

Normal Organ Dokuları ile Lenfoid ve Çeşitli Epitelyal Tümör Hücre Dizilerinde RT-PCR ile BCL-6 mRNA Ekspresyonu Sonuçlarının Değerlendirilmesi

The Evaluation of the Results of BCL-6 mRNA Expression Analysed By RT-PCR in Normal Tissues, Lymphoid and Epithelial Tumor Cell Lines

Serap Işıksay¹ Maria FKL Leung² Wai-Choi Leung²

¹Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Eskişehir - Türkiye

²Tulane Üniversitesi Tıp Fakültesi, Moleküler Patoloji Birimi, New Orleans - ABD

Özet: Bu çalışmada kimi normal organ dokularında ve çeşitli lenfoid ve lenfoid olmayan kültür tümör hücre dizilerinde, reverz-transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile BCL-6 mRNA ekspresyonu araştırıldı. Normal akciğer, karaciğer, dalak, ince barsak, çizgili kas, beyin dokuları, lenf düğümünde ve Burkitt lenfoma (Raji, MC116), T hücreli lenfoma (JURKAT) gibi lenfoid tümörler ile akciğerin adenoskuamöz hücreli karsinomu (H596), duktal meme karsinomu (ZR-75-1), hepatosellüler karsinom (Hep 3 ve Hep G2) ve serviks karsinomu (HeLa) gibi lenfoid olmayan tümör hücre dizilerinde BCL-6 mRNA ekspresyonu gösterildi. Bulgularımız normal dokular yanısıra, çeşitli lenfoid ve lenfoid olmayan tümöral hücrelerde BCL-6 geninin biyolojik aktivasyonu olduğunu göstermektedir. Burada, normal ve tümöral dokulardaki BCL-6 ekspresyonu kaynak bilgileri eşliğinde tartışıldı.

Anahtar Sözcükler: BCL-6 mRNA, normal dokular, tümörler

Summary: In this study, we investigated BCL-6 mRNA expression in normal tissues and several cell lines derived from lymphoid and non-lymphoid tumors by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). BCL-6 mRNA expression was determined in normal tissues of lung, liver, spleen, small bowel, striated muscle, brain, lymph node, and in the several tumor cell lines which are derived from Burkitt lymphoma (Raji, MC116), T cell lymphoma (JURKAT), lung adenosquamous carcinoma (H596), ductal breast carcinoma (ZR-75-1), hepatocellular carcinoma (Hep 3 and Hep G2) and cervix carcinoma (HeLa). This findings shows that BCL-6 gene has biological activation in several lymphoid and non-lymphoid tumor cells besides normal tissues. Here, BCL-6 expression in normal tissues and tumors were discussed in the view of the literature.

Key Words: BCL-6 mRNA, normal tissues, tumors

Tümörlere özgü pek çok değişik translokasyon ve inversiyonların kırılma noktalarının klonlanması, yeni protoonkogenlerin ortaya konmasını sağlamıştır. Translokasyon gibi yapısal değişiklikler, protoonkogenlerin deregülasyonuna (aşırı ekspresyonu) neden olabilmektedir. Kromozomal aberrasyonlarda etkilenen genler, sıklıkla, transkripsiyon faktörlerinin şifresini taşıdığından, transkripsiyon kontrolünde ortaya çıkan değişikliklerin kanser gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (1).

Son yıllarda (1993), özellikle diffüz büyük B hücreli non-Hodgkin lenfomalarda, 3. kromozom ile 14, 22, 2, 8, 5, 11, 12, 1 ve 9. kromozomlar arasında oluşan translokasyonlarda, 3q27 bandı üzerindeki kırılma noktasında, B hücreli lenfoma (BCL)-6 geni olarak adlandırılmış ve protoonkogen olduğu düşünülen bir gen tanımlanmıştır (2-5). Bu gen başka araştırmacılar tarafından BCL-5 ve LAZ-3 olarak da adlandırılmıştır (4-6). BCL-6 geninin biyolojik fonksiyonu henüz ortaya konamamıştır. Bu gen ürünü, Kruppel tipte bir zinc-finger protein olup, transkripsiyon faktörleri ile yapısal olarak homolog özellikler taşımaktadır. Bu yapısal benzerlik nedeniyle BCL-6 proteininin, bir transkripsiyon regülatörü olup, hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve gelişiminde etkisi olduğu düşünülmektedir (2-5,7).

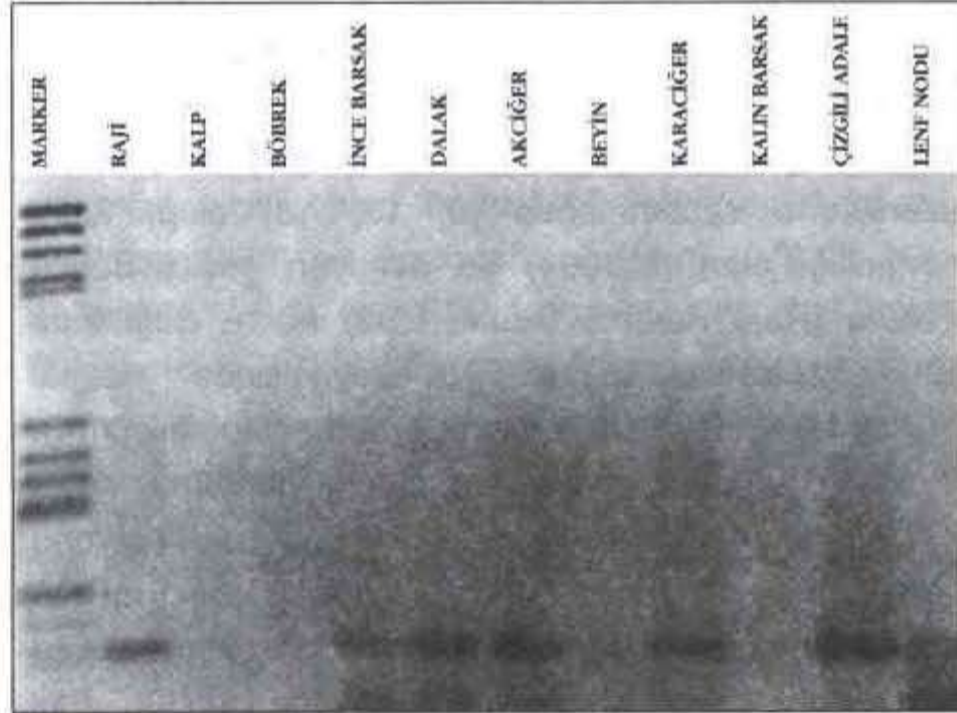
Diffüz büyük hücreli lenfoma ve folliküler lenfomalarda BCL-6 geninde 5 kodlayıcı olmayan bölgede yeniden düzenlenme (rearrangement), nokta mutasyonları ve küçük delesyon gibi yapısal değişiklikler gösterilmiştir (5,8,9). BCL-6 geninde yeniden düzenlenme olduğunda, genin kodlayıcı olmayan sekansı üzerinde kırılmalar ortaya çıkabilmektedir (3,8). Kodlayıcı sekansta ise bir değişiklik olmamaktadır. Translokasyon sırasında bu kodlayıcı sekansın heterolog bir kromozoma taşınması, BCL-6 gen lokusu içinde alternatif diğer bir regülatör sekansa füzyonu ya da endojen regülatör sinyallerin yitmesi gibi olası mekanizmalarla, bu genin normal regülasyonunun ve normal ekspresyonunun bozulduğu öne sürülmektedir (3). Ancak, lenfoid doku tümörlerinde BCL-6 gen bölgesinde yapısal bir bozukluk saptanmasına karşın, normal boyutlarda BCL-6 mRNA'nın aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir (5,9). Kodlayıcı sekanstaki mutasyonların da bu genin deregülasyonunda önemli katkısı olmadığı bildirilmektedir (10). Buna göre, BCL-6 ekspresyonunu etkileyen başka mekanizmalar olmalıdır. BCL-6 geninde yapısal değişikliklerinin yanısıra, ekspresyonunun mRNA ve protein düzeyinde incelenmesi biyolojik aktivasyonunun değerlendirilmesinde ya-

rarlı olacaktır. Bu konuda, İngilizce kaynaklarda, çoğunlukla lenfoid doku ve tümörlerinde yapılmış araştırmalar olup (2-20), ulaşılabildiği kadarıyla Türkçe kaynaklarda bildirilen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı, BCL-6 geninin, lenfoid tümörler yanısıra, çeşitli normal dokular ve malign epitelyal tümörlerde biyolojik aktivitesini değerlendirmek üzere mRNA düzeyinde ekspresyonunu araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada Bjab kültür B hücrelerine ait insan BCL-6 mRNA ve komplementer DNA sekansları gen bankasından (accession no:U00115) sağlandı. RNA folded software programı ile elde edilen mRNA'nın sekonder yapısı üzerinde segment analizi yapıldı. Bu analiz doğrultusunda polimeraz zincir reaksiyonu testi sırasında annealing fazında reaksiyona açık olması beklenen mRNA segmentlerine komplementer olan primer sekansları hazırlandı. Bu çalışmada kullanılan primer sekansları: Sens 5' AGCCAACCTGAAAACCCACACTCG 3', Antisens 5' CTGTACAAAT CTGGCTCCGCAGG 3' olup, oligonükleotidlerin sentezi Beckman Oligo 1000 DNA synthesizer (Beckman Instruments, CA) da yapıldı. Oligonükleotidler kullanılabildiği dek -80°C'de saklandı. Öncelikle Raji (Burkitt lenfoma) kültür hücre dizisinde Guanidinium-cesium chloride metodu ile total RNA ekstraksiyonu yapıldı (21). RT-PCR testi için rTth DNA polimeraz kit (Perkin Elmer Cetus, Inc.Norwalk, CT) kullanıldı. Revers transkripsiyon buffer (10mM Tris-HCL, 90 mM KCL, pH 8,3) ve H₂O içeren sterilize bir tüp içerisine her biri 200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP konuldu. Tüp içerisine 2 µl (250ng) total RNA ve 2 µl (50 µM) antisens primer eklendi. Karışımın üzeri 60 µl mineral yağı ile örtüldü. Tüpteki karışım RNA denatürasyonu için 94°C'de 2 dk ısıtıldı. Sonra, karışım 1 dk süre ile 65°C'de soğutuldu. Revers transkripsiyonu başlatmak üzere tüplere 2 µl (10µM MnCl₂) ve 2µl rTth DNA polimeraz eklendi ve 75°C'de 5 dk inkübe edildi. Revers transkripsiyon, 75°C'de ısıtılmış chelating MnCl₂ eklenerek durduruldu. Oluşan komplementer DNA template denatürasyonu için karışım 1 dk 94°C'de tutulduktan sonra tüp içerisine 2 µl (50µM) sens primer ve 8 µl 25 mM MgCl₂ eklenerek 65°C'de 1 dk inkübe edildi. Bu karışıma ikinci komplementer DNA dizisinin sentezi için 3 dk 75°C'de inkübasyon uygulandı. Temp Tronic thermocycler (Thermolyne, Dubuque, IA) 35 siklusk bir amplifikasyon oluşturmak üzere, denatürasyon için 94°C'de 1 dk, annealing için 65°C'de 1 dk ve polimerizasyon için 75°C'de 1 dk'lık inkübasyonlar olacak biçimde

programlandı. Total reaksiyon volümü 100 µl idi. Thermocycling işlemi tamamlandıktan sonra reaksiyon karışımından alınan 25 µl, %2'lik (w/v) agaroz üzerinde elektroforez ile analiz edildi. Agoroz jelde ethidium bromide ile boyanan DNA bandlarının parlak floresansı pozitif filmde koyu bandlar olarak görüntülendi. RT-PCR testinde 82 baz çifti içeren beklenen boyutta amplifikasyon ürünü görüldü. Uygulanan RT-PCR analizinin BCL-6 RNA'sına spesifikliğı test edildi. Bundan sonra bir otopsi olgusunun kalp, akciğer, karaciğer, dalak, böbrek, ince barsak, çizgili kas, beyin, lenf düğümü ve tümöral ovarian dokudan alınan doku örnekleri ile MC116 (Burkitt lenfoma), U937 (histiyositik lenfoma), IM9 (myeloma), JURKAT (T hücreli lenfoma), ZR-75-1 (duktal meme karsinom), H596 (akciğer adenoskuamöz karsinom), Hep3 ve Hep G2 (hepatosellüler karsinom), HeLa (serviks karsinomu) kültür hücre dizilerinden RNA ekstraksiyonu yapıldı. Kültür hücre dizileri Amerikan doku kültür hücre koleksiyonundan sağlandı. Yukarıdaki RT-PCR protokolü ile normal organ dokuları ile kültür hücrelerinde BCL-6 mRNA ekspresyonu araştırıldı. Pozitif kontrol olarak Raji kültür hücre RNA'sı kullanıldı.

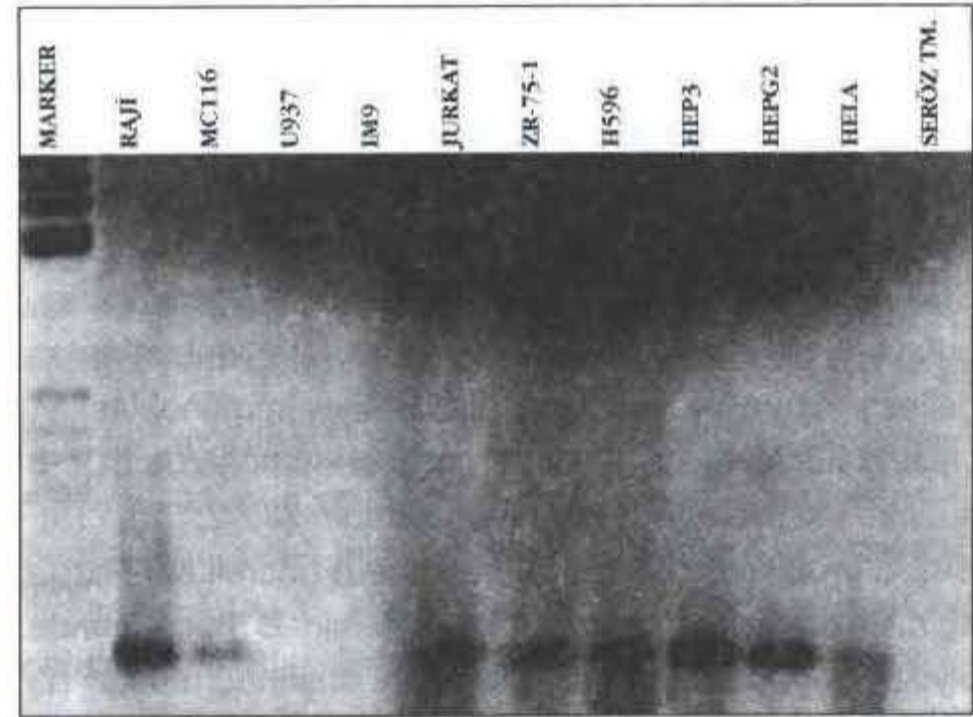


Resim 1. BCL-6 mRNA'nın normal organ dokularında ekspresyonu.

Bulgular

Otopsi olgusunun normal organ dokularında BCL-6 mRNA ekspresyonu RT-PCR ile kalitatif olarak değerlendirildiğinde: ince barsak, dalak, akciğer, beyin, karaciğer, çizgili kas ve lenf düğümünde değişik düzeyde boyanma gösteren tek ve beklenen boyutta (82 baz çifti) amplifikasyon ürünleri görüldü. Bu dokularda amplifikasyon ürünlerinin görülmesi, BCL-6 mRNA ekspresyonu olduğunu gösterdi. Kalp, böbrek ve kalın barsak dokularında amplifikasyon görülmedi (Resim 1).

Lenfoid ve lenfoid olmayan tümör kültür hücre dizilerinde yapılan kalitatif değerlendirmede: MC116 (Burkitt lenfoma), JURKAT (T hücreli lenfoma), ZR-75-1 (meme duktal karsinom), H596 (akciğer adenoskuamöz karsinom), Hep 3 ve Hep G2 (hepatosellüler karsinom), HeLa (serviks karsinom) hücrelerinde beklenen boyutta ve tek olarak değişik boyanma kuvvetinde amplifikasyon ürünleri görüldü. U937 (histiyositik lenfoma), IM9 (myeloma) ve otopsi olgusuna ait ovarium seröz tümöründe BCL-6 mRNA ekspresyonu saptanmadı (Resim 2).



Resim 2. BCL-6 mRNA'nın lenfoid ve lenfoid olmayan tümörlerde ekspresyonu.

Tartışma

Multisellüler bir organizmada değişik hücre türlerinde yapı ve fonksiyon ayırımı gösterir. Organizmada tüm hücreler aynı genoma sahip olmakla birlikte, hücrelerin diferansiyasyonları sırasında, genlerde seçici kayıpların olmasından çok, genellikle gen ekspresyonundaki değişikliklerin rolü olduğu düşünülmektedir. Gen ekspresyonu DNA, RNA ve protein seviyelerinde regüle olup, kontrol altındadır. Çoğu gen için, RNA transkripsiyonunun başlaması gen ekspresyonunun en önemli aşamasıdır. Gende ne zaman ve hangi sıklıkta transkripsiyon olacağı kontrol altında olup, transkripsiyon, genleri regüle eden proteinlerce başlatılır ve sona erdirilir. Bir gen ile ilgili regülatör protein, çeşitli nedenlerle eksprese edilebilir ve pek çok genin regülasyonu ile ilişkili olabilir (22).

BCL-6 proteini bir transkripsiyon regülatörü olup, çeşitli genlerin transkripsiyonunda rolü olduğu ileri sürülmektedir (13). Bu gen ve ürünlerinin ekspresyonuna yönelik çalışmaların hemen tümü lenfoid dokularda yapılmış olup, bu çalışmalarda, BCL-6 proteinin normal germinal merkez B hücreleri (7, 13, 17) ve bu hücrelerden gelişen lenfomalarda kuvvetli olarak eksprese edildiği gösterilmiştir (7, 13-15, 17). Germinal merkez hücreleri dışında, marjinal zonda az sayıda B hücresinde, mantle zonda yer alan T hücrelerinin %24-26'sı ve parakortikal zondaki T hücrelerin %10-16'sında (13-15), genellikle CD4+ hücrelerde ve interfolliküler mesafedeki büyük CD30+ hücrelerin bir kısmında (7,19) BCL-6 protein ekspresyonu görülebilmektedir. Pro-B hücreler ve bunlardan gelişen lösemiler ile, daha diferansiye immünoblastlar, plazma hücreleri ve bunlardan gelişen tümörlerde BCL-6 protein ekspresyonu bulunmamaktadır (3, 7, 10, 13). BCL-6 proteininin bazı B hücreler ve B hücreli NHL'larda ağırlıklı olarak bulunması, bu proteinin B hücrelerinde biyolojik bir fonksiyonu olabileceğini düşündürmüştür (7, 13, 14).

BCL-6 geni, NHL'larda translokasyonun sıkça görüldüğü 3q27 gen bölgesinde lokalizedir (2-5). Diffüz, büyük B hücreli NHL'ların %28,6-45'inde (5, 13, 16), folliküler lenfomaların %5-25'inde (5, 13), mikst büyük ve küçük hücreli NHL'ların %10-50'sinde (9, 10) ve 39 T hücreli NHL'lı olgudan sadece 1'inde (5) bu gende yeniden düzenlenme gösterilmiştir. Gen yapısındaki bu değişikliklerin BCL-6 ekspresyonunda deregülasyona ve bunun da lenfoma gelişimine katkısı olabileceği öne sürülmektedir (7,8,14). Diffüz büyük B hücreli ve folliküler NHL'lı

olgularda gen yeni düzenlenmesinin olduğu olgularda, aşırı BCL-6 mRNA ya/ya da protein ekspresyonu gösterilirken (13), kimi çalışmalarda BCL-6 ekspresyonunun, 3q27 anomalisi ya/ya da gen yeniden düzenlemelerinden bağımsız olduğu ve BCL-6 geninde deregülasyonun aberran doku ekspresyonuna neden olmadığı ortaya konmuştur (10, 15, 17). BCL-6 geninde kodlayıcı sekans intakt kaldığından (3, 11) bu gende oluşan bozukluklar protein yapısına yansımamaktadır (10, 17). Dolayısı ile BCL-6 protein ekspresyonunun bu gende lezyon olduğunu göstermedeki değerinin sınırlı olduğu düşünülmektedir (7, 14).

NHL'larda, BCL-6 ekspresyonu patterni, genellikle, geliştikleri normal hücrelerdekine benzer (13, 17, 19). Folliküler NHL'larda, orijin aldıkları normal germinal merkez B hücreleri gibi, BCL-6 protein ekspresyonu yüksek seviyelerde saptanmıştır (13). Diffüz büyük B hücreli NHL'larda ise BCL-6 ekspresyonu gösteren hücre sayısı ve şiddeti değişken bulunmuş, ancak, en kuvvetli ekspresyonun gende yeniden düzenleme gösteren olgularda olduğu saptanmıştır (17). Burkitt lenfoma olgularında da BCL-6 mRNA ve protein ekspresyonu bildirilmektedir (13, 15, 23). Matür B hücrelerinden köken alan Burkitt lenfomada, BCL-6 ekspresyonu reaktif germinal merkez hücrelerine benzerdir (23). Burkitt lenfoma olgularında çoğunlukla BCL-6 geninde yeniden düzenlenme saptanmamış (3, 13, 16) olup, 3q27 anormalliği olan (MD901) ve olmayan çeşitli Burkitt lenfoma (Raji, Ramos, Daudi, EB3) hücre dizilerinde Northern blot analiz ile RNA seviyesinde (normal boyutlarda) artmış BCL-6 ekspresyonu gösterilmiştir (4). Biz de RT-PCR yöntemi ile Burkitt lenfoma (Raji, MC116) hücre dizilerinde BCL-6 mRNA ekspresyonu saptadık. Bir çalışmada (18), Raji hücresindeki mRNA ekspresyonu normal organ dokuları ile karşılaştırılmış ve kantitatif olarak bir ayırım olmadığı görülmüştür. Raji hücresinde BCL-6 geni, mRNA ve protein düzeyinde (17) eksprese edilmektedir, ancak, protein ekspresyonunun kantitatif değerlendirilmesi yapılmamıştır.

Lenf düğümlerinde az oranda normal T hücrelerinde BCL-6 gen ekspresyonu gösterilmiştir (7, 13-15, 19). İnterfolliküler alanlarda büyük boyutlu CD30+ T hücrelerinde de BCL-6 ekspresyonu bulunmamaktadır (7, 19). CD30+ anaplastik T hücreli lenfomalarda (olguların %45'inde) BCL-6 protein ekspresyonu gösterildiğinden, CD30+ T hücreli lenfomaların, interfolliküler CD30+ ve BCL-6+ T hücrelerinden geliştiği düşünülmüştür (19).

Periferik T hücreli lenfoma, T hücreli kronik lenfositik lenfoma, prolenfositik lösemi, akut lenfoblastik lösemilerde ve mikozis fungoides olgularında bu genin RNA ya/ya da protein ekspresyonu saptanmamıştır (13, 15). T hücreli lenfoma ve lösemilerde bir olgu dışında (5) bu genin yeniden düzenlenme görülmemiştir (9, 10). Bu çalışmada da T hücreli (JURKAT) NHL hücre dizisinde BCL-6 mRNA ekspresyonu gösterildi. Bu hücre dizisinin histopatolojik ve immünofenotipik özellikleri bilinmemektedir. Bizim ve diğer çalışmaların sonuçları BCL-6 geninin, T hücreli lenfomaların bazı tiplerinde ekspresyon edildiği yönündedir. Kaynaklarda, BCL-6 gen ve ürünlerinin ekspresyonunun araştırıldığı T hücre neoplazili olan olgu sayısı az olup, daha geniş dizi çalışmaları gereklidir.

Lenfoid dokularda plazma hücreleri, germinal merkezdeki makrofaj, doku histiyosit ve monositlerinde BCL-6 ekspresyonu görülmemektedir (7, 15). B hücre diferansiyasyonunun son basamağı olan plazma hücrelerinde, downregüle edilmesi sonucu BCL-6 mRNA ve protein ekspresyonunun olmadığı düşünülmektedir. Myelomada BCL-6 geninde yeniden düzenlenme saptanmamış olup, köken aldığı plazma hücrelerinde olduğu gibi BCL-6 gen ekspresyonu görülmemektedir (9, 10, 13). Yalnız bir olguda çok zayıf mRNA ekspresyonu bildirilmiştir (13). Histiyositik lenfomada (U937) da RNA ve protein ekspresyonuna rastlanmamıştır (7, 10). Biz de bu çalışmada, geliştikleri normal hücrelerde olduğu gibi, myeloma (IM9) ve histiyositik lenfoma (U937) hücre dizilerinde BCL-6 mRNA ekspresyonu saptamadık. Bulgularımız, BCL-6 geninin bu neoplaziler ve geliştikleri normal hücrelerde biyolojik aktivasyonu olmadığını düşündürmektedir.

Kaynaklarda lenfoid doku dışı normal organ dokularında BCL-6 gen ve ürünlerinin ekspresyonunun değerlendirildiği az sayıda çalışma bulunmaktadır (4, 18, 24). Northern blot analizi ile bir çalışmada timus, kalp, tonsil, akciğer, karaciğer, dalak, pankreas, böbrek, beyin, çizgili kas ve plasenta dokularında BCL-6 RNA transkripti gösterilmiştir (4, 18). Normal beyin, karaciğer, çizgili kas, dalak, timus ve tonsil dokularında, Northern blot analizi ile RNA ekspresyonunda, kantitatif olarak önemli düzeylerde farklılıklar görülmemiştir (18). Kendi çalışmamızda RT-PCR analizi ile lenf nodu dışında çizgili kas, akciğer, karaciğer, dalak, ince barsak ve beyin dokularında BCL-6 mRNA ekspresyonu gösterildi. Northern-blot analiz çalışmalarında RNA transkripti gösterilmesine karşın (4), kendi çalışmamızda RT-PCR ile kalp ve

böbrekte mRNA ekspresyonu saptanmamıştır. Ancak bu organlarda, ilaveten, BCL-6 geninin başka bölgelerine ait mRNA ekspresyonunun olup olmadığı incelenmelidir. Kantitatif analizi yapılamamış olmakla birlikte, ekspresyon saptanan dokularda elde edilen amplifikasyon bantlarının boyanma kuvvetindeki ayırım çok belirgin değildi. En kuvvetli amplifikasyon çizgili kas ile akciğer dokusunda görüldü. Normal akciğer dokusunda saptadığımız RNA ekspresyonunun, bu organda da bulunabilen lenfoid dokuya mı yoksa diğer hücrelere mi ait olduğu bilinmemektedir. Kaynaklarda da çizgili kas dokusunda RNA düzeyinde yüksek düzeylerde BCL-6 ekspresyonu bildirilmektedir (18). İmmün dokukimyasal çalışmalarda, BCL-6 proteininin tonsil, timus ve derinin çok katlı yassı epitel hücrelerinde ekspresyon edildiği, ancak, tiroid, karaciğer, böbrek ve çizgili kas dokularında bu genin protein düzeyinde ekspresyonu olmadığı saptanmıştır (14, 15). Çalışmamızda, ince barsak dokusunda BCL-6 mRNA ekspresyonu görülürken, kalın barsak dokusunda saptanmamıştır. İnce barsaklarda lamina propria B ve T hücreleri, kalın barsakta ise çok az B, çoğunlukla T hücreleri bulunmaktadır (25-27). Bu çalışmada ince barsaklarda saptanan BCL-6 mRNA ekspresyonu, lamina propria bulunan B hücrelerine ait olabilir. Kalın barsakta mRNA ekspresyonunun görülmemiş olması, bu barsak segmentindeki lenfoid hücrelerin hemen tümünün T hücreler olması ile açıklanabilir. İmmün dokukimyasal bir çalışmada (7), gastrointestinal sistem lenfoid hücrelerinde BCL-6 protein ekspresyonu görülmediği bildirilmektedir.

Normal dokularda BCL-6 geninin mRNA ve protein ekspresyonunun regülasyonunda işleyen mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemektedir. B hücre aktivasyonu sırasında BCL-6 ekspresyonunun değerlendirildiği bir çalışmada (18); dinlenme durumundaki B hücreleri ile germinal merkez hücrelerinde BCL-6 mRNA'nın benzer düzeylerde olduğu gösterilirken, kantitatif olarak yapılan Western blot analizinde, dinlenme durumundaki B hücrelere göre, germinal merkez hücrelerinde BCL-6 protein düzeyinin 3 ila 34 kat yüksek olduğu saptanmıştır. Bu iki hücre popülasyonunda BCL-6 mRNA düzeylerinin benzer olmasına karşın, protein düzeyindeki ayırım nedeniyle, BCL-6 ekspresyonunun, primer olarak, o andaki mRNA düzeyindeki değişikliklerden çok, translasyon ve translasyon sonrası mekanizmalarca regüle olduğu öne sürülmüştür. Kaynaklarda ve kendi çalışmamızdaki bulgulara göre, kimi normal dokularda,

örneğin; karaciğer, böbrek ve çizgili kas dokularında RNA ekspresyonu gösterilmesine karşın, protein ekspresyonunun bulunmaması; BCL-6 protein ekspresyonunun, translasyon ve sonrası aşamalarında regüle olduğu görüşünü (18) desteklediği gibi, diğer taraftan, bu bulgular, yapı ve fonksiyonu normal olan wild türde BCL-6 proteininin, normal hücrelerde yaşamının kısa olması ya da immün dokü kimyasal olarak saptanamayacak ölçüde düşük düzeylerde olmasından kaynaklanabilir.

Kaynaklarda bir kaç çalışmada, lenfoid olmayan dokulardan gelişen solid tümörlerde BCL-6 gen ve ürünlerine yönelik kimi veriler bildirilmektedir. Kimi solid tümörlerde (tümör türü verilmemiştir), BCL-6 geninde gen yeniden düzenlenmesi araştırılmış, ancak saptanmamıştır (8). Adenokarsinom hücre dizilerinde, zayıf mRNA ekspresyonu gösterilirken, protein ekspresyonuna rastlanmamıştır (24). Bir çalışmada (24), papilloma ve keratoakantoma gibi epidermis kökenli tümörlerin, orijin aldıkları epitel katı hücrelerini öykünürcesine BCL-6 ekspresyonu gösterdikleri, çok katlı yassı epitel hücreli karsinomlarda ve kültür hücre dizilerinde daha çok diferansiye olanlarda mRNA ve protein ekspresyonu görüldüğü bildirilmektedir. Bu tümörlerde, BCL-6 gen ekspresyonunun, morfolojik diferansiyasyon ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Kendi çalışmamızda, hepatosellüler karsinoma (Hep 3, Hep G2), akciğer adenokarsinom (H596), meme (ZR-75-1) ve serviks karsinomu (HeLa) hücre dizilerinde BCL-6 mRNA ekspresyonu görüldü. Bir diğer çalışmada HeLa hücre dizisinde, Northern-Blot analizi ile, düşük düzeyde BCL-6 RNA ekspresyonu saptanmıştır (18). Çalışmamızda da, HeLa hücre dizisinde amplifikasyon bant kuvveti oldukça düşüktü. Kaynaklarda, diğer mRNA ekspresyonu saptadığımız tümör hücreleri ile ilgili bir veriye rastlanmamıştır. Otopsi olgusuna ait seröz ovaryum tümöründe, bu genin mRNA ekspresyonu yoktu. Çeşitli epitelyal tümör hücre dizilerinde olduğu halde, ovaryum seröz tümöründe ekspresyonunun gösterilememiş olması, bu genin, kimi epitelyal tümör türlerinde biyolojik aktivitesinin olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışmada normal meme, serviks epitel ve seröz epitelde BCL-6 mRNA

ekspresyonu değerlendirilemediğinden, tümörleri ile bir karşılaştırma yapılamadı. Buna karşın, hepatosellüler karsinom hücre dizisinde normal karaciğer dokusunda olduğu gibi mRNA ekspresyonu vardı.

Sonuç olarak, bu çalışmada, oldukça duyarlı bir yöntem olan RT-PCR ile, BCL-6 gen ekspresyonunun çeşitli normal dokular, lenfoid tümörler ve bunların dışında pek çok epitel kaynaklı malign tümör hücre dizilerinde bulunduğunu saptadık. Bulgularımıza göre, BCL-6 geninin, normal ve kimi tümöral dokularda biyolojik olarak aktif olduğu sonucuna varıldı. Ancak, BCL-6 geninin normal ve tümöral dokulardaki biyolojik fonksiyonları henüz bilinmemektedir. BCL-6 geninin biyolojik fonksiyonunun araştırıldığı bir çalışmada (28); proteininin POZ domaininin transkripsiyonda represör etkisi olduğu ortaya konmuştur. BCL-6 wild tip proteinin aşırı ekspresyonu ve normal fonksiyonlarının bozulması ile transformasyonun geliştiği düşünülmektedir (28). Bir protoonkogen olduğu varsayılan BCL-6 geni, transkripsiyonu regüle edici etkisi ile tümöral hücrelerde de fonksiyonel olarak aktive olup, pek çok tümörün gelişiminde benzer mekanizmalarla rol oynayabilir düşüncesindeyiz. Seyfert ve ark. (28), BCL-6 proteininin direkt ya da indirekt olarak genel transkripsiyonel mekanizmalarla etkileşip, DNA'nın transkripsiyon aktivatörlere yanıtını modifiye ederek bazı hedef genlerin; belki de bu gen bir tümör süpresör genidir, transkripsiyonu üzerinde anormal bir represör etki oluşturarak transformasyona neden olabileceğini ileri sürmektedir. BCL-6 geni hangi genlerin transkripsiyonunu etkilemektedir? BCL-6 gen ekspresyonunun regülasyonunda normal ve tümöral dokularda etkili mekanizmalar nelerdir? gibi soruların yanıtları bilinmemektedir. Bu gen ekspresyonunun, neoplastik transformasyondaki rolünü belirlemek için, değişik tümörlerde sitogenetik ve moleküler analizlerle birlikte, mRNA ve protein ekspresyonunun birlikte değerlendirildiği ve bunların normal dokularla karşılaştırıldığı çalışmaların sürdürülmesi, BCL-6 geninin onkogenezdeki rolü ve tanısal öneminin değerlendirilmesinde yardımcı olacaktır.

Kaynaklar

1. Rabbits TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372: 143-149.
2. Ye BH, Rao PH, Chaganti RSK, Dalla-Favera R. Cloning of bcl-6, the locus involved in chromosome translocations affecting band 3q27 in B-cell lymphoma. *Cancer Res* 1993; 53: 2732-2735.
3. Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offit K, Chaganti RSK, Dalla-Favera R. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large cell lymphoma. *Science* 1993; 262: 747-750.
4. Miki T, Kawamata N, Arai A, Ohashi K, Nakamura Y, Kato A, Hirose S, Aoki N. Molecular cloning of the breakpoint for 3q27 translocation in B-cell lymphomas and leukemias. *Blood* 1994; 83: 217-222.

5. Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, Lenormand B, Rossi A, Pezzella F, Fruchart C, Duval C, Monconduit M, Tilly H. LAZ-3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: Correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. *Blood* 1994; 83: 2423-2427.
6. Deweindt C, Kerckaert JP, Tilly H, Quief S, Nguyen VC, Bastard C. Cloning of a breakpoint cluster region at band 3q27 involved in human non-Hodgkin's lymphoma. *Genes Chrom Cancer* 1993; 8: 149-154.
7. Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, Louie DC, Offit K, Chaganti RSK, Dalla-Favera R. BCL-6 protein is expressed in germinal center B cells. *Blood* 1995; 86: 45-53.
8. Migliazza A, Ye BH, Martinotti S, Fusco C, Offit K, Chaganti RSK, Dalla-Favera R. Mutations of the 5' non-coding region of BCL-6 in non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 1994; 10s: 40a.
9. Lo Coco F, Ye BH, Corradini P, Offit K, Knowles DM, Chaganti RSK, Dalla-Favera R. Rearrangements of the BCL-6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1994; 83: 1757-1759.
10. Otsuki T, Yano T, Clark HM, Bastard C, Kerckaert, Jaffe ES, Raffeld M. Analysis of LAZ3(BCL-6) status in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: Results of rearrangement and gene expression studies and a mutational analysis of coding region sequences. *Blood* 1995; 85: 2877-2884.
11. Kerckaert JP, Deweindt C, Tilly H, Quief S, Lecocq G, Bastard C. LAZ3 a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosomal 3q27 translocations in human lymphomas. *Nature Genet* 1993; 5: 66-70.
12. Offit K, Lo Coco F, Louie DC, Parsa NZ, Leung D, Portlock C, Ye BH, Lista F, Filippa D, Rosenbaum A, Ladanyi M, Jhanwar S, Dalla Favera R, Chaganti RSK. Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large cell lymphoma. *N Eng J Med* 1994; 331: 74-80.
13. Onizuka T, Moriyama M, Yamochi T, Kuroda T, Kazama A, Kanazawa N, Sato K, Kato T, Ota H, Mori S. BCL-6 gene product, a 92- to 95-Kd nuclear phosphoprotein, is expressed in germinal center B cells and their neoplastic counterparts. *Blood* 1995; 86: 28-37.
14. Flenghi L, Ye BH, Fizzotti M, Bigerna B, Cattoretti G, Venturi S, Pacini R, Pileri S, Lo Coco F, Pescarmona E, Pelicci PG, Dalla-Favera R, Falini B. A specific monoclonal antibody (PG-B6) detects expression of the BCL-6 protein in germinal centers B cells. *Am J Pathol* 1995; 147: 405-411.
15. Flenghi L, Bigerna B, Fizzotti M, Venturi S, Pasqualucci L, Pileri S, Ye BH, Gambacorta M, Pacini R, Baroni CD, Pescarmona E, Anagnostopoulos I, Stein H, Asdrubali G, Martelli MF, Pelicci PG, Dalla-Favera R, Falini B. Monoclonal antibodies PG-36a and PG-B6p recognize, respectively, a highly conserved and a formol resistant epitope on the human BCL-6 protein amino-terminal region. *Am J Pathol* 1996; 148: 1543-1555.
16. Pescarmona E, Lo Coco F, Pacchiarotti A, Rapanotti MC, Cimino G, Di Paolo B, Baroni CD. Analysis of the BCL-6 gene configuration in diffuse B-cell non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. *J Pathol* 1995; 177: 21-25.
17. Pittaluga S, Ayoubi TAY, Wlodarska I, Stul M, Cassiman JJ, Mecucci C, Van Den Berghe H, De Wolf-Peters C. BCL-6 expression in reactive lymphoid tissue and in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol* 1996; 179: 145-150.
18. Allman D, Jain A, Dent A, Maile RR, Selvaggi T, Kehry MR, Staudt LM. BCL-6 expression during B cell activation. *Blood* 1996; 87:5257-5268.
19. Carbone A, Gloghini A, Gaidano G, Dalla-Favera R, Falini B. BCL-6 protein expression in human peripheral T-cell neoplasms is restricted to CD 30+ anaplastic large cell lymphomas. *Blood* 1997; 90: 2445-2450.
20. Liang R, Chan WP, Kwong YL, Xu WS, Srivastava G, Ho FCS. High incidence of BCL-6 gene rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma of primary gastric origin. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 97: 114-118.
21. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18: 5294-5299.
22. Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell*. 3th ed. New York: Garland Publishing, 1994; 401-415.
23. Spina D, Leoncini L, Megha T, Gallorini M, Disanto A, Tosi P, Abinya O, Nyong 'o A, Pileri S, Kraft R, Laisue JA, Cottier H. Cellular kinetic and phenotypic heterogeneity in and among Burkitt's and Burkitt-like lymphomas. *J Pathol* 1997; 182:145-150.
24. Kanazawa N, Moriyama M, Onizuka T, Sugawara K, Mori S. Expression of bcl-6 protein in normal skin and epidermal neoplasms. *Pathol Internat* 1997; 47: 600-607.
25. Segal GH, Petras RE. Small intestine. In: Sternberg SS, editor. *Histology for Pathologist*. First ed. New York: Raven Press, 1992; 554.
26. Levine DS, Haggitt RC. Colon. In: Sternberg SS, editor. *Histology for Pathologists*. First ed. New York: Raven Press, 1992; 577.
27. Owen DA, Kelly JK. Large intestine and anus. In: Damjanow I, Linder J, editors. *Anderson's Pathology*. 10th ed. Mosby: St.Louis, 1996; 1741.
28. Seyfert VL, Allman D, He Y, Staudt LM. Transcriptional repression by the protooncogene BCL-6. *Oncogene* 1996; 12: 2331-2342.

Yazışma Adresi:

Yrd. Doç. Dr. Serap Işıksöy
Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı
26 060 Eskişehir
