

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

Hegyi Katalin

Témavezető: Dr. Méhes Gábor



DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2014

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Hegyi Katalin okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája (klinikai és experimentális onkológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Méhes Gábor, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Panyi György, az MTA doktora
Dr. Torday László, PhD

A doktori szigorlat időpontja: DE ÁOK Pathológiai Intézet könyvtára, 2014. szeptember 10. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora
Dr. Krenács Tibor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora
Prof. Dr. Panyi György, az MTA doktora
Dr. Krenács Tibor, PhD
Dr. Torday László, PhD

Az értekezés védésének időpontja: DE ÁOK Belgyógyászati Intézet A épület tanterme, 2014. szeptember 10. 13 óra

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 szelekciós előnyhöz juttatják, az a malignus sejtpopulációk feldúsulásához vezet.

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

A kromoszómális instabilitás már korai stádiumú daganatokban feltűnő jelenség, amely kariotipizálással, in situ hibridizációval, és az egyes gének kópiaszámának vizsgálata révén is kimutatható. A kromoszómák számbeli változása általában arányban áll az adott tumor malignitási potenciáljával, a mutációk genetikai eltérések halmozódásához vezetnek a karcinogenezis során.

A kromoszómák szétválása és egyenlő arányban történő elosztása szempontjából kulcsfontosságú a centroszóma ciklus, valamint 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 ezen kinázok (elsősorban Aurora A és B kináz) overexpresszióját.

Ismeretes az Aurora B kináz fontos szabályozó szerepe a normál ploiditás fenntartásában: korai G2 fázisban a H3 hiszton foszforilálásán keresztül szabályozza a kromatin kondenzációt, ezáltal befolyásolja a mitózis iniciálását. Továbbá a CPC (Chromosome Passenger Complex) tagjaként a kromoszómák mitotikus orsóhoz való kapcsolását is szabályozza.

A H3 hiszton foszforilációja a mitózis előkészítésének kulcsfontosságú lépése. Kísérletesen bizonyítást nyert az Aurora B szabályozó szerepe a mitózis elindításában: a kináz G2/M fázisban Ser10 pozícióban foszforilálja a H3 hiszton, ezzel elindítva a kromatin kondenzáció folyamatát.

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

HeLa sejtvonalon végzett kísérletek adatai szerint az Aurora B overexpressziója pedig fokozott H3 hiszton foszforilációt, hibás kromatin kondenzációt és a kromoszómák nem megfelelő illesztését okozza.

Az Aurora kináz család tagjainak sokoldalú érintettsége a sejtosztódás szabályozásában, valamint a tumorgenezisben egyértelmű. A fokozott sejtproliferáció az agresszív daganatok egyik legjellemzőbb tulajdonsága. Az onkológiai kezelések között a sejtosztódásra ható szerek jelentős szerepet töltenek be. Újabban több olyan új hatóanyag is klinikai kipróbálásra került, melyek a sejtosztódás egyes elemeit, konkrétan az Aurora kináz B gátlását célozzák. A sejtosztódásra ható kezelések hatékonysága ugyanakkor egyelőre nehezen jelezhető előre.

Kísérleteink a sejtosztódás daganatokban megváltozott szabályozása és az Aurora B kináz funkció közötti viszonyt tisztázását célozzák. Mindez segíthet a megfelelő terápia kiválasztásánál, hatékonyságának előrejelzésénél, a betegség besorolásánál és a prognózis megállapításánál. Az Aurora kináz B, 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 teszi.

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

Vizsgálataink az agresszív malignus folyamatokban gyakori aneuploidia és az Aurora B kináz funkció közötti összefüggés megértését célozták.

Kísérleteinkben az Aurora B és a kinázzal kölcsönható fehérjék expresszióját szöveti szinten, immunhisztokémiai módszerekkel vizsgáltuk invazív emlőkarcinoma és agresszív limfóma mintákon.

A 17-es kromoszóma, valamint az AURKB és TP53 gének kópiaszámát fluoreszcencia in situ hibridizációval vizsgáltuk. A 17-es kromoszóma aneuszómia 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. Aurora B overexpresszió definiálása hisztológiai körülmények között
 - 1.2. Aurora B expresszió összefüggése az adott minta sejtproliferációs aktivitásával
 - 1.3. Aurora B kináz legfontosabb upstream és downstream kölcsönható fehérjék expressziójának vizsgálata
2. Invazív emlőtumor és limfóma minták FISH analízise AURKB, TP53 és CEP17 specifikus DNS szondákkal
 - 2.1. Vizsgálataink egyik fő céljaként meg kívántuk vizsgálni, hogy az Aurora B overexpresszió háttérben található-e AURKB génamplifikáció
 - 2.2. Az AURKB génnel 17p13.1 lókuszban szomszédos TP53 gén státuszának vizsgálata
 - 2.3. 17-es kromoszóma kópiaszámbeli eltéréseinek, valamint a minták ploiditásának vizsgálata
3. Aurora B overexpresszió és aneuszómia összefüggésének vizsgálata
4. Vizsgálataink során kapott eredmények összevetése a betegek klinikai adataival

ANYAG ÉS MÓDSZER

Invazív emlőkarcinoma minták

A DEOEC Pathologiai Intézetében 2009-2010 között diagnosztizált invazív emlőkarcinoma közül 50 szövettanilag alkalmasnak ítélt minta került elemzésre. Minden mintából formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövettani minta készült.

Emlőkarcinoma mintákhoz megfelelő kontroll csoport (normál emlőből származó szövet) nem állt rendelkezésre.

A kiválasztott 50 emlőkarcinoma minta közül szövettani besorolás alapján 45 ductalis, 5 lobularis invazív emlőkarcinomának bizonyult.

Molekuláris osztályozást követően 32 minta luminalis A (ER pozitív, PR pozitív, HER2 génamplifikáció negatív, Ki67 expresszáló sejtek aránya kevesebb, mint 20%), 4 minta luminalis B (ER pozitív, PR pozitív, HER2 génamplifikáció pozitív és/vagy Ki67 expresszió >20 %), 8 minta HER2 típusba (ER negatív, PR negatív, HER2 génamplifikáció pozitív), további 6 minta tripla negatív (ER negatív, PR negatív, HER2 génamplifikáció negatív) altípusba volt sorolható.

Ösztrogén receptor pozitivitást összesen 36, progeszteron receptor pozitivitást 27 szövettani mintában láttunk. Az 50 mintából 16 mintában nem volt detektálható c-erb-B2 expresszió. HER2 génamplifikációt 13 mintában figyeltünk meg.

Limfoid eltérések

Kísérleteinkbe a DEOEC Pathologiai Intézetében 2008 és 2012 között diagnosztizált agresszív B-sejtes limfóma esetek közül 50 került bevonásra. Az mintákból formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövettani minták készültek.

A beválasztott minták közül morfológiai és immunhisztokémia jellegzetességek alapján 41 diffúz nagy B-sejtes limfóma, másképp nem specifikált (DLBCL, NOS) szövettani diagnózist kapott, 3 minta ALK+ anaplasticus B-sejtes limfómának bizonyult (B-ALCL), 3 minta primer mediastinalis nagy B-sejtes limfómaként, további 1 minta borderline DLBCL – klasszikus Hodgkin limfómaként került leírásra.

A DLBCL, NOS mintákon belül a Hans-féle kritériumok alapján két alcsoportot hoztunk létre: a centrum germinativum (GCB) és nem centrum germinativum (non-GCB) immunhisztokémiai fenotípust mutató csoportokat.

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

Kontroll csoportként 10 reaktiv follicularis hyperplasiát mutató nyirokcsomó mintát használtunk. Kontroll mintáinkat formalinban való fixálást követően szintén paraffinba ágyasztuk. TMA blockjainkba 6 - 6, két kontroll mintából származó szövethenger került.

Szöveti microarray

Immunhisztokémiai eredményeink verifikálására a felhasznált mintákból szöveti microarrayt hoztunk létre.

Hematoxylin-eosin (HE) festett metszeteken a reprezentatív régiók jelölése után az egyes paraffinos blockokból TMA Master készülék (3DHistech Kft, Magyarország) segítségével 3-3db, egyenként 1 mm átmérőjű szövethenger került eltávolításra, majd az előkészített recipiens blockba való beillesztésre. A multiblockokba tájékozódást megkönnyítendő májból származó szövethengereket építettünk. Az egyes szövethengerek koordinátáit TMA Master 1.0 szoftver (3DHistech Kft, Magyarország) segítségével rögzítettük.

A szövethengerek és a recipiens block üregei között keletkező réseket olvasztott (56 °C) paraffinnal töltöttük ki.

Immunhisztokémiai vizsgálatok (IHC)

Immunhisztokémiai (IHC) 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, röviden: a metszetek deparaffinálása (xilol, 2×3 perc) után a metszeteket rehidráltuk (leszálló alkoholsor, 3-3 perc) majd magas nyomáson

feltártuk (maximális nyomáson 3 perc). A lemezek mosása (1×TBS, 2×5 perc) és blokkolása (1% BSA, 0,1% NP-40 in 1×TBS 120') után felcseppentettük a primer antitestet. 2 óra inkubálást követően a nem kötődött antitesteket 1×TBS-sel lemostuk, majd a metszetek szekunder antitesttel 40 percig inkubáltuk. A nem kötődött szekunder antitesteket 1×TBS oldatban lemostuk (2×5 perc). Az antigén-antitest kötődések vizualizálása DAB kromogén alkalmazásával történt (0,02 v/v% DAB DAB pufferben, szemkontroll mellett). A metszeteket csapvízzel öltítettük, majd hematoxylin háttérfestést végeztünk (Gill II hematoxylin, 5 másodperc, öblítés csapvízzel, majd desztillált vízzel). A metszeteket ezt követően dehidráltuk (acetonos, majd xilolos öblítés kétszer), majd xilobázisú médiummal (Surgipath Micromount, Leica Microsystems, Németország) fedtük.

A jelölések kiértékelését Leica DM 2500 fénymikroszkóppal a Fénymikroszkópia részben leírtaknak megfelelően végeztük.

Fénymikroszkópia

A MIB-1, Aurora B, és survivin pozitív sejtfrakciók százalékos arányát az összes tumorsejthez viszonyítva határoztuk meg.

A H3S10P expresszáló mitotikus sejtek számát 10 nagy nagyítású látótérre (/10 HPF) vonatkoztatva határoztuk meg.

Kontroll mintáinkban a vizsgált fehérjék expressziójának meghatározása a centrum germinativumokban történt. Mintánként 10 centrum germinativumot 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).

Limfóma minták Aurora B overexpresszióra vonatkozó cut off értékét kontroll mintáink adatai alapján, AMI számtani közép+2SD képletet alkalmazva 0,5-nél határoztuk meg.

Inzvív emlőkarcinoma minták - nem lévén megfelelően definiálható kontroll csoport - az Aurora B overexpresszió határértékét irodalmi adatok alapján 0,3 feletti értéknél határoztuk meg.

A mitózis index meghatározása HE festet metszetek alapján, a mitotikus formák számának megadásával történt, 10 nagy nagyítású látótérben.

Reaktiv follicularis hyperplasia minták kiértékelését a centrum germinativumokban végeztük.

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 génstátusz meghatározásához 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. Röviden: az 5 µm vastag metszeteket NeoClear-ben deparaffinizáltuk (Merck, Németország, 3×10 perc), majd Abbott DNS szonda alkalmazása esetén 0,2 M HCl-lel kezeltük (20 perc). Ezt követően a lemezeket 0,8 M NaSCN (20 perc, 80°C) és 0,4 m/V% pepszin oldattal (10 perc, 37°C) kezeltük. A lemezekre 5-5 µl DNS szondát tartalmazó hibridizációs elegyet cseppentettünk. A kodenaturációt TP53/CEP17 szonda esetén 75°C-on 10 percig, AURKB/SE17 szonda használatkor 80°C-on 5 percig végeztük. A hibridizációs lépés mindkét DNS szonda alkalmazásakor 37°C-on történt egy éjszakán át. A kodenaturációs és hibridizációs lépések ThermoBrite (Abbott Molecular) félautomata hibridizációs kamra segítségével történtek.

A nem kötődött szondák lemosására a gyártók által ajánlott mosópuffereket (0.3% Triton X-100/2×SSC és 2×SSC) alkalmaztuk. A sejtmagok festésére DAPI-t (1000 ng/ml, Abbott Molecular ill. Kreatech Diagnostics) használtunk.

Emlőtumor minták HER2 génamplifikációs és 17-es kromoszóma kópiaszám státuszának meghatározása DAKO HER2 FISH PharmDx (DAKO, Dánia) kittel történt. A konvencionális FISH eredményeit DAKO HER2 Instant Quality FISH PharmDx (DAKO, Dánia) kit alkalmazásával megerősítettük.

A HER2 FISH-t a gyártó által javasoltaknak megfelelően végeztük. Röviden: az FFPE metszeteket deparaffinálás és rehidráálás után MES-sel

előkezeltük (10 perc forrásponton mikrohullámú sütőben, majd 15 perc hűtés szobahőn). Ezt követően a metszeteket pepszin oldattal kezeltük, konvencionális PharmDx esetén 5 percig szobahőn, IQFISH kit esetén 20 percig 37°C-on. A denaturációt 82°C-on 5 percig végeztük konvencionális-, 66°C-on 10 percig IQ FISH kittel. A hibridizációs hőmérséklet mindkét kit használatakor 45°C, Pharm Dx kit esetében az inkubációt overnight, IQFISH esetében pedig 90 percig végeztük. A be nem kötődött DNS szondák lemosása mindkét kittel „stringent wash buffer”-rel, 10 percig történt 65°C-on-on. A sejtmagokat DAPI-val festettük (1000 ng/ml, DAKO).

A kiértékelést a Fluoreszcens mikroszkópia részben leírtaknak megfelelően végeztük.

Fluoreszcens mikroszkópia

A FISH kiértékelését Zeiss Axio Imager Z2 fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss, Németország), 63× olaj-immersiós objektívvel (Zeiss, NA: 1,4) és Isis (Metasystems, Németország) képalkotó rendszerrel végeztük.

Az emlőkarcinoma minták invazív régióiból 100-100, limfóma minták reprezentatív régióiból 50-50 tumoros sejtmagot értékeltünk.

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

- a) diszómia: follicularis hyperplasia mintákon megfigyelt átlagos sejtenkénti kromoszómaszám alapján határoztuk meg:
átlagos kromoszóma kópiaszám+2SD=1,814+2×0,081=1,98
- b) hiperdiszómia: 1,98 és 2,3 átlagos sejtenkénti kromoszómaszám között
- c) triszómia: 2,3-3,3 átlagos sejtenkénti kromoszómaszám között
- d) tetraszómia: 3,3-4,3 átlagos sejtenkénti kromoszómaszám között

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 sejtmag szuszpenziókon végeztük el.

A sejtmag szuszpenziókat a Hedley által leírt protokollnak megfelelően preparáltuk, apró módosításokkal. A paraffinos szöveti blockokból 1-1 darab 50 μm vastag metszetet készítettünk, melyeket Eppendorf csövekbe helyeztünk. Deparaffinálás után (NeoClear, 3 \times 10 perc) a mintákat gyakori, erőteljes vortexelés mellett 0,8 m/V% pepszin oldattal kezeltük (120 perc, 37°C). A szuszpenziókat 50 μm pórusátmérőjű nylonmembránon átszűrtük. A sejtmagok lecentrifugálása után (3000 g, 8 min) a pelletet 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI/1 \times PBS oldatban reszuszpendáltuk.

Emlőkarcinoma minták esetén a sejtmag-suszpenziók preparálása nem volt sikeres.

A minták DNS tartalmának mérését FACSaria II készülékkel és FACSDiva v6.1.3. szoftver használatával végeztük. Mintánként 100000 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 sejtmag szuszpenziókat használtunk.

Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai analízisét SPSS (v20.0, IBM, USA) és 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 rátái közötti különbségek szignifikanciájának meghatározását log-rank teszttel vizsgáltuk. Ebben az esetben is a $p \leq 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

Aurora B kináz expresszió vizsgálata invazív emlőkarcinoma mintákban Invazív emlőkarcinoma minták klinikai és biológiai paraméterei

Vizsgálataink során összesen 50 emlőkarcinoma mintát vizsgáltunk. 45 minta morfológiailag invazív ductalis emlőkarcinomának, 5 minta invazív lobularis karcinomának bizonyult.

Aurora B expresszió

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

Adataink alapján emlőkarcinoma mintákban az Aurora B kináz expresszáló 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 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 expresszáló szöveti mintákban ($R:0,77$).

Az Aurora B és MIB-1 expressziók közötti lineáris korreláció miatt a kináz overexpresszió 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 emlőkarcinoma mintából 20-ban volt megfigyelhető az Aurora B relatív overexpressziója.

A relatív Aurora B expresszió statisztikailag függetlennek bizonyult a HER2 gén- és ER-, PR receptor státuszoktól.

HER2 és 17-es kromoszóma státusz vizsgálata HER2 PharmDx és HER2 IQFISH PharmDx alkalmazásával

Eredményeink alapján a hagyományos és IQFISH kittel detektálható 17-es kromoszóma és HER2 génaplikációs státuszok közötti egyezés mértéke 100%.

A HER2 kópiaszám detektálása hagyományos kittel 3 mintában morfológiai károsodás és magas háttér fluoreszcencia miatt nehézkes volt, ugyanezek a minták IQFISH kittel lényegesen megtartottabb morfológiát mutattak, kevés háttérfluoreszcencia mellett.

17p13.1 lókuszt és 17-es kópiaszám változások

Az Aurora B kináz overexpresszió citogenetikai hátterének vizsgálatát FISH módszerrel végeztünk.

A minták invazív régiókból 100-100 sejtmag került értékelésre. AURKB és TP53 géneket deletálnak 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 határoztuk meg.

Az Aurora B overexpressziót mutató minták egyikében sem láttunk AURKB génaplikációt.

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 gének kópia száma között összefüggést nem figyeltünk meg. A 13 HER2 génaplikációt mutató minta közül 4-ben láttuk a TP53 és/vagy AURKB gének allélvesztését.

A 17-es kromoszóma sejtenkénti számát 1,5 és 3,9 között figyeltük meg, aneuszómiát – több mint 2,3 CEP17 szignált sejtmagonként - 19 mintában láttunk (38%).

Az AURKB és TP53 együttes allélvesztésével 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 aneuszómiaát mutatott.

Az intakt 17p13.1 lókusszal bíró minták kromoszómálisan stabilabbaknak bizonyultak, a 17-es kromoszóma kópiaszáma 1,6 és 3,19 között változott (átlag: 2,1, SD: 0,05). A különbség statisztikailag szignifikáns ($p < 0,0001$).

Emlőkarcinoma 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 expresszió és numerikus kromoszóma-rendellenességek összefüggéseinek tisztázására a kináz expresszió függvényében a 17-es kromoszóma és a 17p13.1 lókusz sejtenkénti kópiaszámát.

Sem a Ki67, sem az Aurora B expresszió nem mutatott összefüggést a 17-es kromoszóma státusszal.

Az Aurora B expresszáló sejtfrakciók aránya és az AURKB kópiaszáma között gyenge pozitív korrelációt találtunk ($R=0,26$).

Azokban az mintákban, amelyekben normál AURKB génkópiaszám volt megfigyelhető, az Aurora B kináz expresszáló tumorsejtek arányát 0 és 35 % között láttuk (átlag: 6,47, SD: 9,26). Az AURKB géndeléciónal 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 lókusz kópiaszám 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 emlőkarcinoma minták egy csoportjában extrém magas AMI értéket ($AMI \geq 0,8$) figyeltünk meg. Ezekben a mintákban az AURKB relatív génkópia számában is emelkedést láttunk (átlag: 1,1 SD: 0,2), míg a normál 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 expresszió vizsgálata agresszív B-sejtes limfómákban

Kísérleteinkbe összesen 50 agresszív B-sejtes limfóma minta került bevonásra.

A minták közül immunhisztokémiai fenotípusuk alapján 41 DLBCL, NOS-ként volt definiálható. Ezeket az mintákat 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 emlőkarcinoma mintákhoz hasonlóan anti-Ki67 (MIB-1), anti-survivin és anti-Aurora B antitestek alkalmazásakor is sejtmag pozitivitást láttunk kontoll 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.

Follicularis hyperplasia mintákban az immunhisztokémiai reakciók értékelése a centrum germinativumokban történt.

A kontrollként használt follicularis hyperplasia minták centrum germinativumaiban az Aurora B pozitív sejtfrakciókat 23 és 36,5% között láttuk. (átlag±SD: 30,45±5,06). Ugyanez az érték agresszív B-sejtes limfóma mintákban 5 és 70% között volt detektálható (28,2±15,32).

A kontroll csoporthoz viszonyítva az 50 agresszív B-sejtes limfóma minta a 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 13-133/10 HPF között (50,04±27,53, $p=2,27 \times 10^{-12}$) láttuk. Ugyanezek az expressziós arányok follicularis hyperplasia mintákban 75 és 87% között (77,8±4,99) illetve 92 és 175/10 HPF (134,1±23,72) értékek között voltak detektálhatóak.

Invazív emlőkarcinoma mintáinkhoz hasonlóan agresszív B-sejtes limfóma és follicularis hyperplasia mintákban is láttuk az Aurora B kináz sejtproliferációs aktivitástól való függését (R: 0,5 illetve 0,7).

A kináz overexpresszió definiálásához meghatároztuk az AMI indexet, ami follicularis hyperplasia mintákon 0,31 és 0,48 között (átlag±SD: 0,39±0,06), B-sejtes limfóma mintákon 0,17 és 0,85 között (0,44±0,2) volt megfigyelhető.

Az Aurora B overexpresszió cut off értéket a kontroll csoportban detektált átlag AMI+2SD 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 normál, 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 minták volt látható, de megemlítenéd, hogy ebbe az alcsoportba mindösszesen 3 minta volt sorolható.

Aurora B és survivin expresszió összefüggése

Follicularis hyperplasia mintákban a survivin expresszáló sejtek arányát 28,5 és 61% között (átlag±SD: 45,5±11,22) detektáltuk.

Ugyanez az érték limfóma mintákban 10 és 85% közöttinek (39,54±20,69) bizonyult. A különbség statisztikailag nem szignifikáns.

Adataink szerint az Aurora B kinázt expresszáló valamint a survivin pozitív sejtek aránya között erős pozitív korreláció van mind kontroll, mind limfóma mintákban (R érték kontroll mintákban 0,85, limfóma mintákban 0,71 volt).

Mitotikus aktivitás vizsgálata foszfo-H3 hiszton (Ser10) mitózis marker 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.

Follicularis hyperplasia mintákhoz hasonlítva limfóma mintákban a H3S10P pozitív mitotikus sejtek jelentősen kevesebb mennyiségben voltak detektálhatóak ($p=3,77 \times 10^{-7}$).

Agresszív B-sejtes limfóma alcsoportok között H3S10P expresszió tekintetében jelentős különbségeket nem tapasztaltunk.

Az Aurora B kinázt expresszáló és foszfo-H3 hiszton (H3S10P) pozitív mitotikus sejtek mennyisége között gyenge pozitív korrelációt figyeltünk meg, az R érték kontroll mintáinkban 0,26; B-sejtes limfóma mintákban 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 kinázt expresszáló sejtfrakciók aránya között agresszív B-sejtes limfóma mintákban 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 \pm SD: 0,52 \pm 0,25). Ugyanez az érték intakt 17p13.1 régióval rendelkező mintákban 0,19 - 0,83 (0,43 \pm 0,2), reaktív nyiroksomókban 0,31 és 0,48 (átlag \pm SD: 0,39 \pm 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 allélvesztéssel társuló B-sejtes limfóma mintákban az Aurora B pozitív sejtek arányát 10 és 60 % között (átlag \pm SD: 33,75 \pm 18,5), intakt 17p13.1 régióval rendelkezőkben 5 és 70 % között (27,18 \pm 14,75),

kontroll mintákban 23 és 36,5 % között ($31,27 \pm 4,65$) láttuk. A különbségek statisztikailag nem szignifikánsak.

A 17-es kromoszóma aneuzómiája gyakori jelenségnek bizonyult. Diszómiát mindösszesen 4 mintában észleltünk, aneuzómia 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).

AMI értékek alapján alacsony, normál és fokozott Aurora B kináz relatív expressziót mutató limfóma minták között szignifikáns eltérések a 17-es kromoszóma kópiaszámát illetően nem mutatkoztak.

Áramlási citometriás mérésekhez 34 agresszív B-sejtes limfóma és 8 kontroll minta bizonyult alkalmasnak. A FISH-sel 17-es kromoszóma aneuzómiát 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 normál 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 különbséget nem figyeltünk meg.

A 17-es kromoszóma státusz alapján a hiperdiszómiát mutató mintákhoz társult a legkedvezőtlenebb teljes túlélési idő, a különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,27$).

MEGBESZÉLÉS

Az Aurora B és a hozzá hasonló mitotikus kinázok expressziója a kromoszomális instabilitás és mitotikus szabályozási zavarok következményeként kialakuló aneuploidia/aneuszómia és agresszív tumorfenotípus lehetséges biomarkerei.

Ahogy az más munkacsoportok is leírták az Aurora B kináz expresszió hagyományos, mindennapi szövettani diagnosztikában alkalmazott módszerekkel vizsgálható.

Az Aurora B expresszió detektálhatósága normál sejtsztódási körülmények között a korai G2 fázistól az M fázis végéig tartó szakaszra korlátozódik. A kinázt expresszáló tumorsejt frakciót önálló változóként vizsgálva az Aurora B pozitív sejtek megnövekedett arányát gyakran overexpresszióként írják le, ezt egyéb biológiai jellemzők, mint a háttérben álló AURKB génamplifikáció vagy egyéb, a kináz génjét érintő genetikai rendellenességek nem erősítik meg.

Az Aurora B kináz expressziója emlőkarcinómában és agresszív B-sejtes limfómában

Eredményeink alapján az Aurora B kináz expresszióban gyakran látható növekedés mind invazív emlőkarcinoma, mind agresszív B-sejtes limfóma esetében jelentős korrelációt figyeltünk meg a teljes proliferáló sejtfrakció (MIB-1 pozitív) és Aurora B kinázt expresszáló sejtfrakciók között. A korrelációs koefficiens (R) emlőtumor mintákban 0,77, limfóma mintákban 0,5, kontroll mintáinkban 0,7 volt. A kináz expressziója eredményeink alapján jelentős mértékben függ az adott minta sejtproliferációs aktivitásától, tehát a fokozott sejtproliferáció kísérőjelenségeként a G2 és M fázisban lévő sejtek aránya is növekszik.

Az Aurora B overexpresszió határértékének meghatározása az adott szövetre jellemző sejtproliferációs aktivitás figyelembe vételével kell, hogy történjen. Ezért az Aurora B overexpresszió definiálására bevezettük az Aurora B/MIB-1 hányadost (AMI index), amely figyelembe veszi az adott tumorra jellemző sejtproliferációs aktivitást.

Intenzíven osztódó follicularis hyperplasia mintákban az AMI értékét átlagosan 0,39 (\pm 0.05) értéken tapasztaltuk, az overexpresszió határértékét B-sejtes limfóma mintákban az AMI átlag+2SD képlet alapján 0,5 értéknél határoztuk meg. Ez a magas arány a G2 és M fázisban lévő sejtek relatív feldúsulásával magyarázható. Ez a jelenség emlődaganatban ritkán látható. Az emlőtumor és limfóma mintákban tapasztalt fokozott Aurora B expresszió gyakran az adott mintában érvényesülő sejtosztódási stimulus kísérőjelensége.

Agresszív, HER2 génamplifikáció pozitív, szteroid receptor negatív emlőtumor mintákban az Aurora B szignifikánsan emelkedett expresszióját láttuk, ugyanakkor a sejtosztódási aktivitással korrelációban az AMI index alapján a relatív kináz expresszió nem mutatott statisztikailag szignifikáns eltérést a többi mintához viszonyítva. Eredményeink elemzését követően egyértelmű korrelációt az Aurora B overexpresszió és más, emlőtumorkban általánosan vizsgált immunhisztokémiai paraméterek között nem találtunk.

Aurora B overexpresszió citogenetikai háttere

FISH vizsgálattal az Aurora B overexpresszió háttérben génamplifikációt nem tudtunk kimutatni.

6 emlődaganat és 4 limfóma mintában láttuk az AURKB delécióját, mely minden esetben TP53 delécióval társult.

Irodalmi adatok alapján a TP53 gén deléciója önmagában szolid tumorokban és leukémiában is gyakori jelenség. TP53 deléciót 10 invazív emlőtumor mintában figyeltünk meg, ez 6 mintában társult AURKB delécióval. 11 B-sejtes limfóma mintában láttunk TP53 deléciót, ezek közül 4 járt AURKB vesztéssel.

Citogenetikai eredményeink alapján erős kapcsolatot találtunk a TP53 és AURKB lókuszek között emlődaganatos (R: 0,73) mintákban. Ez a kapcsolat agresszív B-sejtes limfóma mintáknál is hasonló volt (R:0,54).

Emlőkarcinoma és agresszív B-sejtes limfóma minták ploiditása

A 17-es kópiaszám rendellenessége emlőtumoros és limfóma mintákban gyakran megfigyelhető jelenség.

Eredményeink alapján a 17-es kromoszóma aneuszómia gyakori agresszív B-sejtes limfómában: 50 mintából 46-ban láttunk számbeli rendellenességet. A

legmagasabb kromoszómaszámokat B-ALCL láttuk, a minták mindegyike TP53 deléciót mutatott.

Emlődaganatos mintáink citogenetikai eredményei alapján a 17p13.1 vesztés és a 17-es kromoszóma poliszómia között erős korreláció van: azokban a mintákban, amelyekben jelen volt 17p13.1 lókuszt vesztés, szignifikánsan magasabb volt az aneuszómia aránya. Bár a 17p13.1 vesztéssel járó minták száma meglehetősen alacsony volt, az adatok alapján a lókuszt vesztése és a malignus sejtklonok keletkezésének valamint túlélésének összefüggésének egy lehetséges magyarázatára következtethetünk.

Dar és munkacsoportja adatai alapján az aneuploidia, valamint a többmagvú sejtek megjelenése a p53 deficienciával társuló mintákban a leggyakoribb. Összefüggést találtak a 17-es kromoszóma aneuszómiája és a tumor agresszivitás között, továbbá ismeretes, hogy a FISH-sel detektálható kromoszóma aneuszómia jól korrelál a minták ploiditásának változásával.

Az AURKB gén érintettségével a kináz, és rajta keresztül a CPC komplex funkciója is károsodhat, ami mitotikus szabályozási zavarhoz, aneuszóm sejtpopulációk megjelenéséhez vezet. A TP53 deléció következtében kialakuló p53 deficiencia pedig egy fontos apoptotikus útvonal sérülésével a sejtklonok túlélésének kedvez. A két hatás együttes érvényesülése aneuszóm sejtpopulációk keletkezéséhez és fennmaradásához vezet.

Aurora B, mint mitotikus regulátor

Újabb sejtvonalt-kísérletes eredmények szerint az Aurora B kinázfunkció gátlása kapcsán a foszforilált (Ser10) H3 hiszton (H3S10P) mennyiségének drámai csökkenését írták le. Aurora B fokozott expressziójának következményeként pedig a H3S10P detektálható mennyiségében is növekedést láttak HeLa sejtvonalon végzett kísérletekben.

Agresszív B-sejtes limfóma mintáinkon a H3S10P pozitívitas csökkenését láttuk a kontroll follicularis hyperplasia mintákhoz viszonyítva, az Aurora B expresszió mértékében statisztikailag jelentős különbségeket nem találtunk. Ugyanakkor az Aurora B kinázt overexpresszáló mintákban a H3S10P pozitív sejtek számát tekintve szignifikáns emelkedés volt a jellemző a kináz normál relatív expresszióját mutató B-sejtes limfóma mintákhoz viszonyítva.

A jelenség lehetséges magyarázata az Aurora B overexpresszió következtében felgyorsuló G2/M átmenet. Ennek következményeként a G2/M ellenőrzési pont funkciója sérül, a mitotikus vagy genetikai rendellenességek javítása elmaradhat.

Vizsgáltuk az Aurora B és a kináz aktivitását upstream reguláló survivin expresszió összefüggéseit. Immunhisztokémiai eredményeink alapján a survivin expressziója a sejtciklusban az Aurora B expressziójánál korábban detektálható, a survivin pozitív sejtek aránya jól korrelál az Aurora B pozitivitással. Az esetleges dereguláció, a survivin Aurora B expressziót befolyásoló hatása az általunk alkalmazott eszközökkel nem állapítható meg.

Klinikopathológiai eredmények értékelése

Az agresszív B-sejtes limfóma minták közül immunhisztokémiai fenotípusuk alapján 41 minta DLBCL, NOS-ként volt definiálható. Ezeket a mintákat Hans kritériumok alapján két alcsoportba soroltuk: 29 minta nem centrum germinativum (non-GCB), 14 centrum germinativum (GCB) típusba tartozott.

3 minta primer mediastinalis nagy B-sejtes limfómának (PMBL), 3 minta ALK+ nagy B-sejtes limfómának (B-ALCL), további 1 minta átmeneti DLBCL-klasszikus Hodgkin-like limfómának bizonyult.

Az alcsoportok között szignifikáns különbségeket a megvizsgált immunhisztokémiai és FISH paraméterekben nem észleltünk.

A legfokozottabb relatív Aurora B expressziós értékeket B-ALCL mintákban láttunk, e minták 17-es kromoszóma státusza és mitotikus aktivitása is a legmagasabbnak bizonyult.

A mintákban az Aurora B overexpressziója és a betegek túlélési ideje között egyértelmű összefüggés nem volt kimutatható.

Eredményeink alapján az Aurora B önálló biomarkerként nem alkalmazható a genetikai instabilitás indikátoraként, jelentős sejtsztódástól való függése miatt. A sérült kinázfunkció demonstrálására a H3S10P expresszió vizsgálata alkalmazható szövettani körülmények között, indirekt módon a genetikai instabilitás jelzője is lehet.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink során elemeztük, hogy emlődaganatok (N=50) és B-sejtes limfómák (N=50) szöveti mintáiban az Aurora B expresszió hogyan befolyásolja a szolid daganatokban megfigyelt gyakori kromoszómaszám eltérések megjelenését.

Eredményeink alapján a legfontosabb következtetéseink:

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 expresszáló tumorsejtek arányának figyelembe vételével 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 limfóma mintákban az Aurora B relatív overexpressziója magasabb mitotikus aktivitással társul.
4. Az overexpresszió háttérben génamplifikációt nem figyeltünk meg. Invazív emlőtumorok és limfóma mintáknál 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 aneuzómiája a vizsgált betegcsoportok szöveti mintáiban gyakori jelenségnek bizonyult. A minták FISH-sel kimutatható aneuzómiája jól reprezentálja az egyes minták áramlási citometriával meghatározott ploiditását.
6. Az Aurora B fehérje expresszió 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 aneuszómiás sejtpopulációk megjelenését eredményezheti. A TP53 deléciója pedig egy fontos apoptotikus útvonal sérülésének következtében valószínűleg a malignus sejtpopulációk túlélésének kedvez.

Iktatószám: DEENKÉTK/17/2014
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Hegyi Katalin
Neptun kód: UJ154W
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Mint azonosító: 10034459

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Hegyi, K.,** Lenborg, 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 (6), 567-571, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/PAI.0b013e318288dcdc>
IF: 1.828 (2012)
2. **Hegyi, K.,** Egervári, K., Sándor, Z., Méhes, G.: Aurora Kinase B Expression in Breast Carcinoma: Cell Kinetic and Genetic Aspects.
Pathobiology. 79 (6), 314-322, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000338082>
IF: 1.948
3. **Hegyi, K.,** Méhes, G.: Mitotic failures in cancer: Aurora B kinase and its potential role in the development of aneuploidy.
Pathol. Oncol. Res. 18 (4), 761-769, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-012-9534-8>
IF: 1.555



További Közlemények

4. Murnyák B., Csonka T., **Hegyi K.**, Méhes G., Klekner Á., Hortobágyi T.: Magas grádusú gliomák előfordulása és molekuláris patológiája.
Idéggogy. Szle. 66 (9-10), 312-321, 2013.
IF:0.348 (2012)
5. Méhes, G., **Hegyi, K.**, Csonka, T., Fazakas, F., Kocsis, Z., Radványi, G., Vadnay, I., Bagdi, E., Krenács, L.: Primary uterine NK-cell lymphoma, nasal-type: A unique malignancy of a prominent cell type of the endometrium.
Pathol. Oncol. Res. 18 (2), 519-522, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-011-9360-4>
IF:1.555
6. Páyer, E., Miltényi, Z., Simon, Z., Szabados, L., **Hegyi, K.**, Méhes, G., Illés, Á.: Uncommon late relapse of angioimmunoblastic T-Cell lymphoma after 16-year remission period.
Pathol. Oncol. Res. 18 (3), 737-741, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-011-9475-7>
IF:1.555

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8.789

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5.331

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománytermetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.01.23



Hegyi K, Bedekovics J, Dócs O, Irsai G, Gergely L, Beke L, Méhes G:
**Mitotic kinase Aurora B is frequently overexpressed in aggressive B-cell
lymphoma** (Pathology International, bírálólat alatt)

KONFERENCIA ABSZTRAKTOK

2013 **Hegyi K**, Bedekovics J, Méhes G: A hiszton 3 foszforiláció és a kromoszóma kondenzáció kinetikájának eltérései diffúz nagy B-sejtes lymphomában (poszter), *Magyar Onkológus Társaság XXX. Kongresszusa*, Pécs

2013 **Hegyi K**, Bedekovics J, Dócs O, Méhes G: Aurora B kináz dereguláció vizsgálata diffúz nagy B-sejtes lymphomában (előadás), *Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola PhD Szimpóziuma*, Debrecen

2013 **Hegyi K**, Bedekovics J, Dócs O, Méhes G: Aurora B kináz dereguláció vizsgálata diffúz nagy B-sejtes lymphomában (előadás), *Magyar Hematológiai és Transzfuziológiai Társaság XXIV. Kongresszusa*, Debrecen

2012 **Hegyi K**, Méhes G: Aurora B kináz deregulációja diffúz nagy B-sejtes lymphomában (poszter), *Magyar Humán-genetikai Társaság IX. Kongresszusa*, Szeged

2012 **Hegyi K**, Lonborg C, Mónus A, Méhes G: Demonstration of HER2 gene copy alterations using the high-speed IQFISH test in breast carcinoma (előadás), *Pannonia Congress of Pathology*, Siófok

2012 **Hegyi K**, Méhes G: HER2 gene status by fluorescence in situ hybridization in comparison with chromogenic in situ hybridization in breast cancer (poszter), *Pannonia Congress of Pathology*, Siófok

2011 **Hegyi K**, Méhes G: Aurora kináz B overexpresszió genetikai hátterének vizsgálata invazív emlődaganatokban (poszter), *Magyar Onkológusok Társasága XXIX. Kongresszusa*, Budapest

2011 **Hegy K**, Méhes G: AURKB és TP53 kodelési összefüggései a ploidotással és a sejtproliferációval emlődaganatokban (előadás), *70. Patológus Kongresszus, Siófok*

2011 **Hegy K**, Egervári K, Sándor Zs, Méhes G: A sejtsztódás rendellenes- ségeit és a kromoszómaszám változását eredményező szabályozási mechanizmusok vizsgálata malignus daganatokban (előadás), *Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola PhD Szimpóziuma, Debrecen*

2010 **Hegy K**, Méhes G: Az Aurora kináz B és a 17p13.1 génlókusz összefüggéseinek vizsgálata emlődaganatokban (előadás), *Magyar Humán-genetikai Társaság VIII. Kongresszusa, Debrecen*

2010 **Hegy K**, Méhes G: A mitotikus apparátus szabályozásának zavarai malignus folyamatokban: fókuszban az Aurora kinázok (előadás), *Fókuszban a Jelátvitel Szimpózium, Budapest*

2010 **Hegy K**, Egervári K, Sándor Zs, Méhes G: Aurora-kinase B expression is dependent on cell proliferation in breast carcinoma (poszter), *Pannonia Congress of Pathology, Graz*

TÁMOGATÁSOK

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt keretében zajlott.

A dolgozat a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 “Vaszkuláris és kardiális kutatóhálózat: Az ér- és a kardiovaszkuláris betegségek patomechanizmusai, diagnosztikai, farmakológiai befolyásolhatóságuk az alapkutatás szintjén” című pályázat támogatásával készült.

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

