



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİDE AURORA-A KİNAZ EKSPRESYONU

UZMANLIK TEZİ

DR. DENİZ ÇETİN

DANIŞMAN

Prof. Dr. V. Gürhan KADIKÖYLÜ

AYDIN-2013

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİDE AURORA-A KİNAZ EKSPRESYONU

UZMANLIK TEZİ

DR. DENİZ ÇETİN

DANIŞMAN

Prof. Dr. V. Gürhan KADIKÖYLÜ

AYDIN-2013

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından **TPF-13009** numaralı proje olarak desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

İç hastalıkları uzmanlık eğitimim boyunca yanımda çalışmaktan onur duyduğum, meslek hayatıma kattığı değerlerle kendisini örnek aldığım tez danışmanı hocam Prof. Dr. V. Gürhan KADIKÖYLÜ'ye, ayrıca uzmanlık eğitimim boyunca üzerimde emeği olan değerli hocalarım Prof. Dr. Abdulvahit YÜKSELEN, Prof. Dr. Ali Önder KARAOĞLU, Prof. Dr. Engin GÜNEY, Prof. Dr. M. Hadi YAŞA, Prof. Dr. Nezih MEYDAN, Prof. Dr. Sabri BARUTCA, Prof. Dr. Taşkın ŞENTÜRK, Prof. Dr. Yavuz YENİÇERİOĞLU, Prof. Dr. Zahit BOLAMAN, Doç. Dr. İrfan YAVAŞOĞLU, Yard. Doç. Dr. Adil COŞKUN ve Yard. Doç. Dr. Mediha AYHAN'a en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım saygıdeğer hocalarım Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Gökay BOZKURT, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Füzuan KACAR DÖGER'e şükranlarımı sunarım.

Dr. Deniz ÇETİN

Aydın, 2013

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii-viii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2-19
GEREÇ VE YÖNTEM	20-21
BULGULAR	22-27
TARTIŞMA	28-31
SONUÇ	32
ÖZET	33-34
ÖZET (İngilizce)	35-36
KAYNAKLAR	37-51

TABLULAR DİZİNİ

Tablo I: Modifiye Rai Evreleme Sistemi

Tablo II: KLL hastaları ve kontrol gruplarının demografik verileri

Tablo III: Kontrol grubunda yer alan hastaların dağılımı

Tablo IV: KLL hastaları ve kontrol gruplarının hematolojik parametrelerinin karşılaştırılması

Tablo V: KLL hastaları ve kontrol gruplarının Aurora kinaz A mRNA ekspresyon değerleri

Tablo VI: KLL hastaları ve kontrol gruplarının Aurora kinaz A immunhistokimyasal verileri

Tablo VII: 13q delesyon statusu ile Aurora kinaz A immunhistokimyasal boyanma verileri

Tablo VIII: 17p delesyon statusu ile Aurora kinaz A immunhistokimyasal boyanma verileri

Tablo IX: Trizomi 12 statusu ile Aurora kinaz A immunhistokimyasal boyanma verileri

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekil 1: Aurora kinaz A-Bora-Polo like kinaz 1 yolağının mitoz fazına girişte Cdk1 aktivasyonunu kontrol mekanizması.

Resim 1: Aurora-A antikorunun 1:100 dilüsyonda 60 dakika enkübasyonu ile elde edilen kemik iliği biyopsi kesiti örneğinde immunhistokimyasal pozitiflik

Resim 2: Aurora-A antikorunun 1:100 dilüsyonda 60 dakika enkübasyonu ile elde edilen kemik iliği biyopsi kesiti örneğinde immunhistokimyasal zayıf pozitiflik

Resim 3: Aurora-A antikorunun 1:100 dilüsyonda 60 dakika enkübasyonu ile elde edilen kemik iliği biyopsi kesiti örneğinde immunhistokimyasal negatiflik

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- ALL:** Akut lenfoblastik lösemi
- AML:** Akut myeloid lösemi
- APC:** Anaphase promoting complex
- ATM:** Ataxia-telangiectasia mutated
- AURKA:** Aurora kinaz A
- AURKB:** Aurora kinaz B
- CD:** Cluster of differentiation
- Cdk1:** Siklin bağımlı kinaz 1
- δ Ct:** Delta Ct
- DBHL:** Diffüz büyük B hücreli lenfoma
- FGFR1:** Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1
- FISH:** Floresan in situ hibridizasyon
- γ-TURC:** Gama-tubulin ring kompleks
- GAPDH:** Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz
- GM-CSF:** Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör
- HLA:** İnsan Lökosit Antijeni
- IgHV:** İmmunglobulin ağır zincir değişken gen bölgesi
- INCENP:** Inner Centromere Protein
- IκB:** İnhibitor of kappa B
- KLL:** Kronik lenfositik lösemi
- KML:** Kronik myeloid lösemi
- λ:** Lambda
- LAP:** Lenfadenopati
- LATS2:** Large tumor suppressor kinase 2
- MCAK:** Mitotic centromere associated kinesin
- MDS:** Myelodisplastik sendrom
- MHC:** Major histokompatibilite kompleksi
- MMP-9:** Matriks metalloproteinaz-9
- NDEL1:** Nuclear distribution element-like 1
- NF-κB:** Nükleer faktör kappa B
- NHL:** Non-Hodgkin lenfoma

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devamı)

Plk1: Polo-like kinase 1

PP1: Protein fosfataz 1

RET: Rearranged during transfection

RT-PCR: Reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu

TACC: Transforming acidic coiled-coil

TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü beta

TNF α : Tümör nekrozis faktör alfa

Tpx2: Targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2

VCAM-1: Vasküler hücre adezyon molekülü-1

VEGFR2: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 2

ZAP-70: Zeta ilişkili protein-70

GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) küçük, olgun görünümlü CD5+ B lenfositlerin kan, kemik iliği ve lenfoid dokularda birikimiyle karakterize, batı toplumlarında en sık görülen erişkin lösemi tipidir. Etyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Çeşitli çevresel ve kalıtsal faktörler, yatkınlık oluşturan gen polimorfizmleri ve HLA haplotipleri, KLL B lenfositlerinden eksprese edilen immunglobulinler ve klonal kromozomal anormallikler etyopatogeneizde yer almaktadır. KLL hastalarında lösemik hücrelerde klonal kromozomal anormallikler en sık del 13q14-23.1 olmak üzere sıklık sırasıyla trizomi 12, del 11q22.3-q23.1, del 6q21-q23, del 17p13.1 (TP53 mutasyonu) ve 14q anormallikleridir. Bu sitogenetik anormallikler hastalığın prognozunu etkilemektedir.

Aurora kinazlar sentrozom olgunlaşması ve ayrılması, mitotik iğ ipliklerinin oluşumu, iğ düzeneği kontrol noktasının denetlenmesi, kromozom ayrılması, sitoplazma bölünmesi gibi mitotik olayların düzenlenmesinde önemli serin/threonin kinazlardır. Aurora kinaz A aşırı ekspresyonu fazla sentromer oluşumuyla ilişkili olarak multipolar iğ oluşumu, hücre siklus kontrol noktasında yetersizlik, sitoplazma bölünmesinde yetersizlik, anöploidi ve apoptozise karşı direnç gelişimine neden olur. Aurora kinaz A aşırı ekspresyonunun tümör gelişim sürecine ve progresyonuna katkısı olan çeşitli transkripsiyon faktörleriyle etkileşimi söz konusudur. Aurora kinaz A'yı kodlayan gen (AURKA) 20q13.2 kromozomal lokalizasyonda yer alır. Bu bölgenin amplifikasyonu çeşitli solid organ tümörlerinde artmıştır ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Aurora kinazların hücre bölünmesinde önemli görevlerinin anlaşılması ve aşırı ekspresyonunun birçok kanserle kötü prognoz ilişkisi ortaya konmasıyla kanser tedavisinde hedef molekül olmalarını sağlamıştır.

Aurora kinaz A aşırı ekspresyonu multiple miyelom, akut lösemiler, Hodgkin ve non-Hodgkin lenfomalar, kronik myeloid lösemide gösterilmiştir. Ancak kronik lenfositik lösemide Aurora kinaz A ekspresyonu ile ilgili literatürde sadece iki çalışma yer almaktadır. Bunlardan biri Aurora kinaz inhibitörü ile ilgili deneysel çalışma olup diğerinde Aurora kinaz A mRNA ekspresyonu RT-PCR yöntemiyle 47 KLL hastasının yalnız 4'ünde araştırılmıştır.

Bu çalışmanın amacı kronik lenfositik lösemide Aurora kinaz A ekspresyonunun belirlenmesidir. Ayrıca bu çalışma tedavi görmemiş KLL hastalarında Aurora kinaz A ekspresyonu ile ilgili literatürde en geniş hasta serisine sahip olma özelliğindedir.

GENEL BİLGİLER

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ

Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) küçük, olgun görünümlü CD5+ B lenfositlerin kan, kemik iliği ve lenfoid dokularda birikimiyle karakterize neoplastik bir hastalıktır. 19. yüzyıl başlarında Virchow tarafından ilk kez tanımlanmış, 1924'te Minot ve Isaacs tarafından 98 KLL hastasının ayrıntılı klinik tanımı yapılmıştır. Batı toplumlarında en sık görülen erişkin lösemi tipidir. Asya ülkelerinde daha nadir görülmektedir. Günümüzde tüm kanserlerin %0.8'ini, tüm lösemilerin yaklaşık %30'unu oluşturur (1). İnsidansı Dünya genelinde <1-5.5/100.000 olup tanıda ortalama yaş 67'dir (2). Erkeklerde iki kat daha sık görülür ve kadınlarda erkeklere göre daha uzun sağkalım süreleri mevcuttur (3).

ETİYOLOJİ VE PATOGENEZ

Çevresel Faktörler

Etyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Hiçbir çevresel risk faktörü tek başına KLL'ye predispozan kabul edilmemektedir (1). Bazı çalışmalar tarım kimyasalları ve elektromanyetik alan maruziyetinin KLL'ye neden olabileceğini göstermiştir (4,5). Çernobil nükleer felaketi sonrasında yapılan çalışmalar, iyonizan radyasyonun agresif KLL gelişiminde rol oynadığını göstermiştir (6).

KLL hastalarında genel popülasyonla kıyaslandığında hepatit C enfeksiyonunun yüksek prevalansı dikkat çeker (7). KLL hücrelerinin Epstein-Barr virüs enfeksiyonuna karşı dirençli olması, bu virüsün patogeneizde rol oynama olasılığını düşürmektedir (1).

Kahtsal Faktörler

KLL çoğunlukla sporadiktir, ancak ailesel olabilmektedir. Ailesel KLL olgularında hastalık daha erken yaşta ortaya çıkar. KLL hastalarının birinci derece akrabalarında KLL ya da diğer lenfoid malignitelerin görülme sıklığı 3-7 kat artmıştır (8,9). Belirli ailelerde KLL insidansının artmasına neden olan genetik faktörler netlik kazanmamıştır. Bir çalışma etkilenen aile bireylerinin lösemik hücrelerinde aynı immunglobulin ağır zincir değişken gen bölgesinin (IgHV) altgrubunun eksprese edildiğini göstermiştir, ancak her hastanın lösemik hücrelerinde kendine özgü somatik IgHV yeniden düzenlenmeleri vardır (1,10).

CD5, CD38 ve tümör nekrozis faktör alfa'yı (TNF α) kodlayan genlerin (sırasıyla 11q13, 4p15 ve 6p21.3) polimorfizmleri ile agresif KLL gelişme riski arasında ilişki gösterilmiştir (11-13). Çeşitli HLA haplotiplerinin KLL hastalarında sık görülmesi genetik yatkınlıkta rolü olduğunu göstermektedir. Sellick ve arkadaşlarının 206 aileyi kapsayan

araştırmasında yatkınlık oluşturan genlerin lokusları 6p22.1, 2q21.2 ve 18q21.1 olarak tanımlanmıştır (9). Di Bernardo ve ark. ise 2q13, 2q37.1, 6p25.3, 11q24.1, 15q23 ve 19q13.32 lokuslarını KLL için risk oluşturan lokuslar olarak tanımlamışlardır (14). Enjuanes ve ark. (15) apoptozis ve immun düzenleyici yolaklarda görevli bazı proteinleri kodlayan genlerin polimorfizmini (CCNH, APAF1, IL16, CASP8, NOS2A, CCR7) KLL riski ile ilişkilendirmiştir.

Birçok KLL hücresi CD19 ve CD20 gibi pan-B hücre yüzey antijenlerini eksprese eder. KLL hücrelerinde CD20 antijeni ekspresyon düzeyi normal dolaşımda bulunan B lenfositlere göre oldukça düşüktür (16). Ayrıca KLL B lenfositleri, hafıza B lenfositlerinde en yaygın olarak eksprese edilen, TNF reseptör ailesinin bir üyesi olan CD27'yi de eksprese eder (17). Gen mikrodizi analizi çalışmaları KLL hücrelerinin antijenle karşılaşmış, hafıza tipi B lenfositler olduğunu göstermiştir (18).

Immunglobulin Ekspresyonu

KLL hastalarının >%90'ında lösemik hücreler düşük düzeyde monoklonal yüzey immunglobulini κ (kappa) ya da λ (lambda) hafif zincirlerini eksprese eder. Bunların %60'ı κ , %40'ı ise λ hafif zinciri eksprese eder. Ağır zincir izotiplerinde ise hastaların >%55'inde yüzey IgM ve IgD, 1/4'ünde sadece IgM, <%5'inde sadece IgD ve yaklaşık %7'sinde IgM ve IgD dışı izotipler (IgG ya da IgA) eksprese olur (1). KLL B lenfositlerinin en önemlisi IgG'nin sabit bölgesi olmak üzere öz-antijenlere karşı reaktivitesi vardır (19). Bu otoantikörlerin önemli bir özelliği polireaktivitedir. Özgüllüklerinin olmamasına rağmen bu otoantikörlerin seçilmiş immunglobulin gen yeniden düzenlemeleri ve değişken olmayan Ig ağır ve hafif zincir çiftlerine bağımlı olması, polireaktivitenin bağlanma özgüllüğünü gösterir (1). KLL B lenfositlerinden eksprese edilen immunglobulinler lösemik klonun sağkalımı ve büyümesi için kritik rol oynar.

Sitogenetik Anormallikler

KLL hastalarında lösemik hücrelerde klonal kromozomal anormallikler en sık del 13q14-23.1 olmak üzere sıklık sırasıyla trizomi 12, del 11q22.3-q23.1, del 6q21-q23, del 17p13.1 (TP53 mutasyonu) ve 14q anormallikleridir (1). Bu sitogenetik anormallikler hastalığın prognozunu etkilemektedir. On üçüncü kromozom uzun kolundaki delesyonlar KLL olgularının yaklaşık yarısında bulunmaktadır. Bu delesyonlar tipik olarak 13q14.3 bölgesinde yer alır ve bu bölgede DLEU1, DLEU2, RFP2, KCNRG, DLEU6, DLEU7 ve DLEU8 genleri tanımlanmıştır (20,21). Ayrıca bu bölgede bcl-2'yi baskılayarak apoptozisi

uyaran miR15 ve miR16-1 mikroRNA'larını kodlayan genler yer alır (22,23). KLL hastalarının ~%68'inde bu mikroRNA'ların kaybı söz konusudur ve 13q14.3'te delesyonların sık görülmesini açıklamaktadır (22). Bu mikroRNA'lar kanser gelişiminde rolü keşfedilen ilk mikroRNA'lardır (1).

Trizomi 12 KLL hastalarının ~%20'sinde tek başına veya diğer kromozomal anormalliklerle birlikte görülür (1). Trizomi 12, 12q13 ve 12q22 arasında yerleşen bazı genler üzerinde gen dozaj etkisi gösterir. Trizomi12+ lösemik hücrelerde daha sık DNA anöploidisine eğilim vardır ve daha yüksek CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD27, CD79b, CD38, yüzey Ig; daha düşük CD43 ekspresyonu ile ilişkilidir (1,24). Trizomi 12 tanısında saptanamasa da sıklıkla ilerlemiş hastalığı olanlarda ya da Richter transformasyonunda saptanan edinsel bir sitogenetik anormalliktir (25).

Kromozom 11q delesyonları KLL hastalarının yaklaşık %20'sinde görülür. 11q delesyonuna sahip hastalar daha genç (<55 yaş) yaş grubunda, daha agresif hastalığa sahip olmaya ve bulky servikal lenfadenopati gelişimine daha yatkındırlar (26,27). 11q delesyonu barındıran KLL hücreleri daha yüksek CD38, FMC7, CD25, yüzey Ig; daha düşük CD11a/CD18, CD11c/CD18, CD31, CD48 ve CD58 ekspresyonu gösterirler (24,28). On birinci kromozom delesyonları özellikle 11q22.3-q23.1 bölgesinde görülür ve bu bölgede önemli bir gen olan ataxia-telangiectasia mutated (ATM) yer alır. ATM'nin normal gen ürünü, DNA hasarı oluşuncaya kadar tümör baskılayıcı gen ürünü p53'ün aktivasyonunda önemli rol oynar. P53 hücre döngüsünü durdurarak DNA onarımını ya da hücre ölümünü uyarır ve KLL tedavisinde kullanılan pek çok ilaca karşı lösemik hücre duyarlılığı için gereklidir (1). Standart tedavilere dirençli agresif KLL hastalarında ATM gen delesyonu ya da mutasyonu saptanabilir (26,29). Bazı KLL hastalarının germ-line DNA'sında bu genin defektif bir kopyasının taşınması, ATM'nin agresif KLL patogenezinde rol oynayabileceğini göstermektedir (30).

Altıncı kromozomdaki anormallikler tipik olarak 6q23 delesyonları olup bazen de 6q25-27 ve/veya 6q21 delesyonlarını içerebilir. 6q21 ve 6q24 arasındaki anormalliklere sahip hastalar daha yüksek prolenfosit oranına, ortalamanın üzerinde CD38 ekspresyon düzeyine ve normal sitogenetiğe sahip ya da izole 13q14.3 delesyonu olan hastalara kıyasla daha agresif hastalığa sahiptirler (1).

17p13.1 delesyonu tüm KLL hastalarının yaklaşık %15'inde saptanır. Bu bölgede delesyondan etkilenen kritik gen TP53'tür. 17p delesyonu ve/veya TP53 mutasyonu olan KLL

hastaları daha ileri evre hastalığa, daha yüksek lösemik hücre proliferasyon oranına, daha kısa sağkalım sürelerine ve birinci sıra tedaviye büyük oranda direnç sahiptirler (31,32). Bir KLL hastasında 17p13.1 delesyonuna sahip lösemik hücrelerinin oranı zaman geçtikçe ve özellikle alkilleyiciler ya da pürin analogları ile tedaviden sonra artabilir (33). TP53 gen mutasyonları hastalık seyrinde edinilebilir ve lösemik hücrelerin antikanser ilaçlara ve iyonize radyasyona direnç kazanmasıyla sonuçlanır (31).

On dördüncü kromozomda 14q32 bandında immunglobulin ağır zincir kodlayan genler yer alır. Bu band B hücreli malignitelerde translokasyonların gerçekleştiği bölgedir (1). t(14:18) sıklıkla düşük dereceli nodüler B hücreli lenfomalarda görülmekle birlikte nadiren B hücreli KLL'de de saptanabilir (34). Bu translokasyon Ig ağır zincir genleriyle bcl-2'yi bir araya getirir (1).

Lösemik Hücre Kinetiği ve Apoptoz Direnci

Dolaşımda bulunan KLL hücrelerinin G₀ fazında bulunması ve uzun ömürlü olması KLL'yi statik bir hastalık gibi düşündürse de lösemik hücrelerin kayda değer proliferasyon hızı bu kavramla çatışmaktadır (35). KLL'de lenf nodlarında, prolenfosit morfolojisinde CD20 ve diğer B lenfosit yüzey antijenlerini yüksek oranda taşıyan hücreler kümeler oluşturarak proliferasyon merkezi ya da psödofolikül adını alır. Proliferasyon merkezlerinin büyüklüğü ve fazlalığı ile klinik seyir arasında net bir ilişki bulunmamaktadır (1).

KLL B lenfositleri bcl-2 başta olmak üzere bcl-x_L, mcl-1 ve bag-1 gibi anti-apoptotik proteinleri aşırı eksprese eder (36), bax ya da bcl-x_s pro-apoptotik proteinlerini ise düşük düzeyde eksprese eder (37). In vitro koşullarda, lösemik hücrelerde bcl-2 ve/veya bcl-x_L'nin bax'a rölatif oranı ilaçlara direnç gelişimiyle ilişkilidir (38). Bcl-2'nin yüksek düzeyde ekspresyonu, KLL olgularının büyük çoğunluğunda miR-15a ve miR-16-1 mikroRNA'larının kaybının kısmen bir sonucudur (23).

İmmunolojik Bozukluklar

KLL hastalarında genellikle immün yetmezlik gelişir. Hastalık ilerledikçe serum immunglobulin düzeylerindeki ilerleyici düşüş hipogamaglobulinemi ile sonuçlanır. İlâveten hastalarda düşük kompleman düzeyleri, T hücrelerde fonksiyonel kusurlar, MHC antijenleri ekspresyonunda değişiklikler ve granülositik fonksiyon bozukluğu olabilir. Fırsatçı enfeksiyonlara ve herpes zoster, sitomegalovirüs gibi tekrarlayan viral enfeksiyonlara yatkınlık mevcuttur. Lösemik hücrelerden transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-β) gibi immunsupresif sitokin salınımı, immün aktivasyonda hücreler arası etkileşimi bozan CD27

salınımı, B hücre-T hücre etkileşimlerinde gerekli olan CD80'in lösemik hücre yüzeyinde yokluğu ya da azlığı, immun aktivasyonu takiben CD4+ T lenfositlerde eksprese edilen CD40-ligand'ın (CD154) KLL B lenfositleri tarafından baskılanması gibi faktörler immun yetmezliğe katkıda bulunur (1).

KLL hastaları sistemik otoimmün hastalık gelişimine yatkındırlar. Otoantikorlar çoğunlukla neoplastik olmayan B hücrelerde üretilirken, bazı olgularda neoplastik B hücre klonu tarafından üretilir (39). KLL'de en sık görülen otoimmün hastalıklar otoimmün hemolitik anemi ve immun trombositopenidir. Ayrıca kemik iliğinde hematopoetik progenitör hücrelere karşı otoantikor gelişimine bağlı saf eritroid aplazi ya da nötropeni gelişebilir (1).

KLİNİK ÖZELLİKLER

Hastaların %25'inden fazlası tanı anında asemptomatiktir ve bu hastalar genellikle ağrısız lenfadenopati ya da açıklanamayan lenfositoz nedeniyle araştırmalar sırasında tanı alır. Hastalar major organ tutulumu ya da anemi olmasa da egzersiz intoleransı, halsizlik ve yorgunluğun hafif semptomlarına sahip olabilirler. Etkilenen popülasyonun ileri yaş grubu olması nedeniyle hastalar pulmoner, serebrovasküler ya da koroner arter hastalığı komorbiditelerin alevlenmeleriyle prezente olabilirler (1).

Bazı KLL'li olgularda nazal tutulumu sekonder kronik rinit görülebilir (40). Nadir olgularda gangliozidlere karşı IgM antikoruna ile ilişkili olarak sensorimotor polinöropati görülebilir. İleri evredeki olgularda kilo kaybı, tekrarlayan enfeksiyonlar, trombositopeniye sekonder kanamalar ve/veya semptomatik anemi görülebilir. Ancak gece terlemeleri ve ateş yüksekliği sık değildir ve enfeksiyöz hastalık komplikasyonu açısından değerlendirme gerektirir. KLL hastaları bozulmuş T hücre immunitesi ve hipogamaglobulinemi nedeniyle viral ve bakteriyel enfeksiyonlara yatkındırlar (1).

Ağrısız lenfadenopati (LAP) hastaların %80'inde görülür ve en sık servikal, supraklavikular ya da aksillar lenf nodları tutulur. Lenf nodu büyüklüğü değişkenlik gösterir. Bazı hastalarda orofaringeal LAP nedeniyle üst hava yolu tıkanıklığı semptomları görülebilir. Ancak KLL'ye bağlı LAP'larda vasküler ya da lenfatik tıkanıklık bulguları beklenmez. Klinik evrelemede henüz yer almasa da pek çok hastada intraabdominal lenf nodu büyümeleri saptanabilir. Retroperitoneal LAP üreter tıkanıklığı ve hidronefroza yol açabilir. Nadiren periportal lenf nodu büyümesine bağlı safra yolu tıkanıklığı gelişebilir (1).

Hastaların yaklaşık yarısında splenomegali görülür. Erken doyma hissi, karın şişliği gibi yakınmalara yol açabilir. Dalak büyümesi anemi ve trombositopeni gelişimine yol açan

hipersplenizmle sonuçlanabilir. Ancak KLL'de bu tür sitopeniler daha sıklıkla geniş kemik iliği tutulumu ve/veya otoimmuniteye sekonder gelişir. Karaciğerin lösemik hücre infiltrasyonuna bağlı hepatomegali daha az sıklıkta görülür (1).

Ekstranodal Tutulum

Belirli bölgelerde gelişen lösemik hücre infiltrasyonu semptomatik olabilir. Retro-orbital tutulum proptozise yol açabilir. Perikard tutulumu kardiyak tamponad ile sonuçlanabilen restriktif perikardite yol açabilir (41). Akciğer parankimi tutulumunda, lösemik hücrelerin nodüler ya da milier infiltratları direkt akciğer grafisinde görülebilir. Solunum yolu mukozasında da tutulum olabilir. Plevranın lösemik hücre infiltrasyonu hemorajik ya da şilöz vasıfta plevral efüzyon gelişimine yol açabilir (42,43). Gastrointestinal sistemde lösemik hücre infiltrasyonu ülser gelişimi, gastrointestinal kanama ya da malabsorbsiyonla sonuçlanan anormal mukozal kalınlaşmalara yol açabilir. Santral sinir sistemi tutulumu nadir olup baş ağrısı, menenjit, kranyal sinir felci, bilinç kaybı ve komaya neden olabilir (44). Nörolojik bulgular mantarlar, Cryptococcus neoformans, Listeria monocytogenes ya da diğer fırsatçı patojenlerin oluşturduğu infeksiyonlara bağlı gelişebilir. Saçlı deri, subkonjonktiva, böbrekler, prostat, gonadlar ve farinks diğer ekstranodal tutulum yerleridir (1).

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ TANISI

KLL tanısı karakteristik immunfenotipe ve morfolojiye sahip, 3 aydan uzun süreyle devam eden, periferik kanda $>5000/\mu\text{L}$ klonal B lenfositöz varlığına dayanır (45). Lösemik hücreler morfolojik açıdan, dolaşımda bulunan normal küçük, matür lenfositlerin fenotipik kopyasıdır. Periferik yaymanın hazırlanması sırasında parçalanmış KLL lenfositleri smudge hücreleri (Gumprecht lekeleri) olarak görülebilir. KLL hücreleri karakteristik olarak T lenfosit antijeni CD5 ile B lenfosit yüzey antijenleri CD19, CD20, CD23'ü birlikte ekspres eder. Yüzey immünglobulin, CD22 ve CD79b ekspresyon düzeyi ise düşüktür (1). KLL hastaları için önerilen, yüzey Ig zayıf ekspresyonu, CD5, CD23 ekspresyonu, CD79b ve FMC7'nin yokluğu ya da düşük düzeyde ekspresyonları kriterlerinin her biri için 1 puan verilen skorlama sistemine göre olguların %92'sinde 4-5, %6'sında 3, %2'sinde 1-2 skorları mevcuttur (45).

KLL'de kemik iliği aspirasyon incelemesinde $>\%30$ hücre lenfoid seriye aittir (46). KLL tanısı için kemik iliği aspirasyon ve biyopsisi gerekmemekle birlikte tam yanıt değerlendirmesi için zorunludur. Ayrıca tedavi öncesi sitopenilerin ve tedavi sonrası uzamış sitopenilerin nedeninin belirlenmesinde önemlidir (45). KLL hücreleri kemik iliğinde dört

paternde izlenir. Hastaların 1/3'ünde erken evre hastalık ve daha iyi prognozla ilişkili olan interstisyel patern izlenir. Hastaların yaklaşık olarak %10'unda nodüler patern, %25'inde miks nodüler-interstisyel patern izlenir ve bu tutulum şekilleri de iyi prognozla ilişkilidir. Hastaların 1/4'ünde daha agresif, ileri evre hastalıkla ilişkili diffüz patern izlenir (47).

KLİNİK EVRELEME

Günümüzde modifiye Rai ve Binet olmak üzere prognozu belirleme ve tedaviye başlama kararında yardımcı 2 klinik evreleme sistemi kullanılmaktadır. Modifiye Rai sınıflamasında düşük riskli hastalık, mutlak lenfositozlu hastaları tanımlar (Rai evre 0). Orta riskli hastalık, lenfositozla eşlik eden herhangi bir bölgede büyümüş lenf nodları (Rai evre 1) veya eşlik eden splenomegali ve/veya hepatomegali (LAP olabilir ya da olmayabilir; Rai evre 2) bulguları olan hastaları tanımlar. Yüksek riskli hastalık ise hastalık ilişkili anemi (Hemoglobin düzeyi <11 g/dL; Rai evre 3) ya da trombositopenisi (trombosit sayısı <100.000/ μ L; Rai evre 4) olanları tanımlar (46).

Tablo I: Modifiye Rai Evreleme Sistemi

Revize Edilmiş Evreleme Sistemi	Orjinal Evreleme Sistemi	Klinik Özellikler	Ortalama Sağkalım (Yıl)
Düşük risk	0	Kan ve kemik iliğinde lenfositoz	>10
Orta risk	1	Lenfositoz + LAP	7-9
	2	Lenfositoz + splenomegali/hepatomegali	7-9
Yüksek risk	3	Lenfositoz + anemi (Hb <11 g/dL)	1.5-5
	4	Lenfositoz + trombositopeni (trombosit <100.000/ μ L)	1.5-5

Binet evreleme sistemi için tutulan lenfoid alanlar baş-boyun lenf nodları, aksillar lenf nodları, inguinofemoral lenf nodları, dalak ve karaciğer olmak üzere beş bölgeye ayrılmıştır. Binet sisteminin üç evresi aşağıda tanımlanmıştır (46).

Evre A: Hb \geq 10 g/dL, trombosit sayısı \geq 100.000/ μ L, <3 lenfoid alan tulumu

Evre B: Hb \geq 10 g/dL, trombosit sayısı \geq 100.000/ μ L, \geq 3 lenfoid alan tulumu

Evre C: Hb <10 g/dL ve/veya trombosit sayısı <100.000/ μ L

Hastaların ortalama sağkalım süreleri Binet evre A hastalar için >10 yıl, evre B hastalar için 7-9, evre C hastalar için ise 1.5-5 yıldır (48).

PROGNOSTİK BELİRTEÇLER

Lenfosit ikilenme zamanı, mutlak lenfosit sayısının iki katına çıkması için geçen süreyi tanımlayan önemli bir hastalık progresyon belirteçidir. On iki aydan daha kısa lenfosit ikilenme zamanına sahip hastalarda genel ve ortalama sağkalım süreleri, hastalığın evresinden bağımsız olarak belirgin daha kısadır (49).

KLL hastaları, lösemik hücrelerin eksprese ettiği immunglobulin ağır zincir değişken bölge (IgHV) genlerinin somatik mutasyonu durumuna göre prognozları farklı iki gruba ayrılır. Tüm olguların yarısında KLL hücreleri mutasyona uğramamış IgHV genleri eksprese eder. Mutasyona uğramamış IgHV genleri eksprese eden KLL hastalarında progresyona eğilim daha fazladır (50); tedavi alan hastalarda ise remisyonda kalma süresi daha kısadır (51). İstisnai olarak IGHV3-21 mutasyonu barındıran lösemik hücrelere sahip KLL hastalarında, mutasyonsuz IgHV geni taşıyan hastalara benzer şekilde agresif hastalık riski mevcuttur (52).

Zeta-associated protein (ZAP)-70, 70 kDa molekül ağırlığında sitoplazmik bir protein olup normalde sadece natural killer hücreleri ve T lenfositlerde eksprese edilir (1). Mutasyona uğramamış IgHV geni taşıyan KLL hücrelerinde genellikle ZAP-70 eksprese edilir. Buna karşın, IgHV gen mutasyonu barındıran KLL B lenfositlerinde ise genellikle ZAP-70 eksprese edilmez (53). ZAP-70 pozitifliği tanımlaması için lösemik hücrelerin %20 veya daha fazlasının floresans göstermesi gereklidir (54). Tanıdan tedavi başlangıcına kadar geçen sürelerin gruplar arasında kıyaslandığı çok merkezli bir çalışmada, ZAP-70 pozitif KLL hastalarında bu süre ZAP-70 negatif (IgHV mutasyonu olan ve olmayanlar) hastalara göre daha kısa saptanmıştır (55). KLL hücrelerinde ZAP-70 ekspresyonu, agresif hastalığı öngörmede, mutasyonsuz IgHV gen ekspresyonundan daha güçlü bir belirteçtir (56).

CD38, siklik ADP-riboz sentez ve hidrolizinde görevli bir transmembran glikoprotein olup klinik evreden bağımsız olarak kötü prognoz belirteçidir (57). CD38 ekspresyon düzeyi bir hastada farklı zaman dilimlerinde <math><10\%</math> değişiklik gösterebilir ve bu durum lösemik mikroçevre düzenlemesiyle ilişkilendirilmiştir (58). CD38'in prognostik belirteç olarak kullanılmasındaki tartışma kısmen olguların pozitif ve negatif olarak ayrılmasında kullanılan teknik farklılıkların sonucudur. CD38 pozitifliği tanımlaması için lösemik hücrelerin %30 veya daha fazlasının floresans göstermesi gereklidir (1).

Anormal karyotipe sahip KLL hastalarının sağkalım süreleri normal karyotipe kıyasla daha kısadır. Trizomi 12, 11q23 delesyonu, 17p13 delesyonu, 14. ve 6. kromozom anomalileri kötü prognozla ilişkilidir (1). Döhner ve ark.'nın (59) 325 KLL hastasında sitogenetik özelliklerin prognoz üzerine etkisinin incelendiği çalışmada; 17p delesyonu, 11q delesyonu ya da trizomi 12 pozitif hastalarda ortalama tedavisiz sağkalım süreleri normal karyotipli hastalara göre daha kısa saptanmış olup izole 13q delesyonu olan hasta grubunda ise daha uzundur.

Normal renal fonksiyona sahip KLL hastalarında serum β 2-mikroglobulin artışı olumsuz risk faktörüdür (60). Timidin kinaz enziminin ileri evre ya da hızlı progresif hastalıkla ilişkisi gösterilmiş ancak rutin klinik uygulamada standardize edilmediğinden kullanılmamaktadır (61). Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) kullanımı serum β 2-mikroglobulin ve timidin kinaz düzeyini artırabilir (62). Laktat dehidrogenaz enzimi, hemen tüm Richter transformasyonu olan hastalarda yüksek saptanır (63). sCD23, sCD27, sCD44, interlökin-8, interlökin-6, matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) gibi moleküllerin artmış serum düzeyleri olumsuz prognostik faktörler arasında yer almaktadır (1).

AURORA KİNAZ VE MİTOZ

Mitoz sırasında temel görev çoğaltılan kardeş kromatidlerin yeni hücrelere mükemmel doğrulukta ayrılmasının sağlanmasıdır. Mitotik iğ yoğunlaşmış kromozomların doğru hizalanması için platform ve kardeş kromatidlerin doğru ayrılması için bir makine görevi görür (64). Mitoz sırasında, bilinen hücre döngüsü düzenleyicileri de dahil olmak üzere 1000'den fazla proteinin artmış fosforilasyonu gösterilmiştir (65). Aurora kinazların mitotik iğ için esas düzenleyicisi olarak önemli rolleri vardır (66).

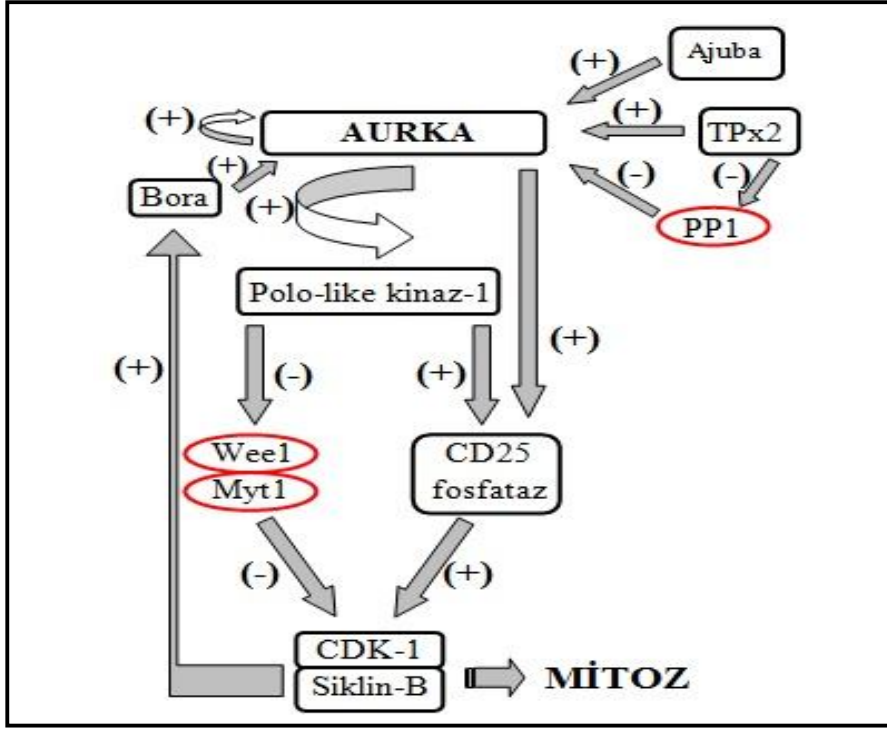
Aurora kinazlar sentrozom olgunlaşması ve ayrılması, mitotik iğ ipliklerinin oluşumu, iğ düzeneği kontrol noktasının denetlenmesi, kromozom ayrılması, sitoplazma bölünmesi gibi mitotik olayların düzenlenmesinde önemli serin/threonin kinazlardır (67). Aurora kinazlar ilk kez Glover ve ark. (68) tarafından 1995'te *Drosophila* cinsi sineklerde tanımlanmıştır. Serin/threonin kinazların fonksiyon kaybının sentrozomların ayrılması ve bipolar iğ oluşumunda yetersizliğe yol açtığı gösterilmiştir. Aurora kinazların memelilerde yüksek derecede sekans homolojisine sahip Aurora kinaz A, B ve C olmak üzere üç tipi tanımlanmıştır (69). Özellikle karboksi-terminal katalitik parçaları benzerlik gösterirken, uzunlukları ve amino-terminal parçalarının sekansları farklıdır (70-72). Benzerliklerine

rağmen ayrı lokalizasyon ve fonksiyonlara sahiptirler. Aurora kinaz A ve B ayrı mekanizmalarla aktive edilerek farklı proteinlerle etkileşime girerler; lokalizasyonları kutuplar ve sentromerler olarak farklılık gösterir (64). Aurora kinaz C ekspresyonu testiste yüksek seviyededir ve spermatogenezde önemli rol oynar (73).

Aurora Kinaz A

Aurora kinaz A'nın (STK15/BTAK/Aurora-2) etkinleşmesi aktivasyon bölgesindeki threonin rezidüsünün (Thr288) otofosforilasyonuna bağlıdır (67,74). Aurora kinaz A aktivitesi Bora, Ajuba, Targeting protein for *Xenopus* kinesin-like protein 2 (Tpx2) gibi pek çok kofaktörle artırılır (67). Bora özellikle Aurora kinaz A'nın uyardığı Polo-like kinase 1 (Plk1) fosforilasyonunda gereklidir (75). Plk1'in threonin rezidüsünün (Thr210) fosforillenerek aktivasyonunda Bora, Aurora kinaz A'nın aktivasyon bölgesine ulaşmasını sağlayarak sinerjik hareket ederler (76). Geç G₂ fazında, aktiflenen Plk1 daha sonra Aurora kinaz A'nın sentrozomin'e bağlanmasını destekler (67). Ayrıca *in vitro* çalışmalar, Ajuba isimli sentrozomda yerleşen proteinin, Aurora kinaz A'nın otofosforilasyonunu uyardığını göstermiştir (77). Kofaktör Tpx2 Aurora kinaz A'nın otofosforilasyonunu uyarması yanı sıra protein fosfataz 1 (PP1)'i inhibe ederek defosforilasyonunu önler (78). Tpx2, Aurora kinaz A'yı mitotik iğ mikrotübüllerine yönlendirerek iğ oluşumunda önemli görev üstlenir (79).

Hücrenin mitoz girişini başlatan siklin B-siklin bağımlı kinaz 1 (siklin B-Cdk1) kompleksinin aktivasyonudur. Cdk1'in T14 ve Y15 fosforilasyonu Wee1/Myt1 kinazlar ile Cdc25 fosfatazlar arasındaki denge ile kontrol edilir. Wee1 ve Myt1 kinazlar siklin B-Cdk1 aktivitesini inhibe ederken Cdc25 fosfatazlar ise aktive eder. Cdc25 fosfatazların 3 izoformu bulunmaktadır: Cdc25A, Cdc25B ve Cdc25C (80). Siklin B-Cdk1 aktivasyonunda Cdc25B başlatıcı olarak görev alır (81). Cdk1 T14/Y15 fosforilasyonunun doğrudan düzenlenmesi yanı sıra çeşitli geribildirim mekanizmaları siklin B-Cdk1 aktivasyonunun dolaylı yollardan düzenlenmesinde görev alırlar (80). Cdk1 yokluğunda da Plk1'e bağlanabilen Bora'nın Cdk1 tarafından fosforilasyonu ile Plk1'e bağlanması artırılır (76,80). Böylelikle Bora kofaktörlüğünde Aurora kinaz A aracılı Plk1 aktivasyonu uyarılır (80). Aktiflenen Plk1, Cdc25 fosfatazları aktive ederken Wee1 kinazları baskılayarak Cdk1 aktivasyonunda görev alır (76). Ayrıca Aurora kinaz A, mitoz başlatıcılarından kabul edilen Cdc25B'yi doğrudan fosforilleyerek siklin B-Cdk1 aktivasyonunu uyarır (82). Böylelikle Aurora kinaz A-Bora-Plk1 yolağı mitoz fazına girişte Cdk1 aktivasyonunu kontrol eder (76). Bu ilişki şekil 1'de şematize edilmiştir.



Şekil 1: Aurora kinaz A-Bora-Polo like kinaz 1 yolağının mitoz fazına girişte Cdk1 aktivasyonunu kontrol mekanizması

Hücre döngüsünün S fazında sentrozom duplikasyonunu takiben Aurora kinaz A sentrozomlarda birikmeye başlar. Sentrozom olgunlaşmasının en belirgin olduğu geç G₂ fazında perisentriyoller maddede γ -tubulin, γ -tubulin ring kompleks (γ -TURC) ve çeşitli düzenleyici proteinlerin toplanmasıyla sentrozomların hacmi ve mikrotübül nükleasyon kapasitesi artar. Aurora kinaz A sentrozomda γ -tubulin, sentrozomin, large tumor suppressor kinase 2 (LATS2), transforming acidic coiled-coil/maskin (TACC), nuclear distribution element-like 1 (NDEL1)'in perisentriyoller maddeye toplanmasını yardım ederek sentrozom olgulaşmasında katkı sağlar (83). Aurora kinaz A hücre çekirdek zarı dağıldıktan sonra sentrozomların ayrılmasında mekanizması netlik kazanmamış olsa da aktif rol oynar (84). Aurora kinaz A'nın mutasyonu ya da azlığı anormal yapıda, monopolar iğ oluşumuna neden olur (68,85). Marumoto ve ark. (85) çalışmalarında Aurora kinaz A antikorunun insan hücresine mitozun farklı aşamalarında mikroenjeksiyonu ile sentriyol çiftlerinin yanlış ayrılması, kromozomların metafaz plağında yanlış dizilmesi ve sitoplazma bölünmesinin tamamlanamaması etkilerini ortaya koymuştur. Mitoz sonunda Aurora kinaz A, anaphase promoting complex (APC)-ubiquitin-proteozom yolağında yıkılır (86).

Aurora kinaz A mitozdaki görevleri yanı sıra TP53 (p53) ve nükleer faktör kappa B (NF- κ B) fonksiyonlarını da düzenler. TP53'ü fosforile ederek MDM2 aracılığıyla

ubikuitinasyon ve proteolizisine neden olur (67,87). TP53 fonksiyon kaybı ile hücreler DNA hasarına neden olan ajanlara dirençli hale gelebilir. Aurora kinaz A, NF- κ B antagonisti olan inhibitor of kappa B (I κ B)'nin fosforilasyonu ile güçlü bir anti-apoptotik efektör olan NF- κ B aktivitesini artırarak kemoterapi rezistansına katkıda bulunur (67,88).

Aurora Kinaz B

Kromozomal kararlılık mitoz sırasında hatasız kromozom ayrılması ve düzgün sitoplazma bölünmesini gerektirir. Kromozom ayrılmasında kusurlar sayısal ve yapısal kromozom anormalliklerine yol açarak kanser hücresi gelişimine neden olabilir (89). Kinetokorlar sentromer üzerinde iğ ipliklerinin mikrotübüllerine bağlanmayı sağlayan multi-protein yapılarıdır. Çekirdek zarfı dağıldığında prometafazda kromozomlar, kardeş kinetokorlardan biri bağlı diğer ise serbest olmak suretiyle yakındaki bir iğ ipliğine tutunup 'monotelik' bağlantı gerçekleştirirler. Kardeş kinetokorlardan serbest olan karşı kutuptan mikrotübüle tutunarak 'amfitelik' (bipolar) bağlantıyı gerçekleştirir. Bu sayede kromozomlar iki kutupun ortasında metafaz plağında konumlanır. Her iki kardeş kinetokor aynı kutuba bağlanırsa (sintelik bağlanma) kromozom metafaz plağında yer alamaz (70).

Genom kararlılığının sağlanmasında kritik rol oynayan kromozom yolcu kompleksi Aurora kinaz B, Inner Centromere Protein (INCENP), Survivin ve Borealin'den meydana gelir. Siklin b-Cdk1 kompleksi aktivasyonu ile mitoz başladığında, kromozom yolcu kompleksinin enzimatik çekirdeği olan Aurora kinaz B aktifleşir (89). Aurora kinaz B ekspresyonu G₂-M geçişinde pik yapar ve mitoz süresinde maksimum seviyededir (70,71). Aurora kinaz B kinetokor-mikrotübül etkileşimlerini stabilize eder. Bipolar bağlanmış kromozomda yeterli gerilim kuvveti oluşuncaya kadar kinetokor-mikrotübül bağlantıları Aurora kinaz B tarafından bozulur (90). İç sentromere bağlı Aurora kinaz B aktiftir fakat mikrotübüllerin kinetokordan ayrılmasına neden olmaz. Buna karşın yeterli gerilim olmadığında kinetokor substratları Aurora kinaz B'ye çok yakınlaştığından fosforile olur ve böylece mikrotübüllere olan ilgi azalır, kinetokor-mikrotübül bağlantısının stabilitesi kaybolur (91). Aurora kinaz B yanlış mikrotübül-kinetokor bağlantıları üzerine yıkıcı etkilerini mitotic centromere associated kinesin (MCAK), KMN (KNL1/Mis12/Ndc80) ağı üzerinden gösterir (64). Aurora kinaz B, INCENP ve Survivin, tüm kromozomlar mitotik iğ üzerinde uygun bipolar bağlantıyı gerçekleştirene kadar mitozun ilerlemesine engel olan 'iğ düzeneği kontrol noktası'nı denetler (70,90). Ayrıca kinetokor-kromatin çevresinde mikrotübül organizasyonunda gerekli γ -tubulin yoğunlaşması için Aurora kinaz A'nın gerekliliği, Aurora

kinaz A'nın baskılandığı hücre serilerinde bipolar iğ morfolojisinin bozulması ve mitozun ilerleyişinde duraksamayla gösterilmiştir (92). Anafazda, kromatidler ayrıldıktan sonra Aurora kinaz B, antiparalel mikrotübül demetlerinin organize olduğu iğ orta zonunda toplanır (70). Santral spindlin isimli tetramerik protein kompleksin bir araya gelmesini sağlayarak sitoplazma bölünmesinde görev alır (93).

AURORA KİNAZ VE KANSER

Aurora kinaz A aşırı ekspresyonu fazla sentromer oluşumuyla ilişkili olarak multipolar iğ oluşumu, hücre siklus kontrol noktasında yetersizlik, sitoplazma bölünmesinde yetersizlik, anöploidi ve apoptozise karşı direnç gelişimine neden olur (83). Aurora kinaz A ile p53 arasındaki negatif geribildirim döngüsü kanser hücrelerinde kaybolmuştur. Aurora kinaz A, p53'ü fosforile ederek MDM2 aracılığıyla p53 kaybına yol açar (67,87). Aurora kinaz A aşırı ekspresyonunun tümör gelişim sürecine ve progresyonuna katkısı olan çeşitli transkripsiyon faktörleriyle etkileşimi söz konusudur. Bir tümör supresor gen olan AP-2 α 'nın Aurora kinaz A tarafından p53'ten bağımsız olarak inhibe edildiği gösterilmiştir (94). Aurora kinaz A tarafından I κ B α 'nın fosforillenerek azalması, tümör büyümesini destekleyen bir transkripsiyon faktörü olan NF κ B'nin aktifleşmesine neden olur (95). Aurora kinaz A ile myc onkoproteinleri arasındaki etkileşimler de karsinogeneze katkıda bulunmaktadır (83).

Aurora kinaz A'yı kodlayan gen (AURKA) 20q13.2 kromozomal lokalizasyonda yer alır. Bu bölgenin amplifikasyonu çeşitli solid organ tümörlerinde artmıştır ve kötü prognoz ile ilişkilidir (71,96-99). AURKA'dan farklı olarak, kromozom 17p13.1'de yerleşen Aurora kinaz B geninin (AURKB) amplifikasyonu bildirilmemiştir (67). Aurora kinaz A ve B aşırı ekspresyonu pek çok tümörde daha yüksek tümör derecesi, daha fazla proliferasyon hızı ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (100-103).

Bischoff ve ark. (71) tarafından Aurora kinaz A'nın aşırı ekspresyonu kolorektal kanser hücrelerinde gösterilmiştir. TPX2 ve Aurora kinaz A'nın aşırı ekspresyonu kolorektal poliplerin karsinoma progresyonuyla ilişkili saptanmıştır (104). Evre 2 ve 3 kolon kanserli 386 hastanın yer aldığı hücre siklus proteinlerinin rekürrens ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada (105), evre 3 kemoterapi almış hastalarda rekürrens oranı Aurora kinaz A ekspresyonu yüksek tümörlülerde daha fazla tespit edilmiştir (54.7 vs 17.6, p<0.001). Yüksek Aurora kinaz A ekspresyonu olan, kemoterapi alan ve almayanlar hastalar arasında hastaliksız sağkalım açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Nadler ve ark.'nın (106) 638 meme kanseri hastasının tümör dokusunun incelendiği çalışmada, yüksek Aurora kinaz A ekspresyonunun sağkalımda azalmayla ilişkisi gösterilmiş olup ($p=0.0005$), Aurora B ekspresyonu ile sağkalım arasında ilişki saptanmamıştır. Aurora A aşırı ekspresyonu yüksek nükleer derece, yüksek Her2/neu ve progesteron reseptör ekspresyonu ile bağlantılıdır.

Over kanserinde Aurora kinaz A'nın hastalık prognozu ile ilişkisini gösteren çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Mendiola ve ark.'nın (107) çalışmada, Aurora kinaz A eksprese eden tümöre sahip olanlarda Aurora kinaz A eksprese etmeyenlere kıyasla, artmış genel ve hastaliksız sağkalım süreleri gösterilmiştir. Buna karşın, Kulkarni ve ark.'nın (108) çalışmada, Aurora kinaz A ekspresyonu erken evre over kanserinde daha kısa hastaliksız sağkalım süresi ile ilişkilirken ileri evre over kanserinde bu ilişki gösterilmemiştir. Üç ayrı çalışmada Aurora kinaz A aşırı ekspresyonu ile agresif hastalık ve kötü prognoz arasındaki korelasyon ortaya konmuştur (109-111). Over kanserinde BRCA2 ile Aurora kinaz A ekspresyonu arasındaki negatif ilişkiyi gösteren son çalışmalarda, yüksek dereceli over kanserli hastalarda BRCA2 nükleer birikimi ile daha iyi genel sağkalım ve hastaliksız sağkalım süreleri ilişkisi gösterilmiştir ancak Aurora kinaz A aşırı ekspresyonu ile kötü prognoz ilişkilendirilmiştir (112,113).

Aurora kinaz A aşırı ekspresyonu esasen orta ve kötü diferansiye akciğer kanserlerinde görülür (114). Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde Aurora kinaz A'nın perimembranöz boyanma paterni göstermesinin, diffüz sitoplazmik boyanmaya kıyasla daha yüksek proliferasyon indeksi, daha kötü prognoz ve daha az sağkalım ile ilişkili olduğu saptanmıştır (115).

Reiter ve ark.'nın (116) çalışmada, 66 baş-boyun skuamöz hücreli karsinom hastasında AURKA mRNA aşırı ekspresyonu ile tümör evresi, rejyonel lenf nodu varlığı ve uzak metastaz arasında anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0.0001$). AURKA mRNA aşırı ekspresyonu, baş-boyun kanserinde hastaliksız sağkalım ($p=0.03$) ve genel sağkalım sürelerinin ($p<0.001$) kısalması ile ilişkilidir.

Aurora Kinazların Hematolojik Malignitelerde Yeri ve Önemi

Ikezoe ve ark.'nın (117) çalışmada 44 akut myeloid lösemi (AML) hastasının kemik iliği hücreleri, sağlıklı gönüllerin kemik iliği ($n=11$) ve periferik kan ($n=12$) mononükleer hücreleriyle kıyaslandığında Aurora kinaz A'nın artmış ekspresyonu lösemik hücrelerde gösterilmiştir (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.0001$). Aurora kinaz B için de benzer

sonuçlar elde edilmiştir. Sağlıklı kişilerin periferik kan mononükleer hücreleri granülosit-koloni stimulan faktör ile mobilize edildiğinde Aurora kinaz A ve B ekspresyonu artmıştır. Kemik iliğinde CD34+ hücrelerde Aurora kinaz A mRNA düzeyinin incelendiği 9 AML, 20 myelodisplastik sendrom (MDS) ve 5 kontrol hastasından oluşan çalışmada, MDS ve AML hastalarının CD34+ hücrelerinde Aurora kinaz A düzeyinin belirgin arttığı gösterilmiştir (her ikisi için $p=0.01$) (118). Ayrıca bu çalışmada Aurora kinaz A mRNA düzeyiyle blast yüzdesi, sitogenetik anormallikler ve MDS hastalarında IPSS skorları arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve kronik myeloid lösemi (KML) hastalarında Aurora kinaz artmış ekspresyonuyla ilgili daha az olgu serisi bulunmaktadır. Philadelphia (Ph) pozitif ALL ve KML hastalarında tirozin kinaz inhibitörlerine karşı T315I mutasyonuna bağlı direnç gelişmesi durumunda Aurora kinaz inhibitörleriyle olumlu klinik yanıtlar alınması nedeniyle çalışmalar bu yönde devam etmektedir (119,120).

Hose ve ark.'nın (121) alışmasında, tedavi almamış 233 multiple miyelom hastasında Aurora kinaz A ve B ekspresyon oranları sırasıyla %24 ve %3 olarak saptanmıştır. Yüksek doz kemoterapi ve otolog kök hücre nakliyle tedavi edilen alt grupta ($n=168$) Aurora kinaz A ve B ekspresyon oranları benzer bulunmuştur (sırasıyla %23.2 ve %3.5). 345 multiple miyelom hastasından oluşan bağımsız bir kohortta (Arkansas grubu) Aurora kinaz B ekspresyonu %3, Aurora kinaz A ekspresyonu ise %14 oranında saptanmıştır. Aurora kinaz A eksprese eden miyelom hücrelerinin proliferasyon hızı artmıştır, ancak Aurora kinaz A eksprese etmeyen miyelom hücreleriyle kıyaslandığında kromozomal anormallikler (anöploidi) daha fazla değildir. 513 multiple miyelom hastasından oluşan 2 bağımsız kohortta, Aurora kinaz ekspresyonu ile daha düşük hastalıksız ve genel sağkalım süreleri ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle multiple miyelomda Aurora kinaz A ekspresyonu olumsuz prognostik faktör olarak kabul edilmektedir (121).

Aurora kinaz A ve B artmış ekspresyonu sıklıkla non-Hodgkin lenfomaların (NHL) agresif alt tiplerinde görülür. Farklı B hücreli NHL hastalarından elde edilen hücre serilerinde Aurora kinaz A ekspresyonu diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL) ve Burkitt lenfoma gibi agresif NHL tiplerde artmıştır (122). Uluslar arası Prognostik İndeks (IPI) değeri yüksek olan DBBHL hastalarında Aurora kinaz A ekspresyonunun daha fazla olması, NHL hastalarında hastalık aktivitesi ile Aurora kinaz A ekspresyonunun bağlantılı olduğunu göstermektedir (67). İmmunhistokimyasal alışmalarda Aurora kinaz B aşırı ekspresyonu

DBBHL'de %48, Burkitt lenfomada %86 oranında tespit edilmiştir ancak düşük dereceli lenfomalarda genellikle artmış ekspresyonu gösterilmemiştir. Bu da NHL'da histolojik derece ile Aurora kinaz B ekspresyonu düzeyi arasında da anlamlı ilişki ($p<0.001$) olduğunu göstermektedir (123). 26 mantle hücreli lenfoma hastasının yer aldığı çalışmada Aurora kinaz A mRNA ekspresyonu en yüksek oranda blastoid varyantta saptanmış olup Ki67 ekspresyonuyla da güçlü bir korelasyon ($p<0.005$) göstermiştir (124). Qi ve ark.'nın (125) çalışmasında, 20 mantle hücreli lenfoma hastasının doku örneklerinde Aurora kinaz A %88, Aurora kinaz B ise %75 oranında ++/+++ boyanma paterni görülmüştür ve düşük sağkalım süreleriyle korelasyon gösterir. Hodgkin lenfoma ile ilgili daha az çalışma bulunmaktadır. Mori ve ark.'nın (126) selektif Aurora kinaz B inhibitörü olan AZD1152'nin Burkitt lenfoma ve Hodgkin lenfomalarda etkinliğinin araştırıldığı çalışmasında, immunhistokimyasal incelemeyle lenf nodlarında Aurora kinaz A ve B'nin artmış ekspresyonu gösterilmiştir. Aurora kinaz A ve B mRNA ekspresyon düzeylerinin Burkitt lenfoma ve Hodgkin lenfoma hücre serilerinde belirgin arttığı reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle gösterilmiştir. Hücre serilerindeki artmış protein düzeyleri Western Blot analiziyle doğrulanmıştır.

AURORA KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ

Aurora kinazların hücre bölünmesinde önemli görevlerinin anlaşılması ve aşırı ekspresyonunun birçok kanserle kötü prognoz ilişkisi ortaya konmasıyla kanser tedavisinde hedef molekül olmalarını sağlamıştır (127). Günümüzde prelinik ve klinik çalışmaları devam eden otuzun üzerine aurora kinaz inhibitörü bulunmaktadır. Aurora kinaz inhibitörleri etkilerini ko-aktivatör moleküllerin aurora kinaz ile etkileşimini engelleyerek gösterirler. Bunun en iyi bilinen şekli ATP'nin katalitik bağlanma bölgesinin hedeflenmesidir (128).

Pan-Aurora Kinaz İnhibitörleri

Bu inhibitörler Aurora kinaz A, B ve C'yi inhibe ederler. PHA-739358 (Danusertib) 3-aminopirazol türevi bir intravenöz pan-aurora kinaz inhibitörü olup dominant etkisini Aurora kinaz B üzerinden gösterir. Aurora kinaz inhibisyonu yanı sıra ABL (Abelson), rearranged during transfection (RET), Trk-A ve fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1 (FGFR1) kinazları inhibe etme özelliğine sahiptir (127). KML'de tirozin kinaz inhibitörü direncinden sorumlu olan T315I mutasyonuna sahip olanlarda PHA-739358'in etkinliği gösterilmiştir (129). İmatinibe dirençli KML hastalarında ve solid tümörlerde faz 2 klinik çalışmalar devam etmektedir (127).

CYC116 faz 1 klinik çalışmaları devam eden, 2-anilino-4-heteroaril-pirimidin grubu oral biyoyararlanımı olan, lösemi ve solid organ tümörlerinde etkisi gösterilmiş bir pan-aurora kinaz inhibitörü olup ayrıca vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 2 (VEGFR2) kinazı inhibe edici özelliği ile tümör anjiogenezini doz bağımlı olarak baskıladığı lösemik fare modelinde gösterilmiştir (127,130).

VX-680 isimli pan-aurora kinaz inhibitörü ALL ve KML hastalarında BCR-ABL kinazın T315I mutant formuna karşı etkinliğiyle öne çıkmış ancak kalp yetmezliği gibi yüksek toksisite nedeniyle çalışmalarına ara verilmiştir (127).

AT9283 Aurora kinaz A ve B yanı sıra janus kinaz 2 (JAK2), JAK3 ve BCR-ABL (T315I mutant form dahil) kinazı inhibe eder (131). Güvenlik, tolerans ve etkinliği faz 2 çalışmalarda araştırılmaktadır.

R763 (AS703569) pek çok solid tümör ksenograft modelinde etkinliği gösterilmiş ve ilaveten ABL, FLT1 ve FLT3 kinazları da inhibe eden güçlü bir oral pan-aurora kinaz inhibitörüdür. FLT3 ITD mutant lösemik hücre dizisinde R763 oldukça etkili bulunmuştur (132).

GSK1070916 Aurora kinaz B ve C'nin selektif inhibitörü olup in vivo etkinliği pek çok ksenograft modelde tümör regresyonuna yol açmasıyla gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada 2 lösemik fare modelinde (AML HL60 ve MV-4-11) medyan sağkalım süresinde doz bağımlı artış sağladığı görülmüştür (133).

Pan-aurora kinaz inhibitörlerinden AMG-900 p-glikoprotein üretimi yoluyla çoklu ilaç direnci oluşturan hücre dizilerinde ve ksenograft modellerde ilaç direncinin üstesinden gelme özelliğiyle öne çıkmaktadır (134).

Aurora Kinaz A İnhibitörleri

MLN8237 (Aisertib) faz 2 çalışmaları devam etmekte olan selektif Aurora kinaz A inhibitörü olup BCR-ABL'yi T315I mutant formları dahil olmak üzere in vitro ve in vivo koşullarda inhibe ettiği gösterilmiştir (135). Refrakter KML hastalarında umut verici bir tedavi alternatifi adaydır. MLN8237'nin multiple miyelomda etkinliği, çoklu immun yetmezlikli farelerde oluşturulan multiple miyelom ksenograft modelde tümör hacmini belirgin küçültmesi ve genel sağkalım oranlarını arttırması ile gösterilmiştir (136).

ENMD-2076 Aurora kinaz A yanı sıra FLT3, Sarcoma (Src), VEGFR2 ve FGFR1 gibi onkojenik kinazları inhibe eder (127). Multiple miyelomda etkinliği yüksek bir ajandır. Wang ve ark.'nın (137) çalışmasında, H929 insan plazmositom ksenograftının implante edildiği

farelerde ENMD-2076 oral yolla uygulandığında, doz artışı ile paralel olarak tümör büyümesinde belirgin inhibisyon gösterilmiştir.

MK-5108 (VX689) ilerlemiş solid tümörlü hastalarda faz 1 çalışmaları devam eden bir Aurora kinaz A inhibitörüdür (127).

Aurora Kinaz B İnhibitörleri

AZD1152 (Barasertib) ve BI 811283 solid tümörler ve hematolojik malignitelerde faz 2 çalışmaları devam eden selektif Aurora kinaz B inhibitörleridir (127).

GEREÇ VE YÖNTEM

Adnan Menderes Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylı (13/09/2012 tarih ve B.30.2.ADÜ.0.20.05.00/050.04-245 sayılı) ileriye dönük çalışmamıza Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'nda takip edilen Uluslar arası KLL Çalışma Grubu tanı kriterlerine (46) göre yeni KLL tanısı konulmuş ve hiç tedavi almamış 41 hasta ile immun trombositopenik purpura, megaloblastik anemi, demir eksikliği anemisi, otoimmün hemolitik anemi gibi benign hematolojik hastalığı olan 19 hasta kontrol grubu olarak alındı. Solid organ tümörü ya da KLL dışında hematolojik malignitesi olanlar çalışmaya alınmadı. KLL hastaları modifiye Rai ve Binet evreleme sistemleri ile evrelendirildi. Tüm hastalara kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi yapıldı.

Kantitatif RT-PCR ile Aurora Kinaz A mRNA Ekspresyonu

Kemik iliği hücrelerinde Aurora kinaz A ekspresyonu kantitatif RT-PCR yöntemiyle Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında araştırıldı. β -aktin ve gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) mRNA iç kontroller olarak kullanıldı. Total RNA kemik iliği hücrelerinden Trizol yöntemi (High Pure Isolation Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kullanılarak ekstrakte edildi. Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) ile cDNA hazırlandı. Aurora kinaz A cDNA'sı TaqMan Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ve Aurora-A TaqMan Gen Expression Assay ile kantifiye edildi. β -aktin; her biri 400nM forward (CCCTGGCACCCAGCAC) ve reverse (GCCGATCCACACGGAGTAC) primerler ile 100nM konsantrasyondaki prob (fam-ATCAAGATCATTGCT CCTCCTGAGCGC-bhq) kullanılan TaqMan Universal PCR Mastermix ile değerlendirildi. RT-PCR için LightCycler 480II (Roche Diagnostics) kullanıldı. Rölatif RNA düzeyleri standart delta/delta Ct (δ/δ Ct) metoduyla elde edildi. Bu metod ile AURKA geni Ct değerleri β -aktin ve GAPDH ile normalize edilerek δ Ct değerleri elde edildi. Gruplar arasında oranlanarak elde edilen δ/δ Ct değeri 2'den büyük ise o oranda AURKA pozitif ekspresyon artışı, -2'den küçük ise down regulasyon olarak değerlendirildi.

Kontrol grubundan bir hastanın Aurora kinaz A mRNA ekspresyon düzeyi teknik sorun nedeniyle çalışılmadı ve bu nedenle değerlendirmeye alınmadı.

İmmunhistokimyasal İnceleme

Kırk bir KLL ve 18 kontrol grubu hastasının formalin ile sabitlenmiş ve parafine gömülmüş kemik iliği biyopsi kesitleri Aurora kinaz A immünohistokimyasal analizi için

kullanıldı. Doku kesitleri Aurora-A antikoruyla (Novus Biologicals Inc. Littleton CO, USA 1:100 dilüsyonda) 60 dakika enkübe edildi. Hücrelerin çekirdek ve sitoplazmasında >%10 boyanma pozitif, %1-10 boyanma zayıf pozitif ve hiç boyanmama negatif olarak kabul edildi. Kesitleri değerlendiren patolog kesitlerin olgu ya da kontrol ait olduğu konusunda bilgilendirilmedi. Tüm çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında yapıldı.

Sitogenetik İnceleme

KLL hastalarında sitogenetik anomaliler kemik iliği aspirasyon örneğinde floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemiyle araştırıldı. Kırk bir KLL hastasının 32'sinde 13q14.3 delesyonu, 35'inde 17p13.1 delesyonu ve 31'inde trizomi 12 araştırıldı.

İstatistiksel Analiz

Tüm verilerin karşılaştırılması SPSS 15.0 Windows ortamında Mann-Whitney-U, Ki-Kare ve One-Way ANOVA testleri ile yapıldı ve $p < 0.05$ değerler anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

KLL tanısı yeni konulmuş ve hiç tedavi almamış 41 hasta (22 erkek ve 19 kadın, yaş ortalaması 70 ± 10) ile kontrol grubu olarak benign hematolojik hastalığı olan 18 hasta (7 erkek ve 11 kadın, yaş ortalaması 53 ± 20) çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grupları arasında yaş açısından anlamlı fark vardı ($p=0.004$). Tablo II’de hasta ve kontrol gruplarının demografik verileri verildi.

Tablo II: KLL hastaları ve kontrol gruplarının demografik verileri

	Cinsiyet		Sayı	Yaş ortalaması
	Erkek	Kadın		
KLL	22 (%54)	19 (%46)	41 (%100)	70 ± 10
Kontrol	7 (%39)	11 (%61)	18 (%100)	53 ± 20
Toplam	29 (%49)	30 (%51)	59 (%100)	64 ± 16

Çalışmaya alınan KLL hastalarının %68’i Binet A, %5’i Binet B, %27’si Binet C evresindeydi.

Kontrol grubunda değerlendirilen, solid organ tümörü ya da hematolojik malignitesi olmayan hastaların dağılımı tablo III’te verildi.

Tablo III: Kontrol grubunda yer alan hastaların dağılımı

	Kontrol Grubu Sayı (%)
Demir eksikliği anemisi	6 (%33)
Megaloblastik anemi	1 (%6)
Dimorfik anemi	3 (%17)
İmmun trombositopenik purpura	6 (%33)
Otoimmün hemolitik anemi	1 (%6)
Kist hidatik	1 (%6)
Toplam	18 (%100)

KLL hastalarında lökosit ve lenfosit sayıları kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek saptandı (her ikisi için $p<0.001$). Ancak hemoglobin, hematokrit düzeyleri, monosit ve trombosit sayıları açısından iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı (her biri

için $p>0.05$). KLL hastaları ve kontrol gruplarının hematolojik parametreleri Tablo IV'te verildi.

Tablo IV: KLL hastaları ve kontrol gruplarının hematolojik parametrelerinin karşılaştırılması

	KLL Hasta Grubu (n=41)	Kontrol Grubu (n=18)	P değeri
Hemoglobin (g/dL)	11.5 ± 2	10 ± 3	0.098
Hematokrit (%)	36 ± 7	31 ± 9	0.059
Lökosit sayısı (/µL)	45054 ± 33156	6897 ± 3437	< 0.001
Lenfosit sayısı (/µL)	34184 ± 25323	1601 ± 652	< 0.001
Monosit sayısı (/µL)	2028 ± 9955	498 ± 421	0.469
Trombosit sayısı (/µL)	199341 ± 86517	198056 ± 156828	0.581

Kırk bir KLL ve 18 kontrol grubu hastasının kemik iliği aspirasyon örneğinde Aurora kinaz A mRNA ekspresyon düzeyi RT-PCR yöntemiyle β -aktin ve GAPDH housekeeping genleri kullanılarak araştırıldı. KLL hastalarında Aurora kinaz A mRNA ekspresyon düzeyi ortalaması β -aktin kontrolüyle 3.84 (1.02-9.61 aralığında), GAPDH kontrolüyle 3.49 (1-9.81 aralığında) tespit edildi. Kontrol grubu hastalarında Aurora kinaz A mRNA ekspresyon düzeyi ortalaması β -aktin kontrolüyle 3.91 (1.09-9.88 aralığında), GAPDH kontrolüyle 3.49 (1.21-7.73 aralığında) tespit edildi. Her iki housekeeping gen ile KLL hastaları ve kontrol grubu arasında Aurora kinaz A mRNA ekspresyonu açısından anlamlı farklılık saptanmadı (sırasıyla $p=0.742$ ve $p=0.229$). KLL hastaları ve kontrol gruplarının Aurora kinaz A mRNA ekspresyonu değerleri Tablo V'te verildi.

Tablo V: KLL hastaları ve kontrol gruplarının Aurora kinaz A mRNA ekspresyonu değerleri

	AURKA mRNA (β-aktin)				AURKA mRNA (GAPDH)			
	Min.	Max.	Ort.	P	Min.	Max.	Ort.	P
KLL (n=41)	1.02	9.61	3.84±2.61	0.742	1	9.81	3.49±2.31	0.229
Kontrol (n=18)	1.09	9.88	3.91±2.71		1.21	7.73	4.29±2.42	

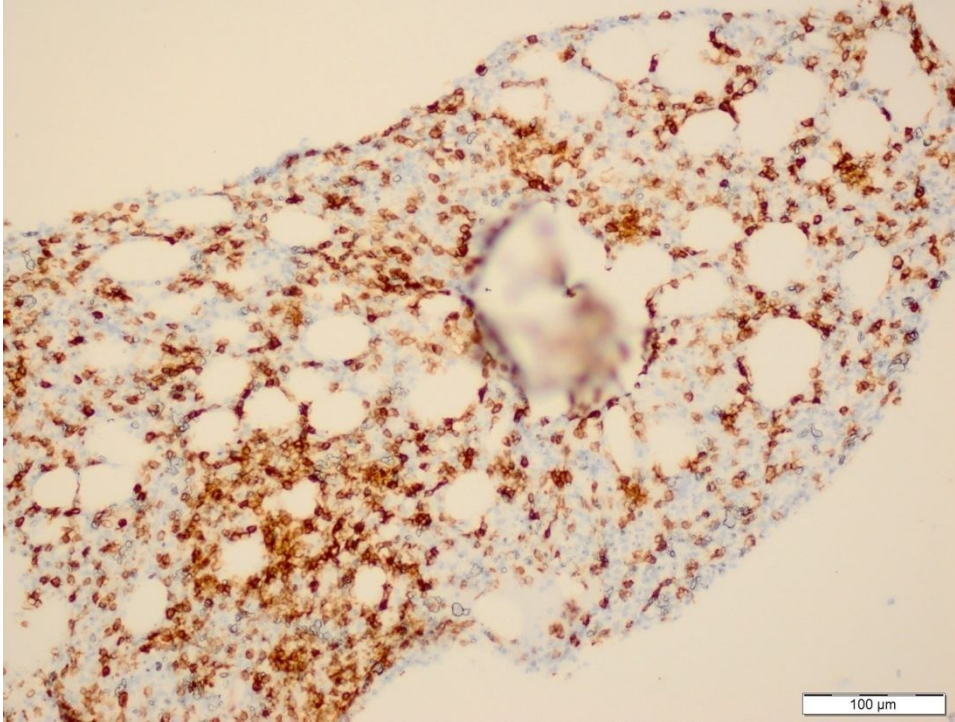
Tüm KLL hastaları ve tüm kontrol grubu hastalarının kemik iliği biyopsi kesitlerine Aurora-A antikoru uygulanarak immunhistokimyasal incelemesi yapıldı. Aurora kinaz A boyaması KLL hastalarının %61'inde pozitif, %39'unda ise negatif saptandı. Kontrol grubundaki hastaların %22'sinde (4 hasta) zayıf pozitif, %78'inde negatif saptandı. Kontrol

grubunda pozitif Aurora kinaz A boyanması yoktu. KLL hastalarında Aurora kinaz A immunhistokimyasal pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$). KLL hastaları ve kontrol gruplarının Aurora kinaz A immunhistokimyasal verileri Tablo VI'da verildi.

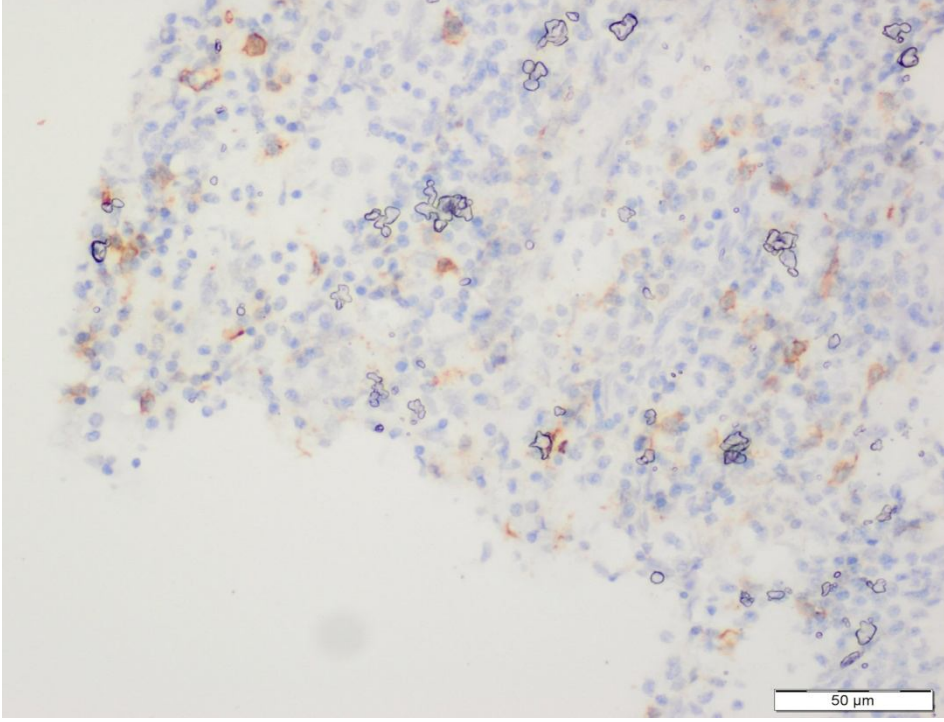
Tablo VI: KLL hastaları ve kontrol gruplarının Aurora kinaz A immunhistokimyasal verileri

	Aurora Kinaz A İmmunhistokimya			Toplam	P değeri
	Pozitif	Negatif	Zayıf pozitif		
KLL	25 (%61)	16 (%39)	-	41 (%100)	< 0.001
Kontrol	-	14 (%78)	4 (%22)	18 (%100)	
Toplam	25 (%42)	30 (%51)	4 (%7)	59 (%100)	

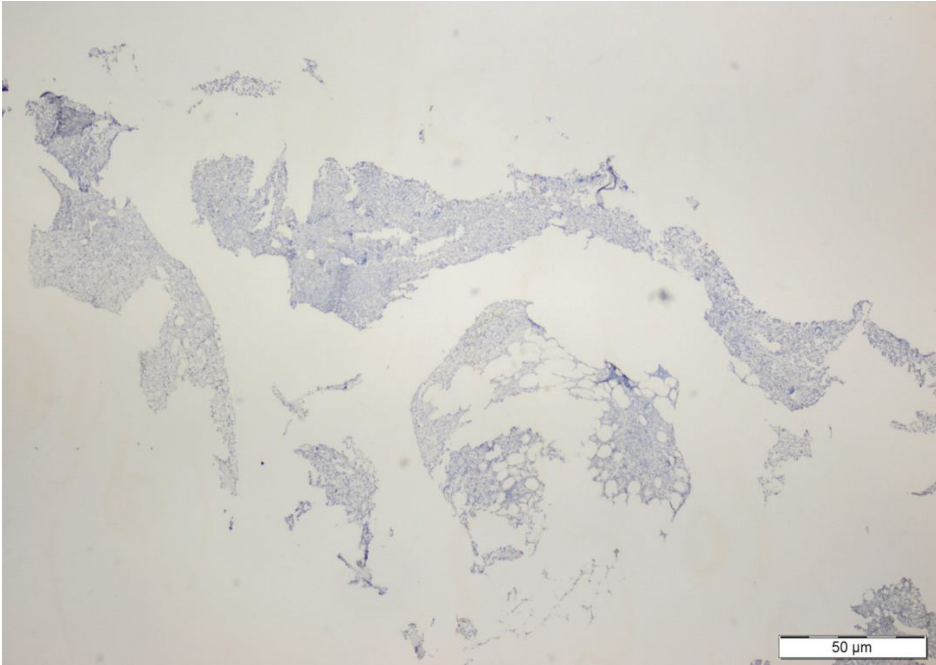
Aurora kinaz A boyanması pozitif olan hastaların tümünde kemik iliği hücrelerinde hem sitoplazmik hem nükleer boyanma paterni birlikte görüldü. Olgulara ait kemik iliği biyopsi kesitlerinin mikroskopik görüntülerinde negatif, zayıf pozitif ve pozitif Aurora kinaz A boyamaları Resim 1-3'te verildi.



Resim 1: Aurora-A antikorunun 1:100 dilüsyonda 60 dakika enkübasyonu ile elde edilen kemik iliği biyopsi kesiti örneğinde hücrelerin çekirdek ve sitoplazmasında $>10\%$ boyanma immunhistokimyasal pozitiflik olarak değerlendirildi.



Resim 2: Aurora-A antikorunun 1:100 dilüsyonda 60 dakika enkübasyonu ile elde edilen kemik iliği biyopsi kesiti örneğinde hücrelerin çekirdek ve sitoplazmasında %1-10 boyanma immunhistokimyasal zayıf pozitiflik olarak değerlendirildi.



Resim 3: Aurora-A antikorunun 1:100 dilüsyonda 60 dakika enkübasyonu ile elde edilen kemik iliği biyopsi kesiti örneğinde hücrelerin çekirdek ve sitoplazmasında hiç boyanma olmaması immunhistokimyasal negatiflik olarak değerlendirildi.

Binet evrelemesine göre hem Aurora kinaz A mRNA ekspresyonu hem de immunhistokimyasal boyanma açısından anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

Çalışmada yer alan 41 KLL hastasının 32'sinde 13q14.3 delesyonu FISH yöntemiyle araştırıldı ve %53'ünde (17 hasta) 13q delesyonu saptandı. 13q delesyonu pozitif olan hastaların %71'inde, 13q delesyonu negatif olan hastaların %53'ünde Aurora kinaz A pozitif boyandı. 13q delesyonu olan ve olmayan hastalar arasında Aurora kinaz A immunhistokimyasal boyanma açısından anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). 13q delesyonu statusu ile Aurora kinaz A immunhistokimyasal boyanma durumu Tablo VII'de karşılaştırıldı.

Tablo VII: 13q delesyon statusu ile Aurora kinaz A immunhistokimyasal boyanma verileri

	Aurora kinaz A İmmunhistokimya		Toplam	P değeri
	Pozitif	Negatif		
13q delesyonu pozitif	12 (%71)	5 (%29)	17 (%100)	0.314
13q delesyonu negatif	8 (%53)	7 (%47)	15 (%100)	
Toplam	20 (%62.5)	12 (%37.5)	32 (%100)	

Çalışmada yer alan 41 KLL hastasının 35'inde 17p13.1 delesyonu FISH yöntemiyle araştırıldı ve %10'unda (4 hastada) 17p delesyonu saptandı. Dört hastanın ikisinde (%50) Aurora kinaz A pozitif boyandı. 17p delesyonu negatif olan hastaların %64.5'inde Aurora kinaz A pozitif boyandı. 17p delesyonu olan ve olmayan hastalar arasında Aurora kinaz A immunhistokimyasal boyanma açısından anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). 17p delesyonu statusu ile Aurora kinaz A immunhistokimyasal boyanma durumu Tablo VIII'de karşılaştırıldı.

Tablo VIII: 17p delesyon statusu ile Aurora kinaz A immunhistokimyasal boyanma verileri

	Aurora kinaz A İmmunhistokimya		Toplam	P değeri
	Pozitif	Negatif		
17p delesyonu pozitif	2 (%50)	2 (%50)	4 (%100)	0.572
17p delesyonu negatif	20 (%64.5)	11 (%35.5)	31 (%100)	
Toplam	22 (%63)	13 (%37)	35 (%100)	

Çalışmada yer alan 41 KLL hastasının 31'inde trizomi 12 FISH yöntemiyle araştırıldı ve %10'unda (üç hastada) trizomi 12 saptandı. Üç hastanın birinde (%33) Aurora kinaz A pozitif boyandı. Trizomi 12 negatif olan hastaların %64'ünde Aurora kinaz A pozitif boyandı. Trizomi 12 pozitif ve negatif hastalar arasında Aurora kinaz A immunhistokimyasal boyanma

açısından anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). Trizomi 12 statusu ile Aurora kinaz A immunhistokimyasal boyanma durumu Tablo IX'da karşılaştırıldı.

Tablo IX: Trizomi 12 statusu ile Aurora kinaz A immunhistokimyasal boyanma verileri

	Aurora kinaz A İmmunhistokimya		Toplam	P değeri
	Pozitif	Negatif		
Trizomi 12 pozitif	1 (%33)	2 (%67)	3 (%100)	0.296
Trizomi 12 negatif	18 (%64)	10 (%36)	28 (%100)	
Toplam	19 (%61)	12 (%39)	31 (%100)	

TARTIŞMA

Bu çalışmada yeni tanı konulmuş ve tedavi almamış KLL hastalarında RT-PCR yöntemiyle Aurora kinaz A mRNA ekspresyonunda bir artış yok iken immunhistokimyasal yöntemle Aurora kinaz A ile boyanma artışı belirgin idi.

Kronik lenfositik lösemide Aurora kinazlar ile ilgili literatürde sadece iki çalışma yer almaktadır. Bunlardan biri Aurora kinaz inhibitörü ile ilgili deneysel çalışma olup diğeri çalışmamıza benzer niteliktedir. Inamdar ve ark.'nın (138) 47 KLL ve 20 hematolojik açıdan sağlıklı kontrol grubundan oluşan çalışmasında Aurora kinaz A ekspresyonu, Western Blot yöntemiyle 47 hastanın 42'sinde (%89.4) kontrol grubuna göre artmış bulunmuştur ($p<0.001$). İmmunhistokimyasal incelemeyle tüm KLL hastalarının kemik iliği aspirasyon/biyopsi örneklerinde Aurora kinaz A ile boyanma gösterilmiştir. Aurora kinaz A'nın hücre içi dağılımını sergilemek amacıyla 15 KLL hastasının kemik iliği aspirasyon/biyopsi örneğinde Aurora kinaz A antikoruna ile yapılan immünhistokimyasal incelemede, Aurora kinaz A hücrelerin sitoplazma ve nükleuslarında boyanmıştır. Aynı çalışmada kantitatif RT-PCR ile Aurora kinaz A mRNA toplam dört KLL hastasında incelenmiş ve yalnızca bir hastada düzeyinde artış gözlenmiştir. Diğer üç KLL hastasında ise kontrol grubundan daha düşük Aurora kinaz A mRNA düzeyi saptanmıştır. KLL'de sık görülen kromozomal anormallikler ile Aurora kinaz A ekspresyonu arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla konvensiyonel sitogenetik ve/veya FISH çalışılmış ve Western Blot yöntemiyle artmış Aurora kinaz A düzeyi olan 42 hastanın 28'inde (%67) en az bir kromozomal anormallik saptanmıştır. Trizomi 12 %21, ATM gen delesyonu (del11q23) %21 oranında tespit edilmiştir.

Bu çalışmada az sayıda hastada Aurora kinaz mRNA düzeyi araştırılmıştır. Çalışmamızda tüm KLL hastalarında ve tüm kontrol grubu hastalarında Aurora kinaz A mRNA düzeyi araştırılmıştır. Yine yalnızca Aurora kinaz düzeyi yüksek olan hastalarda kromozomal anormalliklerin birlikteliğinin araştırılması bu kromozomal anormalliklerle Aurora kinaz A arasındaki ilişkiyi ortaya koyacak istatistiksel verinin oluşmasını engellemiştir. Bizim çalışmamızda KLL hastalarında 13q delesyonu, 17p delesyonu ve trizomi 12 kromozomal anormallikleri ile Aurora kinaz A mRNA ekspresyonu ve immunhistokimyasal boyanma arasında bir farklılık bulunmadı.

Ikezoe ve ark.'nın (117) çalışmasında 44 AML hastasının kemik iliği hücreleri, sağlıklı gönüllerin kemik iliği (n=11) ve periferik kan (n=12) mononükleer hücreleriyle

karşılaştırılmış ve lösemik hücrelerde Aurora kinaz A mRNA artmış ekspresyonu gösterilmiştir (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.0001$).

Ye ve ark.'nın (118) 9 AML, 20 MDS ve 5 kontrolden oluşan çalışmasında MDS ve AML hastalarının kemik iliği CD34+ hücrelerinde Aurora kinaz A mRNA ekspresyon düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı artış saptanmıştır (her ikisi için $p=0.01$). Ancak Aurora kinaz A mRNA düzeyiyle blast yüzdesi, sitogenetik anormallikler ve MDS hastalarındaki International prognostic scoring system (IPSS) skorları arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Yang ve ark.'nın (139) çalışmasında CD34+/CD38- AML hücrelerinde Aurora kinaz A mRNA ekspresyonu CD34+/CD38+ AML hücrelerine ve sağlıklı kontrol grubunun CD34+ hematopoetik kök hücrelerine göre belirgin arttığı saptanmıştır. Aynı çalışmada CD34+/CD38- AML hücrelerine sahip farelerde Aurora kinaz A inhibisyonu ile sağkalım sürelerinin uzaması Aurora kinaz A'nın kemoterapiye dirençli CD34+/CD38- AML hasta grubunun tedavisinde umut veren hedef molekül olabileceğini göstermiştir.

ALL ve KML hastalarında Aurora kinaz artmış ekspresyonuyla ilgili daha az olgu serisi bulunmaktadır. Philadelphia (Ph) pozitif ALL ve KML hastalarında tirozin kinaz inhibitörlerine karşı T315I mutasyonuna bağlı direnç gelişmesi durumunda Aurora kinaz inhibitörleriyle olumlu klinik yanıtlar alınması nedeniyle çalışmalar bu yönde devam etmektedir (119,120).

Farklı B hücreli non-Hodgkin lenfoma (NHL) hastalarından elde edilen hücre serilerinde Aurora kinaz A ekspresyonu diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL) ve Burkitt lenfoma gibi agresif NHL tiplerde artmıştır (122). International Prognostic Index (IPI) değeri yüksek olan DBBHL hastalarında Aurora kinaz A ekspresyonunun daha fazla olması NHL hastalarında hastalık aktivitesi ile Aurora kinaz A ekspresyonunun bağlantılı olduğunu gösterebilmektedir (67).

Camacho ve ark.'nın (124) 26 mantle hücreli lenfoma hastasının yer aldığı çalışmasında Aurora kinaz A mRNA ekspresyonunu en yüksek oranda blastoid varyantta saptanmış olup Ki67 ekspresyonuyla da güçlü bir korelasyon ($p<0.005$) göstermiştir.

Qi ve ark.'nın (125) çalışmasında, 20 mantle hücreli lenfoma hastasının doku örneklerinde Aurora kinaz A için %88 oranında ++/+++ boyanma paterni görülmüştür ve pozitif boyanmanın düşük sağkalım süreleriyle korelasyon gösterdiğini saptamıştır.

Hodgkin lenfoma ile ilgili daha az çalışma bulunmaktadır. Mori ve ark.'nın (126) selektif Aurora kinaz B inhibitörü olan AZD1152'nin Burkitt lenfoma ve Hodgkin lenfomalarda etkinliğinin araştırıldığı çalışmasında, immunhistokimyasal incelemeyle lenf nodlarında Aurora kinaz A ve B'nin artmış ekspresyonu gösterilmiştir. Aynı çalışmada Aurora kinaz A ve B mRNA ekspresyon düzeylerinin Burkitt lenfoma ve Hodgkin lenfoma hücre serilerinde belirgin arttığı RT-PCR yöntemiyle gösterilmiş ve artmış protein düzeyleri Western Blot analiziyle doğrulanmıştır.

513 multiple miyelom hastasından oluşan iki bağımsız kohortta, Aurora kinaz ekspresyonu ile daha düşük hastalısız ve genel sağkalım süreleri ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle multiple miyelomda Aurora kinaz A ekspresyonu olumsuz prognostik faktör olarak kabul edilmektedir (121).

Çalışmamızda her ne kadar KLL hastalarında Aurora kinaz A mRNA ekspresyonu kontrol grubu hastalarına göre yüksek bulunmaz iken kemik iliği biyopsi kesitlerine Aurora-A antikoru uygulanarak immunhistokimyasal incelemesinde Aurora kinaz A boyaması KLL hastalarının %61'inde pozitif, %39'unda ise negatif idi. Kontrol grubundaki hastaların %22'sinde (4 hasta) zayıf pozitif, %78'inde negatif saptandı. Kontrol grubunda pozitif Aurora kinaz A boyanması yoktu. KLL hastalarında Aurora kinaz A immunhistokimyasal pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı farklıydı. Aurora kinaz A pozitif boyanan tüm hastaların kemik iliği hücrelerinde sitoplazma ve nükleuslarında birlikte boyanma görüldü. Aurora kinaz A boyanması zayıf pozitif olan kontrol grubundaki 4 hastanın 2'si dimorfik anemi, 1'i megaloblastik anemi ve 1'i kist hidatik hastasıydı. Zayıf pozitiflik B₁₂ vitamin eksikliğine bağlı kemik iliğinde eritroid öncü hücrelerin artışı, nükleer-sitoplazmik asenkronizasyon ve buna bağlı inefektif eritropoez ile; kist hidatik hastasında ise eozinofili ile ilişkilendirildi. KLL hastalarında Binet evresine göre hem Aurora kinaz A mRNA ekspresyonu hem de immunhistokimyasal boyanma açısından anlamlı fark yoktu.

17p delesyonu olan KLL hastaları daha ileri evre hastalığa, daha yüksek lösemik hücre proliferasyon oranına, daha kısa sağkalım sürelerine ve birinci sıra tedaviye büyük oranda dirence sahiptirler (31,32).

Ancak çalışmamızda ne 13q ve 17p delesyonu ne de trizomi 12 sitogenetik anomalisi olan hastalardaki Aurora kinaz A mRNA ekspresyonu ve immunhistokimyasal boyanma bakımından bir farklılık yoktu. Bu biyokimyasal boyanma protein sentezinin arttığını göstermektedir. Bu durum gen amplifikasyonu mekanizmasıyla açıklanabilir.

Aurora kinazların aşırı ekspresyonunun birçok kanserle kötü prognoz ilişkisi ortaya konmasıyla kanser tedavisinde hedef molekül olmalarını sağlamıştır. Pan-aurora kinaz inhibitörü olan VX-680'in KLL hücre kültürüne inkübasyonu kinaz aktivitesinin baskılanarak hücre döngüsünün G₂/M fazında bloke olduğu ve apoptozisin uyarıldığı in vitro koşullarda gösterilmiştir (140). Aynı çalışmada VX-680'in KLL'ye karşı etkinliği Eμ-TCL1 transgenik fare modelinde araştırılmış ve hayvanlarda sağkalıma olumlu katkısı gözlenmiştir. VX-680 ALL ve KML hastalarında BCR-ABL kinazın T315I mutant formuna karşı etkinliğiyle öne çıkmış ancak kardiyak toksisite nedeniyle çalışmalarına ara verilmiştir (127). Günümüzde Aurora kinaz inhibitörleriyle kanser tedavisi ile ilgili umut vaat eden klinik çalışmalar devam etmektedir.

SONUÇ

Yeni tanı konulmuş ve tedavi görmemiş KLL hastalarıyla yapılan literatürdeki en geniş hasta serisine sahip çalışmamızda Aurora kinaz A mRNA ekspresyonunda bir artış saptanmadı. Ancak immunhistokimyasal boyanma açısından anlamlı farklılık Aurora kinaz A'nın KLL'de potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir.

ÖZET

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİDE AURORA-A KİNAZ EKSPRESYONU

Amaç ve Hipotez: Aurora kinazlar sentrozom olgunlaşması ve ayrılması, mitotik iğ ipliklerinin oluşumu, iğ düzeneği kontrol noktasının denetlenmesi, kromozom ayrılması, sitoplazma bölünmesi gibi mitotik olayların düzenlenmesinde önemli serin/threonin kinazlardır. Aurora kinaz A aşırı ekspresyonu pek çok solid organ tümörü ve hematolojik malignitede daha yüksek tümör derecesi, daha fazla proliferasyon hızı ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmanın amacı kronik lenfositik lösemide Aurora kinaz A ekspresyonunun belirlenmesidir.

Yöntem: Adnan Menderes Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylı ileriye dönük çalışmamıza yeni KLL tanısı konulmuş ve hiç tedavi almamış 41 hasta (22 erkek ve 19 kadın, yaş ortalaması 70±10) ile benign hematolojik hastalığı olan 18 hasta (7 erkek ve 11 kadın, yaş ortalaması 53±20) kontrol grubu olarak alındı. Tüm hastalara kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi yapıldı. Kontrol grubundan bir hastanın Aurora kinaz A mRNA ekspresyon düzeyi teknik sorun nedeniyle analiz edilemedi ve çalışmadan çıkarıldı. Kemik iliği hücrelerinde Aurora kinaz A ekspresyonu kantitatif reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle β -aktin ve GAPDH housekeeping genleri kullanılarak araştırıldı. Rölatif RNA düzeyleri standart delta/delta Ct (δ/δ Ct) metoduyla elde edildi. Tüm KLL hastaları ve tüm kontrol grubu hastalarının kemik iliği biyopsi kesitlerine Aurora-A antikoruna uygulanarak immunhistokimyasal incelemesi yapıldı. KLL hastalarında 13q delesyonu, 17p delesyonu ve trizomi 12 kromozomal anormallikleri kemik iliği aspirasyon örneğinde FISH yöntemiyle araştırıldı. Tüm verilerin karşılaştırılması SPSS 15.0 Windows ortamında Mann-Whitney-U, Ki-Kare ve One-Way ANOVA testleri ile yapıldı ve $p<0.05$ değerler anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Aurora kinaz A mRNA ekspresyonu açısından KLL hastaları ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). KLL hastalarında Aurora kinaz A immunhistokimyasal pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$). Aurora kinaz A pozitif boyanan tüm hastaların kemik iliği hücrelerinde sitoplazma ve nükleuslarında birlikte boyanma görüldü. 13q delesyonu, 17p delesyonu ya da trizomi 12 kromozomal anormallikleri olan KLL hastalarında Aurora kinaz A immunhistokimyasal boyanma bakımından bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$).

Sonuç: Tedavi görmemiş KLL hastalarıyla yapılan literatürdeki en geniş hasta serisine sahip çalışmamızda Aurora kinaz A mRNA ekspresyonunda bir artış saptanmadı. Ancak immunhistokimyasal boyanma açısından anlamlı farklılık Aurora kinaz A'nın KLL'de potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Aurora kinaz A, kronik lenfositik lösemi

SUMMARY

AURORA-A KINASE EXPRESSION IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Aim and Hypothesis: Aurora kinases are serine/threonine kinases that are essential for regulating mitotic events such as centrosome maturation and segregation, mitotic spindle formation, control of spindle assembly checkpoint, chromosome segregation and cytokinesis. Aurora kinase A overexpression was associated with higher tumor grade, proliferation rate and poor prognosis in many solid organ tumors and haematological malignancies. The aim of this study is to determine the Aurora kinase A expression in patients with chronic lymphocytic leukemia.

Method: Our prospective study was approved by the Ethics Committee of Adnan Menderes University. Newly diagnosed, untreated 41 CLL patients (22 males and 19 females with mean age of 70 ± 10) and control group of 19 patients (7 males and 11 females with mean age of 53 ± 20) with benign haematological diseases were included in this study. Bone marrow aspiration and biopsy was performed in all patients. Aurora kinase A mRNA expression could not be analyzed due to technical problem in only one patient of control group and this patient was excluded. Aurora kinase A expression was investigated using β -actin ve GAPDH housekeeping genes by quantitative RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) method in bone marrow cells. Relative RNA level was performed via standard delta/delta Ct (δ/δ Ct). Aurora-A antibody was applied to all bone marrow biopsy sections of patients with CLL and control group for immunohistochemical analysis. 13q deletion, 17p deletion and trisomy 12 chromosomal abnormalities were investigated by FISH method in bone marrow aspirates of CLL patients. Statistical analysis of the differences between groups was assessed by Mann-Whitney-U, Chi-square and One-Way ANOVA tests in SPSS 15.0 Windows. A p-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results: There was no significant difference for Aurora kinase A mRNA expression between CLL patients and control group ($p>0.05$). Aurora kinase A immunohistochemical positivity in patients with CLL was statistically significant ($p<0.001$). Cytoplasmic and nuclear staining pattern was both seen in all Aurora kinase A positively stained CLL patients. There was no significant difference for immunohistochemical staining in CLL patients with chromosomal abnormalities 13q deletion, 17p deletion or trisomy 12 ($p>0.05$).

Conclusion: Aurora kinase A mRNA overexpression was not detected in our study which has largest series of untreated patients with CLL. However, significant immunohistochemical staining represent that Aurora kinaz A might be a potential therapeutic target in CLL.

Key Words: Aurora kinase A, chronic lymphocytic leukemia

KAYNAKLAR

1. Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia and related diseases. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT (eds). Williams Textbook of Hematology, 8th ed. McGraw-Hill, 2010: 1431-81.
2. Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2004; 13: 279-87.
3. Molica S. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 1477-80.
4. Waterhouse D, Carman WJ, Schottenfeld D, Gridley G, McLean S. Cancer incidence in the rural community of Tecumseh, Michigan: a pattern of increased lymphopietic neoplasms. *Cancer* 1996; 77: 763-70.
5. Feychting M, Forssén U, Floderus B. Occupational and residential magnetic field exposure and leukemia and central nervous system tumors. *Epidemiology* 1997; 8: 384-9.
6. Hamblin TJ. Have we been wrong about ionizing radiation and chronic lymphocytic leukemia? *Leuk Res* 2008; 32: 523-5.
7. Bianco E, Marcucci F, Mele A, Musto P, Cotichini R, Sanpaolo MG, Iannitto E, De Renzo A, Martino B, Specchia G, Montanaro M, Barbui AM, Nieddu R, Pagano L, Rapicetta M, Franceschi S, Mandelli F, Pulsoni A. Prevalence of hepatitis C virus infection in lymphoproliferative diseases other than B-cell non-Hodgkin's lymphoma, and in myeloproliferative diseases: an Italian Multi-Center case-control study. *Haematologica* 2004; 89: 70-6.
8. Cuttner J. Increased incidence of hematologic malignancies in first-degree relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Invest* 1992; 10: 103-9.
9. Sellick GS, Goldin LR, Wild RW, Slager SL, Ressenti L, Strom SS, Dyer MJ, Mauro FR, Marti GE, Fuller S, Lyttelton M, Kipps TJ, Keating MJ, Call TG, Catovsky D, Caporaso N, Houlston RS. A high-density SNP genome-wide linkage search of 206 families identifies susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 110: 3326-33.
10. Shen A, Humphries C, Tucker P, Blattner F. Human heavy-chain variable region gene family nonrandomly rearranged in familial chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 8563-7.

11. Pérez-Chacón G, Contreras-Martín B, Cuní S, Rosado S, Martín-Donaire T, Losada-Fernández I, Vargas JA, Jordá J, Alvarez N, García-Marco J, Pérez-Aciego P. Polymorphism in the CD5 gene promoter in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 646-50.
12. Aydin S, Rossi D, Bergui L, D'Arena G, Ferrero E, Bonello L, Omedé P, Novero D, Morabito F, Carbone A, Gaidano G, Malavasi F, Deaglio S. CD38 gene polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: a role in transformation to Richter syndrome? *Blood* 2008; 111: 5646-53.
13. Jevtovic-Stoimenov T, Kocic G, Pavlovic D, Macukanovic-Golubovic L, Marjanovic G, Djordjevic V, Tosić N, Pavlović S. Polymorphisms of tumor-necrosis factor-alpha - 308 and lymphotoxin-alpha + 250: possible modulation of susceptibility to apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma mononuclear cells. *Leuk Lymphoma* 2008; 49: 2163-9.
14. Di Bernardo MC, Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Webb E, Sellick G, Wild R, Sullivan K, Vijayakrishnan J, Wang Y, Pittman AM, Sunter NJ, Hall AG, Dyer MJ, Matutes E, Dearden C, Mainou-Fowler T, Jackson GH, Summerfield G, Harris RJ, Pettitt AR, Hillmen P, Allsup DJ, Bailey JR, Pratt G, Pepper C, Fegan C, Allan JM, Catovsky D, Houlston RS. A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2008; 40: 1204-10.
15. Enjuanes A, Benavente Y, Bosch F, Martín-Guerrero I, Colomer D, Pérez-Alvarez S, Reina O, Ardanaz MT, Jares P, García-Orad A, Pujana MA, Montserrat E, de Sanjosé S, Campo E. Genetic variants in apoptosis and immunoregulation-related genes are associated with risk of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 2008; 68: 10178-86.
16. Almasri NM, Duque RE, Iturraspe J, Everett E, Braylan RC. Reduced expression of CD20 antigen as a characteristic marker for chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 1992; 40: 259-63.
17. Ranheim EA, Cantwell MJ, Kipps TJ. Expression of CD27 and its ligand, CD70, on chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 1995; 85: 3556-65.
18. Klein U, Dalla-Favera R. New insights into the phenotype and cell derivation of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 294: 31-49.
19. Caligaris-Cappio F. B-chronic lymphocytic leukemia: a malignancy of anti-self B cells. *Blood* 1996; 87: 2615-20.

20. Bullrich F, Fujii H, Calin G, Mabuchi H, Negrini M, Pekarsky Y, Rassenti L, Alder H, Reed JC, Keating MJ, Kipps TJ, Croce CM. Characterization of the 13q14 tumor suppressor locus in CLL: identification of ALT1, an alternative splice variant of the LEU2 gene. *Cancer Res* 2001; 61: 6640-8.
21. Mabuchi H, Fujii H, Calin G, Alder H, Negrini M, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Croce CM. Cloning and characterization of CLLD6, CLLD7, and CLLD8, novel candidate genes for leukemogenesis at chromosome 13q14, a region commonly deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 2001; 61: 2870-7.
22. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15524-9.
23. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 13944-9.
24. Quijano S, López A, Rasillo A, Barrena S, Luz Sánchez M, Flores J, Fernández C, Sayagués JM, Osuna CS, Fernández N, González M, Giraldo P, Giralt M, Pérez MC, Martin-Antoran JM, Gutiérrez O, Perdiguer L, Díaz Mediavilla J, González Silva M, Asensio Del Rio A, Cerveró C, Guerra JL, Butrón R, García Mdel C, Almeida J, Orfao A. Association between the proliferative rate of neoplastic B cells, their maturation stage, and underlying cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphoproliferative disorders: analysis of a series of 432 patients. *Blood* 2008; 111: 5130-41.
25. Brynes RK, McCourty A, Sun NC, Koo CH. Trisomy 12 in Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 1995; 104: 199-203.
26. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997; 89: 2516-22.
27. Joshi AD, Dickinson JD, Hegde GV, Sanger WG, Armitage JO, Bierman PJ, Bociek RG, Devetten MP, Vose JM, Joshi SS. Bulky lymphadenopathy with poor clinical outcome is

associated with ATM downregulation in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients irrespective of 11q23 deletion. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 172: 120-6.

28. Sembries S, Pahl H, Stilgenbauer S, Döhner H, Schriever F. Reduced expression of adhesion molecules and cell signaling receptors by chronic lymphocytic leukemia cells with 11q deletion. *Blood* 1999; 93: 624-31.

29. Eclache V, Caulet-Maugendre S, Poirel HA, Djemai M, Robert J, Lejeune F, Raphaël M. Cryptic deletion involving the ATM locus at 11q22.3 approximately q23.1 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and related disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 152: 72-6.

30. Bullrich F, Rasio D, Kitada S, Starostik P, Kipps T, Keating M, Albitar M, Reed JC, Croce CM. ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 1999; 59: 24-7.

31. el Rouby S, Thomas A, Costin D, Rosenberg CR, Potmesil M, Silber R, Newcomb EW. p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood* 1993; 82: 3452-9.

32. Cordone I, Masi S, Mauro FR, Soddu S, Morsilli O, Valentini T, Vegna ML, Guglielmi C, Mancini F, Giuliacci S, Sacchi A, Mandelli F, Foa R. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood* 1998; 91: 4342-9.

33. Beà S, López-Guillermo A, Ribas M, Puig X, Pinyol M, Carrió A, Zamora L, Soler F, Bosch F, Stilgenbauer S, Colomer D, Miró R, Montserrat E, Campo E. Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). *Am J Pathol* 2002; 161: 957-68.

34. Kern W, Haferlach T, Schnittger S, Schoch C. Detection of t(14;18)(q32;q21) in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 410-1.

35. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, Murphy EJ, Koduru P, Ferrarini M, Zupo S, Cutrona G, Damle RN, Wasil T, Rai KR, Hellerstein MK, Chiorazzi N. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 2005; 115: 755-64.

36. Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, Wang HG, Zhang X, Bullrich F, Croce CM, Rai K, Hines J, Reed JC. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood* 1998; 91: 3379-89.

37. Gottardi D, Alfarano A, De Leo AM, Stacchini A, Aragno M, Rigo A, Veneri D, Zanotti R, Pizzolo G, Caligaris-Cappio F. In leukaemic CD5+ B cells the expression of BCL-2 gene family is shifted toward protection from apoptosis. *Br J Haematol* 1996; 94: 612-8.
38. Pepper C, Bentley P, Hoy T. Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1996; 95: 513-7.
39. Kipps TJ, Carson DA. Autoantibodies in chronic lymphocytic leukemia and related systemic autoimmune diseases. *Blood* 1993; 81: 2475-87.
40. Amir R, Dowdy YG, Goldberg AN. Chronic rhinitis: a manifestation of chronic lymphocytic leukemia. *Am J Otolaryngol* 1999; 20: 328-31.
41. Giannini O, Schönenberger-Berzins R. Fulminant cardiac tamponade in chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol* 1997; 8: 1168-9.
42. Sivakumaran M, Qureshi H, Chapman CS. Chylous effusions in CLL. *Leuk Lymphoma* 1995; 18: 365-6.
43. Zeidman A, Yarmolovsky A, Djaldetti M, Mittelman M. Hemorrhagic pleural effusion as a complication of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologia (Budap)* 1995; 26: 173-5.
44. Elliott MA, Letendre L, Li CY, Hoyer JD, Hammack JE. Chronic lymphocytic leukaemia with symptomatic diffuse central nervous system infiltration responding to therapy with systemic fludarabine. *Br J Haematol* 1999; 104: 689-94.
45. Oscier D, Dearden C, Eren E, Fegan C, Follows G, Hillmen P, Illidge T, Matutes E, Milligan DW, Pettitt A, Schuh A, Wimperis J; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis, investigation and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2012; 159: 541-64.
46. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ; International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111: 5446-56.
47. Pangalis GA, Roussou PA, Kittas C, Kokkinou S, Fessas P. B-chronic lymphocytic leukemia. Prognostic implication of bone marrow histology in 120 patients experience from a single hematology unit. *Cancer* 1987; 59: 767-71.

48. Johnston JB, Seftel M, Gibson SB. Chronic lymphocytic leukemia. In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber DA, Means RT Jr (eds). *Wintrobe's Clinical Hematology*, 12th ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2009: 2214-45.
49. Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1987; 60: 2712-6.
50. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1848-54.
51. Lin KI, Tam CS, Keating MJ, Wierda WG, O'Brien S, Lerner S, Coombes KR, Schlette E, Ferrajoli A, Barron LL, Kipps TJ, Rassenti L, Faderl S, Kantarjian H, Abruzzo LV. Relevance of the immunoglobulin VH somatic mutation status in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab (FCR) or related chemoimmunotherapy regimens. *Blood* 2009; 113: 3168-71.
52. Tobin G, Söderberg O, Thunberg U, Rosenquist R. V(H)3-21 gene usage in chronic lymphocytic leukemia--characterization of a new subgroup with distinct molecular features and poor survival. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 221-8.
53. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrikson SE, Zhao H, Ibbotson RE, Orchard JA, Davis Z, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Arthur DC, Marti GE, Wilson WH, Hamblin TJ, Oscier DG, Staudt LM. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003; 101: 4944-51.
54. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marcé S, López-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348: 1764-75.
55. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351: 893-901.
56. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, Wierda WG, Grever MR, Byrd JC, Kay NE, Brown JR, Gribben JG, Neuberg DS, He F, Greaves AW, Rai KR, Kipps TJ. Relative value of ZAP-

- 70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 112: 1923-30.
- 57.** Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002; 99: 1023-9.
- 58.** Patten PE, Buggins AG, Richards J, Wotherspoon A, Salisbury J, Mufti GJ, Hamblin TJ, Devereux S. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood* 2008; 111: 5173-81.
- 59.** Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1910-6.
- 60.** Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, Do KA, Cortes J, Thomas D, Garcia-Manero G, Koller C, Beran M, Giles F, Ravandi F, Lerner S, Kantarjian H, Keating M. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 4679-85.
- 61.** Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, Ostwald M, Busch R, Kuhn-Hallek I, Thiel E, Emmerich B. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 9: 1732-7.
- 62.** Itälä M, Pelliniemi TT, Remes K. GM-CSF raises serum levels of beta 2-microglobulin and thymidine kinase in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1996; 94: 129-32.
- 63.** Robertson LE, Pugh W, O'Brien S, Kantarjian H, Hirsch-Ginsberg C, Cork A, McLaughlin P, Cabanillas F, Keating MJ. Richter's syndrome: a report on 39 patients. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1985-9.
- 64.** Hochegger H, Hégarat N, Pereira-Leal JB. Aurora at the pole and equator: overlapping functions of aurora kinases in the mitotic spindle. *Open Biol* 2013; 3:120185.
- 65.** Dephoure N, Zhou C, Villén J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, Gygi SP. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 10762-7.
- 66.** Vader G, Lens SM. The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1786: 60-72.

67. Farag SS. The potential role of aurora kinase inhibitors in haematological malignancies. *Br J Haematol* 2011; 155: 561-79.
68. Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA, Parry H. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 1995; 81: 95-105.
69. Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 21-32.
70. Carmena M, Earnshaw WC. The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 842-54.
71. Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 1998; 17: 3052-65.
72. Giet R, Prigent C. Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J Cell Sci* 1999; 112: 3591-601.
73. Kimmins S, Crosio C, Kotaja N, Hirayama J, Monaco L, Höög C, van Duin M, Gossen JA, Sassone-Corsi P. Differential functions of the Aurora-B and Aurora-C kinases in mammalian spermatogenesis. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 726-39.
74. Satinover DL, Leach CA, Stukenberg PT, Brautigan DL. Activation of Aurora-A kinase by protein phosphatase inhibitor-2, a bifunctional signaling protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8625-30.
75. Macůrek L, Lindqvist A, Lim D, Lampson MA, Klompaker R, Freire R, Clouin C, Taylor SS, Yaffe MB, Medema RH. Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* 2008; 455: 119-23.
76. Seki A, Coppinger JA, Jang CY, Yates JR, Fang G. Bora and the kinase Aurora cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* 2008; 320: 1655-8.
77. Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Nitta M, Hatakeyama K, Saya H. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 2003; 114: 585-98.
78. Eysers PA, Erikson E, Chen LG, Maller JL. A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Curr Biol* 2003; 13: 691-7.
79. Kufer TA, Silljé HH, Körner R, Gruss OJ, Meraldi P, Nigg EA. Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J Cell Biol* 2002; 158: 617-23.

- 80.** Lindqvist A, Rodríguez-Bravo V, Medema RH. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol* 2009; 185: 193-202.
- 81.** Lammer C, Wagerer S, Saffrich R, Mertens D, Ansorge W, Hoffmann I. The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J Cell Sci* 1998; 111: 2445-53.
- 82.** Dutertre S, Cazales M, Quaranta M, Froment C, Trabut V, Dozier C, Mirey G, Bouché JP, Theis-Febvre N, Schmitt E, Monsarrat B, Prigent C, Ducommun B. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci* 2004; 117: 2523-31.
- 83.** 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: 661-87.
- 84.** Barr AR, Gergely F. Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J Cell Sci* 2007; 120: 2987-96.
- 85.** Marumoto T, Honda S, Hara T, Nitta M, Hirota T, Kohmura E, Saya HJ. Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *Biol Chem* 2003; 278:51786-95.
- 86.** Honda K, Mihara H, Kato Y, Yamaguchi A, Tanaka H, Yasuda H, Furukawa K, Urano T. Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* 2000; 19: 2812-9.
- 87.** Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan ZM, Bondaruk J, Suzuki F, Fujii S, Arlinghaus RB, Czerniak BA, Sen S. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet* 2004; 36: 55-62.
- 88.** Sun C, Chan F, Briassouli P, Linardopoulos S. Aurora kinase inhibition downregulates NF-kappaB and sensitises tumour cells to chemotherapeutic agents. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 220-5.
- 89.** 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: 1407-20.
- 90.** Carmena M, Ruchaud S, Earnshaw WC. Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21: 796-805.

91. 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: 1350-3.
92. Katayama H, Sasai K, Kloc M, Brinkley BR, Sen S. Aurora kinase-A regulates kinetochore/chromatin associated microtubule assembly in human cells. *Cell Cycle* 2008; 7: 2691-704.
93. Douglas ME, Davies T, Joseph N, Mishima M. Aurora B and 14-3-3 coordinately regulate clustering of centralspindlin during cytokinesis. *Curr Biol* 2010; 20: 927-33.
94. Zou L, Sun Y, Wang M, Zhan Q. Aurora-A interacts with AP-2 α and down regulates its transcription activity. *PLoS One* 2011; 6: 23110.
95. Briassouli P, Chan F, Savage K, Reis-Filho JS, Linardopoulos S. Aurora-A regulation of nuclear factor-kappa B signaling by phosphorylation of IkappaB α . *Cancer Res* 2007; 67:1689-95.
96. 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: 2195-200.
97. Reichardt W, Jung V, Brunner C, Klein A, Wemmert S, Romeike BF, Zang KD, Urbchat S. The putative serine/threonine kinase gene STK15 in chromosome 20q13.2 is amplified in human gliomas. *Oncol Rep* 2003; 10: 1275-9.
98. Tatsuka M, Sato S, Kitajima S, Suto S, Kawai H, Miyauchi M, Ogawa I, Maeda M, Ota T, Takata T. Overexpression of Aurora-A potentiates HRAS-mediated oncogenic transformation and is implicated in oral carcinogenesis. *Oncogene* 2005; 24: 1122-7.
99. Nishida N, Nagasaka T, Kashiwagi K, Boland CR, Goel A. High copy amplification of the Aurora-A gene is associated with chromosomal instability phenotype in human colorectal cancers. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 525-33.
100. Miyoshi Y, Iwao K, Egawa C, Noguchi S. Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. *Int J Cancer* 2001; 92: 370-3.
101. Jeng YM, Peng SY, Lin CY, Hsu HC. Overexpression and amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2065-71.
102. 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: 1281-8.

103. Smith SL, Bowers NL, Betticher DC, Gautschi O, Ratschiller D, Hoban PR, Booton R, Santibáñez-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: 719-29.

104. Sillars-Hardebol AH, Carvalho B, Tijssen M, Beliën JA, de Wit M, Delis-van Diemen PM, Pontén F, van de Wiel MA, Fijneman RJ, Meijer GA. TPX2 and AURKA promote 20q amplicon-driven colorectal adenoma to carcinoma progression. *Gut* 2012; 61: 1568-75.

105. Belt EJ, Brosens RP, Delis-van Diemen PM, Bril H, Tijssen M, van Essen DF, Heymans MW, Beliën JA, Stockmann HB, Meijer S, Meijer GA. Cell cycle proteins predict recurrence in stage II and III colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 682-92.

106. 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: 4455-62.

107. Mendiola M, Barriuso J, Mariño-Enríquez A, Redondo A, Domínguez-Cáceres A, Hernández-Cortés G, Pérez-Fernández E, Sánchez-Navarro I, Vara JA, Suárez A, Espinosa E, González-Barón M, Palacios J, Hardisson D. Aurora kinases as prognostic biomarkers in ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 2009; 40: 631-8.

108. Kulkarni AA, Loddo M, Leo E, Rashid M, Eward KL, Fanshawe TR, Butcher J, Frost A, Ledermann JA, Williams GH, Stoeber K. DNA replication licensing factors and aurora kinases are linked to aneuploidy and clinical outcome in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6153-61.

109. Landen CN Jr, Lin YG, Immaneni A, Deavers MT, Merritt WM, Spannuth WA, Bodurka DC, Gershenson DM, Brinkley WR, Sood AK. Overexpression of the centrosomal protein Aurora-A kinase is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4098-104.

110. Das K, Lorena PD, Ng LK, Shen L, Lim D, Siow WY, Narasimhan K, Teh M, Choolani M, Putti TC, Salto-Tellez M. Aurora A expression, hormone receptor status and clinical outcome in hormone related cancers. *Pathology* 2010; 42: 540-6.

- 111.** Lassus H, Staff S, Leminen A, Isola J, Butzow R. Aurora-A overexpression and aneuploidy predict poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2011; 120: 11-7.
- 112.** Yang G, Chang B, Yang F, Guo X, Cai KQ, Xiao XS, Wang H, Sen S, Hung MC, Mills GB, Chang S, Multani AS, Mercado-Uribe I, Liu J. Aurora kinase A promotes ovarian tumorigenesis through dysregulation of the cell cycle and suppression of BRCA2. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3171-81.
- 113.** Yang F, Guo X, Yang G, Rosen DG, Liu J. AURKA and BRCA2 expression highly correlate with prognosis of endometrioid ovarian carcinoma. *Mod Pathol* 2011; 24: 836-45.
- 114.** Lo Iacono M, Monica V, Saviozzi S, Ceppi P, Bracco E, Papotti M, Scagliotti GV. Aurora kinase A expression is associated with lung cancer histological-subtypes and with tumor de-differentiation. *J Transl Med* 2011; 9: 100.
- 115.** Ogawa E, Takenaka K, Katakura H, Adachi M, Otake Y, Toda Y, Kotani H, Manabe T, Wada H, Tanaka F. Perimembrane Aurora-A expression is a significant prognostic factor in correlation with proliferative activity in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 547-54.
- 116.** Reiter R, Gais P, Jütting U, Steuer-Vogt MK, Pickhard A, Bink K, Rauser S, Lassmann S, Höfler H, Werner M, Walch A. Aurora kinase A Messenger RNA overexpression is correlated with tumor progression and shortened survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5136-41.
- 117.** Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Tasaka T, Taniguchi A, Kuwayama Y, Komatsu N, Bandobashi K, Togitani K, Koeffler HP, Taguchi H. A novel treatment strategy targeting Aurora kinases in acute myelogenous leukemia. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 1851-7.
- 118.** Ye D, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Xiao L, Vadhan-Raj S, Fernandez MH, Nguyen MH, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE. Analysis of Aurora kinase A expression in CD34(+) blast cells isolated from patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *J Hematop* 2009; 2: 2-8.
- 119.** Tanaka R, Squires MS, Kimura S, Yokota A, Nagao R, Yamauchi T, Takeuchi M, Yao H, Reule M, Smyth T, Lyons JF, Thompson NT, Ashihara E, Ottmann OG, Maekawa T. Activity of the multitargeted kinase inhibitor, AT9283, in imatinib-resistant BCR-ABL-positive leukemic cells. *Blood* 2010; 116: 2089-95.

- 120.** Giles FJ, Swords RT, Nagler A, Hochhaus A, Ottmann OG, Rizzieri DA, Talpaz M, Clark J, Watson P, Xiao A, Zhao B, Bergstrom D, Le Coutre PD, Freedman SJ, Cortes JE. MK-0457, an Aurora kinase and BCR-ABL inhibitor, is active in patients with BCR-ABL T315I leukemia. *Leukemia* 2013; 27: 113-7.
- 121.** Hose D, Rème T, Meissner T, Moreaux J, Seckinger A, Lewis J, Benes V, Benner A, Hundemer M, Hielscher T, Shaughnessy JD Jr, Barlogie B, Neben K, Krämer A, Hillengass J, Bertsch U, Jauch A, De Vos J, Rossi JF, Möhler T, Blake J, Zimmermann J, Klein B, Goldschmidt H. Inhibition of aurora kinases for tailored risk-adapted treatment of multiple myeloma. *Blood* 2009; 113: 4331-40.
- 122.** 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: 439-47.
- 123.** 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: 1364-73.
- 124.** Camacho E, Beà S, Salaverría I, López-Guillermo A, Puig X, Benavente Y, de Sanjosé S, Campo E, Hernández L. Analysis of Aurora-A and hMPS1 mitotic kinases in mantle cell lymphoma. *Int J Cancer* 2006; 118: 357-63.
- 125.** Qi W, Cooke LS, Liu X, Rimsza L, Roe DJ, Manziolli A, Persky DO, Miller TP, Mahadevan D. Aurora inhibitor MLN8237 in combination with docetaxel enhances apoptosis and anti-tumor activity in mantle cell lymphoma. *Biochem Pharmacol* 2011; 81: 881-90.
- 126.** Mori N, Ishikawa C, Senba M, Kimura M, Okano Y. Effects of AZD1152, a selective Aurora B kinase inhibitor, on Burkitt's and Hodgkin's lymphomas. *Biochem Pharmacol* 2011; 81: 1106-15.
- 127.** Kollareddy M, Zheleva D, Dzubak P, Brahmshatriya PS, Lepsik M, Hajdich M. Aurora kinase inhibitors: progress towards the clinic. *Invest New Drugs* 2012; 30: 2411-32.
- 128.** Pérez Fidalgo JA, Roda D, Roselló S, Rodríguez-Braun E, Cervantes A. Aurora kinase inhibitors: a new class of drugs targeting the regulatory mitotic system. *Clin Transl Oncol* 2009; 11: 787-98.
- 129.** Gontarewicz A, Balabanov S, Keller G, Colombo R, Graziano A, Pesenti E, Benten D, Bokemeyer C, Fiedler W, Moll J, Brümmendorf TH. Simultaneous targeting of Aurora

kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I. *Blood* 2008; 111: 4355-64.

130. Hajduch M, Vydra D, Dzubak P, Stuart I, Zheleva D. In vivo mode of action of CYC116, a novel small molecule inhibitor of Aurora kinases and VEGFR2. AACR Annual Meeting 2008; Abstract 5645.

131. Howard S, Berdini V, Boulstridge JA, Carr MG, Cross DM, Curry J, Devine LA, Early TR, Fazal L, Gill AL, Heathcote M, Maman S, Matthews JE, McMenamin RL, Navarro EF, O'Brien MA, O'Reilly M, Rees DC, Reule M, Tisi D, Williams G, Vinković M, Wyatt PG. Fragment-based discovery of the pyrazol-4-yl urea (AT9283), a multitargeted kinase inhibitor with potent aurora kinase activity. *J Med Chem* 2009; 52: 379-88.

132. McLaughlin J, Markovtsov V, Li H, Wong S, Gelman M, Zhu Y, Franci C, Lang D, Pali E, Lasaga J, Low C, Zhao F, Chang B, Gururaja TL, Xu W, Baluom M, Sweeny D, Carroll D, Sran A, Thota S, Parmer M, Romane A, Clemens G, Grossbard E, Qu K, Jenkins Y, Kinoshita T, Taylor V, Holland SJ, Argade A, Singh R, Pine P, Payan DG, Hitoshi Y. Preclinical characterization of Aurora kinase inhibitor R763/AS703569 identified through an image-based phenotypic screen. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 99-113.

133. Hardwicke MA, Oleykowski CA, Plant R, Wang J, Liao Q, Moss K, Newlander K, Adams JL, Dhanak D, Yang J, Lai Z, Sutton D, Patrick D. GSK1070916, a potent Aurora B/C kinase inhibitor with broad antitumor activity in tissue culture cells and human tumor xenograft models. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 1808-17.

134. Payton M, Bush TL, Chung G, Ziegler B, Eden P, McElroy P, Ross S, Cee VJ, Deak HL, Hodous BL, Nguyen HN, Olivieri PR, Romero K, Schenkel LB, Bak A, Stanton M, Dussault I, Patel VF, Geuns-Meyer S, Radinsky R, Kendall RL. Preclinical evaluation of AMG 900, a novel potent and highly selective pan-aurora kinase inhibitor with activity in taxane-resistant tumor cell lines. *Cancer Res* 2010; 70: 9846-54.

135. Kelly KR, Ecsedy J, Medina E, Mahalingam D, Padmanabhan S, Nawrocki ST, Giles FJ, Carew JS. The novel Aurora A kinase inhibitor MLN8237 is active in resistant chronic myeloid leukaemia and significantly increases the efficacy of nilotinib. *J Cell Mol Med* 2011; 15: 2057-70.

136. Görgün G, Calabrese E, Hideshima T, Ecsedy J, Perrone G, Mani M, Ikeda H, Bianchi G, Hu Y, Cirstea D, Santo L, Tai YT, Nahar S, Zheng M, Bandi M, Carrasco RD, Raju

N, Munshi N, Richardson P, Anderson KC. A novel Aurora-A kinase inhibitor MLN8237 induces cytotoxicity and cell-cycle arrest in multiple myeloma. *Blood* 2010; 115: 5202-13.

137. Wang X, Sinn AL, Pollok K, Sandusky G, Zhang S, Chen L, Liang J, Crean CD, Suvannasankha A, Abonour R, Sidor C, Bray MR, Farag SS. Preclinical activity of a novel multiple tyrosine kinase and aurora kinase inhibitor, ENMD-2076, against multiple myeloma. *Br J Haematol* 2010; 150: 313-25.

138. Inamdar KV, O'Brien S, Sen S, Keating M, Nguyen MH, Wang X, Fernandez M, Thomazy V, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE. Aurora-A kinase nuclear expression in chronic lymphocytic leukemia. *Mod Pathol* 2008; 21: 1428-35.

139. Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Nobumoto A, Udaka K, Yokoyama A. CD34(+)/CD38(-) acute myelogenous leukemia cells aberrantly express Aurora kinase A. *Int J Cancer* 2013; 133: 2706-19.

140. de Paula Careta F, Gobessi S, Panepucci RA, Bojnik E, Morato de Oliveira F, Mazza Matos D, Falcão RP, Laurenti L, Zago MA, Efremov DG. The Aurora A and B kinases are up-regulated in bone marrow-derived chronic lymphocytic leukemia cells and represent potential therapeutic targets. *Haematologica* 2012; 97: 1246-54.