

Sveučilište u Zagrebu
Medicinski fakultet

Ivona Stipica

**Genomska nestabilnost klasičnog Hodgkinova
limfoma**

Zagreb, 2013.

Ovaj rad izrađen je u Kliničkom zavodu za patologiju KB Merkur pod vodstvom prof. dr. sc. Slavka Gašparova u sklopu znanstvenog projekta „Prognostička vrijednost FOXP1 i FOXP3 u B limfoproliferativnim bolestima“ (broj. 108-1081873-1891, voditelj projekta prof. dr. sc. Slavko Gašparov) i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2012./2013.

POPIS KRATICA

ABVD	kemoterapijski protokol <i>doksorubicin, bleomicin, vinblastin i dakarbazin</i>
ampl.	amplifikacija
bak	proapoptotski protein, eng. <i>BCL2-antagonist/killer</i>
bax	proapoptotski protein, eng. <i>BCL-2-associated X protein</i>
BCL2	apoptotski regulatorni protein, eng. <i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL3/RELB	apoptotski regulatorni protein, eng. <i>B-cell lymphoma 3</i>
<i>BCL6</i>	apoptotski regulatorni gen, eng. <i>B-cell lymphoma 6</i>
BCR	eng. <i>breakpoint cluster region protein</i>
BH1	enzimatski kofaktor tetrahidrodrobiopterin 1
BH3	enzimatski kofaktor tetrahidrodrobiopterin 3
BH4	enzimatski kofaktor tetrahidrodrobiopterin 4
bok	proapoptotski protein, eng. <i>Bcl-2 related ovarian killer</i>
CCL2	citokin iz porodice CC kemokina, eng. <i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CCL17	citokin iz porodice CC kemokina, eng. <i>chemokine (C-C motif) ligand 17</i>
CCND1	eng. <i>cyclin D1</i>
CD	stanični antigen, eng. <i>cluster of differentiation</i>
c-FLIP	inhibitor apoptoze, eng. <i>cellular FLICE inhibitory protein</i>
CI	interval pouzdanosti, eng. <i>confidence interval</i>
<i>c-MYC</i>	apoptotski gen, eng. <i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
<i>c-REL</i>	onkogen, eng. <i>v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog</i>
CX3CL1	citokin, eng. <i>chemokine (C-X3-C motif) ligand 1</i>
DAPI	kontrastna boja, eng. <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DLBCL	difuzni B-velikostanični limfom, eng. <i>diffuse large B-cell lymphoma</i>

del	delecija
DFS	preživljenje bez simptoma bolesti, eng. <i>disease free survival</i>
DOK4	prema eng. <i>docking protein 4</i>
EBV	Epstein-Barr virus
ECOG	eng. <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
ER	endoplazmatski retikulum
EMA	epitelni membranski antigen, eng. <i>epithelial membrane antigen</i>
FAS/CD95	transmembranski receptor, inicijalni faktor apoptoze
FFPE	formalinom fiksirano u parafin uklopljeno tkivo, eng. <i>Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded</i>
FISH	fluorescencijska <i>in situ</i> hibridizacija
GHSG	German Hodgkin Study Group
HAT	histonska acetiltransferaza
HL	Hodgkinov limfom
HIV	virus humane imunodeficijencije, eng. <i>human immunodeficiency virus</i>
HS	Hodginska stanica
I κ B	inhibitor proteina NF κ B, eng. <i>NF-kappa-B inhibitor alpha</i>
<i>IGH</i>	gen koji kodira za teški lanac imunoglobulina, eng. <i>immunoglobulin heavy chain locus</i>
IL4	interleukin 4
IL10	interleukin 10
IRF4/ MUM1	specifični transkripcijski faktor, eng. <i>interferon regulatory factor 4</i>
JAGGED1	protein kodiran genom <i>JAG1</i>
KHL	klasični Hodgkinov limfom
Ki67	nuklearni proliferacijski marker
LDKHL	limfocitna predominacija klasičnog Hodgkinova limfoma

LP stanica	limfocit predominant stanica
LRKHL	limfocitima bogat klasični Hodgkinov limfom
LMP1	protein latentne faze infekcije EBV-om, eng. <i>Latent Infection Membrane Protein 1</i>
LMP2	protein latentne infekcije EBV-om, eng. <i>Latent Infection Membrane Protein 2</i>
MCKHL	mješoviti celularitet klasičnog Hodgkinova limfoma
mcl1	eng. <i>myeloid cell leukemia sequence 1</i>
NF κ B	transkripcijski faktor NF κ B, eng. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NLPHL	nodularna limfocitna predominacija Hodgkinova limfoma
<i>NOTCH1</i>	gen koji kodira NOTCH proteine, eng. <i>Notch homolog 1</i>
NS	nodularna skleroza
NSKHL	nodularna skleroza klasičnog Hodgkinova limfoma
OS	ukupno preživljenje, eng. <i>overall survival</i>
<i>p53</i>	tumorsupresorski gen
PAX5/ BSAP	B-stanični aktivator proteina od eng. <i>paired box protein 5</i>
<i>PRDM1</i>	eng. <i>PR domain zinc finger protein 1</i>
RS	Reed-Sternbergova stanica
RTU	eng. <i>ready to use</i>
tr	translokacija

SADRŽAJ RADA

1. UVOD.....	1
1.1. Hodgkinov limfom.....	1
1.1.1. Nodularna limfocitna predominacija Hodgkinova limfoma	1
1.1.2.1. Nodularna skleroza (NSKHL)	4
1.1.2.2. HL miješanog celulariteta (MCKHL)	5
1.1.2.3. Limfocitima bogat klasični HL (LRKHL)	6
1.1.2.4. Limfocitna deplecija (LDKHL).....	6
1.2. Patofiziologija Hodgkinova limfoma	7
1.3. Genomska nestabilnost Hodgkinova limfoma	8
1.3.1. BCL2 u limfomima B-staničnog podrijetla.....	9
1.3.2. BCL6 u limfomima B-staničnog podrijetla	10
1.3.3. MYC u limfomima B-staničnog podrijetla	10
1.3.4. 9q34 u limfomima B-staničnog podrijetla	11
1.3.5. p53 u limfomima B-staničnog podrijetla	11
2. HIPOTEZA	12
3. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....	12
4. ISPITANICI I METODE	13
4.1. Ispitanici.....	13

4.2. Metode	13
4.2.1. Fluorescencijska in situ hibridizacija.....	13
4.2.2. Statistične metode.....	14
5. REZULTATI	15
6. RASPRAVA	18
7. ZAKLJUČCI.....	20
8. ZAHVALE	21
9. POPIS LITERATURE.....	22
10. SAŽETAK	27
11. SUMMARY.....	28

1. UVOD

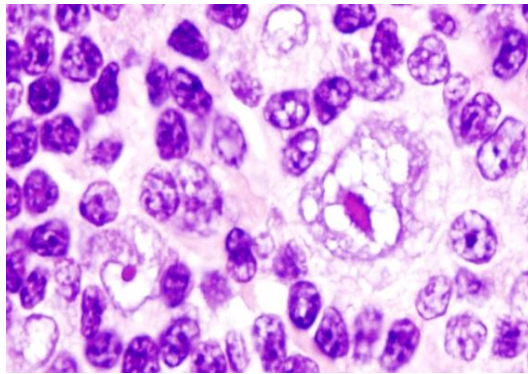
1.1. Hodgkinov limfom

Hodgkinov limfom (HL) je zloćudna novotvorina koja najčešće nastaje u limfnim čvorovima. Javlja se češće u mladim odraslim osobama, a glavna karakteristika je pojava manjeg broja tumorskih mononuklearnih i multinuklearnih Hodgkinovih stanica (HS) kao i klasičnih tzv. Reed-Sternbergovih stanica (RS) okruženih s brojnim netumorskim, upalnim stanicama. Tumorske stanice pripadaju B-staničnoj lozi (Piccaluga i sur.-2011). Ovisno o biološkom ponašanju i kliničkim karakteristikama, te kliničkim i morfološkim obilježjima Hodgkinov limfom se može podijeliti u dva entiteta: nodularnu limfocitnu predominaciju Hodgkinovog limfoma (NLPHL) i klasični Hodgkinov limfom (KHL). Klasični Hodgkinov limfom se dalje histološki dijeli u četiri podvrste: nodularnu sklerozu (NSKHL), Hodgkinov limfom miješanog celulariteta (MCKHL), limfocitnu depleciju (LDKHL) i limfocitima bogat (LRKHL) (Thomas i sur.-2005). Liječenje ovisi prvenstveno o kliničkom stadiju bolesti prema Ann Arbor klasifikaciji, a manje o histološkom tipu. U prvom stadiju zahvaćena je jedna regija limfnih čvorova. U drugom stadiju zahvaćene su dvije ili više regija limfnih čvorova s iste strane dijafragme. U trećem stadiju zahvaćene su regije limfnih čvorova s obje strane dijafragme. U četvrtom stadiju je bolest proširena sa zahvaćanjem jednog ili više nelimfatičnih organa ili bez zahvaćanja limfnih čvorova. Najčešća ektranodalna lokalizacija su koštana srž ili jetra. Proširenost Hodgkinovog limfoma možemo stupnjevati i prema German Hodgkin Study Group (GHSG) te govorimo o ranom povoljnom, ranom nepovoljnom i uznapredovalom stadiju bolesti.

1.1.1. Nodularna limfocitna predominacija Hodgkinova limfoma

NLPHL je monoklonalna neoplazma B-limfocita koju karakterizira nodularna ili nodularno difuzna proliferacija limfocita, histiocita, epiteloidnih histiocita, te velikih neoplastičnih tzv. LP stanica (eng. lymphocyte predominant odnosno *popcorn cells*) (Steidl i sur.-2011).

NLPHL obuhvaća 5% svih Hodgkin limfoma, a pretežno se javlja kod muškaraca u dobi od 30 do 50 godina starosti (Biasoli i sur.-2010). Najčešće zahvaća cervikalne, aksilarne ili ingvinalne limfne čvorove. Arhitektura limfnog čvora može biti u potpunosti ili djelomično ispunjena nodularnim ili nodularno-difuznim infiltratima građenim od malih limfocita, histiocita, epiteloidnih histiocita uz rijetke LP stanice koje su velike i imaju multilobularnu, nepravilnu jezgru nalik „kokici“ (eng.popcorn) te oskudnu citoplazmu (Steidl i sur.-2011). (Slika 1)



Slika 1. LP stanica. Velike stanice s nepravilnom, multilobularnom jezgrom i oskudnom citoplazmom.

Imunofenotipski LP stanice su CD20, CD79a, CD57, BCL6 i CD45 pozitivne u većini slučajeva, a u više od 50% slučajeva ekspiriraju epitelni membranski antigen (EMA). U pravilu ne ekspiriraju CD15 i CD30, no u malom broju slučajeva tumorske stanice mogu biti CD30+. Većina LP stanica okružena je CD3, PD1 i CD57 pozitivnim T limfocitima (Piccaluga i sur.-2011).

Klinička slika pokazuje znakove lokalizirane periferne limfadenopatije. Manji broj bolesnika pri dijagnozi pokazuje klinički uznapredovali stadij bolesti. Bolest je uglavnom sporo progresivna s čestim recidivima, ali i dobrim odgovorom na terapiju. Rijetko je smrtonosna, a stopa preživljenja ovisi o stadiju bolesti. Bolesnici u ranim stadijima bolesti imaju izrazito dobru prognozu - do 80% bolesnika ima ukupno preživljenje do 10 godina. Viši stadiji bolesti

imaju lošije stope preživljenja, a u 3-5% slučajeva dolazi do progresije u B-velikostanični limfom (Piccaluga i sur.-2011).

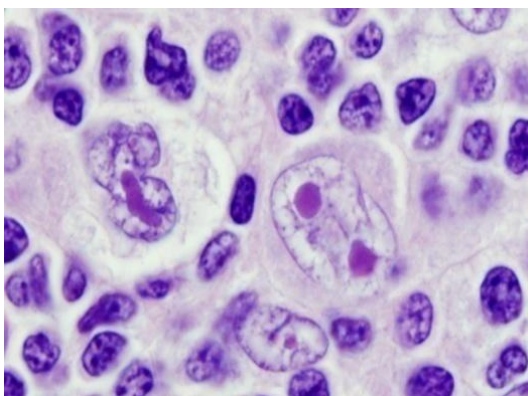
1.1.2. Klasični Hodgkinov limfom

Klasični Hodgkinov limfom (KHL) je monoklonalna limfoidna neoplazma građena od mononuklearnih i multinuklearnih Hodgkinovih stanica, lakunarnih stanica te RS stanica koje se nalaze u okruženju različitih vrsta netumorskih stanica kao što su mali, pretežno T limfociti, eozinofilni i neutrofilni granulociti, histiociti, plazma stanice i fibroblasti (Küppers-2009). Dijagnostička RS stanica je velika, binuklearna stanica. U središtu svake jezgre nalazi se krupni eozinofilni nukleol okružen svijetlim obrubom citoplazme zbog čega se takav izgled jezgre uspoređuje sa sovinim okom. (Slika 2) Ovisno o reaktivnom infiltratu i morfologiji HS, KHL se dijeli u 4 podvrste: NSKHL, MCKHL, LDKHL, LRKHL (Hansman i Wilenbrock-2002).

Klasični HL čini 95% svih HL te pokazuje bimodalnu distribuciju s najvišom incidencijom u periodu od 15. do 35. godine i ponovnim rastom incidencije nakon 50. godine života. Bolesnici koji su preboljeli infektivnu mononukleozu imaju veći rizik oboljenja od KHL (Swerdlow i sur-2008). Pretpostavlja se da EBV ima jednu od važnih uloga u patogenezi KHL-a kao što i gubitak imunosti kod HIV infekcije također doprinosi nastanku HL (Kaplan-2002).

U većine oboljelih KHL zahvaća cervikalne limfne čvorove (u 75% slučajeva), ali i medijastinalne, aksilarne i paraaortalne regije. Više od 60% pacijenata ima lokaliziranu bolest. Infiltracija slezene nije uobičajena, no javlja se u 20% slučajeva te povećava rizik za ektranodalnu diseminaciju. Koštana srž je infiltrirana tumorskim stanicama u 5% slučajeva (Piccaluga i sur.-2011).

Bolest se najčešće manifestira kao periferna limfadenopatija koja u 40% pacijenata može biti praćena B-simptomima: povišenom tjelesnom temperaturom ($>38^{\circ}\text{C}$), noćnim znojenjem i značajnim gubitkom tjelesne mase (više od 10% tjelesne težine u zadnjih 6 mjeseci) (Nagai-2012).



Slika 2. Klasični Hodgkinov limfom. Reed-Sternbergove stanice i mali limfociti.

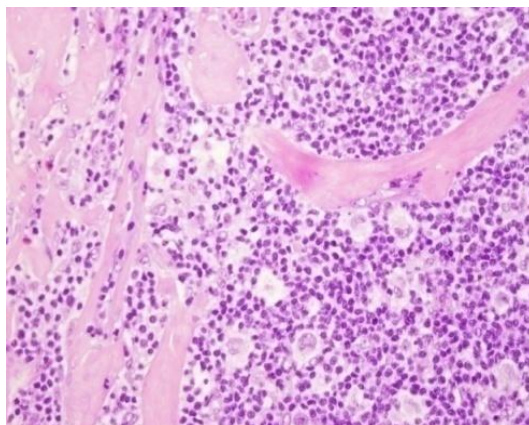
Imunofenotipski tumorske stanice u KHL su CD30 i CD15 pozitivne. Pretpostavlja se da potječu od B-stanica što se temelji na njihovoj ekspresiji B-staničnog aktivatora proteina PAX5/BSAP, ali i specifičnog faktora transkripcije IRF4/MUM1 te nuklearnog proliferacijskog markera Ki67 (Piccaluga i sur.-2011). Klasični Hodgkinov limfom je izlječiv u 85% slučajeva (Swerdlow i sur.-2008).

1.1.2.1. Nodularna skleroza (NSKHL)

NSKHL je najučestaliji tip klasičnog Hodgkinova limfoma i čini 70% svih oboljelih. Tipična je debela vezivna čahura te prisutnost tračaka kolagenog veziva koje pregrađuju čvor i stvara nodule. U većini slučajeva dominiraju tzv. lakunarne stanice koje nastaju zbog fiksacije u formalinu zbog čega dolazi do retrakcije stanične membrane te stanice izgledaju kao da su u lakunama (Gobbi i sur.-2013). (Slika 3)

U 80% slučajeva su zahvaćeni medijastinalni limfni čvorovi. Proširena bolest se javlja u 54% slučajeva, dok su slezena ili pluća zahvaćeni u 8-10% slučajeva, kosti u 5%, a koštana srž u 3% slučajeva (Piccaluga i sur.-2011).

Nodularna skleroza ima najbolju prognozu od svih podvrsta klasičnog HL, a faktor koji negativno utječe na stopu preživljenja je masivna medijastinalna proširenost bolesti, tj. tumorska masa veća od 7,5 centimetara u promjeru (Lam i sur-2011).



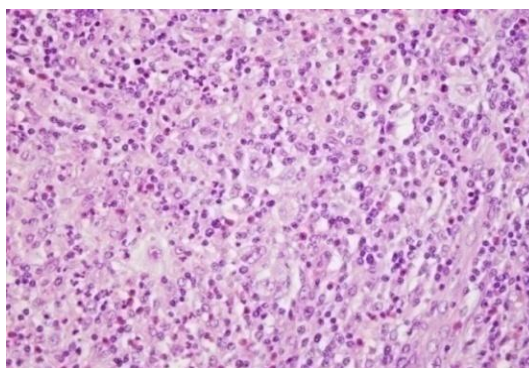
Slika 3. Tumorsko tkivo građeno od velikog broja lakunarnih stanica.

1.1.2.2. HL miješanog celulariteta (MCKHL)

Ovaj tip KHL obilježen je klasičnim RS-stanicama, kao i mononuklearnim i multinuklearnim HS u okolišu mješovitog upalnog infiltrata građenog od eozinofila, neutrofila, histiocita i plazma stanica bez znakova fibroze (Swerdlow i sur.-2008). (slika 4)

Ovaj tip limfoma čini 20 do 25% svih KHL, a učestalije se javlja kod oboljelih od HIV infekcije i u populacijama razvijenijih zemalja. Bimodalna dobna distribucija nije zabilježena, najčešće se javlja u muškaraca s medijanom 38 godina (Piccaluga i sur.-2011).

Češće se dijagnosticira u već uznapredovalom kliničkom stadiju. Najčešće su zahvaćeni periferni limfni čvorovi, trećina bolesnika ima zahvaćenu i slezenu, dok su koštana srž, jetra i ostali organi rjeđe zahvaćeni (Swerdlow i sur.-2008). MCKHL ima bolju prognozu od limfocitne deplecije, a lošiju od nodularne skleroze (Hirano i sur.-2010).

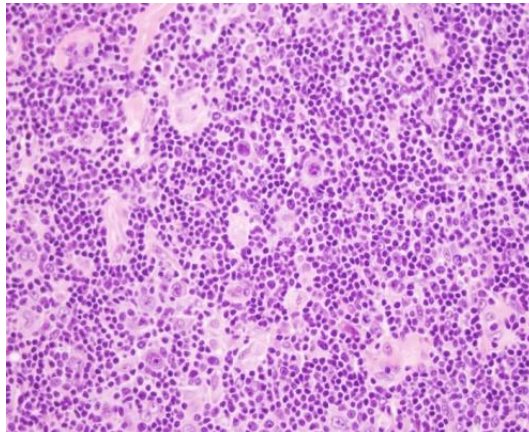


Slika 4. KHL miješanog celulariteta.

1.1.2.3. Limfocitima bogat klasični HL (LRKHL)

Ovaj tip KHL karakterizira prisutnost RS stanica i HS stanica nodularnih ili difuznih staničnih infiltrata kojima dominiraju mali limfociti, dok neutrofili i eozinofili nisu prisutni ili su malobrojni (Swerdlow i sur.-2008). (slika 5)

Limfocitima bogat klasični HL čini 5% svih KHL. Dobna pojavnost je slična kao i u NLPHL - učestaliji je kod muškaraca (Kaplan-2002). Tipično su zahvaćeni periferni limfni čvorovi, dok je širenje bolesti u medijastinum izrazito rijetko. Bolest se, morfološki, može zamijeniti s NLPHL pa je za postavljanje točne dijagnoze nužna imunohistokemijska analiza (Swerdlow i sur.-2008).



Slika 5. Limfocitima bogat KHL. Dominiraju mali limfociti i rijetke tumorske stanice.

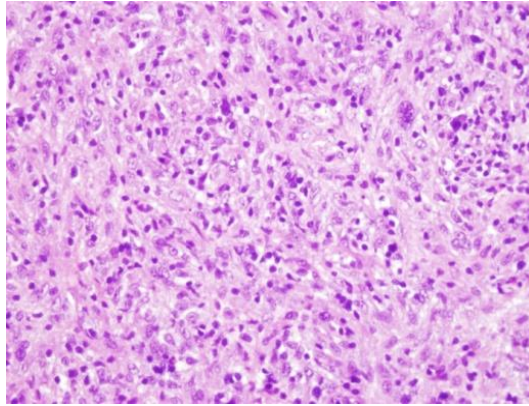
1.1.2.4. Limfocitna deplecija (LDKHL)

Ovaj tip KHL obilježen je predominacijom, mnoštvom RS i ostalih modificiranih tumorskih stanica uz gubitak (depleciju) netumorskog infiltrata (Swerdlow i sur.-2008). (slika 6)

To je najrjeđi podtip klasičnog Hodgkinova limfoma (manje od 1% ukupnog broja slučajeva). 60 do 75% pacijenata su muškarci u dobi od 30 do 37 godina (Piccaluga i sur.-2011). Bolest se najčešće javlja u nerazvijenim zemljama te kod HIV pozitivnih bolesnika (Kaplan-2012).

Primarno su zahvaćeni abdominalni organi, retroperitonealni limfni čvorovi i koštana srž, dok je periferna limfadenopatija rjeđa (Swerdlow i sur.-2008).

Bolest je pri dijagnozi češće prisutna u već uznapredovalom stadiju (3. i 4. stadij prema Ann Arbor klasifikaciji) i praćena B-simptomima, no unatoč tome terapijski učinci su podjednaki kao i u ostalim podtipovima klasičnog HL-a. HIV pozitivni bolesnici imaju lošiju prognozu (Kaplan-2012).



Slika 6. Limfocitna deplecija. Predominacija tumorskih stanica, tek rijetki limfociti.

1.2. Patofiziologija Hodgkinova limfoma

HS i RS- stanice porijekla su preapoptotične B-stanice koja je izbjegla negativnu selekciju unutar germinativnog centra limfnog čvora. Germinativni centri su mikroanatomske strukture unutar limfnih čvorova koje se razvijaju prilikom imunološkog odgovora organizma. U B-stanicama jedan od tri glavna procesa koji određuje sudbinu te stanice je somatska hipermutacija koja rezultira promijenjenim imunoglobulinskim genima u svrhu povećanja afiniteta prema antigenu. Negativna selekcija B-stanica s neodgovarajućim mutacijama odvija se njihovim uklanjanjem FAS posredovanom apoptozom. FAS/CD95 je transmembranski receptor i inicijalni faktor kaskadne reakcije koja završava apoptozom. Glavni inhibitor apoptoze je c-FLIP čija koncentracija je povećana u HS i RS-stanicama (Re i sur.-2002). U normalnom germinativnom centru koncentracija c-FLIP proteina je velika u B-stanicama koje imaju visoko afinitetne B-stanične receptore.

Glavna karakteristika HS i RS-stanica je nepostojanje ekspresije imunoglobulina i rezistencija na apoptozu. Vjeruje se da maligni klonovi u klasičnom Hodgkinovu limfomu

proliferiraju bez antigenog poticaja, a izbjegavanje apoptoze se tumači velikom koncentracijom antiapoptotičnog c-FLIP proteina (Thomas i sur.-2005).

Tumorske stanice imaju promijenjene signalne puteve. Centralnu ulogu ima transkripcijski faktor NF κ B koji potiče upalni odgovor i ekspresiju gena odgovornih za antiapoptotski odgovor (Itoh i sur.-2012). NF κ B faktor se nalazi u citoplazmi vezan na I κ B proteine. Nakon stimulacije aktivira se I κ B kinaza koja fosforilira I κ B proteine i tako otpušta NF κ B koji odlazi u jezgru gdje potiče transkripciju specifičnih gena. U Hodgkinovu limfomu transkripcijski faktor NF κ B ima jednu od važnijih uloga jer doprinosi nekontroliranoj proliferaciji stanica (Bai i sur.-2005). U stanici koja nije zaražena EBV-om mutacije I κ B gena mogu poremetiti prelazak NF κ B iz citoplazme u jezgru što utječe na kontrolu staničnog ciklusa, apoptoze i proliferacije (Itoh i sur.-2012).

Značajan onkogeni faktor je i EBV koji povećava rizik oboljenja od Hodgkinova limfoma za tri puta kod oboljelih od infektivne mononukleoze (Thomas i sur.-2005). Glavna karakteristika latentne infekcije EBV-a je ekspresija LMP1, LMP2 i EBNA1 proteina uz pomoć kojih EBV ostvaruje transformirajuću funkciju. LMP1 potiče neprestanu aktivnost receptora CD40, a LMP2 koči ekspresiju BCR-a što dovodi do aktivacije NF κ B, te posljedičnog poticanja proliferacije.

1.3. Genomska nestabilnost Hodgkinova limfoma

Genomska nestabilnost je karakteristika Hodgkinovih i Reed-Sternbergovih stanica. Može se podijeliti u četiri kategorije: DNA mutacije, numeričke aberacije, strukturalne aberacije, delecije i/ili povećan broj kopija kromosomskih regija (Re i sur.-2002). DNA mutacije pronađene su u genima koji kodiraju za protein I κ B α , koji regulira konstitutivnu aktivnost NF κ B u Hodgkinskom limfomu. Numeričke kromosomske aberacije obilježje su Reed-Sternbergovih multinuklearnih stanica koje često imaju povećan broj kromosoma. Složene strukturalne aberacije su najčešće zabilježene u kromosomskim regijama: 2p, 3q, 6q, 7q, 13p, 14p i 17q. Translokacije najčešće zahvaćaju lokus 14q32.3, gdje se nalazi lokus koji

kodira za teški lanac imunoglobulina (*IGH*). Translokacijom se onkogeni premještaju pod kontrolu imunoglobulinskog regulatornog mehanizma čime je potaknuta njihova neprestana ekspresija. Neke od takvih translokacija značajne su i za pojedine podtipove ne-Hodgkinova limfoma; $t(8;14)(q24.1;q32.3)(MYC/IGH)$ je značajka Burkittova limfoma, a $t(11;14)(q13.2;q32.3)(CCND1/IGH)$ je karakteristična za non-Hodgkinov limfom_stanica plaštene zone (Martín-Subero i sur.-2006). Kao translokacijski partneri u 20% slučajeva dokazani su i onkogeni *BCL6*, *MYC*, *BCL3* i *REL* (Hartman i sur.-2008). Amplifikacija c-Rel lokusa na kromosomu 2p je povezana s izraženijom aktivnošću transkripcijskog faktora NF κ B koji pojačava antiapoptotski signal u stanicama klasičnog Hodgkinova limfoma (Re i sur.-2002). Visok postotak delecija zabilježen je u kromosomskoj regiji 6q24-q25. Kromosomski lomovi se najčešće događaju na kromosomima 1p, 6q, 7q, 11q, 12q i 14q dok su kromosomske adicije zabilježene na 2., 5., 9. i 12. kromosomu, a delecije na kromosomu 13, 21 i Y (Hartman i sur.-2008). Promjene kariotipa tumorskih stanica Hodgkinova limfoma imaju ulogu u razvoju bolesti što je vidljivo iz kliničke slike, a utječe na terapijski odgovor. U osoba rezistentih na kemoterapiju učestale su adicije na kromosomskim mjestima koji kodiraju proteine: *CCL2*, *CXCL13*, *CCL17*, *DOK4* i *IL10*, koji se nalaze na u kromosomskoj regiji 16q13, delecije na kromosomskom lokusu 4q27 koji kodira za interleukine 21 i 2, te delecija na kromosomskom lokusu 17p13.3 koji kodira za *BCL3/RELB* (Hartman i sur.-2008). Pacijenti koji imaju deleciju regije 4q27, 11p14.3 ili 17p12 te adicije kromosomske regije 19q13.31 pokazuju rezistenciju na terapiju i češću ponovnu pojavu bolesti dok su pacijenti kojima su utvrđene adicije u regiji 16q13 kemosenzitivni na terapiju i imaju bolji prognostički faktor preživljenja (Slovak i sur.-2011).

Poznavanje kariotipova koji su učestaliji kod pacijenata otornih na terapiju stoga omogućuje razvoj novih terapijskih metoda koje će povećati preživljenje i smanjiti kemorezistenciju.

1.3.1. BCL2 u limfomima B-staničnog podrijetla

BCL-2 je onkogen, koji se nalazi na kromosomu 18. On kodira protein koji je sastavni dio membrane endoplazmatskog retikuluma (ER), jezgrine ovojnice te vanjske membrane

mitochondrija. Proteini porodice BCL2 imaju centralnu ulogu u antiapoptotskim mehanizmima. Proapoptotski i antiapoptotski proteini podijeljeni su u skupine od BH1 do BH4 (Slovak i sur.-2011). Antiapoptotski proteini (*bcl2*, *bcl-xl* i *mcl1*) sadrže sve četiri BH domene od kojih BH1, BH2 i BH3 čine mjesto za vezanje BH3 domene. Proapoptotski proteini (*bax*, *bak* i *bok*) sadržavaju BH1, BH2 i BH3 domenu. Proapoptotski proteini *bax* i *bak* doprinose permeabilnosti mitohondrijske membrane koja propušta apoptotske proteine i potiče apoptozu. Antiapoptotski proteini BCL2 i *bcl-xl* sprječavaju aktivaciju *bax* i *bak* proteina i vezanje njihovih aktivnih formi za ciljne stanice. Reed-Sternberg stanice eksprimiraju BCL2 proteine, te omjer BCL2/*bax* proteina zaustavlja apoptotski intrinzični put (Bai i sur.-2007).

1.3.2. BCL6 u limfomima B-staničnog podrijetla

BCL6 je transkripcijski faktor građen u obliku šesteročlanog cink prstena sa specifičnom N-terminalnom domenom čija je zadaća modulacija START-ovisnog IL-4 B-staničnog odgovora. Translokacije i hipermutacije ovog gena su česte u difuznom B-velikostaničnom limfomu (DLBCL), nodularnoj predominaciji Hodgkinova limfoma, folikularnom i Burkittovom limfomu, ali ne i u klasičnom Hodgkinovu limfomu. BCL6 sprječava završnu B-staničnu diferencijaciju blokirajući *PRDM1* gen (Wlodarska i sur.-2003). *PRDM1* gen omogućuje sazrijevanje B-stanice u plazma stanicu, koja proizvodi protutijela važna za protuupalnu funkciju organizma. Pojačana ekspresija *BCL6* gena dovodi do značajne proliferacije nezrelih stanica dok smanjena ekspresija *BCL6* i pojačana ekspresija *PRDM1* dovode do razvoja odgovarajućih plazma stanica (Wagner i sur.-2011).

1.3.3. MYC u limfomima B-staničnog podrijetla

Lokus za gen *MYC* se nalazi na kromosomu 8. *MYC* regulira ekspresiju 15% svih gena preko „enhancer box“ sekvenci (e-box) kao i regrutiranjem histonske acetiltransferaze (HAT). To znači da osim uloge klasičnog transkripcijskog faktora, *MYC* također djeluje na regulaciju kromatinske strukture preko histonske acetilacije. Ekspresija *MYC*, *NOTCH1* i *IRF4* gena je prisutna u svim podtipovima klasičnog Hodgkinova limfoma. *MYC* je ključni kontrolor

staničnog rasta i proliferacije; *NOTCH 1* je T-stanični transkripcijski faktor koji je eksprimiran i aktivan u Reed-Sternbergovim i Hodgkinskim stanicama te blokira izražaj B-staničnog fenotipa; *IRF4* je ključan za plazmastaničnu diferencijaciju i dodatno doprinosi blokadi B-staničnog genotipa. *MYC*, *NOTCH1* i *IRF4* zajednički doprinose razvoju neoplazme međusobno upotpunjujući svoje putove transkripcije (Smith i sur.-2010 i Tiacci sur.-2012).

1.3.4. 9q34 u limfomima B-staničnog podrijetla

NOTCH1 se nalazi na regiji 9q34. On pripada skupini NOTCH receptora kojoj pripadaju ukupno četiri proteina (NOTCH1-4), čiji lokusi su smješteni na kromosomskim regijama 9q34, 1p13-p11, 19p13.2-p13.1 i 6p21.3. NOTCH1 je u najvećem broju prisutan na timocitima, u manjem broju na makrofazima i prekursorskim stanicama u koštanoj srži. NOTCH2 se nalazi na timocitima i B-stanicama. NOTCH3 je eksprimiran u različitim hematopoetskim stanicama.

NOTCH4 je većinom prisutan na endotelnim stanicama i u manjem broju na makrofazima (Kojika i Griffin-2010). Aktivacija NOTCH signalnog puta u sazrijevanju krvnih stanica povezana je s preživljavanjem multipotentnih matičnih stanica i zaštitom od apoptoze te formiranjem eritrocitnih kolonija. Funkcija NOTCH-a je važna u preživljavanju timocita tokom njihovog ranog ekspanzivnog rasta. U mijelopoezi NOTCH pomaže granulocitnu diferencijaciju i reducira proliferaciju stanica. NOTCH1 je transmembranski receptor koji pomoću liganda JAGGED1 može imati onkogenu ulogu inducirajući proliferaciju stanica i inhibiranje apoptoze. U stanicama Hodgkinova limfoma NOTCH1 se najčešće aktivira vezanjem liganda sa susjedne stanice pri čemu se prekida diferencijacija B-stanica i započinje aktivacija NF κ B puteva te inhibiranje apoptoze i induciranje proliferacije malignih stanica (Schwarzer i Jundt-2011).

1.3.5. p53 u limfomima B-staničnog podrijetla

Gen *p53* (17p13.11) spada u porodicu tumor supresorskih gena pri čemu ima važnu ulogu u kontroli staničnog ciklusa i održavanju genske stabilnosti. *p53* stvara tetramere koji se vežu za specifičnu sekvencu DNA, aktivirajući pritom transkripciju. Gubitkom tumor supresorske

aktivnosti (delecija ili mutacija gena p53) mutirani proteini dobivaju onkogeni potencijal što rezultira nekontroliranim rastom tumorskih stanica. U KHL-u zabilježena je delecija kromosomske regije p53 u području egzona 4, 8, 9, 10 i 11 što je rezultira gubitkom transkripcijske aktivnosti proteina TP53 i posljedično nekontroliranog staničnog ciklusa i apoptoze (Feuerborn i sur.-2006).

2.HIPOTEZA

Genomska nestabilnost KHL-a povezana je s razvojem i kliničkom slikom bolesti, te odgovorom na terapiju.

3.OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj rada je istražiti utjecaj genetske nestabilnosti na razvoj KHL-a.

Specifični ciljevi su utvrditi moguću povezanost između:

- 1.translokacije gena *BCL2* i razvoja KHL-a.
- 2.translokacije gena *BCL6* i razvoja KHL-a.
- 3.translokacije gena *c-MYC* i razvoja KHL-a.
- 4.delecije regije *9q34* i razvoja KHL-a.
- 5.broja kopija gena *p53* i razvoja KHL-a.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

U ovu studiju uključeno je 120 pacijenata oboljelih od KHL-a. Za svih 120 pacijenata bili su dostupni klinički podaci: stupanj bolesti prema ECOG-u, Ann Arbor stupanj proširenosti bolesti, prisutnost B-simptoma, veličina tumora, postojanje infiltracije koštane srži, GHSG, terapija, terapijski odgovor, postojanje relapsa, 2. linija terapije, ukupno preživljenje i vrijeme bez simptoma bolesti.

Od 120 pacijenata 49 je bilo muškog spola u dobi od 18 do 81 godine s medijanom dobi od 33.25 godina. 71 pacijentica ženskog spola u dobi od 16 do 93 godine imale su medijan pojavnosti bolesti u dobi od 30.35 godina. Istraživanje je provedeno na formalinom fiksiranim u parafin uklopljenim (FFPE) rezovima limfnih čvorova. Učinjena je revizija svih slučajeva te su nakon potvrde dijagnoze svi uključeni u studiju. Kontrolni uzorci bili su FFPE uzorci tonzila deset osoba koje nisu bolovale od Hodgkinskog limfoma ili imale druge hematološke bolesti. Rezovi tkiva debljine 4 μ m, korišteni su za interfaznu fluorescencijsku *in situ* hibridizaciju (FISH).

4.2. Metode

4.2.1. Fluorescencijska *in situ* hibridizacija

Metoda FISH korištena je za određivanje delecije regije 9q34, translokacije gena *BCL2*, gena *BCL6* i gena *MYC*, te broja kopija gena *p53*. Korišteni su rezovi tkiva limfnih čvorova uklopljenih u parafin, debljine 4 μ m fiksiranim na silaniziranim predmetnim staklima (DakoCytomation, Denmark). Rezove sam tretirala otopinom Borg Decloaker, RTU (Biocare Medical, LLC, USA) u loncu pod pritiskom (Pascal DakoCytomation, Denmark) na 125 °C dvije minute pri čemu se odvija postupak deparafinizacije, rehidracije i otvaranja primarnih epitopa, nakon čega slijedi tretiranje uzoraka pepsinom 0,1 g/mL (Sigma, Germany) na 37 °C 20 minuta. Provela sam postupak dehidracije kroz seriju alkohola (70%, 85% i 100% etanol) te osušila preparate na zraku prije stavljanja probe. Direktno obilježene probe

pripremlila sam prema uputama proizvođača. Pripremljene preparate s probama stavila sam u aparat za hibridizaciju (Hybridizer DakoCytomation, Denmark). Denaturacija se odvijala na 82°C u trajanju od pet minuta nakon čega je slijedila hibridizacija preko noći na 37°C. Idući dan rezove sam ispirala sljedećim puferima i detergentima: 0,0003% Tween/0,4xSSC; 0,0001% Tween/2xSSC; 2xSSC. Za poklapanje uzoraka upotrijebila sam 10 µL otopine Vectashield (Vector Laboratories Inc., USA) koja sadržava 10⁻⁵ g/L kontrastne boje 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Uzorke sam analizirala florescencijskim mikroskopom Olympus BX51.

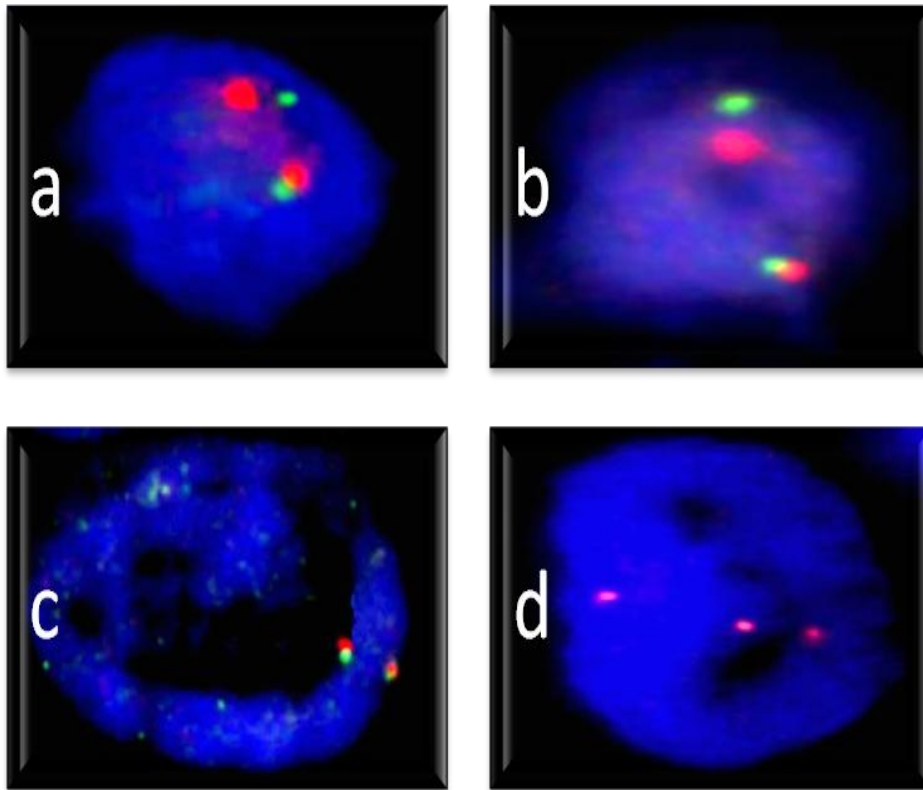
4.2.2. Statističke metode

Dobiveni rezultati obrađeni su statističkim metodama kako bi se utvrdilo postoji li povezanost između analiziranih genetičkih promjena i razvoja bolesti te preživljenja. Kvalitativni podaci analizirani su tablicama kontingencija (χ^2 test). Kaplan-Meierovom analizom procijenjeno je preživljenje bolesnika. Promatrani su odgovor na terapiju, preživljenje bez simptoma bolesti (engl. *disease free survival*, DFS) i ukupno preživljenje (engl. *overall survival*, OS). Usporedba preživljenja između uspoređivanih skupina analizirana je log-rank testom. Od opisnih varijabli korišteni su medijan i 95% intervali pouzdanosti (engl. *confidence interval*, CI). Rezultati su interpretirani na 5%-tnoj razini značajnosti. Za statističku analizu podataka korišten je informatički program STATISTICA® (verzija 8.0, StatSoft, Inc., Tulsa, USA).

5.REZULTATI

Morfološkom analizom utvrđeno je da 77 uzoraka pripada podskupini NSKHL, a 43 MCKHL. Prema Ann Arbor klasifikaciji 12 pacijenata je imalo proširenosti bolesti 1.stupnja, 69 2.stupnja, 17 3.stupnja, a 8 4.stupnja. Prema GHSG klasifikaciji 24 pacijenta su imala rani povoljni stadij bolesti, 49 rani nepovoljni stadij, a 33 uznapredovali stadij bolesti. Od 120 pacijenata 52 su imala B-simptome, dok oni nisu bili prisutni kod 54 pacijenta. Tumor veći od 7.5 centimetara zabilježen je u 35 slučajeva dok je kod preostalih pacijenata veličina tumora bila manja od 7.5 centimetara. Infiltracija koštane srži bila je prisutna u 4 pacijenta. ABVD terapija s ili bez zračenja provedena je kod 103 pacijenta dok su 3 pacijenta bila liječena drugim protokolima. Kompletna remisija je nakon 1.linije terapije nastupila kod 95 pacijenata, dijelomična kod 9 pacijenata, a kod 2 pacijenta je došlo do progresije bolesti. Relaps bolesti je nastupio kod 12 pacijenata. Drugu liniju terapije bilo je potrebno upotrijebiti kod 23 pacijenta pri čemu je kod 21 pacijenta primjenjena transplantacija koštane srži. Kao odgovor na 2.liniju terapije kod 16 pacijenata je nastupila kompletne remisija, dok je kod 6 pacijenata došlo do parcijalne remisije. Do kraja ovog istraživanja 7 pacijenata je umrlo.

Metoda FISH pokazala je prisutnost delecije 9q34 u tumorskim stanicama kod 62 pacijenta. 24 uzorka imala su translokaciju *BCL2* (slika 7-a). 11 uzoraka imalo je translokaciju *BCL6* (slika 7-b), dok niti jedan pacijent nije imao translokaciju *c-MYC* gena (slika 7-c). Delecija gena *p53* nije nađena, no 57 pacijenata imalo je umnožene kopije tog gena.(slika 7-d)



Slika 7. a) translokacija *BCL2*; b) translokacija *BCL6*; c) netranslocirani aleli gena *c-MYC*; d) tri kopije gena *p53*.

Tablica 1. Učestalost istraživanih promjena obrađenih metodom FISH.

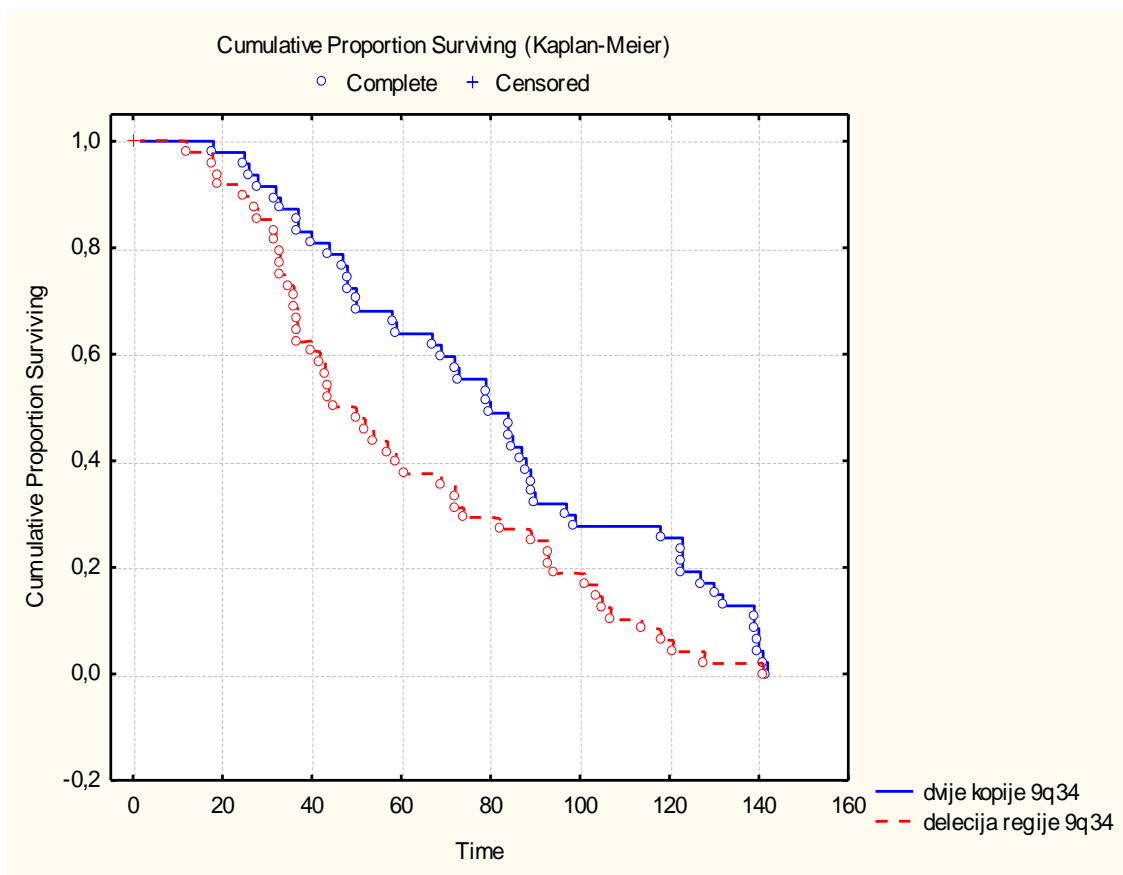
	9q34	<i>BCL2</i>	<i>BCL6</i>	<i>p53</i>	<i>MYC</i>
bez promjene	58	95	109	57	120
tr./del./ampl.*	62	24	11	31	0

*delecija 9q34, translokacija *BCL2*, translokacija *BCL6*, amplifikacija *p53*, translokacija *c-MYC*

χ^2 test je pokazao da postoji korelacija između promjena gena *p53* i odgovora na terapiju ($\chi^2=8.122$, $p=0.004$). Pacijenti čije tumorske stanice imaju povećan broj kopija gena *p53* češće, nakon prve linije terapije, imaju parcijalnu remisiju ili ne pokazuju odgovor na terapiju, dok pacijenti koji imaju nepromijenjen broj kopija *p53* pokazuju kompletnu remisiju.

Log-rank test je pokazao da pacijenti čije tumorske stanice imaju deleciju regije 9q34 imaju kraće vrijeme bez bolesti ($p=0.00994$). (slika 8)

χ^2 test nije pokazao značajnost između translokacije *BCL2*, *BCL6*, *c-MYC* i kliničkih parametara. Preživljenje bez simptoma bolesti i OS nije bilo značajno različito kod pacijenata grupiranih prema postojanju ostalih istraživanih genskih promjena.



Slika 8. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja bez bolesti pacijenata grupiranih prema promjenama regije 9q34.

6. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazali su korelaciju između broja kopija gena *p53* i odgovora na terapiju te delecije regije 9q34 i duljine vremena bez simptoma bolesti. Povećan broj kopija gena *p53* prisutan je kod bolesnika koji ne odgovaraju na terapiju ili je odgovor na terapiju smanjen. Gen *p53* jedan je od najvažnijih tumorsupresorskih gena te se naziva još i čuvarom genoma. Nepromijenjeni gen *p53* kodira protein p53 koji suprimira djelovanje protoonkogena te ima ulogu u kontroli staničnog ciklusa. *p53* je glavni kontrolor staničnog ciklusa i ima sposobnost prepoznavanja oštećenja DNA: stanicama koje imaju normalnu DNA omogućuje prelazak u S fazu staničnog ciklusa dok onima kojima je oštećena DNA blokira taj prijelaz. Stanice s oštećenom DNA mogu biti popravljene DNA izrezivanjem te ponovno uključene u stanični ciklus. Ukoliko je popravak nepotpun nastupa apoptoza. Alternativno, stanice mogu biti trajno zakočene u jednom od dijelova staničnog ciklusa čime započinju proces starenja stanica. U stanicama u kojima je p53 zbog promjena na genu inaktivan kontrola pri prelasku stanice iz G1 u S fazu izostaje, te se stanice sa defektnom DNA nastavljaju umnažati (Lane-1992). p53 je transkripcijski faktor koji se specifično i izravno veže kao tetramer na ciljno mjesto molekule DNA, no može izazvati smrt stanice neovisno o svom tumorsupresorskom potencijalu aktivirajući faktore BCL2 porodice proteina. U većini tumora gen *p53* nije funkcionalan, a ponekad, kao u slučaju Hodgkinovog limfoma, može biti i amplificiran. 2002. godine konstruiran je transgenični miš, koji je imao povećan broj kopija gena *p53*. Miš je bio nazvan „Super p53“ jer nije podlijebao tumorskim oboljenjima (Garcia-Cao i sur.-2002). U ljudskom organizmu ovakvo djelovanje umnoženog gena *p53* nije zamijećeno. Naprotiv, ovaj je rad prikazao da uslijed povećanog broja kopija gena *p53* tumorske stanice KHL-a postaju kemorezistentne i brže dovode do ponovne proliferacije tumorskih stanica. Kemorezistencija povezana s genom *p53* u dosadašnjim istraživanjima većinom se odnosila na njegovu deleciju, te je dokazana u stanicama tumora dojke (Aas i sur.-1996). Istraživanja kemorezistencije vezane za gen *p53* u limfomima napravljena su na mišjem modelu. Gen *p53* je bio mutiran zbog čega je onemogućavao odvijanje apoptotskog procesa stanica

limfoma doprinoseći tumorigenezi i kemorezistenciji (Schmitt i sur.-2002). Budući da p53 sudjeluje na različite načine u velikom broju signalnih puteva i u zdravim i u tumorskim stanicama te prema rezultatima ovog istraživanja moguće je pretpostaviti da povećan broj kopija ovog gena ne mora nužno značiti i uobičajenu funkcionalnost njegova proteina ili povećanu ekspresiju proteina kojeg on kodira. Povećan broj kopija gena, kod KHL-a može značiti nastanak veće količine nefunkcionalnog proteina koji više nema tumorsupresorsku funkciju pa efekt na život stanice može biti sličan slučajevima kod kojih je gen p53 deletiran. U ovom radu također je utvrđena povezanost delecije regije 9q34 i razdoblja bez bolesti pri čemu bolesnici čije stanice imaju deleciju regije 9q34 imaju kraći period bez bolesti. Unutar regije 9q34 nalazi se smješten gen *NOTCH1*. Funkcija gena *NOTCH1* veoma je važna u diferencijaciji normalnih hematopoetskih stanica (Milner i sur.-1994), no *NOTCH1* može imati i onkogeni potencijal što je i potvrđeno u stanicama KHL-a. Naime *NOTCH1* potiče tumorigenezu tako što prekida diferencijaciju B-stanica, započinje aktivaciju NF_κB putova, inhibiranja apoptozu i inducira proliferaciju malignih stanica (Schwarzer i Jundt-2011). Utvrđena delecija regije 9q34 potencijalno znači i deleciju gena *NOTCH1*. U istraživanjima tumora druge etiologije dokazano je da ukoliko se blokira aktivnost *NOTCH1* gena tumorske stanice dolaze u postmitotičku fazu bez mogućnosti daljnje diobe (Van Es i sur.-2005). Rezultati ovog istraživanja tako sugeriraju da kod KHL-a zbog delecije regije 9q34 dolazi do dediferencijacije stanica što dalje uzrokuje agresivniji tijek bolesti tj. kraće vrijeme bez bolesti. Gen *NOTCH1* uz samostalnu ulogu u razvoju Hodginovog limfoma, potencijalno može djelovati i na signalne puteve koje je uključen i p53 (Beverly i sur.-2005). Delecija gena *NOTCH1* tj. regije 9q34 može biti odgovorna za zastoj stanica u onoj fazi zastoja u kojoj nastaje nefunkcionalni protein p53 kao posljedica umnoženih kopija njegovog gena, odnosno poremećene translacije. Ta dva događaja mogu zajedno pospješiti kemorezistenciju i utjecati na bržu pojavu remisije bolesti.

Prepoznavanje važnosti uloge umnoženih kopija gena p53 u razvoju kemorezistencije i ranije pojave remisije te uloge delecije regije 9q34 u skraćanju perioda bez bolesti sugerira

postojanje dva signalna puta koja djelujući neovisno, ali i sinergistički ubrzavaju razvoj KHL-a i upravo zbog toga trebaju biti razmotreni pri razvoju novih kemoterapeutskih sredstava koja će poboljšati dosadašnje rezultate preživljenja kemorezistentnih bolesnika.

7. ZAKLJUČCI

1. Genomska nestabilnost klasičnog Hodgkinova limfoma povezana je s razvojem i kliničkom slikom bolesti te odgovorom na terapiju.
2. Pacijenti čije tumorske stanice imaju povećan broj kopija gena *p53* češće, nakon prve linije terapije, imaju parcijalnu remisiju ili ne pokazuju odgovor na terapiju, dok pacijenti koji imaju nepromijenjen gen *p53* pokazuju kompletnu remisiju.
3. Pacijenti čije tumorske stanice imaju delecije regije 9q34 imaju kraće vrijeme bez bolesti.

8. ZAHVALE

Zahvaljujem mentoru prof.dr.sc. Slavku Gašparovu koji mi je omogućio sudjelovanje u ovom znanstvenom istraživanju, te pokazao što znači voljeti posao koji radiš.

Doc.dr.sc. Petri Korać od sveg srca zahvaljujem na velikoj pomoći pri pisanju ovog rada, a još više na strpljenju i razumijevanju u trenucima kad je to bilo najpotrebnije.

Veliko hvala osoblju laboratorija Kliničkog zavoda za patologiju KB Merkur.

Hvala Ogiju, bratu Danteu te mojim roditeljima Božidaru i Ivi koji su omogućili da moj san postane stvarnost.

9. POPIS LITERATURE

Aas T, Borresen AL, Geisler S, Smith-Sorenson B, Johnsen H, Varhaug JE, Akslen LA, Lonning PE. Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nature Med.*1996;2:811-814.

Bai M, Papoudou-Bai A, Kitsoulis P, Horianopoulos N, Kamina S, Agnantis NJ, Kanavaros P. Cell cycle and apoptosis deregulation in classical Hodgkin lymphomas. *In Vivo* 2005;19(2):439-53.

Bai M, Papoudou-Bai A, Horianopoulos N, Grepic C, Agnantis NJ, Kanavaros P. Expression of bcl2 family proteins and active caspase 3 in classical Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol.*2007;38(1):103-13.

Beverly LJ, Felsher DW, Capobianco AJ. Suppression of p53 by Notch in lymphomagenesis: implications for initiation and regression. *Cancer Res.*2005;65(16):7159-68.

Biasoli I, Stamatoullas A, Meignin V, Delmer A, Reman O, Morschhauser F, Coiffier B, Bosly A, Diviné M, Brice P. Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma: a long-term study and analysis of transformation to diffuse large B-cell lymphoma in a cohort of 164 patients from the Adult Lymphoma Study Group. *Cancer* 2010;16(3):631-9.

Feuerborn A, Möritz C, Von Bonin F, Dobbstein M, Trümper L, Stürzenhofecker B, Kube D. Dysfunctional p53 deletion mutants in cell lines derived from Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma.*2006;47(9):1932-40.

Garcia-Cao I, Garcia-Cao M, Martin-Caballero J, Criado LM, Klatt P, Flores JM, Weill JC, Blasco MA, Serrano M. 'Super p53' mice exhibit DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J.* 2002;21:6225-6235.

Gobbi PG, Ferreri AJ, Ponzoni M, Levis A. Hodgkin lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol.*2013;85(2):216-37

Hansmann ML, Willenbrock K. WHO classification of Hodgkin's lymphoma and its molecular pathological relevance. *Pathologie* 2002;23(3):207-18.

Hartmann S, Martin-Subero JI, Gesk S, Hüsken J, Giefing M, Nagel I, Riemke J, Chott A, Klapper W, Parrens M, Merlio JP, Küppers R, Bräuninger A, Siebert R, Hansmann ML. Detection of genomic imbalances in microdissected Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma by array-based comparative genomic hybridization. *Haematologica*. 2008; 93(9):1318-26.

Hirano M, Asaoku H, Kurosawa M, Maeda Y, Omachi K, Moriuchi Y, Kasai M, Ohnishi K, Takayama N, Morishima Y, Tobinai K, Kaba H, Yamamoto S, Fukuda H, Kikuchi M, Yoshino T, Matsuno Y, Hotta T, Shimoyama M. Prognostic analysis and a new risk model for Hodgkin lymphoma in Japan. *Int J Hematol*. 2010;91(3):446-55.

Itoh K, Kinoshita T, Watanabe T, Yoshimura K, Okamoto R, Chou T, Ogura M, Montes-Moreno S, Odqvist L, Diaz-Perez JA, Lopez AB, de Villambrosía SG, Mazorra F, Castillo ME, Lopez M, Pajares R, García JF, Mollejo M, Camacho FI, Ruiz-Marcellán C, Adrados M, Ortiz N, Franco R, Ortiz-Hidalgo C, Suarez-Gauthier A, Young KH, Piris MA. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly is an aggressive post-germinal center B-cell neoplasm characterized by prominent nuclear factor- κ B activation. *Mod Pathol*.2012;25(7):968-82.

Kaplan LD. Management of HIV-associated Hodgkin lymphoma: how far we have come. *J Clin Oncol*.2002;30(33):4056-8.

Kojika S, Griffin JD. Notch receptors and hematopoieses. *Exp Hematol*.2001;29(9):1041-52.

Küppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *HematologyAm Soc Hematol Educ Program*. 2009; 491-6.

Lam S, Rizkalla K, Hsia CC. Mediastinal choriocarcinoma masquerading as relapsed Hodgkin lymphoma. *Case Rep Oncol*. 2011;4(3):512-6.

Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15–16.

Marilyn L. Slovak, Victoria Bedell, Ya-Hsuan Hsu, Dolores B. Estrine, Norma J. Nowak, Maria L. Delioukina, Lawrence M. Weiss, David D Smith and Stephen J. Forman. Molecular karyotypes of Hodgkin and Reed-Sternberg cells at disease onset reveal distinct copy number alterations in chemosensitive vs. refractory Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2011;17(10): 3443–3454.

Martín-Subero JI, Klapper W, Sotnikova A, Callet-Bauchu E, Harder L, Bastard C, Schmitz R, Grohmann S, Höppner J, Riemke J, Barth TF, Berger F, Bernd HW, Claviez A, Gesk S, Frank GA, Kaplanskaya IB, Möller P, Parwaresch RM, Rüdiger T, Stein H, Küppers R, Hansmann ML, Siebert R. Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* 2006;66(21):10332-8.

Milner LA, Kopan R, Martin DIK, Bernstein ID. A human homologue of the *Drosophila* developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors. *Blood* 1994;83: 2057-2062.

Nagai H. Diagnosis and treatment of classical Hodgkin lymphoma. *Nihon Rinsho.* 2012 Apr;70 Suppl 2:568-76.

Piccaluga PP, Agostinelli C, Gazzola A, Tripodo C, Bacci F, Sabattini E, Sista MT, Mannu C, Sapienza MR, Rossi M, Laginestra MA, Sagramoso-Sacchetti CA, Righi S, Pileri SA. Pathobiology of Hodgkin lymphoma. *AdvHematol* 2011;2011:920898.

Re D, Zander T, Diehl V, Wolf J. Genetic instability in Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* 2002;13 Suppl 1:19-22.

Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW. A senescence program controlled by p53 and p16-INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 2002;109:335-346.

Schwarzer R, Jundt F. Notch and NF- κ B signaling pathways in the biology of classical Hodgkin lymphoma. *Curr Mol Med.*2011;11(3):236-45.

Smith SM, Anastasi J, Cohen KS, Godley LA. The impact of MYC expression in lymphoma biology: beyond Burkitt lymphoma. *Blood Cells Mol Dis.*2010;45(4):317-23.

Steidl C, Connors JM, Gascoyne RD. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. *J Clin Oncol.* 2011; 29(14):1812-26.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NI, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW .

Thomas RK, Re D, Wolf J, Diehl V. Part I: Hodgkin's lymphoma-molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Lancet Oncol.* 2005;5(1):8-11.

Tiacci E, Döring C, Brune V, van Noesel CJ, Klapper W, Mechtersheimer G, Falini B, Küppers R, Hansmann ML. Analyzing primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells to capture the molecular and cellular pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2012;120(23):4609-20.

Van Es JH, Van Gijn ME, Riccio O, Van den Born M, Vooijs M, Begthel H, Cozijnsen M, Robine S, Winton DJ, Radtke F, Clevers H. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 2005;435:959-963.

Wagner SD, Ahearne M, Ko Ferrigno P. The role of BCL6 in lymphomas and routes to therapy. *Br J Haematol.*2011;152(1):3-12.

WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Fourth Edition WHO 2008;2:322-334.

Wlodarska I, Nooyen P, Maes B, Martin-Subero JI, Siebert R, Pauwels P, De Wolf-Peeters C, Hagemeijer A. Frequent occurrence of BCL6 rearrangements in nodular lymphocyte predominance Hodgkin lymphoma but not in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; 101(2):706-10.

10. SAŽETAK

Ivona Stipica

Genomska nestabilnost klasičnog Hodgkinova limfoma

Hodgkinov limfom (HL) je neoplazma porijekla stanica limfatičkog tkiva. HL se dijeli na nodularnu limfocitnu predominaciju (NLPLH) i klasični Hodgkinov limfom (KHL). KHL je obilježen prisutnošću Reed-Sternbergovih (RS) i Hodgkinovih stanica (HS) u limfnom čvoru ili tkivu. RS stanice i HS često pokazuju genomsku nestabilnost: DNA mutacije, numeričke aberacije, strukturalne aberacije, delecije i/ili povećan broj kopija kromosomskih regija. S obzirom da je genomska nestabilnost jedno od najvažnijih svojstava malignih stanica KHL-a glavni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi njenu povezanost sa razvojem i kliničkom slikom bolesti, te utjecajem na terapiju. Istraživanje je provedeno na formalinom fiksiranim u parafin uklopljenim (FFPE) rezovima limfnih čvorova 120 pacijenata oboljelih od KHL-a. Metodom fluorescencijske *in situ* hibridizacije detektirane su promjene gena *BCL2*, *BCL6*, *c-MYC*, *p53* i regije 9q34. U tumorskim stanicama zabilježen je povećan broj kopija gena *p53*, delecija regije 9q34 gdje se nalazi lokus za gen *NOTCH1*, translokacija gena *BCL2* i *BCL6* dok je gen *c-MYC* bio nepromijenjen. Statističkim testovima je utvrđeno da povećan broj kopija gena *p53* korelira sa povećanom kemorezistencijom i bržom pojavom remisije bolesti dok prisutnost delecije regije 9q34 malignih stanica skraćuje period bez bolesti. Zaključno, prisutnost povećanog broja kopija gena *p53* i delecije regije 9q34 ubrzava razvoj KHL-a pri čemu djelovanje ovih gena može biti temelj za razvoj novih kemoterapeutskih sredstava.

Ključne riječi: Hodgkinov limfom, povećan broj kopija gena *p53*, *NOTCH1*.

11. SUMMARY

Ivona Stipica

Classic Hodgkin's lymphoma genomic instability

Hodgkin's Lymphoma (HL) is a neoplasm originating from lymphatic tissue cells. HL is divided into nodular lymphocyte predominance (NLPLH) and classical Hodgkin's lymphoma (CHL). HL is characterized by the presence of Reed-Sternberg (RS) and Hodgkin's cells (HS) in the lymph nodes or tissues. RS cells and HS often show genomic instability: DNA mutations, numerical aberrations, structural aberrations, deletions and/or an increased number of chromosome regions. Given that genetic instability is one of the most important characteristics of Hodgkin lymphoma malignant cells the aim of this research was to determine its relationship with development and clinical manifestations of the disease, and possible impact on therapy effect. The study was conducted on formalin-fixed, paraffin blended (FFPE) lymph sections from 120 patients diagnosed with cHL. Fluorescence *in situ* hybridization showed translocations of gene *BCL2* and *BCL6*, deletion of region 9q34 and amplification of gene *p53*. Gene *c-MYC* was unchanged. Statistics showed that an increased number of *p53* gene copies correlates with increased chemoresistance and faster appearance of remission while the presence of deletion in the region 9q34 in malignant cells reduces disease free period. Finally, the presence of an increased number of *p53* gene copies as well as deletion of region 9q34 accelerates the development of cHL. Abberant functions of these genes could be the basis for the development of new chemotherapeutics.

Key words: Hodgkin's lymphoma, amplification of gene *p53*, gene *NOTCH1*.