



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Clinical significance of T-cell clonality in mycosis fungoides and other cutaneous T-cell lymphomas**

Muche, J.M.

### **Citation**

Muche, J. M. (2010, May 20). *Clinical significance of T-cell clonality in mycosis fungoides and other cutaneous T-cell lymphomas*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15546>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/15546>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).



Summary / Samenvatting



## **Chapter 7 - Summary / Samenvatting**

### **7.1 Summary**

Primary cutaneous T-cell lymphomas represent a heterogeneous group of mature T-cell neoplasms, clinically originating in the skin and subsequently disseminating into lymph nodes, blood, and other visceral organs. The primary cutaneous occurrence of neoplastic cells distinguishes CTCL from histologically similar lymphomas that develop skin lesions as sign of metastatic dissemination. With a relative frequency of 44%, MF represents the most common entity of primary cutaneous lymphomas.

MF is characterized by a clonal proliferation of epidermotropic T-lymphocytes. By the use of Southern blotting, several studies detected circulating clonal T-cells only in some cases of advanced MF. Therefore, it was postulated that blood involvement is associated with poorer prognosis, lymph node involvement as well as an enlarged total body tumor burden. In contrast, frequent occurrence of multifocal or diffuse cutaneous MF lesions as well as the recirculatory behavior of T-cells support the hypothesis of an early occurrence of malignant T-cells in the peripheral blood.

The purpose of this thesis was to obtain more insight into T-cell clonality in the peripheral blood of patients suffering from MF. Frequency of peripheral blood T-cell clonality with regard to MF stage was analyzed in detail, and the identity of the T-cell clones detected in skin and blood of a given patient was determined. The prognostic relevance of simultaneous detection of clonal T-cells in peripheral blood and skin of MF patients was analyzed in extended studies with special emphasis for early stages. The linkage between clonal chromosomal aberrations indicating qualitative and functional alteration of the affected cells, and TCR clonality was addressed. In addition, the relation between genomic aberration and survival in CTCL was investigated. Finally, TCR clonality data obtained by our in-house PCR and the Biomed-2 protocol were compared with special regard to sensitivity, specificity and match of the outcomes.

#### **Occurrence of circulating clonal T-cells in mycosis fungoides.**

Using a sensitive TCR $\gamma$  PCR/ HD-TGGE system to investigate a large cohort of well-classified CTCL, we identified circulating clonal T-cells in 45/69 (65%) patients with MF and other CTCL, including high frequencies in MF IA (6/13) and IB (15/27). In a second study, we verified the early occurrence of circulating clonal T-cells by a more objective TCR $\gamma$  PCR/ FFA assay detecting peripheral blood T-cell clones in 8/18 (44%) MF IA and 19/39 (49%) MF IB patients. However, the identity of blood and cutaneous T-cell clone remained controversial. By comparison of gradient gel migration patterns and sequencing of the clonal TCR $\gamma$  rearrangements, we proved the identity of circulating and cutaneous T-cell clone in 14/17 MF stage I patients with detectable peripheral blood T-cell clonality (first study). FFA, providing exact size assessment of the (frequently biallelic) clonal TCR $\gamma$  rearrangement, was applied in the second study for a more objective assessment of this identity: Corresponding T-cell clones in skin and blood were identified in 22/29 MF stage I patients bearing a peripheral blood T-cell clone.

These data clearly indicate an early dissemination of the neoplastic T-cell clone into both compartments, skin and blood, as expected from the clinical impression that skin lesions occur multifocally already at early stages of MF. In our opinion, this phenomenon is rather a sign of the

physiological recirculation of skin-homing T-cells and the term systemic disease should be reserved for cases in which the neoplastic cells have lost their affinity to the skin.

Nevertheless, in a total of 10/93 (11%) MF stage I patients investigated by us, the peripheral blood T-cell clone differed from the cutaneous clone. Circulating clonal T-cell populations were also detected in 3/8 autoimmune collagen disorders, 9/39 (23%) non-lymphoma skin cancer and 5/38 (13%) healthy volunteers. Their occurrence was independent of the donor's age and not related with malignant lymphoproliferation, retroviral infections or idiopathic CD4 lymphopenia. Since the nature of this phenomenon remained speculative, we suggested the term T-cell Expansion of Undetermined Significance (TExUS) in analogy to monoclonal gammopathy of undetermined significance. Although at a rather low frequency, TExUS is even found in (cutaneous) lymphoma patients and should be considered when assessing the T-cell clonality in peripheral blood samples.

#### **Prognostic relevance of circulating clonal T-cells in mycosis fungoides.**

The detection of circulating clonal T-cells in MF has been associated with a worse prognosis. Our group could not confirm this association when investigating two different cohorts of MF stage I/II patients for progression in TNM stage by TCR $\gamma$  PCR/ HD-TGGE (n=67) and, respectively, by TCR $\gamma$  PCR/ FFA (n=64). In our first study comparing the frequency of PCR positive cases within the progressing and non-progressing group, significant differences between both groups were found neither after 2 months nor after 1, 2, 3 and 4 years of observation. In the second study, univariate analysis identified age of >60y and detection of a peripheral blood T-cell clone identical to the cutaneous clone to be of prognostic relevance. Although multivariate analysis was not possible in our cohort, further stratification clearly indicated an age of >60y to be the predominating prognostic factor, since all patients at the age of  $\leq$ 60y did not progress at TNM stage, irrespective of the state of peripheral blood T-cell clonality. Detection of peripheral blood T-cell clonality non-related to the cutaneous clone, sex, TNM stage at initial diagnosis, and detection of a cutaneous T-cell clone were even irrelevant.

To our opinion, the detection of circulating clonal T-cells in MF is rather a problem of sensitivity than a prognostic marker. The increasing frequency of PCR positive cases during the course of the disease might indicate an increase in the number of circulating clonal T-cells in more advanced stages. Quantification of circulating clonal T-cells might help to determine that amount of neoplastic T-cells in the peripheral blood, which has a prognostic significance. Purely qualitative investigation of T-cell clonality in blood samples at the initial diagnosis of MF cannot predict the clinical course of the disease.

#### **Correlation between T-cell clonality and genetic aberrations in CTCL.**

To investigate the correlation between T-cell clonality and genetic aberrations, we firstly explored the coexistence of clonal chromosomal abnormalities and TCR clones in 41 samples from skin, blood, or lymph nodes of 17 CTCL patients. In 30/34 (88%) specimens, corresponding results were found. Of the four divergent specimens, all were derived from peripheral blood and were clonal by TCR PCR analysis only. Analysis of micro-dissected cells in two patients demonstrated a single neoplastic T-cell to bear both, a dominant TCR rearrangement and a complex chromosomal aberration. In addition, the combined analysis confirmed identity of T-cell clones in skin and blood, and persistence of the

initial TCR/chromosomal clone in 11/14 (79%) patients despite therapy and complete clinical remission. In our second study, we were interested in presence and prognostic significance of chromosomal imbalances in CTCL. By comparative genomic hybridization, chromosomal imbalances were detected in 21 of 32 CTCL patients (66%). Euchromatic loss (dim) was localized most frequently (>16%) at the chromosomal regions 17p (28%), 13q (25%), 6q (19%), and 10q (16%), and gain of chromatin (enh) at 7 (25%), 8q (25%), and 17q (16%). The pattern dim6q–enh7–enh8–dim13 was the most frequent combination. The number of aberrations per tumor sample correlated with clinical tumor stages: from none in stage IA to  $8.75 \pm 1.8$  (mean  $\pm$  SEM) in stage IVA. Imbalances occurred more frequently in aggressive subtypes ( $9.33 \pm 2.16$ ) than in indolent ( $2.88 \pm 0.8$ ) subtypes. A high number of chromosomal imbalances ( $\geq 5$ ) was associated with shorter survival. Gain of chromatin in 8q and loss of 6q and 13q correlated with a significantly shorter survival, whereas the most frequently observed aberrations (loss in 17p and gain in 7) did not influence the prognosis.

In summary, complex chromosomal aberrations in CTCL arise exclusively in clonally expanded T-lymphocytes. Parallel chromosomal analysis confirmed previous TCR data demonstrating an early dissemination of the T-cell clone to skin and blood. Although a consistent pattern of chromosomal alteration is still unidentified, characteristic combinations of aberrations (enh7–dim13q and dim6q–enh7–enh8q–dim13q) were found in a substantial number (24%) of our CTCL patients. Moreover, some (CTCL-specific) alterations (dim6q, enh8q, and dim13q) seem to be prognostically significant.

#### **Molecular biological findings in the light of the standardized Biomed-2 approach.**

To confirm our previous TCR PCR results, we applied the Biomed-2 TCR $\gamma$  and TCR $\beta$  PCR as well as our in-house TCR $\gamma$  PCR to a collection of 107 archival skin samples (84 CTCL, 3 systemic T-cell lymphomas and 20 controls). In the CTCL samples, the Biomed-2 TCR $\gamma$  PCR revealed 81%, the in house TCR $\gamma$  PCR 86%, and the Biomed-2 TCR $\beta$  PCR 78% T-cell clonality. In the 20 control samples, the Biomed-2 TCR $\gamma$  PCR detected a T-cell clone in one sample, and the Biomed-2 TCR $\beta$  PCR in two samples. By the in-house TCR $\gamma$  PCR, all of the controls were non-clonal. Since both approaches revealed almost identical analytical sensitivities (2.5-10%, depending on the T-cell line), the (non-significant) differences in PCR outcomes are rather caused by different primer binding positions or primer-primer interactions in the more complex Biomed-2 PCR. Moreover, insufficient priming of the TCR gene segments due to germ line configuration, incomplete, deleterious or trans-rearrangements explains the general failure to detect clonality in the remaining 11 CTCL cases.

These data, by confirming diagnostic sensitivity and specificity of our in-house TCR $\gamma$  assay, verify our previously published findings on clonally expanded T-cells in CTCL. Nevertheless, the Biomed-2 TCR $\gamma$  protocol is currently highly recommended for routine analysis of CTCL to permit data comparability and exchange of experience in T-cell lymphoma diagnosis. However, (appropriate) predictive values have not been estimated for the Biomed-2 protocol and detection of T-cell clonality by PCR assays fails in a substantial portion of CTCL samples, but succeeds in various benign conditions. Thus, accurate integration of clinical, histomorphological, immunohistochemical data still represents the golden diagnostic standard. Demonstration of a T-cell clone only supplements the diagnosis of CTCL.



## 7.2 Samenvatting

Primaire cutane lymfomen representeren een heterogene groep van maligniteiten die uitgaan van rijpe T-cellen. Ze manifesteren zich primair in de huid voordat disseminatie optreedt naar lymfeklieren, bloed en viscerale organen. Door het primair ontstaan in de huid kunnen CTCL worden onderscheiden van pathologisch identieke lymfomen die de huid pas in een gevorderd stadium aantasten. Met een relatieve frequentie van 44% representeert de MF het prototype van CTCL.

MF is gekenmerkt door een klonale proliferatie van epidermotrope T-lymfocyten. Door middel van Southern blotting konden verschillende auteurs aantonen dat klonale T-cellen alleen in enkele gevorderde gevallen in het perifere bloed optreden. Zij concludeerden dan ook dat disseminatie naar het perifere bloed was geassocieerd met een slechte prognose, aantasting van lymfeklieren en een grote tumorlast. Het frequent optreden van multifocale en diffuse huidmanifestaties en de fysiologische recirculatie van T-cellen pleiten daarentegen voor een vroeg optreden van maligne T-cellen in het perifere bloed.

Het doel van dit proefschrift was om meer inzicht te krijgen in de T-cel klonaliteit van het perifere bloed van MF patiënten. De frequentie van de T-cel klonaliteit en de identiteit van de T-cel klonen in bloed en huid werden geanalyseerd in verschillende stadia van MF. De prognostische relevantie van het simultane aantonen van klonale T-cellen in bloed en huid werd bepaald met speciale aandacht voor de vroege stadia van MF. De link tussen klonale chromosomale afwijkingen die een kwalitatieve en functionele verandering van de betreffende cel aantonen, en de TCR klonaliteit werd onderzocht. Hiernaast werd ook de relatie tussen genomische alteraties en de prognose van CTCL benaderd. Tenslotte werd de door ons ontwikkelde methoden (TCR $\gamma$  PCR/ HD-TGGE en TCR $\gamma$  PCR/ FFA) vergeleken met het recent gepubliceerde Biomed-2 protocol.

### **Het optreden van circulerende klonale T-cellen bij mycosis fungoides.**

Middels de TCR $\gamma$  PCR/ HD-TGGE methode werd een groot cohort van CTCL onderzocht. Circulerende klonale T-cellen konden geïdentificeerd worden in 45/69 (65%) patiënten, waarvan 6/13 MF stadium IA en 15/27 MF stadium IB. In een 2<sup>e</sup> studie kon het vroege optreden van circulerende klonale T-cellen bevestigd worden door de objectieve TCR $\gamma$  PCR/ FFA methode. T-cel klonen in het bloed werden gevonden in 8/18 MF IA en 19/39 MF IB patiënten. Door de electroforese patronen van bloed- en huidmateriaal te vergelijken en door het bepalen van de sequentie van het klonale rearrangement kon de identiteit van de circulerende en de cutane kloon aangetoond worden in 14 van 17 MF I patiënten met een T-cel kloon in het perifere bloed. FFA, een methode die een exacte bepaling van de lengte van het klonale TCR gen toelaat, werd toegepast in een 2<sup>e</sup> studie: Corresponderende T-cel klonen in huid en bloed werden geïdentificeerd bij 22/29 MF I patiënten met een T-cel kloon in het perifere bloed.

Deze data tonen duidelijk aan dat de neoplastische T-cel kloon vroeg aanwezig is in de huid en in het bloed. Dit was te verwachten gezien het multifocaal optreden van huidmanifestaties in vroege stadia van MF. Ons inziens is dit fenomeen een teken van fysiologische recirculatie van huid-infiltrerende T-cellen. De term systemische disseminatie zou voorbehouden moeten worden voor gevallen waar de neoplastische T-cellen hun affiniteit met de huid verliezen.



Desalniettemin werd bij 10/93 (11%) van de door ons onderzochte MF I patiënten een T-cel kloon in het perifere bloed gevonden die niet identiek was met de cutane T-cel kloon. Circulerende klonale T-cel populaties werden ook aangetoond bij 3/8 patiënten met autoimmune kollagenosen, bij 9/39 (23%) patiënten met huidkanker (basaalcelcarcinoom, plaveiselcelcarcinoom, melanoom) and bij 5/38 (13%) gezonde proefpersonen. Het optreden van deze T-cel klonen was onafhankelijk van de leeftijd en niet gerelateerd aan maligne lymfoproliferaties, retrovirale infecties en idiopathische CD4 lymfopenie. Omdat geen oorzaak voor dit fenomeen gevonden kon worden hebben wij, in analogie met monoklonale gammopathie van onbekende significantie (MGUS), de term T-cell Expansion of Undetermined Significance (TExUS) geïntroduceerd. Hoewel TExUS zelden voorkomt bij (cutaan) lymfoom patiënten moet bij het uitvoeren van klonaliteitsanalyses in perifeer bloed met dit fenomeen rekening gehouden worden.

#### **De prognostische relevantie van circulerende klonale cellen bij mycosis fungoides.**

Sommige auteurs associëren het aantonen van circulerende klonale T-cellen bij MF patiënten met een ongunstige prognose. Wij konden een samenhang tussen het optreden van progressie in het TNM stadium en het aantonen van T-cel klonaliteit in het perifere bloed niet bevestigen in twee onafhankelijke studies. In de eerste studie (67 MF stadium I/II patiënten, TCR $\gamma$  PCR/HD-TGGE) werd de frequentie van gevallen met circulerende klonale T-cellen in de progressieve en de niet progressieve groep vergeleken. Een significant verschil tussen beide groepen kon niet aangetoond worden, noch na 2 maanden observatie noch na 1, 2, 3, of 4 jaar observatie. In een univariate analyse liet de tweede studie (64 MF stadium I/II patiënten, TCR $\gamma$  PCR/FFA) een prognostische significantie zien van een leeftijd >60 jaar en van het optreden van T-cel klonaliteit in het bloed. Echter, verdere stratificatie toonde een duidelijke voorkeur voor de leeftijd als prognostische factor: geen enkele patiënt <60 jaar toonde progressie, onafhankelijk van de status van de T-cel klonaliteit in het perifere bloed. Ook het optreden van klonale T-cellen in de huidlaesies, het geslacht en het TNM stadium tijdens de primaire diagnose waren irrelevant.

Ons inziens is het al dan niet aantonen van circulerende klonale T-cellen meer een probleem van de analytische sensitiviteit dan een prognostische marker. De toename van de frequentie van PCR-positieve gevallen in het beloop van de ziekte zou verklaard kunnen worden door een toename van het aantal circulerende klonale T-cellen in het bloed bij gevorderde stadia. Kwantificering van dit aantal zou kunnen leiden tot het vaststellen van een bovengrens met prognostische significantie. Het aantonen van circulerende klonale T-cellen tijdens de initiële diagnosestelling is op zichzelf geen prognostische marker.

#### **De correlatie tussen T-cel klonaliteit en genetische aberraties bij CTCL.**

In de eerste studie hebben wij de co-existentie van klonale chromosomale alteraties en TCR klonen onderzocht in 41 proeven van huid, bloed en lymfeklieren van 17 CTCL patiënten. In 30/34 (88%) proeven werden corresponderende uitslagen gevonden. Alle 4 divergente proeven kwamen uit het perifere bloed en waren uitsluitend klonaal in de TCR analyse. Een analyse op het niveau van een enkele cel bij twee patiënten toonde aan dat de klonale TCR rearrangement en de klonale chromosomale alteratie inderdaad in een en dezelfde cel voorkomen. Hiernaast kon dit onderzoek het optreden van identieke klonale cellen in huid en bloed bij CTCL patiënten bevestigen en werd aangetoond dat de initiale chromosomale kloon ondanks behandeling en complete klinische remissie

persisteerde bij 11/14 (79%) van de onderzochte CTCL patiënten. In de tweede studie werd het optreden en de prognostische relevantie van chromosomale imbalances bij CTCL patiënten onderzocht. Middels comparatieve genomische hybridisatie werden chromosomale imbalances gevonden bij 21/32 (66%) patiënten. Een euchromatisch verlies (dim) werd het vaakst (>16%) gevonden in de chromosomale regionen 17p (28%), 13q (25%), 10q (16%) en 6q (19%), een toename van chromatin (enh) bij 7 (25%), 8q (25%) en 17q (16%). Het patroon dim6q–enh7–enh8–dim13 was de meest voorkomende combinatie. Het aantal aberraties per tumor proef correleerde met het klinische stadium: Geen aberraties in stadium IA,  $8.75 \pm 1.8$  aberraties in stadium IVA. Imbalances traden vaker op in agressieve subtypen ( $9.33 \pm 2.16$ ) dan in indolente CTCL ( $2.88 \pm 0.8$ ). Een aantal van  $\geq 5$  chromosomale imbalances was geassocieerd met een korter overleven. Toename van chromatin in 8q en verlies in 6q en 13q correleerden eveneens met een significant korter overleven. Echter, de meest voorkomende aberraties (verlies in 17p en toename in 7) hadden geen invloed op de prognose.

Samenvattend kon in het chromosomen onderzoek aangetoond worden dat complexe chromosomale alteraties bij CTCL uitsluitend optreden in klonaal geëxpandeerde T-cellen. Gecombineerd chromosomaal en TCR onderzoek bevestigde eerdere data die een vroege disseminatie van klonale T-cellen naar bloed en huid bij CTCL aantonen. Hoewel een consistent patroon van chromosomale aberraties nog steeds niet is geïdentificeerd, werden karakteristieke combinaties (enh7–dim13q en dim6q–enh7–enh8q–dim13q) in 24% van CTCL patiënten gevonden. Sommige (CTCL-specifieke) alteraties (dim6q, enh8q, and dim13q) waren bovendien van prognostische relevantie.

#### **Moleculair biologische data in het licht van het gestandaardiseerde Biomed-2 protocol.**

Om de data van ons TCR onderzoek te bevestigen, werden 107 huid proeven (84 CTCL, 3 systemische T-cel lymfomen, 20 controles) middels de door ons ontwikkelde TCR $\gamma$  PCR/ FFA techniek en het gestandaardiseerde Biomed-2 protocol onderzocht. Bij de CTCL biopten toonde onze eigen TCR $\gamma$  PCR/ FFA T-cel klonaliteit aan in 86% (72/84), de Biomed-2 TCR $\gamma$  PCR in 81% (68/84) en de Biomed-2 TCR $\beta$  PCR in 78% (66/84). In de controlegroep werd T-cel klonaliteit gevonden middels Biomed-2 TCR $\gamma$  PCR in één huidbiopt van cutaan marginale zone lymfoom en middels Biomed-2 TCR $\beta$  PCR in twee gevallen van pseudolymfomen. Omdat met alle PCR technieken een identieke analytische sensitiviteit van 2,5 tot 10% (afhankelijk van de gebruikte T-cel lijn) bereikt werd, zijn de (niet significante) verschillen in de PCR uitslagen waarschijnlijk door verschillende posities van de primer binding en door primer-primer interacties in de meer complexe Biomed-2 PCR te verklaren. Hiernaast is een insufficiënte binding van de primer aan het TCR gen (wegens kiembaan configuratie, deleties of trans-rearrangements) hoogstwaarschijnlijk de oorzaak voor het falen van alle drie technieken bij de 11 resterende CTCL patiënten.

Deze data bevestigen sensitiviteit en specificiteit van de door ons ontwikkelde PCR techniek en verifiëren daarmee ook voorafgaande resultaten van ons onderzoek naar klonaal geëxpandeerde T-cellen bij CTCL. Om een vergelijkbaarheid van de onderzoeksdata mogelijk te maken, heeft het gebruik van de gestandaardiseerde Biomed-2 techniek ondertussen wel de voorkeur. Helaas worden bij gebruik van TCR PCR technieken substantiële aantalen van foutpositieve en foutnegatieve resultaten geconstateerd en staan er nog geen predictieve waarden vast. Het Biomed-2 protocol blijft daarom alleen een supplement bij de diagnostiek van CTCL. Accurate integratie van klinische,

histomorphologische en immunohistochemische gegevens blijft nog steeds de gouden standaard.

### 7.3 Abbreviations

AJCC	American Joint Committee on Cancer
BRCA	Breast cancer gene
CD	Cluster of differentiation
CGH	Comparative genomic hybridization
CREST	Calcinosis cutis, Raynaud symptoms, Esophagus complaints, Sclerodactyly, Teleangiectasia
CRK	CT10 related kinase
CT-10	Cancer/Testis antigen 10
CTCL	Cutaneous T-cell lymphoma(s)
D	Diversity gene segment
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
DMBT1	Deleted in malignant brain tumors gene
DNA	Deoxyribonucleic acid
EORTC	European organization for research and treatment of cancer
FFA	Fluorescence fragment analysis
HD	Heteroduplex
IL	Interleukin
IL-2RA	Interleukin 2 Receptor A
ISCL	International Society for Cutaneous Lymphomas
J	Joining gene segment
MAX	MYC-associated factor X
MF	Mycosis fungoides
MFISH	Multicolor fluorescence in situ hybridization
MNT	Max-interacting nuclear protein with transcriptional-repressor activity
MOS	Moloney murine sarcoma oncogene
MXI1	MAX-interacting protein 1
MYC	Myelocytomatosis oncogene
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerase chain reaction
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PVT	Plasmacytoma variant translocation gene
RB-1	Retinoblastoma gene 1
SALT	Skin-associated lymphatic tissue
SB	Southern blot
SPP	Small plaque parapsoriasis
SSCP	Single strand conformational polymorphism
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
TCR	T-cell receptor
TE <sub>x</sub> US	T-cell expansion of undetermined significance
TGGE	Temperature gradient gel electrophoresis
TNM	Tumor nodes metastasis
TP53	Tumor suppressor gene 53
V	Variable gene segment
WHO	World health organization

