

Analiza profili ekspresji mikroRNA i mRNA w chłoniaku podobnym do chłoniaka Burkitta z aberracją 11q (BLL,11q)

Słowa kluczowe: chłoniak podobny do chłoniaka Burkitta z aberracją 11q (BLL,11q), chłoniak Burkitta, chłoniak rozlany z dużych komórek B, bliżej nieokreślony, gen *MYC*, profil ekspresji mikroRNA i mRNA, sekwencjonowanie następnej generacji

Chłoniak podobny do chłoniaka Burkitta (BL, ang. *Burkitt lymphoma*) z aberracją w obrębie długiego ramienia chromosomu 11 (BLL,11q, ang. *Burkitt-like lymphoma with 11q aberration*) to bardzo rzadka nowa tymczasowa jednostka chorobowa wyodrębniona przez WHO w 2017 roku. Przypadki BLL,11q charakteryzują się szeregiem cech morfologicznych, immunofenotypowych, genetycznych i klinicznych bardzo zbliżonych do cech BL. Jednocześnie niektóre BLL,11q odróżnia od BL morfologia, odpowiadająca obrazowi typowemu dla chłoniaków rozlanych z dużych komórek B, bliżej nieokreślonych (DLBCL,NOS, ang. *diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified*) lub chłoniaków pośrednich pomiędzy BL a DLBCL. Chłoniaki BLL,11q nie ujawniają rearanżacji *MYC*, wykazują bardziej złożony kariotyp niż BL, często obserwuje się węzłową lokalizację choroby. Zmianą cytogenetyczną charakterystyczną dla BLL,11q jest obecność aberracji w obrębie długiego ramienia chromosomu 11 – jednoczesnej duplikacji fragmentu 11q23.2-23.3 oraz delecji fragmentu telomerycznego 11q24.1-qter.

Przedmiotem dyskusji wciąż pozostaje kwestia, czy przypadki BLL,11q stanowią odrębną jednostkę, czy może są szczególnymi wariantami innych jednostek chorobowych, czy ich cechy bliższe są cechom chłoniaka Burkitta, czy też chłoniaka DLBCL,NOS z ośrodków rozmnażania limfocytów B (GCB DLBCL,NOS, ang. *germinal center B-cell DLBCL*). Dokładniejsza molekularna charakterystyka BLL,11q może się przyczynić do lepszego poznania patogenezy tego agresywnego nowotworu z komórek B.

Celem niniejszej pracy była charakterystyka molekularna BLL,11q w porównaniu do chłoniaka Burkitta, a dodatkowo także do GCB DLBCL,NOS, w oparciu o badanie wzorów ekspresji mikroRNA i mRNA.

Materiał kliniczny stanowiły próbki zbierane prospektywnie, uzyskane od 122 pacjentów Kliniki Nowotworów Układu Chłonnego Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego, którzy byli

diagnozowani i/lub leczeni w latach 2003–2017: 12 przypadków BLL,11q, 39 przypadków BL, 63 przypadki DLBCL,NOS (w tym 8 wtórnych) oraz 8 HGBL (ang. *high grade B-cell lymphoma*). Badania rozpoczęły się w okresie obowiązywania klasyfikacji WHO chłoniaków z 2008 roku, jednak wszystkie rozpoznania zostały następnie zweryfikowane zgodnie z klasyfikacją WHO z 2017 roku.

Pierwszy, wstępny etap pracy obejmował ocenę poziomu ekspresji trzech mikroRNA: miR-155-5p, miR-21-5p oraz miR-26a-5p techniką RT-qPCR w BLL,11q, BL, DLBCL,NOS i HGBL.

Kontynuację badań wstępnych stanowiły określenie i analiza profili transkryptów mikroRNA i mRNA w BLL,11q w porównaniu w szczególności do BL oraz dodatkowo do GCB DLBCL,NOS, z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji (NGS, ang. *next generation sequencing*). Do NGS włączono 6 próbek BLL,11q, 8 próbek BL, 6 próbek GCB DLBCL,NOS oraz 8 próbek GCB DLBCL,NOS z rearanżacją genu *MYC*, dla których dysponowano najdokładniejszymi wynikami badań diagnostycznych i danymi klinicznymi.

NGS przeprowadzono na sekwenatorze *Ion Proton* (Thermo Fisher Scientific). Dla transkryptów mRNA normalizację wyników i różnicową analizę ekspresji pomiędzy badanymi grupami chłoniaków wykonano w programie *DESeq2*, a dla mikroRNA w programie *edgeR*. Na zbiorach danych uzyskanych metodą NGS wykonano szereg analiz statystycznych i bioinformatycznych, korzystając m.in. z pakietu statystycznego *R*, w tym: analizy głównych składowych i grupowania hierarchicznego, analizy profilu ekspresji mikroRNA i genów regulowanych przez *MYC* oraz analizę profilu ekspresji genów tworzących tzw. molekularną sygnaturę BL. Wykonano również analizy ontologiczne profilu cząsteczek mRNA i mikroRNA, których poziom ekspresji istotnie statystycznie różnicuje badane grupy.

Weryfikację wyników NGS wykonano za pomocą techniki RT-qPCR, stosując metodę ΔCT , dla 7 cząsteczek mikroRNA oraz 6 transkryptów genów, w tym *MYC*. Dla genu *MYC* wynik RT-qPCR potwierdzono dodatkowo techniką cyfrowego PCR.

Podstawowe analizy statystyczne oraz ilustrację graficzną wyników wykonano w programach *GraphPad*, *SigmaPlot* oraz *Inkscape*.

Wstępne badania ekspresji mikroRNA metodą RT-qPCR wskazały m.in. na zbliżony poziom ekspresji miR-155-5p oraz miR-26a-5p w BLL,11q i w BL oraz na wyższy poziom ekspresji miR-21-5p w BLL,11q w porównaniu z BL.

Analiza profilu transkryptów mRNA z użyciem techniki NGS wykazała istotnie różny poziom ekspresji 1097 cząsteczek mRNA pomiędzy BLL,11q i BL. Analiza głównych składowych i grupowanie hierarchiczne wskazało na odrębność BLL,11q i BL.

W grupie transkryptów mRNA istotnie różnicujących BLL,11q i BL obecnych jest szereg cząsteczek warunkujących ekspresję białek o kluczowym znaczeniu w patogenezie nowotworów układu chłonnego, m.in. MYC.

Ze względu na szczególne znaczenie czynnika transkrypcyjnego MYC w patogenezie BL oraz na podobieństwo niektórych cech BL i BLL,11q, mimo braku translokacji MYC w BLL,11q, dla przypadków BLL,11q, BL oraz GCB DLBCL,NOS bez i z rearanżacją MYC, wykonano analizę poziomu ekspresji genów, które mogą być regulowane przez MYC. Wykazano, że w BLL,11q ekspresja genów tej grupy jest najbliższa profilowi, który charakteryzuje przypadki chłoniaka Burkitta, jednak analiza głównych składowych wykonana w tym zakresie dla BLL,11q i BL wykazała odrębność tych grup.

W pracy wykonano także analizę profilu ekspresji grupy genów uznanych jako tzw. molekularna sygnatura BL. Analiza ta wykazała największe podobieństwo BLL,11q do BL.

W ramach niniejszej pracy profil ekspresji mRNA różnicującego BLL,11q i BL analizowano również w kontekście zmian cytogenetycznych. We wszystkich przypadkach BLL,11q zaobserwowano powielenie fragmentu DNA w *locus* 11q23.2, gdzie zlokalizowany jest gen *NCAM1* [NCAM1 (CD56)], którego ekspresja jest jedną z diagnostycznych cech fenotypu, różnicujących BLL,11q i BL. Jednocześnie analiza NGS wykazała ponad 5-krotny wzrost ekspresji *NCAM1* w BLL,11q w porównaniu do BL.

Analiza profilu transkryptów mikroRNA z użyciem techniki NGS wykazała istotnie różny poziom ekspresji 39 cząsteczek mikroRNA pomiędzy BLL,11q i BL. Wyniki grupowania hierarchicznego oraz analizy skalowania wielowymiarowego wskazały na niecałkowitą odrębność grup BLL,11q i BL oraz na większe zróżnicowanie

profilu ekspresji mikroRNA w obrębie grupy BLL,11q w porównaniu do grupy przypadków klasycznego chłoniaka Burkitta.

Ze względu na wspomniane wcześniej szczególne znaczenie czynnika transkrypcyjnego MYC w patogenezie BL oraz na podobieństwo niektórych cech BL i BLL,11q, mimo braku translokacji *MYC* w BLL,11q, wykonano analizę profilu ekspresji grupy mikroRNA, których poziom ekspresji może być regulowany przez MYC. Stwierdzono, że profil ekspresji tej grupy mikroRNA różnicuje BLL,11q i BL. Przy tym trzeba zauważyć, że ta sama analiza rozszerzona o przypadki GCB DLBCL,NOS bez rearanżacji *MYC* i przypadki GCB DLBCL,NOS z rearanżacją *MYC* wykazała, że w tej grupie chłoniaków, przypadki BLL,11q wykazują największe podobieństwo do BL.

W grupie mikroRNA, których poziom ekspresji istotnie różnicuje BLL,11q i BL znalazły się miR-34b-5p i miR-34c-5p, a badania cytogenetyczne wykazały we wszystkich badanych przypadkach BLL,11q, powielenie fragmentu DNA w *locus* 11q23.1, w którym kodowane są te mikroRNA. Zatem zwiększona ekspresja miR-34b-5p i miR-34c-5p w BLL,11q może być wynikiem amplifikacji materiału genetycznego w tym obszarze.

Analizując profile mRNA i mikroRNA o ekspresji istotnie różnicującej BLL,11q i BL wykazano, że są one powiązane z szeregiem ścieżek sygnałowych (np.: sygnałowanie przy udziale interleukin), funkcji molekularnych (np.: wiązanie cytokin, w tym chemokin do receptora CCR) i procesów biologicznych (np.: procesy transkrypcji, translacji i metabolizmu RNA, proliferacja limfocytów B, procesy kataboliczne argininy, adhezja ogniskowa, formowanie lamellipodiów, formowanie cytoszkieletu), które mogą być istotne w biologii tych dwóch nowotworów.

WNIOSKI

Chłoniaki BLL,11q różnią się istotnie na poziomie transkryptomów mRNA i mikroRNA od BL oraz od chłoniaków GCB DLBCL,NOS.

O odmienności BLL,11q i BL świadczą także wykazane różnice profilu ekspresji grup cząsteczek mRNA i mikroRNA, które mogą być regulowane przez MYC oraz profilu grupy transkryptów mRNA definiowanej jako molekularna sygnatura BL. Przy tym, w szerszym kontekście, który uwzględnia także GCB DLBCL,NOS bez

i z rearanżacją *MYC*, pomimo widocznych różnic, BLL,11q wykazuje największe podobieństwo do BL.

Uzyskana charakterystyka molekularna BLL,11q stanowi istotny argument przemawiający za wyodrębnieniem BLL,11q jako oddzielnego podtypu agresywnego B-NHL.