

# **Gyermekkori kis kereksejtes daganatok (Ewing-sarcoma, pPNET) molekuláris genetikai vizsgálata**

Doktori tézisek

**Zentainé Dr. Patócs Barbara**

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Fekete György egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Bartyik Katalin egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Kiss András egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tímár József egyetemi tanár, az MTA tagja

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Karcagi Veronika osztályvezető főorvos, Ph.D.

Dr. Pápai Zsuzsanna osztályvezető főorvos, Ph.D.

Budapest

2015

## Bevezetés

A Ewing tumorok családjába (EFT) tartozó tumorok – azaz a csontok Ewing-sarcomája (ES), az extraossealis Ewing-tumor és a perifériás primitív neuroectodermális tumor (pPNET) – differenciálatlan kis kereksejtes tumorok, melyek a csontokat és a lágyrészeket egyaránt érinthetik. E tumorok közös genetikai jellemzője a TET-családba tartozó EWSR1 gén és az ETS-családba sorolható öt transzkripciós faktor egyik tagját kódoló gén között létrejövő reciprok kromoszomális transzlokáció. Az EWSR1 gén leggyakoribb transzlokációs partnerei az FLI1 gén (11q24), illetve az ERG gén (21q22), ritkább esetben azonban az ETV1 (7p22), ETV4 (17q12) valamint a FEV gén (2q33) is lehet. Az EFT háttérében álló transzlokáció sokszínűsége tovább gazdagodott azon felismerés által, miszerint mindkét transzlokációs partner felcserélhető más génekkel. Eszerint az újonnan, szórványosan azonosított C-terminális partnerek mellett a transzlokációban részt vehet a TET-családba tartozó gének másik tagja, a FUS gén (16p11) is.

Az EFT-re specifikus transzlokációk változatosságát tovább fokozza a transzlokációs töréspontokban észlelt sokféle variációs lehetőség. A leggyakoribb EWSR1-FLI1 transzlokáció esetében például az EWSR1 génen belül négy (a 7., 8., 9. és 10.) intronban, az FLI1 génszekvenciáját tekintve pedig hat (a 3., 4., 5., 6., 7. és 8.) intronban fordulhat elő kisebb-nagyobb gyakorisággal töréspont. Habár egy munkacsoport szerint eddig 12 különböző transzlokáció típust publikáltak, mely transzlokációkat a 12 leggyakoribbnak nevezték el, az EWSR1 gén 4 intronja, valamint az FLI1 gén 6 intronja között elméletileg 24 féle módon jöhet létre transzlokáció, ezért legalább 24 féle transzlokáció típust kell feltételeznünk. A két leggyakoribb fúziós transzkriptum az 1. típusú EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) és a 2. típusú EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5). A kiméra transzkriptumokról szintetizálódó fúziós fehérje a transzkripciós kontroll megszakításával és a sejtek transzformálásával kóros transzkripciós faktorként viselkedik, és végső soron a Ewing-családba tartozó tumorok kialakulásához vezet.

A lehetséges transzlokációs töréspontok által közrefogott vizsgálandó génrészletek, ezen belül is az intronok nagysága miatt az EFT molekuláris genetikai diagnosztikája RNS-alapú. Az EWSR1-ETS transzlokációk közötti, valamint az egyes transzlokációkon belüli heterogenitáson túl azonban a formalinnal fixált, paraffinba ágyazott minták esetén az RNS-degradációból fakadó töredezettséggel újabb metodikai nehézségek kerültek előtérbe. Bár az

EFT molekuláris diagnosztikájában többféle módszer is elterjedt, az archivált tumorszövetek vizsgálatával kapcsolatos nehézségekre még nem született megnyugtató megoldás.

## **Célkitűzések**

Jelen munka során a következő célokat tűztem ki:

➤ Molekuláris genetikai módszerek kidolgozása és Magyarországon elsőként való beállítása a Ewing-tumorok családjának diagnosztikájában az EWSR1-FLI1 és az EWSR1-ERG transzlokációk azonosítására.

➤ Az RNS alapú, új, (Magyarországon és külföldön ilyen formában eddig nem alkalmazott) multiplex fluoreszcens PCR és lézer indukált kapilláris elektroforézis alapú metodika alkalmazása frissen fagyasztott EFT- minták esetében.

➤ Az RNS alapú, új, multiplex fluoreszcens PCR és lézer indukált kapilláris elektroforézis alapú metodika alkalmazása formalinnal fixált, paraffinba ágyazott EFT-mintákban.

➤ A Semmelweis Egyetem, Ortopédiai Klinika Tumorbankjában tárolt EFT-minták feldolgozását követően az egyes EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzlokációk és transzlokáció típusok eloszlásának meghatározása a magyar betegpopulációban.

➤ Az EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzlokációk magyar betegpopulációban észlelt spektrumának összevetése nemzetközi adatokkal.

➤ Az EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzlokációs típusok szerepe a Ewing-tumorok családjának klinikai megnyilvánulásában (genotípus-fenotípus összefüggések keresése).

➤ A többszörös fúziós transzkriptumok szekvenciájának és gyakoriságának meghatározása a Ewing-sarcoma családba tartozó tumorok esetében.

➤ Az egyazon EFT-mintában előforduló multiplex fúziós transzkriptumok háttérében álló jelenség jellemzése, valamint az EFT patomechanizmusában feltételezhető szerepének megítélése saját eredményeim és a szakirodalmi adatok alapján.

## Módszerek

A jelen retrospektív vizsgálat keretében 23 frissen fagyasztott és 60 formalinnal fixált, paraffinba ágyazott, összesen 48 betegtől származó mintát dolgoztunk fel, melyek 1996 és 2006 között kerültek mintavételre. A vizsgálat során 25 betegtől több mintát is feldolgoztunk, de mindegyik mintavételből legfeljebb egy paraffinba ágyazott és/vagy frissen fagyasztott mintát vontunk be a vizsgálatunkba. Az összes minta a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikáján működő Tumorbankból származik.

A Ewing-sarcoma/perifériás primitív neuroektodermális tumor diagnózisának kialakítása a WHO által meghatározott szövettani kritériumok alapján elvégzett hisztopatológiai vizsgálatokon alapult. A vizsgálatba a 22 FFT és 53 FFPE, szövettanilag Ewing-sarcomának/pPNET-nek diagnosztizált minta mellett 8 kis kereksejtes tumorként diagnosztizált tumormintát is bevontunk, melyek esetében azonban felvetődött az ES/pPNET szövettani gyanúja.

Az összes lehetséges EWSR1-FLI1 vagy EWSR1-ERG transzlokáció típus amplifikálásának érdekében, az EWSR1, FLI1 és ERG gének szakirodalomban leírt töréspont régióinak figyelembevételével öt (EWS A, EWS B, FLI1 A, FLI1 B, ERG) primerkészletet terveztünk. A külső primerek tervezésekor legfeljebb 200 bázispárnyi amplikonok sokszorosítása volt az egyik legfontosabb kritérium. A belső primerkészlet tervezésekor célunk volt különböző PCR termékek amplifikálása: a lehetséges amplikonhosszak között legalább 2-3 bp különbség megléte volt a követelmény, mely az amplikonok fluoreszcens kapilláris elektroforézissel való megkülönböztetésének feltétele. Az RNS misőségi kontrolljaként szolgáló  $\beta$ -aktin (ACTB) housekeeping génre egy külső (ACTB A) és egy belső (ACTB B) primerpár lett tervezve.

Az EWS és FLI1 primerkészletek négy-négy forward, illetve reverse primerből állnak, míg az ERG génre két forward primerből álló primerkészletet (ERG) terveztünk. Az EWS B primerkészlethez tartozó belső forward primereket fluoreszcens (6FAM, VIC, NED vagy PET) festékkel jelöltük.

A frissen fagyasztott mintákból Trizol reagens, az FFPE mintákból High Pure RNA Paraffin Kit vagy PureLink™ FFPE RNA Isolation Kit felhasználásával izoláltam RNS-t, majd -80 °C-on tároltam a további felhasználásig.

A frissen fagyasztott EFT-minták esetében monoplex RT-PCR és nested fluoreszcens multiplex PCR segítségével, a tervezett specifikus primerek, valamint a GeneAmp RNA PCR

Kit vagy az AmpliTaq Gold DNA polimeráz felhasználásával amplifikáltuk az EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzkriptumokat. Az FFPE minták vizsgálata során multiplex RT-PCR és multiplex fluoreszcens PCR kombinációja által sokszorosítottuk a fúziós transzkriptumokat. Az EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzkriptumok kimutatása lézer indukálta fluoreszcens kapilláris elektroforézis alkalmazásával, az ampikonhosszak, és az amplifikálásban résztvevő forward primerhez kötött fluoreszcens festék azonosítása alapján történt. A kimutatott fúziós transzkriptum szekvenciáját minden esetben DNS szekvencia analízissel ellenőriztük.

Az RT-PCR, valamint a minták minőségének ellenőrzése céljából minden FFPE mintából származó RNS-en elvégeztük a housekeeping  $\beta$ -aktin gén átírását és amplifikálását.

## Eredmények

A 23 frissen fagyasztott tumorminta közül 21 esetben (91%) sikerült kimutatni az EWSR1-ETS fúziós transzkriptumot. Az EWSR1-FLI1 1. típusaként ismert, leggyakoribb EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) transzkriptum 10 beteg 11 mintájában fordult elő, a 2. típusú EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) valamint az EWSR1(ex 7)-ERG(ex 6) transzkriptumokat pedig 4-4 mintában sikerült kimutatnunk. További egy-egy mintában az alábbi hétféle fúziós transzkriptumot azonosítottuk: EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7), EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 8), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 6), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 8), EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7), EWSR1(ex 10)-FLI1(ex 6). Egy esetben a 2. típusú transzlokáció alternatív splicing eredményezte alternatív transzkriptumát (EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5<sup>^</sup>8)) mutattuk ki, mely nem tartalmazta a 6. és 7. exonokat.

A 21 frissen fagyasztott minta közül, melyekben molekuláris genetikai módszerekkel is igazoltuk fúziós transzkriptumok jelenlétét, 5 mintában többféle fúziós transzkriptumot is találtunk. Egy mintában három [EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 6), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 8)], három mintában pedig két-két különböző kiméra transzkriptumot azonosítottunk [EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 8), EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6) az első, EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5), EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5) a második és EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7), EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7) a harmadik esetben]. Végül egy frissen fagyasztott mintában a 2. típusú EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) transzkriptum mellett annak egy alternatív transzkriptumát (EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5<sup>^</sup>8)) is azonosítottuk.

A módszer optimalizálása során, az SK-ES-1 sejtvonalon egyik késői passzázsából származó RNS vizsgálata is többféle EWSR1-FLI1 fúziós transzkriptumot mutatott ki. Az

eddig leírt EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5) transzkriptum mellett ebben a sejtvonal-passzázsban az EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5) transzkriptum is megjelent. A korai 2. passzázsából azonban az EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5) nem volt kimutatható.

A másik allélon található EWSR1 gén transzkripció mintázatának azonosítására amplifikáltuk és azonosítottuk a 7. és 11. exonok közötti EWSR1 génrészletet. Mindegyik frissen fagyasztott mintában csak egyféle, a 7., 8., 9. 10. és 11 exonokat egyaránt tartalmazó transzkriptumnak megfelelő hosszúságú termék ábrázolódott, alternatív transzkriptumokat nem sikerült kimutatni.

RT-PCR amplifikációnak 39 beteg 45 formalinnal fixált paraffinba ágyazott mintáját tudtuk alávetni, mivel a gyenge RNS-minőség miatt 15 mintát ki kellett zárunk a vizsgálatból. Hat beteg esetében két formalinnal fixált, paraffinba ágyazott mintán is vizsgáltuk az EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzkriptumok jelenlétét, ugyanakkor e minták mindegyike más időpontokban történt mintavételekből származott.

Huszonöt beteg 27 mintájában (60%) sikerült azonosítani EWSR1-FLI1 vagy EWSR1-ERG transzlokációt mind fluoreszcens kapilláris elektroforézis által, mind pedig szekvenálással. Huszonkét betegnél EWSR1-FLI1, három betegnél pedig EWSR1-ERG transzlokációt azonosítottunk legalább egy paraffinos mintában. A következő hat különböző EWSR1-FLI1 és egy EWSR1-ERG transzkriptumot azonosítottuk a paraffinos tumormintákban: EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 6), EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 5), EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7), EWSR1(ex 10)-FLI1(ex 6), EWSR1(ex 7)-ERG(ex 6), továbbá az EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 7) és EWSR1(ex 9)-FLI1(ex 7) transzkriptumokat, melyeket ugyanazon tumormintában mutattuk ki az EWSR1(ex 7)-FLI1(ex 7) transzkriptummal együtt.

## **Következtetések – a munka jelentősége**

➤ Jelen munkám során új módszert dolgoztam ki a Ewing-családba tartozó tumorokra jellemző EWSR1-FLI1, valamint EWSR1-ERG transzlokációkról átíródó mRNS-ek kimutatására. Az új módszer monoplex vagy multiplex RT-PCR-en, továbbá fluoreszcens, multiplex nested PCR-t követő lézer-indukált, fluoreszcens kapilláris elektroforézisen, és a kimutatást megerősítő szekvenáláson alapul. Ez a metodika alkalmas mind frissen fagyasztott, mind a degradált RNS-t tartalmazó formalinnal fixált, paraffinba ágyazott mintákban az összes lehetséges EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzkriptum azonosítására.

➤ A bemutatott új módszert alkalmazva vizsgáltam a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikáján működő Tumorbank 23 frissen fagyasztott, és 60 paraffinba ágyazott, immun-hisztológiai módszerekkel többségében a Ewing-családba tartozó tumorként diagnosztizált tumormintáját, mely esetszám nemcsak a legnagyobb, közölt molekuláris genetikai vizsgálat Magyarországon az adott betegkörben, de nemzetközi szinten is jelentősnek számít.

➤ A frissen fagyasztott EFT-minták 91%-ában, a formalinnal fixált, paraffinba ágyazott tumorminták 60%-ában sikerült molekuláris genetikai módszerekkel is igazolni az EFT diagnózisát. A paraffinos minták vizsgálatára kidolgozott módszer nehézségeit, gyenge pontjait áttekintve javaslatokat fogalmaztam meg a módszer kisebb módosításaira, mely lehetővé teszi a transzlokációk és transzlokáció típusok heterogenitása, valamint az archivált mintákban tapasztalt RNS-degradáció miatt nehézségekbe ütköző molekuláris genetikai diagnosztika számára egy kis RNS- és reakcióelegy igényű alternatív vizsgálati módszer alkalmazását.

➤ Az összes EFT-minta molekuláris genetikai vizsgálata során tíz különböző EWSR1-FLI1 és egy EWSR1-ERG fúziós transzkriptumot sikerült azonosítanom. Ezek közül kettőt, az EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 5) és EWSR1(ex 8)-FLI1(ex 8) transzkriptumokat legjobb tudásom szerint mi közöltük elsőként.

➤ A magyar EFT-minták vizsgálata során észlelt EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzkriptumok előfordulási gyakorisága megegyezett a nemzetközi adatokkal.

➤ Mintegy öt beteg esetében több EWSR1-FLI1 transzkriptumot is azonosítottunk ugyanabban az EFT-mintában. A jelenség legvalószínűbb magyarázatát eddigi ismereteink alapján az alternatív splicing mechanizmusa nyújtja.

➤ Az összes, többszörös fúziós transzkriptumot tartalmazó EFT-minta vizsgálati eredményének ismeretében az alternatív splicing viszonylag gyakori jelenség: előfordulási gyakorisága az eddig közölt esetek alapján kb. 4%, a jelen kutatás eredményei szerint 22%, de a transzlokációs töréspontok ismert eloszlása alapján előfordulása akár a 30%-ot is meghaladhatja.

➤ Az alternatív splicing a Ewing-családba tartozó tumorok jelentős részének patogenezisében fontos szerepet játszik, lehetőséget nyújtva az out-of-frame transzkriptummal és ebből következően biológiailag inaktív fehérje szintetizálásával járó esetekben az in-frame mRNS átírására és aktív onkogén fehérje létrehozására. A többszörös fúziós transzkriptumok háttérében álló in-frame transzlokációjú esetek feltehetően jelentős száma pedig felveti az alternatív splicing további, egyelőre ismeretlen szerepét is.

➤ Az EFT-betegek tumormintáiban azonosított EWSR1-FLI1 és EWSR1-ERG transzlokáció típusok, a multiplex fúziós transzkriptumokat mutató esetek, valamint a betegek túlélési adatai közötti esetleges összefüggéseket a jól dokumentált esetek kis száma miatt nem tudtuk vizsgálni.



## **Saját publikációk jegyzéke**

### **Az értekezés témájában megjelent közlemények:**

**Patócs B**, Németh K, Garami M, Arató G, Kovalszky I, Szendrői M, Fekete G. Multiple splice variants of EWSR1-ETS fusion transcripts co-existing in the Ewing sarcoma family of tumors. *Cell Oncol.* 2013;3:191-200. **IF (2011): 3,105**

**Patócs B**, Németh K, Garami M, Arató G, Kovalszky I, Szendroi M, Fekete G. Utilisation of fluorescent multiplex PCR and laser-induced capillary electrophoresis for the diagnosis of Ewing family of tumours in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J Clin Pathol.* 2012;12:1112-8. **IF (2011): 2,306**

### **Az értekezés témájában tartott előadások:**

**Patócs B**, Németh K, Garami M, Arató G, Kovalszky I, Szendroi M, Fekete G. Ewing-sarcoma / pPNET molekuláris genetikai diagnosztikája Magyarországon. VII. Magyar Genetikai Kongresszus és XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, 2007.04.15-17.

**Patócs B**, Németh K, Garami M, Arató G, Kovalszky I, Szendroi M, Fekete G. Ewing-sarcoma / pPNET molekuláris genetikai diagnosztikája Magyarországon. A MOT XXVII. Jubileumi Kongresszusa, Budapest, 2007.11.8-10.