

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**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

Tartalom

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés.....	7
2.1. Aurora kinázok.....	7
2.1.1. Aurora A.....	7
2.1.2. Aurora C.....	9
2.1.3. Aurora B.....	10
2.1.3.1. A CPC komplex.....	12
2.1.3.2. Aurora B szerepe a mitotikus kromoszóma kondenzáció iniciálásában.....	15
2.1.3.3. Az Aurora B kináz expresszió malignus folyamatokban.....	17
2.1.3.4. Aurora kináz inhibitorok (AKI).....	20
2.1.3.5. Aurora B mint prognosztikai és prediktív marker.....	22
3. Célkitűzések.....	24
4. Anyag és Módszer.....	25
4.1. Vizsgálatba bevont betegcsoportok.....	25
4.1.1. Invazív emlőkarcinoma minták.....	25
4.1.2. Limfoid eltérések.....	26
4.2. Szöveti microarray.....	27
4.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok (IHC).....	28
4.4. Fénymikroszkópia.....	29
4.5. Fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH).....	29
4.6. Fluoreszcens mikroszkópia.....	30
4.7. Sejtek DNS tartalmának meghatározása áramlási citometriával.....	31
4.8. Statisztikai analízis.....	32
5. Eredmények.....	33
5.1. Aurora B kináz expresszió vizsgálata invazív emlőkarcinoma mintákban.....	33
5.1.1. Invazív emlőkarcinoma minták klinikai és biológiai paraméterei.....	33
5.1.2. Aurora B expresszió.....	33
5.1.3. HER2 és 17-es kromoszóma státusz vizsgálata HER2 PharmDx és HER2 IQFISH PharmDx alkalmazásával.....	36
5.1.4. 17p13.1 lókuszt és 17-es kópiaszám változások.....	38
5.1.5. Aurora B expresszió és 17-es kromoszóma kópiaszám összefüggései.....	41

5.2. Aurora B kináz expresszió vizsgálata agresszív B sejtes limfómákban.....	43
5.2.1. Aurora B overexpresszió.....	43
5.2.2. Aurora B és survivin expresszió összefüggése	48
5.2.3. Mitotikus aktivitás vizsgálata foszfo-H3 hiszton (Ser10) mitózis marker alkalmazásával	49
5.2.4. AURKB, TP53 és 17-es kromoszómát érintő kópiaszám változások, minták ploiditása	51
5.2.5. Az Aurora B expresszió hatása a betegek túlélési idejére.....	56
6. Megbeszélés	58
7. Összefoglalás.....	62
8. Summary	63
9. Irodalomjegyzék.....	64
10. Tárgyszavak	71
10. Keywords	71
11. Köszönetnyilvánítás	72
12. Támogatások	73
13. Függelék.....	74

Rövidítések jegyzéke

AURKA	Aurora kinase A gene
AURKB	Aurora kinase B gene
AURKC	Aurora kinase C gene
BSA	Bovine Serum Albumin
CDC25B	Cell Division Cycle 25B
CEP17	Chromosome 17 centromere region
c-erbB2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 protein
CPC	Chromosome Passenger Complex
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DLBCL, NOS	Diffuse large cell lymphoma, not otherwise specified
ER	Estrogen receptor
FFPE	Formalin fixed paraffin embedded
FISH	Fluorescence in situ hybridization
H3S10P	Phospho-histone H3 (Ser10)
HE	Hematoxylin and eosin staining
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 gene
IHC	Immunohistochemistry
INCENP	Inner Centromere Protein
Ki67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki67, cell proliferation marker
NaSCN	Sodium thiocyanate
NP40	Nonidet P-40, detergens
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
PP1	Protein Phosphatase 1
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PR	Progesterone receptor
SD	Standard Deviation
SSC	Saline-sodium citrate
TBS	Tris-buffered saline
TP53	Tumor protein p53
TPX2	Targeting Protein for Xklp2

1. 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 aneuszómiaéhoz, aneuploidiaéhoz, a kromatin szerveződésének megváltozásához vezet. Ezek az elváltozások megváltozott génextpressziót, géntermék-funkciót és különböző géndózishoz kötött eltéréseket eredményeznek [1].

A kromoszómális instabilitás már korai stádiumú daganatokban feltűnő jelenség [2], 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 [3].

A genomi DNS jelentősebb mennyiségi változása citológiai és szöveti szinten is megnyilvánul, az ilyen daganatos folyamatokban a sejtek és a sejtmagok interfázisban is durva, sokszor bizarr morfológiai jegyeket hordoznak.

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 [4]. 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 [5].

A H3 hiszton foszforilációja a mitózis előkészítésének kulcsfontosságú lépése [6]. Kísérletesen bizonyítást nyert az Aurora B szabályozó szerepe a mitózis elindításában: a kináz

G2/M fázisban Ser10 pozícióban foszforilálja a H3 hisztont, ezzel elindítva a kromatin kondenzáció folyamatát [7].

Kísérletes körülmények között a kináz funkciójának gátlása a H3 hiszton foszforiláció szignifikáns csökkenését okozza, genetikai instabilitáshoz, aneuploid sejtpopulációk megjelenéséhez és apoptózishoz vezet [8].

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 [9].

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.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Aurora kinázok

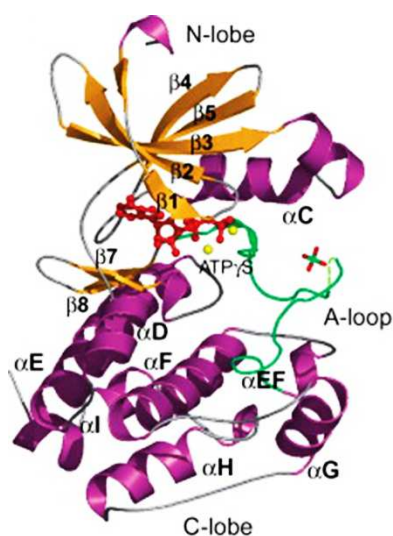
Az Aurora kináz család tagjai szerin/treonin kinázok. Funkciójukat tekintve a sejtosztódás, a kromatidák utódsejtek közötti elosztásának szabályozásában alapvető fontosságúak. Deregulációjuk genetikai instabilitáshoz, kromoszóma számbeli változások megjelenéséhez vezet [10].

A kináz családon belül humán sejtekben A-, B- és C-típusú kinázokat különítettek el. A kinázok jelentős szekvencia homológiát mutatnak, celluláris lokalizációjuk és funkciójuk eltérő [11].

A sejtosztódás szabályozásában betöltött fontos szabályozási szerepük okán az Aurora kinázokat számos tumortípusban tanulmányozták. A tanulmányok elsősorban az Aurora A és B kinázokra fókuszálnak, a C típusú kinázról jelenleg is csekély mennyiségű információ áll rendelkezésre. Az Aurora A tumorprogresszióban betöltött és prediktív szerepéről számos eredmény áll rendelkezésre, míg az Aurora B kináz malignus transzformációban betöltött funkciója kevésbé ismert.

2.1.1. Aurora A

Az A típusú Aurora kinázt gyakran emlegetik ‘poláris kináz’-ként a centroszóma ciklus szabályozásában betöltött szerepére utalva [12-14]. A kináz másodlagos szerkezetét az 1. Ábra szemlélteti.



1. Ábra Az Aurora A másodlagos szerkezetének szalagdiagramja

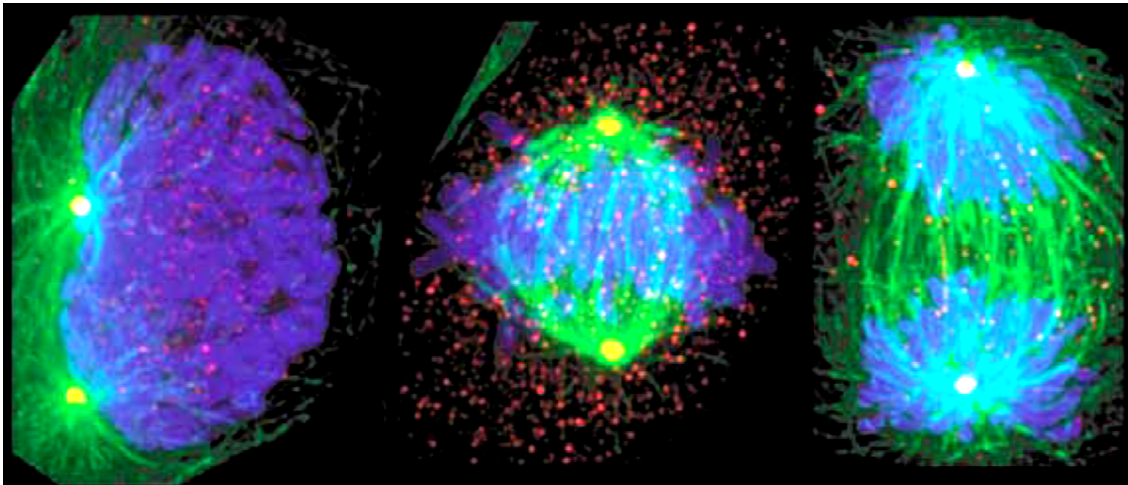
Az ábrán az α hélixek lila, a β redők narancssárga, az aktivációs hurok (A-loop) zöld színnel van feltüntetve [15].

A kináz aktivitását az aktivációs hurok (A-loop) T288 foszforilációs státusza határozza meg. Az aktivációs hurok protein foszfatáz 1 (PP1) vagy 2A (PP2A) általi defoszforilációja a kináz inaktivációját okozza. A kináz aktivációjához Ran-GTPáz és TPX2 kofaktorok szükségesek. A TPX2 a mitotikus orsók kialakulása előtt disszociál az importin α -ról és β -ről, majd az Aurora A kinázhoz kötődik [16-18].

A kötődést követően az Aurora A a centroszómák és proximális mikrotubulusok közelében lokalizálódik [11, 18, 19].

A kinázt a G2/M fázisátmenetben a CDC25B foszforilálja [20].

Ezt az expressziós mintázatot a sejtosztódás későbbi szakaszaiban diffúz citoplazmikus lokalizáció váltja fel [21]. A kináz expressziója a késői S fázistól a prometáfázisig detektálható, M fázisban tetőzik [5] (2. *Ábra*).



2. *Ábra* Az Aurora A (piros színnel) celluláris lokalizációja a sejtosztódás különböző fázisaiban

A kináz mitózisban betöltött szabályozó szerepe az alábbiakban foglalható össze [22]:

- a) Centroszóma érés és szeparáció szabályozása
- b) M fázisba való belépés szabályozása
- c) Metafázis kromoszómák illesztésének szabályozása
- d) Citokinezis szabályozása

Az Aurora A funkciójának kiesése elsősorban a mitózisba való belépés késését okozza [23]. A kináz funkciójának kísérletes gátlása kapcsán változatos mitotikus rendellenességeket figyeltek meg: a centroszóma érés és szeparáció zavarát, multipoláris mitotikus orsók megjelenését és citokinezisben észlelt szabálytalanságokat [14].

A kináz overexpresszióját több tumortípusban leírták [16]. A jelenséget a mitózis citokinezis nélküli terminációjával hozták összefüggésbe, így aneuploidia kialakulásában fontos tényező lehet [24].

Az overexpresszió és a kinázt kódoló, 20q13 lókuszban található AURKA gén amplifikációja között szoros összefüggést írtak le. AURKA génamplifikációt elsőként emlőtumorokban írtak le [3], majd a jelenséget több epitheliális tumorban – colon-, ovárium- és hasnyálmirigy karcinoma - is megfigyelték [13].

2.1.2. Aurora C

A C és B típusú kinázok nagyfokú hasonlóságot mutatnak, aminosav-szekvenciájuk 83%-ban megegyezik [9].

Az Aurora C-ről jelenleg kevés információ áll rendelkezésre az irodalomban. Néhány tanulmány a spermatogenezisben [25], az oogenezisben [26], a cirkadián ritmus és a celluláris morfológia szabályozásában betöltött szerepét írja le [27].

Az Aurora A-tól és B-től eltérően az Aurora C erősen szövet specifikus expressziót mutat. Humán szövetek a kináz alacsony fokú expresszióját látták prosztatában, lépben és fibroblasztokban [10], magasabb fokú expressziót mértek normál placentában, vastagbélben és emlőben.

A kináz expressziója G2/M átmenetben a legmagasabb, az expresszió anafázistól a citokinezisig a centroszómák közelében detektálható [28, 29].

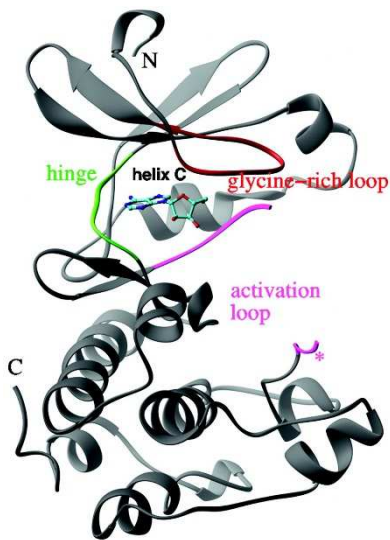
Az Aurora C és B kinázokkal kölcsönható fehérjék (INCENP, survivin, borealin) és szubsztrátok (H3 hiszton, CENP-A, INCENP és Borealin) között nagy átfedés látható [30], ami alapján a két kináz kompetitív funkcióját feltételezik [27].

A kinázt kódoló AURKC gén a 19q13.43 lókuszban helyezkedik el, deléciója és átrendeződése számos tumorban ismert jelenség [28], továbbá a gén 4 missense mutációját figyelték meg tüdő adenokarcinómában [31, 32].

A kináz overexpresszióját hepatocelluláris karcinoma, tüdő adenokarcinoma és pajzsmirigy karcinoma sejtvonalakon figyelték meg [28, 33, 34].

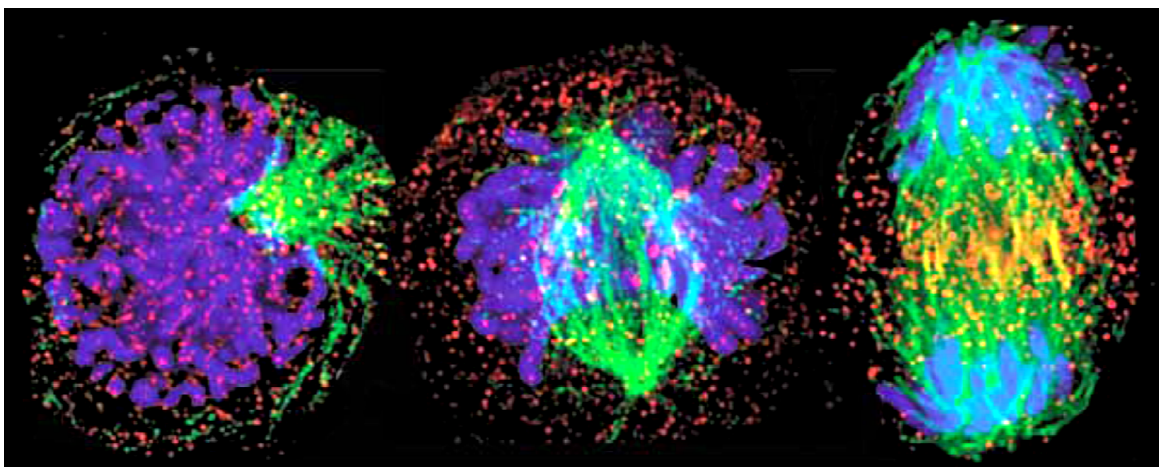
2.1.3. Aurora B

A kináz család jelenleg legintenzívebben tanulmányozott tagja az Aurora B. Humán sejtekben a 'chromosome passenger' (CPC) fehérjekomplex enzimatisz egységeként van jelen [5, 11, 35]. Másodlagos szerkezetét a 3. *Ábra* szemlélteti.



3. *Ábra* Az Aurora B kináz másodlagos szerkezte [36]

A kináz expressziója a korai G2 fázistól citokinezis végéig detektálható. Profázisban a kromoszómák mentén figyelhető meg, metafázisban a belső centromerikus régiókba koncentrálódik. Anafázisban a középlemezben, telofázisban a középtestben található [37] (4. *Ábra*).



4. *Ábra* Az Aurora B (pirossal jelölve) celluláris lokalizációja a sejtosztódás során [38].

Legfontosabb szubsztrátjai közé a kromatin kondenzáció, citokinezis és a mikrotubulus-kinetochor kapcsoló effektor molekulák tartoznak (1. Táblázat).

1. Táblázat Az Aurora B kináz szubsztrátjai

Szubsztrát	Funkció	Foszforilációs hely	Referencia
Autofoszforiláció		Thr232	[39]
CENP-A	Aurora B belső centromerikus régiókba lokalizálása	Ser7	[40]
CENP-E	Kromoszómák mozgatása, mitotikus orsó elongáció	Thr422	[41]
EB2	Mitotikus orsók, mikrotubulusok dinamikájának szabályozása	nem ismert	[42]
EB3	Mitotikus orsók, mikrotubulusok dinamikájának szabályozása	Ser176	[42]
Hec1	Kinetochor protein	Ser5, Ser15, Thr49, Ser55, Ser69, Ser44	[43]
H3 hiszton	Mitotikus kromatin kondenzáció	Ser10, Ser28	[7, 44]
INCENP	Aurora B targeting szabályozása	Ser894, Ser895	[45]
MCAK	Mikrotubulus depolimerizáció	Thr95, Ser110, Ser196	[46]
MgcRacGAP 1	Mitotikus orsók kinetochorhoz kapcsolása	Ser387, Ser410	[47]
MKLP1	Plusz-vég orientált motorfehérje	Ser812, Ser814	[48]
NSUN2	RNS metiltranszferáz	Ser139	[49]
Shugoshin-2	Kromatidák közötti kohézió szabályozása	Thr537, Thr620	[50]
Survivin	Kinetochor fehérje, Aurora B aktiválása	Thr117	[51]
Vimentin	III. típusú intermedier filamentum	Ser6, Ser24, Ser38, Ser46, Ser64, Ser65, Ser72, Ser86	[52]

Forrás: Kinasource UniProt adatbázis

Az Aurora B kináz legfontosabb funkciói:

- a) Kromoszómakondenzáció elindítása G2 fázisban H3 hiszton foszforilálásával
- b) Érett centroméra struktúra kialakítása
- c) Kromoszómák mitotikus orsókhoz való kapcsolása
- d) Citokinezis előkészítése

A kináz funkciójának kiesését közvetlen összefüggésbe hozták az aneuploidia, genetikai instabilitás és tumorgenezis megjelenésével [8]. A kinázfunkció kísérletes gátlása kapcsán intenzív poliploidizációt és apoptózist figyeltek meg [37].

Aurora B overexpressziót mRNS és fehérjeszinten is megfigyeltek emlő-, colorectalis-, vese- és prosztatata daganatokban [13].

Az Aurora B-t kódoló AURKB gén a TP53 gén szomszédságában, a 17p13.1 lókuszbán helyezkedik el. A gén amplifikációját vagy mutációját még nem írták le [32].

Aurora B overexpresszió aneuploidia és a többmagvú sejtek megjelenése különösen p53 inszufficienciával társulva gyakori [53], tehát az Aurora B kináz dereguláció okozta kromoszóma kérés, valamint kromoszóma szegregációs hibák p53 inszufficienciával társulva fokozott kockázatot jelentenek genetikai instabilitás kialakulása szempontjából [54].

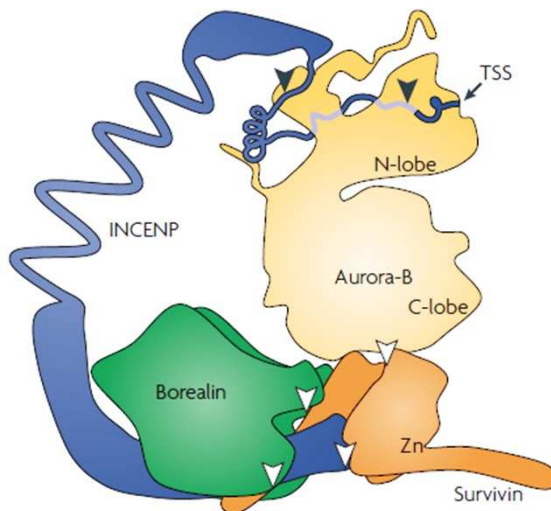
2.1.3.1. A CPC komplex

A sejtosztódás során a normál, fajra jellemző ploiditás megtartása alapvető fontosságú. Daganatsejtekben gyakran találkozunk a kromoszómaszegregáció hibájából fakadó kromoszóma rendellenességekkel. Ezek lehetnek teljes kromoszómát érintők, mint a teljes kromoszóma nyeres és vesztes, vagy a kromoszómák struktúráját érintő aberrációk [55].

A normál kromoszómaszám fenntartásában fontos a kromoszómák megfelelő kapcsolása a mitotikus orsókhoz, továbbá, hogy a testvér kromatidák szétválasztása ne történjen meg hibás kapcsolat esetén, valamint hogy a citoplazma kettéválása ne következzen be a kromatidák középlemezből való eltávolítása előtt. Ezeket a mitotikus szabályozási eseményeket a CPC komplex szabályozza [56].

Jelenlegi kutatási eredmények alapján a sejtekben legalább kétféle CPC komplex létezik: az Aurora B-t és INCENP-t tartalmazó szubkomplex, valamint az Aurora B-t, INCENP-t, survivin-t és a borealin-t magában foglaló holokomplex. A komplex enzimatikusan aktív alegységét az Aurora B képezi, a másik három fehérje a komplex targetingjének, valamint az Aurora B enzimaktivitásának a szabályozásáért felelős [57].

A CPC szerkezetét az 5. *Ábra* szemlélteti.



5. Ábra A CPC komplex sematikus szerkezete

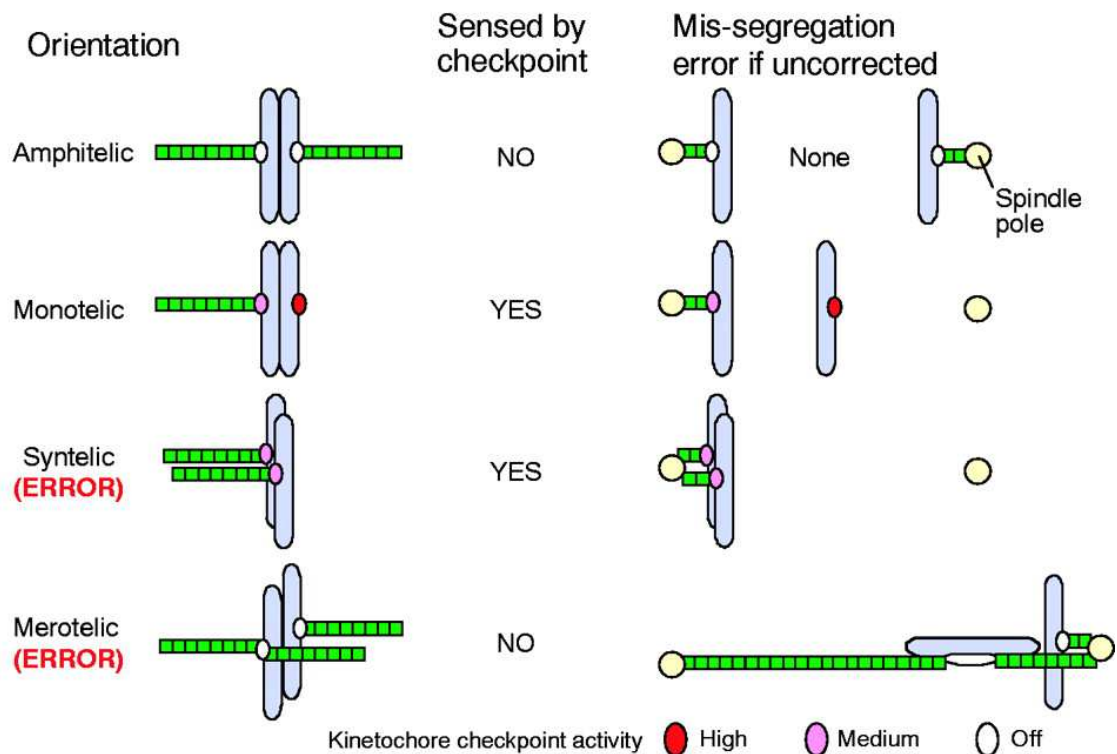
A survivin és a borealin az INCENP N terminális régiójához kapcsolódik, míg az Aurora B N terminális szakasza az INCENP IN box (a két fekete nyílhegy közötti) régiójához kapcsolódik. A borealin és a survivin között is erős kapcsolódás jön létre, a borealin N terminális régióján keresztül. A komplexen belüli fehérje-interakciókat fehér nyílhegyek jelölik [58].

A komplex fő funkciója a kromoszómák mitotikus orsóhoz való kapcsolása, és a kapcsolási hibák kijavítása. A komplex fontos szerepet tölt be a kinetochor struktúra kialakításában is [59].

A CPC az alábbi fehérjecsoportok szabályozásában érintett:

- a) *SAC útvonal fehérjék*: Mad1, Mad2, Bub1, BubR1, Mps1, Cenp-E [60, 61]
- b) *mikrotubulus-kinetochor interakciót szabályozó fehérjék*: Cenp-E, Ndc80, Knl1, Mis12, Zwilch, p150^{Glucd}, MCAK, Dam1, Plk1 [46, 62, 63]
- c) *Shugoshin fehérjecsalád*: Sgo1, Sgo2 [64, 65]

Nem daganatos sejtekben is gyakran bekövetkezik a kromoszómák és a mitotikus orsók nem megfelelő kapcsolódása. A kóros kapcsolódások javítását, valamint a javításhoz szükséges időt biztosítandó a mitotikus progresszió késleltetését, a kinetochor ellenőrzési pont aktiválását az Aurora B facilitálja (6. Ábra).



6. Ábra A kinetochor ellenőrzési pont aktiválása kromoszómák nem megfelelő kapcsolódása [66]

Az ellenőrzési pont monotelikus (*monotelic* - a két kromatida közül csak az egyik kapcsolódik mitotikus orsóhoz) és szintelikus (*syntelic* - a két kromatida azonos centroszóma felé kapcsolódik) kapcsolódási hiba esetén aktiválódik. Merotelikus kapcsolódáskor (*merotelic* - az egyik kromatida mindkét centroszóma felé kapcsolódik), az ellenőrzési pont nem aktiválódik.

Az ellenőrzési pont aktiválódásának leírására többféle modell ismeretes [59]:

1. Modell: az Aurora B kinetochor szubsztrátról történő tenzió-függő leválása

Amennyiben a testvér kromatidák bipoláris elrendeződésnek megfelelően kapcsolódnak, a két kromatida kinetochor régiója közötti távolság nagyobb, az Aurora B kinetochor szubsztátjaival nem kolokalizál, a kromatidák közötti tenzió viszonylag állandó. Kóros kapcsolódáskor a feszülés csökken vagy megszűnik, az Aurora B és szubsztrátjai ismét egymáshoz közel helyeződnek, ami destabilizációhoz vezet [67].

2. Modell: az Aurora B mikrotubulus-függő szabályozása

Hasadó élesztőkön végzett kísérletek eredményei alapján bizonyítást nyert, hogy a CPC komplex hidat képez a mikrotubulusok és a kromoszómák centromerikus régiói között [68]. Ebben a modellben alacsony tenzió az Aurora B aktivitásának köszönhetően a mikrotubulus-centroméra összeköttetés meggyengül. Helyes, biorientált kapcsolás esetén a tenzió ismét nő, amely a komplex konformáció változását idézi elő, ami az Aurora B kináz gátlását eredményezi. A modell alkalmazása humán vonatkozásban nem egyértelmű, hiszen a CPC komplex ebben az esetben a belső centromerikus régiókban található, így közvetlen összeköttetése a mikrotubulusokkal nincs.

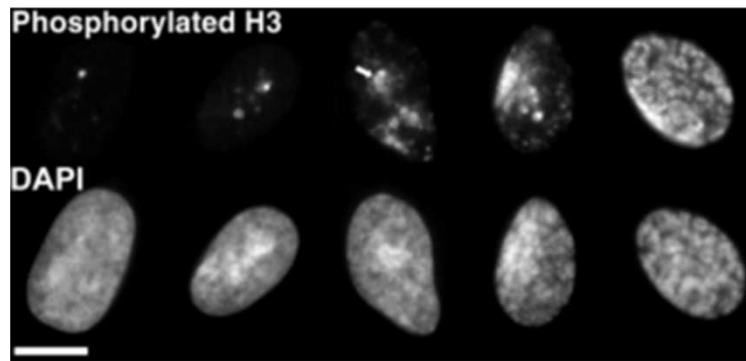
3. Modell: az Aurora B aktivitásának változása a centromerikus heterokromatin strukturális változásának függvényében

A modell szerint a mikrotubulusok okozta tenzió elegendő erőt biztosíthat a nukleosómák kitekeréséhez a centromerikus régiókban [69]. Ezáltal megváltozik a CPC komplexek eloszlása a kromoszómák mentén, az Aurora B kináz aktivitás csökken. Nem megfelelő kapcsolódáskor a tenzió csökken, a CPC komplexek lokális koncentrációja megnő, annak a valószínűsége, hogy egyik CPC komplex foszforilál egy másikat, jelentősen megnő, így fokozva az Aurora B kináz aktivitását.

2.1.3.2. Aurora B szerepe a mitotikus kromoszóma kondenzáció iniciálásában

A G2 fázisban sejtosztódási stimulus hatására végbemenő kromoszóma kondenzáció a metafázisos kromoszóma-struktúra kialakulásának, így a sejtosztódásnak elengedhetetlen előfeltétele. A folyamat evolucionálisan erősen konzervált, a H3 hiszton Aurora B általi foszforilálásával indul [6]. Az Aurora B H3 hisztonnal Ser10 pozícióban való interakcióját több munkacsoport is leírta [7, 70-72].

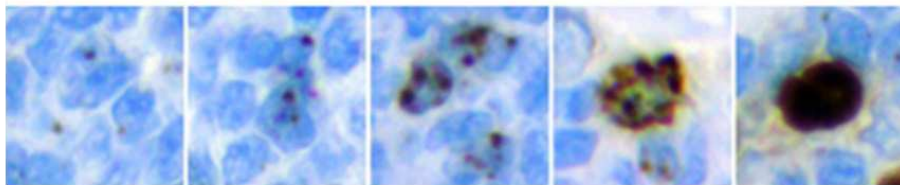
A foszforiláció immunfluoreszcencia és elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján a pericentromerikus heterokromatin régiókban kezdődik, a G2 fázis korai szakaszában, szétterjed a teljes kromoszómakarok mentén, majd anafázisban eltűnik [6] (7. *Ábra*).



7. Ábra A foszforilált H3 hiszton (H3S10P) celluláris lokalizációja a sejtosztódás során [6]

A foszforiláció a pericentromerikus régiókban kezdődik, majd a foszforiláció végigterjed a kromoszómakarok mentén. A H3S10P a sejtosztódás különböző fázisaiban jellegzetes mintázatot mutat citológiai preparátumokon. Immunfluoreszcens jelölés, scalebar: 10 μ m

A folyamat hisztológiai körülmények között, immunhisztokémiai módszerekkel is jól követhető (8. Ábra).



8. Ábra H3S10P celluláris lokalizációja szövettani körülmények között

Immunhisztokémiai jelölés, DAB reakció hematoxylin háttérfestéssel, 1000x nagyítás, saját felvétel

Az Aurora B kísérletes gátlása jelentős H3 hiszton foszforiláció (Ser10) csökkenést eredményez [73, 74], valamint ellenkező esetben, a kináz overexpressziója kapcsán a foszforiláció nagymértékű fokozódását figyelték meg. Utóbbi jelenség nem megfelelő kromatin kondenzációval, kóros kromoszómakapcsolással és szabálytalan mitotikus formák megjelenésével társult HeLa sejtvonalon végzett kísérletekben [9].

A kísérletes adatok alapján az Aurora B kinázfunkció sérülése, up- és downregulációja is a mitotikus ellenőrzési pont gyengülését okozza. A kinázfunkció gyengülése elégtelen kromoszóma-kondenzáción, kromoszóma-késésen keresztül aneuploid sejtpopulációk megjelenéséhez vezet (lásd később).

2.1.3.3. Az Aurora B kináz expresszió malignus folyamatokban

Az Aurora B overexpresszióját több tumortípusban leírták (2. Táblázat). A munkacsoportok között azonban nincs konszenzus: a kináz expressziójának mértéke különböző módszerekkel került meghatározásra, a kináz expresszióját a tanulmányok többsége önálló markerként vizsgálja, az adott tumorra jellemző sejtproliferációs aktivitással való viszonyát nem veszi figyelembe. Az overexpresszióra vonatkozó határérték meghatározása erősen szubjektív.

2. Táblázat Fokozott Aurora B expresszióval társuló tumorok

Tumor típus	Referencia
Hepatocellularis karcinoma	[75]
Fej-nyaki laphámrák	[76, 77]
Prostata daganat	[78, 79]
Heredaganatok	[80, 81]
Colorectalis daganatok	[82]
Emlőkarcinoma	[83]
Astrocitoma	[84]
Világossejtes vesekarcinoma	[85]
Akut myeloid leukemia (AML)	[86]
Non-Hodgkin limfóma	[87]
Nem-kissejtes tüdőrák	[88, 89]
Pajzsmirigy karcinoma	[90]
Endometrialis karcinoma	[91]

Sorrentino és munkatársai [90] pajzsmirigy karcinoma minták Aurora B expressziós szintjét vizsgálták a sejtproliferációs aktivitással párhuzamosan immunhisztokémiai és Western-blot módszerekkel. Az immunpozitív sejtek százalékos arányát az összes tumorsejthez viszonyítva határozták meg.

Eredményeik szerint normál pajzsmirigy szövet és nem neoplasztikus elváltozásokban a kináz expressziója nem detektálható, míg a tumorsejtek jelentős kináz-expressziót mutattak. Az Aurora B pozitív sejtek aránya immunhisztokémiai módszerrel 10 papillaris pajzsmirigy karcinoma (PTC) mintában (átlag \pm SD) 2,3 \pm 0,4 %, 10 follicularis pajzsmirigy karcinoma mintában 2,8 \pm 0,4 %, 15 anaplasticus pajzsmirigy karcinoma mintában 29,6 \pm 3,4 % arányban volt detektálható. A sejtproliferációs aktivitást jellemző Ki67 expressziót ugyanezekben a mintákban (átlag \pm SD) 3,1 \pm 0,5 %, 3,6 \pm 0,6 %, és 43,2 \pm 6,6 % arányban figyelték meg.

A szerzők eredményeik alapján az Aurora B kináznak prognosztikus jelentőséget tulajdonítanak. Sejtvonal kísérleteikben a kináz kísérletes blokkolása jelentős mértékben redukálta az anaplasticus sejtek növekedését, ezért az Aurora B kinázt ígéretes terápiás targetként írják le.

Qi és munkatársai [77] 40 formalin-fixált paraffinba ágyazott szájüregi laphámrák mintán immunhisztokémiai módszerrel tanulmányozták az Aurora B-t és a Ki67 fehérjét expresszáló sejtek arányát. Kontrollként 6 normál mucosa mintát használtak.

Az Aurora B és Ki67 proteinek emelkedett expresszióját találták normál epithelialis szövethez viszonyítva (Aurora B: $\text{átlag} \pm \text{SD}$: 16.5 ± 8.5 % laphámrák mintákban és 4.4 ± 1.9 % normál epithelialis szövetben; Ki67: laphámrákban 49.7 ± 18.1 % és 13.7 ± 2.9 % normál epithelialis szövetekben). A két paraméter között erős korrelációt találtak ($R: 0,69$).

A legintenzívebb Aurora B expressziót rosszul differenciált tumorokban figyelték meg. Adataik szerint jelentős kináz expresszió mutatható ki a nyirokcsomó áttétekből származó mintákban is.

Kurai és munkatársai [91] tanulmányukban 40 normál, 30 hyperplasticus és 73 malignus endometrium minta Aurora B expresszióját hasonlították össze immunhisztokémiai, western-blot és RT-PCR módszerekkel.

Az Aurora B kinázt expresszáló sejtek arányát pozitívitás indexként (PI) adták meg, a következő formula szerint: intenzív jelölést mutató sejtek aránya $\times 1$ + gyengén pozitív sejtek aránya $\times 0,5$. Az overexpresszióra vonatkozó határértéket $PI=20$ értéknél állapították meg. Az előző munkacsoporthoz hasonlóan ők is látták a kináz jelentős korrelációját a sejtproliferációs rátával.

Az Aurora kináz B endometrium ciklustól való függését állapították meg. A kináz expresszióját a proliferációs fázisban találták a legmagasabbnak, míg a szekréciós fázisban a kináz expresszió szignifikáns csökkenését látták. Endometrium karcinoma mintákban a kináz expressziója alacsony volt. Az Aurora B fokozott expresszióját rossz prognózissal társították szemben az Aurora B negatív karcinoma mintákkal.

García-Fernandez és munkacsoportja [76] az Aurora B kináz és a Ki67 expressziója mellett más, a sejtciklus szabályozásban érintett fehérjék, mint az Aurora A, p53 és survivin expresszióját vizsgálták 259 laryngealis laphámrák mintában. Kísérleteikhez formalinban fixált paraffinba ágyazott mintákat használtak, a fehérjék expresszióját immunhisztokémiai módszerrel vizsgálták. A fehérjeexpresszió kvantifikálására multiplikatív expressziós indexet

(MEI) használtak, melyet a következő formula szerint határoztak meg: intenzitás „score” (negatív: 0; gyengén pozitív: 1; közepesen pozitív: 2; erősen pozitív: 3) + pozitív sejtek aránya (negatív: 0; 1-33 %: 1; 34-66 %: 2, 67%-100%: 3). Az Aurora B overexpresszióját MEI>4 értéknél határozták meg.

Korrelációt találtak a fokozott Aurora B expresszió és a tumor rekurrencia között. Eredményeik alapján az Aurora B overexpresszióval társuló mintákban a betegek túlélési ideje szignifikánsan kevesebbnek bizonyult.

Lin és munkatársai [75] 160 hepatocellularis karcinoma mintán vizsgálták az Aurora B expressziót RT-PCR-rel és Western-blottal. Az Aurora B mellett vizsgálták az Aurora B mRNS szinteket, továbbá a p53 és β -katenin génjeinek mutációs analízisét is elvégezték.

A minták 61 %-ában látták az Aurora B overexpresszióját. A kináz expresszió fokozódását agresszív tumor fenotípusok megjelenésével hozták összefüggésbe. Az emelkedett Aurora B expresszió és főbb klinikopatológiai paraméterek között erős korrelációt láttak: emelkedett szérumszint AFP szint ($p < 0,0001$), tumor méret ($p = 0,021$), tumor grádus ($p = 0,0007$). Az Aurora A-hoz hasonlóan az Aurora B overexpresszó és a tumorinvázió és az intrahepaticus metastasis képzés között is összefüggést találtak. Pozitív korrelációt találtak az Aurora B overexpresszió és a p53 valamint a β -katenin mutációk megjelenése között.

Ikezoé és munkacsoportja [92] kísérleteikben az Aurora B kináz expresszióját vizsgálta immunhisztokémiai módszerekkel. Tanulmányukba 21 diffúz nagy B-sejtes limfóma (DLBCL), 7 Burkitt-limfóma (BL), 13 follicularis limfóma (FL), 4 köpenysejtes limfóma (MCL), 3 mucosa asszociált limfóma (MALT), 11 felnőttkori T-sejtes limfóma (ATL), 9 perifériás T-sejtes limfóma (PTCL) és 3 Hodgkin-limfóma (HL) mintát vontak be.

A legintenzívebb és legnagyobb fokú Aurora B pozitivitást DLBCL (10/21 minta) és BL mintákban (6/7 minta) detektálták. FL (12/13 minta), MCL (1/3 minta) és MALT (1/3 minta) mintákban a kináz közepes expresszióját detektálták. ATL minták közül 8-ban nem volt detektálható kináz expresszió, további 3 minta gyenge pozitivitást mutatott. PTCL minták közül 3 bizonyult Aurora B negatívnak, 5 mintában pedig gyenge pozitivitást láttak. Az Aurora B expresszió és a klinikai státusz között erős korrelációt figyeltek meg.

Az Aurora A kináz mRNS overexpresszióját már 1997-ben megfigyelték és összefüggésbe hozták az emlődaganatok kialakulásával [93]. Az Aurora B expresszióját emlőtumorkban kevés munkacsoport vizsgálta, a tudományos figyelem inkább az Aurora A kinázra összpontosul.

Nadler és munkacsoportja [94] 638 primer emlőtumor mintában valamint 9 sejtvonalon vizsgálták az Aurora A és B kináz expresszióját immunhisztokémiával és Western blottal. Az Aurora B expressziójában a szerzők rendkívüli variabilitást figyeltek meg. A fokozott Aurora B expressziós értékek és a tumor korai életkorban való megjelenésével, a magas nuclearis grádussal, alacsony ösztrogén-receptor expresszióval és nyirokcsomó érintettséggel korreláltak. A kináz expressziója a betegek túlélési idejét szignifikáns mértékben nem befolyásolta.

Az Aurora kinázok aberráns expressziója számos különböző tumortípusban leírásra került. A jelenséget összefüggésbe hozták az agresszív tumor fenotípus megjelenésével. A megfigyelések alapján a kináz család új-generációs tumorelles szerek fejlesztésének fontos célpontjává vált.

2.1.3.4. Aurora kináz inhibitorok (AKI)

A kinázok leírását követő 10 éven belül már több mint 10 kináz ellenes szer került kipróbálásra.

Az Aurora kináz inhibitorok ATP kompetitív módon hatnak. Bár az Aurora kinázok ATP kötő helyei nagyfokú hasonlóságot mutatnak, a kötőhely térszerkezetének különbözősége mégis lehetőséget nyújt szelektív gátlószerek alkalmazására [95].

A dolgozat megírásakor több mint 30 különböző Aurora kináz inhibitor van különböző fázisban lévő preklinikai és klinikai tanulmányokban.

A jelenleg különböző preklinikai és klinikai vizsgálatok különböző fázisaiban levő Aurora kináz inhibitorokat a 3. és 4. Táblázat foglalja össze.

3. Táblázat Szelektív Aurora kináz inhibitorok

Inhibitor	Fejlesztő	Target	Alkalmazás	Fejlesztési fázis
MLN8237	Milliennium	Aurora A	solid tumorok leukemia	Fázis II
ENMD-2076	EntreMed	Aurora A	solid tumorok myeloma	Fázis II
MK-5108	Vertex	Aurora A	solid tumorok	Fázis I
AZD1152	AstraZeneca	Aurora B	solid tumorok AML	Fázis II
Hesperadin	Boehringer Ingelheim	Aurora B		Fázis I

Forrás: Kollareddy et al, 2012 [96]

4. Táblázat Pán-Aurora kináz inhibitorok

Inhibitor	Fejlesztő	Target	Alkalmazás	Fejlesztési fázis
PHA-739358	Nerviano	Aurora A Aurora B Aurora C	solid tumorok CML	Fázis II
CYC116	Cyclacel	Aurora A Aurora B Aurora C	solid tumorok,	Fázis I
SNS-314	Sunesis	Aurora A Aurora B Aurora C	solid tumorok leukemia	Fázis I
VX-680	Vertex	Aurora A Aurora B Aurora C	solid tumorok	Toxicitás miatt felfüggesztve
AT9283	Astex	Aurora A Aurora B	solid tumorok CML AML	Fázis II
R763	Rigel	Aurora A Aurora B Aurora C	solid tumorok	Fázis I
PF-03814375	Pfizer	Aurora A Aurora B	solid tumorok	Fázis I
GSK1070916	GlaxoSmithKline	Aurora B Aurora C	solid tumorok	Fázis I
AMG-900	Amgen	Aurora A Aurora B Aurora C	solid tumorok	Fázis I
PHA-680632	Nerviano	Aurora A Aurora B Aurora C	solid tumorok leukemia	Preklinikai
VE-465	Merck	Aurora A Aurora B Aurora C	hepatocellularis karcinoma	Preklinikai
JNJ-7706621	Johnson	Aurora A Aurora B	solid tumorok melanoma	Preklinikai
CCT129202	Chroma	Aurora A Aurora B	solid tumorok	Preklinikai
Telik's dual AKI	Telik	Aurora A Aurora B	solid tumorok	Preklinikai
AKI-001	Roche	Aurora A Aurora B	solid tumorok	Preklinikai
ZM447439	Astra Zeneca	Aurora A Aurora B		Preklinikai

Forrás: Kollareddy et al, 2012 [96]

ZM447439 pán-Aurora kináz gátlóval végzett kísérletek [61] bizonyítják, hogy a nem szelektív Aurora kináz gátlók alkalmazása Aurora B defektív fenotípust eredményez. A szerzők eredményeik alapján az Aurora B kinázt tartják ígéretesebb terápiás célpontnak.

Az elvégzett és jelenleg is folyamatban lévő kísérletek tanulsága alapján ez idáig egyik AKI sem felelt meg maximálisan a klinikai alkalmazhatóság követelményeinek.

Problémát jelent a tumorsejtekben kialakuló AKI rezisztencia. A rezisztencia kialakulásának pontos biológiai háttere jelenleg nem ismert. Feltehetően a target kináz mutációja vagy overexpressziója következtében megváltozott kináz funkció állhat a jelenség hátterében.

A kináz inhibitorok hatásosságának előjelzése szempontjából fontos lehet a kináz overexpresszió pontos definiálása. Jelenleg a vonatkozó irodalmi adatok nem egységesek, az Aurora B overexpressziót különböző módszerekkel (western blot, ELISA, PCR) határozzák meg, egyéb sejtkinetikai paraméterek figyelembe vétele nélkül.

2.1.3.5. Aurora B mint prognosztikai és prediktív marker

Az Aurora B expresszió prognosztikai és prediktív szerepéről az irodalomban kevés információ áll rendelkezésre.

A megjelent tanulmányok kedvezőtlen prognosztikai jelnek tekintik az Aurora B overexpresszió megjelenését hepatocellularis karcinómában, fej-nyaki daganatokban, endometrium karcinómában, emlőkarcinómában, chondrosarcomában és non-Hodgkin limfómában [75-77, 91, 92, 94, 97, 98].

Az Aurora B prediktív szerepét ovarium karcinómában és hepatocellularis karcinómában vizsgálták.

Beussel és munkatársai [99] előrehaladott (FIGO III stádium) serosus ovárium karcinomás betegek első vonalbeli taxán és platina-bázisú terápiájának összefüggését vizsgálták a recidívamentes (RFS) és teljes túléléssel (OS) valamint az Aurora B expresszióval összefüggésben. Összesen 18 nem neoplasztikus ovárium és 80 ovárium karcinoma minta Aurora B expresszióját határozták meg immunhisztokémiai módszerrel.

A nem neoplasztikus minták egyikében sem volt kimutatható Aurora B expresszió, míg az ovarium karcinoma minták túlnyomó többsége (79/80 minta) Aurora B expressziót mutatott. Eredményeik alapján az Aurora B pozitív betegek recidívamentes túlélése szignifikánsan kedvezőbbnek bizonyult taxán-bázisú terápia mellett, míg platina-bázisú terápia és az Aurora B expressziója között összefüggést nem mutattak ki.

Hetland és munkacsoportja [100] szintén előrehaladott (FIGO IIIc, IV stádium) primer és metasztatikus serosus ovárium karcinoma minták Aurora B expresszióját vizsgálta, kemorezisztencia kialakulásával és túléléssel összefüggésben. 38 primer tumorból, 44 solid metasztázisból és 88 effúzióból származó tumor minta Aurora B mRNS szintjét határozták meg qRT-PCR módszerrel. Az Aurora B kináz expresszióját fehérje szinten, immunhisztokémiai módszerrel is meghatározták. A kináz fokozottabb expresszióját látták kemoterápia előtt (platina-bázisú és paclitaxel), az expresszió a terápia hatására csökkent. Eredményeik alapján azokban a tumorokban, amelyek alacsony Aurora B expressziót mutatnak, gyakrabban alakult ki rezisztencia az alkalmazott kemoterápiás szerekkel szemben.

Tanaka és munkatársai [101] hepatocellularis karcinoma minták Aurora B expressziós adatait elemezték. 107 beteg primer hepatocellularis karcinoma mintáját vizsgálták meg immunhisztokémiai módszerrel.

Adataik szerint normál májszövetben nem volt detektálható Aurora B kináz expresszió, míg tumoros szövetekben ez gyakori jelenségnek bizonyult. Eredményeik alapján az Aurora B expresszió szintje erősen összefügg a tumor várható rekurrenciájával.

Az Aurora B sokrétű mitotikus regulátor szerepe, valamint upregulált kináz funkciója különböző tumoros folyamatokban is ismert, ezért a tumor ellenes szerek fejlesztésének ígéretes célpontja. Az AKI inhibitorok célcsoportjának meghatározása azonban nem egyértelmű: a legfőbb indok azon a megfigyelésen alapszik, ami szerint az Aurora B overexpressziója sok tumor közös jellemzője. Az overexpresszió definiálásában azonban jelenleg nincs konszenzus, a kináz expresszió többféle módszerrel kerül meghatározásra mRNS vagy fehérjeszinten. A kináz expresszióját önálló biomarkerként vizsgálják, más tényezőket nem vesznek figyelembe.

3. Célkitűzések

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 és az aneuploidia között erős összefüggést írtak le [102]. 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*

4. Anyag és Módszer

4.1. Vizsgálatba bevont betegcsoportok

4.1.1. 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 minták klinikopatológiai adatait az 5. Táblázat foglalja össze.

5. Táblázat A vizsgálatba bevont emlőkarcinoma minták klinikopatológiai adatai

	<i>Minták száma</i>	
	IDC	ILC
Szövettani típus		
<i>Molekuláris altípus</i>		
Luminalis A	27	5
Luminalis B	4	0
HER2 típusú	8	0
Tripla negatív	6	0

ER státusz		
negatív	14	0
pozitív	31	5

PR státusz		
negatív	21	2
pozitív	24	3

c-erb-B2 „score”		
-	14	2
+	10	1
++	12	2
+++	9	0

HER2 amplifikáció		
negatív	32	5
pozitív	13	0

Összes minta	45	5
Kor (átlag±SD)		
<i>Nem</i>	Nő: 49	Férfi: 1

IDC: invazív ductalis karcinoma; ILC: invazív lobularis karcinoma; ER: ösztrogén receptor; PR: progeszteron receptor

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

Molekuláris osztályozást követően 32 minta luminalis A (ER pozitív, PR pozitív, HER2 génamplifikáció negatív, Ki67 expresszálo 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.

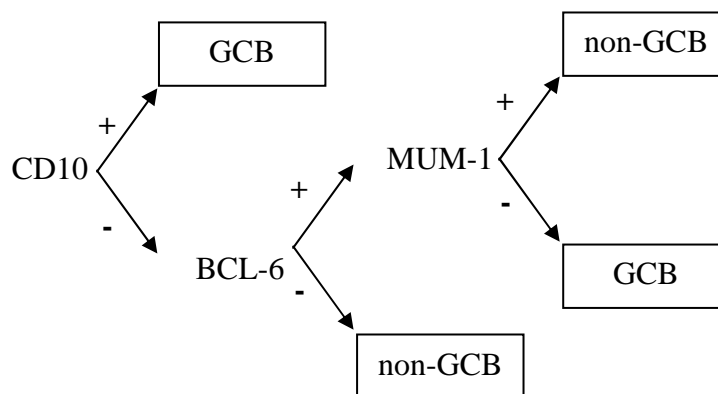
Ösztrogén receptor pozitivitást összesen 36, progeszteron receptor pozitivitást 27 szövettani mintában láttunk. Az 50 mintából 16 mintában nem volt detektálható c-erb-B2 expresszió. HER2 génamplifikációt 13 mintában figyeltünk meg.

4.1.2. 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 jellegzetességeik 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 [103] (9. Ábra) alapján két alcsoportot hoztunk létre: a centrum germinativum (GCB) és nem centrum germinativum (non-GCB) immunhisztokémiai fenotípust mutató csoportokat (6. Táblázat).



9. Ábra Hans algoritmus

6. Táblázat Agresszív B-sejtes limfóma minták klinikopatológiai paraméterei

	<i>Minták száma</i>	<i>Stádium</i>				
		<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>NA</i>
<i>Szövettani típus</i>						
DLBCL, NOS, non-GCB	29	1	6	3	13	6
DLBCL, NOS, GCB	14	1	2	3	5	3
PMBL	3	0	1	0	1	1
B-ALCL	3	0	1	1	0	1
Borderline DLBCL-CHD	1	0	0	1	0	0

<i>Összes minta</i>	50					
<i>Kor (átlag±SD)</i>	55,3±16,1					
<i>Nem</i>						
Nő	22					
Férfi	28					

DLBCL: diffúz nagy B-sejtes limfóma; NOS: not otherwise specified; non-GCB: nem centrum germinativum eredet; GCB: centrum germinativum típus; PMBL: primer mediastinalis nagy B-sejtes limfóma; B-ALCL: ALK+ nagy B-sejtes limfóma; CHD: klasszikus Hodgkin limfóma; NA:nincs adat

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 ágyaztuk. TMA blockjainkba 6 - 6, két kontroll mintából származó szövethenger került.

4.2. 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 (3DHitech 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 (3DHitech Kft, Magyarország) segítségével rögzítettük.

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

4.3. 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. Az alkalmazott antitesteket és hígításokat 7. Táblázat foglalja össze. 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 öltettük, 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 xilolbázisú médiummal (Surgipath Micromount, Leica Microsystems, Németország) fedtük.

7. Táblázat IHC vizsgálatokhoz használt antitestek és epitóp feltáró kitek

Primer antitest	Hígítás	Epitóp feltárás	Szekunder antitest	Kromogén
egér anti-Ki67 (MIB-1 klón) DAKO ¹	1:600		Envision FLEX detection system, DAKO	
egér anti-survivin AbCam ²	1:300	EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, pH6, DAKO		DAB
nyúl anti-Aurora B AbCam	1:300		Super Sensitive™ One- Step Polymer-HRP IHC Detection System, BioGenex ³	
nyúl anti-H3 hiszton (foszfo- Ser10) AbCam	1:1000	EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, pH6, DAKO	Envision FLEX detection system, DAKO	

¹ DAKO, Dánia

² AbCam Plc, UK

³ BioGenex, USA

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

4.4. 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.

Invazív emlőkarcinoma mintákban - nem lévén megfelelően definiálható kontroll csoport - az Aurora B overexpresszió határértékét irodalmi adatok alapján [104] 0,3 feletti értékeknél határoztuk meg.

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

Reaktiv follicularis hyperplasia mintákban a kiértékelést a centrum germinativumokban végeztük.

4.5. 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 használatakor 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 rehidráció 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 bekötődött DNS szondákat Zeiss Axio Imager Z2 fluoreszcens mikroszkóppal detektáltuk, a *Fluoreszcens mikroszkópia* részben leírtaknak megfelelően.

4.6. 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:
 $\text{átlagos kromoszóma kópiaszám} + 2SD = 1,814 + 2 \times 0,081 = 1,98$
- b) *hiperdiszómia*: 1,98 és 2,3 átlagos sejtenkénti kromoszómaszám között
- c) *trisómia*: 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.

4.7. Sejtek DNS tartalmának meghatározása áramlási citometriával (ploiditás vizsgálatok)

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 [105] megfelelően preparáltuk, apró módosításokkal. A paraffinos szöveti blockokból 1-1 darab 50 µm vastag metszetet készítettünk, melyeket Eppendorf csövekbe helyeztünk. Deparaffinálás után (NeoClear, 3×10 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 µg/ml DAPI/1×PBS oldatban reszuszpendáltuk.

Emlőkarcinoma minták esetén a sejtmag-szuszenziók preparálása nem volt sikeres, szűrés után a szuszpenziók elegendő mennyiségű sejtmagot nem tartalmaztak.

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.

4.8. 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.

5. Eredmények

5.1. Aurora B kináz expresszió vizsgálata invazív emlőkarcinoma mintákban

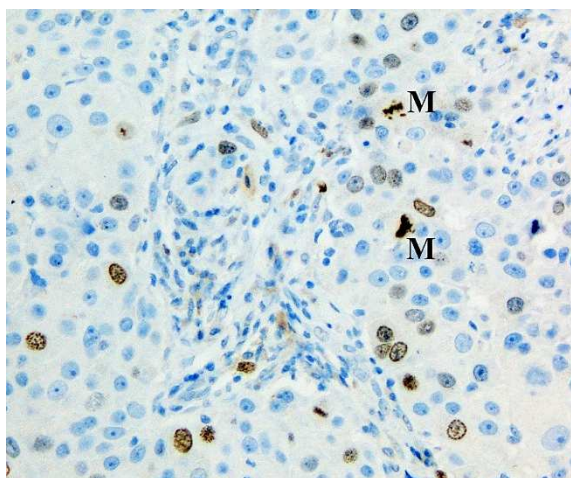
5.1.1. Invazív emlőkarcinoma minták klinikai és biológiai paraméterei

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

A minták klinikopatológiai adatait az 5. Táblázat foglalja össze.

5.1.2. Aurora B expresszió

Az Aurora B pozitív sejtekben sejtmag pozitivitást észleltünk. Aurora B pozitivitás G2 fázistól az M fázis végéig detektálható, az antitest a vártnak megfelelően az interfázisos sejtmagok egy részét, valamint a mitotikus alakokat jelölte (10. Ábra).

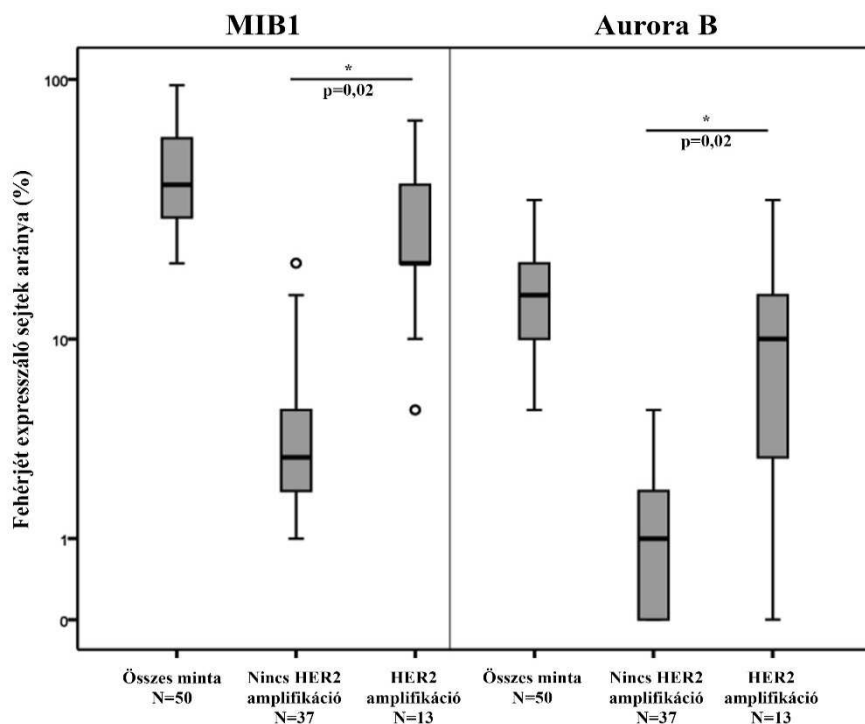


10. Ábra Aurora B kinázt expresszáló sejtek jelölése immunhisztokémiai reakcióval

M: mitózis; DAB reakció, hematoxylin háttérfestés, 400× nagyítás

Adataink alapján emlőkarcinoma mintákban az Aurora B kinázt 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).

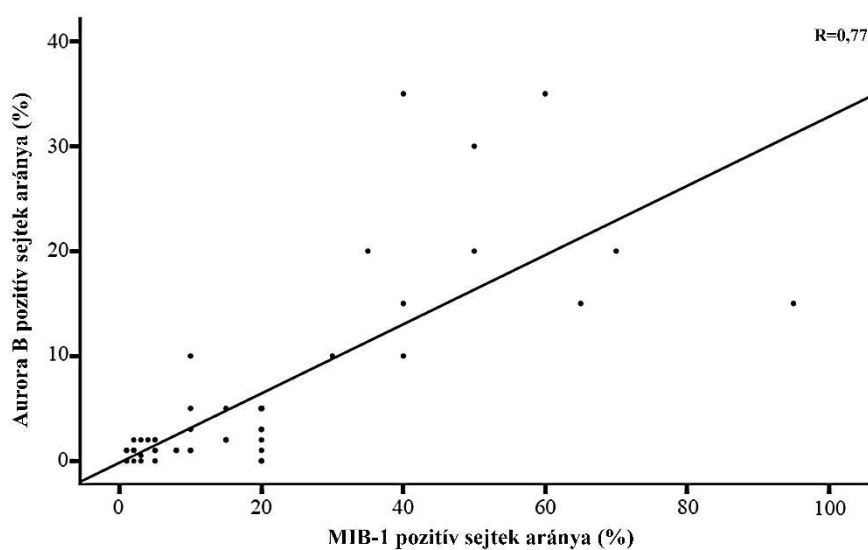
A HER2 génamplifikációt mutató mintákban szignifikánsan magasabb Aurora B kináz expressziót figyeltünk meg ($p=0,015$), és eredményeink szerint ez fokozott sejtproliferációval társult ($p=0,018$) (11. Ábra).



11. Ábra HER2 génekópiaszám kapcsolata MIB-1 és Aurora B fehérjéket expresszáló sejtek arányával emlőkarcinoma mintákban
A box plotokon átlag és szórás van feltüntetve.

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 ($p=0,0003$).

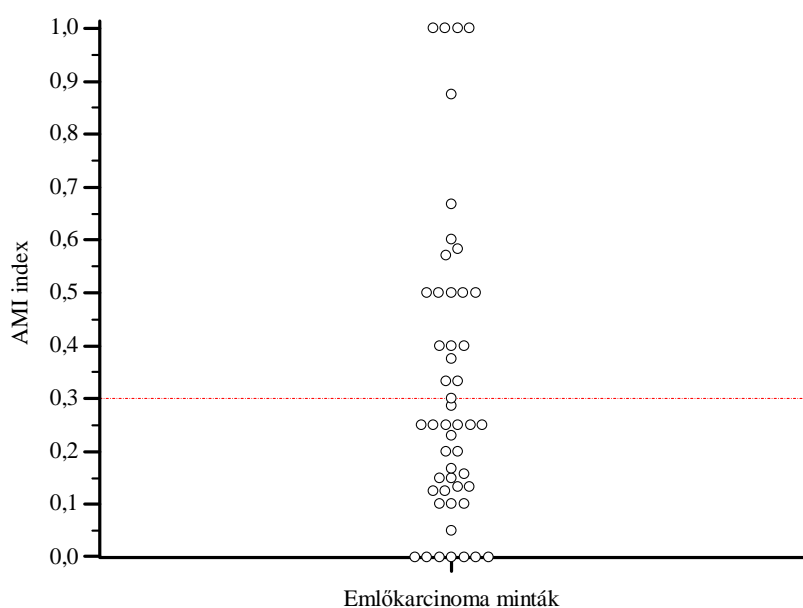
Erős korrelációt találtunk az Aurora B-t és a MIB-1-et együttesen expresszáló szöveti mintákban ($R:0,77$) (12. Ábra).



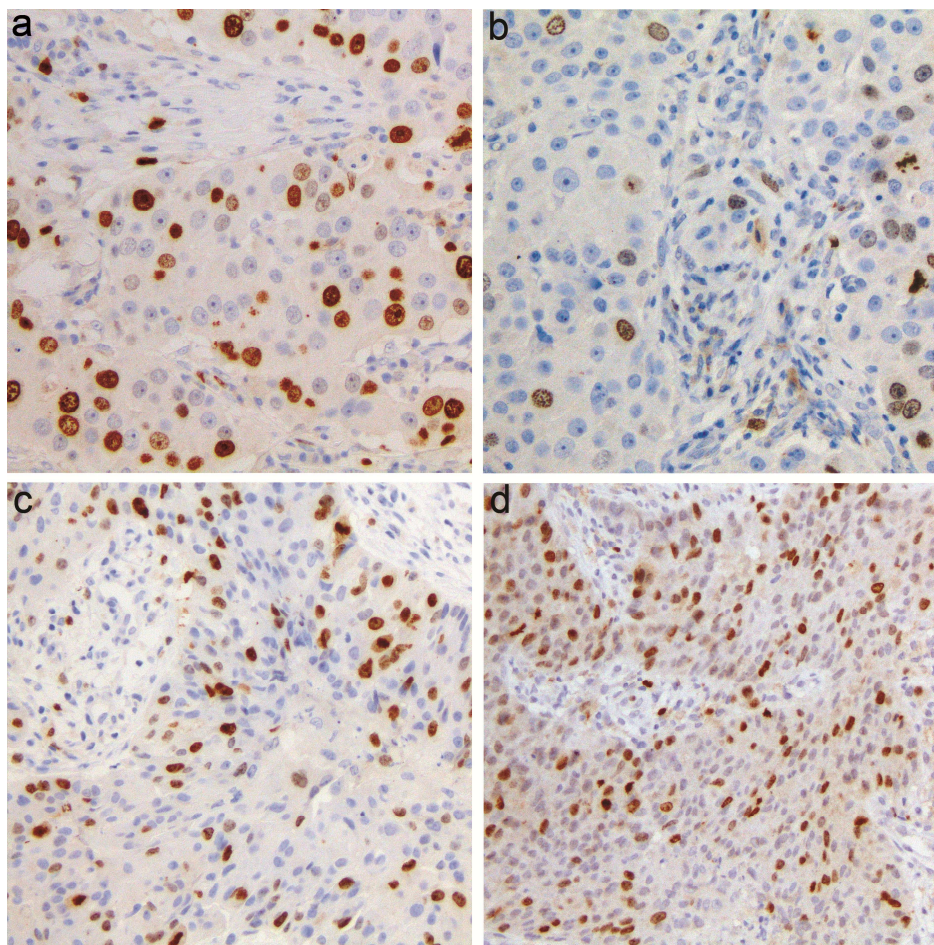
12. Ábra Aurora B expresszió a sejtproliferáció függvényében

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 [104] 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 (13-14. Ábra).



13. Ábra Emlőkarcinoma minták relatív Aurora B expressziója (AMI)
Overexpresszióknak a 0,3 feletti AMI értékeket tekintettük.



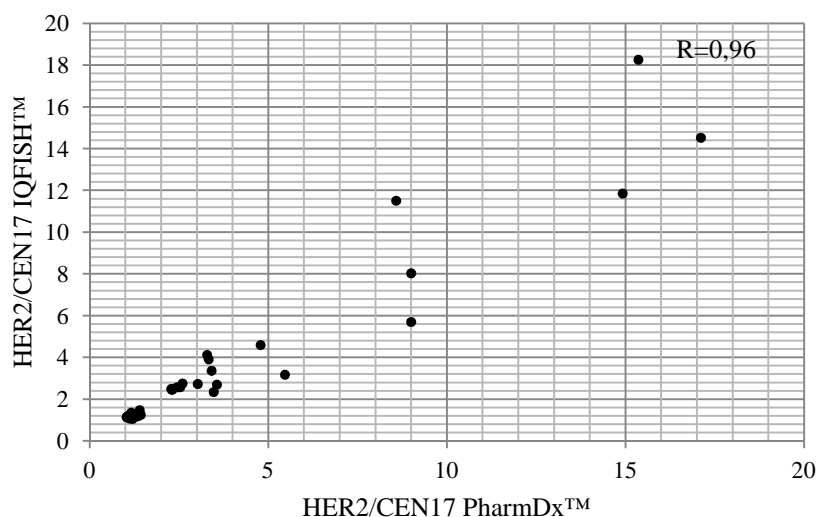
14. Ábra Emlőkarcinoma szöveti minták MIB-1 (a,c) és Aurora B (b,d) expressziója

Az a és b képek egy AMI=0,25 relatív Aurora B expressziót mutató szövettani mintát, a b és d mikrofontók egy Aurora B overexpresszióval (AMI=0,88) járó mintát reprezentálnak.
DAB reakció, hematoxylin háttérfestés, 400× nagyítás

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

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

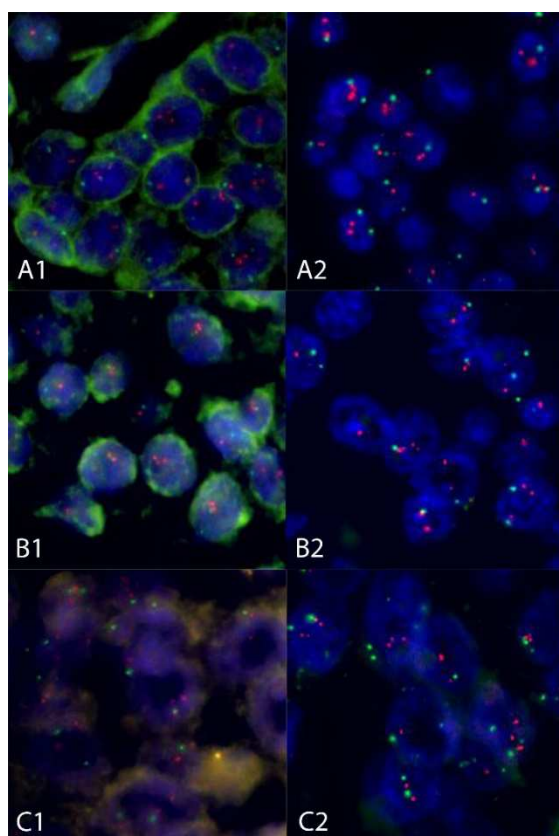
Eredményeink alapján a hagyományos és IQFISH kittel detektálható 17-es kromoszóma és HER2 génaplifikációs státuszok közötti egyezés mértéke 100 % (15. Ábra).



15. Ábra A HER2 gén kópiaszáma konvencionális (PharmDx) és IQFISH kittel

A HER2 amplifikációs státusza mindkét kit alkalmazásával megegyeztek, a HER2/CEN17 arányok korrelációja 96% volt.

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 (*16. Ábra*).



16. Ábra In situ hibridizáció eredménye invazív emlőtumor mintákon konvencionális (A1-B1-C1) és IQFISH (A2-B2-C2) kiteket alkalmazva

A HER2 és a 17-es kromoszóma kópiaszámok tekintetében nem volt különbség. IQFISHt használva az eredmény az alacsonyabb háttérfluoreszcencia miatt könnyebben interpretálható, a szöveti morfológia kevésbé károsodott.

630× nagyítás, DAPI sejtmag festés

5.1.4. 17p13.1 lókuszt és 17-es kópiaszám változások

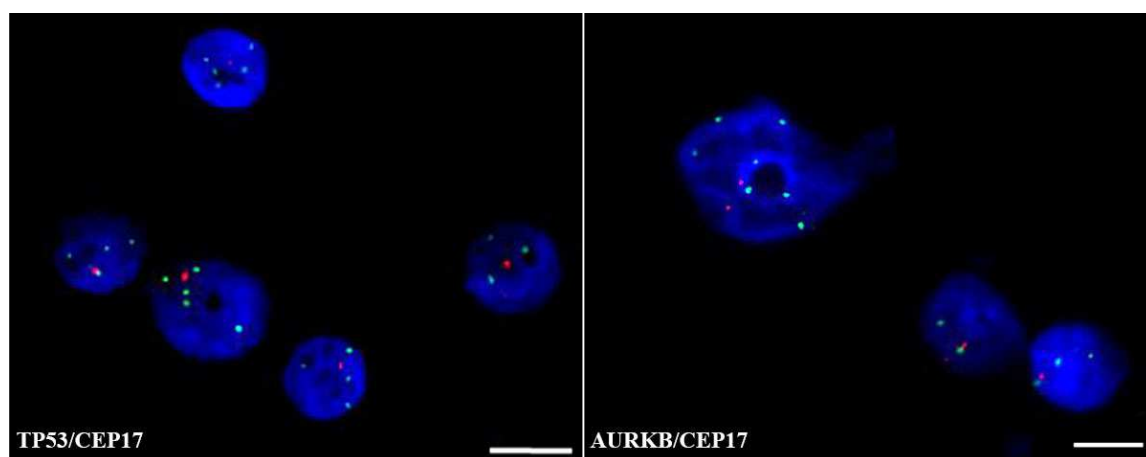
Az Aurora B kináz overexpresszió citogenetikai hátterének vizsgálatát FISH módszerrel végeztünk. A FISH reakciók mikroszkópos képét a 12. *Ábra* mutatja be.

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.

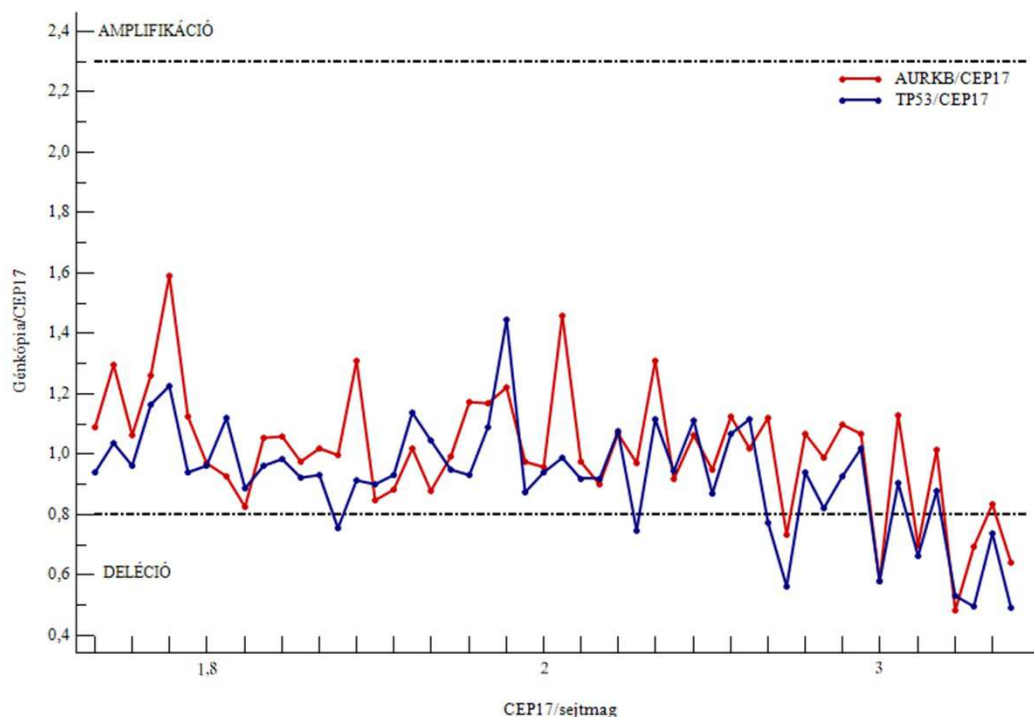
Az Aurora B overexpressziót mutató minták egyikében sem láttunk AURKB génamplifikációt.

A minták egy csoportjában (6 minta) azonban megfigyeltük az AURKB delécióját, amely mindegyik mintában TP53 delécióval társult. (17-18. *Ábra*) 4 további mintában csak TP53.



17. *Ábra* TP53 és AURKB vesztés 17-es kromoszóma poliszómiával.

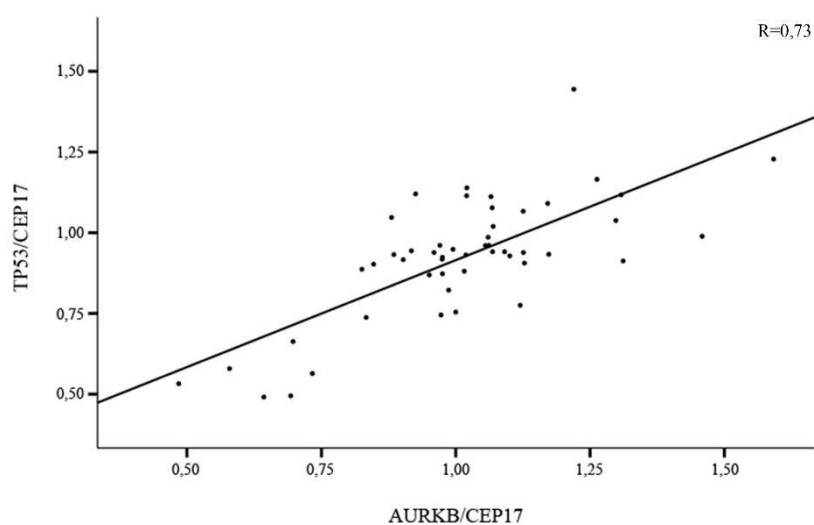
Aurora B és a TP53 gének az ábrán piros színben, a 17-es kromoszóma centromérai régiója (CEP17) zöld színnel van jelölve. Scalebar: 4µm



18. Ábra AURKB és TP53 relatív génkópiaszámok a 17 kromoszóma (CEP17) sejtmagonkénti számának függvényében

Allélvesztést 0,8 kópia / CEP17 értéknél kisebb génkópiaszámnál állapítottunk meg. 6 mintában volt megfigyelhető az AURKB és TP53 gének együttes vesztese. Génamplifikáció (>2,3 génkópia / CEP17) egy mintában sem volt megfigyelhető.

Eredményeink szerint erős korreláció van az AURKB és TP53 gének kópiaszáma között ($R:0,73$) (19. Ábra).



19. Ábra AURKB és TP53 kópiaszámok közötti erős korreláció

A minták HER2 és AURKB és/vagy TP53 gének száma között összefüggést nem figyeltünk meg. A 13 HER2 génamplifikációt 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 (8. Táblázat), aneuszómiát – több mint 2,3 CEP17 szignált sejtmagonként - 19 mintában láttunk (38%).

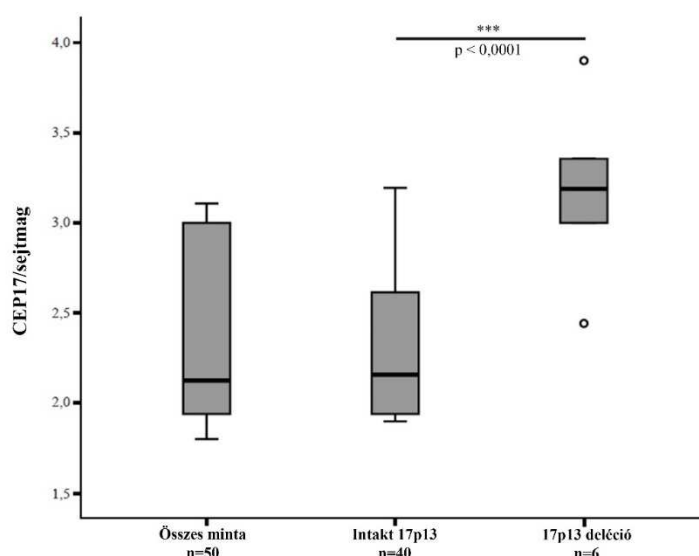
8. Táblázat A fehérjék expressziója 17-es kromoszóma aneuszómiát mutató, és normál, diszómiás mintákban

	aneuszómia (n=19)		diszómia (n=31)		p
	tartomány	átlag±SD	tartomány	átlag±SD	
Aurora B pozitivitás (%)	0-35	7.42±8.67	0-35	5.37±8.8	0.43
Mitózis index	5-54	21.26±10.25	2-68	13.6±15.04	0.06
Ki67 pozitivitás (%)	5-70	21.37±15.48	1-95	17.58±23.22	0.54
AMI index	0-1	0.31±0.26	0-2	0.44±0.5	0.31
Aurora B relatív overexpresszió		N=6		N=14	

p: p-érték, valószínűség értéke

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 aneuszómiát mutatott.

Az intakt 17p13.1 lókusssal bíró minták kromoszómálisan stabilabbnak bizonyultak, a 17-es kromoszóma kópiaszáma 1,6 és 3,19 között változott (átlag: 2,1, SD: 0,05). A különbség statisztikailag szignifikáns ($p < 0,0001$) (20. Ábra).



20. Ábra A 17p13.1 lókuszs elvesztés és 17-es kromoszóma kópiaszámának összefüggése

A box plotokon átlag és SD értékek vannak feltüntetve.

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

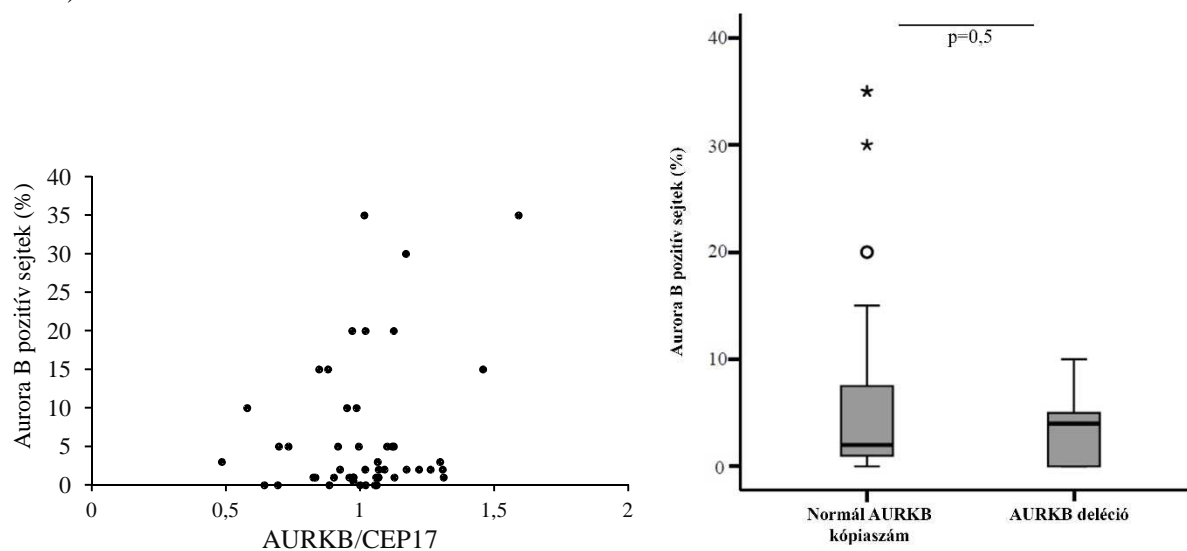
5.1.5. Aurora B expresszió és 17-es kromoszóma kópiaszám összefüggései

Az Aurora B kináz expresszió és numerikus kromoszóma-rendellenességek összefüggéseinek tisztázására a kináz expresszió függvényében a 17-es kromoszóma és a 17p13.1 lókuszt 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 kinázt expresszáló tumorsejtek arányát 0 és 35 % között láttuk (átlag: 6,47, SD: 9,26). Az AURKB géndelációval társuló mintákban ugyanez az érték 0 és 10% közöttinek bizonyult (átlag: 3,83, SD: 3,44), a különbség statisztikailag nem szignifikáns ($p=0,5$) (21. Ábra).

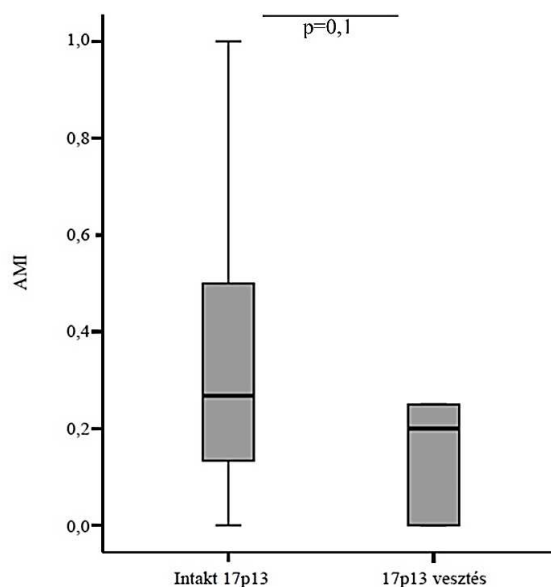


21. Ábra AURKB gén kópiaszám és a kináz expressziója közötti korreláció

A box plotokon átlag és SD értékek vannak feltüntetve.

Adataink alapján statisztikailag nincs jelentős különbség a relatív Aurora B expresszióban a 17p13.1 lókuszt 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) (22. *Ábra*).

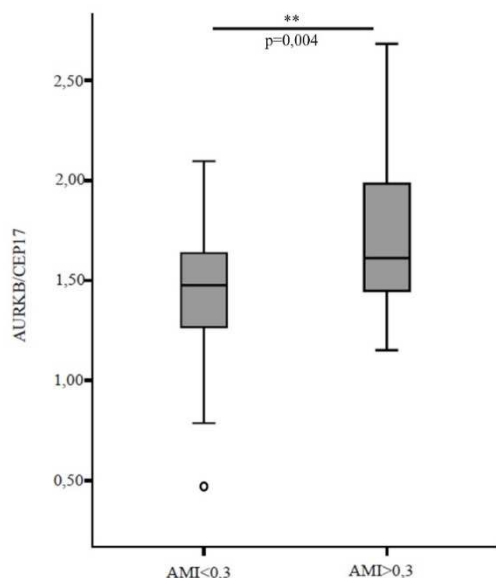


22. *Ábra* A relatív Aurora B expresszió (AMI) és a 17p13.1 lókusztól való kópiaszámának összefüggése

17p13 deléció az Aurora B relatív expressziójában mérsékelt csökkenést okozott az intakt 17p13 régióval rendelkező mintákhoz viszonyítva. A különbség statisztikailag nem szignifikáns.

A box plotokon átlag és SD értékek vannak feltüntetve.

Az emlőkarcinoma minták egy csoportjában extrém magas AMI értéket ($AMI \geq 0,8$) figyeltünk meg. Ezekben a mintákban az AURKB relatív génekópia 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 ($p=0,004$) (23. *Ábra*).



23. *Ábra* AURKB relatív génekópia szám az Aurora B kináz normál- és overexpressziójával összefüggésben

Az Aurora B overexpressziója az AURKB génekópia szám emelkedését okozza, de adataink alapján génamplifikáció nem figyelhető meg a fokozott kináz expresszió hátterében.

A box plotokon átlag és SD értékek vannak feltüntetve.

5.2. Aurora B kináz expresszió vizsgálata agresszív B sejt limfómákban

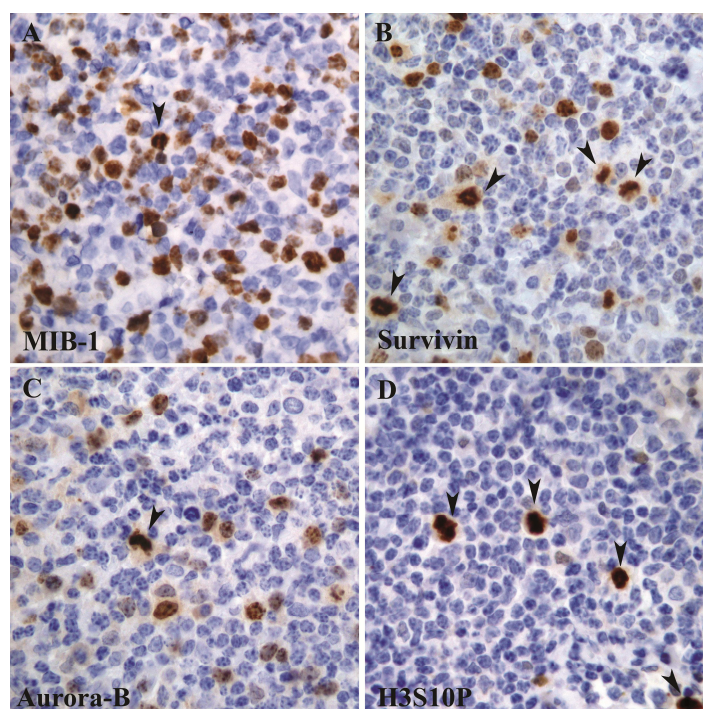
Kísérleteinkbe összesen 50 agresszív B-sejt limfóma minta került bevonásra. A minták klinikopathológiai paramétereit a 6. Táblázat foglalja össze.

A minták közül immunhisztokémiai fenotípusuk alapján 41 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) alcsoportba volt sorolható.

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

5.2.1. Aurora B overexpresszió

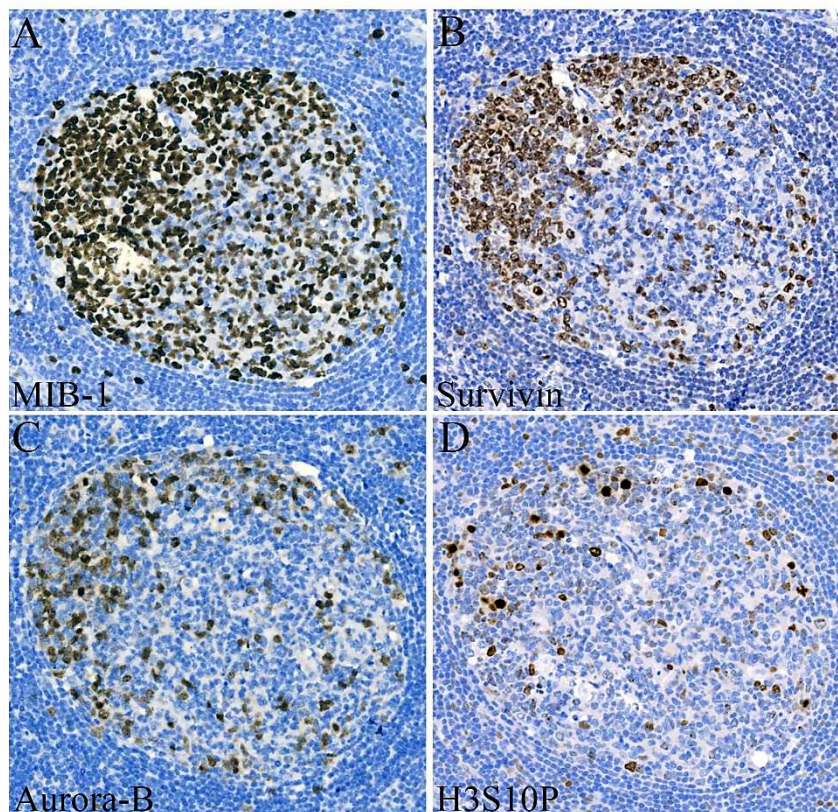
Az invazív emlőkarcinoma mintákhoz hasonlóan anti-Ki67 (MIB-1), anti-survivin és anti-Aurora B antitestek alkalmazásakor is sejtmag pozitivitást láttunk kontoll és agresszív B-sejt limfóma mintákban is. A foszforilált H3 hisztont (H3S10P) jelölő antitest a mitózisosokat szelektíven, intenzív DAB szignállal emeli ki a szöveti környezetből (24. Ábra).



24. Ábra MIB-1 (A), survivin (B), Aurora B (C) és H3S10P (D) expressziót mutató sejtek

Anti-MIB-1 antitesttel a teljes proliferáló sejtfrakció jelölhető, a survivin és Aurora B expresszió a korai G2 fázistól az M fázis végéig detektálható, a H3S10P antitest a mitotikus formákat tünteti fel szelektíven. 400× nagyítás. A nyílhegyek mitotikus sejteket jelölnek, DAB kromogén, hematoxylin háttérfestés

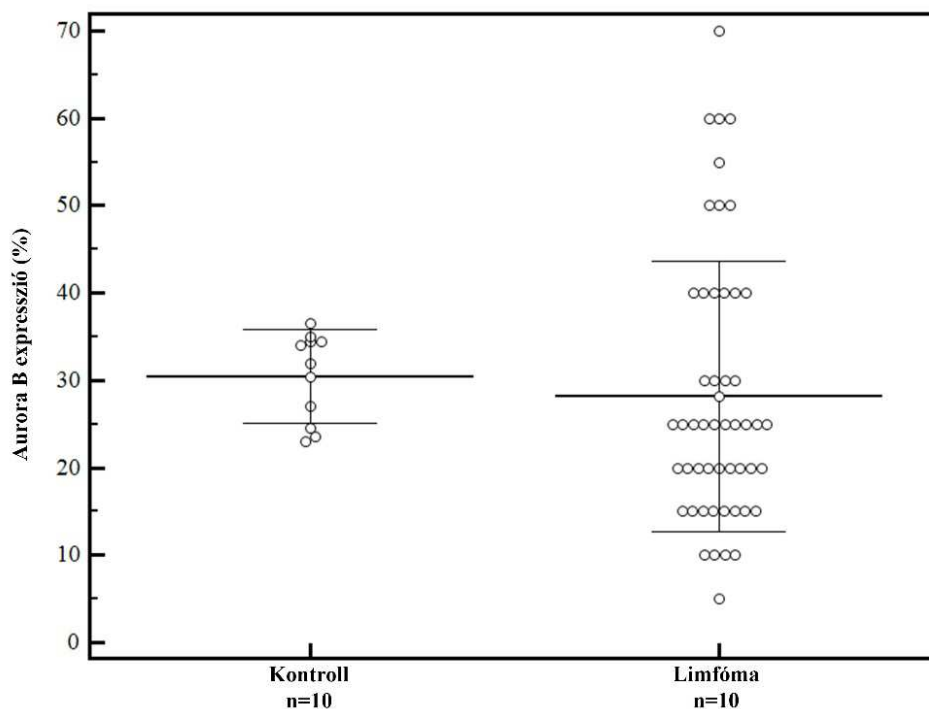
Follicularis hyperplasia mintákban az immunhisztokémiai reakciók értékelése a centrum germinativumokban történt (25.Ábra).



25. Ábra MIB-1, survivin, Aurora B és H3S10P expressziót mutató sejtek reaktiv follicularis hyperplasia mintában.

200× nagyítás, DAB kromogén, hematoxylin háttérfestés

A kontrollként használt follicularis hyperplasia minták centrum germinativumaiban az Aurora B pozitív sejtfrakciókat 23 és 36,5% között láttuk. (átlag \pm SD: 30,45 \pm 5,06). Ugyanez az érték agresszív B-sejtes limfóma mintákban 5 és 70% között volt detektálható (28,2 \pm 15,32) (26. Ábra).



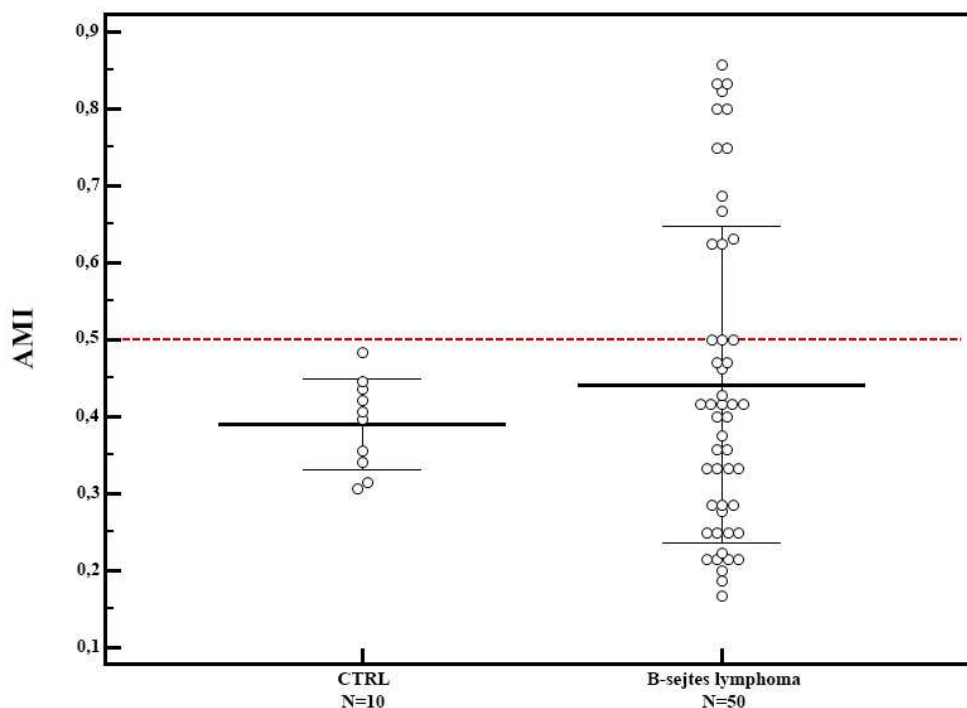
26. Ábra Aurora B expresszió kontroll és B-sejtes limfóma mintákban
A dot plotokon a vízszintes vonalak átlag és SD értékeket reprezentálnak.

A kontroll csoporthoz viszonyítva az 50 agresszív B-sejtes limfóma minta sejtproliferációs aktivitását szignifikánsan alacsonyabbnak találtuk ($p=0,008$). A MIB-1 pozitív sejtfrakciók arányát limfómában 20 és 95% között (átlag \pm SD: $63,6\pm 15,94$), a mitotikus sejtek számát 13-133/10 HPF között ($50,04\pm 27,53$, $p=2,27\times 10^{-12}$) láttuk. Ugyanezek az expressziós arányok follicularis hyperplasia mintákban 75 és 87% között ($77,8\pm 4,99$) illetve 92 és 175/10 HPF ($134,1\pm 23,72$) 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 \pm SD: $0,39\pm 0,06$), B-sejtes limfóma mintákon 0,17 és 0,85 között ($0,44\pm 0,2$) 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 (27. Ábra).



27. Ábra Relatív Aurora B expresszió kontroll és agresszív B-sejtes limfóma mintákban
A dot plotokon a vízszintes vonalak átlag és SD értékeket reprezentálnak.

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.

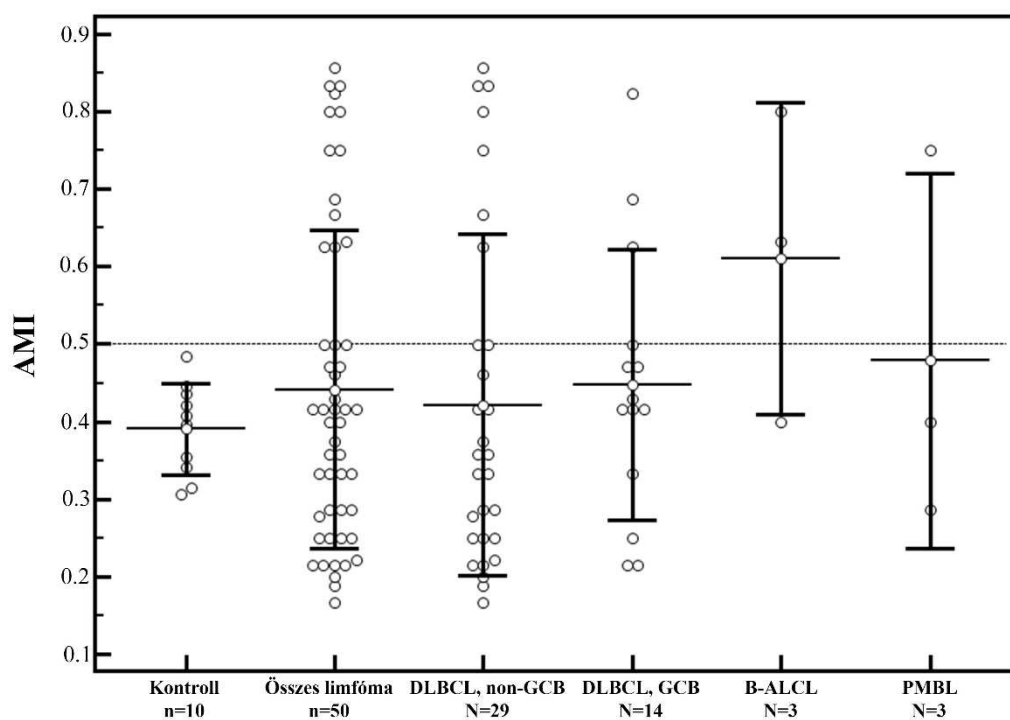
8 mintában extrém magas, 0,75 feletti értéket figyeltünk meg, ezekben a mintákban a mitotikus aktivitás is magasabbnak bizonyult ($p=0,012$), változatlan általános sejtproliferációs aktivitás (MIB-1 pozitivitás) mellett a 0,75-nél alacsonyabb AMI indexszel járó mintákhoz viszonyítva (9.Táblázat).

9. Táblázat Aurora B kinázt overexpresszáló minták immunhisztokémiai paraméterei és átlagos 17-es kromoszóma kópiaszámjai

	<i>CEP17</i> /sejtnag	<i>p</i>	<i>MIB-1</i> %	<i>p</i>	<i>Survivin</i> %	<i>p</i>	<i>H3S10P</i> <i>MI</i> /10 HPF	<i>p</i>	<i>MI</i> /10 HPF	<i>p</i>
	átlag±SD		átlag±SD		átlag±SD		átlag±SD		átlag±SD	
AMI<0.5	2.62		62.97		34.11		100.16		44.51	
N=37	±0.58		±15.49		±18.56		±62.54		±22.31	
AMI>0.5	2.73	0.65	63.75	0.65	**50.94	0.001	137.00	0.062	*61.44	0.016
N=13	±0.50		±17.37		±19.46		±101.56		±33.95	
AMI>0.75	2.74	0.61	61.88	0.74	*56.25	0.012	*174.125	0.016	**76.00	0.003
N=8	±0.55		±14.56		±19.16		±126.99		±36.16	

p: *p*-érték, valószínűség értéke

Relatív Aurora B expressziót tekintve az agresszív B-sejtes limfóma alcsoportok között szignifikáns eltérés nem volt látható (28. Ábra).

**28. Ábra** A relatív Aurora B expresszió kontroll és agresszív B-sejtes limfóma mintákban

NON-GCB: DLBCL, NOS, nem centrum germinativum eredet; GCB: DLBCL, NOS, centrum germinativum típus; B-ALCL: ALK+ nagy B-sejtes limfóma; PMBL: primer mediastinalis nagy B-sejtes limfóma
A dot plotokon a vízszintes vonalak átlag és SD értékeket reprezentálnak.

Az AMI legmagasabb átlagértéke B-ALCL minták volt látható, de megemlítendő, hogy ebbe az alcsoportba mindösszesen 3 minta volt sorolható (10. Táblázat).

10. Táblázat AMI értéke kontroll és agresszív B-sejtes limfóma mintákban

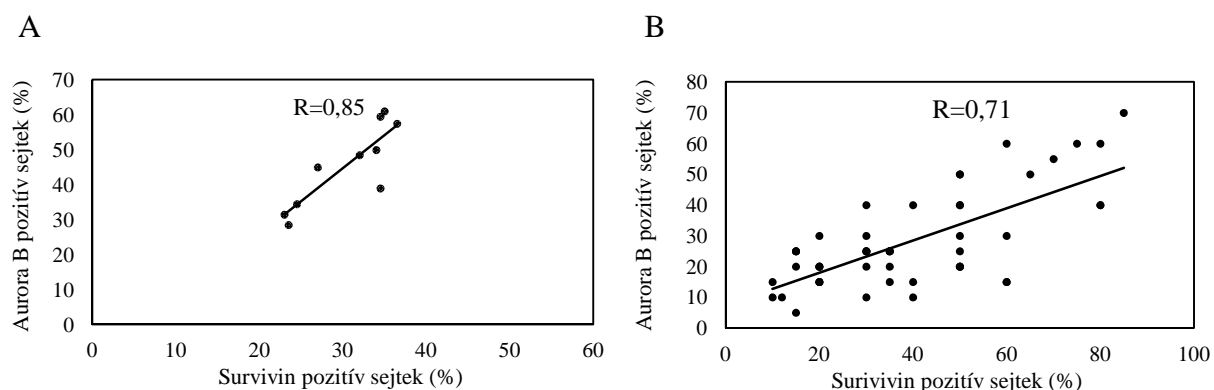
	<i>Kontroll</i> <i>N=10</i>	<i>Összes minta</i> <i>N=50</i>	<i>non-GCB</i> <i>N=29</i>	<i>GCB</i> <i>N=14</i>	<i>B-ALCL</i> <i>N=3</i>	<i>PMBL</i> <i>N=3</i>	<i>Borderline</i> <i>N=1</i>
AMI	Átlag 0,39	0,44	0,42	0,45	0,61	0,48	0,33
	SD 0,06	0,20	0,22	0,18	0,20	0,24	

5.2.2. Aurora B és survivin expresszió összefüggése

Follicularis hyperplasia mintákban a survivint 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.) (29. Ábra).

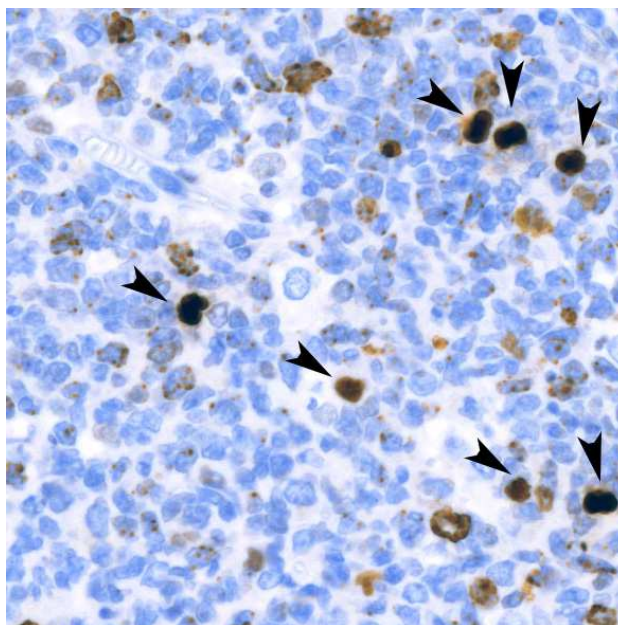


29. Ábra Survivin és Aurora B fehérje expresszió összefüggése kontroll (A) és agresszív B-sejtes limfóma (B) mintákban

Eredményeink szerint a survivint és az Aurora B-t expresszáló sejtek aránya között erős korreláció van.

5.2.3. 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 (30. *Ábra*).



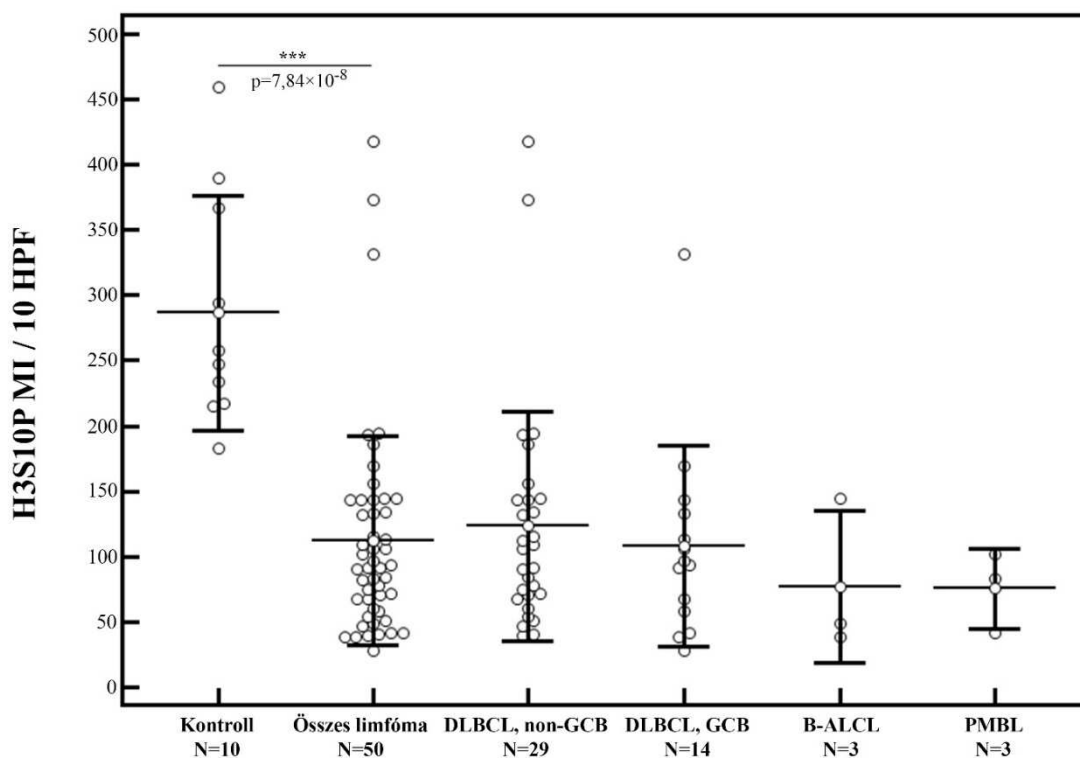
30. *Ábra* H3S10P fehérjét expresszáló sejtek

A nyílhegyek mitotikus sejteket jelölnek, melyeket az anti-H3S10P antitest erős DAB szignállal emel ki a szöveti környezetből.

Háttérfestés: hematoxylin, 400× nagyítás

Follicularis hyperplasia mintákhoz hasonló 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 (31. *Ábra*).

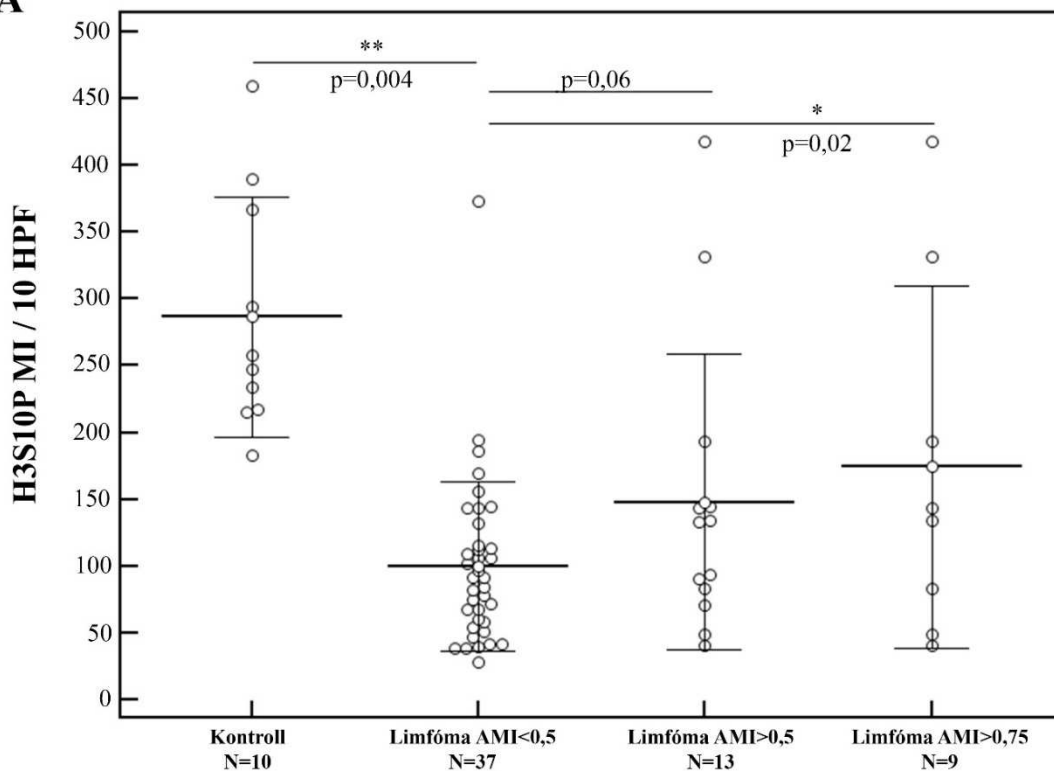


31. Ábra Foszfo-H3 hiszton (H3S10P) pozitív mitotikus sejtek száma kontroll és limfóma mintákban Follicularis hyperplasia mintákhoz viszonyítva a B-sejtes limfóma minták jelentősen alacsonyabb mitotikus aktivitást mutattak. A limfóma alcsoportok között szignifikáns különbségek nem voltak. non-GCB: DLBCL, NOS, nem centrum germinativum eredet; GCB: DLBCL, NOS, centrum germinativum típus; B-ALCL: ALK+ nagy B-sejtes limfóma; PMBL: primer mediastinalis nagy B-sejtes limfóma A dot plotokon a vízszintes vonalak átlag és SD értékeket reprezentálnak.

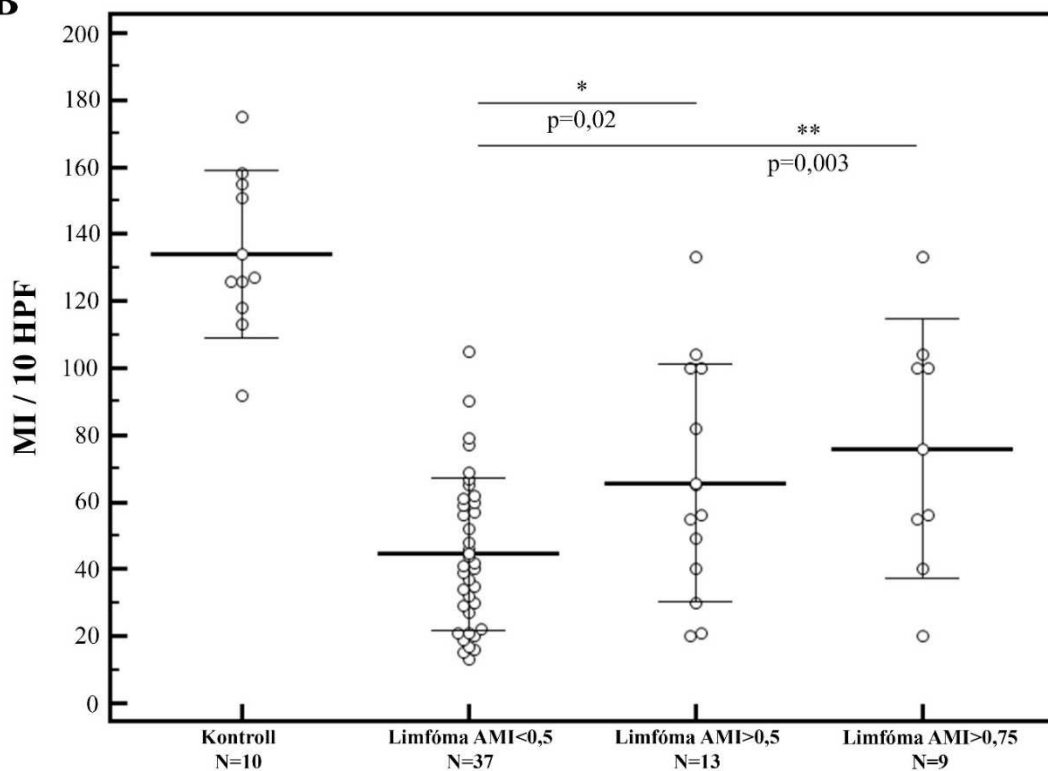
Az Aurora B kinázt expresszáló és foszfo-H3 hiszton (H3S10P) pozitív mitotikus sejtek mennyisége között gyenge pozitív korrelációt figyeltünk meg, az R érték kontroll mintáinkban 0,26; B-sejtes limfóma mintákban 0,41 volt.

A különböző AMI értékek alapján létrehozott limfóma mintacsoportok H3S10P expressziójában szignifikáns különbségek mutatkoztak. Az Aurora B kináz relatív overexpressziója magasabb mitotikus aktivitással járt együtt, HE festett metszetek és H3S10P expresszió alapján egyaránt (32. Ábra).

5.2.4. A



B



32. Ábra Mitotikus sejtek számának megoszlása relatív Aurora B expresszió alapján kontroll és B-sejtes limfóma mintákban H3S10P immunhisztokémiai jelölés (A) és HE festés alapján (B)

Az Aurora B expresszió emelkedésével a mitotikus aktivitás is fokozódik.

A dot plotokon a vízszintes vonalak átlag és SD értékeket reprezentálnak.

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 nyirokcsomókban 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 17p13.1 veszteséget mutató minták B-sejtes limfóma alcsoportok közötti eloszlását a 11. Táblázat szemlélteti.

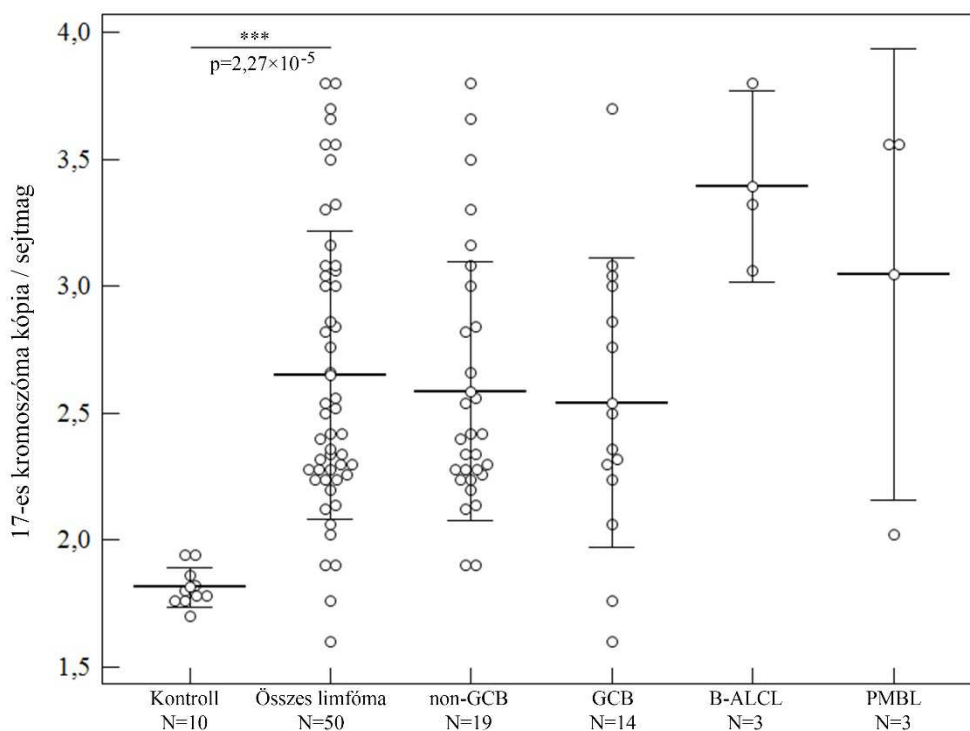
11. Táblázat 17p13.1 státusz agresszív B-sejtes limfóma alcsoportokban

	non-GCB N	GCB N	B-ALCL N	PMBL N	Átmeneti N	Σ Minta
TP53 deléció	3	1	3	0	0	7
AURKB és TP53 deléció	2	2	0	0	0	4
Intakt 17p13.1	24	11	0	3	1	39
Σ Minta	29	14	3	3	1	50

A B-ALCL minták mindegyike TP53 deléciót mutatott, a 29 NON-GCB minta közül 2 bizonyult TP53 deletálnak, 2 mutatott a TP53 deléció mellett AURKB veszteséget. A 12 GCB mintából egyben volt TP53 deléció, 2-ben AURKB és TP53 deléció kimutatható. PMBL minták mindegyike, és az átmeneti DLBCL-CHD minta intakt 17p13.1 régióval bírt.

N: minták száma; non-GCB: DLBCL, NOS, nem centrum germinativum eredet; GCB: DLBCL, NOS, centrum germinativum típus; B-ALCL: ALK+ nagy B-sejtes limfóma; PMBL: primer mediastinalis nagy B-sejtes limfóma

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 deléció mutató B-ALCL mintákban láttuk (33. Ábra).



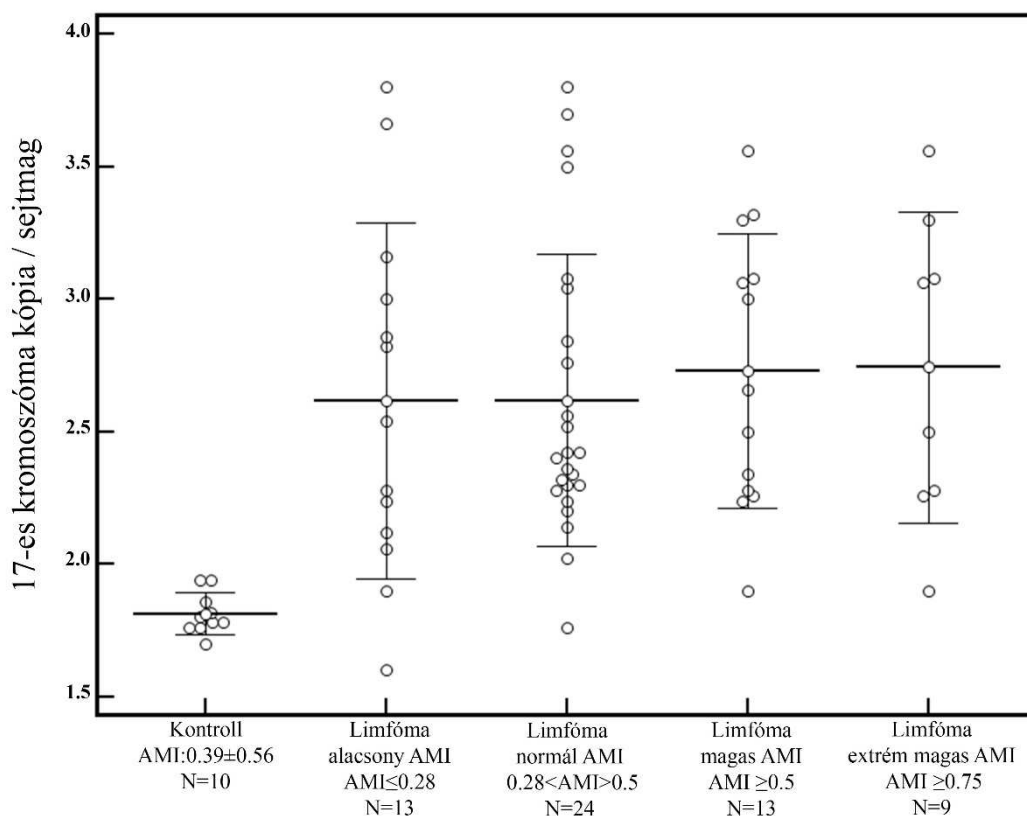
33. Ábra A 17-es kromoszóma kópiaszáma kontroll és agresszív B-sejtes limfóma mintákban

Diszómiát mindössze 4 limfóma mintában volt detektálható, a legmagasabb átlagos 17-es kromoszóma kópiaszám B-ALCL mintákban volt jelen.

non-GCB: DLBCL, NOS, nem centrum germinativum eredet; GCB: DLBCL, NOS, centrum germinativum típus; B-ALCL: ALK+ nagy B-sejtes limfóma; PMBL: primer mediastinalis nagy B-sejtes limfóma
A dot plotokon a vízszintes vonalak átlag és SD értékeket reprezentálnak.

Az Aurora kináz B relatív expressziója és a 17-es kromoszóma sejtenkénti kópiaszáma között összefüggést nem tudtunk kimutatni (korrelációs koefficiens (R)=0,01).

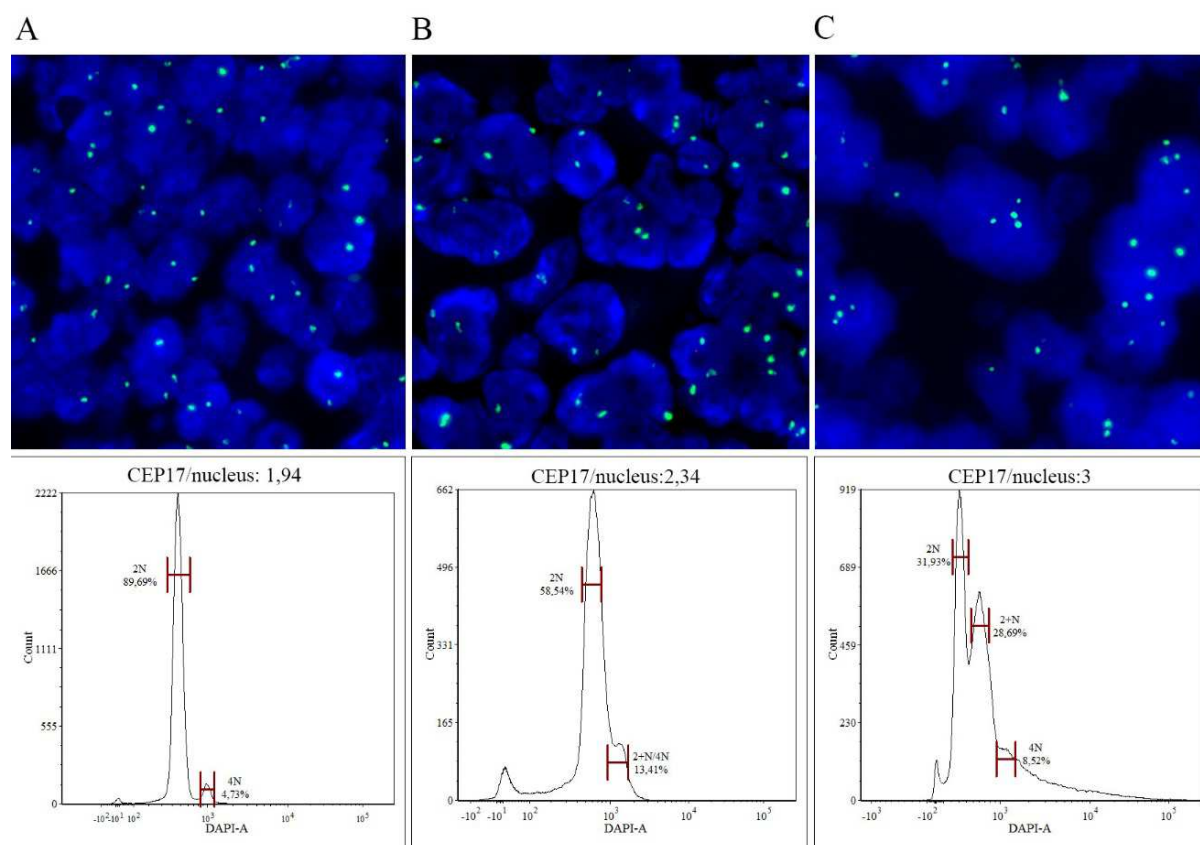
AMI értékek alapján alacsony, normál és fokozott Aurora B kináz relatív expressziót mutató limfóma minták között szignifikáns eltérések a 17-es kromoszóma kópiaszámát illetően nem mutatkoztak (34. Ábra).



34. Ábra 17-es kromoszómaszám sejtenkénti megoszlása kontroll és B-sejtes limfóma mintákban a relatív Aurora B expresszió alapján

Az Aurora B expresszió fokozódása nem befolyásolta szignifikánsan a 17-es kromoszóma kópiaszámát. A dot plotokon a vízszintes vonalak átlag és SD értékeket reprezentálnak.

Áramlási citometriás mérésekhez 34 agresszív B-sejtes limfóma és 8 kontroll minta bizonyult alkalmasnak. A FISH-sel 17-es kromoszóma aneuszómiát mutató minták mindegyikében a kiszámított DNS index aneuploid sejtpopulációk jelenlétét igazolta (35. *Ábra*).



35. Ábra Agresszív B-sejtes limfóma minták ploiditása

A 17-es kromoszóma FISH vizsgálatával 17-es kromoszóma aneuzómiát mutató minták flow citometriás teljes DNS tartalom meghatározása aneuploid sejtpopulációk jelenlétét igazolta

A: follicularis hyperplasia, 17-es kromoszóma normozómia (két zöld CEP17 szignál sejtmagonként), aneuploid sejtpopulációk a görbe alapján nincsenek jelen

B: DLBCL, NOS, non-GCB, FISH-sel 17-es kromoszóma hiperdiszómia (2-3 CEP17 szignál sejtmagonként), flow citometriával hiperdiploid sejtpopuláció jelenléte igazolódott

C: DLBCL, NOS, non-GCB, 17-es kromoszóma triszómia (3, esetenként 4 CEP17 szignál sejtmagonként), hiperdiploid és tetraploid sejtpopuláció megléte flow citometriával is igazolódott

Mikrofotók: Zeiss AxioImager, 630x nagyítás, CEP17 SpectrumGreen-nel jelölve, DAPI magfestés

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

A különböző 17-es kromoszóma státuszú csoportok sejtproliferációs és más, fehérje expresszióra vonatkozó adatait a 12. Táblázatban foglaltuk össze.

12. Táblázat Különböző 17-es kromoszóma státuszt mutató B-sejtes limfóma mintákhéjje expressziós és 17p13.1 FISH adatai

	<i>Kontroll</i>		<i>Diszómia</i>		<i>Hiperdiszómia</i>		<i>Triszómia</i>		<i>Tetraszómia</i>	
	<i>N=10</i>	<i>N=4</i>	<i>N=4</i>	<i>N=12</i>	<i>N=12</i>	<i>N=25</i>	<i>N=25</i>	<i>N=9</i>	<i>N=9</i>	
	Átlag±SD	Átlag±SD	p	Átlag±SD	p	Átlag±SD	p	Átlag±SD	p	
TP53/CEP17	1,05±0,06	0,93±0,11	0,029	1,08±0,21	0,69	0,95±0,2	0,15	0,89±0,21	0,034	
AURKB/ CEP17	1,1±0,06	1,18±0,19	0,26	1,35±0,27	0,012	1,13±0,64	0,24	1,01±0,21	0,23	
MIB-1 %	77,8±10,8	62,5±14,79	0,02	66,67±13,12	0,025	64,60±16,45	0,019	57,22±18,56	**0,004	
Aurora B %	30,45±9,25	28,75±16,72	0,79	28,75±15,83	0,76	29±15	0,77	25±16,2	0,33	
Survivin %	45,5±16,1	33,75±24,33	0,28	34,17±18,35	0,12	39,88±22,55	0,46	48,33±14,14	0,64	
H3S10P MI/10 HPF	403,1±351,03	134±49,61	0,009	155±114,7	0,0097	96,4±60,02	2,17×10⁻⁸	91,67±56,56	3,38×10⁻⁵	
AMI	0,39±0,09	0,45±0,52	0,25	0,44±0,23	0,54	0,44±0,18	0,53	0,44±0,23	0,53	
MI/10 HPF	134,1±23,72	65,75±27,23	0,001	50,75±20,55	5,25×10⁻⁸	44,40±27,91	3,32×10⁻¹⁰	57,78±33,23	2,63×10⁻⁵	

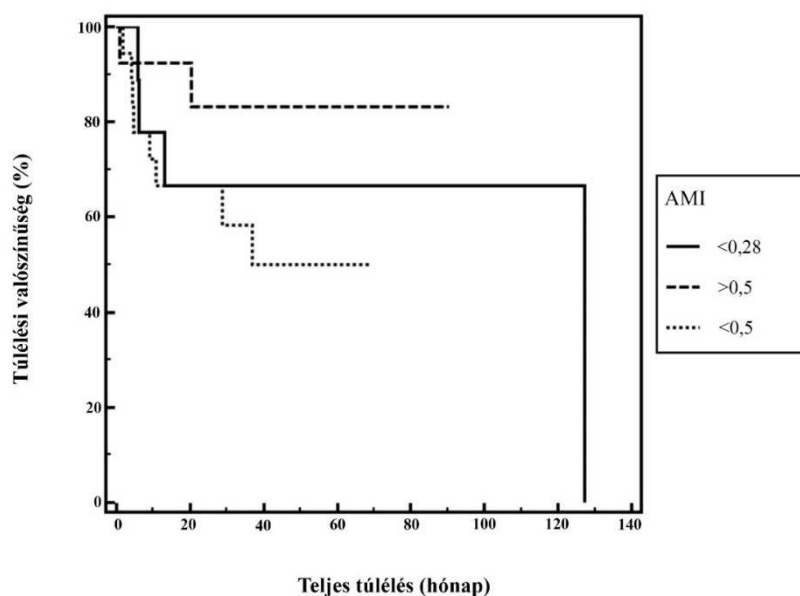
A sejtproliferációs aktivitásban szignifikáns eltérések mutatkoztak a kontroll mintákhoz viszonyítva. A legalacsonyabb sejtproliferációt a 17-es kromoszóma tetraszómiás mintákban figyeltük meg. p: p-érték, valószínűség értéke

5.2.5. 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).

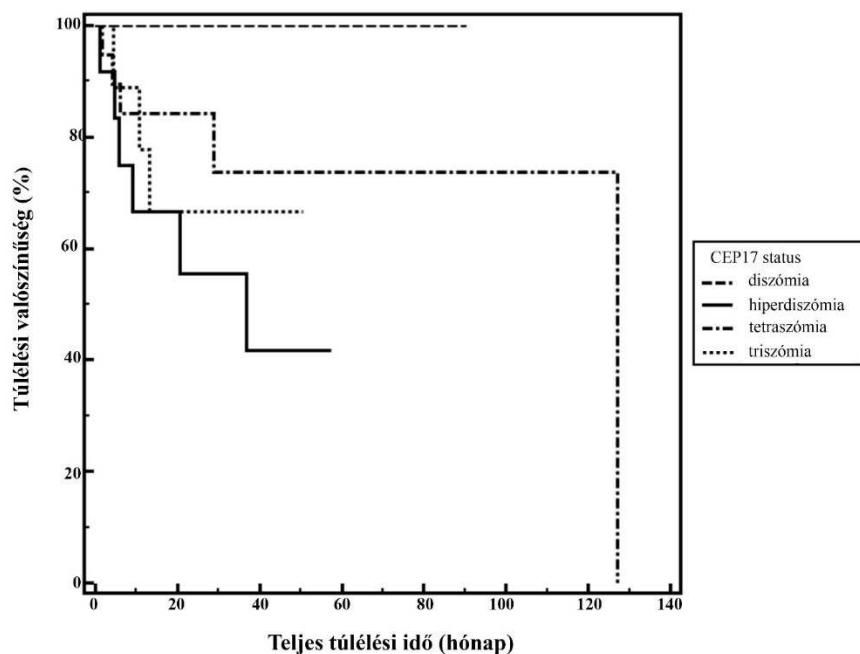
Eredményeink szerint a megvizsgált fehérjék expressziója és a betegek teljes túlélési ideje, valamint a limfóma stádiuma között összefüggés nem mutatható ki.

Az Aurora B relatív expressziója és a vizsgálatba bevont betegek teljes túlélési ideje között statisztikailag szignifikáns különbségeket nem figyeltünk meg (36. Ábra).



36. Ábra Az Aurora B overexpresszióval társuló agresszív B-sejtes limfómás betegek túlélési ideje
AMI: Aurora B / MIB-1 index, relatív Aurora B expresszió

A 17-es kromoszóma státusz alapján a hiperdiszómiát mutató mintákhoz társult a legkedvezőtlenebb teljes túlélési idő, a különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,27$; 37. Ábra).



37. Ábra Különböző 17-es kromoszóma státuszt mutató betegek teljes túlélési ideje

6. Megbeszélés

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

Ahogy azt más munkacsoportok is leírták [79, 90, 106] az Aurora B kináz expresszió hagyományos, mindennapi szövettani diagnosztikában alkalmazott módszerekkel vizsgálható.

Az Aurora B expresszió detektálhatósága normál sejtosztódási 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 mintáinkban 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 minták az AMI értékét átlagosan $0,39 (\pm 0,05)$ értéken láttuk, 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 minták a 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, emlőtumorokban általánosan vizsgált immunhisztokémiai paraméterek között nem találtunk.

Aurora B overexpresszió citogenetikai háttere

FISH vizsgálatlalt az Aurora B overexpresszió hátterében 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 [107, 108]. 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 lókuszok 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-ben 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 lókusz vesztés, szignifikánsan magasabb volt az aneuszómia aránya. Bár a 17p13.1 vesztéssel járó minták száma meglehetősen alacsony volt, az adatok alapján a lókusz vesztése és a malignus sejtklónok 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 [53]. Összefüggést

találtak a 17-es kromoszóma aneuszómiája és a tumor agresszivitás között [109, 110], továbbá ismeretes, hogy a FISH-sel detektálható kromoszóma aneuszómia jól korrelál a minták ploiditásának változásával [102, 111].

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 sejtvonal-kísérletes eredmények szerint az Aurora B kinázfunkció gátlása kapcsán a foszforilált (Ser10) H3 hiszton (H3S10P) mennyiségének drámai csökkenését írták le [73, 74]. Aurora B fokozott expressziójának következményeként pedig a H3S10P detektálható mennyiségében is növekedést láttak HeLa sejtvonalon végzett kísérletekben [9].

Agresszív B-sejtes limfóma mintáinkon a H3S10P pozitivitás 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.

Klinikopathologiai 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 sejtosztódástól való függése miatt. A sérült kinázfunkció demonstrálására a H3S10P expresszió vizsgálata alkalmazható szövettani körülmények között, indirekt módon a genetikai instabilitás jelzője is lehet.

7. 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) vezetünk 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 háttérében 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 sejtklónok 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 útvonal sérülésének következtében valószínűleg a malignus sejtpopulációk túlélésének kedvez.

8. Summary

The main goal of this work was to study the effect of Aurora kinase expression on cell ploidy and tumorigenesis. 50 invasive breast cancer, 50 diffuse large B-cell lymphoma and 10 reactive lymph node sample were recruited in the study.

Our main findings:

1. The expression of Aurora B and its binding partners can be studied between histological conditions.
2. Immunohistochemistry and FISH are reproducible methods on tissue microarrays.
3. 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 the 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. The higher relative Aurora B expression associated with higher mitotic activity in B-cell lymphoma.
4. 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.
5. Our study presents the frequent occurrence of aneusomy chromosome 17 in breast carcinoma and B-cell lymphoma samples. Chromosome 17 aneusomy evaluated by FISH is correlated with aneuploidy studying by flow cytometry.
6. Direct correlation between kinase expression and ploidy could not be shown.
7. The highest Ami values was seen in B-ALCL samples, it was associated with high chromosome 17 copy numbers and mitotic activity.

The damaged Aurora B kinase function serve for 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 results an 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.

9. Irodalomjegyzék

1. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer**. *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
2. Loeb KR, Loeb LA: **Significance of multiple mutations in cancer**. *Carcinogenesis* 2000, **21**(3):379-385.
3. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: **Genetic instabilities in human cancers**. *Nature* 1998, **396**(6712):643-649.
4. Keen N, Taylor S: **Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents**. *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(12):927-936.
5. Carvajal RD, Tse A, Schwartz GK: **Aurora kinases: new targets for cancer therapy**. *Clin Cancer Res* 2006, **12**(23):6869-6875.
6. Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD: **Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation**. *Chromosoma* 1997, **106**(6):348-360.
7. Crosio C, Fimia GM, Loury R, Kimura M, Okano Y, Zhou H, Sen S, Allis CD, Sassone-Corsi P: **Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases**. *Mol Cell Biol* 2002, **22**(3):874-885.
8. Weaver BA, Cleveland DW: **Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death**. *Cancer Cell* 2005, **8**(1):7-12.
9. Katayama H, Brinkley WR, Sen S: **The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis**. *Cancer Metastasis Rev* 2003, **22**(4):451-464.
10. Bolanos-Garcia VM: **Aurora kinases**. *Int J Biochem Cell Biol* 2005, **37**(8):1572-1577.
11. Carmena M, Earnshaw WC: **The cellular geography of aurora kinases**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**(11):842-854.
12. Salaun P, Rannou Y, Prigent C: **Cdk1, Plks, Auroras, and Neks: the mitotic bodyguards**. *Adv Exp Med Biol* 2008, **617**:41-56.
13. Marumoto T, Zhang D, Saya H: **Aurora-A - a guardian of poles**. *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(1):42-50.
14. Lukasiewicz KB, Lingle WL: **Aurora A, centrosome structure, and the centrosome cycle**. *Environ Mol Mutagen* 2009, **50**(8):602-619.
15. Nowakowski J, Cronin CN, McRee DE, Knuth MW, Nelson CG, Pavletich NP, Rogers J, Sang BC, Scheibe DN, Swanson RV *et al*: **Structures of the cancer-related Aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography**. *Structure* 2002, **10**(12):1659-1667.
16. Mountzios G, Terpos E, Dimopoulos MA: **Aurora kinases as targets for cancer therapy**. *Cancer Treat Rev* 2008, **34**(2):175-182.
17. Tsai MY, Wiese C, Cao K, Martin O, Donovan P, Ruderman J, Prigent C, Zheng Y: **A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly**. *Nat Cell Biol* 2003, **5**(3):242-248.
18. Kufer TA, Sillje HH, Korner R, Gruss OJ, Meraldi P, Nigg EA: **Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle**. *J Cell Biol* 2002, **158**(4):617-623.
19. Lapenna S, Giordano A: **Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer**. *Nat Rev Drug Discov* 2009, **8**(7):547-566.
20. Dutertre S, Cazales M, Quaranta M, Froment C, Trabut V, Dozier C, Mirey G, Bouche JP, Theis-Febvre N, Schmitt E *et al*: **Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at**

- the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci* 2004, **117**(Pt 12):2523-2531.
21. Berdnik D, Knoblich JA: **Drosophila Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis.** *Curr Biol* 2002, **12**(8):640-647.
 22. Nikonova AS, Astsaturov I, Serebriiskii IG, Dunbrack RL, Jr., Golemis EA: **Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division.** *Cell Mol Life Sci* 2013, **70**(4):661-687.
 23. Marumoto T, Hirota T, Morisaki T, Kunitoku N, Zhang D, Ichikawa Y, Sasayama T, Kuninaka S, Mimori T, Tamaki N *et al*: **Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells.** *Genes Cells* 2002, **7**(11):1173-1182.
 24. Lanni JS, Jacks T: **Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**(2):1055-1064.
 25. Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M, Perrin J, Martinez D, Sele B, Jouk PS *et al*: **Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility.** *Nat Genet* 2007, **39**(5):661-665.
 26. Sharif B, Na J, Lykke-Hartmann K, McLaughlin SH, Laue E, Glover DM, Zernicka-Goetz M: **The chromosome passenger complex is required for fidelity of chromosome transmission and cytokinesis in meiosis of mouse oocytes.** *J Cell Sci* 2010, **123**(Pt 24):4292-4300.
 27. Slattery SD, Mancini MA, Brinkley BR, Hall RM: **Aurora-C kinase supports mitotic progression in the absence of Aurora-B.** *Cell Cycle* 2009, **8**(18):2984-2994.
 28. Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Okano Y: **Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3.** *J Biol Chem* 1999, **274**(11):7334-7340.
 29. Hu HM, Chuang CK, Lee MJ, Tseng TC, Tang TK: **Genomic organization, expression, and chromosome localization of a third aurora-related kinase gene, Aie1.** *DNA Cell Biol* 2000, **19**(11):679-688.
 30. Li X, Sakashita G, Matsuzaki H, Sugimoto K, Kimura K, Hanaoka F, Taniguchi H, Furukawa K, Urano T: **Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C.** *J Biol Chem* 2004, **279**(45):47201-47211.
 31. Davies H, Hunter C, Smith R, Stephens P, Greenman C, Bignell G, Teague J, Butler A, Edkins S, Stevens C *et al*: **Somatic mutations of the protein kinase gene family in human lung cancer.** *Cancer Res* 2005, **65**(17):7591-7595.
 32. Fernandez-Miranda G, Trakala M, Martin J, Escobar B, Gonzalez A, Ghyselinck NB, Ortega S, Canamero M, Perez de Castro I, Malumbres M: **Genetic disruption of aurora B uncovers an essential role for aurora C during early mammalian development.** *Development* 2011, **138**(13):2661-2672.
 33. Lin YS, Su LJ, Yu CT, Wong FH, Yeh HH, Chen SL, Wu JC, Lin WJ, Shiue YL, Liu HS *et al*: **Gene expression profiles of the aurora family kinases.** *Gene Expr* 2006, **13**(1):15-26.
 34. Ulisse S, Delcros JG, Baldini E, Toller M, Curcio F, Giacomelli L, Prigent C, Ambesi-Impiombato FS, D'Armiento M, Arlot-Bonnemains Y: **Expression of Aurora kinases in human thyroid carcinoma cell lines and tissues.** *Int J Cancer* 2006, **119**(2):275-282.
 35. Adams RR, Wheatley SP, Gouldsworthy AM, Kandels-Lewis SE, Carmena M, Smythe C, Gerloff DL, Earnshaw WC: **INCENP binds the Aurora-related kinase**

- AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow.** *Curr Biol* 2000, **10**(17):1075-1078.
36. Cheetham GM, Knegt RM, Coll JT, Renwick SB, Swenson L, Weber P, Lippke JA, Austen DA: **Crystal structure of aurora-2, an oncogenic serine/threonine kinase.** *J Biol Chem* 2002, **277**(45):42419-42422.
37. Lens SM, Voest EE, Medema RH: **Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer.** *Nat Rev Cancer* 2010, **10**(12):825-841.
38. Andrews PD, Knatko E, Moore WJ, Swedlow JR: **Mitotic mechanics: the auroras come into view.** *Curr Opin Cell Biol* 2003, **15**(6):672-683.
39. Yasui Y, Urano T, Kawajiri A, Nagata K, Tatsuka M, Saya H, Furukawa K, Takahashi T, Izawa I, Inagaki M: **Autophosphorylation of a newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis.** *J Biol Chem* 2004, **279**(13):12997-13003.
40. Zeitlin SG, Shelby RD, Sullivan KF: **CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis.** *J Cell Biol* 2001, **155**(7):1147-1157.
41. Kim Y, Holland AJ, Lan W, Cleveland DW: **Aurora kinases and protein phosphatase 1 mediate chromosome congression through regulation of CENP-E.** *Cell* 2010, **142**(3):444-455.
42. Ban R, Matsuzaki H, Akashi T, Sakashita G, Taniguchi H, Park SY, Tanaka H, Furukawa K, Urano T: **Mitotic regulation of the stability of microtubule plus-end tracking protein EB3 by ubiquitin ligase SIAH-1 and Aurora mitotic kinases.** *J Biol Chem* 2009, **284**(41):28367-28381.
43. DeLuca JG, Gall WE, Ciferri C, Cimini D, Musacchio A, Salmon ED: **Kinetochores microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1.** *Cell* 2006, **127**(5):969-982.
44. Goto H, Yasui Y, Nigg EA, Inagaki M: **Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation.** *Genes Cells* 2002, **7**(1):11-17.
45. Bishop JD, Schumacher JM: **Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity.** *J Biol Chem* 2002, **277**(31):27577-27580.
46. Lan W, Zhang X, Kline-Smith SL, Rosasco SE, Barrett-Wilt GA, Shabanowitz J, Hunt DF, Walczak CE, Stukenberg PT: **Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity.** *Curr Biol* 2004, **14**(4):273-286.
47. Minoshima Y, Kawashima T, Hirose K, Tonozuka Y, Kawajiri A, Bao YC, Deng X, Tatsuka M, Narumiya S, May WS, Jr. *et al*: **Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis.** *Dev Cell* 2003, **4**(4):549-560.
48. Guse A, Mishima M, Glotzer M: **Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis.** *Curr Biol* 2005, **15**(8):778-786.
49. Sakita-Suto S, Kanda A, Suzuki F, Sato S, Takata T, Tatsuka M: **Aurora-B regulates RNA methyltransferase NSUN2.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**(3):1107-1117.
50. Tanno Y, Kitajima TS, Honda T, Ando Y, Ishiguro K, Watanabe Y: **Phosphorylation of mammalian Sgo2 by Aurora B recruits PP2A and MCAK to centromeres.** *Genes Dev* 2010, **24**(19):2169-2179.
51. Wheatley SP, Henzing AJ, Dodson H, Khaled W, Earnshaw WC: **Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo.** *J Biol Chem* 2004, **279**(7):5655-5660.

52. Goto H, Yasui Y, Kawajiri A, Nigg EA, Terada Y, Tatsuka M, Nagata K, Inagaki M: **Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process.** *J Biol Chem* 2003, **278**(10):8526-8530.
53. Dar AA, Goff LW, Majid S, Berlin J, El-Rifai W: **Aurora kinase inhibitors--rising stars in cancer therapeutics?** *Mol Cancer Ther* 2010, **9**(2):268-278.
54. Ota T, Suto S, Katayama H, Han ZB, Suzuki F, Maeda M, Tanino M, Terada Y, Tatsuka M: **Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability.** *Cancer Res* 2002, **62**(18):5168-5177.
55. Ricke RM, van Ree JH, van Deursen JM: **Whole chromosome instability and cancer: a complex relationship.** *Trends Genet* 2008, **24**(9):457-466.
56. van der Waal MS, Hengeveld RC, van der Horst A, Lens SM: **Cell division control by the Chromosomal Passenger Complex.** *Exp Cell Res* 2012, **318**(12):1407-1420.
57. Gassmann R, Carvalho A, Henzing AJ, Ruchaud S, Hudson DF, Honda R, Nigg EA, Gerloff DL, Earnshaw WC: **Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle.** *J Cell Biol* 2004, **166**(2):179-191.
58. Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC: **Chromosomal passengers: conducting cell division.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**(10):798-812.
59. Kelly AE, Funabiki H: **Correcting aberrant kinetochore microtubule attachments: an Aurora B-centric view.** *Curr Opin Cell Biol* 2009, **21**(1):51-58.
60. Vigneron S, Prieto S, Bernis C, Labbe JC, Castro A, Lorca T: **Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom?** *Mol Biol Cell* 2004, **15**(10):4584-4596.
61. Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Haworth C, Johnson T, Mortlock A, Keen N, Taylor SS: **Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores.** *J Cell Biol* 2003, **161**(2):267-280.
62. Emanuele MJ, Lan W, Jwa M, Miller SA, Chan CS, Stukenberg PT: **Aurora B kinase and protein phosphatase 1 have opposing roles in modulating kinetochore assembly.** *J Cell Biol* 2008, **181**(2):241-254.
63. Andrews PD, Ovechkina Y, Morrice N, Wagenbach M, Duncan K, Wordeman L, Swedlow JR: **Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere.** *Dev Cell* 2004, **6**(2):253-268.
64. Kawashima SA, Tsukahara T, Langedegger M, Hauf S, Kitajima TS, Watanabe Y: **Shugoshin enables tension-generating attachment of kinetochores by loading Aurora to centromeres.** *Genes Dev* 2007, **21**(4):420-435.
65. Huang H, Feng J, Famulski J, Rattner JB, Liu ST, Kao GD, Muschel R, Chan GK, Yen TJ: **Tripin/hSgo2 recruits MCAK to the inner centromere to correct defective kinetochore attachments.** *J Cell Biol* 2007, **177**(3):413-424.
66. Maiato H, DeLuca J, Salmon ED, Earnshaw WC: **The dynamic kinetochore-microtubule interface.** *J Cell Sci* 2004, **117**(Pt 23):5461-5477.
67. Liu D, Vader G, Vromans MJ, Lampson MA, Lens SM: **Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates.** *Science* 2009, **323**(5919):1350-1353.
68. Sandall S, Severin F, McLeod IX, Yates JR, 3rd, Oegema K, Hyman A, Desai A: **A Bir1-Sli15 complex connects centromeres to microtubules and is required to sense kinetochore tension.** *Cell* 2006, **127**(6):1179-1191.
69. Bloom KS: **Beyond the code: the mechanical properties of DNA as they relate to mitosis.** *Chromosoma* 2008, **117**(2):103-110.

70. Goto H, Tomono Y, Ajiro K, Kosako H, Fujita M, Sakurai M, Okawa K, Iwamatsu A, Okigaki T, Takahashi T *et al*: **Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation.** *J Biol Chem* 1999, **274**(36):25543-25549.
71. Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell JA, Hunt DF *et al*: **Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes.** *Cell* 2000, **102**(3):279-291.
72. Perez-Cadahia B, Drobic B, Davie JR: **H3 phosphorylation: dual role in mitosis and interphase.** *Biochem Cell Biol* 2009, **87**(5):695-709.
73. Kang TH, Park DY, Choi YH, Kim KJ, Yoon HS, Kim KT: **Mitotic histone H3 phosphorylation by vaccinia-related kinase 1 in mammalian cells.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**(24):8533-8546.
74. Loomis RJ, Naoe Y, Parker JB, Savic V, Bozovsky MR, Macfarlan T, Manley JL, Chakravarti D: **Chromatin binding of SRp20 and ASF/SF2 and dissociation from mitotic chromosomes is modulated by histone H3 serine 10 phosphorylation.** *Mol Cell* 2009, **33**(4):450-461.
75. Lin ZZ, Jeng YM, Hu FC, Pan HW, Tsao HW, Lai PL, Lee PH, Cheng AL, Hsu HC: **Significance of Aurora B overexpression in hepatocellular carcinoma. Aurora B Overexpression in HCC.** *BMC Cancer* 2010, **10**:461.
76. Garcia-Fernandez E, De Diego JI, Collantes-Bellido E, Mendiola M, Prim MP, Perez-Fernandez E, Miguel-Martin M, Nistal M, Hardisson D: **Aurora B kinase expression in laryngeal squamous cell carcinoma and its prognostic implications.** *Histopathology* 2011, **58**(3):368-376.
77. Qi G, Ogawa I, Kudo Y, Miyauchi M, Siriwardena BS, Shimamoto F, Tatsuka M, Takata T: **Aurora-B expression and its correlation with cell proliferation and metastasis in oral cancer.** *Virchows Arch* 2007, **450**(3):297-302.
78. Lee EC, Frolov A, Li R, Ayala G, Greenberg NM: **Targeting Aurora kinases for the treatment of prostate cancer.** *Cancer Res* 2006, **66**(10):4996-5002.
79. Chieffi P, Cozzolino L, Kisslinger A, Libertini S, Staibano S, Mansueto G, De Rosa G, Villacci A, Vitale M, Linardopoulos S *et al*: **Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation.** *Prostate* 2006, **66**(3):326-333.
80. Chieffi P, Troncone G, Caleo A, Libertini S, Linardopoulos S, Tramontano D, Portella G: **Aurora B expression in normal testis and seminomas.** *J Endocrinol* 2004, **181**(2):263-270.
81. Baldini E, Arlot-Bonnemains Y, Mottolèse M, Sentinelli S, Antoniani B, Sorrenti S, Salducci M, Comini E, Ulisse S, D'Armiento M: **Deregulation of Aurora kinase gene expression in human testicular germ cell tumours.** *Andrologia* 2010, **42**(4):260-267.
82. Katayama H, Ota T, Jisaki F, Ueda Y, Tanaka T, Odashima S, Suzuki F, Terada Y, Tatsuka M: **Mitotic kinase expression and colorectal cancer progression.** *J Natl Cancer Inst* 1999, **91**(13):1160-1162.
83. Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C *et al*: **A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers.** *EMBO J* 1998, **17**(11):3052-3065.
84. Araki K, Nozaki K, Ueba T, Tatsuka M, Hashimoto N: **High expression of Aurora-B/Aurora and Ipl1-like midbody-associated protein (AIM-1) in astrocytomas.** *J Neurooncol* 2004, **67**(1-2):53-64.

85. Li Y, Zhang ZF, Chen J, Huang D, Ding Y, Tan MH, Qian CN, Resau JH, Kim H, Teh BT: **VX680/MK-0457, a potent and selective Aurora kinase inhibitor, targets both tumor and endothelial cells in clear cell renal cell carcinoma.** *Am J Transl Res* 2010, **2**(3):296-308.
86. Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Tasaka T, Taniguchi A, Kuwayama Y, Komatsu N, Bandobashi K, Togitani K, Koeffler HP *et al*: **A novel treatment strategy targeting Aurora kinases in acute myelogenous leukemia.** *Mol Cancer Ther* 2007, **6**(6):1851-1857.
87. Hamada M, Yakushijin Y, Ohtsuka M, Kakimoto M, Yasukawa M, Fujita S: **Aurora2/BTAK/STK15 is involved in cell cycle checkpoint and cell survival of aggressive non-Hodgkin's lymphoma.** *Br J Haematol* 2003, **121**(3):439-447.
88. Smith SL, Bowers NL, Betticher DC, Gautschi O, Ratschiller D, Hoban PR, Booton R, Santibanez-Koref MF, Heighway J: **Overexpression of aurora B kinase (AURKB) in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability.** *Br J Cancer* 2005, **93**(6):719-729.
89. Takeshita M, Koga T, Takayama K, Ijichi K, Yano T, Maehara Y, Nakanishi Y, Sueishi K: **Aurora-B overexpression is correlated with aneuploidy and poor prognosis in non-small cell lung cancer.** *Lung Cancer* 2013, **80**(1):85-90.
90. Sorrentino R, Libertini S, Pallante PL, Troncione G, Palombini L, Bavetsias V, Spalletti-Cernia D, Laccetti P, Linardopoulos S, Chieffi P *et al*: **Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation.** *J Clin Endocrinol Metab* 2005, **90**(2):928-935.
91. Kurai M, Shiozawa T, Shih HC, Miyamoto T, Feng YZ, Kashima H, Suzuki A, Konishi I: **Expression of Aurora kinases A and B in normal, hyperplastic, and malignant human endometrium: Aurora B as a predictor for poor prognosis in endometrial carcinoma.** *Hum Pathol* 2005, **36**(12):1281-1288.
92. Ikezoe T, Takeuchi T, Yang J, Adachi Y, Nishioka C, Furihata M, Koeffler HP, Yokoyama A: **Analysis of Aurora B kinase in non-Hodgkin lymphoma.** *Lab Invest* 2009, **89**(12):1364-1373.
93. Sen S, Zhou H, White RA: **A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines.** *Oncogene* 1997, **14**(18):2195-2200.
94. Nadler Y, Camp RL, Schwartz C, Rimm DL, Kluger HM, Kluger Y: **Expression of Aurora A (but not Aurora B) is predictive of survival in breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**(14):4455-4462.
95. Fabbro D, Ruetz S, Buchdunger E, Cowan-Jacob SW, Fendrich G, Liebetanz J, Mestan J, O'Reilly T, Traxler P, Chaudhuri B *et al*: **Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs.** *Pharmacol Ther* 2002, **93**(2-3):79-98.
96. Kollareddy M, Zheleva D, Dzubak P, Brahmshatriya PS, Lepsik M, Hajduch M: **Aurora kinase inhibitors: progress towards the clinic.** *Invest New Drugs* 2012, **30**(6):2411-2432.
97. Liang X, Wang D, Wang Y, Zhou Z, Zhang J, Li J: **Expression of aurora kinase A and B in chondrosarcoma and its relationship with the prognosis.** *Diagn Pathol* 2012, **7**:84.
98. Erpolat OP, Gocun PU, Akmansu M, Karakus E, Akyol G: **High expression of nuclear survivin and Aurora B predicts poor overall survival in patients with head and neck squamous cell cancer.** *Strahlenther Onkol* 2012, **188**(3):248-254.

99. Beussel S, Hasenburg A, Bogatyreva L, Hauschke D, Werner M, Lassmann S: **Aurora-B protein expression is linked to initial response to taxane-based first-line chemotherapy in stage III ovarian carcinoma.** *J Clin Pathol* 2012, **65**(1):29-35.
100. Hetland TE, Nymoan DA, Holth A, Brusegard K, Florenes VA, Kaern J, Trope CG, Davidson B: **Aurora B expression in metastatic effusions from advanced-stage ovarian serous carcinoma is predictive of intrinsic chemotherapy resistance.** *Hum Pathol* 2013, **44**(5):777-785.
101. Tanaka S, Arii S, Yasen M, Mogushi K, Su NT, Zhao C, Imoto I, Eishi Y, Inazawa J, Miki Y *et al*: **Aurora kinase B is a predictive factor for the aggressive recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy.** *Br J Surg* 2008, **95**(5):611-619.
102. Carlson JA, Healy K, Tran TA, Malfetano J, Wilson VL, Rohwedder A, Ross JS: **Chromosome 17 aneusomy detected by fluorescence in situ hybridization in vulvar squamous cell carcinomas and synchronous vulvar skin.** *Am J Pathol* 2000, **157**(3):973-983.
103. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Muller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES *et al*: **Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray.** *Blood* 2004, **103**(1):275-282.
104. Lopez-Marure R, Contreras PG, Dillon JS: **Effects of dehydroepiandrosterone on proliferation, migration, and death of breast cancer cells.** *Eur J Pharmacol* 2011, **660**(2-3):268-274.
105. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA: **Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry.** *J Histochem Cytochem* 1983, **31**(11):1333-1335.
106. Hontz AE, Li SA, Lingle WL, Negron V, Bruzek A, Salisbury JL, Li JJ: **Aurora a and B overexpression and centrosome amplification in early estrogen-induced tumor foci in the Syrian hamster kidney: implications for chromosomal instability, aneuploidy, and neoplasia.** *Cancer Res* 2007, **67**(7):2957-2963.
107. Seitz S, Poppe K, Fischer J, Nothnagel A, Estevez-Schwarz L, Haensch W, Schlag PM, Scherneck S: **Detailed deletion mapping in sporadic breast cancer at chromosomal region 17p13 distal to the TP53 gene: association with clinicopathological parameters.** *J Pathol* 2001, **194**(3):318-326.
108. Sankar M, Tanaka K, Kumaravel TS, Arif M, Shintani T, Yagi S, Kyo T, Dohy H, Kamada N: **Identification of a commonly deleted region at 17p13.3 in leukemia and lymphoma associated with 17p abnormality.** *Leukemia* 1998, **12**(4):510-516.
109. Takehisa M, Sasa M, Bando Y, Hirose T, Morimoto T, Nagao T, Tangoku A: **Chromosomal aneusomy (chr 1, 11, 17) detected by fluorescence in situ hybridization may be a prognostic factor in breast cancer.** *Anticancer Res* 2007, **27**(2):1073-1078.
110. Tsukamoto F, Miyoshi Y, Egawa C, Kasugai T, Takami S, Inazawa J, Noguchi S: **Clinicopathologic analysis of breast carcinoma with chromosomal aneusomy detected by fluorescence in situ hybridization.** *Cancer* 2001, **93**(2):165-170.
111. Pajor L, Szuhai K, Mehes G, Kosztolanyi G, Jakso P, Lendvai G, Szanyi I, Kajtar P: **Combined metaphase, interphase cytogenetic, and flow cytometric analysis of DNA content of pediatric acute lymphoblastic leukemia.** *Cytometry* 1998, **34**(2):87-94.

10. Tárgyszavak

Mitotikus rendellenességek

Malignus transzformáció

Aurora kináz B

Kináz overexpresszió

Invazív emlőkarcinoma

Limfóma

10. Keywords

Mitotic failures

Malignant transformation

Aurora kinase B

Kinase overexpression

Invasive breast cancer

Lymphoma

11. 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 Pathológiai Intézet minden munkatársának, hogy munkámat segítették. Külön köszönet illeti **dr. Bedekovics Juditot** az agresszív B-sejtes limfóma minták szövettani besorolásában nyújtott segítségével, **Dócs Ottót** és **Dr. Egervári Kristófot** a TMA preparátumok elkészítésében való segítségükért, továbbá **Rigó Gyuláné Etát** áldozatos munkájáért és **Beke Líviát** immunhisztokémiai vizsgálatokban való segítségéért.

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 ploiditás vizsgálatokat 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** klinikai adatok elemzése során nyújtott segítségükért.

Különös 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.

Köszönettel tartozom **szüleimnek**, akik anyagi és erkölcsi háttérrel biztosítottak tanulmányaimhoz. 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.

12. 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, diagnosztikái, farmakológiai befolyásolhatóságuk az alapkutatás szintjén” című pályázat támogatásával készült.

This research was realized in the frames of TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 „National Excellence Program – Elaborating and operating an inland student and researcher personal support system” The project was subsidized by the European Union and co-financed by the European Social Fund.

The publication is supported by the TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KOV-2012- 0045, „Research network on vascular biology/medicine project”.

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



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



13. Függelék



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

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

Jelölt: Hegyi Katalin

Neptun kód: UJ154W

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Mtmt azonosító: 10034459

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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 (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.
Időgyógy. 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., Millényi, 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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.01.23



A dolgozat téziseit megalapozó egyéb közlemény

Hegy 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, a fokozatszerzési eljárás kezdetekor bírálat alatt