

**Az érett T-sejtes lymphomák funkcionális patogenezeise**  
**Krenács László PhD**  
**Részletes beszámoló a zárójelentéshez**  
**KON-46663**

A perifériás (vagy post-thymicus) T-sejtes lymphomák (PTL) az érett T-sejtek daganatai, melyek biológiailag, klinikailag és hisztomorfológiailag rendkívül változatos daganatcsoportot képviselnek. Az PTL esetek többsége az érett  $\alpha\beta$  T-sejtek fenotípusát hordozza, de előfordul  $\gamma\delta$  T-sejt, sőt NK-sejt eredetű daganat is. Az NK-sejtes lymphomákat a hagyomány, valamint a hasonló morfológia, átfedő immunfenotípus és funkcionális jellegzetességek okán együtt klasszifikáljuk a valódi T-sejtes lymphomákkal.

A célkitűzésünk alapvetően az volt, hogy az érett T/NK-sejtes lymphomák egyes típusainak komplex immunmorfológiai elemzése révén megállapítsuk a daganatsejtek funkcionális antigén profilját, amelynek révén, az immunológia legújabb eredményeit is figyelembe véve, a normális sejtes megfelelő is levezethető lehet. A normális sejtes megfelelő funkcionális differenciációja és immunbiológiai jellemzői utalhatnak arra, hogy milyen tartós behatások érhetik, illetve milyen, a lymphomagenesis szempontjából fokozott fogékonyságot jelentő mechanizmusok zajlanak ezekben a sejt típusokban, azaz a normális sejtes megfelelő funkciójának megismerése kulcsfontosságú lehet a malignus átalakulásban szerepet játszó tényezők meghatározásában is. A daganatsejtek normális megfelelőinek a meghatározása elősegítheti hatásosabb kezelési módokat kidolgozását is, hiszen arra nézve is adatokhoz juthatunk, hogy a daganatsejt natív, vagy neoplastikus dysregulációjával kapcsolatos tulajdonságai hogyan avatkoznak be a beteg immunrendszerébe. Az érett T-sejtes lymphomák tanulmányozása révén a daganatsejtek normális funkcionális megfelelőiről olyan adatokat nyerhetünk, amelyek a konvencionális és nem konvencionális T-sejtekre vonatkozó immunológiai ismereteinket is bővíthetik.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

*Szövetminták.* A feldolgozott esetek a Würzburgi Egyetem Patológiai Intézetének és a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány, Szeged Daganatpatológiai és Molekuláris Diagnosztikai Laboratóriumának szövettani archívumából kerültek ki.

*Immunfenotipizáláshoz használt antitestek.* Az immunfenotipizálások során összesen 41 féle leukocyta differenciációs felszíni antigén ellenes, 13 féle TCR  $\beta$  és  $\delta$  lánc ellenes, 7 féle kemokin és kemokin receptor ellenes, valamint 3 egyéb, monoklonális és poliklonális antitest került alkalmazásra.

*Immunhisztokémiai detektálás.* Az immunhisztokémiai reakciókat részben a streptavidin-biotin-peroxidáz, részben a jelölt dextrans polimer (EnVision™, DAKO) módszerrel hajtottuk végre. Az EnVision rendszert mind peroxidáz, mind alkalikus foszfatáz jelöléssel alkalmaztuk, az utóbbit a szekvenciális immunoenzimatikus kettős jelölések során.

*A szekvenciális immunoenzimatikus kettős jelölés.* A szekvenciális immunoenzimatikus kettős jelölést az angioimmunoblastos T-sejtes lymphoma daganatsejtjeinek vizsgálata során alkalmaztuk. Ennek során a monoklonális egér, illetve poliklonális nyúl, vagy kecske primer antitestek lekötődésének kimutatását (első lépcső) kombináltuk a második lépésben alkalmazott monoklonális egér, poliklonális nyúl, vagy poliklonális kecske antitestek lekötődésének detektálásával.

*A TCRV $\beta$  génátrendeződés és expresszió meghatározása (TCRV $\beta$  „spectrotyping”).* A TCR $\beta$  gén variábilis szegmentuma 25 funkcionális alcsaládot tartalmaz. A 25 TCRV $\beta$  szegmensre (és főbb variánsokra) specifikus PCR segítségével meghatároztuk a monoklonális  $\beta$  génszegmenst, majd erre a monoklonális  $\beta$  láncra specifikus antitest alkalmazásával, többes fluorescens jelölés és konfokális mikroszkóp segítségével térképeztük fel a daganatsejtek funkcionális fenotípusát. A vizsgálatokhoz olyan eseteket használtunk, amelyekből gyorsfagyasztott szövet állt rendelkezésünkre, amelyek monoklonálisnak bizonyultak valamely V $\beta$  génszegmentumra nézve, és amelyek a beszerezhető V $\beta$  szegmentumokra specifikus antitestek spektrumába estek.

*TCRV $\gamma$  génanalízis.* A TCR $\gamma$  génátrendeződést a hepato-splenikus  $\gamma\delta$  T-sejtes lymphomák és a subcután panniculitis-szerű T-sejtes lymphomák feldolgozása során vetettük be. Részben a McCarthy és mtsai. által 1992-ben leírt eljárást, részben a primerek 5' végén GC-clamp-et tartalmazó denaturációs gélelektroforézis (DGGE) módszerét alkalmaztuk. Mindkettőhöz V $\gamma$

és J $\gamma$  konszenzus primerek (V $\gamma$ 1-8, V $\gamma$ 9, V $\gamma$ 10, V $\gamma$ 11, illetve J $\gamma$ 1, J $\gamma$ 2, J $\gamma$ p1, J $\gamma$ 2) kerültek felhasználásra.

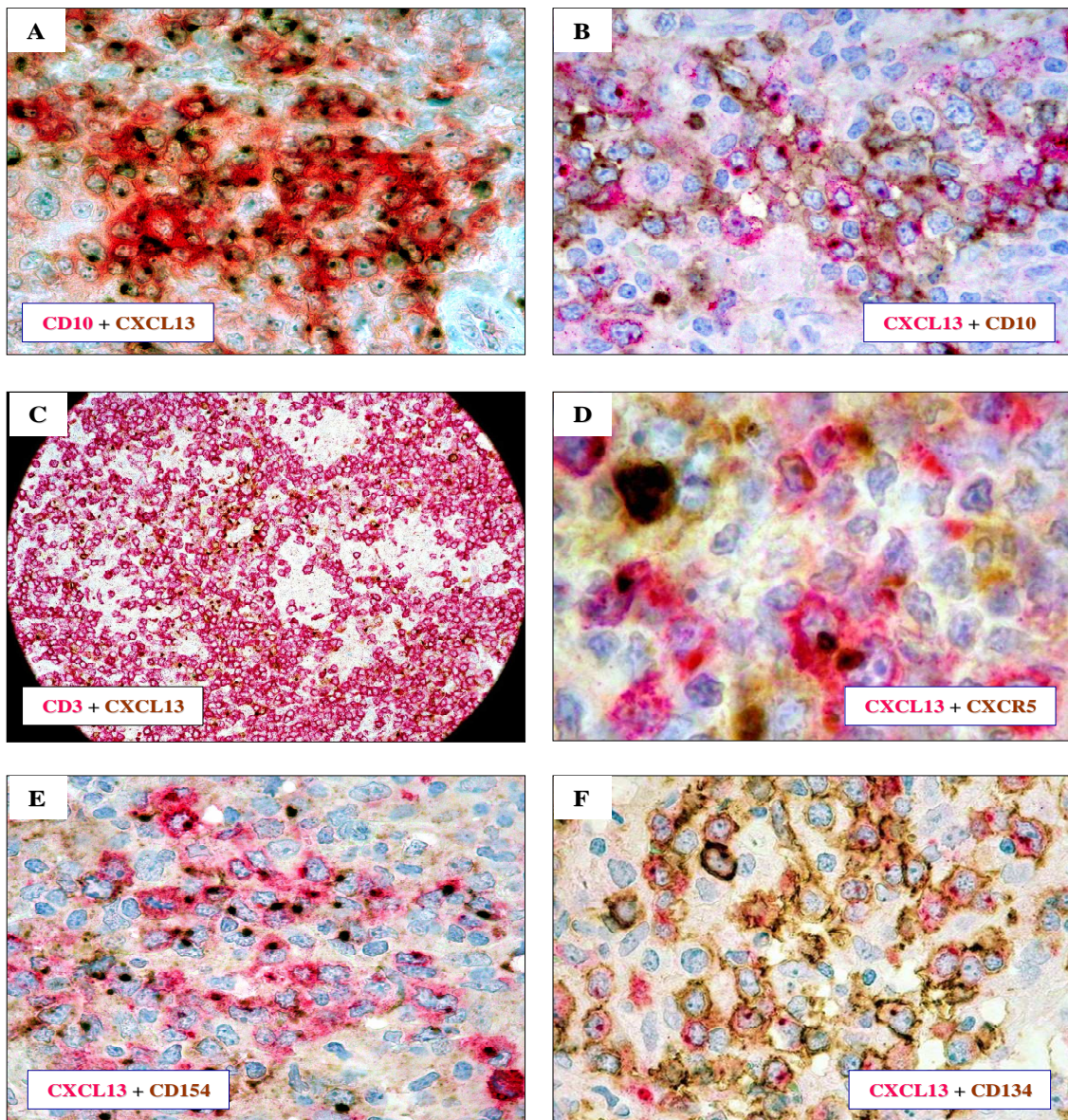
## EREDMÉNYEK

- Elsőként bizonyítottuk, hogy a hepato-splenicus  $\gamma\delta$  T-sejtes lymphoma nemcsak 7-es izokromoszómát hordozhat klonális kromoszóma aberrációként, hanem az ezzel ekvivalens 7-es gyűrűkromoszómát is.
- Megállapítottuk, hogy az angioimmunoblastos T-sejtes lymphoma daganatsejtjei az érintett nyirokcsomó lymphoid szövetének csak kis frakcióját képezik.
- Kimutattuk, hogy az angioimmunoblastos T-sejtes lymphoma daganatsejtjei következetesen CD45RA<sup>-</sup>CD45R0<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>bcl-2<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> fenotípust mutatnak, ami alapján terminálisan differenciálódott CD4<sup>+</sup> effektor T-sejteknek felelnek meg.
- Megállapítottuk, hogy az angioimmunoblastos T-sejtes lymphoma CD10<sup>+</sup> daganatsejtjei koexpressziót mutatnak az egyik legspecifikusabbnak tartott T<sub>FH</sub> sejt antigénnek, a CXCL13 kemokinnel. A CXCL13, szemben a CD10-zel, valamennyi AITL esetben expresszálódik.
- Megállapítottuk, hogy a CXCL13 és receptora, a CXCR5 szintén átfedő expressziót mutatott az AITL daganatsejtjeiben, ami a T<sub>FH</sub> sejtekre nagy fokban specifikus antigén profilt bizonyít. Az, hogy a ligand és a receptora ugyanazon a sejten jelentkezik, a daganatsejtek autocrin szabályozására utalhat.
- Az elsők között állapítottuk meg, hogy az angioimmunoblastos T-sejtes lymphoma CD10/CXCL13 koexpresszióval meghatározható daganatsejtjei CXCR5<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>CD57<sup>-/+</sup> immunfenotípust mutatnak (1. ábra), ami a germinális centrum (GC) külső zónájában, a GC és a köpenyzóna között elhelyezkedő T<sub>FH</sub> sejtek fenotípusának felel meg.

- Mivel az angioimmunoblastos T-sejtes lymphomára jellemző proliferáló follicularis dentriticus reticulum (FDR) sejtek is mutatnak CXCL13 expressziót, továbbá az FDR sejtekre jellemző a CD40 (a CD154 receptora), illetve az OX40L (a CD134 ligandja) expressziója, adataink a daganatsejtek és az FDR sejtek között fennálló intenzív párbeszédre utalnak.
- A daganatsejtek T<sub>FH</sub> tulajdonságai közvetlen magyarázatot adhatnak számos, az AITL-ben jelentkező különleges jellegzetességre, mint amilyen az autoimmun tünetek gyakori jelentkezése, a follicularis B-sejtes depléció ellenére tapasztalható B-sejtes hyperactivatio és poliklonális hypergammaglobulinaemia, valamint az FDR sejtek prominens proliferációja.
- Megállapítottuk, hogy a perifériás T-sejtes lymphoma tovább nem osztályozott kategóriájába tartozó esetek többsége (63%-a) CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45R0<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>bcl-2<sup>+</sup> fenotípussal rendelkezik, ami CD4<sup>+</sup> centrális memória T-sejtes sajátságokra utal. A maradék esetek, a PTL NOS csoport gyűjtő jellegének megfelelően, heterogén megjelenést mutatnak.
- Megállapítottuk, hogy a perifériás T-sejtes lymphoma tovább nem osztályozott típusába tartozó esetek egyharmadában található CXCL13 expresszió, és 20%-ában valamely más, az AITL-ben is pozitívást mutató T<sub>FH</sub> antigén is kimutatható. Ezek a “borderline” AITL esetek antigén expressziójukban és sejtes összetételükben átfedést mutatnak az AITL esetekkel, de nem, vagy alig tartalmaznak FDR sejteket.
- Megállapítottuk, hogy az NFATc1 transzkripciós faktor expresszió epigenetikusan gátolt anaplasiás nagysejtes lymphomában, és ez a gátlás az ezen lymphomákra jellemző immunreceptor jelátvitel károsodására vezethető vissza.
- Eredményeket értünk el a regulátoros T-sejtek lymphomáinak meghatározása területén is. Meghatároztunk olyan lymphomákat, amelyek a természetes T regulátoros sejtek fenotípusát hordozzák; ilyen lymphomákat még nem írtak le a magyar populációban.

- Egy jelentős, és relatíve egységes lymphoma csoportot különítettünk el, amelyre a TH3 fenotípus a jellemző. A regulátoros T-sejtekkel kapcsolatos eredményeink jelenleg foglaljuk össze.
- Eredményeink azt bizonyítják, hogy az érett T-sejtes lymphomákban gyakran tapasztalható „patológiás” immunfenotípus magyarázatát nem annyira a malignus átalakulás, vagy daganatos progresszió következményeként létrejövő kóros antigén expresszió, illetve antigén vesztés adja, hanem az, hogy az esetek jelentős része a nem konvencionális – nem a legtömegesebb – T-sejt populációkból, hanem funkcionálisan és topográfiailag speciálisan differenciálódott (pl. szerv-specifikus) T-sejtekből ered. Azaz az érett T/NK-sejtes lymphomák rendkívüli biológiai heterogenitása döntő részben a normális sejtes megfelelőik rendkívüli funkcionális változatosságával magyarázható. Ezek a sejtek az átlagos körülmények között a szokásos vizsgálómódszerek elől rejtve maradnak, a normális egyének vérében, vagy perifériás nyirokszerveiben (ahol a „konvencionális” T-sejtek uralják a képet) csak elhanyagolható számban vannak jelen. Ezekre a „szokatlan”, nem konvencionális, kicsi T-sejt populációkra vonatkozó immunbiológiai ismereteink, éppen a nehezen vizsgálható voltuk miatt, hiányosak. Így az egyes, nem konvencionális T-sejtekből származó lymphomák tanulmányozása az adott T-sejtre vonatkozó immunológiai ismereteink bővülését fogja szolgálni.
- Így például az angioimmunoblastos T-sejtes lymphoma egy olyan, nagy jelentőségű, modellértékű állapot, ahol a T<sub>FH</sub>-sejtek daganatos proliferációja révén betekintést nyerhetünk a T<sub>FH</sub>-sejtek funkciójába, és a folliculáris B-sejtekkel, valamint az FDR sejtekkel történő funkcionális kapcsolat részletei is jobban megismerhetők lesznek.
- Az eredményeink felhasználásával, elképzelésünk szerint egy, a funkcionális jellemzőket jobban figyelembe vevő lymphoma besorolás alapozható meg, mely a WHO Klasszifikációban lefektetett elvek további finomítását hozhatja, elősegítve például a jelenleg legheterogénebb csoportnak, a perifériás T-sejtes lymphoma „tovább nem osztályozott” (gyűjtő)csoportjának a további felosztását is. A citotoxikus fenotípus észlelése már hasznosítható adatként szolgál e daganatok WHO Klasszifikációjában, és beépült a klinikailag is értékelt információk közé.

## 1. ábra



**1. ábra: Az angioimmunoblastos T-sejtes lymphoma daganatsejtjei aktivált follicularis B helper T-sejt fenotípust ( $CXCL13^+CXCR5^+CD154^+CD134^+$ ) mutatnak. (A) A CD10 piros (Új fukszin), a CXCL13 barna (DAB) és (B) CD10 barna (DAB), CXCL13 bíborvörös (Fast red TR) kettős jelölések a daganatsejt CD10 és CXCL13 koexpresszióját bizonyítják. (C) CD3 bíborvörös (Fast red TR), CXCL13 barna (DAB). A CXCL13<sup>+</sup> sejtek a CD3<sup>+</sup> sejtek egy kisebb frakcióját képezik. (D) A CXCL13<sup>+</sup> daganatsejt (Fast red TR) CXCR5<sup>+</sup>-ak is (DAB). A kép bal felső sarkában egy CXCL13-CXCR5<sup>+</sup> Reed-Sternberg-szerű óriássejt látszik. (E) A CXCL13 (Fast red TR) és CD154 (DAB) átfedő citoplazmatikus reakciója CXCL13/CD154 koexpressziót bizonyít. (F) A CXCL13 citoplazmatikus (Golgi) pozitívítása (Fast red TR) a CD134 felszíni pozitívítású sejtekben (DAB) e két antigén koexpresszióját bizonyítja. (EnVision-HRP<sup>TM</sup>, vagy CSA II System és EnVision-AP<sup>TM</sup> kettős jelölések; eredeti nagyítások: [A] [B] [E] és [F] 400x; [C] 100x; [D] 1.000x)**