

ZÁRÓJELENTÉS

A krónikus lymphocytás leukémia transzformációjában szerepet játszó molekuláris patomechanizmusok (OTKA K-76204) pályázathoz



Témavezető: Dr. Matolcsy András, egyetemi tanár, Semmelweis Egyetem,
1. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

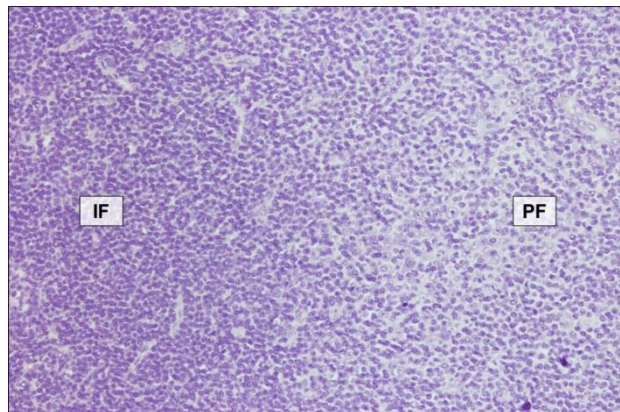
Budapest, 2013. június 25.

TARTALOMJEGYZÉK

1.	A pályázat tudományos háttere és főbb célkitűzései.....	3
2.	A támogatási időszak alatt elért tudományos eredmények bemutatása	4
2.1	Genetikai instabilitás vizsgálata kromoszóma szinten	4
2.2	Génexpressziós profilok meghatározása CLL-ben	6
2.3	MikroRNS expresszió vizsgálata pseudofollicularis mintázatot mutató CLL-ben.....	9
2.4	Epigenetikai vizsgálatok CLL-ben.....	15
2.5	Epigenetikai vizsgálatok follicularis lymphomában.....	16
3.	A pályázati témához szorosan nem kapcsolódó kutatási aktivitás az OTKA támogatás feltüntetésével	19
4.	A pályázati időszak alatt megjelent és bírálókat alatt álló publikációk az OTKA támogatás feltüntetésével	21
5.	Irodalomjegyzék	22

1. A PÁLYÁZAT TUDOMÁNYOS HÁTTERE ÉS FŐBB CÉLKITŰZÉSEI

A krónikus lymphocytás leukémia (CLL) egy indolens megbetegedés, amely az esetek 5-10%-ában egy agresszívebb lymphoma típusba transzformálódik. A transzformáció a prolymphocyták számának emelkedésében (prolymphocytás transzformáció [PLT]), illetve diffúz nagy B-sejtes lymphoma kialakulásában (Richter transzformáció [RT]) nyilvánulhat meg. Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján a különböző molekuláris mechanizmusoknak, így a genetikai instabilitásnak, az aberráns szomatikus hipermutációnak (ASHM) és az emelkedett aktiváció-indukált citidin deamináz (AID) szintnek szerepe lehet a tumorsejtek transzformációjában [1-3], azonban a transzformált sejtek eredete és az azt elindító mechanizmusok nem ismertek. A CLL-es betegek nyirokcsomói a transzformált CLL sejtekre emlékeztető, kevésbé érett sejtekből álló kis csoportokat, ún. pseudofolliculusokat tartalmaznak (1. ábra). A betegség lefolyása során a pseudofolliculusok mérete megnőhet, azonban ezek transzformációval való kapcsolata nem ismert. Feltételezésünk szerint ezen pseudofolliculusok jelentik a CLL progressziójának és transzformációjának kiindulópontját.



1. ábra: Krónikus lymphocytás leukémia (nyirokcsomó metszet, 40x, metilén-kék festés). A felvétel jobb oldalán jól látható a nagyobb, kevésbé érett sejtekből álló pseudofolliculáris régió. (IF: interfolliculáris régió; PF: pseudofolliculáris régió)

Pályázatunk fő célkitűzése a pseudofolliculusok transzformációban betöltött szerepének tisztázása érdekében a pseudofolliculusokat alkotó éretlenebb B-sejtek genetikai és epigenetikai hátterét vizsgáltuk, valamint az itt észlelt genetikai eltéréseket vetettük össze a pseudofolliculusokon kívüli érettebb fenotípusú tumorsejtekben megfigyelt változásokkal.

A pályázati időszak során – az irodalomban aktuálisan megjelenő új felfedezéseknek megfelelően – ez eredeti célkitűzésekhez képest egyéb elképzeléseket is megvalósítottunk, reagálva ezzel a legfrissebb irodalmi adatokra és trendekre. Továbbá, az epigenetika térhódításának

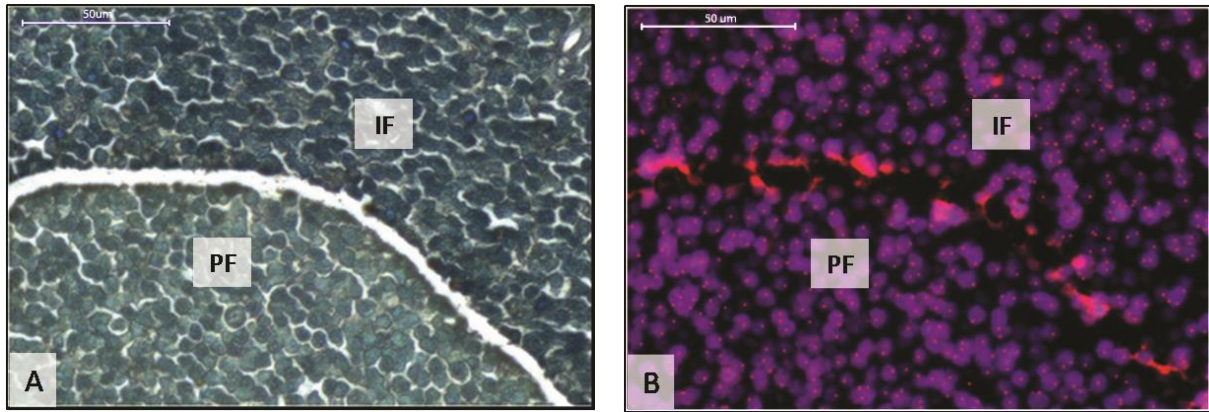
köszönhetően, bizonyos megfigyeléseket, kísérleteket egyéb lymphoma típusokra (döntően follicularis lymphoma) is kiterjesztettünk.

2. A TÁMOGATÁSI IDŐSZAK ALATT ELÉRT TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK BEMUTATÁSA

A CLL progressziójában és transzformációjában szerepet játszó mechanizmusokat több szinten vizsgáltuk. Kezdeti kísérleteinkkel arra kívántunk választ kapni, hogy vajon megfigyelhető-e bizonyos genetikai eltérések akkumulációja a pseudofolliculusok területén (2.1 fejezet). Majd array alapú génexpressziós vizsgálatokkal összehasonlító analízist végeztünk CLL-es betegek nyirokcsomói, csontvelői és perifériás vér mintái között ezen kompartmenteknek a CLL-es tumorsejtekre kifejtett hatását vizsgálva (2.2 fejezet). A pseudofolliculusok további karakterizálása céljából mikroRNS expressziós vizsgálatokat folytattunk összehasonlítva a mikrodisszekcióval szeparált pseudofollicularis és interfollicularis régiókat (2.3 fejezet). Végül az epigenetikai szabályozásban szerepet játszó hiszton metiltranszferáz, EZH2 expresszióját vizsgáltuk CLL-ben (2.4 fejezet). Az elmúlt év rávilágított az epigenetikai szabályozásban bekövetkező változások kulcsszerepére B-sejtes lymphomákban, ahol a follicularis lymphoma (FL) modell értékű betegségként jelent meg. Így bizonyos epigenetikai vizsgálatokat az FL transzformációjának tanulmányozására is kiterjesztettünk (2.5 fejezet).

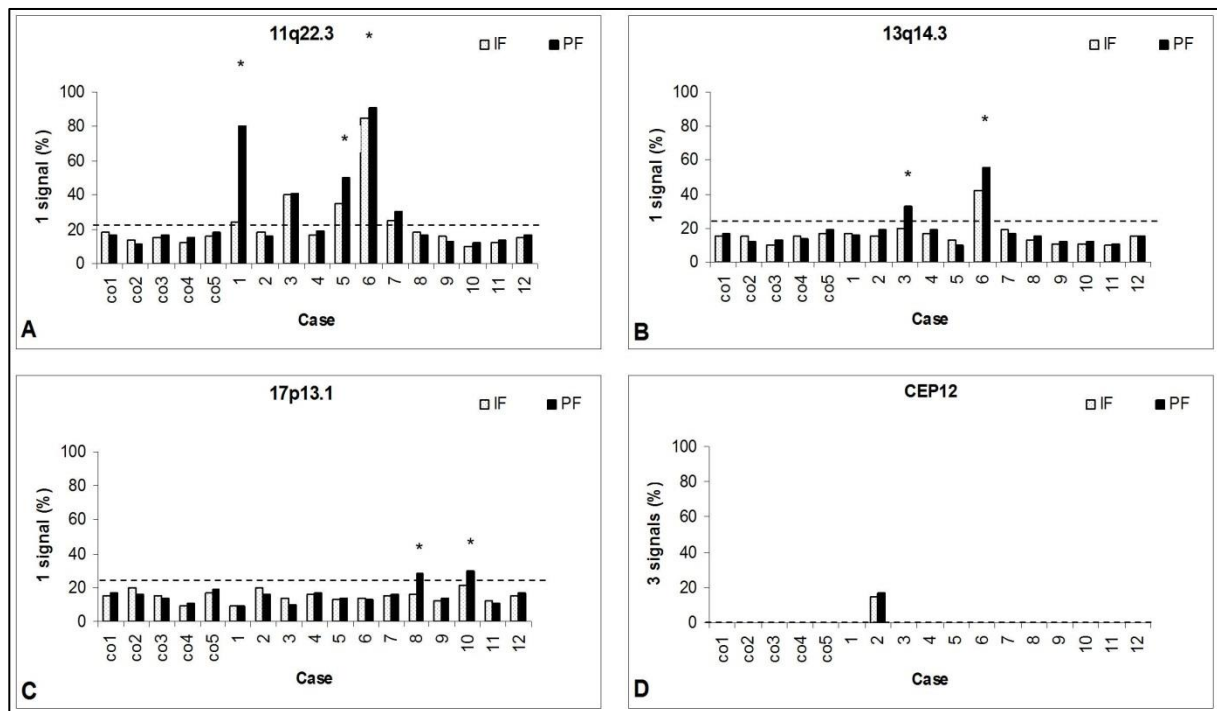
2.1 Genetikai instabilitás vizsgálata kromoszóma szinten

Vizsgálataink során 12 CLL-ben szenvedő beteg formalinban fixált paraffinba ágyazott nyirokcsomó mintáiban del(11)(q22.3) (*ATM*), del(13)(q14.3) (*RB-1*), del(17)(p13.1) (*p53*) és +12 genetikai eltéréseket mutattunk ki fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) eljárással. A pseudofolliculusok demarkációja lézer sugárral történt a metszeteken metilén-kék festést követően. Majd ezt követően 11q22.3 (*ATM*), 13q14.3 (*RB-1*), és 17p13.1 (*p53*) locusokra specifikus single color DNS próbákkal valamint 12 kromoszóma centromera próbával FISH vizsgálatokat végeztünk (2. ábra). Ezt követte a metszetek szkennelése (Mirax Scan, 3D Histech Ltd, Budapest, Hungary) és a szkennelt metszeteket képanalizáló szoftverrel vizsgáltuk (Mirax Viewer 1.11, 3D Histech Ltd, Budapest, Hungary). A pseudofolliculusok relokalizációját követően mindkét területen minimum 300 interfázisos sejtmagot értékeltünk.



2. ábra: Lézerrel jelölt nyirokcsomói pseudofollicularis (PF) és interfollicularis (IF) területek reprezentatív FISH analízise. **(A)** Metilén-kék festés (x60). **(B)** 11q22.3 locus FISH analízise. Rövidítések: IF: interfollicularis régió; PF: pseudofollicularis régió.

11q deléciót 5 esetben detektáltunk, 13q deléció 2 esetben, 17p deléció 2 esetben valamint 12 trizómia 1 esetben volt kimutatható. 7 esetben a pseudofolliculusokban szignifikánsan magasabb volt a genetikai eltérések aránya, mint a PF-t körülvevő interfollicularis zónában (3. ábra).



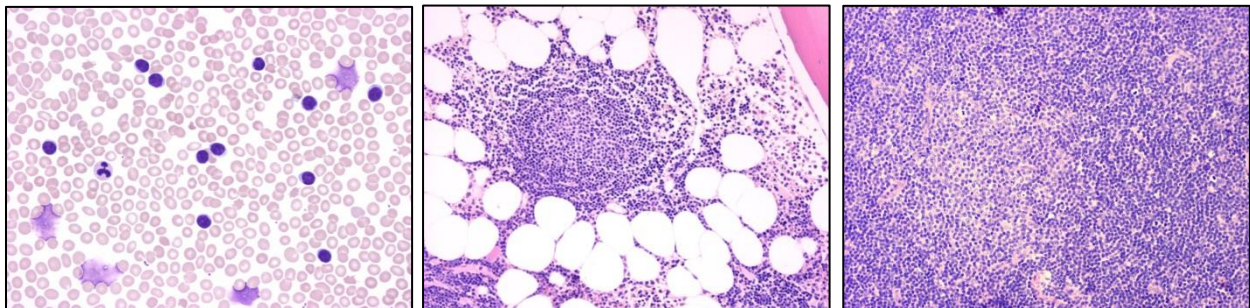
3. ábra: 12 CLL-es beteg FISH vizsgálatának eredményei. **(A)** 11q22.3 (ATM), **(B)** 13q14.3 (RB-1), **(C)** 17p13.1 (p53) locus és **(D)** 12 kromoszóma centromera próba (CEP12). (Balogh és mtsai, *Leukemia & Lymphoma* 2011 alapján).

Eredményeinket a *Leukemia & Lymphoma* folyóiratban publikáltuk [4], ahol közleményükre egy szerkesztői kommentár is megjelent „FISHing for answers in proliferation centers of chronic lymphocytic leukemia lymph nodes” címmel [5]. Ezen eredményeink a pseudofolliculusok szerepét

sugallták a CLL progressziója során, azonban e hipotézis megerősítéséhez további vizsgálatokat folytattunk.

2.2 Génexpressziós profilok meghatározása CLL-ben

A CLL egy csontvelői eredetű betegség, mely során a tumorsejtek a perifériás vérben valamint a nyirokcsomókban is megjelenhetnek. Array alapú globális vizsgálatokkal kívántunk arra választ kapni, hogy a kórkép lefolyása során mely lokalizációban fellépő mikrokörnyezeti hatások következtében alakul ki a tumorsejtek genetikai instabilitása, mely a betegség transzformációjában központi szerepet játszhat.



4. ábra: CLL megjelenése a (A) perifériás vérben, (B) csontvelőben és (C) nyirokcsomóban.

E kísérlet során hat CLL-ben szenvedő betegtől egy időpontban vettünk perifériás vér, csontvelő és nyirokcsomó mintát. A nyirokcsomót teljes egészében feldolgoztuk, a csontvelő-aspirátum és a perifériás vér esetében a mononukleáris sejteket sűrűség-gradiens centrifugálással különítettük el. Minimum 75%-os tumorsejt-arányt sikerült elérni valamennyi minta és kompartment esetében. Az RNS izolálást és minőségellenőrzést követően 18 mintán végeztük el a génexpressziós mérést, amihez *Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray 4x44K* (Agilent Technologies) lemezeket használtunk. A lemezeket Agilent Microarray Scanner segítségével olvastuk le, majd a kapott adatokat az egyszínű oligonukleotid microarray formátumokra javasolt paraméterek alkalmazásával normalizáltuk. Az analízist Genespring GX szoftver segítségével, szigorú statisztikai feltételek mellett (2X-es különbség; TukeyHSD post-hoc test; One way ANOVA $p < 0.001$; Benjamini-Hochberg multiple correction test) végeztük el.

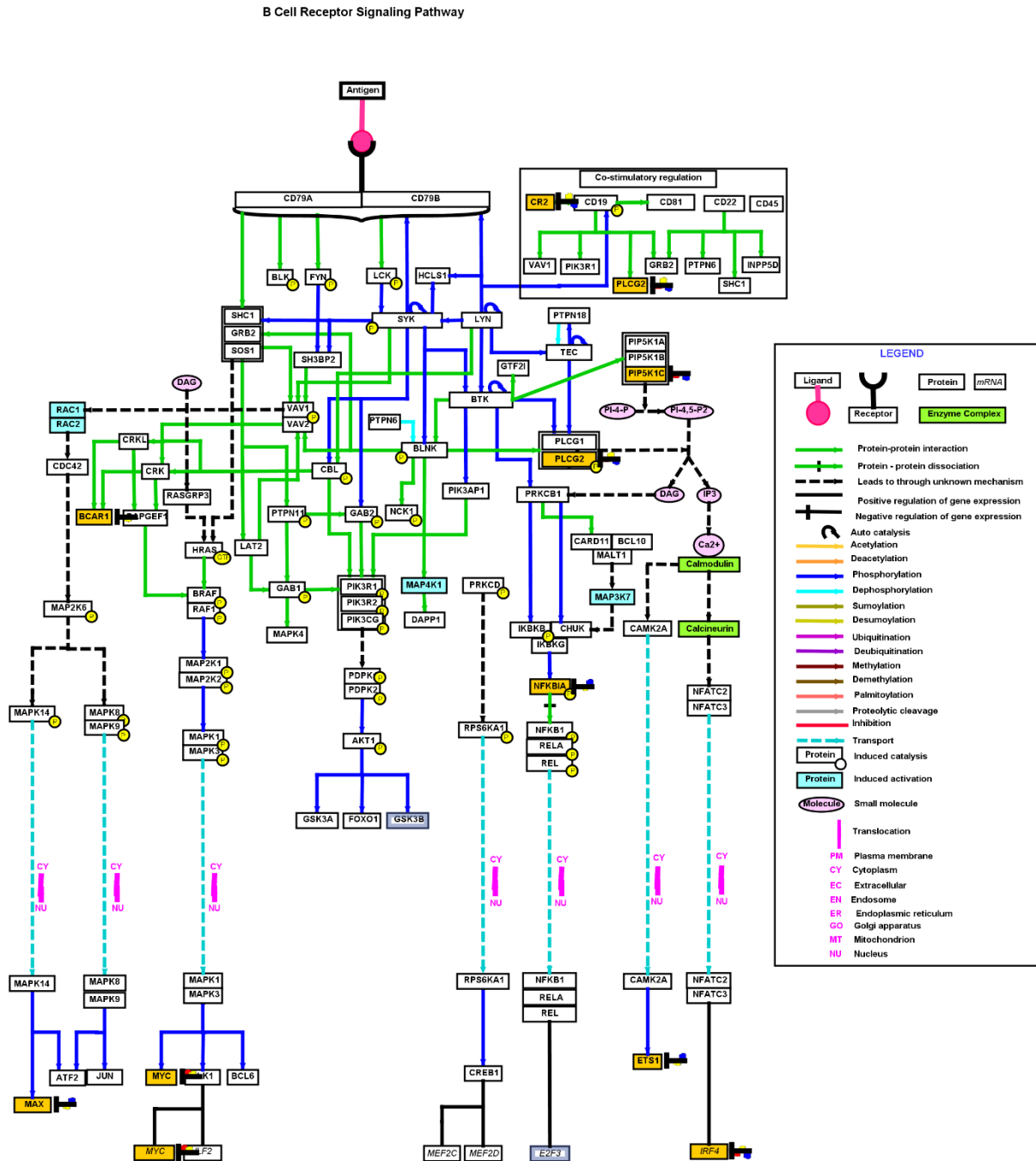
Eredményeink alapján mintegy 200 gén mutatott szignifikánsan különböző expressziót a vizsgált perifériás vér, csontvelő és nyirokcsomó között. A legnagyobb különbséget mutató gének listája az 1. táblázatban található. Az elvégzett útvonal elemzés eredményei alapján a legprominensebb deregulált útvonalak között a B-sejt receptor (BCR) jelátviteli út, az NF κ B mediált

szignál transzdukció, valamint a sejtciklus cyclinek általi szabályozása szerepelt (5. ábra). Ezen eltérések a pseudofolliculusokat is magába foglaló nyirokcsomói mintákban bizonyultak a legkifejezettebbnek, utalva a nyirokcsomói mikrokörnyezet szerepének fontosságára a CLL progressziója során.

Sajnálatos módon, génexpressziós vizsgálatainkkal egyidőben Hesishanu és munkatársai egy, a mi kísérleti rendszerünkkel szinte teljesen megegyező tanulmányt publikáltak a *Blood* folyóiratban 12 CLL-es beteg perifériás vér, csontvelő és nyirokcsomó mintáinak génexpressziós profilját összehasonlítva [6]. Az említett munkacsoport Affymetrix platformot használva jutott lényegében ugyanazon megállapításokra. Így egy alacsony impaktú folyóiratban való publikáció helyett, génexpressziós tanulmányunk eredményeit a mikroRNS expresszióval és epigenetikai szabályozással kapcsolatos megfigyelésekkel integrálva tervezzük közölni.

1.Táblázat: A legnagyobb mértékű eltérést mutató gének listája a génexpressziós analízis alapján.

Gén	Leírás
<i>DEFA3</i>	defensin, alpha 3, neutrophil-specific (DEFA3), mRNA [NM_005217]
<i>HBG1</i>	hemoglobin, gamma A (HBG1), mRNA [NM_000559]
<i>SLC4A1</i>	solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 [NM_000342]
<i>HBG1</i>	hemoglobin, gamma A (HBG1), mRNA [NM_000559]
<i>TRIM58</i>	tripartite motif containing 58 (TRIM58), mRNA [NM_015431]
<i>S100A12</i>	S100 calcium binding protein A12 (S100A12), mRNA [NM_005621]
<i>SPTA1</i>	spectrin, alpha, erythrocytic 1 (elliptocytosis 2) (SPTA1), mRNA [NM_003126]
<i>AHSP</i>	alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP), mRNA [NM_016633]
<i>GYPA</i>	glycophorin A (MNS blood group) (GYPA), mRNA [NM_002099]
<i>MYL4</i>	myosin, light chain 4, alkali; atrial, embryonic (MYL4), transcript variant 2, mRNA [NM_002476]
<i>HEMGN</i>	hemogen (HEMGN), transcript variant 1, mRNA [NM_018437]
<i>EPB42</i>	erythrocyte membrane protein band 4.2 (EPB42), transcript variant 1, mRNA [NM_000119]
<i>LTF</i>	lactotransferrin (LTF), transcript variant 1, mRNA [NM_002343]
<i>CA1</i>	carbonic anhydrase I (CA1), transcript variant 2, mRNA [NM_001738]
<i>HBM</i>	hemoglobin, mu (HBM), mRNA [NM_001003938]
<i>ALAS2</i>	aminolevulinate, delta-, synthase 2 (ALAS2), [NM_000032]
<i>DEFA4</i>	defensin, alpha 4, corticostatin (DEFA4), mRNA [NM_001925]
<i>HBD</i>	hemoglobin, delta (HBD), mRNA [NM_000519]
<i>ALAS2</i>	aminolevulinate, delta-, synthase 2 (ALAS2), [NM_000032]
<i>NFE2</i>	nuclear factor (erythroid-derived 2), 45kDa (NFE2), transcript variant 1, mRNA [NM_006163]



5. ábra: Az útvonal analízis eredményei alapján az egyik leginkább deregulált jelátviteli út a B-sejt receptor mediálta jelátvitel. (Piros, sárga és kék szimbólumok jelzik az adott molekula mellett annak up- vagy downregulációját a nyirokcsomóban, csontvelőben illetve a perifériás vérmintákban).

2.3 MikroRNS expresszió vizsgálata pseudofollicularis mintázatot mutató CLL-ben

A vizsgálat alapvető célja annak felderítése volt, hogy a CLL progressziójában ismerten szerepet játszó mikroRNS-ek között található-e olyan, amely eltérő expressziót mutat a pseudofolliculusokban (proliferációs centrumokban) a környező kis érett CLL sejteket tartalmazó területekhez képest. MikroRNS expresszió analízist 15 esetben végeztünk TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies) segítségével, olyan formalin fixált paraffinba ágyazott CLL-es nyirokcsomókban, amelyekben szövettani vizsgálattal pseudofollicularis mintázatot láttunk. A vizsgálat első lépéseként minden esetben metilénkékkel festett metszetekből lézer-mikrodisszekcióval nyertünk ki kb. 5000 sejtet a pseudofolliculusok területéről, és további kb. 5000 sejtet a kis, érett CLL sejteket tartalmazó területekből. Ezt követően teljes RNS izolálást végeztünk Recover All kit-tel (Life Technologies), majd a vizsgálni kívánt 19 mikroRNS-ből cDNS-t készítettünk reverz transzkripcióval. A lézerrel kimetszett mintákból nyerhető korlátozott RNS mennyiség miatt a valós idejű PCR vizsgálat előtt egy előszorozó (preamplifikáció) lépést is végeztünk. A mikroRNS-ek relatív expresszióját ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems) típusú real-time PCR készülékkel vizsgáltuk. Az amplifikációt követően az adatokat a Sequence Detection Software version 1.3 (Applied Biosystems) szoftver segítségével analizáltuk. Az értékelés során az alkalmazott belső kontrollhoz (U6 snRNS) viszonyított relatív expressziót határoztuk meg delta CT módszer felhasználásával ($\Delta Ct = Ct_{U6} - Ct_{miRNS}$). Statisztikai analízist Wilcoxon teszttel végeztünk.

Az általunk vizsgált mikroRNS-eket, valamint a nemzetközi irodalomból ismert néhány fontosabb, a lymphoma-genesissel is összefüggésbe hozható jellegzetességeiket az *1. táblázatban* foglaltuk össze.

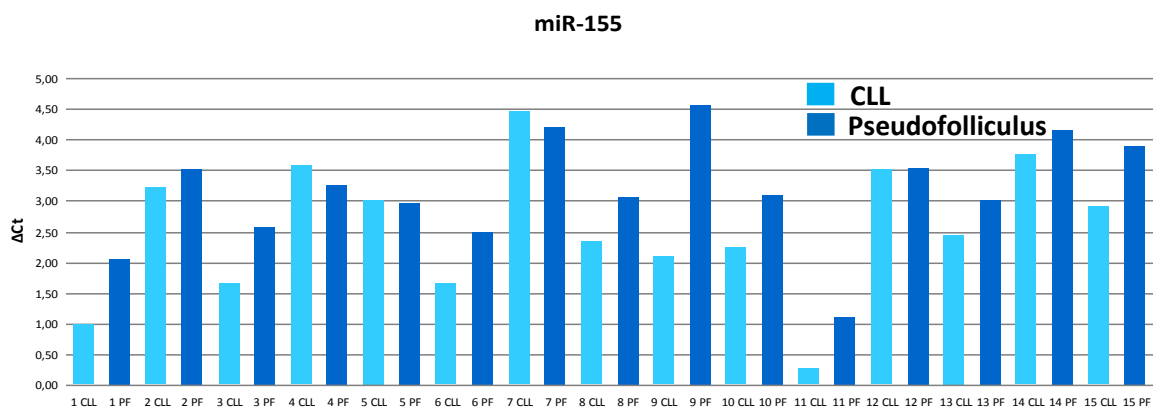
2.Táblázat: A vizsgált mikroRNS-ek és célfehérjéik

mikroRNS	Lokalizáció	Lymphoma/leukémia altípus	Bizonyított és feltételezett célfehérjék
hsa-miR-155	21q21.3	CLL, DLBCL, MCL, SMZL, NK/T, PMBCL, cHL, ALCL-ALK(-), MALT, PCMZL, BL	GCSAM, RTKN2, SMAD5, PIK3R1, INPP5D, DKC1, AKT2, AID, SHIP1, TP53INP1, SOCS1, PU.1
hsa-miR-150	19q13.33	CLL, MCL, NK/T, cHL, PCMZL	TRAF6, DKC1, AKT2, GAB1, FOXP1
hsa-miR-181a	1q32.1	CLL, DLBCL, ATL	MYC, BCL-2, TP53INP1
hsa-miR-21	17q23.1	CLL, SMZL, NK/T, cHL, DLBCL	PDCD4, PTEN, ANP32A, SMARCA4,
hsa-miR-15a	13q14.2	CLL, ALCL, MCL, CTCL	BCL-2, MCL1, CDK-6, TP53, HIF1A, BLIMP1
hsa-miR-16	13q14.2	CLL, ALCL, FL, cHL, CTCL, MCL	BCL-2, MCL1, CDK-6, TP53, HIF1A, BMI1
hsa-miR-29c	1q32.2	CLL, NMZL, FL	TCL1, MCL1, CDK-2, MCL-6, CDK-6, IGF-1R, STAT3
hsa-miR-34a	1p36.22	CLL, DLBCL	BCL-2, CyclinD1, CyclinE2, CDK4, c-MYC, Sirt 1, FOXP1, MET
hsa-miR-221	Xp11.3	CLL, BL, NMZL, DLBCL (ABC)	p27, LMO2, KIT, PTEN
hsa-miR-222	Xp11.3	CLL, BL, DLBCL, DLBCL (ABC)	p27, LMO2, KIT, PTEN
hsa-miR-223	Xq12	CLL, NMZL, CTCL, MALT	LMO2
hsa-miR-101-1	1p31.3	CLL, FL, ALCL	EZH2, FOXP1
hsa-miR-93-5p	7q22.1	CLL	TP53INP1
hsa-miR-650	22q11.22	CLL	CDK1, ING4, EBF3
hsa-miR-92a-1	13q31.3	CLL, AML, ALL	MCL1, DOCK5, FBXW7, BCL2L11, LMO2, NOTCH1, PTEN
hsa-miR-142-3p	17q22	CLL, NK/T, EBV+ ATL	IL1A
hsa-miR-142-5p	17q22	CLL, BL, MALT	IL1A, TP53INP1
hsa-miR-15b	3q25.33	CLL, APL	EZF1
hsa-miR-331	12q22	CLL, ALL, AML	E2F-1, SOCS1

ABC, aktivált B-sejtes; ALCL, anaplasias nagysejtes lymphoma; ALL, akut lymphoid leukaemia; AML, akut myeloid leukaemia; APL, akut prolymphocytás leukaemia; ATL, felnőttkori T-sejtes leukaemia; BL, Burkitt lymphoma; cHL, klasszikus Hodgkin lymphoma; CLL, krónikus lymphocytás leukaemia; CTCL, kután T-sejtes lymphoma; DLBCL, diffúz nagy B-sejtes lymphoma; FL, folliculáris lymphoma; MALT, MALT lymphoma; MCL, köpenysejtes lymphoma; NK/T, NK/T sejtes lymphoma; NMZL, nodális marginális zóna lymphoma; PCMZL, primer kután marginális zóna B-sejtes lymphoma; PMBCL, primer mediastinalis B-sejtes lymphoma; SMZL, splenikus marginális zóna lymphoma.

A megvizsgált 15 pseudofollicularis mintázatot mutató CLL-es nyirokcsomónál a 19 mikroRNS közül 4 esetében találtunk statisztikailag is szignifikáns expresszió különbséget a pseudofolliculusban a környező kis érett CLL sejteket tartalmazó területekhez viszonyítva: *miR-155* ($p=0,005$), *miR-150* ($p=0,009$), *miR92a* ($p=0,011$) és *miR331* ($p=0,022$). Ezeken kívül a miR29c expresszió esetében is jelentős különbséget figyeltünk meg, azonban statisztikailag ez nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,061$). Az egyes esetek pseudofolliculusaira és a környező kis érett CLL sejteket tartalmazó területeire jellemző ΔCt értékeket az 6.-8. ábrákon mutatjuk be a szignifikáns különbséget mutató mikroRNS-ek esetében.

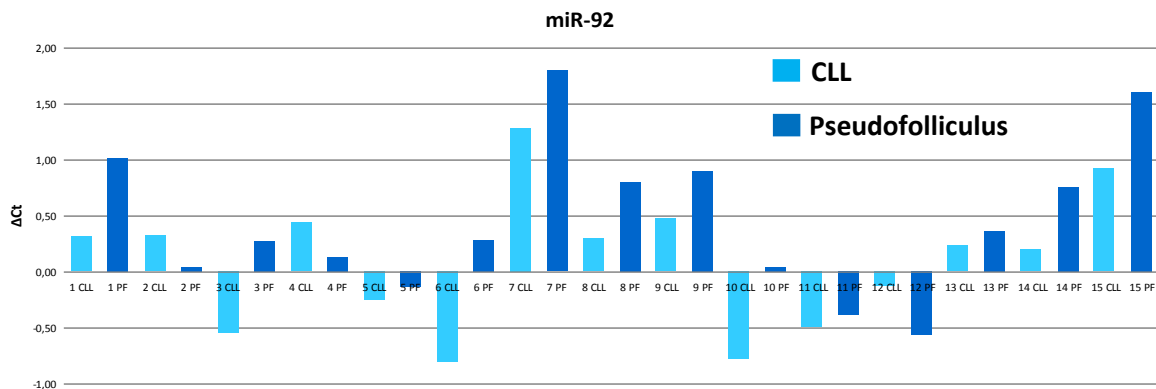
A *miR-155* és a *miR-92a* a pseudofolliculusokban szignifikánsan magasabb expressziót mutatott. A *miR-155* magasabb expresszióját összefüggésbe hozták különféle lymphomák és solid tumorok kialakulásával, ill. progressziójával kapcsolatban, így általános oncomirként tartják számon. A *miR-155* a target gének (pl. *SOCS1* és *SHIP-1*) expressziójának szabályozásával elsősorban a fokozott sejtproliferáció és sejttúlélés irányába hat. Egy CLL-es nyirokcsomó mintákon végzett tanulmányban (Wang M et al. J Pathol, 2008) in situ hibridizációval kimutatták, hogy a BIC/pri-miR-155 (a *miR-155* előalakja) pozitivitást mutató sejtek döntően a pseudofolliculusokra lokalizálódnak. Ezt az adatot kiegészíti eredményünk, mely szerint az érett *miR-155* expressziója is magasabb a proliferációs centrumokban.



6. ábra: *miR-155* expressziója Az egyes esetek pseudofolliculusaira (PF) és a környező kis érett CLL sejteket tartalmazó területeire (CLL) jellemző ΔCt értékek szemléltetésével. A magasabb ΔCt értékek magasabb expressziót reprezentálnak.

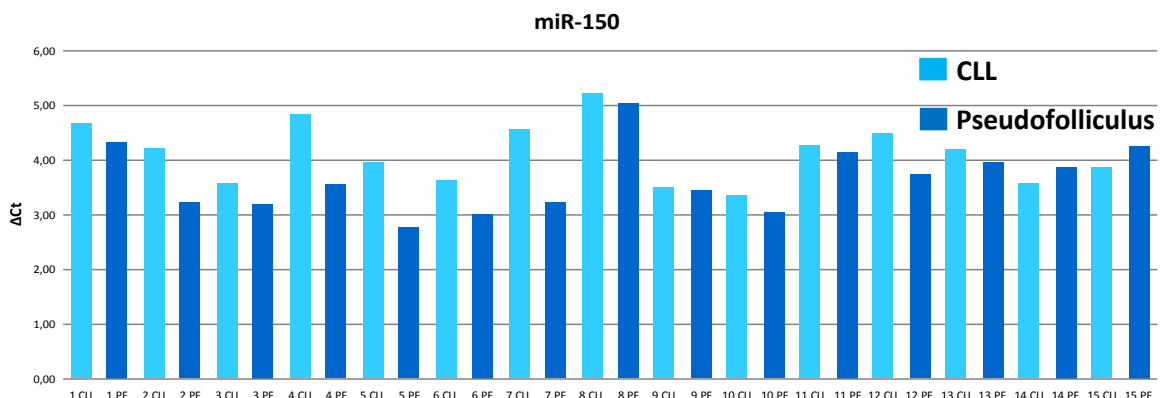
A *miR-92a* a *miR-17-92* cluster tagja és irodalmi adatok alapján expressziójára hatással van pl. az NF κ B és STAT5. A *miR-92a* egyik célfehérjéje a tumorszupresszor PTEN, melyről ismert, hogy CLL-

ben alacsonyabb expressziót mutat. Elképzelhető, hogy a pseudofolliculusokban detektált magasabb miR-92a expresszió a PTEN downregulációján keresztül elősegíti a fokozott sejtnövekedést.



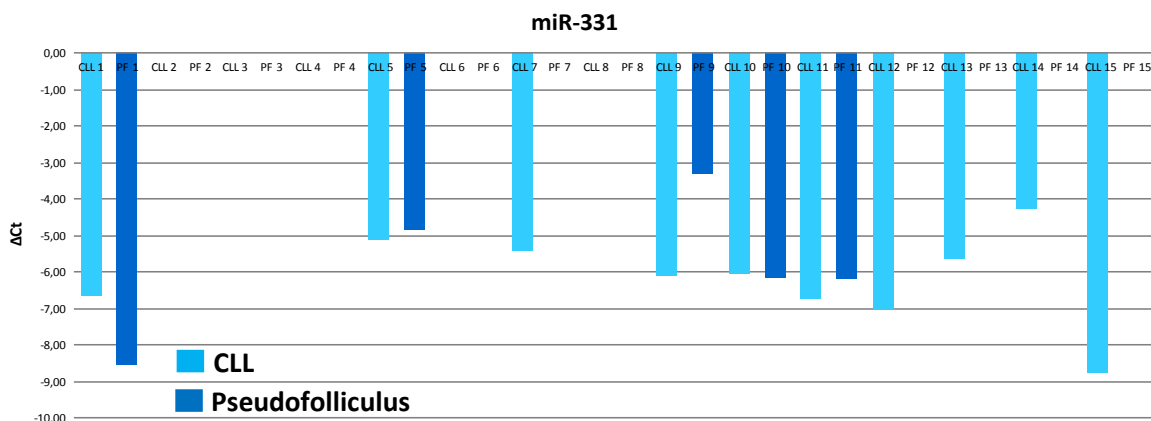
7. ábra: miR-92 expressziója Az egyes esetek pseudofolliculusaira (PF) és a környező kis érett CLL sejteket tartalmazó területeire (CLL) jellemző ΔCt értékek szemléltetésével. A magasabb ΔCt értékek magasabb expressziót reprezentálnak.

A miR-150, a miR-331 és a miR-29c a pseudofolliculusokban alacsonyabb expressziót mutatott a környező kissejtes részekhez képest. A **miR-150**-ról igazolták, hogy részt vesz a BCR-jelátvitel szabályozásában, és pl. az AKT jelátviteli út gátlásán keresztül gátolhatja a sejtnövekedést. A miR-150 egy másik célfehérjéje a FOXP1, melynek fokozott expresszióját leírták rossz prognózist mutató CLL-ben. Ismert, hogy CLL-ben a tumorsejtek általánosan magas miR-150 expressziót mutatnak, és a magas miR-150 expresszió összefüggésbe hozható a betegek hosszabb túlélésével. Ezzel ellentétben, alacsonyabb miR-150 expressziónál a betegek túlélése is rosszabb. A korábban említett in situ hibridizációs vizsgálattal kimutatták, hogy a pseudofolliculusokban kevesebb a miR-150 pozitivitást mutató sejt, amelyet a mi eredményünk is alátámaszt. Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy a proliferációs centrumok alacsonyabb miR-150 expressziója, pl. az AKT jelátviteli út gátlásának csökkenésén keresztül, hozzájárul a CLL progressziójához.



8. ábra: miR-150 expressziója az egyes esetek pseudofolliculusaira (PF) és a környező kis érett CLL sejteket tartalmazó területeire (CLL) jellemző ΔCt értékek szemléltetésével. A magasabb ΔCt értékek magasabb expressziót reprezentálnak.

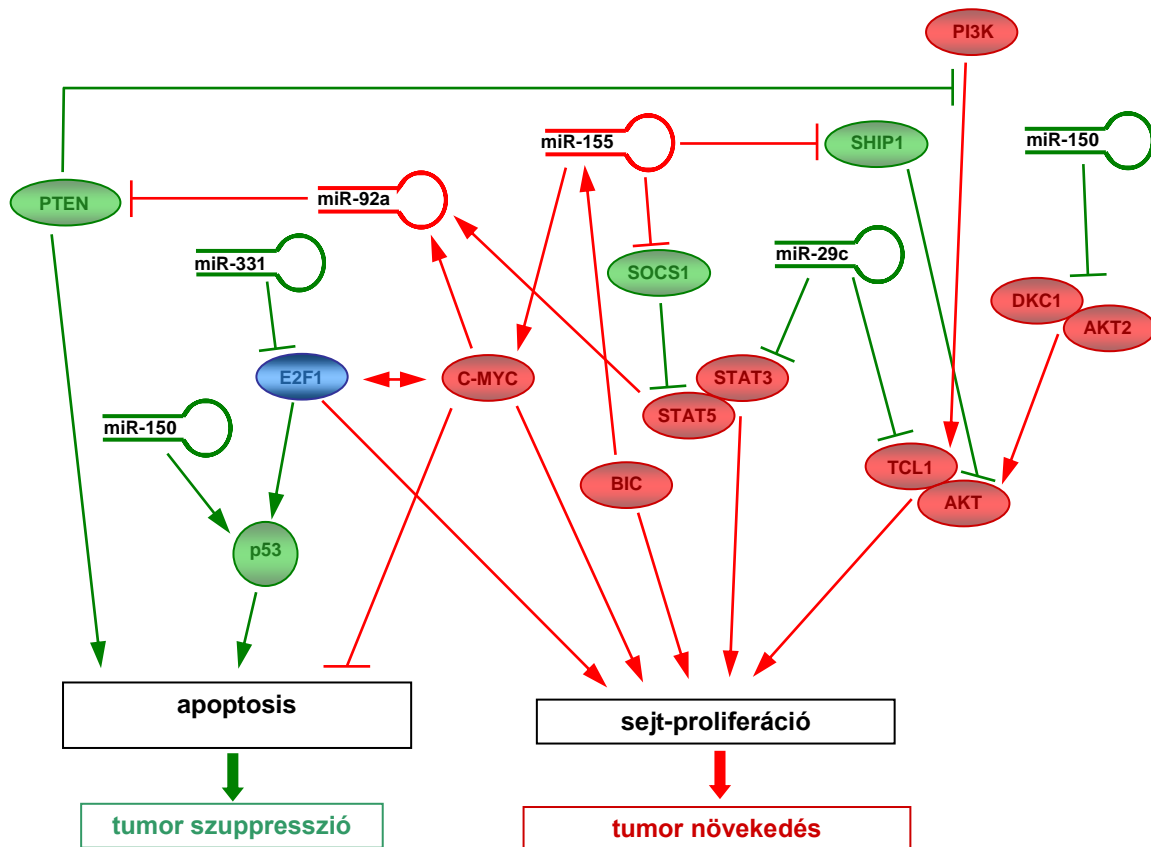
A **miR-331** alacsonyabb expresszióját több tumorban leírták. Egy vizsgálat szerint a miR-331 és az E2F-1 expressziója között közvetlen kapcsolat van, és mivel az E2F-1 tumor-szuppresszorként és onkogénként is viselkedhet, feltételezhető, hogy a miR-331 negatív szabályozásának kiesése miatt a fokozottabban expresszálandó E2F-1 hatása onkogén irányba változik. Vizsgálatunk során 5 esetben egyáltalán nem detektáltunk miR-331 expressziót és a további eseteknél is általában nagyon alacsony expressziót mértünk, amely a pseudofolliculusok területén még alacsonyabbnak bizonyult.



9. ábra: miR-331 expressziója az egyes esetek pseudofolliculusaira (PF) és a környező kis érett CLL sejteket tartalmazó területeire (CLL) jellemző ΔCt értékek szemléltetésével. A magasabb ΔCt értékek magasabb expressziót reprezentálnak.

A miR-29c target fehérjéi közül kiemelendő a TCL1 és a STAT3, melyek gátlásával a sejtproliferáció szabályozásában vesz részt. Egy vizsgálatban a miR-29c és a miR-150 downregulációját figyelték meg rossz prognózisú, ún. „unmutated” IgVH gént expresszáldó CLL-es betegeknél. Eseteink többségénél (11/15 esetben, 73%) megfigyelhető, hogy a miR29c alacsonyabb expressziót mutat a proliferációs centrumokban, így valószínűsíthető, hogy ezeken a területeken a TCL1 és STAT3 aktivitás megnövekedése is hozzájárul a sejtek fokozott proliferációjához és túléléséhez.

Az eredményeinket az irodalmi adatokkal összevetve a pseudofolliculusokban zajló és a CLL progresszióját feltehetően befolyásoló feltételezett mechanizmusokat a *10. ábrán* foglaltuk össze.



10. ábra: Az eredményeink alapján a pseudofolliculusokban jelentős expresszió különbséget mutató mikroRNAs-ek feltételezett, a CLL progresszióját befolyásoló hatásmechanizmusai. A pirossal jelölt mikroRNAs-ek fokozott expresszióját figyeltük meg a pseudofolliculusokban. Ezen mikroRNAs-ek döntően tumor szupresszor szereppel bíró molekulák negatív regulátorai. A zölddel feltüntetett mikroRNAs-ek döntően (proto-)onkogén funkciót betöltő molekulák szabályozói. Ezen mikroRNAs-ek csökkent expresszióját figyeltük meg a pseudofolliculusokban, így valamennyi szignifikáns eltérést mutató mikroRNAs expresszió változásának eredője a betegség progressziójának irányába mutat.

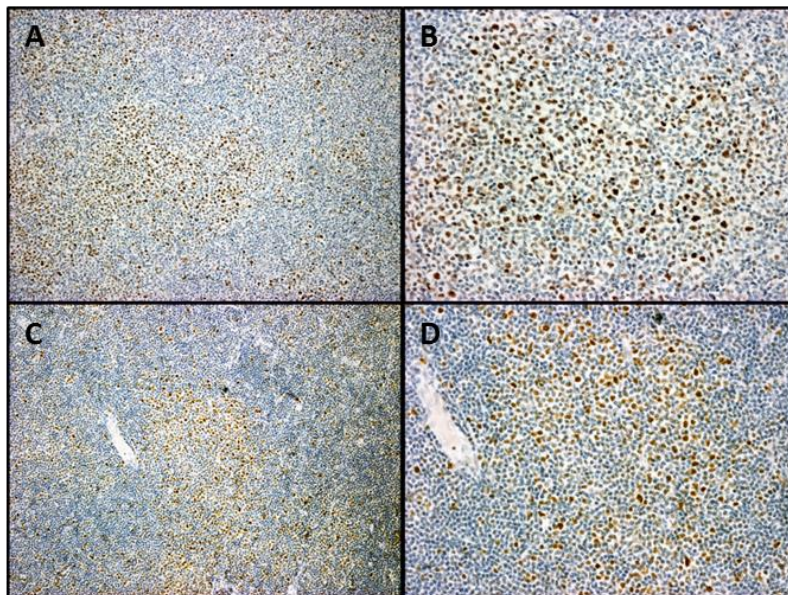
Eredményeink alapján további vizsgálatokat végzünk: (i) az esetek IgVH mutációs státuszának meghatározása és ezek összevetése a klinikai, genetikai és mikroRNAs expressziós adatokkal, (ii) a szignifikáns különbséget mutató mikroRNAs-ek esetében az irodalomból ismert jelentősebb célgének mRNAs és fehérje expressziójának tanulmányozása.

Összességében eddigi megfigyeléseink egy új nézőpontból is megerősítik azt a felvetést, mely szerint a pseudofolliculusban zajló folyamatok kiemelt jelentőségűek a CLL progressziójában. Az eredményeket összefoglaló kézirat beküldés előtt áll.

2.4 Epigenetikai vizsgálatok CLL-ben

Az elmúlt 1-2 év az epigenetikai szemléletmód előretörését hozta a lymphomák területén, aminek során számos lymphoma entitásban írták le az epigenetikai szabályozás különböző szintjeinek zavarát. Döntően a hiszton metilációs és acetilációs gépezet meghibásodása jelenik meg új momentumként e daganatok körében. CLL-ben ugyanakkor viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre e területen. Papakonstantinou és munkatársai egy hiszton metiltransferáz, az EZH2 fokozott expresszióját írták le az agresszívabb klinikai képet mutató CLL-ek esetében, ami összefüggött a az EZH2 negatív szabályozójának, a mir-101-nek csökkent expressziójával [7].

MikroRNS tanulmányunk során mi is vizsgáltuk a mir-101 expresszióját, és bár az nem mutatott szignifikáns eltérést a pseudofollicularis és interfollicularis területek között, az EZH2 fehérje expresszió az esetek többségében döntően a pseudofolliculáris területekre lokalizálódott (11. ábra). Ez az izgalmas, új megfigyelés tovább erősíti eredeti felvetésünket, miszerint a pseudofolliculusok feltehetően kiindulópontját jelentik a CLL progressziójának. Ennek jelentőségét tovább emeli az a tény, hogy az EZH2 metiltransferáz egy vonzó terápiás célpontot képvisel szolid tumorokban és lymphomákban egyaránt [8, 9].

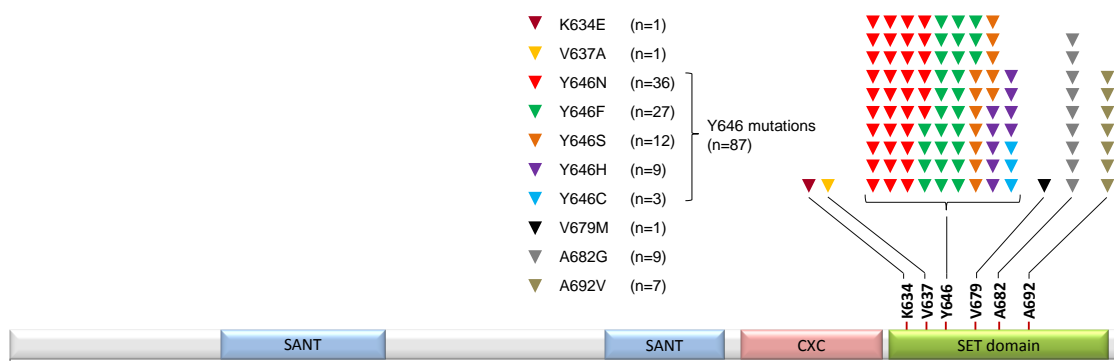


11. ábra: EZH2 expresszió pseudofollicularis mintázatot mutató CLL-ben. Két eset reprezentatív felvételén látható, hogy az EZH2 fehérje expresszió nagyrészt a pseudofolliculusok területére lokalizálódik (A, C: 10x-es nagyítás, B, D: 20x-szoros nagyítás).

A fenti eredmények fényében további epigenetikai szabályozó molekulák és kromatin jelek analízisét tervezzük CLL-ben. Vizsgálni fogjuk, hogy a fokozott EZH2 expresszió szerepet játszik-e CLL a Richter transzformációjában. Az EZH2 fehérjeszintű expresszióján túl vizsgálni tervezzük az enzimmel asszociált represszív kromatin jel, a H3K27me3 depozícióját transzformáció előtt CLL-es és transzformáción átesett CLL-es mintapárok analízisével. A pseudofolliculusok területén megfigyelt magas EZH2 expresszió hátterében a mikroRNS szintű szabályozás zavarán túl egyéb jelátviteli utak meghibásodása is állhat, többek között az AKT és c-MYC mediálta jelátvitel, amit ugyancsak vizsgálni tervezünk ezen előzetes eredmények alapján.

2.5 Epigenetikai vizsgálatok follicularis lymphomában

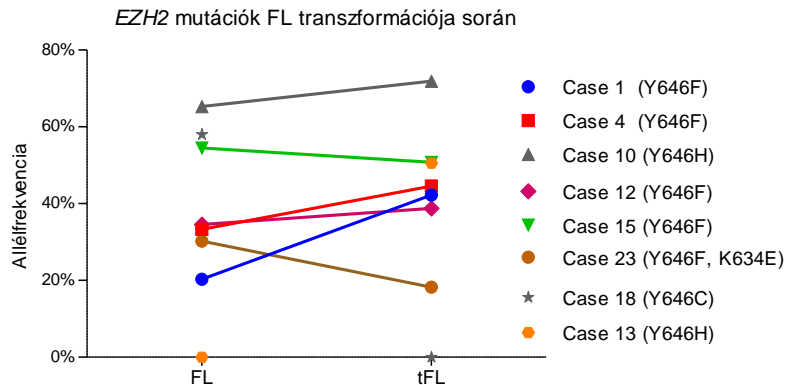
Az *EZH2* hiszton metiltransferáz aktiváló mutációit írták le follicularis lymphomában szenvedő betegek mintegy 8%-ában [10]. Mivel az első tanulmány alacsony esetszámon vizsgálta ezen mutációk gyakoriságát és eloszlását, valamint figyelembe véve azt, hogy az *EZH2* az aktiváló mutációk következtében egy vonzó terápiás célpontként jelent meg, új generációs szekvenálási eljárással vizsgálatuk az *EZH2* mutációkat mintegy 400 FL beteg mintáján, a teljes kódoló régiót analizálva. A korábban közölt eredményeknél lényegesen magasabb mutációs gyakoriságot figyeltünk meg: esetek mintegy 24%-ában sikerült *EZH2* mutációt kimutatni a katalitikus aktivitással rendelkező SET doménben (12. ábra). A variáns allélfrekvenciák analízise arra utal, hogy ezen mutációk többsége valódi klonális eltérésnek tekinthető.



12. ábra: Funkciónyeréses *EZH2* mutációk eloszlása és típusai follicularis lymphomában (n=400).

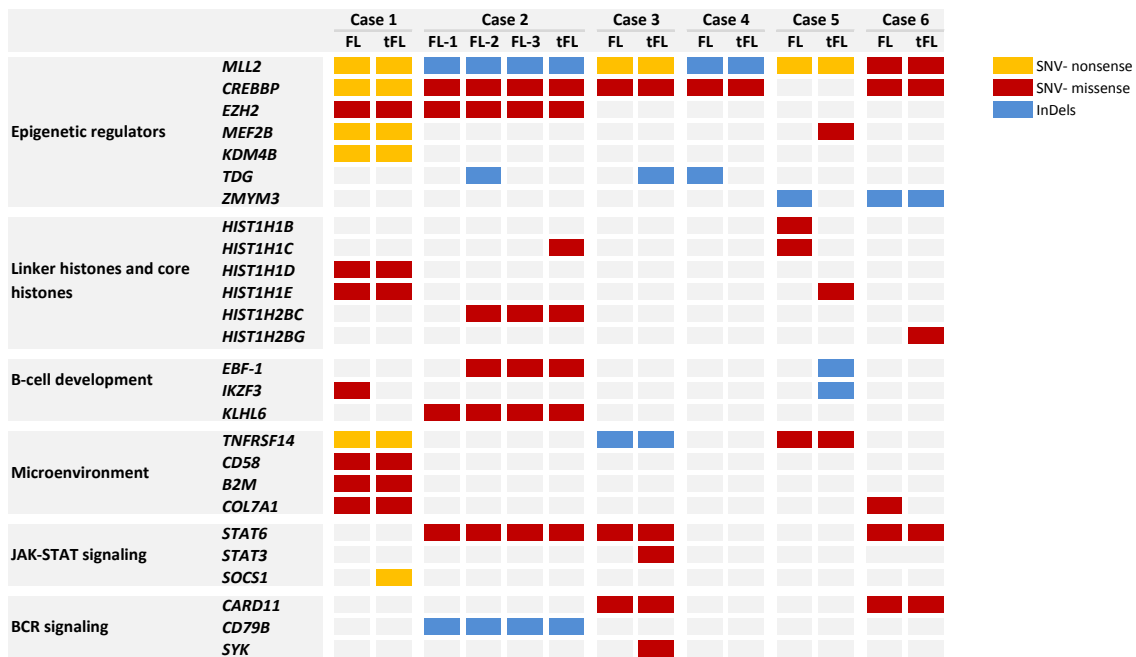
Vizsgáltuk továbbá az *EZH2* mutációk mintázatát az FL transzformációja során a transzformációt megelőző és azt követő minta-párok analízisével. Eredményeink alapján az *EZH2*

mutációk az esetek többségében a transzformáció előtt és után is jelen voltak, viszonylag stabil variáns allélfrekvenciával (12. ábra), ami arra utal, hogy az *EZH2* mutációk korai „driver” eltérésnek tekinthetők, ami alapján a szelektív *EZH2* gátlószer alkalmazása racionális terápiás stratégiát jelenthet FL-ben. Az *EZH2* mutációkkal kapcsolatos eredmények publikálása folyamatban van a *Blood* folyóiratban.



13. ábra: *EZH2* mutációk follicularis lymphoma transzformációja során.

Az új generációs szekvenáláson alapuló teljes genom és exom tanulmányok térnyerésének köszönhetően az elmúlt két év során számos új epigenetikai szabályozó molekula gyakori mutációit írták le FL-ben, többek között az *MLL2* hiszton metiltranszferáz, a *CREBBP* és *EP300* acetiltranszferázok mutációi jelentek meg újonnan leírt „driver” eltéréseként [11]. Egy nemzetközi együttműködés keretén belül lehetőségünk nyílt teljes genom szekvenálást végezni 6 FL-ben szenvedő beteg agresszívebb lymphomába történő transzformáció előtti és a transzformációt követő minta-párjain a transzformációban szerepet játszó mutációk feltárásának céljából. A genomszekvenálás során az eddig ismert mutációs célpontokon túl (*EZH2*, *MLL2*, *CREBBP*, *EP300*), több, korábban FL-ben még nem közölt jelátviteli út komponenseinek mutációit írtuk le. Ezek közül a legjelentősebbek a JAK-STAT jelátviteli komponensei: *STAT6* és *SOCS1* gének; korai B-sejt fejlődésben szerepet játszó gének: *EBF1*, *IKZF3*; valamint a BCR jelátvitel néhány komponense: *CD79B*, *CARD11* (14. ábra). E tanulmány az FL transzformációjának genom szintű térképét tárja elénk, a betegség klonális evolúciójáról is új információkat szolgáltatva. Eredményeink publikációja folyamatban van a *Nature Genetics*-ben (első revízió).



14. ábra: Teljes genom szekvenálással analizált FL és transzformáción átesett FL mintapárokban megfigyelt főbb mutációs célpontok és jelpályák összefoglalása.

3. A PÁLYÁZATI TÉMÁHOZ SZOROSAN NEM KAPCSOLÓDÓ KUTATÁSI AKTIVITÁS AZ OTKA TÁMOGATÁS FELTÜNTETÉSÉVEL

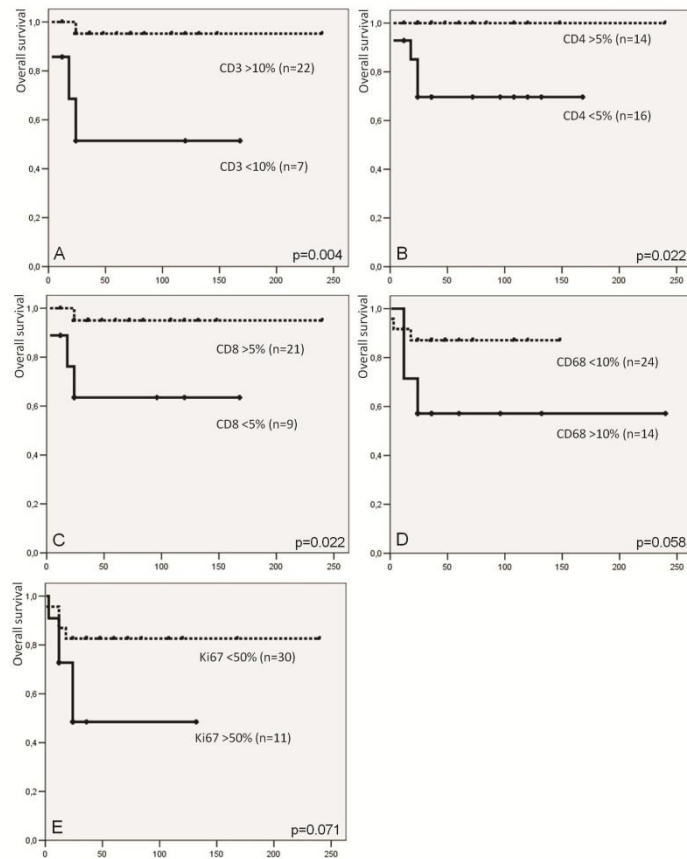
Az alább ismertetett kutatási téma nem kapcsolódik szorosan jelen pályázatban megfogalmazott célkitűzésekhez, azonban mikrokörnyezet és lymphoma progresszió analízis lévén, szervesen kapcsolódik munkacsoportunk fő kutatási irányához. E tevékenység eredményeként készült publikáció esetében is feltüntetésre került a jelen OTKA támogatás.

Vizsgálatunk során a mikrokörnyezet szerepét elemeztük a primer csont diffúz nagy B-sejtes lymphomák prognózisában. A primer csont diffúz nagy B-sejtes lymphoma (PBDLBCL) egy önálló klinikopatológiai entitás, mely az extranodalis lymphomák közel 5%-t teszi ki. A betegség prognózisával összefügg a fiatalabb életkor, korai stádium, alacsony IPI score, a centroblastos morfológia és a tumorsejtek centrum germinatívum B-sejt eredete. Kísérleteink során tisztázni kívántuk a tumor mikrokörnyezet sejtösszetételét, a tumorsejtek fenotípusát, valamint a PI3K/TOR szignál transzdukciós útvonal szerepét a betegség prognózisa és progressziója tükrében.

41 PBDLBCL-ben szenvedő beteg biopsziás mintájából szöveti multiblokk technika (TMA) alkalmazásával meghatároztuk a tumorsejtek sejteredetét Tally algoritmus segítségével. Majd ezt követően különböző T-sejt szubpopulációkra, makrofágokra, illetve dendritikus sejtekre specifikus antitestekkel megvizsgáltuk a reaktív tumor mikrokörnyezet sejtösszetételét, illetve meghatároztuk a reaktív sejtek százalékos arányát. Továbbá vizsgáltuk az mTOR útvonal aktivitását a tumorsejtekben.

Eredményeink alapján szignifikáns különbség volt kimutatható a tumort infiltráló T-lymphocyták arány szempontjából a komplett remissziót mutató, valamint a progressziót mutató esetekben. A jó prognózist mutató esetekben 10% feletti CD3+ T-lymphocytá arány, valamint az 5% feletti CD8+ és CD4+ T-lymphocytá arány volt észlelhető. A tumorsejtek magas proliferációs rátája, illetve magasabb arányú makrofág infiltráció a mikrokörnyezetben rossz prognózisú esetekben volt megfigyelhető (15. ábra).

Eredményeink szerint a nagy arányú T-sejtes infiltráció független prognosztikai faktornak bizonyult a PBDLBCL túlélésének szempontjából, ami összhangban van a nodális DLBCL-ben leírtakkal és alátámasztja azt az elképzelést, hogy a tumor „immunsurveillance” fontos faktor a betegek túlélése szempontjából. Ezen megfigyelések publikációja beküldött kézirat formájában folyamatban van.



15. ábra: A T-sejt subpopulációk, makrofágok, valamint a tumorsejtek osztódási rátájának vizsgálata a túlélés szempontjából

Vizsgálatunk során ugyanakkor nem találtunk különbséget a túlélés szempontjából a centrum germinatívum B-sejtes (GCB) illetve az aktivált B-sejtes (ABC) eredetű esetek között. Az mTOR útvonal aktivációja magasabb volt az aktivált B-sejtes eredetű esetekben, azonban a túléléssel nem mutatott összefüggést. (Az mTOR útvonalat szöveti microarray technika segítségével nodális diffúz nagy B-sejtes lymphomában és Hodgkin lymphomában is vizsgáltuk. E tanulmányok már megjelent publikációt a *4. fejezetben* soroljuk fel: Sebestyén és mtsai 2012, valamint Márk és mtsai 2013.

4. A PÁLYÁZATI IDŐSZAK ALATT MEGJELENT ÉS BÍRÁLAT ALATT ÁLLÓ PUBLIKÁCIÓK AZ OTKA TÁMOGATÁS FELTÜNTETÉSÉVEL

▪ Elfogadott közlemények:

1. Balogh, Z. et al., *High rate of neoplastic cells with genetic abnormalities in proliferation centers of chronic lymphocytic leukemia*. *Leukemia & lymphoma*, 2011. **52**(6):1080-4. IF: 2.580.
2. Sebestyen, A., et al., *Activity and complexes of mTOR in diffuse large B-cell lymphomas--a tissue microarray study*. *Mod Pathol*, 2012. **25**(12): p. 1623-8. IF: 4.792.
3. Mark, A., et al., *Characteristic mTOR activity in Hodgkin-lymphomas offers a potential therapeutic target in high risk disease - a combined tissue microarray, in vitro and in vivo study*. *BMC Cancer*, 2013. **13**: p. 250. IF: 3.330.

▪ Bírálattal álló közlemények (módosítások elvégzése folyamatban):

4. Bödör, C. et al., *High incidence of EZH2 mutations with variable allele frequencies in follicular lymphoma and its consequences for ezh2 targeted therapy*. Közlésre elküldve, javított verzió elkészítése folyamatban, *Blood*, IF: 9.898.
5. Bödör, C., Okosun J., Wang J. et al., *Integrated genomic analysis reveals the driver mutations and evolution patterns fundamental in the initiation and progression of follicular lymphoma*. Közlésre elküldve, javított verzió elkészítése folyamatban, *Nature Genetics*, IF: 35.532.
6. Rajnai, H. et al., *Impact of the microenvironment on the prognosis of primary bone diffuse large B cell lymphoma*, *Histopathology*, IF: 3.500

A bírálattal álló publikációk (4-6) címlapját és absztraktját mellékletként csatoltuk a pályázati jelentéshez.

5. Irodalomjegyzék

1. Balogh, Z., et al., IgVH gene mutation status and genomic imbalances in chronic lymphocytic leukaemia with increased prolymphocytes (CLL/PL). *Hematological oncology*, 2007. 25(2): p. 90-5.
2. Reiniger, L., et al., 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*, 2006. 20(6): p. 1089-95.
3. Bognar, A., et al., Clonal selection in the bone marrow involvement of follicular lymphoma. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 2005. 19(9): p. 1656-62.
4. Balogh, Z., et al., High rate of neoplastic cells with genetic abnormalities in proliferation centers of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 2011. 52(6): p. 1080-4.
5. Zent, C.S., A. Polliack, and T. Tadmor, FISHing for answers in proliferation centers of chronic lymphocytic leukemia lymph nodes. *Leuk Lymphoma*, 2011. 52(6): p. 946-7.
6. Herishanu, Y., et al., The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2011. 117(2): p. 563-74.
7. Papakonstantinou, N., et al., Differential microRNA Profiles and Their Functional Implications in Different Immunogenetic Subsets of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Mol Med*, 2013. 19: p. 115-23.
8. Knutson, S.K., et al., Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(19): p. 7922-7.
9. Knutson, S.K., et al., A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nat Chem Biol*, 2012. 8(11): p. 890-6.
10. Morin, R.D., et al., Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet*, 2010. 42(2): p. 181-5.
11. Morin, R.D., et al., Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*, 2011. 476(7360): p. 298-303.