

**A köpenysejtes lymphoma blasztoz variáns hisztológiai  
megjelenése és sejteredetének meghatározása az  
immunglobulin nehézlánc gén szerveződése alapján**

**PhD-értekezés**

**dr. László Terézia**  
**Pécsi Orvostudományi Egyetem**  
**1999.**

*Témavezető: Dr. Matolcsy András, POTE Pathológiai Intézet*

## Tartalomjegyzék

1. Összefoglalás.....	3
2. Bevezetés és célkitűzések.....	4
3. A célkitűzések megvalósításának elvi háttere.....	7
3.1. A KL feno- és genotípusa és ezek szerepe a KL diagnosztikájában.....	7
3.2. Az IgH génanalízis szerepe a KL és KL-BV klonális kapcsolatának és érettségi fokának megállapításában.....	9
3.3. A KL és a KL-BV tumorsejtjeinek klonális kapcsolata.....	10
3.4. A KL-BV tumorsejtjeinek érettségi foka.....	11
4. A cékitűzések megvalósításához használt anyagok és módszerek.....	14
4.1. Beteganyag.....	14
4.2. A tumorsejtek immunfenotípusának meghatározása.....	15
4.3. DNS izolálása natív és formol paraffinos szövetmintából.....	15
4.4. A t(11;14) kromoszóma transzlokáció kimutatása PCR segítségével.....	16
4.5. Az IgH gén CDR 3 régiójának PCR amplifikációja.....	16
4.6. A V <sub>H</sub> -D-J <sub>H</sub> gén PCR amplifikációja.....	17
4.7. Az IgH gén klónozása és nukleinsav szekvenciájának meghatározása.....	19
4.8. A szomatikus mutációk statisztikai vizsgálata.....	20
5. Eredmények.....	22
5.1. A KL jellemzése a patomorfológiai, citológiai és genetikai jellemzők alapján.....	22
5.1.1. Szövetteni megjelenés.....	22
5.1.2. Immunfenotípus.....	25
5.1.3. A t(11;14) kromoszóma transzlokáció kimutatása PCR segítségével.....	26
5.2. A KL és a KL-BV klonális kapcsolata.....	26
5.2.1. A KL és a KL-BV szövetteni megjelenése.....	26
5.2.2. A KL és a KL-BV által expresszált IgH génnek CDR3 struktúrája.....	27
5.3. A KL-BV sejteredete.....	30
5.3.1. A KL-BV szövetteni megjelenése.....	30
5.3.2. Az átrendeződött Ig V <sub>H</sub> -D-J <sub>H</sub> gén szekvenciájának analízise.....	30
5.3.3. Mutációanalízis.....	35
6. Megbeszélés.....	36
7. Rövidítések.....	43
8. Irodalomjegyzék.....	44
9. A PhD dolgozat alapjául szolgáló közlemények, absztraktok és előadások.....	53

## 1. Összefoglalás

A köpenysejtes lymphoma (KL) egy klinikopathológiai entitás, mely változatos hisztológiai és citológiai megjelenése alapján széles spektrumot ölel fel. A többségben közpnagy sejtekből felépülő tumort "klasszikus" KL-nak, míg a blasztokból állót blasztos variánsnak (KL-BV) nevezték el (33). A két szubtypus elkülönítése, illetve ezen entitások hisztológiai, immunhisztológiai és genetikai alapokon történő osztályozása ma is differenciáldiagnosztikus problémát jelent.

Vizsgálataink fő célkitűzése a KL-BV jellemzésére irányul, mely kérdést három irányból közelítjük meg. /1/. Jellemezzük és csoportosítjuk a KL különböző patomorfológiai megjelenési formáit, szubtypusait, különös tekintettel az újabb diagnosztikus lehetőségekre. /2/. Vizsgáljuk a KL és KL BV közti klonális kapcsolatot. /3/. Végül a KL-BV sejteredetének meghatározása céljából a tumorsejtek által expresszált immunglobulin nehézlánc (IgH) gént térképezzük fel.

Tanulmányunk első részében a Pécsi Orvostudományi Egyetem Pathológiai Intézetében működő Lymphoma Referencia Centrumban 1988 és 1995 között regisztrált centrocitás lymphomának és centrocitoid centroblasztomának véleményezett 67 reprezentatív non-Hodgkin lymphoma (NHL) retrospektív vizsgálatát végeztük el. A kiválasztott 67 NHL közül 63 bizonyult KL-nak a tumorszövet hisztológiai és citológiai megjelenése, valamint a tumorsejtek immunfenotípusa és genotípusa alapján. Megfigyeléseink szerint a KL-ák hisztológiai és citológiai spektrumot képviselnek a kissejtes formától a blasztosig. A noduláris forma citás, míg a diffúz forma blasztos vagy kevertsejtes citológiai megjelenéssel jár gyakrabban együtt. A diagnózis felállítását elősegíti a sejtek immunfenotípus vizsgálata, azonban az általunk alkalmazott molekuláris genetikai vizsgálatok csak az esetek töredékében nyújtanak segítséget.

Kísérleteink második részében a mérsékelt és kifejezett malignitású KL tumorsejtjei közötti klonális kapcsolat feltérképezése céljából két olyan KL molekuláris vizsgálatát végeztük el, melyek kórlefolyása során biztos transzformáció eredményeként KL-BV alakult ki. Vizsgálati anyagunkban a KL és a KL-BV "hároms complemententeritást determináló régió" (CDR3) génszakaszának azonossága egyértelmű bizonyítéka annak, hogy a KL-BV az eredeti KL klónból származik. A szekvencia analízis eredménye arra enged következtetni, hogy interklonálisan divergált szubklónok nem fordulnak elő sem KL-ban sem annak transzformált formájában. Tehát szomatikus mutáció nem játszik szerepet a KL hisztológiai transzformációjában.

Végül a KL-BV sejteredetének meghatározása céljából négy KL-BV esetben tanulmányoztuk a tumorsejtek átrendeződött IgH génjeinek nukleinsav szekvenciáit. Eredményeink arra utalnak, hogy a KL-BV tumorsejtjei származhatnak mutálatlan Ig géneket hordozó, naív, pre-centrum germinativum B-sejtekből, vagy reprezentálhatnak malignusan transzformált, antigén (Ag) szelektált, mutált Ig géneket expresszáló érett B-sejteket. Továbbá ezen mutációk természete és eloszlása lehet véletlenszerű vagy következményes, az Ag szelekció közreműködésétől függően. Függetlenül az Ag szelekció jelenlététől vagy hiányától a vizsgált IgH gének szomatikus mutációja nem volt összefüggésben interklonális diverzifikációval. Összességében ezen adatok arra utalnak, hogy a B-sejt differenciálódás számos fázisában alakulhat ki neoplasztikus transzformáció, mely a KL-BV kialakulását eredményezi.

## 2. Bevezetés és célkitűzések

A KL néven ismert B-sejtes NHL egy klinikopatológiai entitás, melyet a Rappaport osztályozásban intermedier lymphocytás lymphomának, vagy

alacsonyán differenciált lymphocytás lymphomának (27), a Lukes-Collins osztályozásban "small cleaved cell", vagy "follicular center cell" lymphomának (37), a Working Formulation (WF) szerint "small cleaved cell" vagy "large cleaved cell" lymphomának (1), míg a Kiel osztályozásban centrocytás lymphomának nevezték (61). A napjainkban használatos KL elnevezés 1991-ben az International Lymphoma Study Group javaslatára került bevezetésre (5) és ezen elnevezéssel került be a "Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasm" (REAL) (21) és a legújabb WHO osztályozási tervezetbe is.

A KL a nyiroktüszők köpenysejtjeinek tumora, mely sajátos klinikai megjelenéssel és lefolyással jár. Bár a kiel-i osztályozás a mérsékelt malignitású NHL-ák közé sorolta és a REAL, valamint a WHO ideiglenes osztályozása is a perifériás, érett B-sejtes NHL-ák között említi, klinikai lefolyása a mérsékelt malignitású NHL-ák között az előnytelenebbek közé tartozik (62). Eltérően a kifejezett malignitású NHL-tól a KL-s betegek túlélési görbéiben plateaueképződés nem mutatkozik. Ennek magyarázata abban keresendő, hogy magas a tumorsejtek proliferációs aktivitása és a betegek jelentős részében a tumor a diagnózis időpontjában előrehaladott stádiumban van (6,48).

A klinikai lefolyásában is jelentősen eltérő KL-ák esetében a patomorfológiai alapon történő diagnózis alkotást nehezíti, hogy a kórkép hisztológiai és citológiai megjelenése is változatos. A szövettani megjelenés alapján megkülönböztetünk noduláris és diffúz formát. A noduláris KL-ban csíracentrum maradványok körül a tumoros köpenyzóna kiszélesedett, míg a diffúz típusnál a csíracentrumok hiányoznak. A KL citológiai megjelenésében a heterogenitás még kifejezettebb. Mindez komoly differenciáldiagnosztikus problémát jelent, melynek kapcsán reaktív vagy neoplasztikus limfoproliferatív elváltozásoktól, így krónikus lymphocytás leukémiától/kis lymphocytás lymphomától (CLL/SLL), folliculáris lymphomától (FL) és immunocitomától (IC) való elkülönítés okozhat nehézséget (33).

A KL önálló entitásként való elkülönítését a tumorsejtek sajátosságos feno- és genotípusa indokolja. A tumorsejtek CD5, CD20, IgM, és IgD antigéneket expresszálnak, mely immunfenotípus megegyezik a normál köpenyzóna sejteinek immunfenotípusával (5). A tumorsejtek gyakran hordozzák a t(11;14)(q13;q32) kromoszóma transzlokációt, mely a 11. kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő BCL-1 gént és a 14. kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő IgH gént érinti (64,66). A transzlokáció következtében a cyclin D1 regulációja az IgH gén promoter irányítása alá kerül, mely a nukleáris cyclin D1 túltermelődését eredményezi (16,50,53,55).

A KL-BV az esetek egy részében KL-ban szenvedő betegeknél jelenik meg, mely felveti a mérsékelt malignitású KL blasztos transzformációjának lehetőségét. Az esetek más részében azonban megelőző lymphoma nélkül "de novo" alakul ki. A KL-BV feno- és genotípusa tekintetében számos hasonlóságot mutat a klasszikus KL-val. Mindkét tumor expresszája a CD5-öt, és CD 20-at valamint hordozza a t(11;14)(q13;q32) kromoszóma transzlokációt. Ezen hasonlóságok alapján feltételezhető a két különböző klinikai viselkedésű tumor azonos sejteredete (45). Míg a KL sejteredete az immunfenotípus és molekuláris genetikai vizsgálatokkal meghatározottnak tűnik, addig a KL-BV sejteredetéről és a KL-hoz való viszonyáról keveset tudunk.

Jelen tanulmány keretében célul tűztük ki, hogy a Pécsi Orvostudományi Egyetem Pathológiai Inézetében működő Lymphoma Referencia Centrumban a kieli osztályozás alapján 1988 és 1995 között regisztrált centrocitás lymphomának és centrocitoid centroblasztomának véleményezett esetek különböző patomorfológiai megjelenési formáit, szubtípusait jellemezzük a citológiai, immunfenotípus és molekuláris genetikai jellemzők alapján, hogy meghatározzuk a betegség hisztológiai spektrumát és azon immunhisztológiai és molekuláris biológiai vizsgálatok körét, melyek az objektív diagnózis felállításához nélkülözhetetlenek. További vizsgálataink célja a KL és a KL-BV

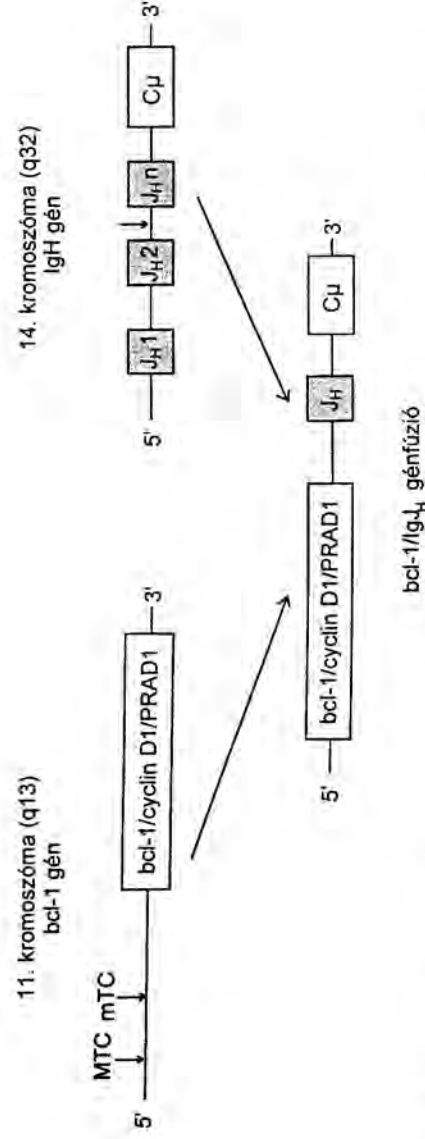
közti klonális kapcsolat, illetve a KL-BV sejteredetének meghatározása a tumorsejtek által expresszált IgH gén feltérképezésével.

### **3. A célkitűzések megvalósításának elvi háttere**

#### **3.1. A KL feno- és genotípusa és ezek szerepe a KL diagnosztikájában**

A NHL-k szövettani diagnózisa napjainkban kiegészül a tumorsejtek feno-és genotípus meghatározásával. A sejtfelszíni és nukleáris antigének kimutatása, valamint a tumorsejtek genotípusának meghatározása objektív adatokat szolgáltat az egyes entitások besorolásához. A heterogén hisztológiai, citológiai megjelenésű KL-ák diagnózisában és differenciáldiagnózisában meghatározó szerepe lehet a cyclin D1 immunhisztokémiai vizsgálatnak (15,16,71). A cyclin D1 egy, a sejtciklus szabályozásban közreműködő nukleáris fehérje, mely a G1 fázis korai szakaszán termelődik és fontos szerepe van a G1 fázis progressziójában és a G1/S tranzícióban (4,28,49,52,60). A cyclin D1 túltermelődést számos szolid tumor, így emlőrák (7,20,30), oesophagus carcinoma (65), colon carcinoma (34) és hepatocelluláris carcinoma (72) esetében leírták már. Ezekben az esetekben a túltermelődést egy, már eleve aktív gén amplifikációja eredményezi. Ezzel ellentétben kísérleti adatok alapján úgy tűnik, hogy lymphoid tumorokban a cyclin D1 túltermelődést a 11. kromoszómán kódolt PRAD/cyclin D1 gén transzlokációja eredményezi, jóllehet egyes esetekben kromoszóma transzlokáció nélkül is leírtak cyclin D1 túltermelődést (16,55), melyet azon megfigyelés is támogat, hogy egyéb limfoproliferatív kórkepekben, így "hairy cell" leukémiában (16), splenicus villosus lymphocytás lymphómában (26), IC-ban és Hodgkin-kórban (71) is kimutatható cyclin D1 expresszió.

Citogenetikai módszerekkel a KL-ák 70 %-ban, míg molekulárgenetikai módszerekkel a KL-ák 50 %-ában detektálható a t(11;14) kromoszóma transzlokáció (3,15,68), mely a 11. kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő BCL-1 gént és a 14. kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő IgH gént érinti (64,66) (2. ábra). Ezáltal a PRAD-1/cyclin D1 gén felszabadul az expresszióját normálisan szabályzó szekvenciák befolyása alól és regulációja az Ig H gén "enhancer" szekvenciájának irányítása alá kerül, ami a BCL-1 gén túlexpresszióját okozza (16,50,53,55). A t(11;14) kromoszóma transzlokáció kimutatásának egyik lehetséges módja a (11;14) transzlokáció polimeráz láncreakció (PCR)-erősítése (35,59). A PCR erősítés során azonban problémát jelenthet, hogy a 11. kromoszómán a töréspont nem fókuszált, hanem viszonylag elszórtan helyezkedik el. A töréspontok nagy része egy 120 kilobázis (kb) nagyságú, a BCL-1 régiót is magában foglaló "major translocation cluster" (MTC) régióon belül halmozottan fordulnak elő (24,43,64,69). A töréspontok kisebb hányada az MTC régióon kívül, attól 3' irányban elhelyezkedő "minor translocation cluster"-nek (mTC) nevezett régióban található (14).

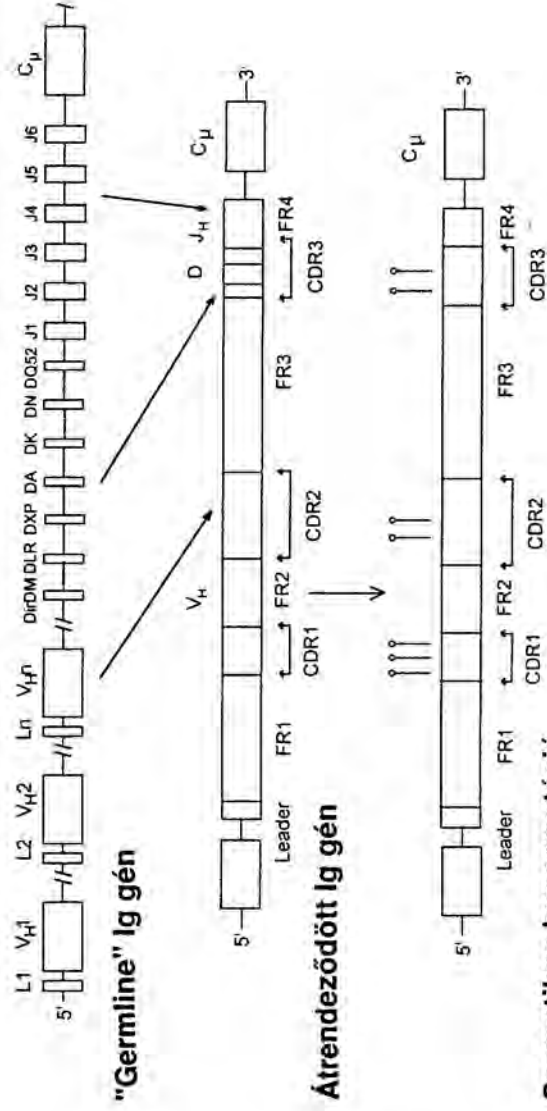


**2. ábra.** A t(11;14) kromoszóma transzlokáció sematikus ábrázolása KL-ában. A transzlokáció a 11. kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő BCL-1 gént és a 14. kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő IgH gént érinti. A töréspontok nagy része az MTC régióban, kisebb hányada az mTC régióban fordul elő.



### 3.2. Az IgH génanalízis szerepe a KL és KL-BV klonális kapcsolatok és érettségi fokának megállapításában

A B-sejtes tumorok eredetének és klonális kapcsolatának meghatározására az IgH gén szerveződésének vizsgálata bizonyult az egyik legalkalmasabb módszernek. Az ontogenezis korai stádiumában a B-sejtek "germline" IgH génjei átrendeződnek. Az átrendeződés során 72 variábilis ( $V_H$ ), 20-30 diversity (D) és 6 joining ( $J_H$ ) génszakaszból rekombinációs gének kapcsolódásából az átrendeződött sejtre specifikus  $V_H$ -D- $J_H$  nukleinsav szekvencia alakul ki (19). Az átrendeződés folyamán a nukleinsav szekvencia egységét tovább növeli, hogy a  $V_H$ -D és a D- $J_H$  génszekvenciák kapcsolódása közé addicionális nukleotidok (N-terminalisok) ékelődnek. Az átrendeződést követően az IgH gén minimális variabilitással rendelkező, konzervált, az Ig gén integritásának megőrzéséért felelős, úgynevezett "framework" (FR) és antigén kötésre szolgáló CDR régiókból tevődik össze. A három gén kapcsolódásából kialakult CDR3 régió egy-egy B-sejt klónra specifikus. E géntátrendeződés végig kíséri az adott B-sejt differenciálódását (2,32) (1. ábra). A CDR régiókban a sejterés, illetve az antigén inger hatására szomatikus mutációk jöhetnek létre, mely intraklonális divergenciát eredményez. Az IgH gén ezen genetikai sajátosságai alapján alkalmas lehet tumorklónok egymáshoz való viszonyának, és a tumorsejtek érettségi fokának megítélésére.



**1. ábra:** Az IgH gén átrendeződés folyamatának sematikus ábrázolása. Az IgH génátrendeződés során három különböző géncsalád  $V_H$ , D és  $J_H$  egy-egy tagjának kapcsolódása révén jön létre az expresszálandó IgH gén. Az átrendeződött gén azon szakasza, mely a három különböző gén kapcsolódása során alakul ki (CDR3) minden egyes elkötelezett B-sejt klónra specifikus. A B-sejt érés további szakaszában az antigénkötő helyeken (CDR1,2,3) szomatikus mutációk alakulnak ki. A "framework" régiók az Ig gén integritásának megőrzéséért felelős génszakaszok, melyeken a szomatikus mutációk száma alacsony.

### 3.3. A KL és a KL-BV tumorsejtségeinek klonális kapcsolata

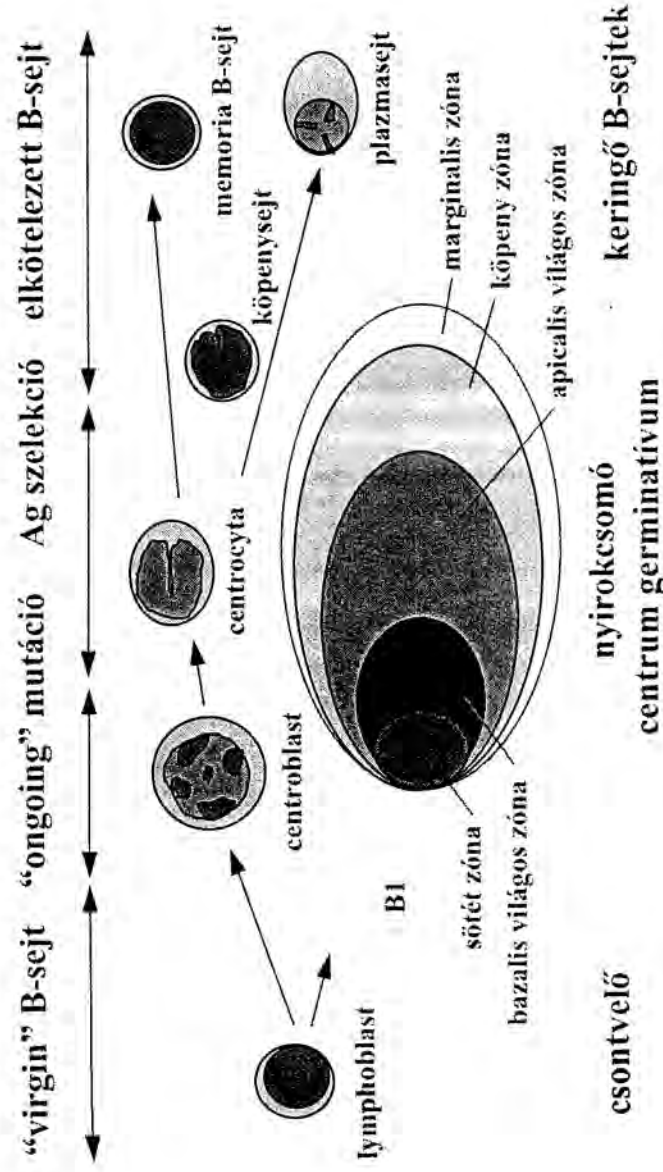
A mérsékelt malignitású B-sejtes NHL-k kórlefolyása során az esetek 10-30%-ában alakul ki kifejezett malignitású NHL. A mérsékelt malignitású lymphomában szenvedő betegnél kialakuló kifejezett malignitású lymphoma megjelenhet második tumorként vagy az eredeti tumorklón blasztos transzformációja következtében (39). A kifejezett malignitású NHL-k kialakulásának ezen alternatív mechanizmusáról előzőleg beszámoltak CLL, FL, mukóza asszociált lymphoid szövet (MALT) lymphomák és myeloma multiplex (MM) kórlefolyása során, azonban a KL és a transzformáció következtében kialakuló KL-BV klonális kapcsolata genetikai szinten még nem

feltérképezett (9,12,41). A B-sejtes NHL-k sejteredete és az egyes lymphomák közti klonális kapcsolatok meghatározásának egyik lehetséges módja a tumorsejtek által expresszált IgH gén szerveződésének összehasonlítása.

Az IgH gén rekombinációja eredményeként kialakuló CDR3 régió szekvencia vizsgálata alkalmas a klonális azonosság vagy különbség eldöntésére (51). Tekintettel arra, hogy a CDR3 szekvenciák minden egyes B-sejtre és ezáltal B-sejt klónra specifikusak, egy lymphoma transzformáció során a transzformáció előtti és utáni klónok azonosak. Abban az esetben, ha egy külön tumorklón jelenik meg, annak CDR3 szekvenciája különbözik az eredeti tumortól. A B-sejtek ezen genetikai sajátosságait kihasználva tanulmányoztuk a KL és a KL-BV klonális kapcsolatát.

#### **3.4. A KL-BV tumorsejtjeinek érettségi foka**

A kieli lymphoma osztályozás rendszerezési elve alapján az egyes B-sejtes NHL-k kialakulásáért a B-sejt differenciálódás során bekövetkezett kiérési blokk tehető felelőssé, melynek kapcsán a blokk előtti fejlődési alakok felszaporodnak, és egy-egy lymphoma entitást képeznek (56). Ezen elképzelés alapján minden egyes lymphoma entitás megfelel egy-egy B-sejt differenciálódási alaknak. Például a lymphoblastos leukémia a lymphoblastok, a CLL a B1-sejtek, a FL a centrum germinativum (CG) sejtjeinek, a KL a köpenyzóna sejtjeinek, a MM pedig az érett plazmasejtek tumorának tekinthető (3. ábra). Ezen besorolás a lymphoma sejtek és a normál B-sejt differenciálódás egyes elemeinek morfológiai, fenó- és génotípus sajátságainak hasonlósága alapján tételezhető fel. A KL-BV helye ebben a rendszerben nem meghatározott.



**3. ábra:** A B-sejt differenciálódás folyamatának sematikus ábrázolása. A csontvelőben, a differenciálódás legkorábbi stádiumában zajlik az Ig gének rekombinációja. A csontvelői B-sejtek átrendeződött IgH génje antigén inger hiányában szomatikus mutációt nem tartalmaz. A B-sejtek további érésük során a nyirokcsomó centrum germinativumába vándorolnak, (centroblastta, centrocytává alakulnak) ahol az antigén szelekció folyamán az átrendeződött IgH génben random módon “ongoing” szomatikus mutációk alakulnak ki. A szomatikus mutációk következtében a B-sejtek elkötelezett sejtekké, azaz memória- vagy plazmasejtekké alakulnak. Ezen antigén szelektált sejtekre jellemző, a szomatikus mutációk jelenléte.

A B-sejtes differenciáció egyes lépései az IgH gén szerveződésével nyomonkövethetők. Az Ag-nel nem érintkezett csontvelői B-sejtek (“virgin” B-sejtek) átrendeződött IgH génjén szomatikus mutáció nem zajlik, így az expresszált  $V_H$  gén szekvenciája megegyezik a “germline-ban” megtalálható  $V_H$  szekvenciával. A B-sejtek további érésük során a nyirokcsomó CG-ába vándorolnak, ahol Ag hatására az átrendeződött IgH génben random módon szomatikus mutációk zajlanak. Az érés ezen stádiumára az “ongoing” szomatikus mutációk, vagy más szóval az intraklonális divergencia jellemző. A szomatikus mutációk által a B-sejt populáció heterogénne válik és ezen

heterogén sejtpopulációból az Ag szelekció hatására memóriasejtek vagy plazmasejtek alakulnak ki. Az Ag szelektált sejtekre jellemző, hogy a szomatikus mutációk elsősorban az antigén kötődésért felelős CDR régiókban helyezkednek el.

Az IgH génen talált mutációk típusa és megoszlása alapján a tumorsejtek IgH V<sub>H</sub> génjének szekvencia analízise lehetőséget nyújthat a sejteredet megállapítására. Az V<sub>H</sub> génen talált mutációk típusa és megoszlása alapján következtethetünk az adott B-sejtek érettségi fokára. Abban az esetben, ha a tumorsejtek által expresszált V<sub>H</sub> gén nem tartalmaz mutációkat, prefolikuláris B-sejt eredetre enged következtetni. A tumorsejtek folyamatos mutációs aktivitása (ongoing mutáció) a CG follikuláris B-sejtjeinek jellemzője. A posztfolikuláris B-sejtek által expresszált IgH génen talált mutációk típusa és száma Ag szelekció nyomait viseli. Ag inger hatására a mutációk többsége a CDR régióra korlátozódik. Ezen mutációk többsége "replacement" (R) mutáció, azaz aminosav szekvencia változást eredményez, ellentétben az FR régiókban talált mutációkkal, melyek többsége "silent" (S) mutáció, azaz nem eredményez aminosav változást. A B-sejtes tumorok ezen genetikai szerveződésének vizsgálata alkalmas arra, hogy meghatározzuk a KL-BV tumorsejtjeinek érettségi fokát és helyét a B-sejt differenciálódás folyamatában (1. táblázat).

**1. táblázat: A B-sejek differenciáltságának osztályozása az IgH gén struktúráltása alapján.**

érettségi fok	szomatikus mutáció	ongoing mutáció	antigén szelekció
(interklonális ivergencia)			
Prefolikuláris B-sejt	-	-	-
Folikuláris B-sejt	+	+	+/-
Posztfolikuláris B sejt	+	-	+

#### 4. A cékítűések megvalósításához használt anyagok és módszerek

##### 4.1. Beteganyag

Vizsgálataink első részében a Pécsi Orvostudományi Egyetem Patológiai Intézetében működő Lymphoma Referencia Centrum által 1988 és 1995 között regisztrált centrocitás lymphomának és centrocitoid centroblastomának véleményezett 67 reprezentatív NHL retrospektív vizsgálatát végeztük el. Azon esetek kerültek feldolgozásra, amelyeknél natív szövet vagy paraffinos blokk állt rendelkezésre az immunhisztológiai és molekuláris biológiai vizsgálatokhoz. A nyirokszövet hisztológiai újraértékelése a REAL osztályozás kritériumai alapján történt (21).

Tanulmányunk második szakasza a KL-BV és a KL kapcsolatának meghatározására és a KL-BV sejteredetének feltérképezésére irányult, melyhez 6 KL-ban szenvedő beteg tumorsejreit használtuk fel. Két esetben a betegség klasszikus vagy másnéven "citás" KL képeben kezdődött, mely a betegség lefolyása során KL-BV-á alakult. További 4 eset kapcsán "de novo" kialakult KL-BV tumorsejreit vizsgáltuk (2. táblázat). A KL és KL-BV diagnózisának felállítása REAL osztályozás által meghatározott hisztológiai és immunfenotípus kritériumok alapján történt (21).

2. táblázat. A KL-BV tanulmányban szereplő betegek adatai.

Betegek	Nem/Kor	Mintavétel időpontja	Diagnózis
1. eset	ffi/46 év	A-1991	KL
		B-1995	KL-BV
2. eset	nő/59 év	A-1998	KL
		B-1998	KL-BV
3. eset	nő/85 év	A-1995	KL-BV
4. eset	ffi/64 év	A-1996	KL-BV
5. eset	ffi/47 év	A-1997	KL-BV
6. eset	ffi/60 év	A-1998	KL-BV

#### 4.2. A tumorsejtek immunfenotípusának meghatározása

Az immunfenotípzálás formol-paraffinba ágyazott szövetmintából történt, három lépéses avidin-biotin immunperoxidáz módszerrel (31), a következő monoklonális antitestek felhasználásával: CD5, CD20 és CD23 (Dako). A tumorsejtek PRAD/cyclin D1 vizsgálatát 21 random módon kiválasztott esetben végeztük el cyclin D1-GM (Novocastra) antitest felhasználásával.

#### 4.3. DNS izolálása natív és formol paraffinos szövetmintából

A genomikus DNS-t natív szövetmintákból telített NaCl felhasználásával, kisózasos módszerrel (44), a formol-paraffinos minták esetében Wright módszerének felhasználásával nyertük (70). A fagyasztott metszeteket 3ml mag lizis pufferben (10mM Tris-HCL, 400 mM NaCl és 2 mM EDTA; 200 µl 10 % nátrium dodecil szulfát [NDS]) szuszpendáltuk, melyhez 500 µl proteináz K oldatot (1mg proteinase K, 1 % NDS és 2 mM EDTA) adtunk. Ezt követően egy éjszakán át 37 °C-on emésztettük, majd 1 ml telített NaCl oldattal ráztuk, ezt követően az elegyet 20 percen át 2500 rpm fordulatszámon centrifugáltuk. A felülszóhoz 2-szeres volumenű abszolút alkoholt adtunk, majd a DNS precipitátumot kétszer mostuk 70 %-os etanolban. A formol-paraffinos blokkokból származó 1-3 db 35 µm vastag metszetet xilolban deparaffináltuk, alkoholon keresztül vizes közegbe vittük, az üledéket vákum centrifugával szárítottuk, majd 55 °C-on egy éjszakán át 100 200 µl emésztőpufferben (1mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.5 % Tween 20, 200 µg/ml proteinase-K) inkubáltuk. A proteinase-K inaktiválása 95 °C-on 10 perces hevítéssel történt (67). A felüliszót a DNS tartalom meghatározás után +4 °C-on tároltuk. A szövetmintákból izolált DNS

koncentrációját 260 nm-es hullámhosszon határoztuk meg denzitométer (Spectronic 21. D. Milton Roy) segítségével.

#### **4.4. A t(11;14) kromoszóma transzlokáció kimutatása PCR segítségével**

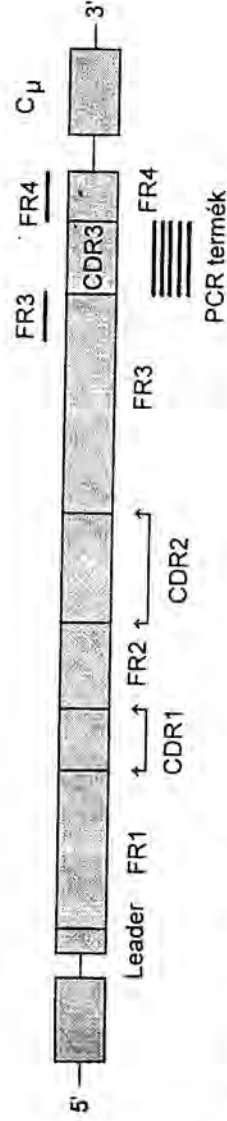
A PCR vizsgálatot az MTC régióra specifikus MCL-1 (CTGCCAAGAAGAGAGT) sense és a FR4 régióra specifikus antisense (ACCTGAGGAGACGGTGACC) primerek segítségével végeztük (35,59). Pozitív kontrollként az M 02058 sejtvonalat használtuk, mely tartalmazza a t(11;14) kromoszóma transzlokációt az MTC-ben. Az amplifikáció során a PCR elegy a következő alkotórészeket tartalmazta: 1 µg genomikus DNS, 1.5 mM dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10xPCR puffer, 10 pM sense és antisense primer valamint 0.2 U Taq DNA polimeráz (Boehringer Mannheim). Az amplifikációt automata termociklométer (Perkin Elmer, GeneAmp 2400) segítségével, 32 cikluson át végeztük. Az amplifikáció következő kondíciók mellett történt: "denaturálás" 1 perc, 95 °C; "anealing" 1 perc, 57 °C; "elongáció" 1 perc, 72 °C. A PCR produktumok kiértékelését ethidium bromidot tartalmazó 2 %-os agar géll elektroforézis segítségével végeztük.

#### **4.5. Az IgH gén CDR 3 régiójának PCR amplifikációja**

Az IgH gén CDR3 génszakasz PCR amplifikációját a FR3 (ACA CGG C(C/T)(G/C) TGT ATT ACT GT) régióra specifikus sense és a FR4 (ACC TGA GGA GAC GGT GAC C) régióra specifikus antisense primerek segítségével végeztük (25) (4. ábra). A vizsgálathoz 1 µg genomikus DNS-t,



1.5 mM dNTP, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 pM FR3 és FR4 oligonukleotid primerek, valamint 0.2 U Taq DNA polimeráz (Boehringer Mannheim) keverékét 25 µl végvolumenben, automata termociklométer (Perkin Elmer, GeneAmp 2400) segítségével 30 cikluson át végeztük. Az egyes ciklusok a következő módon alakultak: "denaturálás" 2 perc, 95 °C; "annealing" 1 perc, 57 °C; "extension" 2 perc, 72 °C. A PCR produktumok kiértékelését ethidium bromidot tartalmazó 2 %-os agar gélelektroforézis segítségével végeztük.

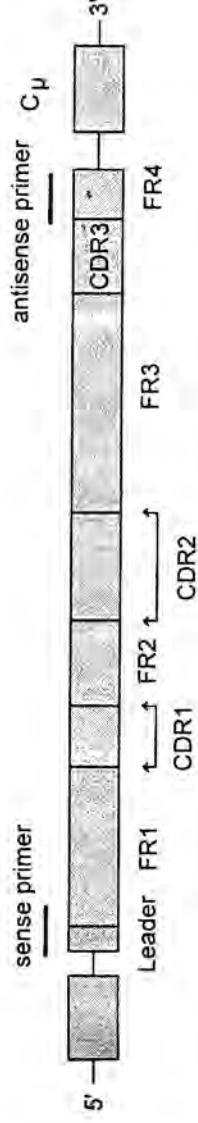


**4. ábra.** Az átrendeződött V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> gén CDR3 szakaszának PCR amplifikációja. Az átrendeződött IgH gén CDR3 szegmensének amplifikációja az FR3 génszakaszra specifikus sense és a FR4 génszakaszra specifikus antisense primerekkel történt.

#### 4.6. A V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> gén PCR amplifikációja

A PCR vizsgálatot a V<sub>H</sub> géncsaládra specifikus leader (L) sense primer és a FR4 régióra specifikus antisense primer segítségével végeztük (17) (5. ábra). Tekintettel arra, hogy a V<sub>H</sub> gének hat géncsaládba sorolhatók, a PCR amplifikációt minden esetben hat külön PCR segítségével végeztük, melyhez a V<sub>H</sub> L1-V<sub>H</sub> L6 sense és az FR4 antisense primereket használtuk. A primerek szekvenciáit a 6. ábra foglalja össze. A PCR vizsgálatához 1 µg genomikus DNS-t, 1.5 mM dNTP, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 pM sense és antisense oligonukleotid primerek, valamint 0.2 U Taq DNA polimeráz (Boehringer Mannheim) keverékét 25 µl végvolumenben

amplifikáltuk. Az amplifikációt automata termociklóméter (Perkin Elmer, GeneAmp 2400) segítségével 30 cikluson át végeztük. Az egyes ciklusok a következő módon alakultak:  $V_H-L1,2,5,6$  esetében : "denaturálás" 2 perc, 94 °C; "annealing" 1 perc, 57 °C; "extension" 2 perc, 72 °C.  $V_H-L3,4$  esetében: "denaturálás" 2 perc, 94 °C; "annealing" 1 perc, 66 °C; "extension" 2 perc, 72 °C. A PCR produktumok kiértékelését ethidium bromidot tartalmazó 2 %-os agar gélelektroforézis segítségével végeztük.



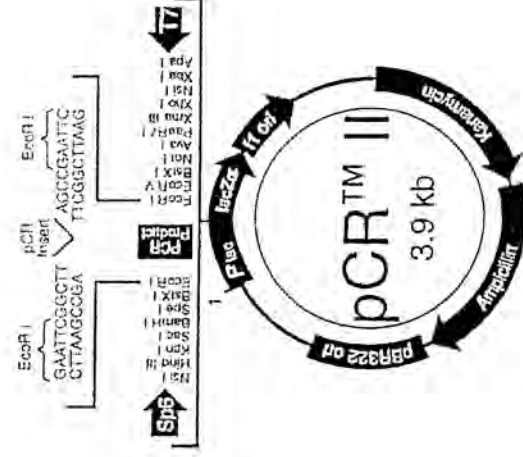
**5. ábra.** Az IgH  $V_H-D-J_H$  génszakasz PCR amplifikációjának sematikus ábrázolása. Az IgH gén PCR amplifikációja az átrendeződött IgH gén leader (sense) és FR 4 (antisense) szekvenciákra specifikus primerek segítségével történt.

$V_H-L1:$	5'- CCA TGG ACT GGA CCT GGA GG
$V_H-L2:$	5'- ATG GAC ATA CTT TGT TCC AC
$V_H-L3:$	5'- CCA TGG AGT TTG GGC TGA GC
$V_H-L4:$	5'- ATG AAA CAC CTG TGG TTC TT
$V_H-L5:$	5'- ATG GGG TCA ACC GCC ATC CT
$V_H-L6:$	5'- ATG TCT GTC TCC TTC CTC AT
FR4:	5'- ACC TGA GGA GAC GGT GAC C

**6. ábra.** Az IgH gén PCR amplifikációja során felhasznált primerek szekvenciái.

#### 4.7. Az IgH gén klónozása és nukleinsav szekvenciájának meghatározása

A PCR termékek klónozása TA-Cloning Kit (Invitrogen, San Diego, CA) felhasználásával a forgalmazó előírásai alapján történt (7. ábra). X-gal és kanamycin klónszelekciót követően minden szövetminta esetében 4 klónt analizáltunk. A PCR termékek nukleinsav szekvenciáját dideoxy biokémiai módszerrel határoztuk meg. A DNS szekvenálásához a forgalmazó utasításainak betartásával Sequenase version 2.0 (United States Biochemical, Cleveland, OH) szekvenáló rendszert használtunk. A DNS szekvenciák értékeléséhez MacVector version 4.5 (Eastern Kodak Co., New Haven, CT) software-t és a GeneBank adatbázisát vettük igénybe.



7. ábra. A PCR termék klónozásának sematikus ábrázolása. A pCR II vektorba való beépülés lehetőségét a Taq polimeráz template independens terminal transzferáz aktivitása biztosítja. Ezen aktivitásnak köszönhetően a PCR termék 3' végeihez "overhanging" adenozin (A) kapcsolódik. A plazmid vágási vonalában az "overhanging" nukleotid timidin (T), mely lehetőséget ad a PCR termék beépülésére.



kör egy-egy szubsztitúciós lehetőséget képvisel. A fekete pontok az R, a körök az S mutációk lehetséges számát ábrázolják. Minden egyes kódon alatt aláhúzva olvasható a germline génben kódolt aminosav, ezek alatt felsorolt aminosavak az adott kódonban előforduló egy-egy báziscsere kövekezményeként a "germline aminosavat" helyettesítő aminosavak. Például a CDR1 régió első kódonja AGC, mely Szerint kódol. Ezen három nukleotid esetében összesen 9 báziscsere lehetséges, melyek közül 8 jár aminosav változással, egy nem. Az R mutációk lehetséges száma örökletesen magasabb a az Ag kötésért felelős CDR régiókban, mint az IgH gén integritásáért felelős, konzervált FR területeken (10).

A CDR és FR régiókban várható R mutációk számát a 9. ábrán feltüntetett képlet segítségével számoltuk ki. Binominális valószínűség model segítségével, a random és talált R mutációk összehasonlítása révén határoztuk meg, hogy az adott IgH génben kialakult R mutációk antigén hatásra alakultak ki vagy sem (10. ábra) (10).

$$R \text{ CDR vagy R FR} = n \times (\text{CDR Rf or FR Rf}) \times (\text{CDR}_{rel} \text{ or FR}_{rel})$$

*R CDR vagy R FR = elvárható R mutációk száma a CDR vagy FR régiókban*

*n = az összes talált mutációk száma*

*Rf = az adott IgV génen belül az R mutációk genetikailag meghatározott gyakorisága*

*CDR<sub>rel</sub> vagy FR<sub>rel</sub> = a CDR vagy FR régiók relatív nagysága*

**9. ábra.** Az adott lymphoma által átredezett IgV<sub>H</sub> gén örökletes struktúrája alapján számolható random megoszlású R mutációk száma a CDR vagy FR régiókban(10).

$$p = \{n!/[k!(n-k)!\} \times q^k \times (1-q)^{n-k}$$

*n = az összes talált mutációk száma*

*q = annak valószínűsége, hogy R mutáció lesz a CDR vagy FR szakaszon*

*(q = CDR<sub>rel</sub> x CDR Rf vagy FR<sub>rel</sub> x FR Rf)*

*k = az összes R mutációk száma a CDR vagy FR szakaszon*

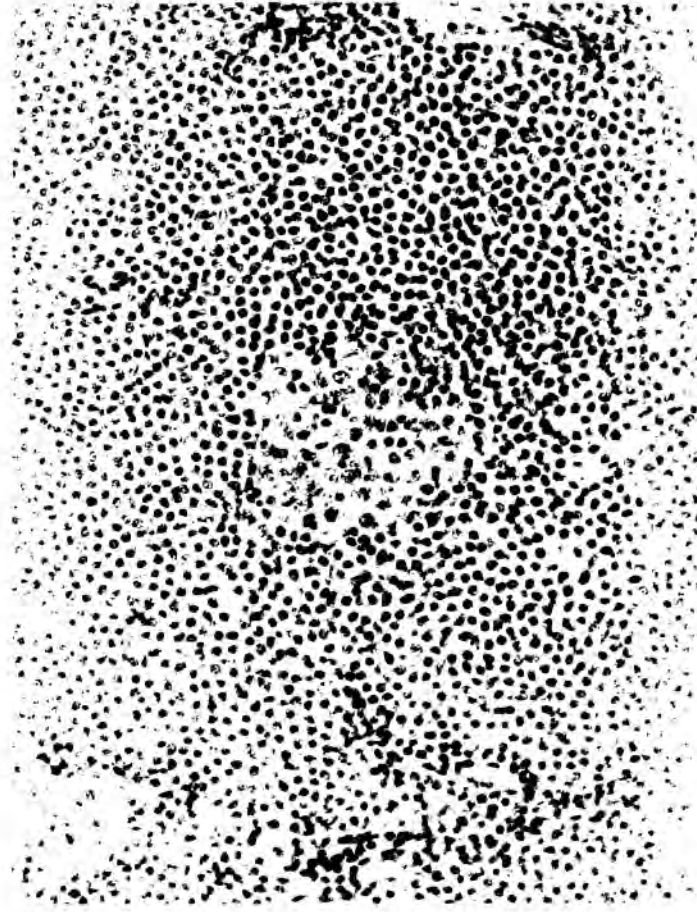
**10. ábra.** Binominális valószínűség modell. Az R mutációk gyakoriságának valószínűsége az adott IgV<sub>H</sub> génszakaszon.

## 5. Eredmények

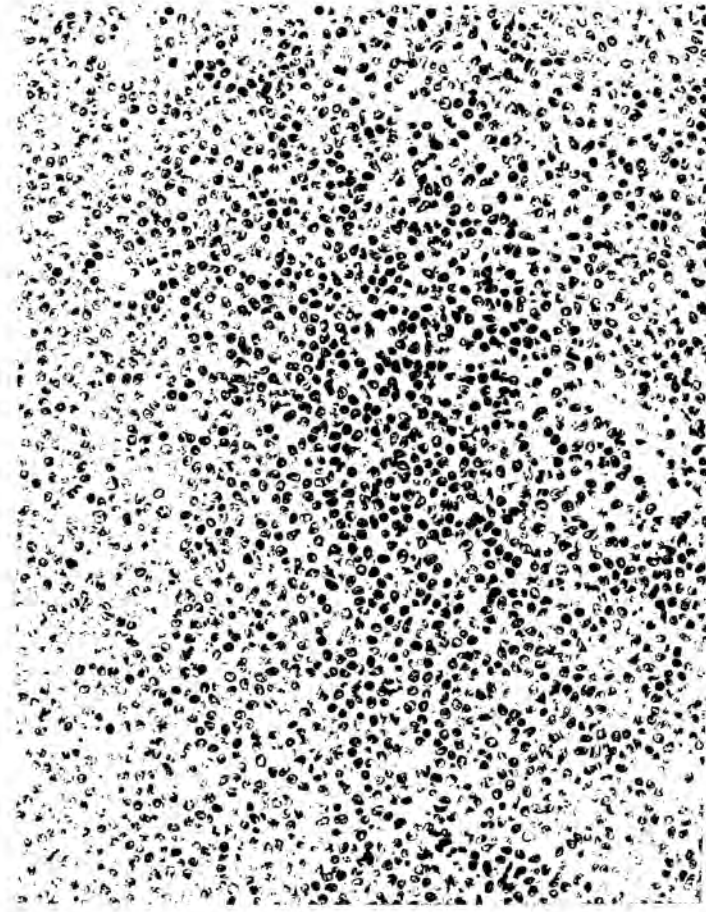
### 5.1. A KL jellemzése a patomorfológiai, citológiai és genetikai jellemzők alapján

#### 5.1.1. Szövetteni megjelenés

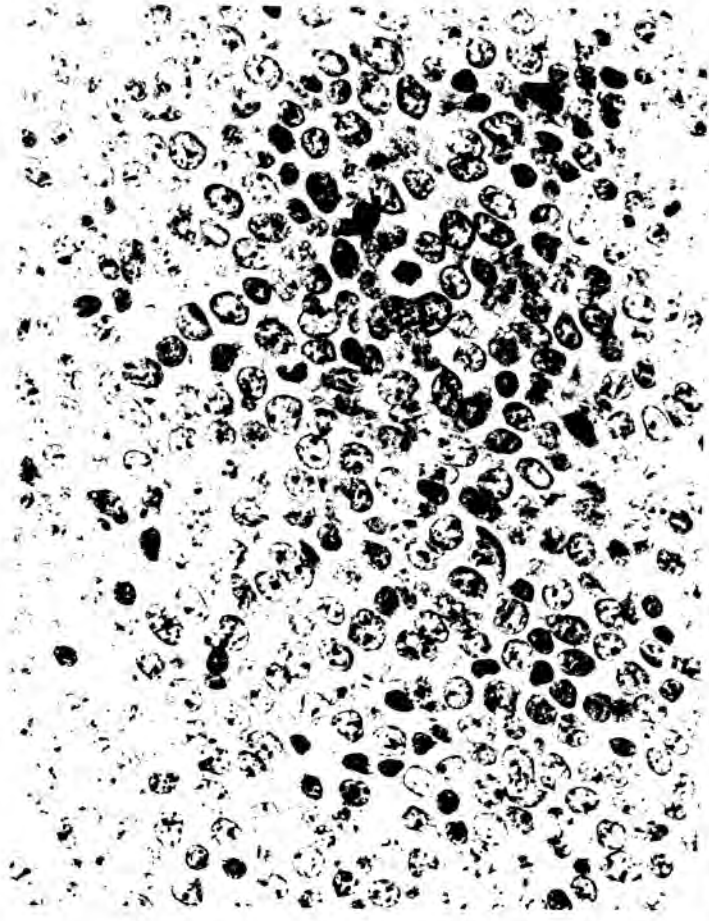
Vizsgálataink során 67 reprezentatív NHL reklassifikációját végeztük el, melyből 63 esetben állítottunk fel KL diagnózist a tumorszövet hisztológiai és citológiai megjelenése, immunfenotípus és molekuláris biológiai sajátosságok alapján. A vizsgált esetek 52 %-ában a tumorszövet noduláris, köpenysejtes mintázatot mutatott, ahol megtartott csíracentrumok körül a tumoros köpenyzóna kiszélesedett (11.a. ábra), 48 %-ában diffúz megjelenésű volt, csíracentrumokat nem tartalmazott. A diffúz KL-ás esetek 27 %-ában a tumorszövet a lymphocytáktól némileg nagyobb mérsékeltten szabálytalan sejtekből állt, azaz citás megjelenésű volt (11.b. ábra), 40 %-ában blasztokból épült fel (11.c. ábra). A fennmaradó esetekben a tumorszövet egyaránt tartalmazott citás és blasztos komponenst, melyet kevertsejtes formának nevezhetünk (11.d. ábra). Ezzel szemben a noduláris mintázatú KL-ák 76 %-a citás, 15 %-a blasztos és csupán 9 %-a bizonyult kevertsejtes lymphomának (12. ábra).



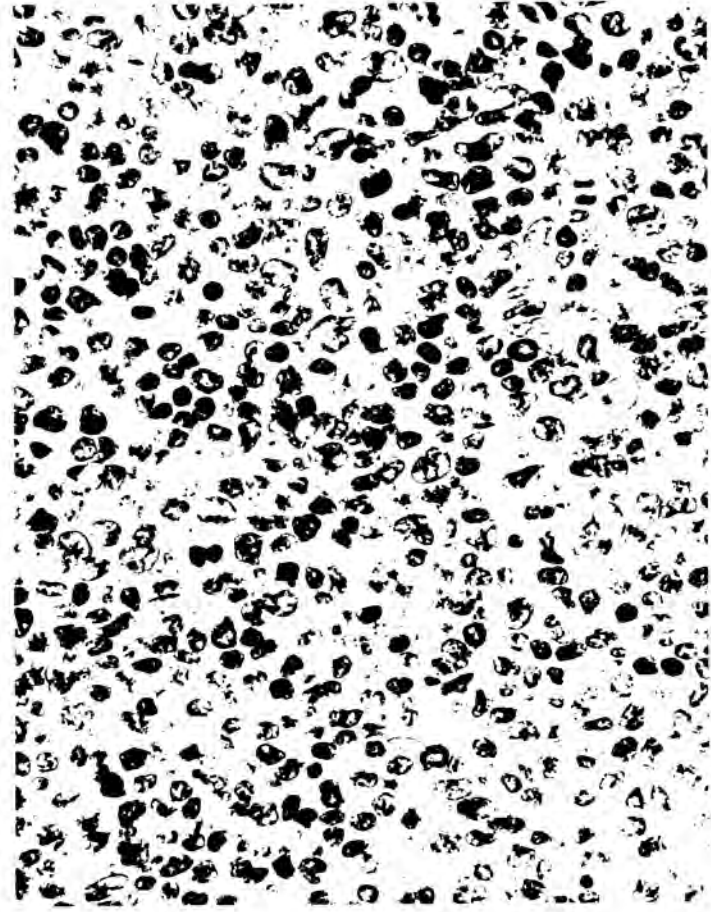
**11. a. ábra.** Noduláris mintázatú KL, melyben a csíracentrum maradvány körül a tumoros köpenyzóna kiszélesedett. A tumorsejtek mérsékelten heterokromatinizált, indentált maggal rendelkeznek. (HE 200X)



**11. b. ábra.** Diffúz megjelenésű, citás KL: ahol csíracentrumok nem láthatók, a tumorszövet kis és középnagy heterokromatinizált, indentált magvú tumorsejtekből áll. (HE 200X)

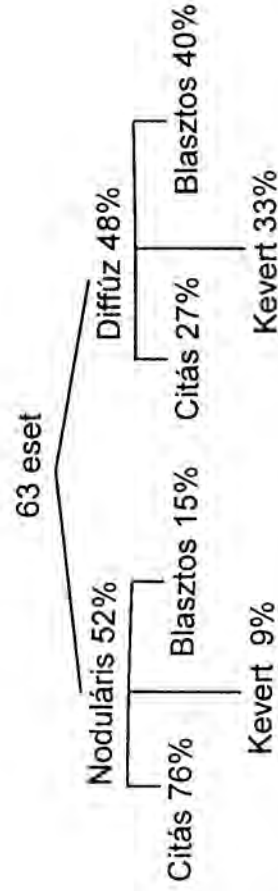


**11.c. ábra.** KL-BV hisztológiai, citológiai jellemzői. A tumorszövet középnagy, keskeny citoplazmájú, finoman diszpergált magvú, túszúrásnyi nukleoluszokat tartalmazó középnagy blasztokból épül fel. (HE 400X)



**11.d. ábra.** Kevertsejtes KL szövettani megjelenése. A tumorszövet citás és blasztos komponens egyaránt tartalmaz. (HE 200X)





**12. ábra.** A vizsgált 63 KL osztályozása a histológiai és citológiai jellemzők alapján. A vizsgált esetek 52 %-ában a tumorszövet noduláris, 48 %-ában diffúz. A diffúz esetek 27 %-ában a tumorszövet citás, 40 %-ában blasztos, 33 %-ában kevertsejtes megjelenésű volt. Ezzel szemben a noduláris mintázatú KL-ák 76 %-a citás, 15 %-a blasztos és csupán 9 %-a bizonyult kevertsejtes lymphomának.

### 5.1.2. Immunfenotípus

A tumorsejtek 99 %-ban intenzív intracitoplazmális pozitivitást észleltünk CD5 és CD20 monoklonális antitestekkel, azonban CD23 antitesttel a sejtek negatívnak bizonyultak. A 21 random módon kiválasztott esetben elvégzett cyclin D1 immunhisztokémiai vizsgálat, során 13 esetben láttunk pozitivitást. Ezekben az esetekben a tumorsejtek 50-90 %-változó intenzitású nucleáris festődést mutatott. Nyolc esetben a nucleáris reakció néhány sejtre korlátozódott vagy teljesen hiányzott és a megismételt vizsgálattal sem kaptunk színreakciót. Ezen nyolc esetet újra megvizsgáltuk és négy esetben a histológiai megjelenés és az ismételt immunfenotípus vizsgálatok eredménye alapján revidéáltuk a diagnózist. Két esetben FL, egy esetben diffúz nagy B-sejtes lymphoma és további egy esetben MALT lymphoma valószínűségét állapítottuk meg. A további négy cyclin D1 negatív esetet a cyclin D1 negativitás ellenére KL-ának tartottuk a CD5, CD20 koexpresszió és együttes CD23 negativitás valamint az egyértelmű KL-ra jellemző histológiai és citológiai jellemzők alapján.

### 5.1.3. A t(11;14) kromoszóma transzlokáció kimutatása PCR segítségével

A t(11;14) transzlokáció PCR vizsgálatát 17 reprezentatív minta esetében végeztük el, az MTC régióra specifikus MCL-1 "sense" primer és a FR4 (J<sub>H</sub>) régióra specifikus "antisense" primer felhasználásával (35,59). Az MCL-1/J<sub>H</sub> génátredeződést a vizsgált 17 esetből 3 esetben (18%) igazoltuk. A PCR termék kiértékelése során ezekben az esetekben egy élesen elkülönült csík volt megfigyelhető 400 és 500 bp magasságában.

## 5.2. A KL és a KL-BV klonális kapcsolata

### 5.2.1. A KL és a KL-BV szövettani megjelenése

A KL és a kórlefolyása során kialakuló kifejezett malignitású KL-BV klonális kapcsolatát két beteg esetében vizsgáltuk. Az első biopsziás vizsgálat során a nyirokcsomók szöveti megjelenése köpenyzóna mintázatot mutatott, a tumorszövet kis és középnagy angulált, mérsékelten szabálytalan magvú sejtekből épült fel. Az ismételt nyirokcsomó biopsziás vizsgálat során a nyirokcsomók alapszerkezetét középnagy, blaszt jellegű sejtekből álló tumorszövet proliferáció destruálta. A sejtosztlások száma 40-50/10 között változott 400x-os nagyítású látóterenként. A tumorsejtek keskeny bazofil citoplazmával, kerek, finoman diszpergált kromatint tartalmazó maggal rendelkeztek. A KL és a KL-BV tumorsejjei mindkét esetben citoplazmális CD5-öt, CD20-at és nukleáris cyclin D1-et expresszáltak, azonban a tumorsejtek CD10 és CD23 negatívnak bizonyultak. Az Ig könnyű és nehézlánc izotípus mindkét esetben azonos volt a KL és az azt követően kialakult KL-BV esetében.

### 5.2.2. A KL és a KL-BV által expresszált IgH gének CDR3 struktúrája

A vizsgált KL és a KL-BV tumorsejtjeiből származó IgH gének PCR amplifikációját követő gélelektroforézise azonos nagyságú csíkot eredményezett. A PCR termék szekvenálásához minden esetben 4 különböző baktérium izolátum került vizsgálatra. A klónok nukleotid és aminosav szekvenciáit a 13. ábra mutatja be. Mindkét KL esetben a PCR amplifikáció 78 bázispár (bp) hosszúságú szakaszt eredményezett, mely a szekvencia analízis során az IgH gén 87-113 kódonjának feleltek meg. Minden tumorminta esetében a transláció értelmes protein szekvenciát eredményezett, így feltételezhető, hogy az expresszált IgH gén allélnak felel meg. Mindkét esetben a KL és a KL-BV tumorsejtjeinek IgH gén PCR amplifikációja azonos CDR3 szekvenciát eredményezett. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a KL és KL-BV azonos génrekombináció eredménye, azaz a két tumorminta azonos klónból származtatható. A rekombinálódott D és J<sub>H</sub> gének azonosításához az általunk kapott szekvenciát összehasonlítottuk a GeneBank germline adatbázisával. Az átrendeződött szekvenciák és a között legközelebbi homológiát mutató germline D és J<sub>H</sub> gének szekvenciáit az 3. táblázat mutatja be. Az 1. esetben a tumorsejtekben a D5-5 (x13972) és a J6 (x86356) gének rendeződtek át. Az átrendeződött J6 gén a germline szekvenciától 3 nukleotid szekvenciában különbözött. A 2. esetben a lymphoma sejtek a D4-17 (x97051) és a J3 (x86355) géneket tartalmazták. A 2. esetben az átrendeződött IgH gén a között germline D4-17 géntől 2 nukleotidban, a J3 géntől 1 nukleotidban különbözött. Összességében adataink arra utalnak, hogy a KL és a KL-BV szoros klonális kapcsolatban van, azaz a KL-BV kialakulása blasztos transzformációnak tekinthető. Eredményeink ugyancsak rámutatnak arra, hogy a KL blasztos transzformációja nem jár a CDR3 génszakasz másodlagos mutációs változásával.



3. Táblázat. A KL- és KL-BV tumorsejtjeiből származó IGH gén N-D-N-J<sub>H</sub> génszakaszának szekvencia vizsgálata.

N1 D N2 J<sub>H</sub>

Eset-1 MCL  
Eset-1 MCL-BV  
ga ga  
ATACAGCTATGGT (D5-5)  
cca cca

Eset-2 MCL  
Eset-2 MCL-BV  
ggg ggg  
GACTACGGTGACTAC (D4-17)  
gactccagg gactccagg  
ATGCTTTTGATATCTGTGGGGCCAAAGGAGACAATGGTCACTCTTCA (J3)

Az azonosságokat pontok jelölik, a szekvencia különbségeknél a nukleotid nevét tüntetjük fel.

### 5.3. A KL-BV sejterededete

#### 5.3.1. A KL-BV szövettani megjelenése

A KL-BV sejteredetének meghatározásához négy betegből származó tumormintát használtunk. Mind a négy esetben a KL-BV "de novo" megelelőző mérsékelt malignitású NHL nélkül alakult ki. A négy KL-BV szöveti megjelenése azonos volt. A tumorszövet diffúz szerkezetű volt, a sejtek polimorfak, a sejtmagok finoman diszpergált kromatint és 3-4 apró, tiszúrásnyi nukleóluszt tartalmaznak. A proliferációs aktivitás kifejezett, a mitózisok száma magas volt.

#### 5.3.2. Az átrendeződött Ig VH-D-JH gén szekvenciájának analízise

A KL-BV tumorsejtjeinek VH-D-JH génszakaszát PCR segítségével amplifikáltuk, klónoztuk, majd minden esetben négy klónt szekvenáltunk. A kapott nukleinsav szekvenciát a 14. ábra, a nukleinsav szekvenciáknak megfelelő aminósav szekvenciát a 15. ábra szemlélteti. Mind a négy esetben a PCR amplifikáció 330 bp hosszúságú szakaszt eredményezett, mely a szekvencia analízis során az 1-113 kódonnak felelt meg. A VH-D-JH szekvenciák mind a négy esetben funkcionáló IgH gént expresszáltak mivel a szekvenciák egyetlen esetben sem tartalmaztak stop kodont, vagy "frame shiftet". A négy KL-BV-ból származó VH-D-JH génszakaszok nukleinsav szekvenciáit a GeneBank adatbázisában szereplő germline génekkel hasonlítottuk össze. A legszorosabb homológiát mutató germline VH génhez viszonyított nukleotid eltéréseket a 14. ábra, és a 4. táblázat foglalja össze. Az 1., 3. és 4. eset a VH3 család egy-egy germline génijét tartalmazta és az 1. eset 100%, a 3. eset 99.0%, a 4. eset pedig 94.6% homológiát mutatott a

legközelebbi germline génnel. A 2. eset germline génje a V<sub>H</sub>5 családból származott és 99.7% homológiát mutatott a germline génnel. Az 1. eset tumorsejtjeiben a HV3-21, a D6-13 és a HJ6 gének rendeződtek át. Ezen esetben mutációt nem észleltünk, így a tumorsejtek prefolikuláris eredete valószínűsíthető. A 2. esetben a tumorsejtjeiben a HV5-51, a D5-18 és a HJ4 gének rendeződtek át. Az átrendezett génen csupán egy mutációt észleltünk a 94. kódonban (A - G) mely nem okozott aminosav változást, így ezen esetben is prefolikuláris eredet valószínű. A 3. esetben a tumorsejtek a HV3-9, a D1-26 és a HJ4 géneket tartalmazták. Mutációt az 52. kódonban (A - G), az 56. kódonban (C - G) és a 94. kódonban (A - G) észleltünk, melyek közül a CDR2 régióban talált 2 mutáció eredményezett aminosav változást. Ezen mutációs megoszlás random megoszlást sejtet. A 4. esetben a tumorsejtek a HV3-33, a D6-19 és a HJ4 géneket tartalmazták. Az átrendeződött génen 13 mutációt találtunk, a 24. kódonban (G-C), 31. kódonban (G-C), 32. kódonban (A-T), 33. kódonban (G-T), 34. kódonban (A-C), 43. kódonban (A-G), 47. kódonban (T-G), 56. kódonban (T-A), 57. kódonban (A-C), 73. kódonban (A-C), 74. kódonban (C-G), 78. kódonban (C-T) és a 88. kódonban (C-A). A 10 aminosav változással járó mutáció közül 6 a CDR1 és CDR2 régiókban, 2 az FR2 régióban, míg további 2 az FR3 régióban volt megfigyelhető. A statisztikai analízis alapján a CDR régiókban talált mutációk 1 esetben utaltak Ag szelekcióra. Ezen 4 eset IgH génanalízisének eredményeként úgy tűnik, hogy a KL-BV tumorsejtjének érettségi foka nem vezethető vissza egy pontra. Vizsgálatunk alapján feltételezhető, hogy a KK-BV számos B-sejt érettségi foknak felelhet meg.

IGHV3-21  
éset 1

IGHV5-51  
éset 2

IGHV3-9  
éset 3

IGHV3-33  
éset 4

IGHV3-21  
éset 1

IGHV5-51  
éset 2

IGHV3-9  
éset 3

IGHV3-33  
éset 4

10  
GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC CTG GTA AAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC

10  
GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGA TAC ACC TTT ACC AAG TAC TGG ATC GGC TGG GTG CCG CAG

10  
GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC CTG GTA CAG CCT GGC AAG TCC CTG AGA CTC TGT GCA

10  
CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC CTG GTG CAG CCT GGC AAG TCC CTG AGA CTC TGT GCA

50  
TCC ATT AGT AGT AGT AGT TAC ATA TAC TAC TCA GAG TCA GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

50  
ATG ATG TAT GCT GGT GAC TCT GAT ACC AGA TAC ACC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTG ACC ATC TCA

50  
GCT ATT AAT TGG AAT AGT GGT ACC ATA ACC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC

50  
GTT ATA TGG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC

50  
GAT ACG TAT AGC AGC AGC TGG GAC GCA TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TCA

CDR3  
60  
52 52A

CDR3  
100 00A 00B 00C 00D 00E 00F 00G 00H  
110

20  
GCT TGT GCA GCC TCT GCA GCC TGT GCA GCC TGT GCA GCC TGT GCA GCC TGT GCA GCC TGT GCA GCC

20  
AAG TAT AAC ATG AAC TGG GTG CCG CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATG GCG AAG TAT AAC

20  
AAG TAT AAC ATG AAC TGG GTG CCG CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATG GCG AAG TAT AAC

20  
AAG TAT AAC ATG AAC TGG GTG CCG CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATG GCG AAG TAT AAC

20  
AAG TAT AAC ATG AAC TGG GTG CCG CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATG GCG AAG TAT AAC

20  
AAG TAT AAC ATG AAC TGG GTG CCG CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATG GCG AAG TAT AAC

20  
AAG TAT AAC ATG AAC TGG GTG CCG CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATG GCG AAG TAT AAC

20  
AAG TAT AAC ATG AAC TGG GTG CCG CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATG GCG AAG TAT AAC

20  
AAG TAT AAC ATG AAC TGG GTG CCG CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATG GCG AAG TAT AAC

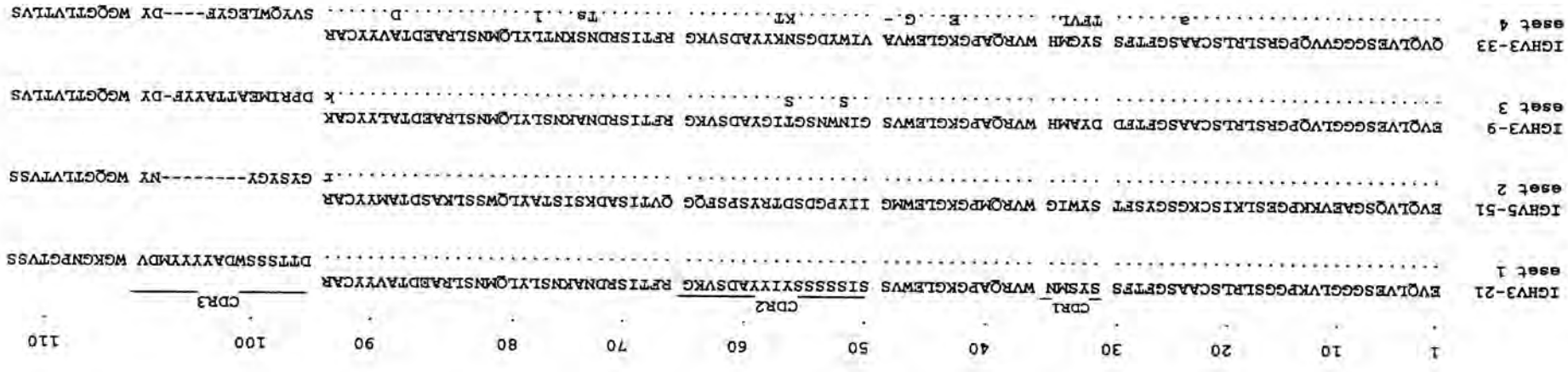
20  
AAG TAT AAC ATG AAC TGG GTG CCG CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATG GCG AAG TAT AAC

20  
AAG TAT AAC ATG AAC TGG GTG CCG CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATG GCG AAG TAT AAC

20  
AAG TAT AAC ATG AAC TGG GTG CCG CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATG GCG AAG TAT AAC

14 ábra: A 4 KL-BV által expresszált VH-D-JH gének nukleinsav szekvenciái és ezen szekvenciákhoz legzorosabb homológiai mutató germine VH gének. A nukleinsav azonosság pontokkal az eltérések a megfelelő nukleinsav nevének feltüntetésével jelöltek.





15 ábra. A 4 KL-BV eset V<sub>H</sub>-D<sub>H</sub> eset V<sub>H</sub>-D<sub>H</sub> gèneszakaszának aminosav szekvenciái. A legközelebbi germline V<sub>H</sub> gèneszekvenciával való homológiát pontokkal, az eltéréseket az adott aminosav nevének feltüntetésével jelöltük. Azon mutációkat, melyek aminosav változást eredményeztek, nagybetűvel, az aminosav változást nem okozó mutációkat kisbetűvel ábrázoltuk.

4. táblázat. A 4 KL-BV tumorsejtjei által expresszált Ig V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> gének vizsgálata.

Eset	klón	Intraklonális Germiline	Legközelebbi Nukleotid Homológia	CDR1 és CDR2		FRR1, FRR2 és FRR3		D Gén	J <sub>H</sub> Gén				
				R	S	R	S						
1.	A-F	no	HV3-21	100.0	0 (0.00)	0.00	0	0	0 (0.00)	0.00	0	D6-13	HJ6
2.	A-F	no	HV5-S1	99.7	0 (0.17)	0.00	0	0	0 (0.59)	0.00	1	D5-18	HJ4
3.	A-F	no	HV3-9	99.0	2 (0.55)	8.13x10 <sup>-2</sup>	0	0	0 (1.72)	0.00	1	D1-26	HJ4
4.	A-F	no	HV3-33	94.6	6 (2.18)	1.39x10 <sup>-2*</sup>	0	0	4 (7.47)	3.57x10 <sup>-2*</sup>	3	D6-19	HJ4

Rövidítések: R, a detektált és (várható) R mutációk száma; S, a detektált S mutációk száma; p; statisztikai szignifikancia.

### 5.3.3. Mutációanalízis

Az általunk vizsgált esetek közül háromban az expresszált  $V_H$  gének változó számú nukleotid eltérést mutatottak az EMBL/ GenBank adatbázisából származó germline génhez képest. Mivel a vizsgált esetekben a betegek germline  $V_H$  génjei nem álltak rendelkezésre a nukleotid különbségek némelyike feltehetőleg egyéni polimorfizmust is képviselhetett. Bár a  $V_H$  gének között általában alacsony a szekvencia polimorfizmus előfordulása (11) és azokban az általunk és mások (40) által tanulmányozott esetekben, melyekben a betegek germline génjei is vizsgálatra kerültek, a szekvenciák az esetek többségében azonosak voltak az EMBL/GenBank adatbázisából származó germline szekvenciákkal. Mindezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a  $V_H$  génekben előforduló polimorfizmus mértéke nem teszi szükségessé az adott beteg germline génjének vizsgálatát, így a nukleotid különbségeket szomatikus mutációként értékeltük. A szomatikus mutációk eloszlásának elemzését minden egyes esetben Chang és Casali (10) módszere szerint végeztük. Ezen módszer szerint vizsgáltuk, hogy az R mutációk előfordulása a CDR, illetve FR régiókban véletlenszerű-e. Vizsgálati eredményünket a 4. táblázat foglalja össze. A 4. esetben a binominális eloszlási modell alkalmazásával szignifikáns eloszlásban ( $p=.05$ ) a CDR régiókban több, míg az FR régiókban kevesebb R mutációt találtunk a vártnál. Ezen statisztikai analízis alapján a CDR régiókban talált mutációk egy esetben utaltak Ag szelekcióra. További egy esetben a mutációk megoszlása randomnak bizonyult, a másik két esetben nem fordult elő olyan mutáció, amely aminosav szekvencia változást eredményezett volna. Ezen négy eset IgH génanalízise során úgy tűnik, hogy a KL-BV tumorsejtjeinek érettségi foka nem vezethető

vissza egy pontra. Vizsgálati eredményünk arra utal, hogy a KL-BV számos B-sejt érettségi foknak felelhet meg.

## 6. Megbeszélés

Tanulmányunk első részében 67 előzőleg, a kieli osztályozás alapján centrocitás lymphomának és centrocitoid centroblastomának diagnosztizált esetet reklasszifikáltunk a hisztológiai, citológiai, immunfenotípus és molekuláris genetikai jellemzők alapján, hogy meghatározzuk a betegség hisztológiai spektrumát és azon immunhisztológiai és molekuláris biológiai vizsgálatok körét, melyek az objektív diagnózis felállításához nélkülözhetetlenek.

Eredményeink arra utalnak, hogy a vizsgált lymphoma entitás hisztológiai és citológiai megjelenése heterogen. A KL hisztológiai megjelenése alapján két altípust különböztethetünk meg, úgy mint noduláris és diffúz formát. A noduláris típusban csiracentrum maradványok körül a tumoros köpenyzóna kiszélesedett. A diffúz KL esetében a csiracentrumok hiányoznak. Vizsgálataink során a sejtek citológiai megjelenését véve alapul mindkét hisztológiai megjelenésű formát további három alcsoportba osztottuk. Így elkülönítettünk, klasszikus vagy citás, blasztos és kevertsejtes formát. A klasszikus KL-ban a tumorszövet kis és középnagy, a normál lymphocitáknál alig nagyobb, mérsékelten szabálytalan, indentált magvú sejtekből épül fel. A KL-BV esetében a sejtek nagyobbak, polimorfak, a sejtmagok finoman diszpergált kromatint és 3-4 apró, túszúrásnyi nukleóluszt tartalmaznak. A proliferációs aktivitás kifejezett, a mitózisok száma magas (23,29,33). További nehézséget jelent, hogy bizonyos százalékban ezen hisztológiai és citológiai

jellemzők egymással keveredve fordulnak elő. A kevertsejtes KL átmenetet képvisel a citás és a blasztoz formák között, melyben citás és blasztoz megjelenésű tumorsejtek együttesen vannak jelen.

A KL-ák prognosztikai megítélésében egyrészt fontos körülmény a tumorszövet esetleges nodularitásának jelenléte. Vizsgálati anyagunkban a noduláris forma nagyobb számban citás, míg a diffúz forma blasztoz vagy kevertsejtes citológiai megjelenéssel jár együtt. Ezen megfigyelés azon irodalmi adatokból jól ismert tényről látszik alátámasztani, miszerint a noduláris mintázatú NHL jobb prognózist képvisel. (33)

Az immunfenotípus meghatározás a KL-ák diagnosztikájában és differenciáldiagnosztikájában alapvető fontosságú (33,36,71), jóllehet az egyes B-sejtes NHL-ák között előfordulhatnak átfedések (42). Az általunk vizsgált KL-ák esetében a legmegbízhatóbb eredménnyel az immunfenotípus meghatározás járt, melynek kapcsán a tumorsejtek 99 %-ban CD5 és CD20 pozitívnak és CD23 negatívnak bizonyultak, függetlenül a histológiai és citológiai megjelenéstől. Ezen jellegzetes immunfenotípus a CLL/SLL és a KL differenciáldiagnosztikájában döntő fontosságú. Mindkét lymphoma tumorsejtjei CD5 és CD20 pozitívak, azonban a KL-val ellentétben a CLL és SLL tumorsejtjeire a CD23 pozitívitas jellemző (36,73). Ebből adódóan a KL és CLL elkülönítésében a CD23 pozitívitasnak vagy negativitásnak meghatározó szerepe van. A KL-ák diagnosztikájában kiegészítő vizsgálati módszer lehet a cyclin D1 immunhisztokémiai vizsgálat (15,16,71). Vizsgálataink során a 21 random módon kiválasztott KL-ás esetben elvégzett cyclin D1 immunhisztokémiai vizsgálat 13 esetben járt pozitív eredménnyel. A 8 cyclin D1 negatív eset közül 4, a jellegzetes histológiai citológiai és immunfenotípus megjelenés alapján, a cyclin D1 negativitas ellenére KL-nak bizonyult. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a cyclin D1

immunhisztokémia a hisztológiailag, citológiailag nehezen értékelhető esetekben addicionális módszer lehet a KL-ák diagnosztikájában, azonban a cyclin D1 negativitás önmagában nem szól KL lehetőségé ellen. Saját vizsgálati anyagunkban más szerzőkhöz hasonlóan (46) cyclin D1 negatív KL is előfordult ezzel szemben az irodalomban leírtak cyclin D1 túlprodukción egyébként limfoproliferatív kórképekben, így "hairy cell" leukaemiában (16), splenicus villosus lymphocytás lymphomában (26), immunocytomában és Hodgkin-kórban (71).

Citogenetikai módszerekkel a KL-ák 70 %-ban, míg molekulárgenetikai módszerekkel a KL-ák 50 %-ában detektálható a t(11;14) kromoszóma transzlokáció (3,15,68). A PCR erősítés során azonban problémát jelenthet, hogy a 11. kromoszómán a töréspont nem fókuszált, hanem viszonylag elszórtan helyezkedik el. A töréspontok nagy része egy 120 kb nagyságú, a BCL-1 régiót is magában foglaló MTC régió belül halmozottan fordulnak elő (24,43,64,69). A töréspontok kisebb hányada az MTC régió kívül, attól 3' irányban elhelyezkedő mTC nevezett régióban fordul elő (14). A törési pontok heterogenitása kétségesé teszi, hogy felállítható-e olyan PCR kondíció, amely minden törési régiót kimutat. Az általunk használt PCR az MTC régióra specifikus, ahol az irodalmi adatok alapján a töréspontok a legnagyobb gyakorisággal fordulnak elő (15,38). Az általunk vizsgált 17 eset közül csupán három esetben (18% ) kaptunk pozitívítást, mely elmarad az irodalomban közölt aránytól (35). A t(11;14) transzlokáció PCR-módszerrel történő kimutatása sikertelen lehet, ha a töréspontok olyan távol helyezkednek el egymástól, hogy a felhasznált primerekkel a töréspont régió több lépésben sem fedhető át, vagy ha a töréspont a vizsgált MTC-n kívül helyezkedik el. Továbbá az irodalomban leírtak KL-t t(11;14) transzlokáció nélkül is (16,55). Esetünkben további hibaforrásként szerepelhet, hogy vizsgálatunkhoz

többségében paraffinos blokkból izolált DNS állt rendelkezésre, mely feltehetően csökkenti a PCR amplifikáció esélyét (38,54). Ezen megfigyelések alapján úgy tűnik, hogy az általunk alkalmazott PCR nem járul hozzá szignifikánsan a KL diagnózisának felállításához.

Tanulmányunk második részében a mérsékelt és kifejezett malignitású KL tumorsejtei közötti klonális kapcsolat feltérképezése céljából két olyan KL molekuláris vizsgálatára került sor, melyek kórlefolyása során blasztos transzformáció eredményeként KL-BV alakult ki. Az immunfenotípus vizsgálatok során a KL és a KL-BV tumorsejtei egyaránt CD5-öt, CD20-at és nukleáris cyclin D1-et expresszáltak. Hasonlóképpen az Igh gén PCR amplifikációja és szekvencia vizsgálata azonos  $V_H$ -D-J<sub>H</sub> génszakaszt eredményezett mind a KL-ban, mind a későbbiekben kialakult KL-BV-ban, mely arra enged következtetni, hogy az általunk vizsgált esetekben a két tumor egyetlen klónból származik. Bár eredményünk az első molekuláris biológiai alapon nyugvó bizonyítéka a KL és a KL-BV közötti klonális kapcsolatnak, más kutatók eredményei is felvetik ennek lehetőségét. Elsőként Traweek és munkatársai számoltak be egy KL-ás esetről, ahol 4 évvel a diagnózis felállítását követően blaszok jelentek meg a perifériás vérben (63). Esetükben a KL és a cirkuláló blaszt sejtek Igh génjének összehasonlító Southern blot vizsgálata azonos Ig génátrendeződést igazolt. Majd Cuneo és társai (13) beszámoltak egy blasztos transzformációt mutató "atípusos CLL-ről", ahol mind a CLL, mind a blaszt sejtpopuláció hordozta a KL-ra jellemző t(11;14) kromoszóma transzlokációt. Jelen tanulmányban a KL és a KL-BV CDR3 génszakaszának azonossága egyértelmű bizonyítéka annak, hogy a KL-BV az eredeti KL klónból származik.

A szekvencia analízis során kimutattunk néhány nukleotid különbséget a tumorsejtek és a között legközelebbi homológiát mutató germline D és J<sub>H</sub>

gének szekvenciái között, azonban ezek a nukleotid különbségek jelen voltak mind a KL, mind a későbbiek során kialakult KL-BV tumorsejtjeiben. Ezen megfigyelésünk azon irodalmi adatokat támogatja, mely szerint a KL és a "de novo" KL-BV egyaránt hordozhat szomatikusan mutált gént (18). Mindezekben túlmenően megfigyelésünk arra enged következtetni, hogy interklonálisan divergált szubklónok nem fordulnak elő sem KL-ban sem annak transzformált formájában. Tehát szomatikus mutáció nem játszik szerepet a KL hisztológiai transzformációjában. Bár vizsgálatunk csupán a CDR3 régióra korlátozódott, mégis ezen génszakasz erőteljesen konzervált volta a KL és a transzformált KL-BV sejtjeiben arra utal, hogy ezek a sejtek megrekedtek a B-sejt differenciálódás egy adott fázisában és a KL kifejezett malignitású lymphomává történő transzformációja nincs összefüggésben a hipermutációs mechanizmus aktiválódásával.

Tanulmányunk utolsó részében a KL-BV sejteredetének meghatározása céljából négy KL-BV eset kapcsán vizsgáltuk a tumorsejtek átrendeződött Ig  $V_H$ -D- $J_H$  géneinek nukleinsav szekvenciáit. Két esetben a  $V_H$  gén nukleinsav szekvenciái azonosak, vagy csaknem azonosak voltak a germline gének prekursorával. Ezzel szemben a másik két esetben mutált  $V_H$  gének voltak megfigyelhetők. Továbbá azt is megfigyeltük, hogy ezen mutációk természetű és eloszlása lehet véletlenszerű vagy következményes az Ag szelekció közreműködésétől függően. Függetlenül az Ag szelekció jelenlététől vagy hiányától a vizsgált  $V_H$  gének szomatikus mutációja nem volt összefüggésben interklonális diverzifikációval. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a KL-BV tumorsejtjei származhatnak mutálatlan Ig géneket hordozó, naív, pre-centrum germinativum B-sejtekből, vagy reprezentálhatnak malignusan transzformált, Ag szelektált, mutált Ig géneket expresszáló érett B-sejteket. Jelen vizsgálati eredmények összegzésével egyidőben mások által megjelent



tanulmányban szintén erre a következtetésre jutottak (47). Ezen megállapítások figyelembe véve a szomatikus mutációk jelenlétét együttesen azt sugallják, hogy a KL-BV heterogén. A KL-BV tumorsejtjeinek vizsgálata során észlelt heterogén Ig  $V_H$  konfiguráció többféleképpen értelmezhető. Lehetséges, hogy a KL-BV egy heterogén betegség csoportot képvisel, melynek tumorsejtjei a B-sejt érés különböző állomásaiból származnak, mint ahogy a heterogenitás ezen típusát már más NHL-k esetében is feltételezték. Például CLL esetében a tumoros B-sejtek által expresszált  $V_H$  gén lehet mutálatlan vagy minimálisan mutált (58), azonban IgA és IgG izotípusú CLL-ben vagy azon CLL-ben melyek átrendeződött VH5 gént expresszálnak lehetnek szomatikusan mutáltak (8,22,40). Alternatív lehetőség, hogy a mutált vagy mutálatlan KL-BV különböző B1 sejtek malignus transzformációjából származik. Ezen utóbbi hipotézist látszik támogatni az a tanulmány, melyben a humán  $CD5^+$  B1 sejtek Ig  $V_H$ -D-J $_H$  génjeinek vizsgálata rávilágított arra, hogy ez a sejtpopuláció virgin B-sejteket, csak úgy mind affinitás érése során átesett sejteket foglal magába (57). Ezen elképzelés alapján lehetséges, hogy a KL-BV progenitorai mutált és mutálatlan B1 sejtek egyaránt lehetnek. Annak tisztázására, hogy vajon a mutált vagy nem mutált KL-BV különböző B1 sejtek malignus transzformációjának eredménye, vagy az ontogenezis során különböző fejlődési stádiumban megrekedt B-sejt malignus transzformációja során alakul ki további, olyan vizsgálatok szükségesek, melyek mutált és nem mutált  $V_H$  géneket hordozó normál B-sejtek kapcsolatát hivatottak feltárni.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Kelényi Gábor professzornak és Dr. Matolcsy Andrásnak munkám során nyújtott szüntelen szellemi támogatásukért, dr. Hírné Perkecz Anikónak fáradhatatlan, lelkiismeretes laboratóriumi munkájáért, férjemnek a dolgozat szerkesztéséhez nyújtott számítástechnikai és lelki támogatásáért és végül családomnak a dolgozat elkészítése során tanúsított türelméért.

## 7. Rövidítések

<b>Ag:</b> antigén	<b>MCL1:</b> a "major" translokációs "cluster" 5' végével komplementer "primer"
<b>antisense:</b> 3' primer	
<b>BCL-1:</b> a 11-es kromoszóma q13-as lókusza által kódolt oncoprotein	<b>MM:</b> myeloma multiplex
<b>CD5, 20, 23:</b> "cluster designation"	<b>MTC:</b> "major translocation cluster"
sejtdifferenciálódási immunológiai markerek	<b>mTC:</b> "minor translocation cluster"
<b>CDR1,2,3:</b> complementaritást meghatározó régiók	<b>NDS:</b> nátrium dodecil szulfát
<b>CG:</b> centrum germinativum	<b>NHL:</b> non-Hodgkin lymphoma
<b>CLL:</b> krónikus lymphocytás leukémia	<b>PCR:</b> polimeráz láncreakció
<b>D:</b> diverzitás gén	<b>pCRII:</b> szekvenáláshoz használt vektor
<b>DNS:</b> dezoxiribonukleinsav	<b>PRAD-1 (másnéven cyclin D1) gén:</b> parathyreoidea adenoma gén (11-es kromoszóma q13-as lókusza által kódolt oncoprotein)
<b>dNTP:</b> dezoxinukleotidfoszfát	<b>primer:</b> próba: a vizsgált gén egy adott szakaszával komplementer szintetizált gén szakasz
<b>EDTA:</b> etilén-diamin-tetraecetsav	<b>R:</b> (replacement) aminosav cserét okozó mutáció
<b>FL:</b> folliculáris lymphoma	<b>REAL:</b> Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasm
<b>FR:</b> (framework); az IgH gén integritásáért felelős génszakaszok	<b>rpm:</b> (revolutions per minute) fordulatszám
<b>G1:</b> a sejtciklus G1 fázisa	<b>S:</b> (silent) aminosav változást nem okozó mutáció
<b>HE:</b> hematoxilin-eozin	<b>sense:</b> 5' primer
<b>IC:</b> immunocitoma	<b>SLL:</b> kis lymphocytás lymphoma
<b>IgD, IgM:</b> immunglobulin izotípusok	<b>Taq:</b> Thermus aquaticus
<b>IgH:</b> immunglobulin nehézlánc	<b>Tris-HCL:</b> tris-(hidroximetil)-aminometán szabad bázisának és sósavas sójának keveréke
<b>JH:</b> ("joining" régió) az immunglobulin nehézlánc gén géntrendeződésben résztvevő génszakasza	<b>U:</b> nemzetközi egység
<b>kb:</b> kilobázis	<b>VH:</b> variabilis régió
<b>KL:</b> köpenysejtes lymphoma	<b>WHO:</b> World Health Organisation
<b>KL-BV:</b> köpenysejtes lymphoma blaszto variáns	
<b>MALT:</b> mukóza-asszociált lymphoid szövet	

## 8. Irodalomjegyzék

1. Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project: National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphoma: Summary and description of a working formulation for clinical usage, *Cancer*, 49 (1982) 2112
2. Arnold, A., Cossman, J., Bakhshi, A., Jaffe, E.S., Waldmann, T.A. and Korsmeyer, S.J.: Immunoglobulin gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms, *New Engl. J. Med.*, 309 (1983) 1593-1599.
3. Athan, E., Foitl, D.R. and Knowles, D.M.: Bcl-1 rearrangement. Frequency and clinical significance among B-cell chronic lymphocytic leukemias and non-Hodgkin's lymphomas, *Am J Pathol*, 138 (1991) 591-599.
4. Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M.J., Pagano, M. and Draetta, G.: Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1, *Genes and Development*, 7 (1993) 812-821.
5. Banks, P.M., Chan, J. and Cleary, M.L.: Mantle cell lymphoma: a proposal for unification of morphologic, immunologic and molecular data, *Am J Surg Pathol*, 16 (1992) 637-640.
6. Berger, F., Felman, P. and Sonet, A.: Nonfollicular small B-cell lymphomas: a heterogeneous group of patients with distinct clinical features and outcomes, *Blood*, 83 (1994) 2829-2835.
7. Buckley, M.F., Sweeney, K.J.E., Hamilton, J.A., Sini, R.L., Manning, D.J., Nicholson, R.I., de Fazio, A., Watts, C.K.W., Musgrove, E.A. and Sutherland, R.L.: Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer, *Oncogene*, 8 (1993) 2127-2133.
8. Cai, J., Humphries, C., Richardson, A. and Tucker, P.W.: Extensive and selective mutation of rearranged VH5 gene in B cell chronic lymphocytic leukemia, *J. Exp. Med.*, 176 (1992) 1073-1079.

9. Chan, J.K., Ng, C.S. and Isaacson, P.G.: Relationship between high-grade lymphoma and low-grade B-cell mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALToma) of the stomach, *Am. J. Pathol.*, 136 (1990) 1153-1164.
10. Chang, B. and Casali, P.: The CDR1 sequences of a major proportion of human germline Ig VH genes are inherently susceptible to amino acid replacement, *Immunol Today*, 15 (1994) 367-373.
11. Cook, G.P. and Tomlinson, I.M.: The human immunoglobulin VH repertoire, *Immunol Today*, 16 (1995) 237-242.
12. Cullen, M., Lister, T. and Brearley, R.: Histologic transformation of non-Hodgkin's lymphoma: a prospective study, *Cancer*, 44 (1979) 645-651.
13. Cuneo, A., De Angeli, C., Roberti, M.G., Piva, N., Bigoni, R., Gandini, D., Rigolin, G.M., Moretti, S., Cavazzini, P., Del Senno, L. and Castoldi, G.: Richter's syndrome in a case of atypical chronic lymphocytic leukaemia with the t(11;14)(q13;32): role for a p53 exon 7 gene mutatio., *British Journal of Haematology*, 92 (1996) 375-381.
14. de Boer, C.J., Loyson, S. and Kluin, P.M.: Multiple breakpoints within the bcl-1 locus in B-cell lymphoma: Rearrangements of the cyclin D1 gene, *Cancer Res*, 53 (1993) 4148-4152.
15. de Boer, C.J., Schuurung, E., Dreef, E., Peters, G., Bartek, J., Kluin, P.M. and van Krieken, J.H.J.M.: Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphopma, *Blood*, 86 (1995) 2715-2723.
16. de Boer, C.J., van Krieken, J.H.J.M., Kluin-Nelemans, J.C., Kluin, P.M. and Schuurung, E.: Cyclin D1 messenger RNA overexpression as a marker for mantle cell lymphoma, *Oncogene*, 10 (1995) 1833-1840.
17. Deane, M. and Norton, J.D.: Immunoglobulin heavy chain variable region family usage is independent of tumor cell phenotype in human B lineage leukemias, *Eur. J. Immunol.*, 20 (1990) 2209

18. Du, M.Q., Diss, T.C., Xu, C.F., Wotherspoon, A.C. and Isaacson, P.G.: Ongoing immunoglobulin gene mutations in mantle cell lymphomas, *British Journal of Haematology*, 96 (1997) 124-131.
19. Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K. and Hood, L.: An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from free segments of DNA: VH, D, and JH, *Cell*, 19 (1980) 981-992.
20. Gillet, C., Fantl, V., Smith, R., Fischer, C., Bartek, J., Dickson, C., Barnes, D. and Peters, G.: Amplification and over-expression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining, *Cancer Research*, 54 (1994) 1812-1817.
21. Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K.C., Cleary, M.L., Delson, G., De Wolf-Peters, C., Falini, B., Gatter, K.C., Grogan, T.M., Isaacson, P.G., Knowles, D.M., Mason, D.Y., Muller-Hermelink, H.K., Pileri, S.A., Piris, M.A., Ralfkiaer, E. and Warnke, R.A.: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group, *Blood*, 84 (1994) 1361-1392.
22. Hashimoto, S., Dono, M., Wakai, M., Allen, S.L., Lichtman, S.M., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Ferrarini, M., Silver, J. and Chiorazzi, N.: Somatic diversification and selection of immunoglobulin heavy and light chain variable region genes in IgG+ CD+ chronic lymphocytic leukemia B cells, *J Exp Med*, 181 (1995) 1507-1517.
23. Hernandez, L., Fest, T., Cazorla, M., Teruya-Feldstein, J., Bosch, F., Pienado, M.A., Piris, M.A., Montserrat, E., Cardesa, A., Jaffe, E.S., Campo, E. and Raffeld, M.: p53 gene mutation and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas, *Blood*, 87 (1996) 3351-3359.
24. Ince, C., Blick, M., Lee, M. and Pathak, S.: Bcl-1 gene rearrangements in B-cell lymphoma, *Leukemia*, 2 (1988) 343-346.
25. Inghirami, G., Szabolcs, M.J., Yee, H.T., Corradini, P., Cesarman, E. and Knowles, D.M.: Detection of immunoglobulin gene rearrangement of B cell nonHodgkin's lymphomas and leukemias in fresh, unfixed and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction, *Lab. Invest.*, 68 (1993) 746-757.

26. Jadayel, D., Matutes, E., Dyer, M.J.S., Brito-Babapulle, V., Khokar, M.T., Oscier, D. and Catovsky, D.: Splenic lymphoma with villous lymphocytes: Analysis of BCL1 rearrangements and expression of the cyclin D1 gene, *Blood*, 83 (1994) 3664-3671.
27. Jaffe, E.S., Bookman, M.A. and Longo, D.L.: Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation-mantle zone lymphoma: a distinct subtype of B-cell lymphoma, *Hum. Pathol.*, 18 (1987) 877-880.
28. Johnson, L.E.: G1 events and the regulation of genes for S-phase enzymes, *Current Opinion in Cell Biology*, 4 (1992) 149-154.
29. Kaleem, Z., Wakoff, A.R., Smith, R.S. and Hess, J.L.: Blastic transformation of mantle cell lymphoma, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 120 (1996) 577-580.
30. Keyomarsi, K. and Pardee, A.B.: Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (1993) 1112-1116.
31. Knowles, D.M.: Lymphoid cell markers. Their distribution and usefulness in the immunophenotypic analysis of lymphoid neoplasms, *Am. J. Surg. Pathol*, 9 (1985) 85
32. Korsmeyer, S.J., Hieter, P.A., Ravetch, J.V., Pohlack, D.G., Waldmann, T.A. and Leder, P.: Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 (1981) 7096-7100.
33. Lardelli, P., Bookman, M.A., Sundeen, J., Longo, D.L. and Jaffe, E.S.: Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation: morphologic and immunophenotypic spectrum and clinical correlations, *American Journal of Surgical Pathology*, 14 (1990) 752-763.
34. Leach, F.S., Elledge, S.J., Sherr, C.J., Wilson, J.K.V., Markowitz, S., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B.: Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas, *Cancer Research*, 53 (1993) 1986-1989.

35. Lim, L., Segal, G.H. and Wittwer, C.T.: Detection of bcl-1 gene rearrangement and B-cell clonality in mantle cell lymphoma using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, *AJCP*, 104 (1995) 689-695.
36. Loyson, S.A.J., de Boer, C.J., Schuurig, E., Kluin, P.M. and van Krieken, J.H.J.M.: Mantle cell lymphoma: A morphological, immunohistochemical and molecular genetic study, *Path Res Pract*, 192 (1996) 781-789.
37. Lukes, R. and Collins, R.: Immunologic characterisation of human malignant lymphomas, *Cancer*, 34 (1974) 1488
38. Luthra, R., Hai, S. and Pugh, W.C.: Polymerase chain reaction detection of the t(11;14) translocation involving the bcl-1 major translocation cluster in mantle cell lymphoma, *Diagn Mol Pathol*, 4 (1995) 4-7.
39. Matolcsy, A.: High-grade transformation of low-grade non-Hoodgkin's lymphomas: mechanisms of tumor progression, *Leukemia Lymphoma*, in print (1999)
40. Matolcsy, A., Casali, P., Liu, Y. and Knowles, D.M.: Molecular characterisation of IgA-and/or IgG-switched chronic lymphocytic leukemia B cells, *Blood*, 89 (1997) 1732-1739.
41. Matolcsy, A., Inghirami, G. and Knowles, D.M.: Molecular genetic demonstration of the diverse evolution of Richter's syndrome (chronic lymphocytic leukemia and subsequent large cell lymphoma), *Blood*, 83 (1994) 1363-1372.
42. Matutes, E., Owusu-Ankomah, K., Morilla, R., Gracia Marco, J., Houlihan, A., Que, T.H. and Catovsky, D.: A scoring system for the immunological diagnosis of CLL, *Leukemia*, 8 (1994) 1640-1645.
43. Medeiros, L.J., van Krieken, J.H., Jaffe, E.S. and Raffeld, M.: Association of bcl-1 rearrangements with lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation, *Blood*, 76 (1990) 2086-2090.
44. Miller, S.A., Dykes, D.D. and Poleski, H.F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res.*, 16 (1988) 1215



45. Ott, M., Ott, G., Kuse, R., Porowski, P., Gunzer, U., Feller, A.C. and Müller-Hermelink, H.K.: The anaplastic variant of centrocytic lymphoma is marked by frequent rearrangements of the bcl-1 gene and high proliferation indices, *Histopathology*, 24 (1994) 329-334.
46. Ott, M.M., Helbing, A., Ott, G., Bartek, J., Fischer, L., Dürr, A., Kreipe, H. and Müller-Hermelink, H.K.: bcl-1 rearrangement and cyclin D1 protein expression in mantle cell lymphoma, *Journal of Pathology*, 179 (1996) 238-242.
47. Pittaluga, S., Tierens, A., Pinyol, M., Campo, E., Delabie, J. and De Wolf-Peeters, C.: Blastic variant of mantle cell lymphoma shows a heterogeneous pattern of somatic mutations of the rearranged immunoglobulin heavy chain variable genes, *Br. J. Haematol.*, 102 (1998) 1301-1306.
48. Pittaluga, S., Wlodarska, I. and Stul, M.S.: Mantle cell lymphoma: a clinicopathological study of 55 cases, *Histopathology*, 26 (1995) 17-24.
49. Quelle, D.E., Ashmun, R.A., Shurtleff, S.A., Kato, J.Y., Bar-Sagi, D., Roussel, M.F. and Sherr, C.J.: Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts, *Genes and Development*, 7 (1993) 1559-1571.
50. Raynaud, S.D., Bekri, S., Leroux, D., Grosgeorge, J., Klein, B., Bastard, C., Gaudray, P. and Simon, M.: Expanded range of 11q13 breakpoints with differing patterns of cyclin D1 expression in B-cell malignancies, *Genes Chromosom Cancer*, 8 (1993) 80-87.
51. Reed, T.J., Reid, A., Wallberg, K., O'Leary, T.J. and Frizzera, G.: Determination of B-cell clonality in paraffin-embedded lymph nodes using the polymerase chain reaction, *Diagnostic Molecular Pathology*, 2(1) (1993) 42-49.
52. Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H. and Reed, S.I.: Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system, *Molecular and Cellular Biology*, 14 (1994) 1669-1679.
53. Rimokh, R., Berger, F., Delsol, G., Charrin, C., Bertheas, M.F. and Magaud, J.P.: Rearrangement and overexpression of BCL-1/PRAD1/ gene in intermediate

- lymphocytic lymphoma and in t(11q13)-bearing leukemias, *Blood*, 81 (1993) 3063-3067.
54. Rimokh, R., Berger, F., Delsol, G., Digonnet, I., Rouault, J.P., Tigaud, J.D., Gadoux, M., Coiffier, B., Bryon, P. and Magaud, J.: Detection of the chromosomal translocation t(11;14) by polymerase chain reaction in mantle cell lymphomas, *Blood*, 7 (1994) 1871-1875.
55. Rosenberg, C.L., Wong, E. and Petty, E.M.: PRAD1, a candidate BCL1 oncogene:mapping and expression in centrocytic lymphoma, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 (1991) 9638-9642.
56. Salmon, S.E. and Seligmann, M.: B-cell neoplasia in man, *Lancet*, 11 (1974) 1230
57. Schettino, E.W., Chai, S.K., Kasaian, M.T., Schroeder, H.W. and Casali, P.: VHDJH gene sequences and antigen reactivity of monoclonal antibodies produced by human B-1 cells. Evidence for somatic selection, *J Immunol*, 158 (1997) 2477-2489.
58. Schroeder, H.W. and Dighiero, G.: The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire, *Immunol Today*, 15 (1994) 288-94.
59. Segal, G.H. and Maiese, R.L.: Mantle cell lymphoma: Rapid polymerase chain reaction-based genotyping of a morfologically hetrogenous entity, *Arch Pathol Lab Med*, 120 (1996) 835-841.
60. Sherr, C.J.: Mammalian G1 cyclins, *Cell*, 73 (1993) 1059-1065.
61. Stansfeld, A., Diebold, J., Kapanci, Y., Kelényi, G., Lennert, K., Mioduszevska, O., Noel, H., Rilke, F., Sundstrom, C., Unnik, J. and Wright, D.: Updated Kiel classification for lymphomas, *Lancet*, 1 (1988) 292
62. Swerdlow, S.H., Habeshaw, J.A., Hashimoto, S., Dhaliwal, H.S., Lister, T.A. and Stansfeld, A.G.: Centrocytic lymphoma: a distinc clinicopathologic and immunologic entity: a multiparameter study of 18 cases at diagnosis and relapse., *American Journal of Pathology*, 113 (1983) 181-197.

63. Traweek, S.T., Liu, J., Johnson, R.M., Winberg, C.D. and Rappaport, H.: High-grade transformation of chronic lymphocytic leukemia and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. Genotypic confirmation of clonal identity, *Hematopathology*, 100 (1993) 519-526.
64. Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Ericson, J., Nowell, P.C. and Croce, C.M.: Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas with the t(11;14) chromosome translocation, *Science*, 224 (1984) 1403-1406.
65. Tsuruta, H., Sakamoto, H., Onda, M. and Terada, M.: Amplification and overexpression of EXP1 and EXP2/cyclin D1 genes in human esophageal carcinomas, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 196 (1993) 1529-1536.
66. van den Berghe, H., Parloir, C., David, G., Michaux, J.L. and Sokal, G.: A new characteristic karyotypic anomaly in lymphoproliferative disorders, *Cancer*, 44 (1979) 188
67. Volkenandt, M., Dicker, A.P., Fanin, R., Banerjee, D., Albino, A. and Bertino, J.R.: Polymerase chain reaction analysis of DNA from paraffin-embedded tissue. In B.A. White (Ed.) *PCR protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1993, pp. 81-83.
68. Williams, M.E., Meeker, T.C. and Swerdlow, S.H.: Rearrangement of the chromosome 11 bcl-1 locus in centrocytic lymphoma: analysis with multiple breakpoint probes, *Blood*, 78 (1991) 493-498.
69. Williams, M.E., Swerdlow, S.H. and Meeker, T.C.: Chromosome t(11;14)(q13q32) breakpoints in centrocytic lymphoma are highly localised at the bcl-1 major translocation cluster, *Leukemia*, 7 (1993) 1437-1440.
70. Wright, D.K. and Manos, M.M.: Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (Eds.) *PCR protocols, a guide to methods and applications*, Academic Press, Inc., San Diego, CA., 1990, pp. 153-158.

71. Yatabe, Y., Nakamura, S., Seto, M., Kuroda, H., Kagami, Y. and Suzuki, R.: Clinicopathologic study of PRAD1/Cyclin D1 overexpressing lymphoma with special reference to mantle cell lymphoma, *Am J Surg Pathol*, 20 (1996) 1110-1122.
72. Zhang, Y.J., Jiang, W., Chen, C.J., Lee, C.S., Kahn, S.M., Santella, R.M. and Weinstein, I.B.: Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 196 (1993) 1010-1016.
73. Zuckerman, L.R., Medeiros, L.J., Ferry, J.A. and Harris, N.L.: Diffuse low grade B-cell lymphomas: Four clinically distinct subtypes defined by a combination of morphologic and immunophenotypic features, *Am J Clin Pathol*, 100 (1993) 373-385.

## 9. A PhD dolgozat alapjául szolgáló közlemények, absztraktok és előadások

### *Folyóiratban megjelent közlemények:*

1. Endrédi J, László T, Kelényi G: Lymphoma Referencia Centrum 1987-1988. Orv. Hetil. 1991, 132:733-36.
2. László T, Kelényi G, Matolcsy A: B-sejtes lymphoproliferatív kórképek klonalitásának elemzése immunglobulin nehézlánc polimeráz láncreakció segítségével. Orv. Hetil. 1996, 137:1963-67
3. Faludi R, Molnár L, Afshin T, Wéber Gy, László T, Mezőfi B: A distalis ileum arteriovenosus malformatioja által okozott vashiányos anaemia. Orv. Hetil. 1998, 139:1025-27.
4. László T, Matolcsy A: Blastic transformation of mantle cell lymphoma: genetic evidence for clonal link between the two stages of tumour. *Histopathology* 1999, (in print)
5. Nagy M, Fehér K, László T, Szomor Á, Losonczy H, Kelényi G, Matolcsy A: A T-sejt receptor génátrendeződés vizsgálata lymphoproliferatív kórképekben polimeráz láncreakció segítségével. Orv. Hetil. 1999, (közlésre elfogadva)
6. László T, Nagy M, Kelényi G, Matolcsy A: Immunoglobulin VH gene mutational analysis suggests that blastic variant of mantle cell lymphoma derive from different stages of B-cell maturation. *Leukaemia Res.* 1999, (submitted for publication)
7. Szeredai Z, Csernus B, Nagy M, László T, Wranke R.A, Matolcsy A: Somatic mutation of the 5' noncoding region of the BCL-6 gene is associated with intracлонаl diversity and clonal selection in histologic transformation of follicular lymphoma *Am J Path.* 1999, (submitted for publication)

*Folyóiratok supplement-jeiben megjelent absztraktok:*

1. László T, Méhes G, Kelényi G: Kifejezett malignitású B-sejtes lymphomák multiparaméteres elemzése. Magyar Oncol. 1995, 39:143. (suppl.)
2. László T, Losonczy H, Egyed M, Matolcsy A: A minimális reziduális betegség meghatározása B-sejtes lymphomák/leukaemiák esetében sz immunoglobulin nehézlánc gén CDR3 régiójára specifikus PCR segítségével. Magyar Belorvosi Arch. (suppl.) 1997, 1: 27.

*Előadások jegyzéke:*

1. László T, Méhes G, Kelényi G: Kifejezett malignitású B-sejtes lymphomák multiparaméteres elemzése. Pathologus Találkozó Székesfehérvár, 1994.
2. László T, Méhes G, Kelényi G: Kifejezett malignitású B-sejtes lymphomák multiparaméteres elemzése Magyar Oncologusok XXI. Nemzeti Kongresszusa Pécs, 1995.nov. 9-11.
3. László T, Kelényi G, Matolcsy A: B-sejtes lymphoproliferatív kórképek klonalitásának elemzése immunoglobulin nehézlánc polimeráz láncreakció segítségével. Magyar Pathologus Kongresszus Szeged, 1995.
4. László T, Kelényi G, Matolcsy A: B-sejtes lymphoproliferatív kórképek klonalitásának elemzése immunoglobulin nehézlánc polimeráz láncreakció segítségével. Malignus lymphoma konferencia Pécs, 1996.
5. László T, Losonczy H, Egyed M, Matolcsy A: A minimális reziduális betegség meghatározása B-sejtes lymphomák/leukaemiák esetében sz immunoglobulin nehézlánc gén CDR3 régiójára specifikus PCR segítségével. Magyar Haematológiai és Transzfuziológiai Társaság XVI. Kongresszusa, Szeged, 1997. április 24-26.
6. László T, Matolcsy A: A köpenysejtes lymphomák molekuláris biológiai jellemzése. Magyar Haematológiai és Transzfuziológiai Társaság XVII. Kongresszusa, Székesfehérvár, 1998. április 23-25.

7. Pongrácz K, Palotai I, László T: Atypusos sarcoidosis. Magyar Gyermekorvosok Társaság és Magyar Pulmonologus Társaság Gyermekpulmonológiai Szekció évi Tudományos ülése, Mosdós, 1998. 08.27-29.
8. László T, Matolcsy A: A köpenysejtes lymphoma és a diagnosztikát elősegítő molekuláris biológiai jellemzők. A Magyar Patológusok Társaságának és a Nemzetközi Patológiai Akadémia (IAP) Magyar Deviziójának Kongresszusa, Gyula, 1998. 08. 26-29.
9. László T: Tüdőre lokalizált angiocentrius lymphoma. Dunántúli Pathológus Találkozó, Marcali, 1999. 05.07.