EZH2 és mikroRNS expressziós vizsgálatok pszeudofollikuláris mintázatot mutató krónikus lymphocytás leukémiás nyirokcsomókban

Doktori tézisek

Dr. Szurián Kinga

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Reiniger Lilla, Ph.D, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Mikala Gábor, Ph.D, klinikai főorvos

Dr. Nagy Zsolt, Ph.D, egyetemi adjunktus

Komplex vizsga bizottság elnöke:

Dr. Schaff Zsuzsanna, Ph.D, MTA doktora

Komplex vizsga bizottság tagjai:

Dr. Tóth Erika, Ph.D, oszt. vez. főorvos

Dr. Patócs Attila, Ph.D, MTA doktora

Budapest, 2018

I. BEVEZETÉS

A krónikus lymphocytás leukemia (CLL) monomorf, kicsi, kerek vagy ovális morfológiájú atípusos érett B-sejtekből, valamint az ezen sejtek között megjelenő nagyobb méretű prolymphocytákból és paraimmunoblastokból álló proliferáció a perifériás vérben (PV), csontvelőben (CSV), lépben és nyirokcsomókban. A World Health Organization (WHO) osztályozása alapján az érett B-sejtes non-Hodgkin lymphomák közé tartozó, alacsony malignitású lymphoma. A kis lymphocytás lymphoma (SLL) a CLL eltérő megjelenési formája, ahol a CLL-es sejtek a nyirokcsomókat és a lépet infiltrálják, de a csontvelőt és a perifériás vért nem. A CLL a „nyugati országok" felnőtt lakosságának leggyakoribb leukémiás megbetegedése, az összes non-Hodgkin lymphoma mintegy 7%-a. Az incidencia az életkorral nő. Férfi predominancia megfigyelhető, a férfi : nő arány 1.7 : 1.

A nyirokcsomót érintő CLL/SLL szövettani morfológiája alapján diffúz és pszeudofollikuláris mintázatot mutató formákat különböztetünk meg. Pszeudofollikuláris a mintázat, ha 20x-os látótérnél nagyobb vagy egymással összefolyó pszeudofollikulusok (PF) láthatóak. A PF-ek területén prolymphocyták és paraimmunoblasztok akkumulálódnak, míg a környező kissejtes területeken (interfollikuláris terek, IF) kisméretű neoplasztikus sejtek vannak jelen. A PF sejtjei CD10 és Bcl-6 negatívak, Bcl-2 pozitívak, a típusos CLL sejtek között nagyméretű Ki-67 pozitív sejtek vannak jelen.

A CLL/SLL sejtjeire a CD20, CD22, CD5, CD19, CD79b, CD23 és CD43, valamint változó mértékben a zéta-asszoaaciált protein-70 (ZAP-70) expressziója jellemző. A genetikai szerveződést tekintve a CLL heterogén betegségcsoport. Floureszcens in-situ hibridizációs (FISH) vizsgálattal az esetek kb. 80%-ában mutatható ki valamilyen citogenetikai eltérés. Az esetek mintegy 50%-ában a 13q14.3 deléciója, kb. 20%-ában a 12-es kromoszóma triszómiája, 25%-ban a

11q22-23 deléciója van jelen. Emellett gyakori a 17p13 és a 6q21 deléciója. A 13q14.3 régióban lokalizálódnak a miR-16-1 és miR-15a mikroRNS-ek, míg az *ATM* gén a 11q22-23, és a *TP53* gén a 17p13 regióra lokalizálódik. További genetikai jellemző az expresszált immunglobulin nehéz lánc gén variábilis régiójának (*IgHV* gén) mutációs státusza. A gén lehet mutálatlan, de az esetek 50-60%-ában szomatikus mutációt hordoz.

A betegek prognózisának megítélésében a stádiumbeosztás mellett a citogenetikai eltérések a meghatározóak. A nem mutált *IgHV* gén, a fokozott ZAP-70 és CD38 protein expresszió és a del11q rosszabb prognózist jelent. A legújabb vizsgálatok alapján – terápiás szempontból – az egyik legfontosabb prognosztikai tényező a *TP53* mutációs státusz. Ezenfelül az agresszívebb lefolyású esetekben szövettanilag nagyméretű vagy összefolyó PF-ok láthatóak.

A CLL a betegek mintegy 5-30%-ában agresszívebb formába transzformálódik. A transzformáció leggyakrabban a nyirokcsomókban, ritkán a csontvelőben alakul ki. A transzformáció következtében a betegek várható élettartama jelentősen lecsökken. A leggyakoribb transzformációs forma, mely a betegek mintegy 2-8%-ában alakul ki, az ún. Richter transzformáció (Richter szindróma, RT), melynek során a CLL diffúz nagy B-sejtes lymphomába (DLBCL) transzformálódik. Ritkábban prolymphocytás lymphomába, Hodgkin-lymphomába vagy akut lymphoid leukémiába való transzformáció is előfordul.

Számos tanulmány igazolja a PF-ok jelentőségét a betegség progressziójában és prognózisában. Utánkövetéses vizsgálatokban a betegség előrehaladtával a PF-ok száma és mérete növ; a PF-is mintázatot mutató CLL agresszívabb lefolyású. A PF-okban Ki-67-tel magasabb proliferációs ráta igazolható, illetve a PF-ok sejtjeiben fokozott a c-Myc és a ciklin D2 expressziója. Munkacsoportunk korábbi tanulmányaiban igazolta, hogy a pszeudofollikuláris

mintázatot mutató CLL-es betegek nyirokcsomóiban a rosszabb prognózissal járó citogenetikai eltérések a pszeudofollikulusok sejtjeiben nagyobb gyakorisággal fordulnak elő. Az irodalomból ismert, hogy a pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL esetek gyakrabban transzformálódnak agresszívabb formába.

A mikroRNS-ek (miRNS, miR) olyan rövid, nem kódoló, körülbelül 22-24 nukleotid hosszúságú RNS molekulák, melyek a poszttranszkripciós szabályozás fontos szereplői. Negatív szabályozási szerepet töltenek be. A mikroRNS-ek sokszor onkogének és tumorszuppresszor gének közelében lokalizálódnak. A daganatok kialakulásában kulcsfontosságú szerepet játszanak. Szolid tumorok mellett malignus hematológiai betegségekben, így a különböző lymphomákban is kórosan expresszálódnak bizonyos miRNS-ek. Az irodalmi adatok alapján a CLL kialakulásával és progressziójával több mint 20 miR szerepe hozható összefüggésbe.

Az enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) a polycomb repressor complex 2 (PRC2) tagja. A H3 hiszton 27-es lysinén metilál. Szerepet játszik a sejtciklus és sejtdifferenciálódás szabályozásában. Számos gén transzkripciójának epigenetikus szabályozója. Az EZH2 overexpressziója ismert a high-grade centrum-germinativum (CG) eredetű lymphomákban, úgymint diffúz nagy B-sejtes lymphomában és high-grade follikuláris lymphomában (FL). Utóbbiakban az EZH2 aktiváló mutációi is ismertek. Az EZH2 szerepe a CLL patomechanizmusában nem tisztázott. Tanulmányokból ismert, hogy CLL-ben a Ki-67 pozitív nagyméretű tumorsejtek expresszálják az EZH2-t, illetve az EZH2 overexpressziója CLL-ben összefüggésbe hozható a rosszabb prognózissal. Az EZH2 overexpressziót mutató esetekben sokszor magas ZAP-70 expresszió vagy kromoszóma eltérés igazolható. Megfigyelték az EZH2 magasabb expresszióját olyan esetekben, ahol az *IgHV* gén mutálatlan volt. *EZH2* aktiváló mutációk CLL-ben jelenlegi tudásunk szerint nem

ismertek. Az EZH2 genetikai és molekuláris megismerése fontos szerepet tölthet be a jövőbeni gyógyszeres terápia megalkotásában. Az EZH2 expresszióját egyes mikroRNS-ek is befolyásolják. Irodalmi adatok alapján az EZH2 negatív szabályozói a miR-101 és a miR-26a. Az EZH2 expressziót a miR-ek mellett számos más molekula is szabályozza, pl. a c-Myc, E2F1 és pRb.

Összességében elmondható, hogy a PF-ok különleges struktúrák a CLL/SLL-es nyirokcsomókban, melyeknek központi szerepe valószínűsíthető a betegség fenntartásában és progressziójában, ugyanakkor a biológiai sajátosságaik még kevéssé ismertek. Vizsgálataink alapvető célja az volt, hogy tovább karakterizáljuk a CLL/SLL pszeudofollikulusait és ezzel hozzájáruljunk a betegség pontosabb megismeréséhez. Elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy a CLL prognózisát negatívan befolyásoló tényezők közül egyes mikroRNS-ek és az EZH2 expressziója eltér-e a PF-okban a környező, interfollikuláris (IF) terekhez képest.

II. CÉLKITŰZÉSEK

- A CLL kialakulásával és/vagy progressziójával összefüggő 19 mikroRNS (miR155, -150, -29c, -26a, -181a, -21, -15a, -16, -34a, -221, -222, -223, -101, -93-5p, -650, -92, -142-3p, -142-5p, -15b) expressziójának összehasonlítása pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL/SLL-es nyirokcsomók PF és IF területein.

- Az EZH2 fehérje expressziójának vizsgálata a PF-okban és az IF terekben.

- Az EZH2 transzkripcióját szabályozó c-Myc, E2F1 és pRb expressziójának vizsgálata a PF-okban és az IF terekben.

- Az *EZH2* gén aktiváló mutációinak analízise CLL/SLL-es esetekben.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III. 1. Szövetminták

Tanulmányunkban 15 CLL/SLL-es beteg formalinban fixált paraffinba ágyazott (FFPE) nyirokcsomó biopsziás mintáját használtuk. Valamennyi minta diagnózisát az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben állították fel a World Health Organization lymphoid szövetek daganatos megbetegedéseinek klasszifikációjára vonatkozó kritériumainak megfelelően, hisztopatológiai, immunfenotípus, FISH és molekuláris vizsgálatok alapján. A szövetminták az elsődleges diagnózisból, a kezelések előtti időszakból származtak. Mikroszkópos vizsgálattal minden CLL/SLL-es nyirokcsomó minta pszeudofollikuláris mintázatot mutatott. Vizsgálatainkba 7 nő és 8 férfi szövetmintáját vontuk be, a diagnóziskor a medián életkor 58,47 év volt. Vizsgálataink ideje alatt egyik betegnél sem mutattak ki high-grade transzformációt. A legutóbbi utánkövetés során a 15 beteg közül kettőben Richter transzformáció, míg 1 esetben prolymphocytás transzformáció fejlődött ki. A betegséggel összefüggő halálozást nem dokumentáltak.

A betegek prognosztikai szempontból jelentős kromoszóma eltéréseinek (del13q, del17p, del11q és tri12) FISH vizsgálati eredményei mind a 15 esetben rendelkezésre álltak.

III. 2. MikroRNS expresszió vizsgálat kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakcióval

Munkánk során 19, az irodalmi adatok alapján a CLL kialakulásával és/vagy progressziójával összefüggésben álló mikroRNS (miR155, -150, -29c, -26a, -181a, -21, -15a, -16, -34a, -221, -222, -223, -101, -93-5p, -650, -92, -142-3p, -142-5p, -15b) expresszióját vizsgáltuk TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies) segítségével, kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakcióval (kvantitatív real-time

PCR, qRT-PCR). A mikroRNS expresszió vizsgálatához először a CLL/SLL nyirokcsomókból lézermikrodisszekció segítségével PF és IF területeket szeparáltunk, majd az összegyűjtött sejtekből RNS-t izoláltunk. Az RNS-ből reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizáltunk, majd preamplifikációt követően elvégeztük a valós-idejű PCR reakciót. A relatív expressziós szinteket ΔCt módszer segítségével határoztuk meg.

III. 3. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az EZH2 és az EZH2-t szabályozó c-Myc, E2F1 és pRb fehérjék expressziós szintjét a PF és IF terekben immunhisztokémia eljárással vizsgáltuk. Az immunreakciókhoz biotinmentes konjugált polimer, Novolink™ (Novocastra) rendszert használtunk. A metszeteket a Pannoramic 250 Flash II nagy felbontású scannerrel (3DHISTECH Ltd.) digitálisan szkenneltük, majd a Pannoramic Viewer software 1.15.4 (3DHISTECH Ltd.) programmal értékeltük ki.

III. 4. Az *IgHV* és *EZH2* gének szekvencia vizsgálata

Az *IgHV* és *EZH2* (16-os és 18-as exon, ismert aktiváló mutációk) gének mutációs státuszát direkt szekvenálással vizsgáltuk meg. A mutációk analíziséhez először a nyirokcsomó mintákból DNS-t izoláltunk, majd az általunk vizsgálni kívánt gén régiókat PCR technikával amplifikáltuk. A megtisztított termékeket kapilláris elektroforézissel megszekvenáltuk (BigDye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), majd a kapott szekvenciákat kielemeztük.

III. 5. Statisztikai analízis

A statisztikai analízist az SPSS 20.0 verziójával végeztük, a grafikonokat Graphpad 5.0 segítségével szerkesztettük.

A vizsgált változók eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszt segítségével ellenőriztük. Normál eloszlású változók esetén a különböző csoportok közötti összehasonlítás során független mintás t-próbát alkalmaztunk, az összetartozó értékeket pedig páros t-próba segítségével elemeztük. Mindkét analízis során kétoldali próbát alkalmaztunk. Azon változók esetében, amelyek nem mutattak normál eloszlást, Mann-Whitney U-tesztet és Kruskall-Wallis tesztet alkalmaztunk.

Szignifikánsnak tekintettük az eltérést, ha p érték $\leq 0{,}05$ volt.

IV. EREDMÉNYEK

IV. 1. MikroRNS expresszió a CLL/SLL-es nyirokcsomók PF és IF tereiben

A CLL kialakulásával és/vagy progressziójával kapcsolatba hozható mikroRNS-ek közül 19 expresszióját hasonlítottuk össze 15 CLL/SLL-es nyirokcsomó PF és IF területein, kvantitatív PCR reakció segítségével. A relatív kvantifikáció eredményei alapján 4 miRNS esetében találtunk statisztikailag szignifikáns expresszió különbséget a PF régiókban az IF területekhez viszonyítva: miR-155 (p=0,005), miR-150 (p=0,009), miR-92a (p=0,011) és miR-26a (p=0,018). Az oncomiR-nek tartott miR-155 és miR-92a a PF-ekben szignifikánsan magasabb expressziót mutatott, míg a tumorszuppresszor miR-150 és miR-26a a PF-ekben alacsonyabb expressziót mutatott a környező IF területekhez képest.

IV. 2. Az EZH2 fehérje, valamint az EZH2 transzkripcióját szabályozó c-Myc, E2F1 és pRb expressziója CLL/SLL-es nyirokcsomók PF és IF tereiben.

Az EZH2 és az EZH2 transzkripcióját szabályozó c-Myc, E2F1 és pRb expresszió szöveti eloszlásának tanulmányozásához immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk 15 CLL/SLL-es nyirokcsomó mintán. A megfestett és digitalizált metszeteken PF és IF területeket jelöltünk ki és a területeken belül kvantifikáltuk a pozitív sejtek arányát. A vizsgálatok eredményeként szignifikánsan magasabb expressziót találtunk a PF-ek területén mind az EZH2 ($p < 0.001$), mind az őt szabályozó E2F1 ($p < 0.001$), c-Myc ($p < 0.001$) és pRb ($p < 0.001$) esetében az IF régiókhoz viszonyítva.

IV. 3. Az EZH2 gén aktiváló mutációinak analízise

Az *EZH2* gén hotspot (Y646, A682 és A692) régióinak mutáció analízisét bidirekcionális Sanger szekvenálással végeztük el 14 CLL/SLL-es nyirokcsomó mintából. A vizsgálat célja az volt, hogy felderítsük, hogy esetleg aktiváló mutáció tehető-e felelőssé az EZH2 overexpresszióért. A vizsgálatok során az *EZH2* gén 16-os és 18-as exonjaiban visszatérő mutációt nem tudtunk kimutatni.

IV. 4. Az *IgHV* gén szekvencia analízise

A 14 CLL/SLL-es esetben elvégzett *IgHV* gén mutációs vizsgálat eredményeként 2 esetet tekintettünk mutáltnak (9. és 11. esetek), a további esetek mutálatlanok voltak. A három high-grade transzformációt mutató eset (3., 4. és 6. esetek) mindegyikében mutálatlan volt az *IgHV* gén.

IV. 5. A mikroRNS-ek, illetve az EZH2, E2F1, c-Myc és pRb fehérjék expressziójának összefüggése az *IgHV* mutációs státusszal

A fehérje és miRNS expressziós eredményeinket összevetettük a prognosztikai szempontból jelentős *IgHV* mutációs státusszal. Azokban az esetekben, amelyekben az *IgHV* gén mutálatlan volt szignifikánsan alacsonyabb miR-150 expressziót mértünk mind a PF, mind az IF területeken a mutált esetekhez viszonyítva ($\Delta Ct_^{PC}miR\text{-}150_{IgHV_NM}$ = 3,45±0,47, $\Delta Ct_^{PC}miR\text{-}150_{IgHV_M}$ = 4,69±0,50, t=-3,42, p=0,005 és $\Delta Ct_^{IF}miR\text{-}150_{IgHV_NM}$ = 3,98±0,48, $\Delta Ct_^{IF}miR\text{-}150_{IgHV_M}$ = 4,95±0,37, t=-2,67, p=0,021). A további miR-ek, illetve a vizsgált fehérjék expressziója és az *IgHV* gén mutációs státusza között szignifikáns összefüggést nem találtunk.

IV. 6. A mikroRNS-ek, illetve az EZH2, E2F1, c-Myc és pRb fehérjék expressziójának összefüggése a kromoszóma eltérésekkel

A fehérje és miRNS expressziós eredményeinket összevetettük a prognosztikai szempontból jelentős kromoszóma eltérésekkel (del13q, del17p, del11q és tri12). Vizsgálataink szerint a 11q delécióval járó esetekben a miR-150 expressziója az IF területén szignifikánsabb alacsonyabb volt ($\Delta Ct_^{IF}mir\text{-}150_{del11q+}$ = 3,79±0,45, $\Delta Ct_^{IF}mir\text{-}150_{del11q-}$ = 4,42±0,48, t=2,66, p=0,020), míg a PF területén csupán hasonló tendenciát igazoltunk (p=0,071). Kromoszóma aberráció(k) (ChA) jelenléte esetén szignifikánsan alacsonyabb a miR-26a expresszió a PF területén ($\Delta Ct_^{PF}miR\text{-}26a_{ChA+}$ = -6,15±2,08, $\Delta Ct_^{PF}miR\text{-}26a_{ChA-}$ = -3,5±2,01; p=0,047). Del17p jelenléte esetén is szignifikánsabb alacsonyabb a miR-26a expressziója a PF-okban összehasonlítva a del17p eltérést nem mutató esetekkel ($\Delta Ct_^{PF}miR\text{-}26a_{del17p+}$ = -8,57±2,43, $\Delta Ct_^{PF}miR\text{-}26a_{del17p-}$ = -4,96±1,99; p=0,035).

A további miR-ek, illetve a vizsgált fehérjék expressziója és a kromoszóma eltérések jelenléte között szignifikáns összefüggést nem találtunk.

V. MEGBESZÉLÉS

Nagyszámú irodalmi adat támasztja alá, hogy CLL/SLL-ben a PF-ok kiemelt szerepet játszanak a sejtproliferációban és a betegség progressziójában. A molekuláris eltérések is – beleértve a citogenetikai eltéréseket és az aberráns onkoprotein expressziót – jellemzően a PF-ok területén akkumulálódnak. A pszeudofollikulusok területén fokozott a proliferációs ráta és emelkedett a c-Myc és ciklin D1 expresszió. A rosszabb prognózissal járó kromoszóma aberrációk is a PF-ok területén halmozódnak fel. Az *IGHV* gén átrendeződése is gyakoribb a PF-ok sejtjeiben. Vizsgálataikban a pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL/SLL-es betegek túlélése jóval rövidebb volt a szövettanilag típusos megjelenésű CLL-hez képest. Összességében az irodalmi adatok alapján a pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL/SLL klinikailag agresszívebb viselkedést mutat.

A mikroRNS-ek megváltozott expresszióját CLL/SLL-ben szintén több tanulmány igazolta, és számos irodalmi adat szól amellett, hogy a mikroRNS-ek szerepet játszanak a betegség patogenezisében. *Wang és mtsai.* RNS in situ hibridizációs módszerrel igazolták, hogy a magasabb miR-155 és alacsonyabb miR-150 expressziót mutató tumorsejtek a PF-okban lokalizálódnak.

Tanulmányaink elsődleges célja az volt, hogy tovább karakterizáljuk a CLL/SLL pszeudofollikulusait és ezzel hozzájáruljunk a betegség pontosabb megismeréséhez. Kíváncsiak voltunk, hogy a CLL prognózisát negatívan befolyásoló faktorok közül bizonyos mikroRNS-ek és az EZH2 expressziója eltér-e a PF-okban a környező IF terekhez képest.

A mikroRNS expresszió vizsgálatához 15 pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL/SLL-es beteg nyirokcsomójának PF és IF tereiben hasonlítottuk össze 19 mikroRNS expresszióját valós idejű PCR reakcióval. A vizsgált 19 mikroRNS közül a miR-155 és a miR-92a szignifikánsan magasabb, míg a miR-150 és miR-26a szignifikánsan alacsonyabb expresszióját igazoltuk a PF-ok területén. Eredményeink egy része megerősíti *Wang és mtsai.* eredményeit, továbbá alátámasztja azt a nézetet, miszerint a PF-ok sejtjei eltérő tulajdonságúak az IF terek sejtjeihez képest.

A miR-155 magasabb expressziója különböző magas malignitású hematológiai betegségekben már ismert. Feltételezhető, hogy a miR-155 proto-onkogén szerepet tölt be és a target gének (pl. *SOCS1* és *SHIP-1*) expressziójának szabályozásával elsősorban a fokozott sejtproliferáció és sejttúlélés irányába hat. A miR-155 a B-sejt receptoron keresztül (BCR) is serkenti a sejtproliferációt nem csak a B-sejtek aktiválása során, hanem a B-sejtes lymphomák egy részében is. A PF-okban igazolt magasabb miR-155 expresszió felveti a lehetőségét annak, hogy a miR-155 megzavarja a PF-okban a BCR szignálutat, és ezen keresztül vesz részt a CLL/SLL progressziójában.

Vizsgálatainkban egy másik fontos oncomiR, a miR-17-92a cluster tagjaként ismert miR-92a is szignifikánsan magasabb expressziót mutatott a PF-ok területén. A c-Myc-mediált transzkripció révén a miR-17-92a cluster család tagjainak magasabb expressziója gyakran megfigyelhető lymphomákban. Kísérlet igazolja, hogy B-sejt specifikus miR-17-92a transzgén egerekben c-Myc-mediált lymphoma fejlődik ki; *Gibson és mtsai.* pedig leírták, hogy a CLL/SLL PF-aiban a c-Myc fehérje expressziója magasabb. Ezen adatok alapján feltételezhető, hogy a c-Myc overexpressziója állhat az emelkedett miR-92a expresszió hátterében. Ismert az is, hogy a miR-17-92a család legfontosabb célfehérjéi a PTEN és a TGF-béta. A PTEN-ről ismert, hogy CLL-ben alacsonyabb expressziót mutat. Elképzelhető,

hogy a pszeudofollikulusokban detektált magasabb miR-92a expresszió a PTEN downregulációján keresztül elősegíti a fokozott sejtnövekedést és csökkenti az apoptózist.

Eredményeink alapján a miR-150 expressziója a PF-okban szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult. A miR-150 tumorszuppresszor funkciója ismert és csökkent expresszióját kimutatták már a legtöbb humán leukémiában, többek között krónikus myeloid leukémiában is. Feltételezések szerint az alacsonyabb miR-150 expresszió a BCR szignálút csökkent gátlásához vezet, melynek fokozott sejtproliferáció a következménye. A miR-150 egyik célfehérjéje a FOXP1, melynek fokozott expresszióját leírták CLL-ben és a fokozott expressziót rosszabb prognózissal hozzák öszefüggésbe. Ismert, hogy CLL-ben a tumorsejtek általánosan magas miR-150 expressziót mutatnak, és a magas miR-150 expresszió összefüggésbe hozható a betegek hosszabb túlélésével. Ezzel ellentétben, alacsonyabb miR-150 expressziónál a betegek túlélése is rosszabb. A korábban említett in situ hibridizációs vizsgálattal kimutatták, hogy a pszeudofollikulusokban kevesebb a miR-150 pozitivitást mutató sejt, amelyet a mi eredményünk is alátámaszt. Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy a proliferációs centrumok alacsonyabb miR-150 expressziója -pl. az AKT jelátviteli út gátlásának csökkenésén keresztül- hozzájárul a CLL progressziójához. Összességében a csökkent miR-150 termelés kapcsolatba hozható a tumorsejtek megnövekedett proliferációs aktivitásával, mely megerősíti a feltételezést, miszerint a PF-ok kiemelt szerepet játszanak a betegség progressziójában.

A miR-26a expressziója szintén szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult PF-okban. A miR-26a egyik ismert szerepe, hogy – számos fehérje mellett – gátolja az EZH2 expresszióját. Az alacsonyabb miR-26a szint fokozott EZH2 termelődéshez vezet, mely szintén a sejtproliferációt segíti elő.

Jelen munkánkban az EZH2 expresszióját immunhisztokémiai vizsgálatokkal tanulmányoztuk 15 CLL/SLL-es nyirokcsomóban, és a digitális kvantitatív kiértékelés segítségével szignifikánsan magasabb expressziót igazoltunk a PF-ok területén az IF területekhez képest. Ez az eredmény párhuzamban áll *van Kemenade és mtsai.* vizsgálatainak eredményével, miszerint a magasabb EZH2 expressziót mutató sejtek nagyméretű, Ki-67 pozitív tumorsejtek, amelyekről ismert, hogy többségükben a PF-okra lokalizálódnak.

Számos kutatási eredmény alapján feltételezhető, hogy CLL/SLL-ben a fokozott EZH2 expresszió rosszabb prognózissal társul, ugyanakkor a CLL/SLL patomechanizmusában az EZH2 pontos szerepe még nem tisztázott. Eredményünk, miszerint az EZH2 expresszió elsősorban a PF-ok sejtjeire lokalizálódik, megerősíti azt a hipotézist, hogy a CLL progressziójában a PF-oknak kiemelt szerepük van.

Visszatérő *EZH2* mutáció a CLL-ben nem ismert, ugyanakkor szerettük volna biztosan kizárni, hogy esetleg aktiváló mutáció áll-e az EZH2 overexpresszió hátterében. A 15 CLL/SLL mintából 14 mintán tudtuk elvégezni az *EZH2* 16-os és 18-as exonjának szekvencia analízisét, mely során mutációt nem azonosítottunk.

További célunk volt annak felderítése, hogy a fentebb leírt miR-26a mellett még milyen más szabályozók eltérései állhatnak a PF-ban megfigyelhető megnövekedett EZH2 expresszió hátterében. A CLL/SLL PF-aiban ismert a c-Myc overexpressziója. A c-Myc az EZH2 expresszióját gátló miR-26a szabályozásán keresztül áll közvetett viszonyban az EZH2-vel, és emellett a c-Myc az E2F1 transzkripciós faktort is aktiválja. Az E2F1 serkentően hat az EZH2-re. Az E2F1-et a tumorszuppresszor Rb is szabályozza, oly módon, hogy az Rb foszforiláció révén inaktiválódik, ezáltal a gátlás kiesése révén nő az E2F1 termelés. Fenti irodalmi adatok alapján immunhisztokémiával vizsgáltuk a c-Myc, az E2F1 és a pRb expresszióját a 15 CLL/SLL-es nyirokcsomó mintán. A digitális kvantitatív

kiértékelés segítségével mindhárom fehérje expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult a PF-ok területén az IF terekhez képest. Ezen erdemények a miR-26a fokozott expressziójával együtt felvetik a lehetőségét annak, hogy a c-Myc/E2F1, c-Myc/miR-26a és pRb/E2F1 utak a felelősek a PF-ok területén megfigyelt fokozott EZH2 expresszióért.

Tanulmányainkban megvizsgáltuk a miRNS, EZH2, c-Myc, E2F1 és pRb expresszió és az *IgHV* gén mutációs státusza, valamint a CLL/SLL-ben prognosztikai jelentőséggel bíró kromoszóma aberrációk lehetséges kapcsolatát is. Bár a vizsgálat elemszáma kevés, statisztikailag szignifikánsan alacsonyabb miR-150 expressziót mértünk mind a PF, mind az IF területén azokban az esetekben, amelyekben az *IgHV* gén mutálatlan volt. Régóta ismert, hogy a mutálatlan *IgHV* gén CLL-ben rosszabb prognózisra utal. Több kutatócsoport felvetette már a lehetőségét annak, hogy a csökkent miR-150 expresszió kapcsolatban áll az *IgHV* gén mutálatlan státuszával, ugyanakkor a két eltérés kapcsolata még nem teljesen tisztázott.

Rabello és mtsai. vizsgálataik során emelkedett EZH2 expressziót találtak azokban a CLL-es betegekben, akik valamilyen visszatérő kromoszóma eltérést hordoztak. Mi hasonló szignifikáns összefüggést nem találtunk, ugyanakkor a 11q delécióval járó esetekben a miR-150 expressziója az IF területén szignifikánsabb alacsonyabb volt. A rosszabb prognózissal társuló kromoszóma aberrációt hordozó esetekben a PF-ok területén a mir-26a expressziója is alacsonyabbnak bizonyult a kromoszóma eltérést nem mutató esetekhez képest.

Vizsgálatunk érdekes eredménye, hogy 17p deléció esetén a PF-okban szintén alacsonyabb volt a miR-26a expressziója a 17p delétiót nem hordozó esetekhez képest. 17p deléció esetén a *TP53* gén deletált és ezen delétiót hordozó betegek kemoterápia rezisztensek. Az igazolt del17p-vel járó esetek >80%-ában a

másik *TP53* allél mutációja igazolható. Del17p hiányában a *TP53* mutáció kevésbé gyakori. A *TP53* mutációja igen rossz prognózissal társul. A legújabb vizsgálatok alapján – terápiás szempontból – a CLL/SLL egyik legfontosabb prognosztikai tényezője a *TP53* mutációs státusz. A miR-26a–17p deléció lehetséges kapcsolatára irányuló vizsgálat az irodalmból eddig nem ismert.

VI. KÖVETKEZTETÉSEK

- Az oncomiR-ek közül a miR-155 és a miR-92a fokozott expressziója, a tumorszuppresszor miR-ek közül a miR-150 és a miR-26a csökkent expressziója igazolható a pszeudofollikulusok területén az IF területekhez képest CLL/SLL-es betegek nyirokcsomóiban.

- EZH2 overexpresszió igazolható a CLL/SLL-es betegek nyirokcsomóinak PF területein az IF területekhez képest, melynek hátterében feltehetően a c-Myc/E2F1, c-Myc/miR-26a és pRb/E2F1 szabályozó útvonalak megváltozott működése áll.

- Az EZH2 overexpresszió hátterében *EZH2* gén aktiváló mutáció nem igazolható a CLL/SLL-es esetekben.

- Összefüggés lehet a rosszabb prognózissal járó kromoszóma aberrációt hordozó betegek, ill. a szintén rosszabb prognózisú NM *IgHV* gén státuszú betegek és a miR-26a csökkent, illetve az EZH2 fokozott expressziója között.

- Összességében eredményeink alátámasztják azt a nézetet, mely szerint a CLL/SLL PF-ai különleges biológiai sajátosságokkal rendelkeznek, és a betegség progressziójában szerepet játszó molekuláris eltérések elsősorban a PF-ok területén halmozódnak fel.

VII. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

VII. I. Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **Kinga Szurián**, Irén Csala, Violetta Piurkó, Linda Deák, András Matolcsy, Lilla Reiniger. Quantitative miR analysis in chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma – proliferation centres are characterized by high miR-92a and miR-155 and low miR-150 expression. *Leukemia Research* 2017
   DOI: 10.1016/j.leukres.2017.04.002. **IF: 2,319**

2. **Kinga Szurián**, Irén Csala, Dóra Marosvári, Hajnalka Rajnai, Katalin Dezső, Csaba Bödör, Violetta Piurkó, András Matolcsy, Lilla Reiniger. EZH2 is upregulated in the proliferation centers of CLL/SLL lymph nodes. *Experimental and Molecular Pathology* 2018
   DOI:10.1016/j.yexmp.2018.07.009 **IF: 2,566**

VII. II. Egyéb témában megjelent közlemények

1. **Kinga Szurian**, Karl Kashofer, Bernadette Liegl-Atzwanger. Role of Next-Generation Sequencing as a Diagnostic Tool for the Evaluation of Bone and Soft-Tissue Tumors. *Pathobiology* 2017
   DOI: 10. 1159/000478662. **IF: 1,592**

2. **Kinga Szurian**, Holger Till, Eva Amerstorfer, Nicole Hinteregger, Hans-Jörg Mischinger, Bernadette Liegl-Atzwanger, Iva Brcic. Rarity among benign gastric tumors: Plexiform fibromyxoma –report of two cases. *World Journal of Gastroenterology* 2017
   DOI: 10.3748/wjg.v23.i31.5817. **IF: 3,3**

3. Edina Bugyik, Katalin Dezső, Eszter Turányi, **Kinga Szurián**, Sándor Paku, Péter Nagy. 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene induces substantial hyperplasia in fibrotic mouse liver. *International journal of experimental pathology* 2012
   DOI: 10.1111/j.1365-2613.2011.00803.x. **IF: 2,04**

4. Eszter Turányi, Katalin Dezső, Edina Bugyik, **Kinga Szurián**, Sándor Paku, Péter Nagy. The primary mitogen (TCPOBOP)-induced hepatocyte proliferation is resistant to transforming growth factor- β-1 inhibition. *Liver international* 2010
   DOI: 10.1111/j.1478-3231.2010.02324.x. **IF: 3,84**

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Dr. Reiniger Lilla témavezetőmnek a szakmai segítség és tanítás mellett a rengeteg munkáért, a sok feláldozott hétvégéért és ünnepnapért.

Köszönöm Prof. Matolcsy Andrásnak, hogy befogadott az intézetbe, szakmai fejlődésemet éveken át támogatta és támogatja. Köszönöm, hogy befogadott a laborjába és munkámat végig segítette szakmai tanácsaival.

Köszönettel tartozom Prof. Rásó Erzsébetnek, Prof. Kovalszky Ilonának és Prof. Nagy Péternek, hogy laborjukban dolgozhattam.

Köszönöm Dr. Csala Irénnek, Dr. Dezső Katának és Dr. Marosvári Dórának a közös munkát és tanítást. Köszönettel tartozom Piurkó Violettának, Bárányné Pallag Adriennenek és Kaminszky Zsuzsának, Kurucz Csillának, Tamási Annának, Hollósi Péternek és Bratu Zitának a sok segítségért.

Köszönöm Dr. Sebestyén Annának értekezésem áttanulmányozását, a hasznos észrevételeket és megjegyzéseket. Köszönöm Dr. Bödör Csabának az értékes szakmai tanácsokat.

Köszönettel tartozom Laczik Cecíliának és Szilágyi Ilonának, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk segítségért. Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak, Dr. Rajnai Hajnalkának, Dr. Téglási Vandának, Dr. Csernus Balázsnak, és Dr. Székely Tamásnak az önzetlen szakmai segítségért, támogatásért és a vidám hangulatért, az együtt eltöltött munka- és szabadidőért. Köszönöm Prof. Sápi Zoltánnak a támogatását.

Köszönettel tartozom Szüleimnek és Testvéreimnek, Hencsei Tibornak, valamint barátaimnak, Dr. Torbágyi Péternek, Dr. Illyés Ildikónak és Dr. Gagyi Évának, akik türelmesen támogatták a munkámat.