

# A sejtosztódás rendellenességeivel és a kromoszómaszám változásával kapcsolatos biológiai mechanizmusok vizsgálata malignus daganatokban

*Hegyi Katalin*

Debreceni Egyetem, Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola, Debrecen

Témavezető:

Méhes Gábor, PhD

*Kísérleteink során emlődaganatos (N=50) és agresszív B-sejtes limfóma (N=50) szöveti mintákban elemeztük az Aurora B kináz overexpressziójának a kromoszóma-rendellenességek kialakulására gyakorolt hatását. Eredményeink szerint az Aurora B overexpressziója önállóan, csak a kinázt expresszáló tumorsejtek arányának figyelembevételével nem értelmezhető. Az overexpresszió szövettani körülmények közötti definiálására egy új indexet (AMI index) vezetünk be, mely figyelembe veszi az adott mintára jellemző sejtproliferációs (mitotikus) aktivitást. Megfigyelésünk szerint az analizált limfómamintákban az Aurora B relatív overexpressziója magasabb mitotikus aktivitással társul. Az overexpresszió háttérében génamplifikációt nem figyeltünk meg. Invazív emlőtumoroknál és limfómamintáknál is a kinázt kódoló gén deléciója volt jellemző, mely minden esetben TP53-delécióval társult. Erős kapcsolatot találtunk a TP53 és az AURKB génkópiaszámok között. Emlőtumormintákban a két gén együttes vesztese erős korrelációt mutatott az aneuszóm sejtpopulációk megjelenésével. A 17-es kromoszóma aneuzómiája a vizsgált betegcsoportok szöveti mintáiban gyakori jelenségnek bizonyult. A minták FISH-sel kimutatható aneuzómiája jól reprezentálta az egyes minták áramlási citometriával meghatározott ploiditását. Az Aurora B fehérje expressziója és a daganatsejtek ploiditása között direkt összefüggést nem találtunk. A vizsgált daganatok közül a B-ALCL-ben figyeltük meg a legmagasabb AMI-értékeket, ez magas 17-es kromoszómaszámmal és fokozott mitotikus aktivitással társult. Megfigyeléseink szerint az Aurora B és a malignus sejtklonok keletkezésének és fennmaradásának egy lehetséges magyarázata az alábbi: a kinázfunkció sérülése a CPC komplex nem megfelelő működésén keresztül mitotikus szabályozási zavart eredményez. A kináz fokozott aktivitása egy fontos mitotikus ellenőrzési pont kiesését okozhatja, ezáltal aneuzómiás sejtpopulációk megjelenését eredményezheti. A TP53 deléciója pedig egy fontos apoptotikus út vonal sérülésének következtében valószínűleg a malignus sejtpopulációk túlélésének kedvez. Magyar Onkológia 59:365–371, 2015*

**Kulcsszavak:** mitotikus rendellenességek, malignus transzformáció, Aurora kináz B, kinázoverexpresszió, invazív emlőkarcinóma, limfóma

*The main goal of this work was to study the effect of Aurora kinase expression on cell ploidy and tumorigenesis. Fifty invasive breast cancer, 50 diffuse large B-cell lymphoma and 10 reactive lymph node samples were recruited in the study. Because of the significant correlation with the overall cell proliferation rate, the overexpression of Aurora B could not be stated on the basis of kinase expressing tumor cell fractions alone. The relative expression of Aurora B kinase is better reflected by the AMI index which represents the Aurora B expression in relation to the whole proliferative fraction of the tumor. A higher relative Aurora B expression was associated*

Levelezési cím: Hegyi Katalin, Debreceni Egyetem, Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola,  
4032 Debrecen, Nagyerdei krt. 98., e-mail: dull.kata@gmail.com

Közlésre érkezett: 2015. október 8. • Elfogadva: 2015. október 25.

*with higher mitotic activity in B-cell lymphoma. FISH analysis of the AURKB locus did not show any gains or amplifications in the samples analyzed. On the other hand, we have observed the loss of the gene in breast carcinoma and lymphoma samples as well. A strong correlation was shown between AURKB and TP53 copy numbers: AURKB loss was associated with TP53 deletion in all samples. According to our results on breast carcinoma, losses at 17p13.1 and chromosome 17 aneusomy determined by FISH showed a statistically significant correlation. Our study presents the frequent occurrence of chromosome 17 aneusomy in breast carcinoma and B-cell lymphoma samples. Chromosome 17 aneusomy evaluated by FISH correlated with aneuploidy determined by flow cytometry. Direct correlation between kinase expression and ploidy could not be shown. The highest AMI values were seen in B-ALCL samples, and it was associated with high chromosome 17 copy numbers and mitotic activity. The damaged Aurora B kinase function results in regulatory deficiencies in the CPC complex leading to mitotic errors, while p53 deficiency helps malignant cells to survive due to insufficient activation of the intrinsic apoptotic pathways. The upregulation of Aurora kinase B function may cause error in an important mitotic checkpoint, thus resulting in induction of aneuploid cell populations. These parallel effects finally increase the complexity of mitotic abnormalities and generate aneuploid cell populations.*

Hegyí K. Biologic mechanisms of mitotic abnormalities and chromosome number changes in malignant tumors. *Hungarian Oncology* 59:365–371, 2015

**Keywords:** mitotic failures, malignant transformation, Aurora kinase B, kinase overexpression, invasive breast cancer, lymphoma

## BEVEZETÉS

A malignus transzformáció egyik legmarkánsabb jelensége a fokozott sejtosztódás és az azzal kapcsolatos hibák folyamatos létrejötte. A tumorsejtek repair mechanizmusai sérülnek, a sejtek metabolikus profilja megváltozik. Amennyiben ezek a folyamatok a tumorsejteket szelekció előnyhöz juttatják, az a malignus sejtpopulációk feldúsulásához vezet.

A kromoszómák szétválása és egyenlő arányban történő elosztódása pontosan szabályozott komplex mechanizmus, melynek felborulása az utódsejtekben aneuszómiahoz, aneuploidiahoz, a kromatin szerveződésének megváltozásához vezet. Ezek az elváltozások megváltozott génexpressziót, géntermékfunkciót és különböző géndózishoz kötött eltéréseket eredményeznek.

A kromoszómák szétválása és egyenlő arányban történő elosztása szempontjából kulcsfontosságú a centroszóma ciklus, valamint a mitotikus ellenőrzési pont megfelelő működése. Újabb tudományos eredmények igazolták, hogy a fenti folyamatok szabályozásában is érintett mitotikus regulátor Aurora kináz család tagjai kulcsfontosságú elemei a genetikai stabilitás fenntartásának. Az expressziójukat érintő változások hozzájárulnak a genetikai instabilitás kialakulásához. Több humán daganatban is megfigyelték a kinázok (elsősorban Aurora A és B kináz) overexpresszióját. Ismeretes az Aurora B kináz fontos szabályozó szerepe a normális ploiditás fenntartásában: korai G2 fázisban a H3 hiszton foszforilálásán keresztül szabályozza a kromatinkondenzációt, ezáltal befolyásolja a mitózis iniciálását. Továbbá a CPC (chromosome passenger complex)

tagjaként a kromoszómák mitotikus orsóhoz való kapcsolását is szabályozza.

Kísérletes körülmények között a kináz funkciójának gátlása a H3 hiszton foszforilációjának szignifikáns csökkenését okozza, genetikai instabilitáshoz, aneuploid sejtpopulációk megjelenéséhez és apoptózishoz vezet.

Kísérleteink a sejtosztódás daganatokban megváltozott szabályozása és az Aurora B kináz funkciója közötti viszony tisztázását célozták. Mindez segíthet a megfelelő terápia kiválasztásánál, hatékonyságának előrejelzésénél, a betegség besorolásánál és a prognózis megállapításánál. Az Aurora B kináz, valamint a mitotikus reguláció szempontjából fontos, a kinázzal kölcsönható fehérjék expressziójának vizsgálatával olyan prediktív értékkel bíró új szöveti markerek azonosítására nyílik lehetőség, amelyek alkalmazhatóak a mindennapos szövettani diagnosztikában. Egyik legfontosabb célunk tehát egy olyan celluláris biomarker leírása, amelyek a sejtosztódási defektusokat és a mitózisra irányuló célzott kezelések várható hatásának predikcióját lehetővé teszik.

Kísérleteink során elsősorban az Aurora B kromoszómaszámra és a sejtmag kromatinszerveződésére gyakorolt hatását, a kináz expressziójában bekövetkezett zavar és az aneuploid sejtpopulációk megjelenése közötti összefüggéseket kívántuk megvizsgálni.

## CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink az agresszív malignus folyamatokban gyakori aneuploidia és az Aurora B kináz funkciója közötti összefüggés megértését célozták. Kísérleteinkben az Aurora B és a kinázzal kölcsönható fehérjék expresszióját szöveti szint

ten, immunhisztokémiai módszerekkel vizsgáltuk invazív emlőkarcinóma és agresszív limfóma mintákon. A 17-es kromoszóma, valamint az AURKB és TP53 gének kópiaszámát fluoreszcencia in situ hibridizációval vizsgáltuk. A 17-es kromoszóma aneuzómiája mellett meghatározásra került a minták ploiditása is, áramlási citometria módszerrel. Egyik legfontosabb célunk egy olyan prediktív értékkel bíró celluláris biomarker leírása volt, amely a sejtosztódási defektusokat és a mitózisra irányuló célzott kezelések várható hatásának predikcióját lehetővé teszi.

*A kísérletes munka alapját képező célkitűzések a következők:*

1. Aurora B expressziójának vizsgálata invazív emlőtumor és agresszív B-sejtes limfóma mintákon immunhisztokémiai módszerekkel.

1.1. Az Aurora B overexpressziójának definiálása hisztológiai körülmények között.

1.2. Az Aurora B expressziójának összefüggése az adott minta sejtproliferációs aktivitásával.

1.3. Az Aurora B kinázal upstream és downstream kölcsönható legfontosabb fehérjék expressziójának vizsgálata.

2. Invazív emlőtumor- és limfómaminták FISH-analízise AURKB-, TP53- és CEP17-specifikus DNS-szondákkal.

2.1. Vizsgálataink egyik fő céljaként meg kívántuk vizsgálni, hogy az Aurora B overexpressziójának hátterében található-e AURKB-génamplifikáció.

2.2. Az AURKB génnel 17p13.1 lókuszbán szomszédos TP53 gén státuszának vizsgálata.

2.3. 17-es kromoszóma kópiaszámbeli eltéréseinek, valamint a minták ploiditásának vizsgálata.

3. Az Aurora B-overexpresszió és az aneuzómia összefüggésének vizsgálata.

4. A vizsgálataink során kapott eredmények összevetése a betegek klinikai adataival.

## MÓDSZEREK

### *Invazív emlőkarcinóma minták*

A DEOEC Pathológiai Intézetében 2009 és 2010 között diagnosztizált invazív emlőkarcinómák közül 50 szövettanilag alkalmasnak ítélt minta került elemzésre. Minden mintából formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövettani preparátum készült. Az emlőkarcinóma-mintákhoz megfelelő kontrollcsoport (normális emlőből származó szövet) nem állt rendelkezésre.

### *Limfoid eltérések*

Kísérleteinkbe a DEOEC Pathológiai Intézetében 2008 és 2012 között diagnosztizált agresszív B-sejtes limfóma esetek közül 50 került bevonásra. A mintákból forma-

linban fixált, paraffinba ágyazott szövettani minták készültek.

Az eredmények verifikálása és archiválása céljából a minták szöveti microarray-be (TMA) is beágyazásra kerültek.

### *Szöveti microarray*

Immunhisztokémiai eredményeink verifikálására a felhasznált mintákból szöveti microarray-t hoztunk létre. Hematoxilin-eozin (HE) festett metszeteken a reprezentatív régiók jelölése után az egyes paraffinos blokkokból TMA Master készülék (3DHitech Kft., Magyarország) segítségével 3-3 db, egyenként 1 mm átmérőjű szövethenger került eltávolításra, majd az előkészített recipiens blokkba való beillesztésre. A multiblokkokba a tájékozódást megkönnyítő májból származó szövethengereket építettünk. Az egyes szövethengerek koordinátáit TMA Master 1.0 szoftver (3DHitech Kft., Magyarország) segítségével rögzítettük. A szövethengerek és a recipiens blokk üregei között keletkező réseket olvasztott (56 °C) paraffinnal töltöttük ki.

### *Immunhisztokémiai vizsgálatok (IHC)*

Immunhisztokémiai módszerrel a FFPE mintákból származó szövettani metszeteken meghatároztuk a teljes proliferáló sejtfrakciót anti-Ki67 (MIB-1 klón, a továbbiakban MIB-1) antitest alkalmazásával, valamint az Aurora B-, survivin- és foszforilált H3 hiszton- (H3S10P) pozitív sejtfrakciókat.

Az immunhisztokémiai jelöléseket 3 µm vastag, adhéziós tárgylemezre (SuperFrost Ultra Plus®, Menzel-Gläser, Németország) fixált szöveti metszeteken végeztük. A jelöléseket a gyártók által javasolt protokoll szerint végeztük.

A MIB-1-, Aurora B-, illetve survivinpozitív sejtfrakciók százalékos arányát az összes tumorsejthez viszonyítva határoztuk meg. A H3S10P-expresszáló mitotikus sejtek számát 10 nagy nagyítású látótérre (/10 HPF) vonatkoztatva határoztuk meg. Kontrollmintáinkban a vizsgált fehérjék expressziójának meghatározása a centrum germinatívumokban történt. Mintánként 10 centrum germinatívumot értékeltünk.

Az Aurora B jelentős sejtproliferációtól való befolyásoltságát figyelembe véve a fehérje overexpressziójának definiálásához egy indexet hoztunk létre, amelyet az Aurora B- és MIB-1-immunpozitív sejtek hányadosaként határoztunk meg (AMI index). A limfómaminták Aurora B-overexpresszióra vonatkozó cut off értékét kontrollmintáink adatai alapján, az AMI számtani közép+2 SD képletet alkalmazva 0,5-nél határoztuk meg. Invazív emlőkarcinóma minták esetén – nem lévén megfelelően definiálható kontrollcsoport – az Aurora B-overexpresszió határértékét irodalmi adatok alapján 0,3 feletti értéknél határoztuk meg.

A mitózisindex meghatározása HE-festett metszetek alapján, a mitotikus formák számának megadásával történt, 10 nagy nagyítású látótérben.

### *Fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH)*

A TP53 gén és 17-es kromoszóma kópiaszámának meghatározására LSI TP53/CEP17 (Abbott Laboratories Inc, USA), 'SpectrumOrange' és 'SpectrumGreen' fluorofórokkal direkten jelzett DNS-szondát alkalmaztunk. Az AURKB génstátuszt Poseidon™ Repeat Free™ AURKB/SE17 (Kreatech Diagnostics, Hollandia), 'PlatinumBright550' illetve 'PlatinumBright495' fluorofórokkal konjugált DNS-szondák segítségével határoztuk meg.

A FISH-t a gyártók által javasolt protokollok alapján végeztük el. A FISH kiértékelését Zeiss Axio Imager Z2 fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss, Németország), 63× olajimmerziós objektívvel (Zeiss, NA: 1,4) és Isis (Metasystems, Németország) képalkotó rendszerrel végeztük. Az emlőkarcinóma-minták invazív régióiból 100-100, a limfómaminták reprezentatív régióiból 50-50 tumoros sejtmagot értékeltünk.

A 17-es kromoszóma státuszát az alábbiak szerint határoztuk meg:

a) diszómia: follikuláris hiperplázia mintákon megfigyelt átlagos sejtenkénti kromoszómaszám alapján határoztuk meg:

átlagos kromoszóma-kópiaszám+2 SD=1,814+2×0,081=1,98

b) hiperdiszómia: 1,98 és 2,3 átlagos sejtenkénti kromoszómaszám között

c) triszómia: 2,3 és 3,3 átlagos sejtenkénti kromoszómaszám között

d) tetraszómia: 3,3 és 4,3 átlagos sejtenkénti kromoszómaszám között

Az AURKB és TP53 géneket deletálnak tekintettük, amennyiben a 17-es kromoszóma kópiaszámához viszonyított számuk kevesebb volt, mint 0,8. A HER2 gént amplifikálnak tekintettük, amennyiben a 17-es kromoszómaszámhoz viszonyított relatív kópiaszám nagyobb volt, mint 2,3.

### *Sejtek DNS-tartalmának meghatározása áramlási citometriával*

A B-sejtes limfóma és reaktív nyirokcsomó minták DNS-tartalmának meghatározását a DEOEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetében, FFPE mintákból izolált sejtmagszuspenziókon végeztük el. A sejtmagszuspenziókat a Hedley által leírt protokollnak megfelelően preparáltuk.

Emlőkarcinóma-minták esetén a sejtmagszuspenziók preparálása nem volt sikeres.

A minták DNS-tartalmának mérését FACS Aria II készülékkel és FACSDiva v6.1.3. szoftver használatával végeztük. Mintánként 100 000 eseményt rögzítettünk. Az elemzett minták DNS-indexét FCS Express 4 v. 4.07.0005 (DeNovo Software, USA) szoftverrel határoztuk meg. Kontrollként FFPE reaktív nyirokcsomókból izolált sejtmagszuspenziókat használtunk.

### *Statisztikai analízis*

Az adatok statisztikai analízisét SPSS (v20.0, IBM, USA), MS Excel XLStat (v7.5.2, Addinsoft, USA) és MedCalc (v12.6.1.0., Medcalc Software, Belgium) szoftverek segítségével végeztük. A középértékek és szórások kiszámítására és összehasonlítására Student t-tesztet alkalmaztunk. Statisztikailag szignifikánsnak a  $p \leq 0,05$  értékeket tekintettük.

Az adatsorok közötti korreláció meghatározásához lineáris regressziót alkalmaztunk. Lineáris korrelációnak az  $R=0,7$  feletti értéket tekintettük.

A teljes túlélési valószínűség meghatározására Kaplan-Meier-analízist alkalmaztunk. A betegcsoportok túlélési ráta közötti különbségek szignifikanciájának meghatározását log-rank teszttel vizsgáltuk. Ebben az esetben is a  $p \leq 0,05$  értéket tekintettük szignifikánsnak.

## EREDMÉNYEK

### *Aurora B kináz expressziójának vizsgálata invazív emlőkarcinómákban*

#### *Az invazív emlőkarcinómák klinikai és biológiai paramétereit*

Vizsgálataink során összesen 50 emlőkarcinóma-mintát vizsgáltunk. 45 minta morfológiailag invazív ductalis emlőkarcinómának, 5 minta invazív lobularis karcinómának bizonyult.

#### *Aurora B-expresszió*

A szövettani minták Aurora B-pozitív sejtjeiben sejtmagi pozitivitást észleltünk. Aurora B-pozitivitás G2 fázistól az M fázis végéig detektálható, az antitest a vártan megfelelően az interfázisos sejtmagok egy részét, valamint a mitotikus alakokat jelölte.

Adataink alapján emlőkarcinóma-mintákban az Aurora B kináz expresszálo sejtek aránya 1% és 35% között változott (átlag: 6,15%, SD: 8,8%). A minták sejtproliferációs aktivitását MIB-1 marker alkalmazásával 1-95% tartományban figyeltük meg (átlag: 19,2%, SD: 20,7%).

A HER2-génamplifikációt mutató mintákban szignifikánsan magasabb Aurora B kináz-expressziót figyeltünk meg ( $p=0,015$ ), és eredményeink szerint ez fokozott sejtproliferációval társult ( $p=0,018$ ).

Adataink alapján a tripla-negatív (HER2-, PR-, ER-) minták Aurora B-expressziója szintén szignifikáns emelkedést mutat ( $p=0,001$ ), ugyanakkor az előző mintákhoz hasonlóan a jelenség fokozott sejtproliferációval társult ( $p=0,0003$ ).

Erős korrelációt találtunk az Aurora B-t és a MIB-1-et együttesen expresszálo szöveti mintákban ( $R: 0,77$ ). Az Aurora B és MIB-1 expressziója közötti lineáris korreláció

miatt a kinázoverexpresszió meghatározására bevezettük az Aurora B/MIB-1 indexet (AMI index). Az AMI index értékét a mintákban 0 és 1 között figyeltük meg (átlag: 0,32, SD: 0,28).

Intenzíven proliferáló mintákon végzett párhuzamos megfigyeléseink, valamint irodalmi adatok alapján a kináz overexpresszióját AMI>0,3 értéknél állapítottuk meg. Ez alapján az 50 emlőkarinóma-mintából 20-ban volt megfigyelhető az Aurora B relatív overexpressziója. A relatív Aurora B-expresszió statisztikailag függetlennek bizonyult a HER2-gén- és ER-, PR-státuszoktól.

#### *A 17p13.1 lókuszt és 17-es kópiaszám változásai*

Az Aurora B kináz overexpressziója citogenetikai hátterének vizsgálatát FISH módszerrel végeztük. A minták invazív régióiból 100-100 sejtmag került értékelésre. Az AURKB és TP53 géneket deletáltak tekintettük, amennyiben a 17-es kromoszóma kópiaszámához viszonyított számuk kevesebb volt, mint 0,8, emelkedett kópiaszámot 2 kópia/17-es kromoszóma érték felett állapítottunk meg. 17-es kromoszóma-poliszómiát 2,3 CEP17 szignál/sejtmag felett határoztunk meg.

Az Aurora B-overexpressziót mutató minták egyikében sem láttunk AURKB-génamplifikációt. A minták egy csoportjában (6 minta) azonban megfigyeltük az AURKB delécióját, amely mindegyik mintában TP53-delécióval társult. Eredményeink szerint erős korreláció van az AURKB és TP53 gének kópiaszáma között (R: 0,73).

A minták HER2- és AURKB- és/vagy TP53-génkópiaszáma között összefüggést nem figyeltünk meg. A 13, HER2-génamplifikációt mutató minta közül 4-ben láttunk a TP53 és/vagy AURKB gének allévesztését.

A 17-es kromoszóma sejtenkénti számát 1,5 és 3,9 között figyeltük meg, aneuszómiát – több mint 2,3 CEP17-szignál sejtmagonként – 19 mintában láttunk (38%). Az AURKB és TP53 együttes allévesztésével járó mintákban a 17-es kromoszóma kópiaszámát 2,44 és 3,9 között láttuk (átlag: 3,18, SD: 0,18), a minták mindegyike 17-es kromoszóma-aneuszómiát mutatott. Az intakt 17p13.1 lókusssal bíró minták kromoszómáisan stabilabbnak bizonyultak, a 17-es kromoszóma kópiaszáma 1,6 és 3,19 között változott (átlag: 2,1, SD: 0,05). A különbség statisztikailag szignifikáns ( $p < 0,0001$ ).

Az emlőkarinóma-minták DNS-tartalmának flow citometriás vizsgálata nem volt kivitelezhető, FFPE mintákból a sejtmagok izolálása nem járt sikerrel.

#### *Aurora B-expresszió és 17-es kromoszóma-kópiaszám összefüggései*

Az Aurora B kináz expressziója és a numerikus kromoszóma-rendellenességek összefüggéseinek tisztázására meghatároztuk a kinázexpresszió függvényében a 17-es kromoszó-

ma és a 17p13.1 lókuszt sejtenkénti kópiaszámát. Sem a Ki67, sem az Aurora B expressziója nem mutatott összefüggést a 17-es kromoszómastátusszal. Az Aurora B-t expresszáló sejtfrakciók aránya és az AURKB kópiaszáma között gyengén pozitív korrelációt találtunk (R=0,26). Azokban a mintákban, amelyekben normális AURKB-génkópiaszám volt megfigyelhető, az Aurora B kináz expresszáló tumorsejtek arányát 0 és 35% között láttuk (átlag: 6,47, SD: 9,26). Az AURKB-géndelécióval társuló mintákban ugyanez az érték 0 és 10% közöttinek bizonyult (átlag: 3,83, SD: 3,44), a különbség statisztikailag nem szignifikáns ( $p=0,5$ ).

Adataink alapján statisztikailag nincs jelentős különbség a relatív Aurora B-expresszióban a 17p13.1 lókuszt kópiaszámának függvényében ( $p=0,1$ ).

Az AMI indexet az AURKB és TP53 együttes vesztésével járó mintákban 0 és 0,25 között figyeltük meg (átlag: 0,15, SD: 0,1), míg az intakt 17p13.1 régióval bíró mintákban ugyanez az érték 0 és 1 között volt mérhető (átlag: 0,36, SD: 0,3). Az emlőkarinóma-minták egy csoportjában extrém magas AMI-értéket ( $AMI \geq 0,8$ ) figyeltünk meg. Ezekben a mintákban az AURKB relatív génkópiaszámában is emelkedést láttunk (átlag: 1,1, SD: 0,2), míg a normális relatív Aurora B-expressziót mutató mintáknál ( $AMI \leq 0,3$ ) ugyanez az érték 1 alatt maradt (átlag: 0,9, SD: 0,2). A különbség statisztikailag szignifikáns ( $p=0,004$ ).

#### *Aurora B kináz expressziójának vizsgálata agresszív B-sejtes limfómákban*

Kísérleteinkbe összesen 50 agresszív B-sejtes limfóma került bevonásra. A minták közül immunhisztokémiai fenotípusuk alapján 41 DLBCL, NOS-ként volt definiálható. Ezeket a mintákat a Hans-kritériumok alapján két alcsoportba soroltuk: 29 minta nem centrum germinativum (non-GCB), 14 centrum germinativum (GCB) alcsoportba volt sorolható. 3 minta primer mediastinalis nagy B-sejtes limfómának (PMBL), 3 minta ALK+ nagy B-sejtes limfómának (B-ALCL) bizonyult, további 1 minta átmeneti DLBCL-klasszikus Hodgkin-like limfóma besorolást kapott.

#### *Aurora B-overexpresszió*

Az invazív emlőkarinómákhoz hasonlóan anti-Ki67 (MIB-1), anti-survivin és anti-Aurora B antitestek alkalmazásakor is sejtmagi pozitivitást láttunk kontroll- és agresszív B-sejtes limfóma mintákban is. A foszforilált H3 hisztont (H3S10P) jelölő antitest a mitózisokat szelektíven, intenzív DAB-szignállal emeli ki a szöveti környezetből.

Folikuláris hiperpláziában az immunhisztokémiai reakciók értékelése a centrum germinativumokban történt, melyekben az Aurora B-pozitív sejtfrakciókat 23% és 36,5% között láttuk (átlag $\pm$ SD: 30,45 $\pm$ 5,06). Ugyanez az érték ag-

resszív B-sejtes limfómákban 5% és 70% között volt detektálható (28,2±15,32).

A kontrollcsoporthoz viszonyítva az 50 agresszív B-sejtes limfóma sejtproliferációs aktivitását szignifikánsan alacsonyabbnak találtuk ( $p=0,008$ ). A MIB-1-pozitív sejtfrakciók arányát limfómában 20% és 95% között (átlag±SD: 63,6±15,94), a mitotikus sejtek számát 13 és 133/10 HPF között (50,04±27,53,  $p=2,27\times 10^{-12}$ ) láttuk. Ugyanezek az expressziós arányok follikuláris hiperpláziában 75% és 87% között (77,8±4,99), illetve 92 és 175/10 HPF (134,1±23,72) értékek között voltak detektálhatóak.

Invazív emlőkarzinóma mintáinkhoz hasonlóan agresszív B-sejtes limfóma és follikuláris hiperplázia mintákban is láttuk az Aurora B kináz sejtproliferációs aktivitástól való függését ( $R: 0,5$ , illetve  $0,7$ ). A kinázoverexpresszió definiálásához meghatároztuk az AMI indexet, ami follikuláris hiperplázis esetén 0,31 és 0,48 között (átlag±SD: 0,39±0,06), B-sejtes limfómákban 0,17 és 0,85 között (0,44±0,2) volt megfigyelhető.

Az Aurora B-overexpresszió cut off értékét a kontrollcsoportban detektált átlagos AMI+2 SD képlet alapján 0,5-nél állapítottuk meg. Ez alapján 13 mintában figyeltük meg az Aurora B kináz overexpresszióját. Az AMI-érték alapján Aurora B-overexpressziót mutató mintákban szignifikánsan emelkedett mitotikus aktivitást figyeltünk meg a normális, 0,5-nél alacsonyabb AMI-értéket mutató mintákhoz viszonyítva. 8 mintában extrém magas, 0,75 feletti értéket figyeltünk meg, ezekben a mintákban a mitotikus aktivitás is magasabbnak bizonyult ( $p=0,012$ ), változatlan általános sejtproliferációs aktivitás (MIB-1-pozitivitás) mellett a 0,75-nél alacsonyabb AMI indexszel járó mintákhoz viszonyítva.

Relatív Aurora B-expressziót tekintve az agresszív B-sejtes limfóma alcsoportok között szignifikáns eltérés nem volt látható. Az AMI legmagasabb átlagértéke B-ALCL-mintáknál volt látható, de megemlítendő, hogy ebbe az alcsoportba mindösszesen 3 minta volt sorolható.

#### *Mitotikus aktivitás vizsgálata foszfo-H3 hiszton (Ser10) mitózismarker alkalmazásával*

A mitotikus aktivitást HE-festett metszetek mellett anti-foszfo-H3 hiszton antitest alkalmazásával is meghatároztuk. Az antitest a mitotikus alakokat szelektíven, erős DAB-szignállal kiemeli a szöveti környezetből.

Follikuláris hiperpláziákhoz hasonlóan limfómákban a H3S10P-pozitív mitotikus sejtek jelentősen kisebb mennyiségben voltak detektálhatóak ( $p=3,77\times 10^{-7}$ ). Agresszív B-sejtes limfóma alcsoportok között a H3S10P-expresszió tekintetében jelentős különbségeket nem tapasztaltunk.

Az Aurora B kináz expresszálo és foszfo-H3 hiszton (H3S10P) pozitív mitotikus sejtek mennyisége között gyen-

ge pozitív korrelációt figyeltünk meg, az R érték kontrollmintáinkban 0,26, B-sejtes limfómákban 0,41 volt.

A különböző AMI-értékek alapján létrehozott limfóma-mintacsoportok H3S10P-expressziójában szignifikáns különbségek mutatkoztak. Az Aurora B kináz relatív overexpressziója magasabb mitotikus aktivitással járt együtt.

#### *AURKB, TP53 és 17-es kromoszómát érintő kópiaszám-változások, minták ploiditása*

Invazív emlőtumor mintáinkhoz hasonlóan direkt összefüggést az AURKB-kópiaszám és az Aurora B kináz expresszálo sejtfrakciók aránya között agresszív B-sejtes limfómákban sem tudtunk kimutatni. Azokban a mintákban, melyekben az Aurora kináz relatív expressziója magas volt, nem figyeltük meg az AURKB gén amplifikációját. 4 mintában láttuk az AURKB és TP53 gének együttes delécióját, ezekben a mintákban sem láttunk a relatív Aurora B-expresszióban bekövetkezett változásokat.

Az AMI index AURKB- és TP53-delécióval társuló mintákban 0,16 és 0,86 között változott (átlag±SD: 0,52±0,25). Ugyanez az érték intakt 17p13.1 régióval rendelkező mintákban 0,19 és 0,83 (0,43±0,2), reaktív nyirokcsomókban 0,31 és 0,48 (átlag±SD: 0,39±0,06) között volt. Statisztikailag jelentős különbségeket nem láttunk ( $p$ -értékek 0,39 és 0,15 voltak).

További 7 mintában láttuk a TP53 gén delécióját. B-ALCL-mintáink mindegyikében kimutatható volt TP53-deléció.

AURKB- és TP53-allévesztéssel társuló B-sejtes limfómákban az Aurora B-pozitív sejtek arányát 10% és 60% között (átlag±SD: 33,75±18,5), intakt 17p13.1 régióval rendelkezőkben 5% és 70% között (27,18±14,75), kontrollmintákban 23% és 36,5% között (31,27±4,65) láttuk. A különbségek statisztikailag nem szignifikánsak.

A 17-es kromoszóma aneuszómiája gyakori jelenségnek bizonyult. Diszómiát mindösszesen 4 mintában észleltünk, aneuszómia 46 mintában, az összes minta 92%-ában volt megfigyelhető. 12 mintában hiperdiszómia, 25-ben triszómia, 9 mintában tetraszómia volt kimutatható. A legmagasabb 17-es kromoszóma-kópiaszámokat a TP53-deléciót mutató B-ALCL-mintákban láttuk.

Az Aurora kináz B relatív expressziója és a 17-es kromoszóma sejtenkénti kópiaszáma között összefüggést nem tudtunk kimutatni (korrelációs koefficiens ( $R$ )=0,01). Az AMI értékek alapján az Aurora B kináz alacsony, normális és fokozott relatív expresszióját mutató limfómaminták között szignifikáns eltérések a 17-es kromoszóma kópiaszámát illetően nem mutatkoztak.

Áramlási citometriás mérésekhez 34 agresszív B-sejtes limfóma és 8 kontrollminta bizonyult alkalmasnak. A FISH-sel a 17-es kromoszóma aneuszómiáját mutató

minták mindegyikében a kiszámított DNS-index aneuploid sejtpopulációk jelenlétét igazolta.

Aurora B kinázt overexpresszáló mintákban 17-es kromoszóma státusz tekintetében nem találtunk különbséget a normális Aurora B-expressziót mutató mintákhoz viszonyítva.

#### *Az Aurora B-expresszió hatása a betegek túlélési idejére*

Az 50 agresszív B-sejtes limfómás beteg átlagos utánkövetési ideje 34,44 hónap volt (tartomány: 0,97–127,1). Eredményeink szerint a megvizsgált fehérjék expressziója és a betegek teljes túlélési ideje, valamint a limfóma stádiuma között összefüggés nem mutatható ki. Az Aurora B relatív expressziója és a vizsgálatba bevont betegek teljes túlélési ideje között statisztikailag szignifikáns különbségeket nem figyeltünk meg. A 17-es kromoszóma státusz alapján a hiperdiszomiát mutató mintákhoz társult a legkedvezőtlenebb teljes túlélési idő, a különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak ( $p=0,27$ ).

## KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az Aurora B, valamint a kinázzal kölcsönható fehérjék expressziója szövettani körülmények között jól vizsgálható.

2. Az immunhisztokémiai és FISH-eredmények szöveti microarray használatával reprodukálhatóak.

3. Az Aurora B overexpressziója önállóan, csak a kinázt overexpresszáló tumorsejtek arányának figyelembevételével nem értelmezhető. Az overexpresszió szövettani körülmények közötti definiálására egy új indexet (AMI index) vezettünk be, mely figyelembe veszi az adott mintára jellemző sejtproliferációs (mitotikus) aktivitást. Megfigyelésünk szerint az analizált limfómamintákban az Aurora B relatív overexpressziója magasabb mitotikus aktivitással társul.

4. Az overexpresszió hátterében génamplifikációt nem figyeltünk meg. Invazív emlőtumoroknál és limfómáknál is a kinázt kódoló gén deléciója volt jellemző, mely minden esetben TP53-delécióval társult. Erős kapcsolatot találtunk a TP53- és az AURKB-génkópiaszámok között. Emlőtumor-mintákban a két gén együttes vesztese erős korrelációt mutatott az aneuszóm sejtpopulációk megjelenésével.

5. A 17-es kromoszóma aneuszómiaja a vizsgált betegcsoportok szöveti mintáiban gyakori jelenségnek bizonyult. A minták FISH-sel kimutatható aneuszómiaja jól reprezentálja az egyes minták áramlási citometriával meghatározott ploiditását.

6. Az Aurora B fehérje expressziója és a daganatsejtek ploiditása között direkt összefüggést nem találtunk.

7. A vizsgált daganatok közül a B-ALCL-ben figyeltük meg a legmagasabb AMI-értékeket, ez magas 17-es

kromoszómaszámmal és fokozott mitotikus aktivitással társult.

Megfigyeléseink szerint az Aurora B és a malignus sejtklonok keletkezésének és fennmaradásának egy lehetséges magyarázata az alábbi: a kinázfunkció sérülése a CPC komplex nem megfelelő működésén keresztül mitotikus szabályozási zavart eredményez. A kináz fokozott aktivitása egy fontos mitotikus ellenőrzési pont kiesését okozhatja, ezáltal aneuszómias sejtpopulációk megjelenését eredményezheti. A TP53 deléciója pedig egy fontos apoptotikus útvonal sérülésének következtében valószínűleg a malignus sejtpopulációk túlélésének kedvez.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, *Dr. Méhes Gábornak*, hogy bevezetett a daganatkutatás rejtelmeibe és munkám során kitartó türelemmel és szakmai segítséggel egyengette az utamat. Köszönöm a Patológiai Intézet minden munkatársának, hogy munkámat segítették. Külön köszönet illeti *dr. Bedekovics Juditot* az agresszív B-sejtes limfómák szövettani besorolásában nyújtott segítségével, *Dócs Ottót* és *Dr. Egervári Kristófot* a TMA-preparátumok elkészítésében való segítségért, továbbá *Rigó Gyuláné Etát* áldozatos munkájáért és *Beke Líviát* az immunhisztokémiai vizsgálatokban való segítségével. Külön szeretném megköszönni *Bessenyei Máriának*, hogy PhD-tanulmányaim kezdetén megannyi segítséggel és gyakorlati tanáccsal látott el a kísérletes munkák során. Köszönöm *Prof. Dr. Vereb Györgynek*, hogy a ploiditásvizsgálatokat a Debreceni Egyetem Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetében végezhettem, valamint köszönöm *Dr. Simon Lászlónak* a mérések során nyújtott segítségét. Köszönet illeti *Dr. Irsai Gábort* és *Dr. Gergely Lajost* a klinikai adatok elemzése során nyújtott segítségükért. Külön köszönettel tartozom *Dr. Treszl Andreának*, akinek köszönhetően megismertem a jelen munka során is nélkülözhetetlen *in situ* hibridizációs módszereket, aki elültette bennem a tudományos munka iránti érdeklődést, és akinek támogató barátságát eléggé megköszönni nem tudom. Megkülönböztetett köszönettel tartozom öcsémnek, *Gábornak*, akitől a dogmákban való szüntelen kételkedést és a körülöttem lévő világ kritikus megfigyelését tanultam. Végül szeretném megköszönni férjemnek, *Hegyi Zoltánnak* kitartó támogatását.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. Hegyi K, Egervári K, Sándor Z, Méhes G. Aurora kinase B expression in breast carcinoma: cell kinetic and genetic aspects. *Pathobiology* 79:314–322, 2012
2. Páyer E, Miltényi Z, Simon Z, et al. Uncommon late relapse of angio-immunoblastic T-cell lymphoma after 16-year remission period. *Pathol Oncol Res* 18:737–741, 2012
3. Méhes G, Hegyi K, Csonka T, et al. Primary uterine NK-cell lymphoma, nasal-type: a unique malignancy of a prominent cell type of the endometrium. *Pathol Oncol Res* 18:519–522, 2012
4. Hegyi K, Méhes G. Mitotic failures in cancer: Aurora B kinase and its potential role in the development of aneuploidy. *Pathol Oncol Res* 18:761–769, 2012
5. Hegyi K, Lønborg C, Mónus A, Méhes G. One-day FISH approach for the high-speed determination of HER2 gene copy status in breast carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 21:567–571, 2013
6. Murnyák B, Csonka T, Hegyi K, et al. Magas grádusú gliomák előfordulása és molekuláris patológiája. *Ideggyógy Sz* 66:312–321, 2013