

Metasztázis-asszociált fehérjék (CD44v6 és NM23-H1) expressziója gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában

Tímár József¹, Sebestyén Anna², Magyarosy Edina³

¹ Országos Onkológiai Intézet, Tumor Progressziós Osztály

² Semmelweis Egyetem, I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet

³ Fővárosi Önkormányzat Heim Pál Gyermekkorháza, Budapest

Két metastázis-társult fehérje (CD44v6 és NM23-H1) jelen van normális limfoid sejtekben is: a CD44v6 aktivációs marker, míg az NM23-H1 állandóan expresszálódik. Különböző hematológiai daganatokban a CD44v6 megjelenése a rossz prognózis markere, azonban szerepét gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában még nem vizsgálták. Az NM23-H1 fehérjét differenciáció-gátló szerepűnek tartják hematológiai daganatokban, és mint ilyen szintén a rossz prognózis markere lehet. Jelen tanulmányunkban 16 akut limfoblasztos leukémiás (ALL) beteg csontvelőjében vizsgáltuk a két metastázis-asszociált fehérje expresszióját fluoreszcens immunhisztokémiai módszerrel. Az irodalomban elsőként mutattuk ki a CD44v6 protein epitópjainak megjelenését a gyermekkori ALL esetek egy részében (6/16), elsősorban a közepes-magas rizikójú betegcsoportban. Az NM23-H1 protein expressziója az ALL-es esetek mintegy felében megtartott volt, s ez nem függött össze a rizikócsoportba való tartozással. A gyermekkori ALL-es eseteink jelentős részében (10/16) csak az egyik metastázis-asszociált fehérje volt jelen a tumorsejtekben, amely jelenség nagyfokú hasonlóságot mutat más szolid daganatokban tapasztaltakhoz. Vizsgálataink alapján felmerül, hogy a CD44v6 fehérje ALL-ben való megjelenése a rossz prognózis markere, azonban ezt a kérdést nagyobb klinikai mintán végzett vizsgálatoknak kell tisztáznia. *Magyar Onkológia* 45:75–79, 2001

Two metastasis associated proteins, CD44v6 and NM23-H1, are expressed by normal lymphoid cells, the former serving as activation marker and the later as a constitutive protein. CD44v6 is considered as a marker of poor prognosis of various hematological cancers but its expression was not demonstrated in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). On the other hand, NM23-H1 is considered as a differentiation inhibitory factor in various hematological cancers and as a marker of poor prognosis. Therefore we have analyzed the expression of CD44v6 and NM23-H1 in bone marrow of sixteen pediatric ALL patients using immunocytochemistry. For the first time, we have demonstrated the expression of CD44v6 protein epitopes on leukemic cells in a proportion of ALL cases (6/16), primarily in the medium/high risk group (except one case), suggesting a possible association to an unfavorable outcome. On the other hand, NM23-H1 protein expression was maintained in leukemic cells in 50% of both low and medium/high risk ALL cases. The majority of the pediatric ALL cases expressed only one of the metastasis associated proteins (10/16). This feature is highly similar to the observations made in several adult solid cancers. The potential of CD44v6 expression in leukemic cells as prognosticator in pediatric ALL has to be evaluated in a larger clinical trial. *Tímár J, Sebestyén A, Magyarosy E. Expression of metastasis associated proteins, CD44v6 and NM23-H1, in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Hungarian Oncology* 45:75–79, 2001



Közlésre érkezett: 2000. október 2.

Elfogadva: 2000. november 7.

Levelezési cím: Dr. Tímár József egyetemi tanár,

Országos Onkológiai Intézet,

1122. Budapest, Ráth György u. 7-9. Tel.: 224-8786, Fax: 224-8706, E-mail: jtimar@oncol.hu

Bevezetés

A CD44 molekula adhéziós glikoprotein és „időleges” proteoglikán, mely limfoid sejtekben ún. hyaluronsav- és homing receptorként szolgál (CD44s vagy CD44H) (5, 6, 8). Számos ún. splice variánsa lehetséges, melyek közül a v6 variáns többféle daganat esetében bizonyult hatékony jelzőjének az áttétképző képességnek (gasztrointesztinális tumorok) (5), míg B és T limfoid sejtekben aktivációs marker, ugyanakkor laphámok esetében fontos sejtadhéziós molekula (6, 8). Az NM23-H1 fehérje a kis GTP-kötő fehérjék családjába tartozik és az NDP-kináz enzimnek felel meg (13). Számos daganatfeleség expressziója esetén az áttétképző képesség lecsökkent, ami miatt metasztázis-szuppresszornak tekintették (4, 13). Ugyanakkor megjegyzendő, hogy laphámokban NM23 normális körülmények között nem mutatható ki, míg limfoid sejtekben az NM23-H1 konstitutívan expresszálódik (15). Ezen két metasztázis-asszociált fehérje expressziója daganatokban igen ellentmondásos, mivel jelenlétük egészen ellentétes módon is változhat bizonyos daganatokban (3). Ez attól függ, hogy az adott normális sejttypusban a CD44v6, illetve az NM23-H1 expresszálódik-e (15).

NHL-ben, CLL-ben és AML-ben a CD44H-expresszió és a szérumban megjelenő szolubilis sCD44 egyértelműen a rossz prognózis markere (12) és ugyanez áll a B-sejtes formákra is (7, 11). Gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában (gyALL) a szérumban megjelenő sCD44 szintén a rossz prognózis markere (14), azonban a CD44v6 variáns expressziójára nézve eddig nem történtek vizsgálatok.

Hematológiai daganatokban az NM23-H1-et differenciálódás-inhibitoroknak tartják (16). GyALL-ben NM23-expressziót gyakrabban találtak relap-

szus esetén, ezért kedvezőtlen prognózisra utaló jelnek tekintik (12), hasonlóan a felnőttkori AML-hez (17).

Mindezek alapján meg kívántuk vizsgálni a CD44v6 és NM23-H1 metasztázis-asszociált fehérjék expresszióját különböző prognózisú gyermekkori ALL esetekben.

Beteganyag és módszerek

Vizsgálatunkba 16 friss, nem-szelektált, frissen diagnosztizált ALL-es beteget vontunk be a szülők beleegyezésével.

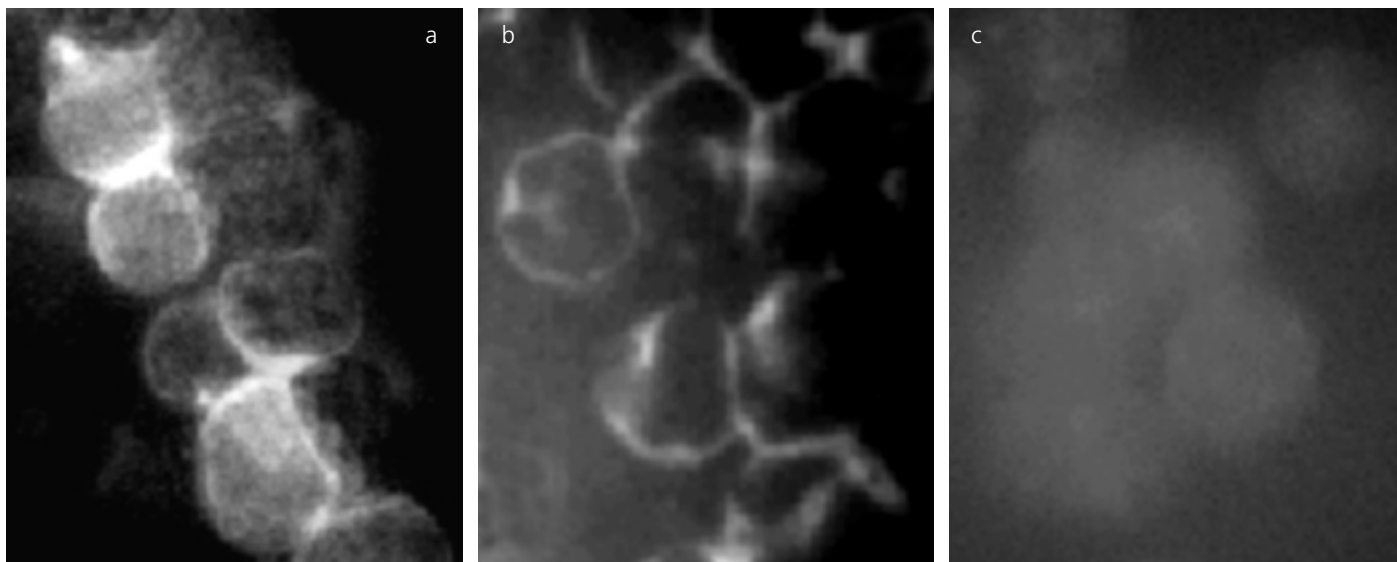
A csontvelő morfológiai, citokémiai és immunológiai vizsgálata

A csontvelő vizsgálata első lépésben May-Grünwald-Giemsa festéssel történt. Az akut leukémia diagnózisát a Francia-Amerikai-Angol (FAB) megegyezési kritériumokra alapoztuk (2). Az immunfenotípust lizált teljes perifériás vérből illetve csontvelőből határoztuk meg áramlások citometriával (FACScan készülék, Becton Dickinson) szimpla vagy kettős immunfluoreszcenciás jelöléssel. Markerek: CD3, CD4, CD7, CD14, CD19, CD20, CD33, CD34, CD61, HLA-DR (Becton Dickinson) (9).

Metasztázis-asszociált fehérjék immuncitokémiai meghatározása

A perifériás vérből fehérvérsejteket Ficoll denzitás-grádiensen történő centrifugálással izoláltunk (Histopaque-1077, Sigma). A szeparált sejteket citospin centrifugával (Shandon) Superfrost tárgylemezre centrifugáltuk. A tárgylemezeket -20°C -on tároltuk feldolgozásig.

1. ábra. A metasztázis-asszociált fehérjék immunfluoreszcens kimutatása ALL-betegek csontvelőkeneteiben. (a) CD44v6 kimutatása, 6. sz. eset. A csontvelőkenetet monoklonális anti-CD44v6 antitesttel jelöltük és biotin/Streptavidin-FITC rendszerrel mutattuk ki: a reakció kifejezetten sejtmembrán-jellegű. (b) NM23-H1 kimutatás, 15. sz. eset. A csontvelőkenetet monoklonális anti-NM23-H1 antitesttel jelöltük és biotin/Streptavidin-Texas-Red rendszerrel mutattuk ki: a reakció kifejezetten citoplazmatikus. (c) Negatív kontroll minta, zöld autofluoreszcencia, 6. sz. eset. A csontvelőkenetet a primer specifikus antitestnek megfelelő izotípuskontroll immunglobulinnal jelöltük és az (a) ábra szerint hívtuk elő.



A minták immunfluoreszcens jelölését szobahőn végeztük. A készítményeket 1% BSA/PBS oldattal blokkoltuk. A primer antitestekkel (egér monoklonális anti-humán CD44v6, R&D Systems, illetve anti-humán NM23-H1, Novocastra) 60 percig inkubáltuk a metszeteket 10 µg/ml koncentrációban. Kontrollként megfelelő izotípusú Ig-vel, ill. primer savó nélkül inkubált mintákat használtunk. Mosás után a lekötődött primer antitesteket biotinált anti-egér immunoglobulinnal (Amersham) utőjelöltük, majd a komplexet FITC- illetve Texas-Red-jelölt Streptavidinnel (Amersham) azonosítottuk. A mintákat Nikon E600 epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk és a képeket Spot-Junior CCD-kamera segítségével képanalizáló szoftverrel rögzítettük (Sterling Heights).

Eredmények

Vizsgálatainkba 16 1–14 éves gyermeket vontunk be (fiú/leány arány: 10/6). Az esetek többsége L1 típusú ALL volt (13 eset), míg csak 3 eset bizonyult L2-nek. Immunfenotípus szerint 9 eset volt CD10⁺ pre-B-ALL, míg 2–2 eset CD10⁻ pre-B-ALL, T-ALL, illetve bifenotípusos ALL (1. táblázat).

Az ALL-es csontvelőkben a CD44v6 protein a limfoid sejtek felszínén volt kimutatható (1a. ábra), míg az NM23-H1 fehérjét inkább a citoplazmában találtuk (1b. ábra). A két metasztázis-asszociált fehérje az ALL-es csontvelőkben igen heterogén módon expresszáldott. Ennek megfelelően három expressziós kategóriát állítottunk fel: negatívnak tekintettük, ha a sejtpopuláció <10%-a volt pozitív, gyengének tekintettük azt, ha a populáció 10-50%-a és erősnek, ha a populáció <50%-a adott pozitív reakciót. A metasztázis-

asszociált fehérjék expressziója nem volt eltérő a különböző fenotípusú esetekben (B-, T- vagy bifenotípusos ALL). Az ALL-es esetek fele NM23-H1-pozitívnak bizonyult, azonban ez nem mutatott kapcsolatot az ALL rizikócsoportokkal (alacsony vagy közepes/magas rizikó) (2. táblázat). Ezzel szemben a CD44v6⁺ esetek a közepes/magas rizikócsoportban fordultak elő egy kivétellel (3. táblázat).

A továbbiakban azt is vizsgáltuk, hogy milyen a két fehérje expressziójának egymáshoz való viszonya. Megállapítottuk, hogy az esetek többségében a tumoros sejtpopuláció csak az egyik metasztázis-asszociált fehérjét expresszáta (10/16), és a kettős expresszió (2/16) vagy a kettős negativitás (4/16) viszonylag ritka jelenség gyermekkori ALL-ben. Az ún. normális limfoid sejtek metasztázis-asszociált protein fenotípusa (NM23-H1⁺/CD44v6⁻) az ALL-es esetek mintegy harmadában maradt fenn, azonban ez nem mutatott összefüggést azzal, hogy az eset milyen rizikócsoportba tartozott (4. táblázat).

Megbeszélés

Vizsgálataink során nem találtunk összefüggést a gyermekkori ALL kezdeti NM23-H1-expressziója és a betegség rizikócsoportba való besorolása között, miután az alacsony, illetve közepes/magas rizikócsoportokban gyakorlatilag azonos arányban találtunk pozitív eseteket. Egy korábbi vizsgálatban azt találták, hogy az NM23-H1-pozitivitás sokkal gyakoribb a relapszusba került gyermekkori ALL-es esetekben, mint a betegség felismerésekor, ezért a szerzők arra következtetésre jutottak, hogy az NM23-H1-expresszió a kedvezőtlen prognózis jele lehet ebben az ALL-formá-

1. táblázat.
Klinikai adatok

Esetszám	Életkor (év)	Nem	Diagnózis	Fenotípus	Kromoszóma	FVS (n/ml)	Rizikócsoport	Lefolyás
1	5	L	L1	CD10+preB	Normális	8300	SR	
2	2	F	L1	CD10+preB	Normális	14300	SR	
3	3	L	L1	CD10-preB	n.v.	33000	SR	
4	5	F	L1	Nd	n.v.	10500	SR	
5	3	F	L1	B/T	Normális	5700	SR	
6	2	F	L1	CD10+preB	Normális	28400	SR	
7	2	L	L1	CD10+preB	Normális	23800	MR	
8	9	F	L1	B/T	Del-chr6	29200	MR	
9	1,5	F	L2	CD10+preB	Hiperdiploid	24600	MR	
10	0,5	F	L1	CD10-preB	Normális	13000	MR	Recidíva
11	7	F	L2	T	Normális	11700	MR	
12	4	L	L1	CD10+preB	Hiperdiploid	47800	MR	Exitus
13	11	F	L1	CD10+preB	n.v.	7500	MR	Exitus
14	14	L	L2	CD10+preB	t9, 12	10600	MR	Progresszió
15	13	F	L1	T	Normális	12500	HR	Transzpl.
16	12	L	L1	CD10+preB	n.v.		HR	

F = fiú, L = leány, n.v. = nem vizsgált, SR = átlagos (standard) rizikó, MR = közepes rizikó, HR = magas rizikó

2. táblázat. Az NM23-H1 protein expressziója gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában

Esetszám	Alacsony malignitású	Esetszám	Közepes/magas malignitású
1	+	7	-
2	+	8	-
3	+	9	-
4	-	10	++
5	-	11	-
6	-	12	+
		13	++
		14	-
		15	++
		16	++
Pozitivitás gyakorisága	3/6		5/10

Az NM23-H1 protein expresszióját citospin-preparátumon végrehajtott immunfluoreszcens jelöléssel határoztuk meg, ahol minimálisan 100 sejtet vizsgáltunk.
 - =negatív, <10% pozitív sejt, + =pozitív, 10–50% pozitív sejt, ++ =erősen pozitív, 50% pozitív sejt

3. táblázat. A CD44v6 protein expressziója gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában

Esetszám	Alacsony malignitású	Esetszám	Közepes/magas malignitású
1	-	7	++
2	-	8	-
3	-	9	++
4	-	10	++
5	++	11	++
6	-	12	-
		13	-
		14	-
		15	-
		16	++
Pozitivitás gyakorisága	1/6		5/10

Az CD44v6 protein expresszióját citospin-preparátumon végrehajtott immunfluoreszcens jelöléssel határoztuk meg, ahol minimálisan 100 sejtet vizsgáltunk.
 - =negatív, <10% pozitív sejt, + =pozitív, 10–50% pozitív sejt, ++ =erősen pozitív, 50% pozitív sejt

4. táblázat. Metasztázis-asszociált proteinek együttes expressziója gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában.

	ALL alcsoportok			
	NM23- CD44v6-	NM23+ CD44v6+	NM23+ CD44v6-	NM23- CD44v6+
Gyakoriság	4/16	2/16	6/16	4/16

A metastázis-asszociált proteinek expresszióját immunhisztokémiai módszerrel határoztuk meg.

ban (10). A saját és a korábbi vizsgálatokat azonban másféleképpen is lehet értékelni. Véleményünk szerint a megtartott NM23-H1-expresszió gyermekkori ALL-ben nem valószínű, hogy a rosszabb prognózis jele, felvetjük inkább annak a lehetőségét, hogy az NDP-kináz enzim expressziója (NM23-H1) esetleg kedvezőtlenül befolyásolja a terápiás választ. Ezen feltevésünk ellenőrzésére azonban természetesen további vizsgálatok szükségesek. Az irodalmi adatok ugyanakkor többszörösen igazolták azt, hogy felnőttkori AML-ben az NM23-H1-expresszió a rossz prognózis markere (17). Az NM23-H1 expressziójának gyermekkori ALL-ben és a felnőttkori AML-ben megnyilvánuló eltérő szerepe véleményünk szerint azzal is magyarázható, hogy szemben a normális limfoid sejtekkel, normális mieloid sejtekben az NM23-H1/NDP-kináz nincsen jelen, tehát a malignus transzformáció folyamatában valószínűleg igen eltérő szerepet játszhat a két leukémia-féleség esetén.

Vizsgálataink során új megfigyelésünk volt az, hogy a gyermekkori ALL esetek egy részében megjelenik a CD44v6 splice variáns és ezen esetek döntően a közepes/magas rizikójú esetek közé tartoznak. Ez a megfigyelésünk arra utal, hogy a CD44v6 fehérje megjelenése a hematológiai betegségekben (gyermekkori ALL, felnőttkori AML, B-CLL) a rossz prognózis markere (5, 7, 11), hasonlóan számos hámeredetű daganathoz (5). Ebből a szempontból fontos megjegyezni, hogy normális B- illetve T-sejtek esetében a CD44v6-expresszió aktivációs marker, ennek jelenléte gyermekkori ALL esetekben jele lehet annak, hogy a tumoros sejtpopulációban ún. aktivált állapotba merevedett blasztsejtek vannak jelen.

Érdekes jelenség normális sejt típusok esetében, hogy csak az egyik metastázis-asszociált fehérje expresszálódik (laphám: CD44v6, mirigyhám/limfocita: NM23-H1) (4, 5, 15). Ez a sajátosság gyakran megfigyelhető a gyermekkori ALL-ben is (10/16). A metastázis-asszociált fehérjék ún. reciprok expresszióját több daganatféleségben lehet megfigyelni (vastagbél-, emlő- és fejnagy daganatok), ugyanakkor az egyes fehérjék expressziója ellentétesen változhat a malignus transzformáció vagy a tumoros progresszió során (15). Ez a jelenség arra utalhat, hogy a két fehérje szerepe ellenkező a progressziós folyamatban vagy génexpressziós szinten valamilyen szabályozási kapcsolatban állhatnak egymással. Ezen felvetéseinkre a választ további vizsgálatoknak kell megadni.

Irodalom

1. Arch R, Wirth K, Hofmann M, et al. Participation in normal immune response of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* 257:682-685, 1992
2. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group For the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukaemia* 9:1783-1786, 1995
3. Fidler IJ, Radinsky R. Search for genes that suppress cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 88:1700-1703, 1996

4. Freije JM, MacDonald NJ, Steeg PS. Nm23 and tumour metastasis: basic and translational advances. *Biochem Soc Symp* 63:261-271, 1998
5. Goodison S, Tarin D. Clinical implications of anomalous CD44 gene expression in neoplasia. *Front Biosci* 3:89-109, 1998
6. Hofmann M, Rudy W, Zöller M, et al. CD44 splice variants confer metastatic behaviour in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res* 51:5292-5297, 1991
7. Irving JA, Cain G, Howard M, et al. The role of alternative splicing of the adhesion molecule, CD44, in lymphoid malignancy. *J Clin Pathol* 51:776-780, 1998
8. Jalkanen S, Reichert RA, Gallatin WM, et al. Homing receptors and the control of lymphocyte migration. *Immunol Rev* 91:39-60, 1986
9. Knapp W, Strobl H, Majdic O. Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry* 18:187-198, 1994
10. Koomagi R, Sauerbrey A, Zintl F, et al. NM23-H1 protein expression in newly diagnosed and relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Res* 18:4307-4309, 1998
11. Legras S, Gunthert U, Stauder R, et al. A strong expression of CD44v6 correlates with shorter survival of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 91:3401-3410, 1998
12. Ristamäki R, Joensuu H, Jalkanen S. Serum CD44 in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 33:433-440, 1999
13. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 80:200-204, 1988
14. Takeuchi M, Tanizawa A, Fukumoto Y, et al. Serum soluble CD44 in pediatric patients with acute leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 21:384-388, 1999
15. Timár J. A metasztázisgének dialektikája. *LAM* 10:16-18, 2000
16. Yamashiro S, Urano T, Shiku H, et al. Alteration of nm23 gene expression during the induced differentiation of human leukemia cell lines. *Oncogene* 9:2461-2468, 1994
17. Yokoyama A, Okabe-Kado J, Wakimoto N, et al. Evaluation by multivariate analysis of the differentiation inhibitory factor Nm23 as a prognostic factor in acute myelogenous leukemia and application to other hematologic malignancies. *Blood* 91:1845-1851, 1998

HIRDETMÉNY

A MAGYAR PATHOLOGUSOK TÁRSASÁGA ÉS A MAGYAR ONKOLÓGUSOK TÁRSASÁGA

KROMPECHER ÖDÖN

Pályamunka díjazására 80 000.- Ft pályadíjat tűz ki orvostanhallgatók és fogorvos-tanhallgatók számára.

A pályamunka címe: „A neuroendokrin rendszer daganatai”.

A pályamunka terjedelme az irodalommal és a dokumentációval együtt maximum 80 oldal lehet.

A munkán csak a jelíge szerepelhet, melyhez mellékelni kell egy borítékot, rajta a jelígével, s a lezárt borítékban a nevet, évfolyamot, pontos lakcímet és telefonszámot kell feltüntetni.

A pályamunka beadási határideje: 2001. november 30.

Helye: Semmelweis Egyetem, II. Patológiai Intézet (1091. Budapest, Üllői út 93.)

Díjazást elért pályázat esetén a Társaságok javaslatot tesznek a pályamunka szakdolgozatként való elfogadására.

MAGYAR PATHOLOGUSOK TÁRSASÁGA
és
MAGYAR ONKOLÓGUSOK TÁRSASÁGA
VEZETŐSÉGE