

# Az immunfenotípus és prognosztikus markerek szerepének vizsgálata krónikus lymphocytás leukémia progressziójában

Doktori tézisek

**Tolnai-Kriston Csilla**

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Barna Gábor, Ph. D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Jáksó Pál, Ph.D., biológus

Dr. Masszi András, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Kiss András, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Erdélyi Dániel, Ph.D., egyetemi adjunktus

Rubovszkyné Dr. Gallai Mónika, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest

2019

## TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
1. BEVEZETÉS.....	8
1.1 A krónikus lymphocytás leukémia (CLL) és prognosztikus markerei.....	8
1.1.1. A krónikus lymphocytás leukémia.....	8
1.1.2. A CLL előfordulása, klinikai jellemzői.....	8
1.1.3. A CLL diagnózisa.....	9
1.1.3.1. Morfológia.....	9
1.1.3.2. Immunfenotípus.....	10
1.1.3.3. Genotípus.....	11
1.1.4. Differenciál-diagnosztika.....	12
1.1.5. Prognosztikai tényezők.....	12
1.1.5.1. Molekuláris/genetikai/citogenetikai prognosztikus faktorok.....	14
1.1.5.2. Áramlási citometriával detektálható prognosztikus markerek.....	17
1.1.5.2.1. ZAP-70.....	17
1.1.5.2.2. CD23.....	17
1.1.5.2.3. CD38.....	19
1.1.5.2.4. CD49d.....	20
1.2.A CLL-sejtek mikrokönyezete.....	25
1.2.1. A mikrokönyezet szerepe a CLL patogenezisében.....	25
1.2.2. A mikrokönyezet sejtjei és a CLL-sejtekkel kialakított interakciók.....	26
1.2.2.1. Mezenchimális strómasejtek (BMSC).....	28
1.2.2.2. Nurselike-sejtek (NLC).....	29
1.2.2.3. T-sejtek és NK-sejtek.....	29
1.2.3. A CLL-sejtek homingja.....	30
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	34
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	35
3.1. Betegek.....	35
3.2. Lymphoma sejtek izolálása.....	36

3.3. RNS izolálás és reverz transzkripció.....	36
3.4. CD23a és CD23b izoformák mRNS expresszió-analízise hagyományos és kvantitatív valós-idejű PCR-rel.....	37
3.5. Immunfenotípus meghatározása áramlási citometriával.....	39
3.6. FISH.....	41
3.7. Sejttenyésztés.....	41
3.8. Plate-k és tárgylemezek VCAM-1 coatolása.....	42
3.9. Apoptózis-mérés.....	42
3.10. Sejtciklus-vizsgálat.....	43
3.11. Proliferációs markerek detektálása áramlási citometriával.....	43
3.12. A CD29 konformációváltozásának valós-idejű detektálása áramlási citometriával.....	44
3.13. Phalloidin jelölés és detektálása konfokális mikroszkóppal.....	45
3.14. Statisztika.....	45
4. EREDMÉNYEK.....	46
4.1. A különböző CD23 expresszió szerepe a CLL prognózisában.....	46
4.1.1. A CD23 izotípusok expressziójának vizsgálata.....	46
4.1.2. A CLL1 és CLL2 esetek immunfenotípusa.....	48
4.1.3. A CLL1 és CLL2 csoportok klinikai adatainak összehasonlítása.....	50
4.1.4. Prognosztikai markerek vizsgálata a CLL1 és CLL2 csoportokban.....	50
4.2. A magas CD49d expresszió szerepének vizsgálata.....	52
4.2.1. A CD49d expresszió korrelációja prognosztikus és mikroenvironmenti interakcióban részt vevő markerekkel.....	52
4.2.2. A CD49d direkt apoptózis-gátló szerepének vizsgálata.....	54
4.2.3. A CD49d-VCAM-1 kapcsolódás proliferáció-indukáló hatásának vizsgálata.....	57
4.2.4. A CD49d/CD29 komplex aktív konformációjának vizsgálata.....	58
4.2.5. CD49d <sup>+</sup> és CD49d <sup>-</sup> CLL-sejtek aktin-átrendeződésének vizsgálata VCAM-1 hatására.....	60
4.2.6. CD49d <sup>+</sup> és CD49d <sup>-</sup> CLL-sejtek immunfenotípus-változása VCAM-1 vagy BMSC ko-kultúra hatására.....	61
4.2.7. Különböző CD49d és CXCR4 expressziójú betegcsoportok klinikai adatainak elemzése.....	63

5. MEGBESZÉLÉS.....	67
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	76
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	77
8. SUMMARY.....	78
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	79
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	99
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	101

**RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

12tri	12-es triszómia
ADP	Adenozin-difoszfát
AID	Aktiváció-indukált citidin deamináz
ALC	Abszolút lymphocyta szám
APC	Allofikocyanine
APRIL	A proliferáció indukáló ligand
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated gén
BAFF	B-sejt aktiváló faktor
Bax	Bcl-2 asszociált X protein
Bcl-2	B-sejt lymphoma 2 protein
Bcl-xL	B-sejt lymphoma-extra large protein
BCR	B-sejt receptor
bFGF	Bázikus fibroblaszt növekedési faktor
BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3
BMSC	Csontvelői strómasejt
BSA	Szarvasmarha szérum albumin
BTK	Bruton's tirozin kináz
CAR	Chimeric antigen receptor
CD	Cluster of differentiation
CDK4	Ciklin-dependens kináz 4
CLL	Krónikus lymphocytás leukémia
C <sub>T</sub>	Threshold ciklus
del	Deléción
DLBCL	Diffúz nagy B-sejtes lymphoma
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ERK	Extracellular signal-regulated kináz
FAK	Fokális adhézións kináz
FBS	Fötális szarvasmarha savó
FDC	Folikuláris dendritikus sejt
FISH	Fluoreszcens in situ hybridizáción

FITC	Fluoreszcein isothiocyanate
ICAM-1	Intercelluláris adhéziós molekula 1
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IGHV	Immunglobulin nehéz lánc variábilis régió
IL	Interleukin
ILK	Integrin-kapcsolt kináz
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
HCL	Hajassejtes leukémia
LDH	Laktát dehidrogenáz
LFA-1	Lymphocyta funkció-asszociált antigén
LPAM	Lymphocyta peyer patch adhéziós molekula
LPL	Lymphoplasmocytás lymphoma
MAdCAM-1	Mukozális addressin sejt adhéziós molekula
MAP	Mitogén aktivált protein kináz
MBL	Monoklonális B-sejtes lymphocytosis
MCL	Köpenysejtes lymphoma
Mcl-1	Indukált myeloid leukémia sejt differenciációs protein
MFI	Átlagos fluoreszcencia intenzitás
mCLL	Mutált CLL
miR	MikroRNS
MM	Myeloma Multiplex
MMP-9	Mátrix-metalloproteináz 9
MRD	Minimális reziduális betegség
MZL	Marginális zóna lymphoma
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NHL	Non-Hodgkin-lymphoma
NK-sejt	Natural-killer sejt
NLC	Nurselike-sejt
NMZL	Nodális marginális zóna lymphoma
PBS	Foszfát pufferes sóoldat

PC5.5	Fikoeritrin-cianin 5.5
PD-1	Programozott sejthalál protein 1
PE	Fikoeritrin
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PE-Cy5	Fikoeritrin-cianin 5
PI	Propidium-jodid
PI3K	Foszfatidil-inozitol 3'-kináz
PKC $\beta$ II	Protein kináz C $\beta$ II
RGD	Arginin-glicin-aszparaginsav
ROR1	Receptor tirozin kináz-like orphan receptor 1
sCD23	Szolubilis CD23
SEM	Középérték átlagos hibája
SDF-1	Strómasejt eredetű faktor 1
SF3B1	Splicing factor 3B alegység 1
SLL	Kis lymphocytás lymphoma
SMZL	Splenikus marginális zóna lymphoma
SSC	Oldalszórás
SYK	Spleen tirozin kináz
t	Transzlokáció
TNF- $\alpha$	Tumor-nekrózis faktor $\alpha$
T <sub>reg</sub>	Regulatórikus T-sejt
TRITC	Tetrametil rodamin izotiocianát
TTT	Első kezelésig eltelt idő
umCLL	Nem-mutált CLL
VCAM-1	Vaszkuláris sejt adhézions molekula-1
VLA-4	Very late antigen-4
WHO	World Health Organisation
Wnt	Wingless-type MMTV integrációs hely
XIAP	X-kapcsolt apoptózis protein inhibitor
ZAP-70	Zeta-lánc asszociált protein protein kináz 70

## **1. BEVEZETÉS**

### **1.1. A krónikus lymphocytás leukémia (CLL) és prognosztikus markerei**

#### **1.1.1. A krónikus lymphocytás leukémia**

A krónikus lymphocytás leukémia (CLL) a WHO (World Health Organisation) osztályozása alapján az érett B-sejtes non-Hodgkin-lymphomák (NHL) csoportjába tartozik. A CLL mérsékelt malignitású, indolens lefolyású megbetegedés, mely a csontvelőben alakul ki és leukémiás vérképpel jár. A betegség előrehaladtával pedig a nyirokcsomókat és más lymphoid szöveteket is érintheti [1].

#### **1.1.2. A CLL előfordulása, klinikai jellemzői**

A CLL a leggyakoribb felnőttkori leukémia-típus a nyugati országokban, a leukémiás megbetegedések mintegy 16-30%-át teszi ki [2]. A CLL főként az idősebb felnőtteket érinti, az átlagéletkor a diagnózis időpontjában 55 év [3]. Férfiak esetében mintegy kétszer gyakrabban fordul elő. Egyre több eredmény számol be a CLL familiáris halmozódásáról [4]. A CLL tünetei általában nem specifikusak: fáradékonyság, testsúlycsökkenés, nyirokcsomó-megnagyobbodás, perifériás lymphocytosis. A betegség előrehaladott stádiumaiban jellemző a generalizált lymphadenopathia, hepatosplenomegalia, anémia, valamint thrombocytopenia [3]. Gyakori a hypogammaglobulinémia, elsősorban az IgG szintjének csökkenése, illetve a T- és B-sejtek anergiája. Ezen elváltozások miatt gyakoribbá válhatnak a bakteriális, vírus- és gombafertőzések. A CLL lefolyásának késői stádiumában másodlagos tumorok is megjelenhetnek, a leggyakoribb a bőr-, tüdő-, vastagbél- és méhnyakrák kialakulása [3].



### **1.1.3. A CLL diagnózisa**

A diagnózis felállításában a perifériás vér áramlási citometriai vizsgálata döntő fontosságú. Differenciál-diagnosztikai szempontból elengedhetetlen a morfológiai, citogenetikai, egyes esetekben immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzése. Újabban a nagy érzékenységű molekuláris genetikai elemzések (új generációs szekvenálás) is fontos részét képezik a CLL diagnosztikájának, főleg a prognózis előrejelzésénél [5]. A kezelés megkezdése előtt a megfelelő terápia kiválasztásánál a citogenetikai és molekuláris genetikai eltérések ismerete alapvető.

A csontvelő és nyirokcsomó vizsgálata nem tartozik hozzá a CLL diagnosztikájához. Csontvelői mintavétel citopéniás betegek esetén szükséges a csontvelői tumortömeg meghatározása, valamint a terápiás válasz megítélése okán. A nyirokcsomó biopszia főként az agresszívebb lymphomává való transzformáció esetén fontos [6].

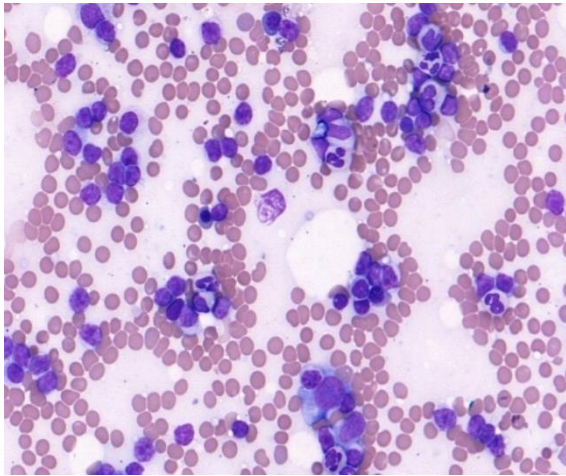
#### **1.1.3.1. Morfológia**

A perifériás vérben jellemző a kis lymphocyták felszaporodása, melyek a kenetben keskeny citoplazmával, kerek maggal, kompakt és rögös kromatinnal láthatók. A nyugvó lymphocyták mellett nagyobb méretű, bő citoplazmájú prolymphocyták is jelen lehetnek, arányuk általában 2% alatti. A CLL-ben tipikus a Gumprecht-rögök megjelenése, melyek a törékeny neoplasztikus lymphocyták mechanikailag károsodott maradványai [3].

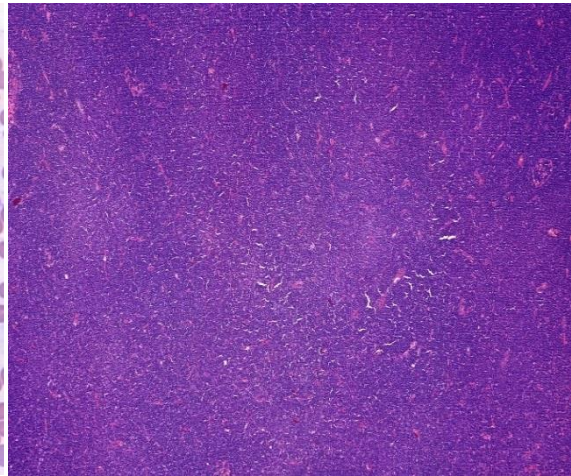
A CLL-sejtek változó mértékben infiltrálhatják a csontvelőt és a nyirokcsomót. A csontvelői kenetekben látható tumorsejtek morfológiája megegyezik a perifériás kenetekben látottakéval (1. A. ábra). A CLL-sejtek myeloperoxidáz negatívak. A CLL korai szakaszában a csontvelői infiltráció mintázata noduláris vagy intersticiális, míg előrehaladott stádiumban diffúz [3].

A CLL-sejtek diffúzan infiltrálhatják a nyirokcsomókat, elmosva a normál folliculáris szerkezetet. A proliferáló CLL-sejtek pseudofollikulusokat (proliferációs centrum) képeznek, melyek világosabb festődésű területekként azonosíthatók (1. B. ábra).

A



B



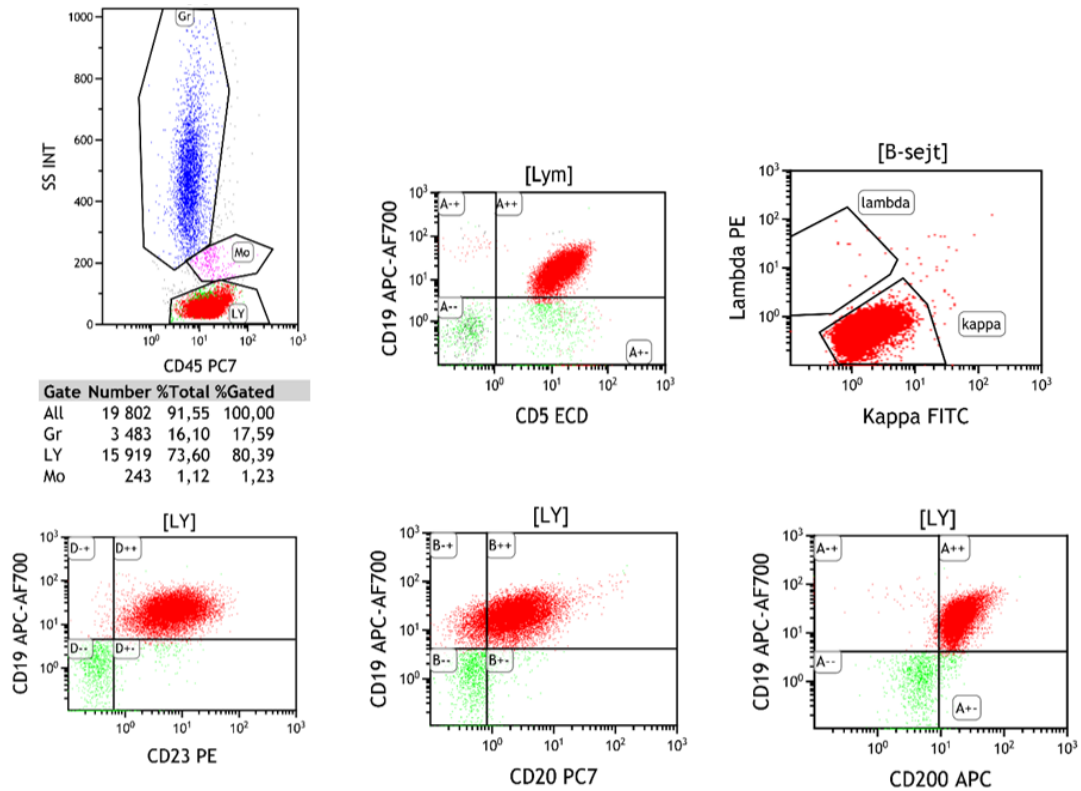
**1. ábra CLL, csontvelő kenet (May Grünwald Giemsa festés, 40x) (A), valamint infiltrált nyirokcsomó hisztológiai képe (hematoxin-eozin, 6x) (B).**

A: CLL extenzív csontvelői infiltrációja. A kenetben jól látható a nagyszámú kis lymphocyták maggal és keskeny citoplazmával.

B: A nyirokcsomót a CLL-sejtek diffúzan infiltrálják, a normális folliculáris szerkezet eltűnik. A proliferáló CLL-sejtek világosabb festődésű, nagyobb sejtekből álló pseudofollikulusokat alkotnak.

### 1.1.3.2. Immunfenotípus

A CLL-sejtek erősen expresszálják a CD45 általános leukocytá antigént, így a normál B-sejtekhez hasonlóan a „lymphocytá kapuba” esnek az áramlási citometriai kiértékelések során (2. ábra). Ritkán előfordul, hogy a kóros sejtek a csökkent (dim) CD45 kifejeződés miatt a „blaszt kapuban” találhatóak [7]. A CLL-sejtekre jellemző az érett B-sejtes markerek kifejeződése, mint a CD19, CD22, CD20 és a CD79a. Ezek mellett a CLL-re specifikus a CD5-CD23 molekulák koexpressziója, mely differenciál-diagnosztikai szempontból döntő fontosságú [8]. A CD20 és a felszíni immunglobulinok (Ig-kappa és lambda láncok) expressziója a normál B-sejtekhez képest gyenge (2. ábra), de gyakoriak a negatív esetek is. Magas CD200 expressziót mutatnak, a CD10, CD79b és CD81 markerek általában negatívak a CLL-sejtek felszínén. A ZAP-70, CD38 és CD49d molekulák változó mértékben expresszálódnak. Atípusos esetek mutathatnak CD4, CD8, CD7 expressziót, illetve CD23 negativitást [7].



## 2. ábra CLL-es perifériás vérminta áramlási citometriai vizsgálata.

A CD45-SSC dot-ploton jól látható az emelkedett lymphocita-arány. A CLL-sejtek jellemző immunfenotípusa a CD19-CD5-CD23-CD20-CD200 expresszió, illetve kapa vagy lambda monoklonalitás.

### 1.1.3.3. Genotípus

A CLL genetikailag rendkívül heterogén megbetegedés. A CLL-es betegek közel 80%-ában mutatható ki valamilyen kromoszóma-aberráció, melyek közül több prognosztikus szereppel is bír. A CLL-re jellemző a neoplasztikus B-sejtek immunglobulin nehézlánc gén variábilis régiójának (*IGHV*) mutációja. Emellett a leggyakoribb eltérések a FISH vizsgálattal kimutatható 13q, 11q, 17p és 6q deléció, valamint a 12-es triszómia (12tri) [9].

#### 1.1.4. Differenciál-diagnosztika

A CLL és a kis lymphocytás lymphoma (SLL) ugyanannak a betegségnek eltérő megjelenési formája; morfológia, immunfenotípus és genotípus alapján nem különíthetők el. A differenciál-diagnózis alapja a perifériás lymphocytaszaporulat mértéke; 4000 sejt/mm<sup>3</sup> felett CLL a diagnózis, ezen érték alatt a kórkép SLL-nek felel meg [3].

A monoklonális B-sejtes lymphocytosis (MBL) daganatmegelőző állapotnak minősül, melyet 5x10<sup>9</sup> sejt/l alatti monoklonális CD5<sup>+</sup> vagy CD5<sup>-</sup> B-sejt szaporulat jellemez kimutatható organomegália, lymphadenomegália nélkül. Az MBL évente 1-2%-ban progrediál CLL-be [10].

A CLL-t fontos elkülöníteni egyéb perifériás lymphocytosist mutató low-grade B-sejtes lymphoproliferatív megbetegedésektől, mint a hajassejtes leukémia (HCL), marginális zóna lymphoma (MZL), lymphoplasmocytás lymphoma (LPL-Waldenström-macroglobulinemia) és a köpenysejtes lymphoma (MCL). A HCL a jellegzetes CD103-CD11c koexpresszió és a CD5-CD23 negativitás, illetve a kenetben látható „hajás”, nyúlványos HCL sejtek révén könnyen diagnosztizálható. A HCL variánsra nem jellemző a nyúlványos morfológiai kép, ekkor a fenotípus segít az elkülönítésben. Az MZL-nek nincs áramlási citometriával detektált jellegzetes immunfenotípusa, ám a CD5 és CD23 felszíni markerek hiánya segíti a CLL-től való elválasztást. Az LPL-re magas CD38-CD138 ko-expresszió és a CLL immunfenotípus hiánya, illetve monoklonális gammopathia jellemző. A CLL-t leginkább a köpenysejtes lymphomától kell elkülönítenünk, amely a CLL-hez hasonlóan aberráns CD5 pozitivitást, azonban CD23 és CD200 negativitást mutat. Mivel mind CLL, mind MCL esetében ismert atípusos CD23 expresszió (CD23<sup>-</sup> CLL és CD23<sup>+</sup> MCL), ezért a biztos diagnózishoz igazolni kell az MCL-sejtek ciklinD1 expresszióját, illetve a t(11;14) kromoszóma-transzlokációt [11].

#### 1.1.5. Prognosztikai tényezők

A CLL indolens kórkép, a betegek átlagos túlélése körülbelül 10 év. A CLL heterogén megbetegedés, mely rendkívül változatos klinikai lefolyással rendelkezik. A CLL-es esetek körülbelül egyharmada évekig nem igényel terápiát, a túlélés akár több évtized is lehet, míg az agresszívebb kórlefolást mutató betegek a kezelések ellenére is csak néhány hónapos túlélést mutatnak. Az esetek 5-30%-ánál a CLL malignus non-

Hodgkin-lymphomává transzformálódik. Leggyakrabban diffúz nagy B-sejtes lymphomává (DLBCL) (ezt nevezzük Richter-szindrómának) vagy prolymphocytás leukémiává alakul át, ritkábban Hodgkin-lymphomává [3]. A CLL transzformációja agresszívebb kórlefoylással és rövidebb túléléssel társul.

Számos prognosztikus tényező segíti a betegség lefolyásának megítélését. Az első prognosztikus osztályozás a Rai- és Binet-féle stádiumbesorolás volt [12, 13]. Ezek klinikai klasszifikációk, melyek a lymphocytózis, a nyirokcsomó-, máj- és lép-megnagyobbodás, illetve a vérképeltérés mértékét tekintik alapul (1. táblázat). A Rai- és Binet-féle osztályozás máig használatos a kezelés-indikáció és a prognózis megítélésénél, azonban a kimenetelt, főleg a CLL korai szakaszában, nem jelzik kellő mértékben [6].

**1. táblázat** A Rai- és Binet-féle klasszifikáció [6, 12, 13]

<b>RAI stádium</b>	<b>Jellemzők</b>	<b>Rizikóstátusz</b>
0	Lymphocitózis, ly a vérben >15000/μl és 40% ly a csv-ben	Alacsony (átlagos túlélés > 10 év)
I	0 stádium és nagy nyirokcsomók	Közepes (átlagos túlélés > 8 év)
II	0-1 stádium és hepatosplenomegália	Közepes (átlagos túlélés > 8 év)
III	0-2 stádium és anémia (Hb <110 g/l)	Magas (átlagos túlélés > 6,5 év)
IV	0-3 stádium és thrombocytopenia (thr <100000/ μl)	Magas (átlagos túlélés > 6,5 év)
<b>Binet stádium</b>	<b>Jellemzők</b>	<b>Átlagos túlélés</b>
A	Hb > 100 g/l, thr >100 G/l és < 3 nyirokcsomó régió-érintett	>10 év
B	Hb > 100 g/l, thr >100 G/l és > 3 nyirokcsomó-régió érintett	>8 év
C	Hb < 100 g/l, thr < 100 G/l és bármely nyirokcsomó-régió érintett	6,5 év

ly: lymphocytá; Hb: hemoglobin; thr: thrombocytá

A prognózist számos újabb faktor is meghatározhatja, mint bizonyos laboratóriumi eltérések ( $\beta$ 2-mikroglobulin, szolubilis CD23 (sCD23), timidinknáz, tejsavdehidrogenáz), valamint molekuláris markerek. Egy ideális prognosztikus marker nemcsak az agresszívebb kórlefolyást jelzi, hanem a betegség patogeneziséhez is hozzájárul, így terápiás célpontként szolgálhat. Ilyen például a mellrák esetében a Her2-Neu overexpresszió, mely agresszívebb betegséggel társul, célzott terápiája pedig jobb klinikai kimenetellel jár [14, 15]. Ezért újabb prognosztikus markerek kutatása kulcsfontosságú a CLL esetében is.

#### 1.1.5.1. Molekuláris/genetikai/citogenetikai prognosztikus faktorok

Az első CLL-ben használt molekuláris prognosztikus marker az immunglobulin nehézlánc gén variábilis régiójának (*IGHV*) mutációs státusza volt. Ez alapján két csoportot különíthetünk el: a nyirokcsomó centrum germinativumában szomatikus hipermutáción keresztülment variábilis régióval rendelkező mutált CLL (mCLL), melyek jobb kimenetellel bírnak, valamint a rosszabb prognózist jelentő nem mutált CLL (umCLL) esetek. A nem mutált *IGHV* eseteknél nagyobb arányban fordul elő relapszus őssejt transzplantáció után és Richter-transzformáció is kizárólag ebben a csoportban alakul ki [16]. A rosszabb kimenetel hátterében az állhat, hogy a nem mutált *IGHV* génnel rendelkező CLL-sejtek állandó anti-apoptotikus és proliferációs jeleket kapnak a B-sejt receptoron (BCR) keresztül a mikrokoznyezetből [17].

A leggyakoribb genetikai eltérés a 13q deléció, előfordulási gyakorisága CLL-ben 40-60%. A del(13q) aberrációt kezdetben jó prognózist jelzőnek írták le: ezen kromoszómaelváltozást mutató betegek hosszabb túlélést mutattak, mint a normál kariotípussal rendelkező CLL-es betegek (3. ábra) [18]. Újabban a 13q deléciót hordozó CLL-sejtek %-a alapján két prognosztikai csoportot különíthetünk el. Nagyarányú (>80%) del(13q) rövidebb ösztúléléssel társul, illetve ezen betegeknél upregulálódnak a sejtmotilitás, migráció, adhézio és proliferáció folyamatában szerepet játszó gének, valamint a BCR és anti-apoptotikus jelutak (NF- $\kappa$ B, Wnt) génjei [19, 20]. A 13q deléció során a *miR15a* és *miR16-1* tumorszuppresszor mikroRNS-ek expressziója csökken, ennek hatására a Bcl-2 anti-apoptotikus fehérje szintje nő és a CLL-sejtek apoptózis-rezisztenciájához vezet [21].

A del(11q) a CLL-es esetek 20%-ában azonosítható és kedvezőtlen prognózissal társul (3. ábra) [9, 22]. Ez az eltérés az *ATM* gént tartalmazó régiót érinti, mely a DNS repairben vesz részt [23]. A 11q deléciót hordozó betegek általában fiatalabbak, több B-tünetük van, valamint gyorsabb betegségprogresszió és rövidebb összétélés jellemző rájuk [23].

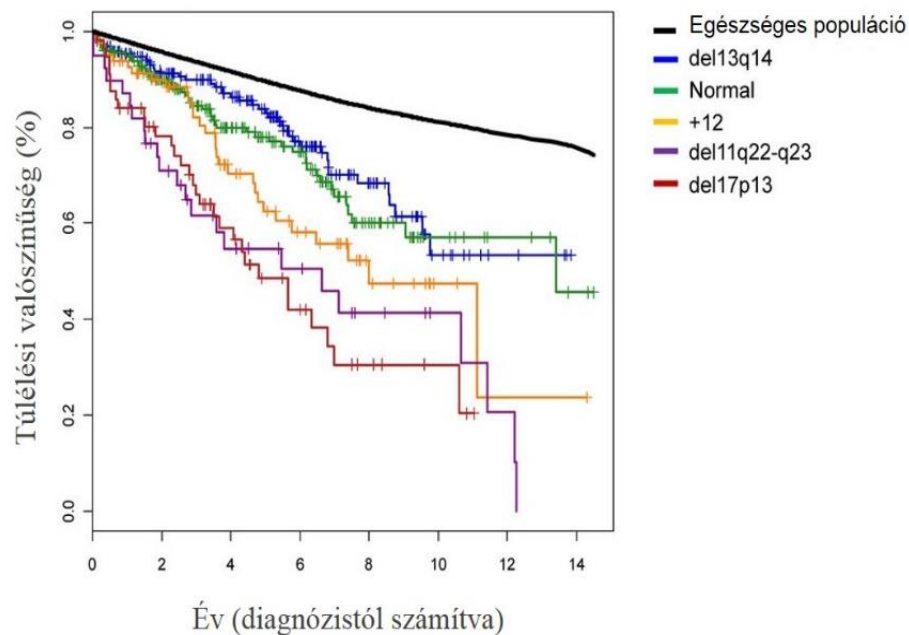
A CLL-es betegek 4-9%-a rendelkezik a diagnóziskor 17p delécióval, azonban kemoterápiás kezelésben részesülő betegeknél ez az arány akár 30% is lehet [18, 24]. A del(17p) eltéréssel rendelkező esetek a legmagasabb rizikójú csoportba tartoznak, nagyon agresszív klinikai lefolyás, terápia-rezisztencia és a legrövidebb összétélés jellemző rájuk (3. ábra) [22]. A 17p deléció a *TP53* tumorszuppresszor gén lokuszát érinti; a p53 fehérje DNS károsodás esetén leállítja a sejtciklust és apoptózist indukál. A del(17p)-t hordozó betegekben a p53 fehérjére specifikus MDM2 ubikvitin-ligáz szintje megnő, mely így számos p53-függő gén és mikroRNS, köztük a *miR-34a* szintjét csökkenti [25]. A *miR-34a* az apoptózis, szenescencia folyamatokban és a sejtciklus megállításában játszik kulcsszerepet. A 17p delécióval rendelkező alcsoport rendelkezik a legtöbb apoptózis, sejtciklus és a BCR jelátvitelt érintő génhibával, mint például a *BCL2*, *SYK*, *ATM*, *PI3K*, *AID* gének downregulációja [26].

A 12tri eltérés az esetek 10-20%-ában fordul elő és a közepes rizikócsoporthoz tartozik (3. ábra) [18]. A közepes prognózis ellenére azonban számos közlemény szerint a 12tri korai progresszióval és nagyon agresszív klinikai képpel társul [27-29]. A 12tri-ben nagyobb a Richter-transzformáció és másodlagos tumorok incidenciája is, összehasonlítva a 12tri-t nem hordozó esetekkel [30]. A 12tri-t hordozó CLL esetek klinikailag rendkívül heterogén entitások, atipikus morfológiával és immunfenotípussal társulnak. Jellemzőek a lymphoplazmacytás morfológiai jelek, a hasadt mag megléte, illetve magasabb felszíni Ig, CD19, CD20, CD22, CD38, CD79b és FMC7, illetve a csökkent CD43 expresszió [27, 31]. A pathogenezist tekintve a 12tri-t hordozó CLL esetekben gyakoriak a p53 degradációval kapcsolatos gének upregulációja, mely a sejtciklus-szabályozás felborulásához vezethet [25]. Emellett jellemző a proliferáció-asszociált E2F1 transzkripciós faktor expressziójának növekedése [32]. Ehhez hozzájárulhat a 12-es kromoszómán kódolt CDK4 kináz upregulációja, mely más kinázokkal együtt szabályozza az E2F1 szintjét. A 12tri aberráció konkrét pathogenezise azonban nem ismert. A 12tri-t hordozó esetekben nagyobb aránnyal fordul elő *NOTCH1*

mutáció, mely az NF- $\kappa$ B útvonal folyamatos aktiválását indukálja [33, 34]. 12tri-t, illetve *NOTCH1* mutációt hordozó CLL-es betegekre a CD49d prognosztikus marker pozitivitása jellemző [35].

A 6q deléció ritka kromoszóma-rendellenesség, a CLL-es betegek körülbelül 6%-nál fordul elő [18]. A del(6q)-t hordozó esetek a közepes rizikócsoportha tartoznak. A betegekre jelentős lymphocytózis, splenomegália és a CLL-sejtek CD38 pozitivitása jellemző [36].

Az új generációs szekvenálás megjelenésével újabb prognosztikus szereppel bíró mutációkat (*NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3*) azonosítottak, melyek egyelőre még nem részei a rutindiagnosztikának [37].



**3. ábra** A leggyakoribb kromoszómaaberrációk az ösztúlélés függvényében, Rossi és mtsai, 2013 nyomán [22].

A del(13q) eltérés az alacsony rizikócsoportha tartozik, a 12tri közepes prognózist jelez, míg a del(11q) és a del(17p) magas rizikót jelent gyors progresszióval, rövid ösztúléléssel.



### 1.1.5.2. Áramlási citometriával detektálható prognosztikus markerek

#### 1.1.5.2.1. ZAP-70

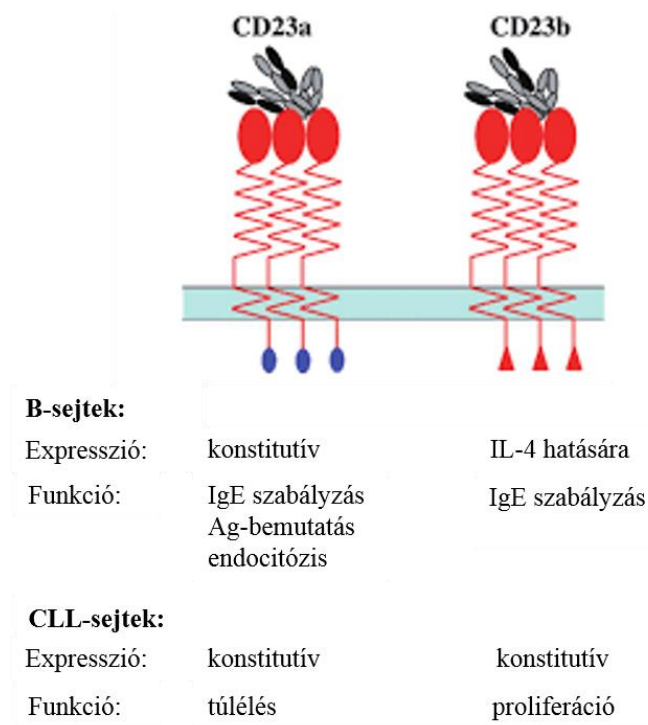
A ZAP-70 molekulát fiziológiásan T-sejtek expresszálják, a CD3 komplexhez kapcsolódva a T-sejt receptor jelátvitelben fontos tirozin kináz. CLL-ben a ZAP-70 negatív prognosztikus faktornak bizonyult, a 20% cut-off értéket tekintve [38]. Továbbá a ZAP-70 szintje esetén találták a legerősebb korrelációt az *IGHV* mutációs státusszal [39]. A BCR-hez kapcsolódva képes fokozni a BCR-eredetű jelátviteli folyamatokat, mely CLL esetén kiemelt fontosságú. A ZAP-70 expresszió és a fokozott BCR stimuláció hozzájárul az Akt és ERK kinázok hosszantartó aktivációjához, melyek számos antiapoptotikus fehérjét (Mcl-1, Bcl-xL, XIAP) indukálnak [40]. Továbbá a ZAP-70<sup>+</sup> CLL-sejtek fokozott kemokin-indukált migrációval jellemezhetők [41].

#### 1.1.5.2.2. CD23

A CLL-sejtek egyik jellegzetessége az emelkedett CD23 expresszió. A CD23 (FcεRII) az alacsony affinitású IgE receptor. Számos hematopoetikus sejt expresszálja (lymphocyták, monocyták, eozinofil granulocyták, folliculáris dendritikus sejtek) és különösen B-sejtek esetén patológiás jelentőséggel bírhat. A B-sejtek felszínén a CD23 ismert differenciáltsági antigén, továbbá meghatározó a B-sejtek aktivációjában, proliferációjában, az IgE-mediált antigénprezentációban, apoptózisban, adhézióban, endocitózisban és fagocitózisban [42].

A CD23 antigénnek két izoformája van, a CD23a és CD23b, melyek csak az N-terminális intracitoplazmatikus doménben térnek el. A CD23b esetén hiányzik egy ITIM motívum és a CKII foszforilációs hely. A CD23a izoforma konstitutívan expresszálódik a B-sejtek felszínén, míg a CD23b B-sejteken csak IL-4 stimulus hatására indukálódik, mely citokin a B-sejtek IgE izotípusváltásában kritikus [42]. A CD23 izoformák expresszióját az IL-4 mellett az IFN $\gamma$ , valamint a BCR antigénkötése is befolyásolja. A BCR tovább növeli az IL-4 hatását a fokozott CD23b expresszióra, míg a CD23a-ra nincs hatással [43]. Emellett a NOTCH2 útvonal is fontos szabályozó, melynek targetje a CD23 gén [44, 45].

A CLL-re jellemző a CD23 overexpressziója és eltérő szabályzása a normál B-sejtekhez képest[46]. Normál B-sejtekkel ellentétben a CLL-sejteken mindkét izoforma konstitutívan expresszálódik, továbbá IL-4 hatására kizárólag a CD23a szintje emelkedik (4. ábra) [43, 47]. A CD23a CLL-ben főként a túléléshez járulhat hozzá, míg a CD23b izoforma expressziója proliferációval társul: G<sub>0</sub> fázisban lévő CLL-sejtek a sejtciklusba belépve emelkedett CD23b expressziót mutattak [43].



#### 4. ábra A CD23a és CD23b izotípusok, Acharya és mtsai, 2010 nyomán [46].

A CD23 izotípusok expressziója, szabályzása és funkciója eltér normál B-sejtek és CLL-sejtek esetén. Míg a B-sejtek csak a CD23a izotípust expresszálják konstitutívan, addig a CLL-sejtek mindkét izoformát konstitutívan kifejezik. Ellentétben a B-sejtekkel, CLL-sejteknél a CD23a a túléléssel, a CD23b a proliferációval kapcsolatos.

A CD23 a CD5<sup>+</sup> lymphomák, a CLL és MCL elkülönítésében fontos differenciál-diagnosztikai marker. A CLL-sejtek nagymértékben expresszálják a CD23 molekulát, míg az MCL-sejtek az esetek nagy részében CD23 negatívak. Ezenkívül SMZL és NMZL B-sejtek is mutathatnak CD23 expressziót. Valójában a CLL-sejtek változó mértékben expresszálják a CD23 molekulát. Ismertek alacsony expressziójú és CD23 negatív esetek is. A CD23 expresszió mértéke prognosztikai jelentőséggel bír: a CD23 szint fordítottan

korrelál az abszolút lymphocyta számmal és a csontvelői prolymphocyta aránnyal, továbbá az alacsonyabb CD23 expresszió rövidebb túléléssel társul [48].

A CD23 lehasítódva a sejtfelszínről szolubilis formában (sCD23) a szérumba kerülhet, mely CLL esetén prognosztikus marker. CLL-es betegekben emelkedett a sCD23 szint, mennyisége jól korrelál a klinikai stádiummal és az abszolút lymphocyta számmal [49]. Érdekes módon a sCD23 szintje nem mutat összefüggést a sejtfelszíni CD23 expresszióval [50].

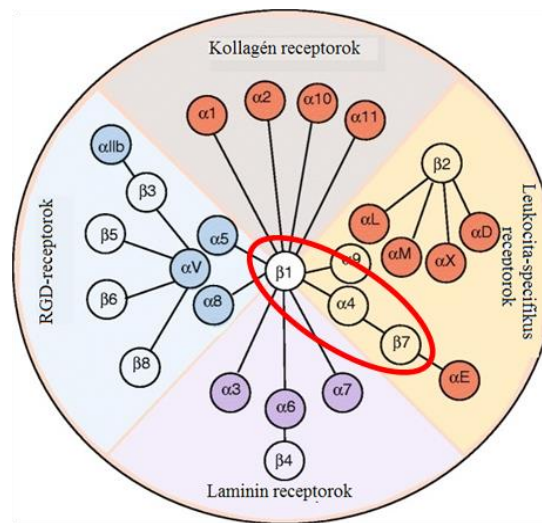
### 1.1.5.2.3. CD38

A CD38 molekulát számos hemopoetikus sejt expresszálja (lymphocyták, myeloid sejtek, NK-sejtek, erythrocyták), ezenkívül az agy és a szem számos sejt típusa, valamint osteoclastok, osteoblastok is kifejezik [51]. A CD38 ektoenzimként és receptorként is működik. Enzimként az ADP-ribozilciklázok közé tartozik és az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -szint szabályozásában játszik szerepet. Ennek révén meghatározó a T-sejt-aktivációban, neutrofil granulocyták kemotaxisában és a monocyták kemokin-termelésében [52]. Emellett a CD38 a lymphocyták jellemző differenciáltsági antigénje, mely receptor és adhéziós molekula szereppel is bír. Receptorként a CD38 számos jelátviteli komplexszel alakít ki interakciót, B-sejtekben a BCR/CD19 komplexhez kapcsolódik. A CD38 ismert ligandja a PECAM-1 (CD31) adhéziós molekula, mely mind a perifériás (endothél sejtek), mind a csontvelői CLL-mikrokörnyezetben (csontvelői strómasejtek) kifejeződik.

A CLL-sejtek változó mértékben expresszálják a CD38 molekulát. A CD38 negatív prognosztikus faktor, a CD38<sup>+</sup> CLL esetek (cut-off 30%) rövidebb túlélést mutatnak [17]. Mivel expressziója korrelál a ZAP-70 és a CD49d molekulákkal, ezért önálló funkcióját nehéz meghatározni. Több kísérlet is igazolta a CD38 szerepét a CLL-sejtek proliferációjában. Magasabb Ki67 expressziót detektáltak CD38<sup>+</sup> CLL-sejteknél, továbbá Calissano és munkatársai bebizonyították, hogy CD38<sup>+</sup> perifériás CLL pool több újonnan proliferált CLL-sejtből áll, mint a CD38<sup>-</sup> pool [53, 54]. Direkt proliferációt kiváltó szerepét mutatja, hogy IL-2 jelenlétében a CD38 keresztükötése a CLL-sejtek osztódását indukálta [55]. A CLL-sejtekre jellemző apoptózis-rezisztenciában betöltött szerepe egyelőre nem tisztázott.

#### 1.1.5.2.4. CD49d

CLL-ben az egyik legújabb prognosztikus marker a CD49d molekula, más néven az  $\alpha 4$  integrin alegység. Az integrinek az adhéziós molekulák legnagyobb családját alkotják. Heterodimer I. típusú transzmembrán glikoproteinek, melyek egy-egy nem kovalens módon kapcsolódó  $\alpha$  és  $\beta$  polipeptidláncból épülnek fel [56]. Jelenleg emberben huszonnégy változatuk ismert, ezek tizennyolc különböző  $\alpha$  lánc és nyolc  $\beta$  lánc kombinációjából felépülő heterodimerek (5. ábra) [57, 58]. Egy adott  $\alpha$  lánc csak bizonyos  $\beta$ -láncokkal alkothat párt. Csoportosításuk a  $\beta$ -láncok alapján történik.



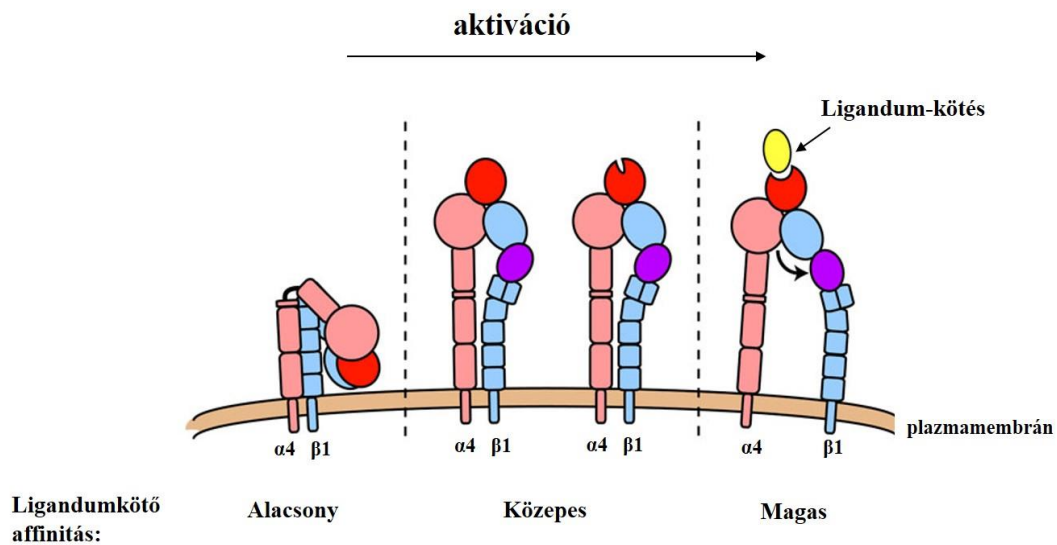
#### 5. ábra Az integrin család tagjai, Barczyk és mtsai, 2010 nyomán [58].

Az integrinek egy-egy meghatározott  $\alpha$  és  $\beta$  láncból épülnek fel. A pirossal jelölt leukocita-specifikus  $\alpha 4$  integrin-lánc (CD49d) a  $\beta 1$  és  $\beta 7$  alegységekkel alkothat párt.

A CD49d a CD29 ( $\beta 1$ ) és  $\beta 7$  alegységekkel alkothat komplexet (5. ábra). A CD49d a  $\beta 7$  láncsal komplexben ( $\alpha 4\beta 7$ ; LPAM) lymphocyták felszínén fejeződik ki és a MAdCAM-1 adhéziós molekulához kötődve a lymphocyták bél homing folyamatát közvetíti [59, 60]. A CD49d a CD29 molekulával kapcsolódva képezi a  $\beta 1$  integrinek közé tartozó VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ; CD49d/CD29) heterodimert [61]. A CD49d/CD29 kizárólag leukocytákon expresszálódik: CD34<sup>+</sup> hematopoetikus őssejtek, T-sejtek, B-sejtek, monocyták, eozinofil granulocyták és NK-sejtek fejezik ki [62]. A CLL-sejtek felszínén a CD49d főként a CD29 láncsal asszociálva fejeződik ki [63].

A CD49d/CD29 a sejt-sejt és sejt-extracelluláris mátrix interakciók kialakításában vesz részt. A heterodimer ligandjai a VCAM-1 (CD106) adhéziós molekula, valamint az extracelluláris mátrix-alkotó fibronectin [64, 65]. A VCAM-1 az Ig szuperfamilia tagja, amely endotél sejtek, csontvelői stromasejtek, illetve hemopoetikus sejtek, például makrofágok felszínén fejeződik ki. A VCAM-1 expresszióját számos citokin indukálja, mint az IL-4, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  és a TNF- $\alpha$  [66] [67]. A CD49d/CD29 másik fő ligandja a fibronectin, mely egy glikoprotein dimer. A fibronectin más mátrixfehérjékhez (kollagén, heparán-szulfát), illetve RGD motívumon keresztül integrinokhoz kötődik. A VCAM-1 és a fibronectin szolubilis formában is megtalálható a plazmában, bizonyos megbetegedésekben emelkedett szintet mutatnak. CLL-ben a CD49d-t kifejező esetek magasabb szolubilis VCAM-1 koncentrációval rendelkeznek [68].

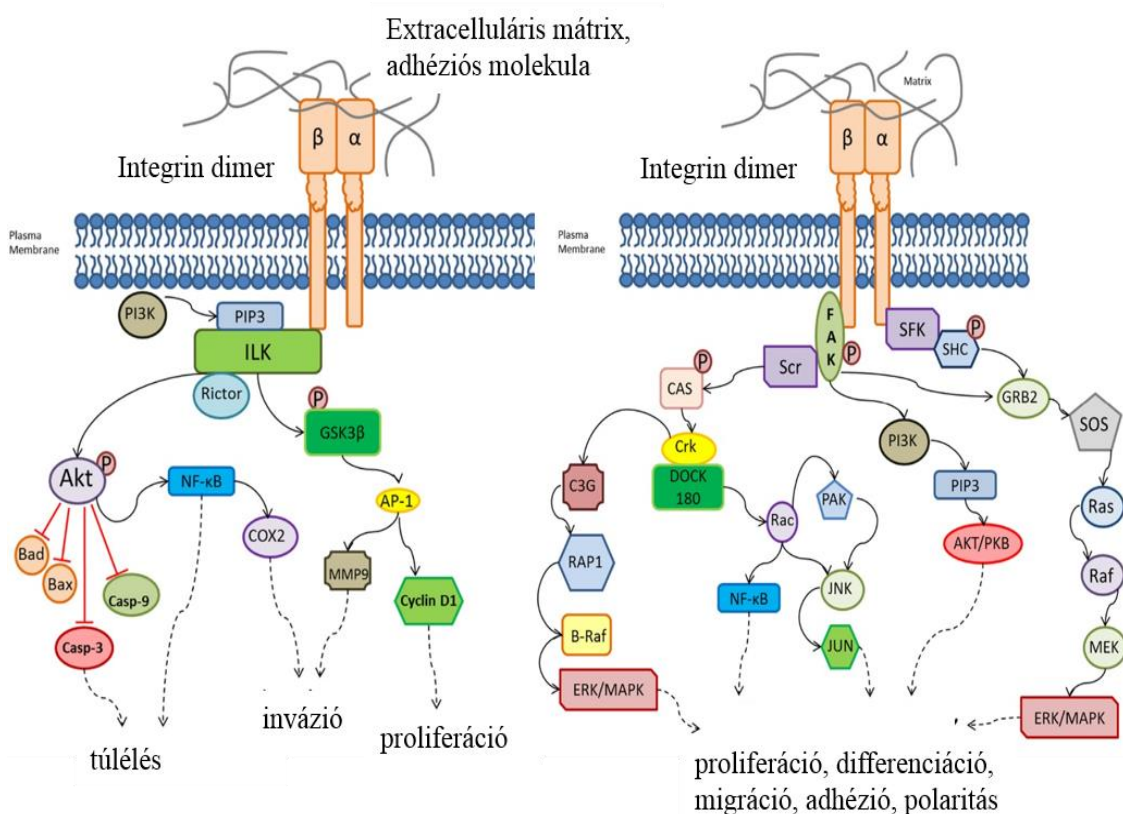
Mint az integrinokra általánosan jellemző, a CD49d/CD29 többféle konformációs állapotban lehet jelen a sejtek felszínén, melyek befolyásolják a molekula ligandkötő affinitását (6. ábra) [57, 64, 69-71]. Alapállapotban a  $\beta$ 1 integrinok alacsony affinitással jellemezhetők. Ebben az állapotban görbült alakban rendelkeznek, a ligandkötőhelyek a plazmamembrán közelében helyezkednek el, az  $\alpha$ - és  $\beta$ -láncok szoros közelségben vannak. Különböző szignálok, mint a BCR, kemokinreceptorok stimulációjának hatására a  $\beta$ -láncokhoz citoplazmatikus fehérjék toborzódnak, melyek konformációváltozást indukálnak az integrinokban. Ezt a kifelé irányuló szignált *inside-out* jelnek nevezzük. A konformációváltozás hatására a molekula a hajlott formából kiegyenesedik, kialakul a receptor ligandkötésre alkalmas aktív formája. Azonban ekkor még kis affinitást mutat, mivel az integrinok feji része zárt állapotban marad. A magas affinitású állapot a ligandkötés hatására bekövetkező további lokális konformációváltozás eredményeként jön létre.



**6. ábra A CD49d/CD29 különböző affinitású konformációi, Lefort és Ley, 2012 nyomán [71].**

A CD49d/CD29 molekula alapállapotban alacsony affinitású zárt konformációban van. *Inside-out* szignálok hatására kialakul a közepes affinitású intermedier forma, majd ligandkötés hatására a magas affinitású, nyitott konformáció indukálódik, mely az *outside-in* jelátvitelt teszi lehetővé.

A ligandkötés kívülről befelé tartó, *outside-in* szignalizációt indukál, mely számos cytoskeletális komponens és intracelluláris jelátviteli út aktiválására képes (7. ábra). A jelátvitel az integrin intracelluláris részéhez közvetlenül kapcsolódó ILK kináz és FAK kináz közvetítésével zajlik, melyek az adhéziót, migrációt, túlélést és proliferációt szabályozzák [72].



**7. ábra A CD49d/CD29 által aktivált főbb jelátviteli utak, Shishido és mtsai, 2014 nyomán [72].**

Ligandkötés hatására a CD49d/CD29 komplex az ILK és FAK kinázok közvetítésével túlélési, proliferációs, adhéziós, migrációs és differenciációs jelpályákat indukál.

A CD49d/CD29 többféle konformációs állapota révén meghatározó szerepet játszik a lymphocyták homing folyamatában (lásd 1.2.3. fejezet). A homing mellett a CD49d-nek szerepe van a leukocyták adhéziójában, fejlődésében, illetve az immunológiai szinapszis kialakításában.

Míg a normál B-sejteken a CD49d nagy arányban van jelen, a CLL-sejtek felszínén különböző mértékben expresszálódik. A cut-off érték 30%, tehát CD49d<sup>+</sup> pozitívnak tekintjük a mintát, ha a CLL-sejtek  $\geq 30\%$ -a expresszálja a CD49d molekulát [73-75]. A magas CD49d szint kedvezőtlen prognosztikai tényező; a CD49d pozitivitás rövidebb összétéléssel és korábbi terápiás indikációval társul [75, 76]. Magasabb CD49d expressziót detektáltak előrehaladott stádiumban (Rai III, IV), a Richter-szindrómába való transzformációnál, illetve lymphadenopátia esetén [77-79]. Egy újabb tanulmány

szerint a CD49d a legmegbízhatóbb áramlási citometriával detektálható prognosztikus marker, így mérését érdemes beépíteni a rutin diagnosztikába [73]. A CD49d független prognosztikai tényező, azonban enyhe korrelációt mutat a ZAP-70 és CD38 molekulákkal, míg az *IGHV* mutáció szintjével nem mutat összefüggést [76]. A CD49d és CD38 molekulák fizikailag is interakcióba kerülnek közös makromolekuláris komplexet képezve, melynek jelenléte rosszabb prognózist jelez [80].

A CD49d elengedhetetlen a CLL-sejtek migrációjában és homingjában (lásd 1.2.3. fejezet). CD49d<sup>+</sup> CLL-sejtek nagyobb migrációs kapacitással rendelkeznek, mint a CD49d<sup>-</sup> CLL-sejtek, melyet a CD49d-t blokkoló antitesttel történő kezelés is megerősít [53]. Továbbá a CD49d<sup>+</sup> esetekre kifejezettebb csontvelői infiltráció jellemző [53].

CD49d<sup>+</sup> CLL-sejtek nagyobb mértékű adhéziót mutatnak VCAM-1, illetve fibronectinnel fedett felszínre [53, 81]. Lagneaux és munkatársai a VCAM-1 vagy a CD49d direkt gátlásával csökkent adhéziót találtak CLL-sejtek esetén [82]. A legerősebb adhézió-gátlás viszont a CD11a, CD18 és CD49d molekulák együttes blokkolásával alakult ki. A CD49d-VCAM-1 kapcsolódás (a CD11a-ICAM-1 interakcióval együtt) fokozza normál B-sejtek túlélését a germinális centrumban, mellyel hozzájárul a B-sejtek szelekciójához [83]. A CD49d a PI3K-Akt vagy az NF- $\kappa$ B útvonal aktiválásán keresztül képes túlélési jeleket indukálni (7. ábra).

CLL-sejtek esetén azonban ellentmondó eredmények jelentek meg a CD49d közvetlen anti-apoptotikus szerepéről. De la Fuente és munkatársai fibronectinnel kezelt lemezen tenyésztettek CLL-sejteket, mely növelte az *in vitro* túlélést és kemorezisztenciát, valamint emelkedett a Bcl-2/Bax arány [84]. Zucchetto és munkatársai CLL-sejtek VCAM-1 transzfektált fibroblasztokhoz történő protektív adhéziójáról számoltak be, mely csökkentette az apoptózist [85]. Azonban Brachtl és munkatársai CD49d-t gátló antitesttel kezelve, bár csökkent adhéziót detektáltak, különbséget nem találtak a CLL-sejtek viabilitásában csontvelői strómasejt ko-kultúrában [53]. Lagneaux és munkatársai szintén a CLL-sejtek csökkent kitapadását találták a CD49d gátlásával, azonban túlélésbeli különbségről nem számoltak be [82]. Az eddigi eredmények alapján nem tisztázott, hogy a CD49d által kiváltott adhézió direkt vagy indirekt módon járul-e hozzá a CD49d<sup>+</sup> CLL-sejtek fokozott túléléséhez.

A CD49d proliferációban betöltött szerepe szintén nem egyértelmű az irodalom alapján. Leírták azonban, hogy a proliferatív Ki67<sup>+</sup> CLL-frakció CD49d<sup>+</sup> [53, 86], illetve



a CD49d-t kifejező CLL-sejtek nagyobb *in vitro* proliferációs rátával jellemezhetők CD40L-transzfectált fibroblasztokkal történő együtt-tenyésztés során [87]. A CD49d önálló szerepét nehéz meghatározni, mivel szintje korrelál a CD38 expressziójával, mely ligandkötésével képes proliferációt indukálni [55].

## **1.2. A CLL-sejtek mikrokönyezet**

### **1.2.1. A mikrokönyezet szerepe a CLL patogenezisében**

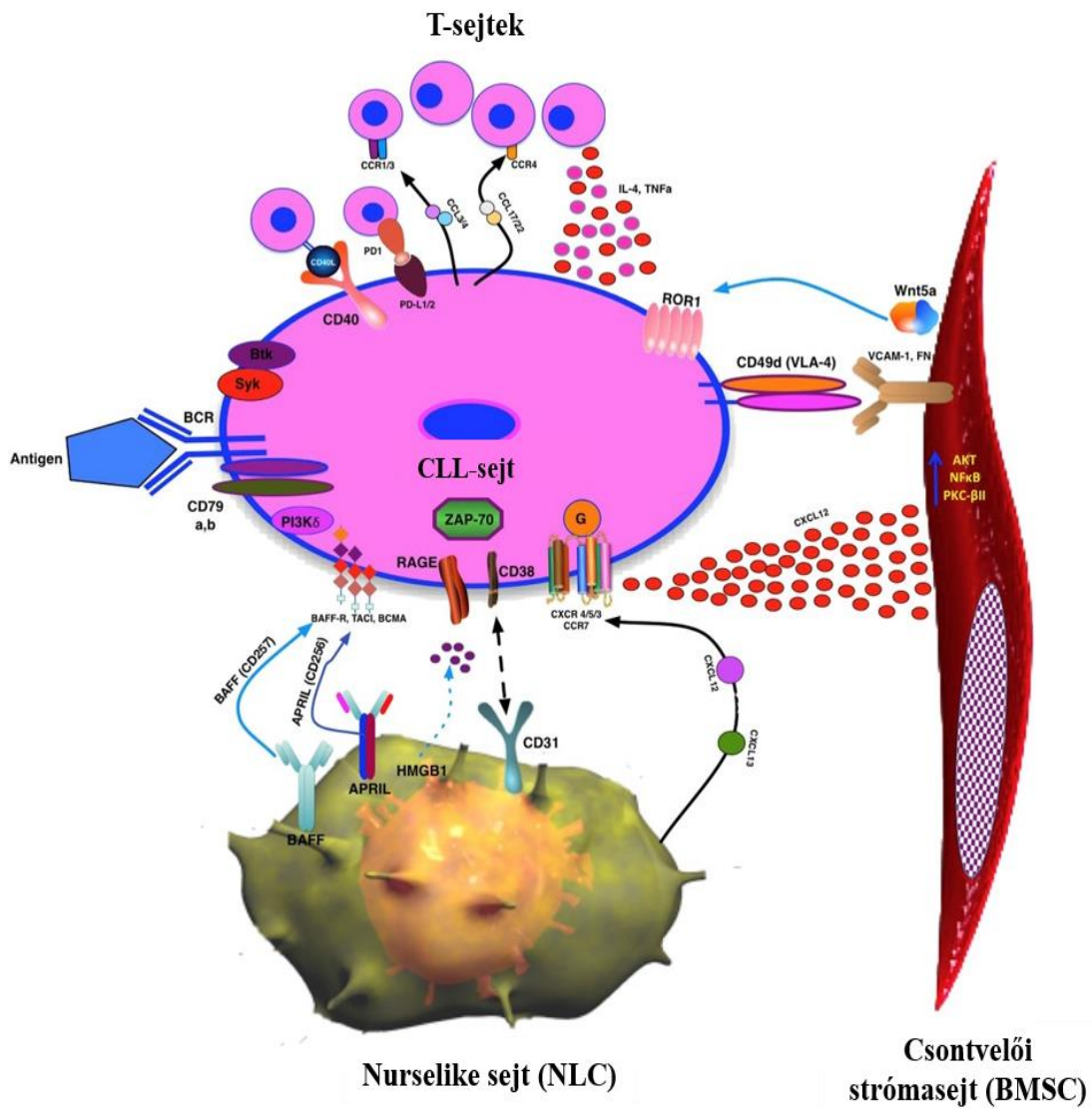
A CLL esetében régóta jól ismert, hogy a belső, genetikai faktorok mellett a mikrokönyezetnek is kulcsszerepe van a betegség patogenezisében. Collins és munkatársai igazolták, hogy a CLL-sejtek *in vivo* hosszú élettartammal rendelkeznek, míg izolálva és *in vitro* tenyésztve spontán apoptózissal gyorsan elpusztulnak [88]. A mikrokönyezet és a CLL-sejtek közötti komplex kapcsolatok meghatározóak a CLL-sejtek apoptózis-rezisztenciájában, a proliferációban, a homingban, a szöveti retencióban, illetve az immunválasz elkerülésében (immune escape) [89-92]. Emellett a mikrokönyezetből származó szupportív szignálok hozzájárulnak a CLL-sejtek kemorezisztenciájához és terápiát követően a minimális reziduális betegség (MRD) jelenlétéhez [93]. A kezelések egyik legfőbb kihívása a reziduális CLL-sejtek eradikációja a csontvelő és a másodlagos nyirokszövetek protektív mikrokönyezeti helyeiről, melynek prognosztikai jelentősége is van: az MRD-negativitás vezet a leghosszabb túléléshez [94]. Így manapság a CLL kezelésében a konvencionális kemoterápiák mellett egyre fontosabb szerepet kapnak a mikrokönyezet elemeit és az általuk kiváltott jelátvitelt célzó terápiák [92, 95].

A CLL-sejtek -vagy legalábbis a perifériás CLL pool egy része- képes recirkulálni a periféria és a lymphoid szövetek között. A progresszióhoz elengedhetetlen, hogy a perifériáról a szövetekbe jussanak, mivel a csontvelő és a másodlagos nyirokszövetek előnyösebb környezetet jelentenek a CLL-sejtek számára. Míg a periférián lévő CLL-sejtek nem osztódnak, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázisban vannak, a szöveti környezetben, legfőképp a nyirokcsomók pseudofolikulus régióiban (kisebb mértékben a csontvelőben) a CLL-

sejtek proliferálnak. A pseudofolikulusokban az osztódó CLL sejtek jellemzője: Ki67<sup>+</sup>, Bcl-2<sup>+</sup>, survivin<sup>+</sup>, magas CD23 expresszió [96]. A CLL-sejtek proliferációs aktivitása különböző, általában az egész klón 1-2 %-a képződik újra naponta [97]. Az osztódáshoz járulékos sejtek, főként CD40L-ot (CD154) expresszáló aktivált CD4<sup>+</sup> T-sejtek és strómasejtek, a nyirokcsomóban a folliculáris dendritikus sejtek (FDC) elengedhetetlenek [98]. A mikroökönyezet sejtes és szolubilis elemei révén elősegíti a CLL-sejtekre jellemző apoptózis-rezisztenciát. Normál B-sejtekkel összehasonlítva a CLL-sejtekben emelkedett az anti-apoptotikus Bcl-2 és Mcl-1 expressziója, illetve csökkent a pro-apoptotikus fehérjék (Bax) szintje [99, 100].

### **1.2.2. A mikroökönyezet sejtjei és a CLL-sejtekkel kialakított interakciók**

A szöveti mikroökönyezetet mezenchimális strómasejtek, monocyta eredetű nerselike-sejtek, T-sejtek, NK-sejtek, a nyirokcsomók folliculáris dendritikus sejtjei és az extracelluláris mátrix alkotják. A CLL-sejtekkel való interakció sejtes és szolubilis faktorok révén a BCR, adhéziós molekulák, citokin- és kemokin receptorokon, kostimulációs molekulákon, immunellenőrzőpont molekulákon keresztül valósul meg (8. ábra) [90].



**8. ábra A CLL-sejtek interakciója a mikro környezet sejtjeivel, Choi és mtsai, 2016 nyomán [89].**

A CLL-mikro környezetet mezenchimális strómasejtek, nurselike-sejtek, T- és NK-sejtek, folliculáris dendritikus sejtek, valamint az extracelluláris mátrix alkotja. A tumorsejtek és a mikro környezet közti komplex kapcsolatok adhézións molekulák (CD49d-VCAM-1, CD38-CD31), citokinek (IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ ), kemokinek (CXCL12, CXCL13), immunellenőrzőpont molekulák (CTLA-4, PD1), kostimulációs molekulák (CD40, CD80, CD86) és a BCR közvetítésével alakulnak ki.

### 1.2.2.1. Mezenchimális strómasejtek (BMSC)

A mezenchimális strómasejtek a csontvelőben és a másodlagos nyirokszövetekben találhatóak, a csontvelőben csontvelői strómasejteknek nevezzük őket (BMSC-*bone marrow stromal cell*). Míg normál csontvelőben a strómasejt-populáció csak kis hányadát adják a mezenchimális strómasejtek, a CLL-mikrokörnyezetben domináns stróma-alkotók [101]. Széles körben elterjedt az izolált BMSC vagy stróma sejtvonalak (humán: HS-5, UE6E7T-2, egér: M2-10B4) alkalmazása a mikrokörnyezet modellezésére. Ezek a kísérletek bizonyították, hogy a BMSC-k önmagukban csökkentik a CLL-sejtek spontán és gyógyszer-indukálta apoptózisát [53, 82, 102-105]. A CLL sejt-stróma kapcsolódást a CD49d/CD29-VCAM-1, a CD11a/CD18 (LFA-1 integrin)–ICAM-1 és a CD38/CD31 adhéziós molekulák közvetítik. A stróma jelenlétében a CLL-sejtek fokozzák felszínükön a CD49d és CD18 integrinek expresszióját, ezzel fokozva az adhéziót [102].

Érdekes módon a BMSC-kultúra a direkt kontaktusba került CLL-sejteknel ugyanolyan mértékben csökkentette az apoptózist, mint a nem-adherens CLL-frakciónál [53]. A direkt sejtkontaktus mellett a szolubilis faktorok fontosságát mutatja az is, hogy a BMSC-kondicionált médium is növelte a CLL-sejtek túlélését [104]. A BMSC-k számos citokint és kemokint szekretálnak, melyek elősegítik a túlélést, mint az IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , bFGF, CXCL12 (SDF-1), CXCL10 [104, 106, 107]. Jellemző a stróma Wnt5a termelése, mely a CLL-sejteken nagymértékben expresszálandó ROR1 fehérjéhez kötődve vált ki apoptózis-gátlást a Wnt szignálúton keresztül [108].

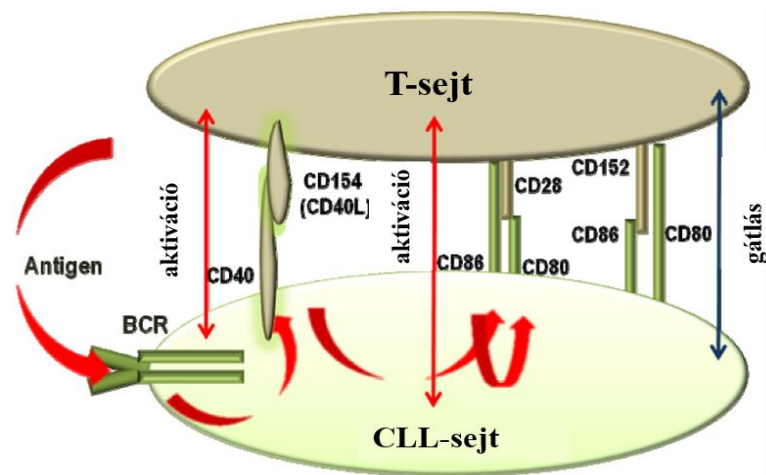
A stróma aktiválja a nyugvó CLL-sejteket, fokozva a CD71, CD69, CD25 és CD70 expressziót [103]. A CLL-stróma kapcsolat azonban kétirányú, a CLL-sejtek is aktiválják a BMSC-eket, tovább fokozva anti-apoptotikus hatásukat. CLL-sejtek jelenlétében strómasejtekben fokozódik a PKC $\beta$ II expressziója, mely az NF- $\kappa$ B útvonalat aktiválja [109]. Emellett a CLL-sejtek hatására a BMSC-k túlélést elősegítő IL-6 és IL-8 szekréciója emelkedik, valamint növekszik az ICAM-1 adhéziós molekula expressziója, így fokozva az adhéziót [102].

### 1.2.2.2. Nurselike-sejtek (NLC)

A nurselike-sejtek (NLC-*nurse-like cells*) monocyta-eredettel rendelkeznek, hasonlóan a tumor-asszociált makrofágokhoz [89]. CLL-ben a csontvelőben és a nyirokcsomókban található, de vérből izolált monocytákból *in vitro* spontán is differenciáltathatók [110]. A NLC-k meghatározók a CLL progresszióban, mivel fokozzák a CLL-sejtek túlélését és proliferációját [110]. CXCL12 és CXCL13 termelésük révén vonzzák magukhoz a CLL-sejteket, melyekkel számos adhéziós molekula (pl. CD31), kemokinek, citokinek révén, valamint a BCR jelút és a TNF családba tartozó BAFF és APRIL aktiválásán keresztül lépnek interakcióba [91, 110].

### 1.2.2.3. T-sejtek és NK-sejtek

A CLL-sejtek szoros közelségbe kerülnek T-sejtekkel a mikro környezetben (9. ábra) [111]. A pseudofollikulusokban  $CD40L^+$   $CD4^+$  T-sejtek segítik a CLL-sejtek proliferációját. A CD40-CD40L kapcsolódás emellett a CLL-sejtek aktiválódását, fokozott adhézióját és túlélését is kiváltja [112].



9. ábra A CLL-sejtek és a T-sejtek interakciója, Vladimirova és mtsai, 2015 nyomán [111].

A CLL-sejtek kostimulációs, immunellenőrzőpont-, adhéziós molekulák, valamint a BCR közvetítésével kerülnek kapcsolatba a T-sejtekkel. A kétirányú kapcsolat révén a CLL-sejtek anti-apoptotikus és proliferációs szignálokat kapnak, a T-sejtek esetén pedig anergia, tolerancia indukálódik.

A T-sejtekre jellemző a CD4/CD8 arány megfordulása. Azonban a CD8<sup>+</sup> T-sejtek funkcionálisan sérültek, csökkent citotoxicitást mutatnak: gátlódik a granzim vezikulákba kerülése és hibás a degranuláció [113, 114]. A T-sejtek fokozott IFN $\gamma$  és TNF- $\alpha$  termeléssel jellemezhetők, melyeknek apoptózis-védő szerepük van [115]. CLL-ben a T-sejtekre a krónikus aktiváció és kimerülés jellemző, melyet a magas HLA-DR, CD69, CD57 és PD-1 expresszió jelez [115]. CLL-sejteken nagy arányban van jelen a PD-1 ligand (PDL1), mely a PD-1-hez kapcsolódva gátolja a T-sejtes immunválasz kialakulását [116]. T-sejteken csökkent a CD28 kostimulációs ligand szintje, valamint normál B-sejtekhez képest a CLL-sejtek is alacsonyabban expresszálják a CD80 (B7-1) és CD86 (B7-2) kostimulációs molekulákat [117]. Kostimuláció hiányában hatékony immunválasz helyett tolerancia vagy anergia indukálódik. A csökkent anti-tumor celluláris immunválaszt tovább erősíti a CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatórikus T-sejtek (T<sub>reg</sub>) fokozott aránya CLL-ben [118].

NK-sejtekre szintén defektusok jellemzők: hiányoznak a citoplazmatikus granulumok, valamint sérül az aktin-polimerizáció és az immunológiai szinapszis [119]. Emellett a CLL-sejtek direkt sejtkontaktus révén (MHC-I) tolerogén fenotípusú NK-sejteket indukálnak, tovább gátolva a citotoxikus választ [91].

### **1.2.3. A CLL-sejtek homingja**

A homing egy többlépcsős, aktív migrációs folyamat, mely során a CLL-sejtek a perifériás vérből a vaszkuláris endothéliumon keresztül lymphoid szövetekbe jutnak (10. ábra). A homing kulcsfontosságú a CLL progressziójában a szöveti mikrokörnyezet proliferációs és túlélési szignáljai miatt. Lymphadenopathia és csontvelői érintettség agresszívebb kórlefolyást és rossz prognózist jelez [2]. A homing dinamikusan kialakuló, majd felbomló adhézios kapcsolatokon alapul, melyben integrinek mellett (főleg CD49d/CD29, CD11a/CD18) mucinok, C-típusú lektinek (szelektinek, CD44), Ig szupercsaládba tartozó adhézios molekulák (VCAM-1, ICAM-1) és kemokinreceptorok vesznek részt [120].

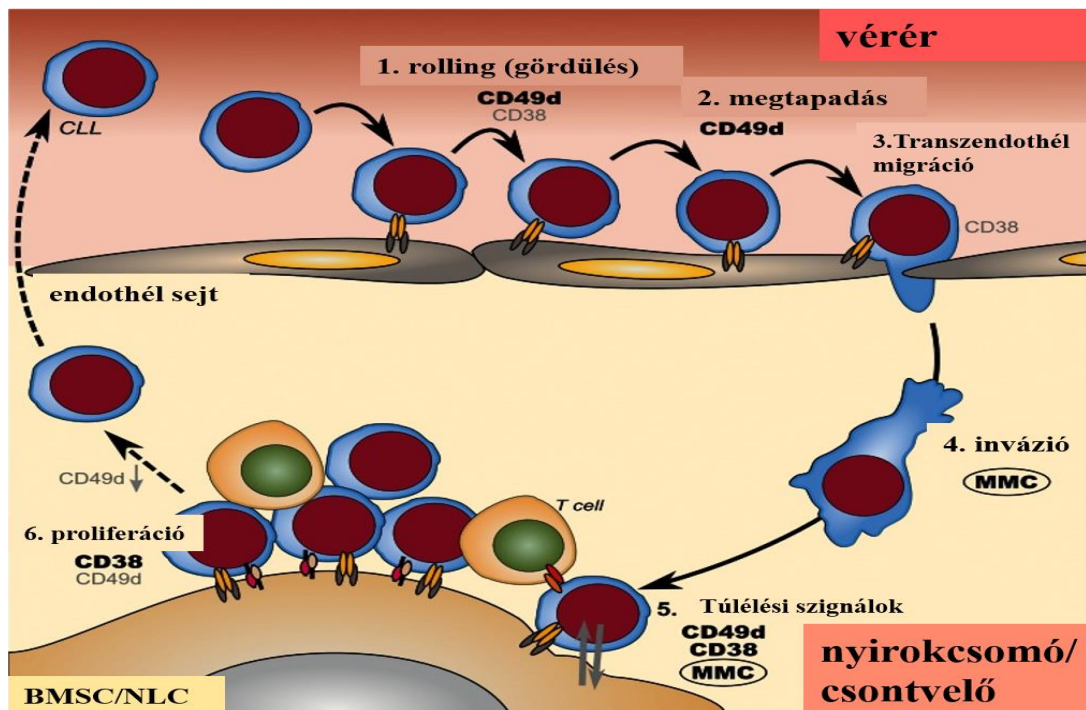
A lymphoid szövetekbe vándorlást kemokinek és receptoraik irányítják [120]. CLL-ben meghatározó a strómasejtek és NLC-k által szekretált CXCL12 kemokin-grádiens irányába történő migráció. A CXCL12 receptora a G-fehérje-kapcsolt CXCR4 (CD184), mely CLL-sejtek felszínén expresszálódik. Perifériás vér CLL-sejtjei magasan

expresszálják a CXCR4 receptort. A nyirokcsomóban, csontvelőben a stróma által termelt magas CXCL12 szint miatt a CLL-sejtek csökkent CXCR4 expressziót mutatnak, mivel a receptor ligandkötés hatására internalizálódik [110]. A CXCL12 a CXCR4 receptorhoz kötődve kemotaxist, migrációt, aktin-polimerizációt indukál a CLL-sejtekben, ezen kívül direkt túlélést-segítő szerepét is leírták [110]. A CXCL12-nek fontos szerepe van az integrinek konformáció-váltásának kiváltásában a homing során. A CLL-sejtek heterogén CXCR4 kifejeződéssel jellemezhetők, a proliferáló CD38<sup>+</sup> CD5<sup>bright</sup> szubpopuláció alacsonyabban expresszálja a CXCR4 molekulát [54, 121]. A BCR stimulációja is csökkenti a CXCR4 szintet és növeli a CXCL12 irányította kemotaxist [122].

A szövetekbe vándorlásban a CXCL12 mellett a stróma által termelt CXCL13, CCL19 és CCL21 is meghatározó [78, 120]. BCR szignálút hatására az aktivált CLL-sejtek fokozzák a CCL3 és CCL4 kemoattraktánsok termelését, mellyel monocytákat, makrofágokat és lymphocytákat toboroznak a közelükbe [123]. A monocyták citokintermelésük révén tovább aktiválják a CLL-sejteket, illetve TNF- $\alpha$  hatására fokozzák a vaszkuláris endothélsjtek és strómasejtek VCAM-1 expresszióját, fokozva a CD49d-mediálta adhéziót és migrációt [124].

A CLL-sejtek homingjában az integrinek, különösen a CD49d/CD29 szerepe kulcsfontosságú. A transzendotheliális migráció során a CLL-sejtek a keringésben lelassulnak, majd az endothélsjtek felszínéhez kapcsolódnak (tethering). Ezt követően gördülni (rolling) kezdenek az endothél felszínén, melyet integrinek (CD49d/CD29, CD11a/CD18) közvetítenek (10. ábra). A CLL-sejtek normál B-sejtekhez képest sérült transzendotheliális migrációval rendelkeznek: csökkent a kezdeti megtapadást (tethering) irányító L-selectin (CD62L) és a CD11a/CD18 szintje, így a homing fő mediátora a CD49d/CD29 [52, 125, 126]. A rolling során az integrinek alacsony affinitással kötik ligandokat, vagyis a CD49d/CD29 az endothélsjteken kifejeződő VCAM-1 molekulát. A fokozódó ligandkötés, illetve a CXCL12 általi stimuláció hatására a CD49d/CD29 magas affinitású konformációja indukálódik, melynek hatására a CLL-sejtek és az endothélsjtek között szoros adhézió alakul ki (firm adhesion). Ezt követően a CLL-sejt áthalad két endothélsajt között (diapedezis), melyet a CD38 és az endotheliális tight junction alkotásában részt vevő ligandja, a CD31 is közvetít (10. ábra). A lymphoid szövetekben történő migrációban (invázió) a CLL-sejtekre specifikus makromolekuláris sejtfelszíni komplex kritikus, melyet a CD49d/CD29, a CD38, a CD44 splice variánsa

(CD44v) és a mátrix metalloproteináz 9 (MMP-9) alkot [80]. A CD44 az extracelluláris mátrix-alkotó hyaluronsav receptora, mely a migráció és a homing mellett túlélési jelet is közvetít [127]. CD44 gátló antitesttel történő kezelés az Mcl-1 anti-apoptotikus fehérje-szint csökkenését és alacsonyabb túlélést eredményezett [128]. Az MMP-9 a CLL-sejtek fő mátrix metalloproteináza, a bazális membrán és extracelluláris mátrix bontásában játszik szerepet. Emellett strómasejt-ko-kultúras kísérletek anti-apoptotikus szerepét is igazolták [129]. A magas intracelluláris MMP-9 expresszió rosszabb prognózist jelez [129]. Csontvelőből, nyirokcsomóból izolált CLL-sejtek emelkedett MMP-9 szintet mutatnak; expresszióját a CXCR4 és CD49d/CD29 stimulációja is befolyásolja [130].



**10. ábra** A CLL sejtek homingja, kiemelve a CD49d szerepét, Brachtl és mtsai, 2013 nyomán [52].

A perifériás CLL-sejtek az alacsony affinitású CD49d/CD29 integrin részvételével az endothélsejtek felszínéhez kapcsolódnak, majd gördülni kezdenek (rolling) az endothél felszínén. Az integrinek aktivációja révén a CLL-sejtek megtapadnak, majd a CD38-CD31 interakció közvetítésével áthaladnak az endothélsejtek között. A szövetekben történő inváziót a CD49d/CD29, CD38, CD44v, MMP-9 makromolekuláris komplex (MMC) teszi lehetővé. A szöveti mikrokörnyezet sejt és szolubilis elemei túlélési és proliferációs jelet szolgáltatnak a CLL-sejteknek. STOP szignálok hatására csökken az adhéziós molekulák expressziója és a CLL-sejtek a keringésbe recirkulálnak.



A csontvelőben, nyirokcsomóban a CLL-sejtek a környező sejtekkel kialakított interakciók során proliferálnak és túlélési jeleket kapnak. Stop-szignálok hatására az adhéziós molekulák felszíni expressziója csökken a CLL-sejteken és a szövetekből a keringésbe recirkulálnak (10. ábra).

CLL esetén a rendkívül változatos betegségfolyás okán a magas kockázatú betegcsoport becslése kiemelt fontosságú. A CLL egyik legfontosabb differenciál-diagnosztikai markere a CD23. A differenciál-diagnosztikai szerepének ellenére a CLL-sejtek változó mértékben fejezik ki a CD23-at, alacsony expressziója prognosztikus jelentőséggel is bír. CLL esetén nem ismert a CD23 izotípusok megoszlása a különböző CD23 expressziójú csoportokban, továbbá az sem, hogy az izotípusok aránya alapján elkülöníthetők-e betegség-alcsoportok, melyek kapcsolatosak a CLL progressziójával.

A CLL progresszióban kiemelt szerepe van a tumor mikrokozonyezetnek. A mikrokozonyezeti interakciók fontos közvetítője a CD49d adhéziós molekula, mely a legmegbízhatóbb áramlási citométerrel detektálható prognosztikus marker. A CLL patogenezisében betöltött pontos szerepéről ellentmondásosak az eddig megjelent eredmények, különösen az apoptózis-gátlást tekintve, mely a CLL-sejtek egyik fő jellemzője. Az irodalom alapján nem tisztázott, mi állhat a CD49d negatív prognosztikus hatásának hátterében.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a CLL-sejtek immunfenotípusát vizsgáltuk, különös tekintettel a CD49d és CD23 prognosztikus markerekre. Vizsgálatainkkal az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

### 1. A CD23 expresszió szerepe a CLL prognózisában:

- A CD23 izotípusok (CD23a és CD23b) expressziójának vizsgálata mRNS-szinten CLL-sejtekben, valamint más CD23<sup>+</sup> lymphoma sejtekben
- A CD23 expresszió mutat-e korrelációt más prognosztikus vagy immunfenotípusos markerekkel
- A CD23 expresszió összefüggése klinikai paraméterekkel, valamint elkülöníthetők-e betegség-alsoportok a CD23 expresszió alapján

### 2. A magas CD49d expresszió szerepének vizsgálata:

- A CD49d korrelációja prognosztikus markerekkel és mikro környezeti interakciókért felelős felszíni molekulákkal
- A CD49d-VCAM-1 kapcsolódás közvetlen szerepének *in vitro* vizsgálata az apoptózis-gátlásban, proliferációban, az aktin-átrendezésben, illetve immunfenotípus-váltásban
- A CD49d/CD29 molekula aktív konformációjának vizsgálata a CLL-sejtek felszínén

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Betegek

A CD49d és más mikrokörnyezeti markerekkel foglalkozó *in vitro* kísérleteinkben 80 CLL-ben szenvedő beteg perifériás vérmintáját használtuk fel. 4 beteg esetén csontvelő aspirátum mintákkal is dolgoztunk. A CD23 expressziós eredményekhez 54 CLL-es beteg anyagát (49 perifériás vérminta és 5 csontvelő aspirátum), 10 MZL-es beteg perifériás vérmintáját, illetve 13 MCL-es (12 perifériás vér, 1 csontvelő aspirátum) esetet vontunk be. A férfi/nő arányt, illetve az életkorokat tartalmazó adatokat a 2. táblázatban összegeztük.

**2. táblázat** A kísérletek beteganyagainak főbb jellemzői

Diagnózis	Férfi/női arány	Átlagéletkor	Életkor eloszlás
CLL (CD49d expressziós kísérletek)	1,4	66	43-83
CLL (CD23 expressziós kísérletek)	1,25	68	43-93
MCL	1,3	63	52-87
MZL	0,67	77,5	67-83

Kontrollnak reaktív tonsillából izolált B-sejteket, valamint perifériás mononukleáris sejteket használtunk, melyek egészséges alanyoktól származnak. A minták diagnózisát a WHO lymphoid tumorok klasszifikációjára vonatkozó kritériumainak megfelelően állították fel a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben [1]. A tanulmányba bevont betegek még soha vagy a kísérleteket megelőző 6 hónapban nem kaptak kezelést. A vizsgálatok a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően, a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának (TUKEB) engedélyével készültek.

### 3.2. Lymphoma sejtek izolálása

Perifériás vér és csontvelő aspirátum mintákból mononukleáris sejteket izoláltunk Ficoll-Histopaque oldattal (Sigma Aldrich, San Louis, MO, USA) történő sűrűséggrádiens centrifugálással.

Tenyésztéses kísérleteinkhez olyan CLL-es mintákat használtunk fel, melyeknél a tumorsejtek aránya a mononukleáris sejtek között 90% feletti volt, ezt áramlási citometriával ellenőriztünk CD5 és CD19 koexpresszió alapján.

A molekuláris vizsgálatokhoz izolált sejteket a felhasználásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

### 3.3. RNS izolálás és reverz transzkripció

A PCR és real-time PCR vizsgálatokhoz a sűrűséggrádiens centrifugálással izolált sejtekből Trizol reagenssel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) RNS-t nyertünk ki. Az RNS mennyiségét Nanodrop II fotométerrel mértük le (Wilmington, USA). Az izolált RNS-t felhasználásig  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Mintánként 2,5  $\mu\text{g}$  RNS-ből készítettünk cDNS-t (reverz transzkripció) High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) használatával. A reakcióelegyek összetételét a 3. táblázatban foglaltuk össze. A cDNS-ek átírása ABI 2720 (Applied Biosystems) PCR készülékben valósult meg az alábbi kondíciókkal:  $25^{\circ}\text{C}$  10 perc,  $37^{\circ}\text{C}$  120 perc. A cDNS mintákat a további felhasználásig  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

**3. táblázat** A reverz transzkripció reakcióelegy-összetétele

Komponens	Térfogat/reakció
10x Reverse Transcription puffer	5 $\mu\text{l}$
25x dNTPs	2 $\mu\text{l}$
10x random primers	5 $\mu\text{l}$
MultiScribe Reverse Transcriptase	2,5 $\mu\text{l}$
Nukleáz mentes víz	10,5 $\mu\text{l}$
RNS templát	25 $\mu\text{l}$
Végtérfogat	50 $\mu\text{l}$

### 3.4. CD23a és CD23b izoformák mRNS expresszió-analízise hagyományos és kvantitatív valós-idejű PCR-rel

A CLL, MCL, MZL és egészséges kontroll B-sejtek CD23 mRNS expressziós szintjét RNS-izolálást és reverz transzkripciót követően először hagyományos PCR-rel ellenőriztük. Az amplifikációhoz a primereket Matsui és munkatársainak cikke alapján választottuk ki [131]. A beméréseket a 4. táblázatban foglaltuk össze. Az amplifikációt ABI 2720 PCR készülékben (Applied Biosystems) végeztük el az alábbi ciklusparaméterekkel: [98°C 30 másodperc, 98°C 10 másodperc, 68°C 30 másodperc, 72°C 30 másodperc] x 35 ciklus, 72°C 7 perc. Az amplifikált termékek detektálása agaróz gélelektroforézissel történt.

**4. táblázat** Hagományos PCR reakcióelegy-összetétele

<b>Komponens</b>	<b>Térfogat/reakció</b>
HF (High-Fidelity) puffer	4 µl
dNTP 2 µM	2 µl
Forward és reverse primerek	1-1 µl
Phusion polimeráz	0,2 µl
Nukleáz mentes víz	8,8 µl
cDNS templát	3 µl
Végtérfogat	20 µl

A CD23 izoformák kvantitatív analízisét valós-idejű (real-time) PCR technikával végeztük el. A CD23a és CD23b izoformák tanulmányozásához TaqMan® génexpressziós rendszert használtunk. A CD23 izoformákra specifikus TaqMan® próbákat Primer express szoftverrel (Applied Biosystems) terveztük meg, melyeket az 5. táblázatban foglaltunk össze. A polimeráz láncreakciót ABI Prism 7300 Sequence Detection System valós-idejű PCR géppel végeztük el (Applied Biosystems). Az amplifikáció 100 ng cDNS templát felhasználásával 50 cikluson keresztül 20 µl végtérfogatban zajlott a 6. táblázatban feltüntetett hőprofilal. A CD23a és CD23b

expressziós értékek normalizálásához belső kontrollként  $\beta$ -aktin gént (TaqMan® Control Reagent, Life Technologies, 4352935E) alkalmaztunk. Minden minta esetén három párhuzamos mérést futtattunk. Kiértékeléséhez a Sequence Detection Software 1.3 programot (Applied Biosystems) használtuk. A program az eredményeket  $C_T$  (threshold cycle) értékben fejezi ki, mely azt a ciklusszámot jelöli, ahol a relatív fluoreszcencia-szint eléri az általunk beállított küszöbértéket. A CD23 izoformák relatív expresszióját  $\Delta\Delta C_T$  módszerrel határoztuk meg: ez kifejezi a CLL-, MCL- és MZL-sejtek esetén a CD23a és CD23b mRNS-ek expresszióját az egészséges kontroll alanyokhoz képest a belső kontroll ( $\beta$ -aktin) értékéhez normalizálva.

**5. táblázat** A CD23 izoformákra specifikus TaqMan próbák

<b>Primer</b>	<b>Szekvencia</b>
CD23a-F	5'-TGCTCCATCATCGGGAGAA-3'
CD23a-R	5'-TCTCTGAATATTGACCTTCCTCCAT-3'
CD23a-TaqMan	5'-6FAM CCAAGCAGGACCGC-MGB-3'
CD23b-F	5'-TCAGAGGCCAAATAGAACAGGAA-3'
CD23b-R	5'-GGCTTGGAGGATTCATTATGCT-3'
CD23b-TaqMan	5'-6FAM TTGGAACAAGCAGAATT-MGB

**6. táblázat** A real-time PCR hőprofilja

<b>Lépés</b>	<b>Hőmérséklet/Idő</b>
Aktiváció	50°C, 2 perc
Kezdeti denaturáció	94°C, 10 perc
Denaturáció	94°C, 15 másodperc
Anelláció-Extenzió	60°C, 1 perc

### **3.5. Immunfenotípus meghatározása áramlási citometriával**

Az áramlási citometriás mérésekhez a sejteket fluoreszcens festékekkel direkt jelölt monoklonális antitestekkel jelöltük. Ezeket a 7. táblázatban foglaltuk össze.

A CD23 expressziós vizsgálatok esetén az áramlási citometriás mérésekhez a CLL-sejteket nem izoláltuk; a vér és csontvelő mintákban lévő vörösvértesteket FACS Lysing oldattal (BD Biosciences) távolítottuk el.

A sejtenyésztes vizsgálatoknál izolált CLL-sejtekkel dolgoztunk, melyeket PBS-ben vettünk fel a jelöléshez. A méréseket FACSCalibur (BD Biosciences) áramlási citométerrel végeztük el, az eredmények kiértékelése CellQuest Pro szoftverrel (BD Biosciences) történt. Az áramlási citométer beállításait és fluoreszcens kompenzációit caliBRITE gyöngyökkel (BD Biosciences) rendszeresen ellenőriztük. Minden mintából 20000 eseményt mértünk le. Az eredmények kiértékelésekor az FSC-SSC dotploton a lymphocyták kapura gáteltünk, ezen belül a vizsgáltuk a CD19<sup>+</sup> populáció immunfenotípusát. A 7 nap tenyésztést követően mért mintáknál az élő sejteken belül elemeztük a CD19<sup>+</sup> sejtcsoport immunfenotípusát. A CD49d pozitivitás meghatározásához az irodalom által javasolt 30%-os cut-off értéket használtuk (72-74). A CXCR4 cut-off értékét (62,1) 80 db perifériás CLL mintánál mért átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) mediánja adta. Az eredményeket átlagos fluoreszcencia intenzitásban (MFI) vagy a pozitív sejtek %-os arányában adtuk meg.

## 7. táblázat Immunfenotípus meghatározásához alkalmazott antitestek

<b>ellenanyag</b>	<b>klón</b>	<b>gyártó</b>
<b>anti-CD5-FITC</b>	DK23	DAKO Glostrup, Denmark
<b>anti-CD49d-PE</b>	L25	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>anti-CD19-PC5.5</b>	J3-119	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
<b>anti-CD38-FITC</b>	AT13/5	DAKO
<b>anti-CD29-PE</b>	HUTS-21	BD Biosciences
<b>anti-CD29-APC</b>	MAR4	BD Biosciences
<b>anti-CD184 (CXCR4) -PE</b>	12G5	BD Biosciences
<b>anti-CD80-FITC</b>	L307.4	BD Biosciences
<b>anti-CD86-PE</b>	2331	BD Biosciences
<b>anti-CD126-APC</b>	UV4	BioLegend, San Diego, CA, USA
<b>anti-CD20-PE-Cy5</b>	B-Ly1	DAKO
<b>anti-CD22-PE</b>	4KB128	DAKO
<b>anti-CD23-PE</b>	MHM6	DAKO
<b>anti-CD44-FITC</b>	BJ18	BioLegend
<b>anti-ROR1-VioBright FITC</b>	2A2	Miltenyi



### 3.6. FISH

A CD23 expresszióval kapcsolatos CLL eseteknél a del11q23, del17p13, del13q, 12tri, az MCL eseteknél a t(11;14) kromoszómaaberrációkat FISH analízissel detektáltuk. A vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet FISH laboratóriuma végezte el rutin diagnosztikai protokollok szerint. Az analízis az alábbi próbákkal valósult meg: CEP11/ATM, CEP17/p53, 13q34/13q14, CEP12 és LSI IGH/CCND1 (Abbott Laboratories (Vysis), IL).

### 3.7. Sejttenyésztés

Az izolált CLL-sejteket  $2 \times 10^6$  sejt/ml koncentrációban tenyésztettük 10% főtális szarvasmarha savóval (FBS; Sigma Aldrich), gentamycinnel (Sandoz, Boucherville, QC, Kanada) és 2mM L-glutaminnal (Gibco, Carbbad, CA, USA) kiegészített RPMI-1640 médiumban (Sigma Aldrich). A CLL-sejteket 7 napig tenyésztettük különböző körülmények között: 1) CLL-sejtek önmagukban, 2) VCAM-1 fedett plate-n vagy 3) BMSC ko-kultúrában.

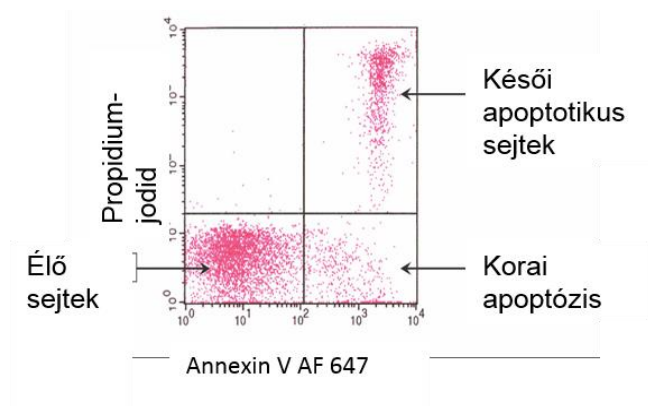
A BMSC ko-kultúrák kísérletekhez Dr. Plander Márk bocsátotta rendelkezésünkre az általa izolált és tenyésztett, majd felhasználásig folyékony nitrogénben fagyasztva tárolt strómasejteket. A csontvelői strómasejt kultúrák kóros sejtet nem tartalmazó, rutin diagnosztikai csontvelő aspirátumból izolált mononukleáris sejtekből származtak. A fagyasztásból felvett sejteket  $2 \times 10^4$  sejt/ml koncentrációban tenyésztettük 24 lyukú plate-n 20% FBS-t, gentamycint és 2mM L-glutamint tartalmazó DMEM médiumban (Dulbecco's modified Eagle's medium; Sigma Aldrich). A ko-kultúrákhoz a strómasejtekről óvatosan leszívtuk a DMEM médiumot, majd rárétegeztük az RPMI-1640 médiumban (10% FBS, gentamycin, L-glutamin) szuszpendált CLL-sejteket  $2 \times 10^6$  sejt/ml koncentrációban.

### 3.8. Plate-k és tárgylemezek VCAM-1 coatolása

48 lyukú plate-t vagy tárgylemezt 10 µg/ml, bikarbonát pufferben hígított VCAM-1 molekulával (R&D Systems, Minneapolis, USA) coatoltunk 2 órán keresztül 37 °C-on vagy egy éjszakán át 4°C-on. Miután a VCAM-1 oldatot leszívtuk, háromszor mostuk PBS pufferrel, majd a nem specifikus kötőhelyeket 1%-os BSA oldattal blokkoltuk 2 órán keresztül 37°C-on. A BSA oldat leszívása után a plate-t vagy a tárgylemezt háromszor mostuk PBS pufferrel, majd rámértük az izolált CLL sejt-szuspenziót.

### 3.9. Apoptózis-mérés

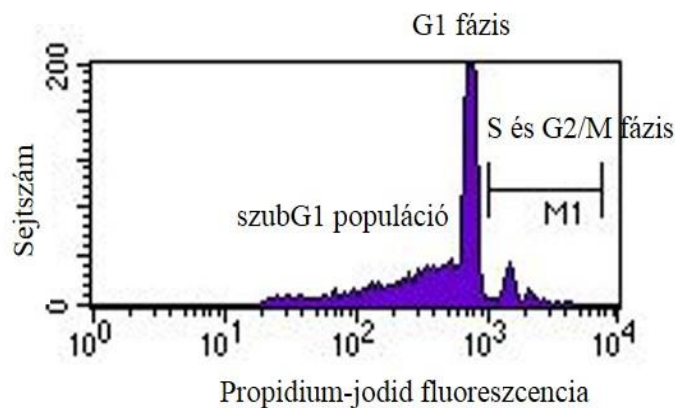
7 nap tenyésztést követően mintánként 10<sup>5</sup> sejtet kétszer mostunk PBS pufferrel, majd 100 µl Annexin V Binding pufferben szuszpendáltunk fel. A sejteket 5 µl Annexin V-Alexa 647 (Biolegend) és 1mg/ml propidium-jodid (PI-Sigma Aldrich) festékekkel jelöltük meg. 15 perc inkubációt követően a sejtszuspenzióhoz 100 µl Annexin V Binding puffert adtunk, majd FACSCalibur áramlási citométerrel mértük és CellQuest Pro szoftverrel értékeltük. Az annexin V és PI negatív populációt tekintettük élőnek (11. ábra).



11. ábra Az annexin V/propidium-jodid festés analízise.

### 3.10. Sejtciklus-vizsgálat

$5 \times 10^5$  sejtet jéghideg 70%-os etanolban fixáltunk, majd alkalikus extrakció (200 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4) és RNáz (Sigma Aldrich) kezelést követően 1 mg/ml PI-vel festettünk meg. Az áramlási citometriás mérések FACSCalibur készüléken valósultak meg, a kiértékelést Kaluza szoftverrel (Beckman Coulter, Brea, CA) végeztük. A PI fluoreszcenciája alapján az S és G2/M fázisban lévő sejteket tekintettük proliferatív frakciónak (12. ábra).



#### 12. ábra Egy proliferatív CLL-es minta analízise.

A sejtciklust a propidium-jodid fluoreszcenciájának alapján elemeztük. Proliferatív frakciónak az S és G2/M fázisban lévő sejteket tekintettük.

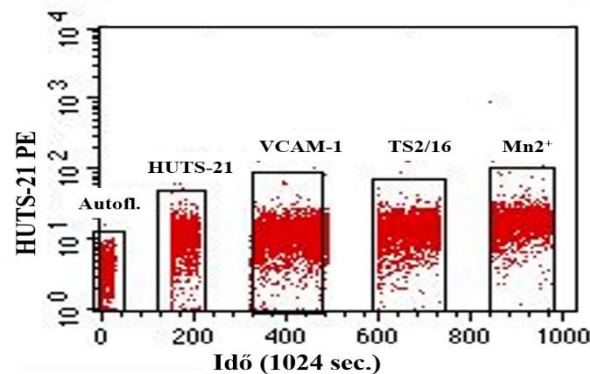
### 3.11. Proliferációs markerek detektálása áramlási citometriával

A Ki67 és ciklinD<sub>2</sub> proliferációs markereket intracelluláris kettős jelöléssel vizsgáltuk. Mintánként  $10^6$  izolált CLL sejtet intracelluláris jelölésre ajánlott IntraStain Kit-tel (Dako) fixáltunk és permeabilizáltunk. Ezt követően a mintákat nyúl anti-Ki67 (clone SP6, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) és egér anti-ciklinD<sub>2</sub> (clone 131205, AbD Serotec, Düsseldorf, Germany) jelületlen elsődleges antitesttel jelöltük és 30 percig inkubáltuk. PBS-mosást követően kecske anti-egér IgG-FITC (DAKO) és szamar anti-nyúl IgG-Cy5 (Jackson ImmunoResearch,) másodlagos ellenanyagokkal jelöltük a sejteket. A Ki67 és ciklinD<sub>2</sub> markerek detektálása FACSCalibur áramlási citométerrel történt.

### 3.12. A CD29 konformációváltozásának valós-idejű detektálása áramlási citometriával

A CD49d/CD29 komplex konformációját a CD29 lánc magas affinitású konformációjára specifikus anti-CD29-PE (clone HUTS-21, BD Biosciences) antitesttel vizsgáltuk. Az antitest csak akkor képes kötődni és detektálható jelet adni, ha a CD29 lánc aktív konformációban van jelen a sejtek felszínén. Aktiválás nélkül, alapállapotban CLL-sejteken és myeloma sejteken is elvégeztük a CD29 jelölését, utóbbiaknál az analízis Navios áramlási citométerrel (Beckman Coulter) történt.

A CD29 aktiválását Chigaev és munkatársai által kidolgozott protokollja alapján végeztük el [132]. Az aktiválást valós-időben (real-time) végeztük, a detektálás FACSCalibur áramlási citométerrel történt. Csövenként  $6 \times 10^5$  izolált CLL-sejtet 500  $\mu$ l RPMI-1640 médiumban vettünk fel. Az áramlási citométeren először 30 másodpercen keresztül a jelöletlen sejtek mérésével alapjelet detektáltunk (autofluoreszcencia), ezután a mérést megszakítottuk, a mintát vízfürdőbe helyeztük és 15  $\mu$ l anti-CD29-PE (clone HUTS-21) antitesttel jelöltük. Alapos vortexelés után a mintát 1 percig vízfürdőbe helyeztük, majd folytattuk a mérést 1 percen keresztül. Az aktív konformáció valós-idejű kiváltásához a mérést szüneteltettük, a sejteket vízfürdőbe helyezve 10  $\mu$ g/ml VCAM-1 oldattal kezeltük, majd 2 perc múlva folytattuk az áramlás citometriai detektálást. A további aktivációhoz 200 ng/ml CXCL12 kemokinnel (Merck) vagy 0,25  $\mu$ g TS2/16 monoklonális antitesttel (clone TS2/16, eBioScience) kezeltük a sejteket vízfürdőben. A maximálisan kiváltható aktív konformációt 3 mM  $MnCl_2$  (Sigma Aldrich) stimulációval értük el. Az áramlási citometriás adatokat összesen 1024 másodpercig gyűjtöttük. Egy reprezentatív minta mérését mutatja be a 13. ábra.



13. ábra A CD29 aktiváció valós-idejű mérése áramlási citométerrel.

A HUTS-21 antitest izotípus kontrolljaként egér IgG<sub>2a</sub> κ-PE (BD Biosciences) antitestet használtunk. A CD29 összmenységét egy aktiváció-független epitóphoz kötődő anti-CD29-APC (clone MAR4, BD Biosciences) antitesttel határoztuk meg.

### **3.13. Phalloidin jelölés és detektálása konfokális mikroszkóppal**

10<sup>5</sup> izolált CLL sejtet 10 µg/ml VCAM-1 vagy 1% BSA oldattal fedett fedőlemezzre tapasztottunk ki 30 percen keresztül 37°C-on. A nem kötődő sejteket PBS pufferrel való mosással távolítottuk el, majd a CLL-sejteket 4% paraformaldehid oldattal (Reanal) fixáltuk 10 percen át 4°C-on. Ezután a fedőlemezeket PBS pufferrel háromszor átmostuk, majd 0,2% Triton-X oldattal (Sigma Aldrich) permeabilizáltuk a sejteket 5 percig szobahőmérsékleten. Háromszori PBS mosást követően a CLL-sejteket phalloidin-TRITC-cel (Sigma Aldrich, hígítás:1:200) jelöltük és 30 percen keresztül inkubáltuk sötétben, szobahőmérsékleten. PBS mosás után a fedőlemezeket fluoreszcens vizsgálatokra alkalmas fedőfolyadékkal fedtük le (Fluorescent Mounting Medium, Dako) és tárgylemezekre helyeztük. A mintákról konfokális mikroszkóppal (Nikon TE 300) készítettünk képeket, majd ezeket ImageJ 1.48k (NIH, Bethesda, MD) programmal analizáltuk. Eredményként 3 különböző minta phalloidin pozitív területeinek átlagát és szórását adtuk meg.

### **3.14. Statisztika**

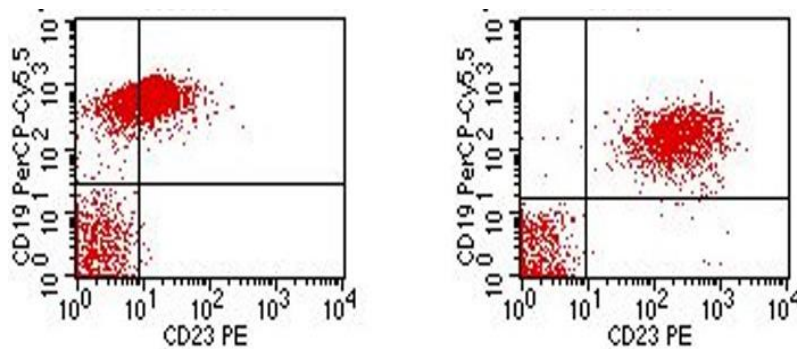
Statisztikai analízisekhez Wilcoxon-, Mann-Whitney-tesztet vagy Spearman-korrelációs koefficiens meghatározását alkalmaztunk, kategorikus változóknál (Rai, Binet stádiumok) X<sup>2</sup>-tesztet használtunk. SPSS szoftverrel (version 20.0; SPSS, Chicago, IL, USA) végeztük el az analízist, p<0,05 értéket tekintve szignifikánsnak. Az eredményeket átlag±SEM formájában ábrázoltuk.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A különböző CD23 expresszió szerepe a CLL prognózisában

#### 4.1.1. A CD23 izotípusok expressziójának vizsgálata

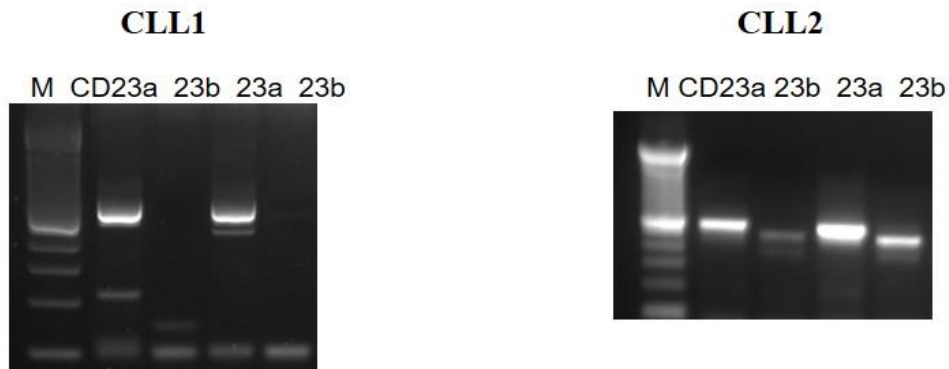
Annak ellenére, hogy a CD23 a CLL egyik legfontosabb differenciál-diagnosztikai markere, eltérő mértékben expresszálódik a CLL-sejtek felszínén. Magas és alacsony CD23 expressziójú csoportokat különíthetünk el (14. ábra).



**14. ábra** Alacsony és magas CD23 expressziójú perifériás CLL minták.

A CD23 izotípusok megoszlása a különböző CD23 expressziójú csoportokban nem ismert. Mivel a CD23 izotípusok (CD23a és CD23b) csak az első hat aminosavban térnek el az intracelluláris doménben, így antitesttel nem különíthetők el. Ezért RNS-szinten vizsgáltuk a CD23a és CD23b expresszióját.

A CD23 izoformák mRNS szintű expresszióját először hagyományos PCR-technikával elemeztük. A CLL-es minták többségében (37/54) mindkét izoforma jelen volt, míg 17/54 esetben csak a CD23a izotípust detektáltuk (15. ábra). A kizárólag CD23a izotípussal rendelkező betegeket CLL1, a CD23a és CD23b izoformákat egyaránt expresszáló eseteket CLL2 csoportnak neveztük el.

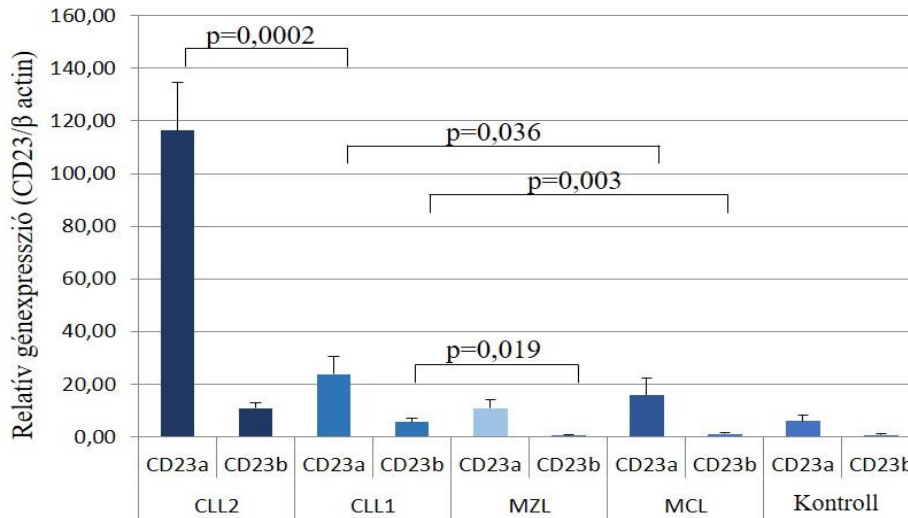


**15. ábra A CLL1 és CLL2 csoportok CD23 izotípus megoszlása.**

A bemutatott ábrák a hagyományos PCR-reakció végtermékei agaróz gélelektroforézissel megfuttatva.

M: marker

A továbbiakban kvantitatív valós-idejű PCR technikával vizsgáltuk a CD23a és CD23b izoformák relatív expresszióját a két CLL csoportban. Érdekes módon a CLL1 csoportban is jelen volt a CD23b izoforma (16. ábra). A CD23a relatív expressziója mindegyik CLL-mintánál magasabb volt, mint a CD23b ( $p < 0,0001$ ) (16. ábra). A CLL1 és CLL2 csoportokat elemezve alacsonyabb CD23a és CD23b szintet figyeltünk meg a CLL1 esetekben ( $p = 0,0002$ ;  $p = 0,053$ ). Ezt követően az alacsony CD23 expressziójú CLL1 csoport mRNS szintjét összehasonlítottuk a szintén leukémiás vérképpel járó CD23<sup>+</sup> MCL és MZL esetek, valamint normál tonsillából izolált B-sejtek CD23 mRNS szintjével. MZL-sejtek szignifikánsan alacsonyabb CD23b expressziót mutattak ( $p = 0,019$ ), míg MCL esetében mindkét izotípus kisebb arányban volt jelen, mint a CLL1 csoportban ( $p = 0,036$ ;  $p = 0,003$ ). Normál B-sejtek a CD23a és CD23b izoformákat alacsonyán expresszálták.



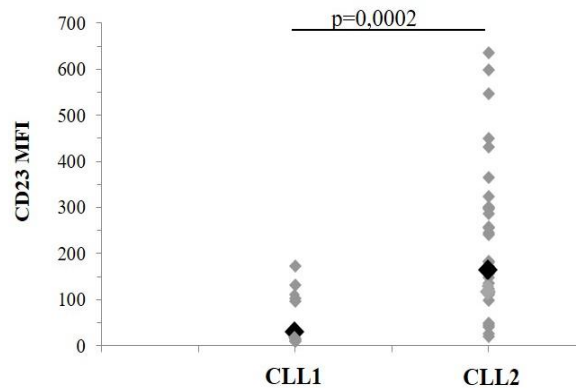
**16. ábra A CD23 izotípusok relatív expressziója CLL2, CLL1, MZL, MCL és normál B-sejtek (kontroll) esetén.**

A CD23a és CD23b expressziók normalizálásához belső kontrollként  $\beta$ —aktin gént használtunk. Az adatokat átlag és szórás formájában ábráztuk. A statisztikai elemzést Mann-Whitney-tesztel végeztük el.

#### 4.1.2. A CLL1 és CLL2 esetek immunfenotípusa

Megnéztük, hogyan korrelál a CLL1 és CLL2 csoportok CD23 mRNS expressziós mintázata a fehérje-szintű CD23 expresszióval. A felszíni CD23 szintet áramlási citométerrel detektáltuk. A CLL1 csoportban szignifikánsan alacsonyabb CD23 kifejeződést detektáltunk, mint a CLL2 csoportban ( $p=0,002$ ) (17. ábra).

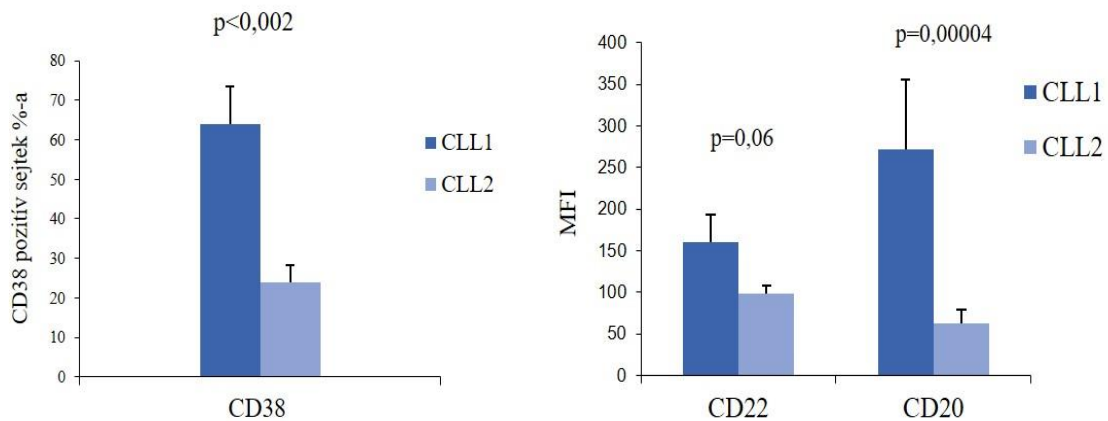




### 17. ábra CLL1 és CLL2 csoportok CD23 expressziója.

A CD23 expresszióját áramlási citométerrel detektáltuk. Az ábra mintánként (CLL1: n=12; CLL2: n=36) ábrázolja a mért CD23 MFI értékeket, feketével az MFI-értékek mediánját jelöltük. A statisztikai analízist Mann-Whitney-tesztel végeztük el.

Ezt követően összehasonlítottuk a két CLL csoport immunfenotípusát. A CLL1 eseteknél magasabb volt a CD38<sup>+</sup> sejtek aránya ( $p < 0,002$ ), illetve magasabb CD20 expressziót detektáltunk, mint a CLL2 eseteknél ( $p = 0,0004$ ) (18. ábra). A CLL1 eseteknél magasabb CD22 szintet is detektáltunk, azonban ez nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak ( $p = 0,06$ ).



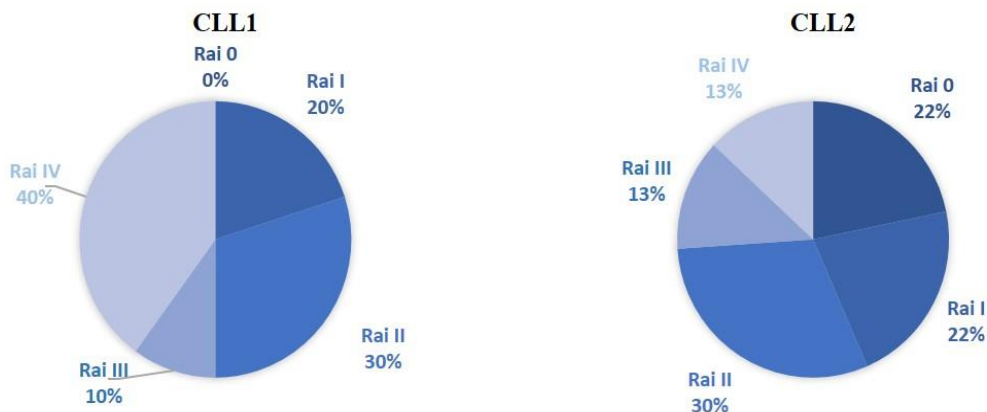
### 18. ábra CLL1 és CLL2 csoportok immunfenotípusa.

A felszíni markerek expresszióját áramlási citométerrel detektáltuk. A bemutatott eredmények a CLL1 (n=13) és CLL2 (n=35) minták esetén mért CD38 pozitív sejtek %-a, valamint a CD22, CD20 MFI értékek átlaga és szórása. A statisztikai analízist Mann-Whitney-tesztel végeztük el.

Mivel ismertek CD23<sup>+</sup> atípusos MCL esetek, a hasonló fenotípus miatt minden CLL1 mintánál elvégeztük az MCL-re jellemző t(11;14) FISH-vizsgálatot. Minden általunk vizsgált CLL1 eset negatív volt a t(11;14) transzlokációra.

#### 4.1.3. A CLL1 és CLL2 csoportok klinikai adatainak összehasonlítása

A különböző CD23 expressziójú csoportok klinikai paramétereit összevetve nem találtunk szignifikáns eltérést. A CLL1 csoportban több nő beteg volt, a diagnóziskori átlagéletkor pedig magasabbnak adódott. A CLL1 betegek előrehaladottabb Rai-stádiummal kerültek diagnózisra (19. ábra), valamint nagyobb volt a kezelést igénylő esetek aránya, mint a CLL2 eseteknél (70% vs 42%). Továbbá a CLL1 csoport alacsonyabb perifériás fehérvérsejt-számmal rendelkezett ( $51,07 \pm 18,5$  vs  $81,7 \pm 31,2$ ). Azonban ezek a különbségek nem bizonyultak szignifikánsak.



19. ábra CLL1 (n=10) és CLL2 (n=23) betegcsoportok diagnóziskor észlelt Rai-stádium besorolása.

#### 4.1.4. Prognosztikai markerek vizsgálata a CLL1 és CLL2 csoportokban

Megvizsgáltuk a FISH analízissel detektálható prognosztikus kromoszóma-aberrációk előfordulását a CLL1 és CLL2 csoportokban. A CLL1 esetek többsége (14/17) 12-es triszómiával rendelkezett, egy eset a 12tri mellett 13q deléció is hordozott (8. táblázat). Érdekes módon, a CLL2 betegek egyikében sem találtunk 12tri-t (0/37).

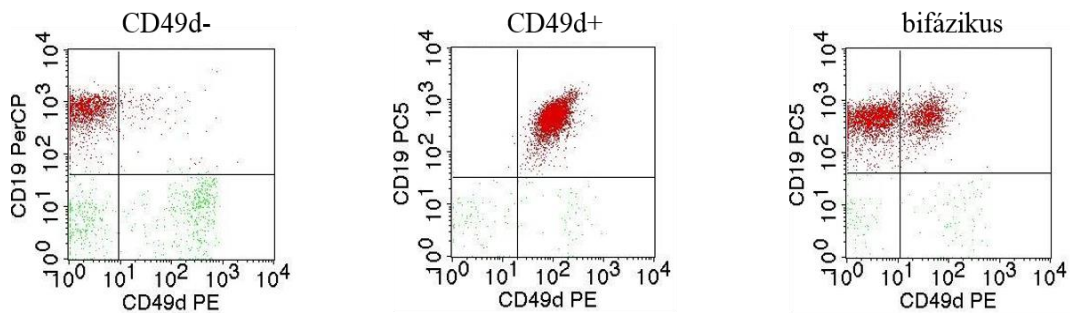
**8. táblázat** CLL1 esetek (n=17) citogenetikai eltérései FISH vizsgálattal detektálva

CLL1 esetek	Citogenetikai eltérés					Egyéb eltérés
	11q(%)	CEP12(%)	13q(%)	17p(%)	t(11;14)(%)	
1	0	80	0	0	0	
2	0	0	0	0	0	
3	0	85	0	0	0	
4	0	33	0	0	-	43% 3 IgH szignál
5	0	0	0	0	0	72% 3 IgH szignál
6	0	40	0	0	0	
7	0	0	0	0	0	
8	0	46	65	0	0	
9	0	65	0	0	0	
10	0	61	0	0	-	
11	-	50	-	-	-	
12	-	45	-	-	0	
13	0	55	-	0	0	
14	-	50	-	-	0	
15	-	70	-	-	0	
16	0	90	0	0	0	
17	0	60	0	0	0	

## 4.2. A magas CD49d expresszió szerepének vizsgálata

### 4.2.1. A CD49d expresszió korrelációja prognosztikus és mikrokörnyezeti interakcióban részt vevő markerekkel

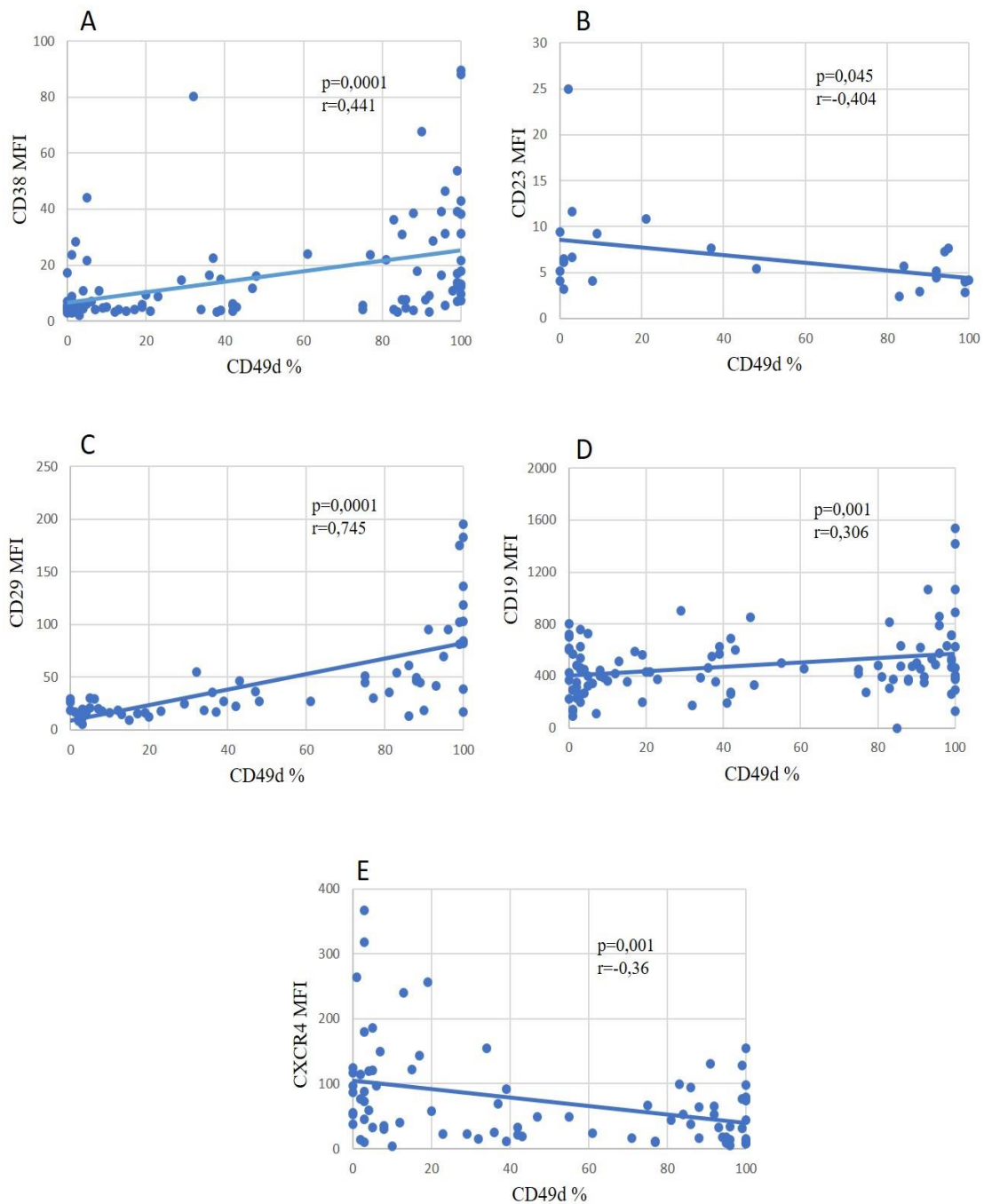
A CD49d különböző mértékben expresszálódik a CLL-sejtek felszínén. Megkülönböztetünk CD49d<sup>-</sup>, CD49d<sup>+</sup>, illetve bifázikus eseteket (20. ábra). A CD49d pozitivitás mértékének az irodalom alapján a 30%-os cut-off értéket használtuk.



**20. ábra** A CD49d kifejeződése perifériás vér CLL-sejteken.

Megvizsgáltuk, a magas kockázatú betegcsoportot jelző CD49d szintje korrelál-e áramlási citométerrel detektálható prognosztikus markerekkel, illetve mikrokörnyezeti interakciók kialakításában meghatározó molekulákkal. Az irodalmi adatoknak megfelelően pozitív korrelációt találtunk a CD38 szintjével perifériás vérből frissen izolált CLL-sejteken (21. A. ábra). A CD23 esetén szignifikáns negatív összefüggést figyeltünk meg a CD49d szintjével (21. B. ábra).

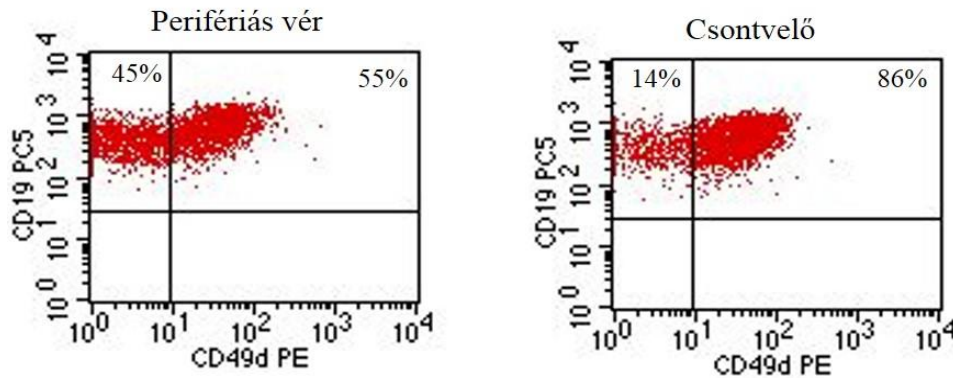
A CD49d pozitívan korrelál a vele egy komplexben lévő CD29 molekulával (21. C. ábra). Továbbá a CD19 BCR ko-receptorral pozitív, míg a CXCR4 kemokinreceptorral negatív összefüggést találtunk (21. D., E. ábra). Emellett a CD49d kifejeződése a CD5 aktivációs marker, CD80, CD86 kostimulációs molekulák, CD44 adhíziós molekula és a ROR1 szintjétől függetlennek bizonyult.



**21. ábra A CD49d korrelációja a CD38, CD23, CD29, CD19, CXCR4 markerekkel.**

A felszíni molekulák expresszióját perifériás vérből frissen izolált CLL sejteken (n=80, CD23 esetén n=26) határoztuk meg áramlási citométerrel. A CD49d esetén a CD49d pozitivitás %-át, a többi markernél az átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) értékét adtuk meg. A korrelációk erősségét Spearman-féle korrelációs koefficienssel határoztuk meg.

4 esetben összehasonlítottuk ugyanazon beteg perifériás véréből és csontvelő aspirátumából izolált CLL-sejtjeinek CD49d expresszióját. Igazoltuk a korábbi eredményeket, miszerint a csontvelői CLL-sejtek fokozottabb CD49d expresszióval jellemezhetők (22. ábra).



22. ábra Perifériás vér és csontvelői CLL-sejtek CD49d-expressziója.

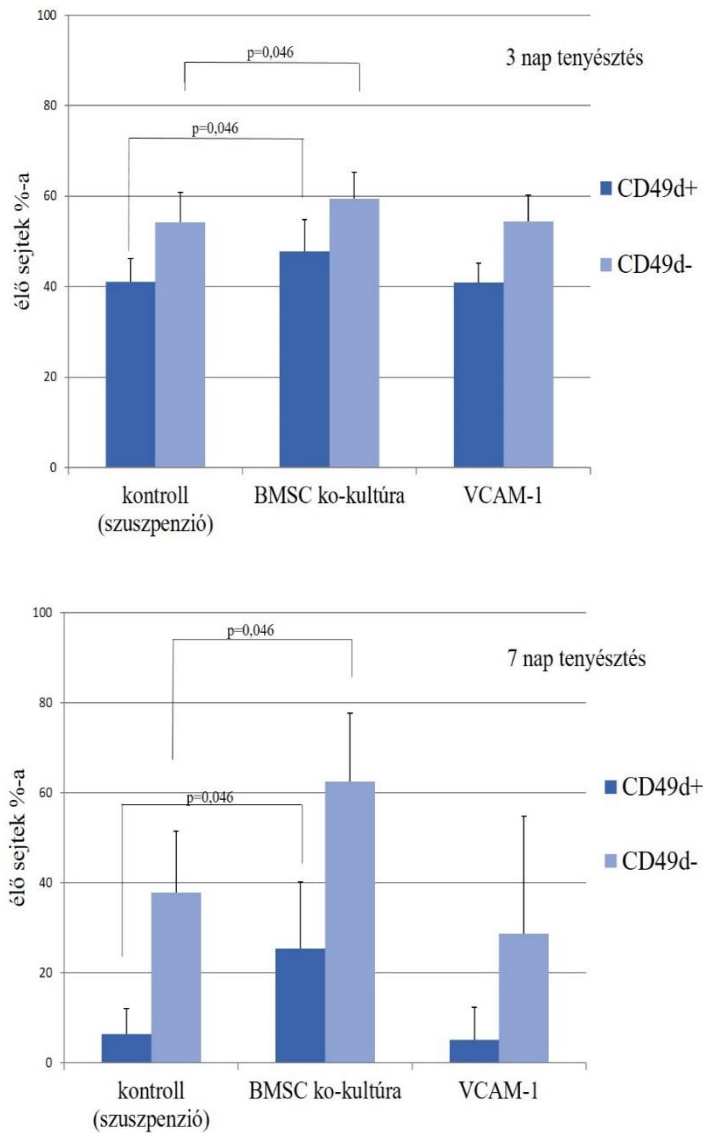
#### 4.2.2. A CD49d direkt apoptózis-gátló szerepének vizsgálata

A továbbiakban megvizsgáltuk, van-e közvetlen szerepe a CD49d/CD29-VCAM-1 interakciónak a CLL-sejtekre jellemző apoptózis-gátlás kiváltásában. Kíváncsiak voltunk, hogy a rosszabb prognózist jelző CD49d<sup>+</sup> esetek hosszabb túléléssel rendelkeznek-e *in vitro*, mint a CD49d<sup>-</sup> minták.

Perifériás vérből izolált CD49d<sup>+</sup> és CD49d<sup>-</sup> CLL-sejteket tenyésztettünk a CD49d ligandjával, VCAM-1 molekulával fedett felszínen, majd 3, 7 nap tenyésztést követően a túlélő sejtek arányát áramlási citométerrel határoztuk meg. Eredményeink alapján a VCAM-1 nem csökkentette a CLL-sejtek spontán apoptózisát sem a CD49d<sup>+</sup>, sem a CD49d<sup>-</sup> esetekben (23. ábra). Modellezve a keringő a VCAM-1 hatását, 3 esetben szolubilis formában kezeltük a CLL-sejteket VCAM-1 molekulával, azonban így sem tapasztaltunk eltérést a túlélésben.

Kíváncsiak voltunk, hogy a szupportív csontvelői mikrokörnyezetben van-e a különbség CD49d<sup>+</sup> és CD49d<sup>-</sup> CLL-sejtek túlélésében. A csontvelői környezet modellezésére csontvelő aspirátumból izolált BMSC kultúrát alkalmaztunk. Igazoltuk a korábban leírt eredményeket, miszerint BMSC ko-kultúrában a CLL-sejtek

szignifikánsan magasabb túlélést mutatnak mind 3, mind 7 nap tenyésztést követően ( $p=0,046$ ) (23. ábra). 7 napnál még kifejezettebb volt a BMSC-k anti-apoptotikus hatása, így a további kísérleteknél ezt a tenyésztési időt alkalmaztuk. Érdekes módon, nem találtunk különbséget a BMSC-k által kiváltott túlélési hatásban a CD49d<sup>+</sup> és CD49d<sup>-</sup> esetek között (23. ábra).

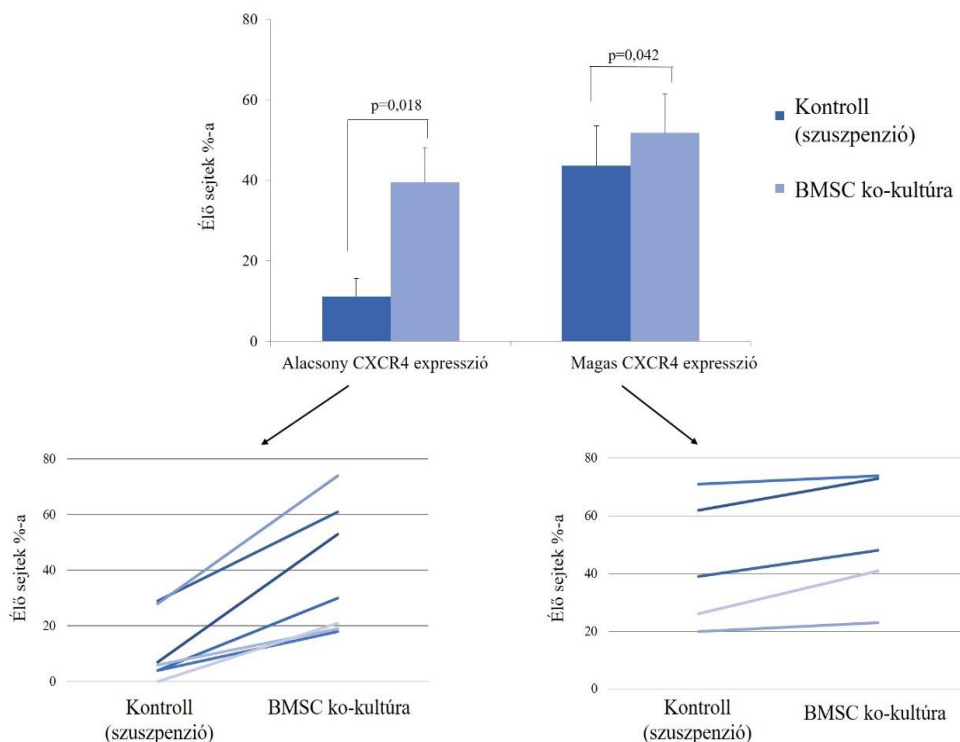


**23. ábra CD49d<sup>+</sup> és CD49d<sup>-</sup> CLL-sejtek túlélése médiumban (kontroll), BMSC-ko-kultúra vagy VCAM-1 stimuláció hatására 3 és 7 nap tenyésztést követően.**

Az élő sejtek arányát Annexin V/PI jelöléssel határoztuk meg. Az ábrázolt adatok mindkét CD49d csoport esetén 6 minta átlaga és szórása. A szignifikancia-szinteket Wilcoxon-teszttel állapítottuk meg.

Az apoptózis-értékeket vizsgálva nagyfokú varianciát tapasztaltunk az egyes minták között. A különböző CD49d expressziójú eseteket összehasonlítva, a CD49d<sup>+</sup> CLL-sejteknél szignifikánsan nagyobb spontán apoptózist detektáltunk mind BMSC nélkül ( $p=0,028$ ), mind BMSC-vel együtt-tenyésztve ( $p=0,046$ ) (23. ábra).

Habár a strómasejtek védőhatása függetlennek bizonyult a CLL-sejtek CD49d expressziójától, összefüggést mutatott a CD49d-vel fordítottan korreláló CXCR4 szintjével. Alacsony és magas CXCR4 expressziójú CLL-csoportokra bontva a CLL-eseteket azt tapasztaltuk, hogy az alacsony CXCR4 szintet mutató CLL-sejteknél nagyobb mértékű a strómasejtek túlélési hatása (24. ábra). Ez a mikrokörnyezeti jelekre szenzitívebb csoport a kifejezettebb protektív hatás ellenére nagyobb spontán apoptózis rátával jellemezhető, mint a magas CXCR4 expressziójú CLL-sejtek (24. ábra).



#### 24. ábra Alacsony és magas CXCR4 expressziójú CLL-esetek túlélése médiumban (kontroll) vagy BMSC ko-kultúrában 7 nap tenyésztést követően.

Az élő sejtek arányát Annexin V/PI jelöléssel határoztuk meg. Az oszlopdigrammok mindkét CXCR4 csoport esetén 6 minta átlagát és szórását ábrázolják, a vonaldiagramok mintánként mutatják be az élő sejtek %-át. A szignifikancia-szinteket Wilcoxon-teszttel állapítottuk meg.



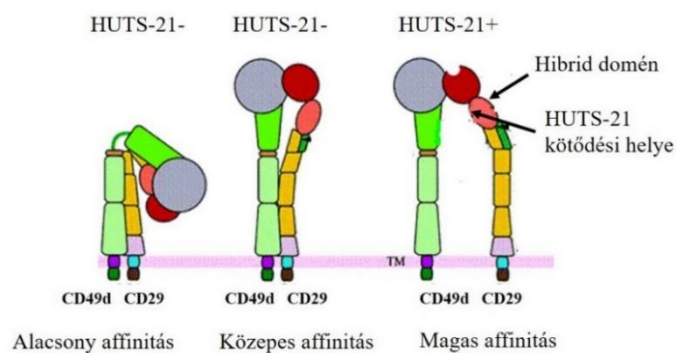
### **4.2.3. A CD49d-VCAM-1 kapcsolódás proliferáció-indukáló hatásának vizsgálata**

Bár a CLL-sejtek fő proliferációs helyszíne a nyirokcsomó és a csontvelő, megvizsgáltuk perifériás vérből izolált CLL-sejtek esetén, hogy a CD49d-kezelés kivált-e proliferációt. VCAM-1 felszínen, illetve BMSC-vel együtt-tenyésztett CD49d<sup>+</sup> és CD49d<sup>-</sup> CLL-sejtek sejtciklus-analízisét (n=65) és 15 esetben a ciklinD2, Ki67 markerek mérését végeztük el 3, 7 nap tenyésztést követően. A perifériás vérből izolált CLL-minták többsége (61/65) nem mutatott proliferációt 3, 7 nap elteltével. Kísérleteinkben sem a VCAM-1 kezelés, sem a BMSC-ko-kultúra nem indukált proliferációt a CD49d<sup>+</sup> és CD49d<sup>-</sup> CLL-sejteknél.

4 mintánál detektáltunk proliferációt, függetlenül a tenyésztési körülményektől. Az S és G2/M fázisban lévő sejtek aránya 3% és 6% között volt. Mind a négy proliferatív minta az alábbi fenotípussal rendelkezett: CD5<sup>++</sup>, CD49d<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD19<sup>++</sup>, alacsony CXCR4, CD80 expresszió.

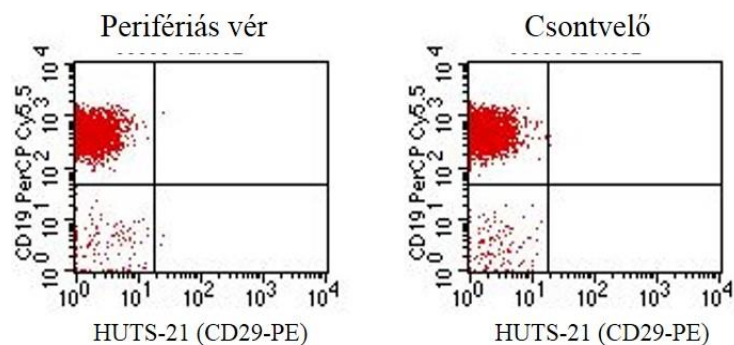
#### 4.2.4. A CD49d/CD29 komplex aktív konformációjának vizsgálata

Mivel kísérleteinkben a CD49d stimulációja sem túlélési, sem proliferáció-indukáló hatást nem váltott ki, megvizsgáltuk jelen van-e, illetve kiváltható-e a CD49d/CD29 komplex aktív konformációja a CLL-sejtek felszínén. A magas affinitású aktív forma teszi lehetővé a ligandkötés által kiváltott *outside-in* jelátvitelt. Az aktív konformációt a CD29 lánc hibrid doménjére specifikus antitesttel (clone HUTS-21) detektáltuk. A hibrid domén csak a magas affinitású, nyitott konformációban tárul fel és válik elérhetővé a HUTS-21 antitest számára (25. ábra) [132-134].



**25. ábra** Az aktív konformációra specifikus HUTS-21 antitest kötődése, Barthel és mtsai, 2008, nyomán [133].

A konformáció-specifikus antitest kötődése alapján, perifériás vérből frissen izolált CLL-sejteken (n=80) a CD49d/CD29 komplex inaktív konformációban van jelen. 4 esetben csontvelő-aspirátumból izoláltunk CLL-sejteket, azonban ezek felszínén sem detektáltunk magas affinitású konformációt (26. ábra).

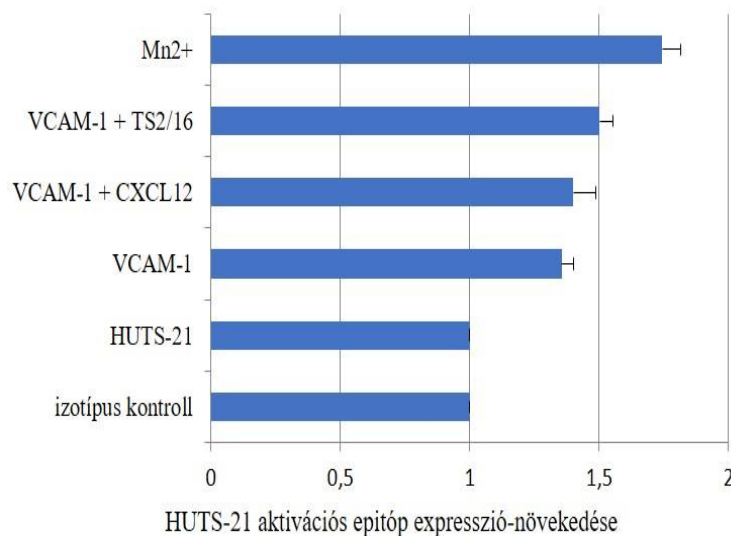


**26. ábra** A CD29 magas affinitású konformációjának expressziója frissen izolált perifériás vér és csontvelői CLL-sejtek felszínén.

A dot-plotok 1-1 reprezentatív minta HUTS-21 aktivációs epitóp expresszióját mutatják áramlási citometriás detektálást követően.

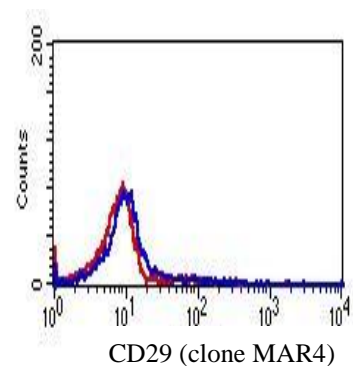
Ezt követően megvizsgáltuk, különböző stimulusokkal kiváltható-e az aktív konformáció. Az aktiválást CD49d<sup>+</sup> perifériás vér CLL mintánál (n=3) végeztük el valós idejű aktivációval, áramlási citométerrel detektálva. A CD49d<sup>+</sup> CLL-sejteket először VCAM-1 liganddal kezeltük, majd CXCL12 kemokint vagy közvetlenül aktiváló TS2/16 klónú anti-CD29 antitestet [135] adtuk a sejtszuszpenzióhoz. Technikai kontrollként Mn<sup>2+</sup>-stimulációt alkalmaztunk, mely maximális integrin-aktivációt vált ki. A VCAM-1 hozzáadása növelte a HUTS-21 antitest kötődését, tehát a magas-affinitású konformáció mennyiségét (27. ábra). CXCL12 vagy a TS2/16 kezelés tovább fokozta a HUTS-21 kötődését. A Mn<sup>2+</sup>-kezelés a maximálisan elérhető magas affinitású konformációt jelzi. A kezelések az össz-CD29 szintet nem befolyásolták, amelyet egy aktiváció-független CD29 antitest (klón MAR4) alkalmazásával bizonyítottunk (28. ábra).

Az eredmények alapján látszik, hogy CLL-sejteken a CD49d/CD29 komplex inaktív állapotban van jelen, azonban ligandkötés és más aktiváló kezelések hatására normál aktivációra képes.



**27. ábra** A CD29 (β1) lánc konformációjának vizsgálata különböző aktiváló kezelések hatására CD49d<sup>+</sup> CLL sejtek (n=3) esetén.

A kezeletlen sejtek HUTS-21 klónú anti-CD29-PE antitest MFI értékét tekintettük 1-nek, ennek arányában fejeztük ki a kezelések hatására bekövetkező MFI-változásokat. A HUTS-21 epitóp expressziója a CD49d/CD29 molekula magas affinitású konformációját jelzi.

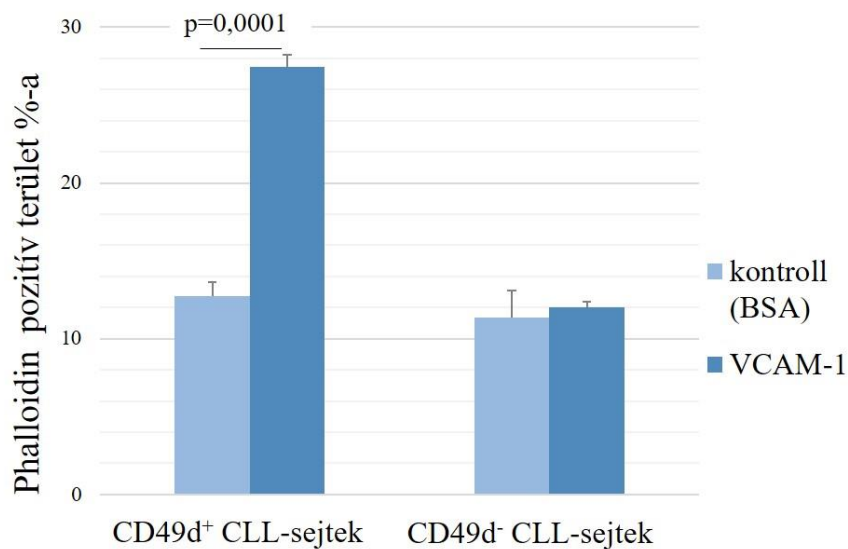


**28. ábra** Össz-CD29 expresszió (clone MAR4 antitesttel jelölve) aktiváció előtt (piros) és után (kék). A bemutatott ábra 1 reprezentatív minta analízise.

#### 4.2.5. CD49d<sup>+</sup> és CD49d<sup>-</sup> CLL-sejtek aktin-átrendeződésének vizsgálata VCAM-1 hatására

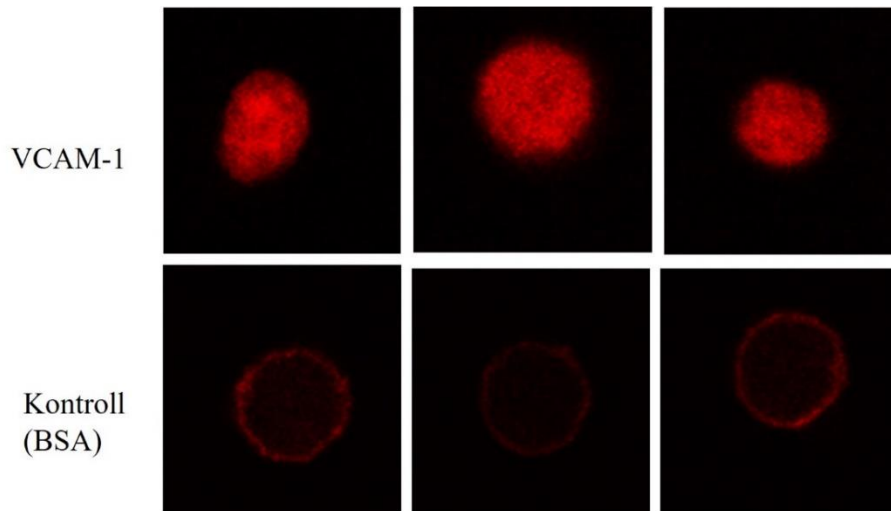
Az integrinek által kiváltott aktin-átrendeződés elengedhetetlen a sejtek adhéziójához, migrációjához. A továbbiakban összehasonlítottuk CD49d<sup>+</sup> és CD49d<sup>-</sup> CLL-sejtek aktin-polimerizációját VCAM-1 kezelés hatására.

Perifériás vérből izolált CD49d<sup>+</sup> és CD49d<sup>-</sup> CLL-sejteket VCAM-1 molekulával fedett lemezre tapasztottunk ki, majd az F-aktint jelölő phalloidin-festést követően konfokális mikroszkóppal analizáltuk a sejteket. CD49d<sup>+</sup> CLL-sejtek esetén a VCAM-1 jelentős aktin-átrendeződést váltott ki, összehasonlítva a kontroll (BSA) lemezre adherált CLL-sejtekkel ( $p=0,0001$ ) (29. és 30. ábra). A CD49d<sup>-</sup> CLL-sejteknél nem detektáltunk különbséget az F-aktin-formációban a VCAM-1-kezelt és kontroll minták között (29. ábra).



#### 29. ábra CD49d<sup>+</sup> és CD49d<sup>-</sup> CLL-sejtek aktin-polimerizációja VCAM-1 kezelés hatására.

Az ábrázolt adatok mindkét CD49d-csoportnál 3 különböző minta esetén mért phalloidin pozitív területek %-ának átlaga és szórása. A statisztikai elemzéshez Wilcoxon-tesztet használtunk.



**30. ábra** Egy reprezentatív CD49d<sup>+</sup> minta phalloidin festődése VCAM-1 vagy BSA-felületre való kitapasztást követően (nagyítás 100x).

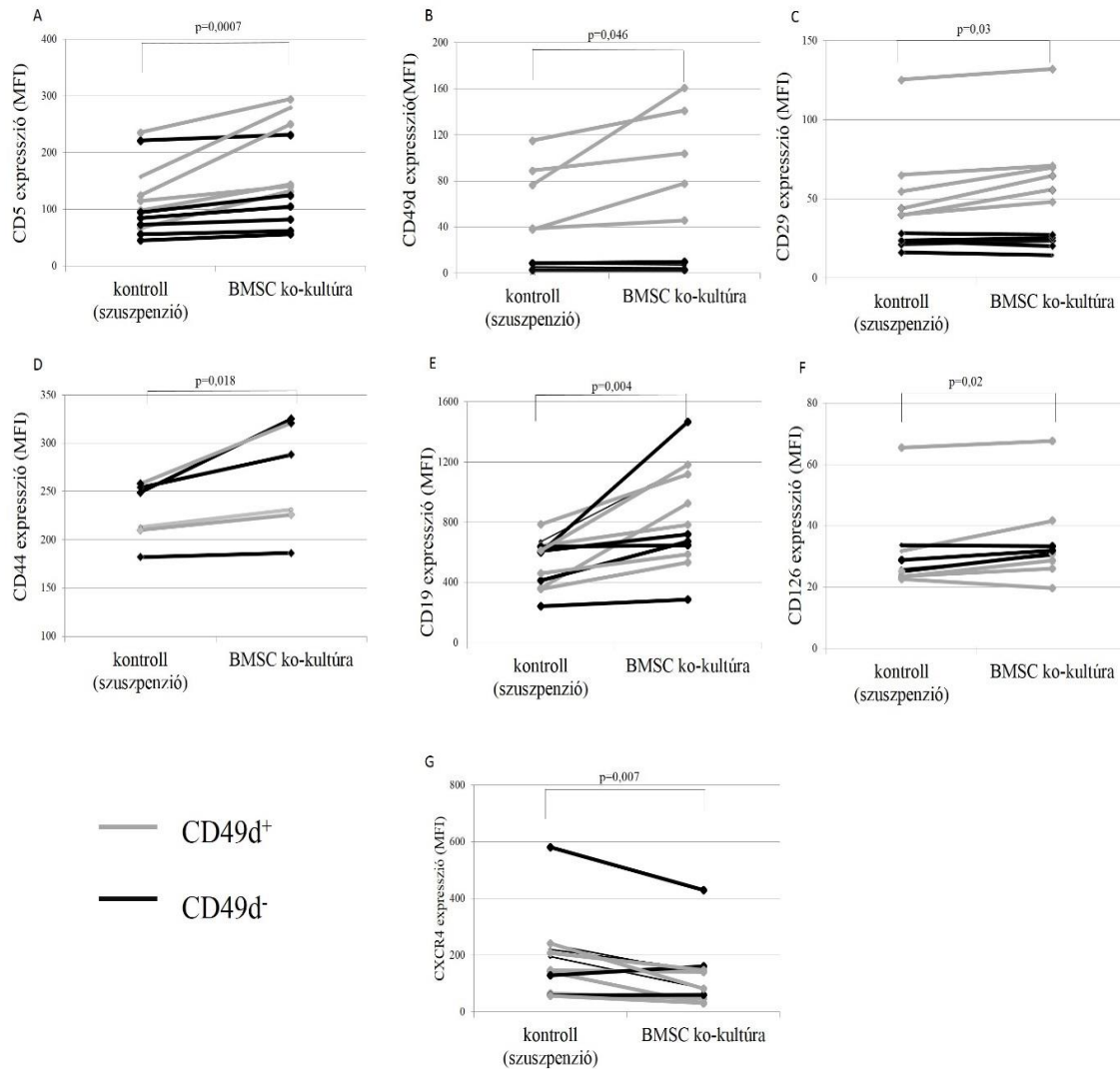
#### **4.2.6. CD49d<sup>+</sup> és CD49d<sup>-</sup> CLL-sejtek immunfenotípus-változása VCAM-1 vagy BMSC-ko-kultúra hatására**

Kíváncsiak voltunk van-e különbség a CD49d<sup>+</sup> és CD49d<sup>-</sup> CLL-sejtek immunfenotípus-változásában VCAM-1 felületen vagy BMSC ko-kultúrában való tenyésztés hatására. Aktivációs markerek (CD5, CD38), BCR koreceptor (CD19), adhéziós molekulák (CD49d, CD29, CD44), kostimulációs molekulák (CD80, CD86), citokin- és kemokin-receptorok (CD126, CXCR4) expresszióját vizsgáltuk 7 nap tenyésztést követően.

A VCAM-1 kezelés nem indukált változást a felszíni molekulák expressziójában egyik CD49d-csoportban sem. BMSC ko-kultúrában szignifikánsan emelkedett CD5, CD49d, CD44, CD19, CD126 szintet detektáltunk, míg a CXCR4 expressziója csökkent strómasejtek jelenlétében (31. ábra). A CD38, CD80, CD86 és ROR1 változása nem mutatott egyértelmű tendenciát.

A különböző CD49d expressziójú csoportokat összehasonlítva a CD49d<sup>+</sup> CLL-sejteknél szignifikánsan nagyobb mértékben növekedett a CD5 expresszió stróma jelenlétében, mint a CD49d<sup>-</sup> eseteknél ( $p=0,03$ ) (31. ábra). A CD29 esetén csak a CD49d<sup>+</sup>

CLL-sejteknél tapasztaltunk expresszió-növekedést BMSC hatására, habár a CD29 a CD49d<sup>-</sup> sejteknél is gyenge pozitivitást mutatott. A többi markert vizsgálva nem találtunk különbséget a BMSC-által indukált fenotípus-változásban a CD49d<sup>+</sup> és CD49d<sup>-</sup> CLL-sejtek között.



**31. ábra CD49d<sup>+</sup> (n=6) és CD49d<sup>-</sup> (n=6) CLL-sejtek immunfenotípusának összehasonlítása médiumban (kontroll) vagy BMSC ko-kultúrában történő 7 napos tenyésztést követően.**

A CD49d<sup>+</sup> eseteket szürkével, a CD49d<sup>-</sup> mintákat feketével jelöltük. Az ábrák a felszíni molekulák esetén mért MFI értékeket mutatják be mintánként. A statisztikai analízist Wilcoxon-tesztel végeztük el.

#### 4.2.7. Különböző CD49d és CXCR4 expressziójú betegcsoportok klinikai adatainak elemzése

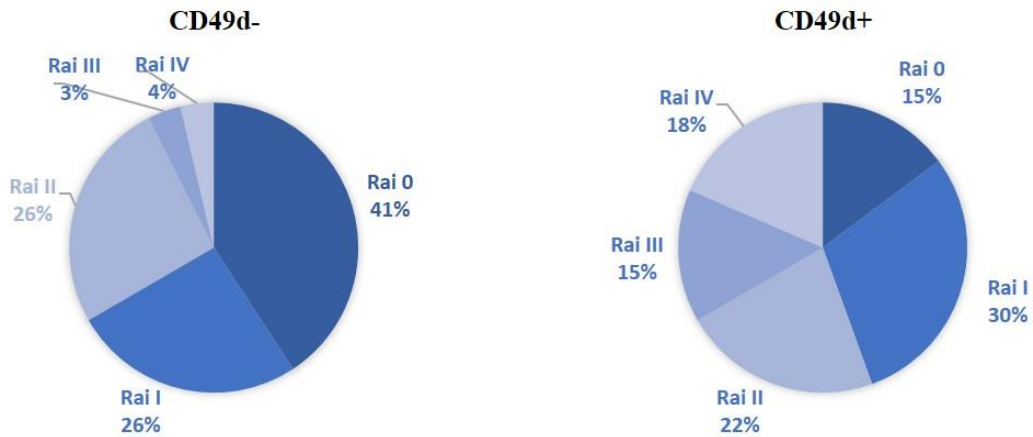
A CD49d esetén jól ismert prognosztikai jelentősége, azonban a CXCR4 esetleges prediktív szerepét még nem vizsgálták. Kíváncsiak voltunk, hogy a mikrokoznyezeti tényezőktől való függés megmutatkozik-e a klinikai paramétereiben. Összehasonlítottuk a különböző CD49d és CXCR4 expressziójú esetek diagnóziskor besorolt klinikai stádiumait (Rai-, Binet-stádium), a diagnóziskor mért szérumban LDH szintet és abszolút lymphocytaszámot (ALC), a kezelés szükségességét, az első kezelésig eltelt időt (TTT), valamint a citogenetikai eltérések előfordulását. A CD49d expresszió függvényében 54, a különböző CXCR4 szint esetén 53 beteg klinikai paramétereit hasonlítottuk össze.

A magas (n=27) és alacsony (n=27) CD49d expresszióval rendelkező betegek életkora a diagnóziskor nem tért el (9. táblázat). A betegek neme tekintetében a CD49d-eseteknél sokkal nagyobb mértékű férfi túlsúlyt tapasztaltunk.

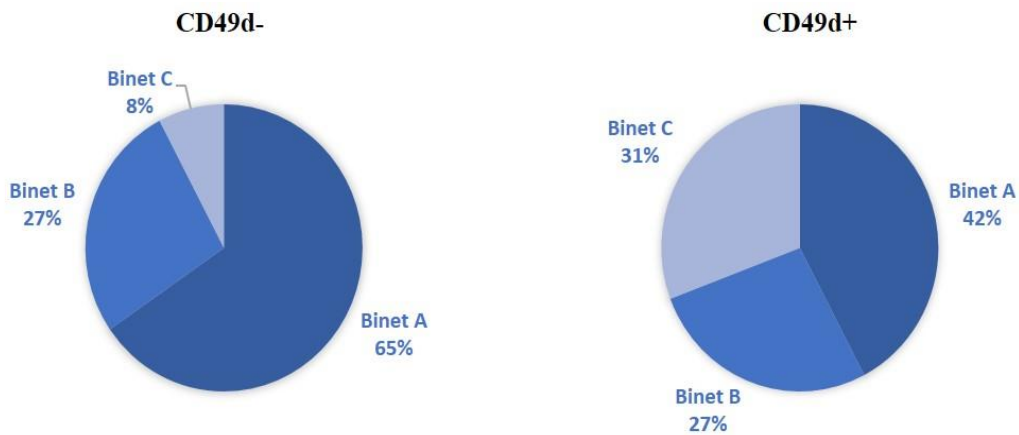
**9. táblázat** A különböző CD49d és CXCR4 expressziójú betegcsoportok klinikai jellemzői

	<b>magas CD49d</b>	<b>alacsony CD49d</b>	<b>alacsony CXCR4</b>	<b>magas CXCR4</b>
<b>betegek életkora</b>	65,8	65,8	65,2	66,7
<b>férfi/nő arány</b>	1,1	2,5	1,7	1,5
<b>LDH (U/L)</b>	394,9±37,7	315,1±32,2	367,1±32	334,6±41
<b>ALC (G/L)</b>	64,1±12,6	77,6±18	76,7±15	54,4±14,2
<b>kezelés szükségessége (betegek %-a)</b>	82%	52%	68%	55%
<b>TTT (nap)</b>	642,7±158,5	1248,4±276	827,9±192	1176,4±298
<b>citogenetikai eltérés jelenléte (betegek %-a)</b>	58%	30%	36%	39%

A CD49d<sup>+</sup> esetek előrehaladottabb stádiummal kerültek diagnózisra, összehasonlítva a CD49d<sup>-</sup> betegekkel (Rai-stádium: p=0,018; Binet-stádium: p=0,017; 32. és 33. ábra).



**32. ábra CD49d<sup>-</sup> (n=27) és CD49d<sup>+</sup> (n=27) betegek diagnóziskor észlelt Rai-stádium besorolása.**



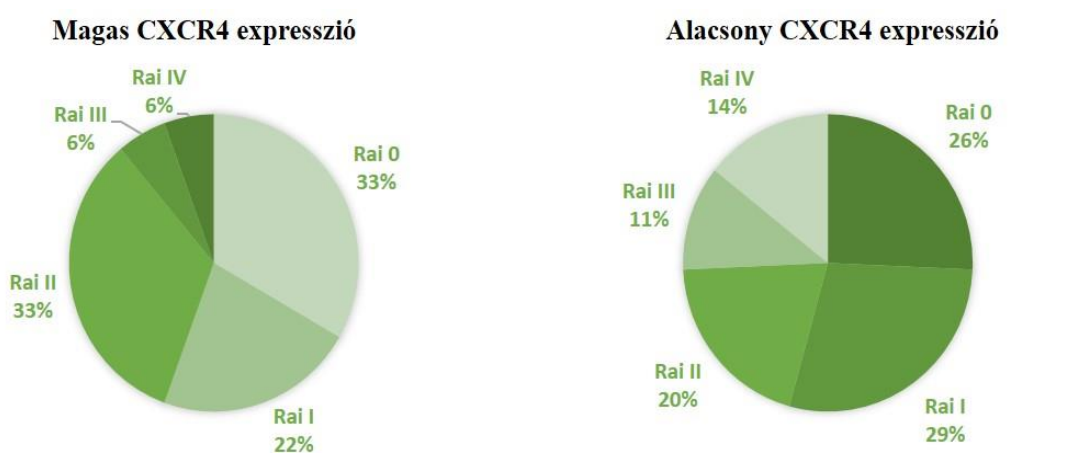
**33. ábra CD49d<sup>-</sup> (n=27) és CD49d<sup>+</sup> (n=27) betegek diagnóziskor észlelt Binet-stádium besorolása.**

Az előrehaladott stádiumot jelzi a CD49d pozitív esetek magasabb LDH szintje is (p=0,013) (9. táblázat). A CD49d-t kifejező betegek nagyobb arányban szorultak kezelésre (p=0,024), továbbá rövidebbnek bizonyult az első kezelésig eltelt idő (TTT – time to treatment; p=0,016), mint a CD49d<sup>-</sup> eseteknél. A CD49d pozitív csoport

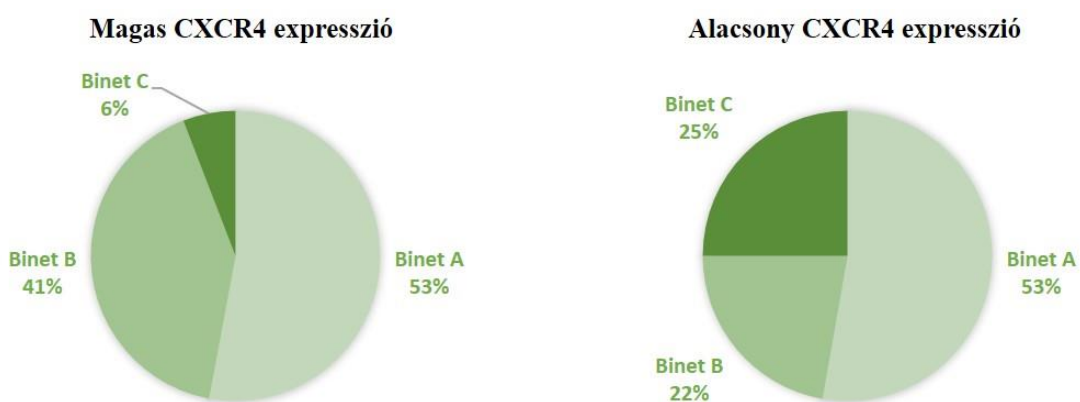


agresszívebb kórlefordását jelzi az is, hogy nagyobb arányban rendelkeztek valamilyen citogenetikai eltéréssel ( $p=0,03$ ). Érdekes módon a  $CD49d^+$  betegeknél alacsonyabb perifériás abszolút lymphocita számot (ALC) detektáltunk, bár ez nem mutatkozott szignifikánsnak.

A továbbiakban összehasonlítottuk az alacsony ( $n=35$ ) és magas ( $n=18$ ) CXCR4 expressziójú betegcsoportok klinikai paramétereit. Mindkét betegcsoportban férfi predominancia érvényesült, az átlagéletkorban különbség nem adódott (9. táblázat). Habár az alacsony CXCR4 szintet mutató esetek kismértékben előrehaladottabb Rai- és Binet-stádiummal kerültek diagnózisra, ez nem mutatkozott szignifikánsnak (34. és 35. ábra). Nem találtunk szignifikáns eltérést az LDH szintben, ALC értékben, a kezelés szükségességében, TTT-ben és a citogenetikai eltérés gyakoriságában az alacsony és magas CXCR4 szinttel rendelkező betegek között (9. táblázat).



**34. ábra Magas ( $n=18$ ) és alacsony ( $n=35$ ) CXCR4 expressziójú betegek diagnóziskor észlelt Rai-stádium besorolása.**



**35. ábra Magas ( $n=18$ ) és alacsony ( $n=35$ ) CXCR4 expressziójú betegek diagnóziskor észlelt Binet-stádium besorolása.**

CLL esetében ismert, hogy a Binet A betegcsoport klinikailag rendkívül heterogén. A jelzett korai stádium ellenére a Binet A CLL betegek egy részére nagyon gyors progresszió jellemző. Ezt a magas rizikójú betegcsoportot a CD49d pozitivitás jól jelzi előre [136]. Kíváncsiak voltunk, hogy a Binet A kohorton belül van-e prognosztikai szerepe a CXCR4 expressziónak. Eredményeink alapján az alacsony CXCR4 szinttel rendelkező betegek szignifikánsan magasabb LDH értéket mutattak a diagnóziskor, összehasonlítva a magas CXCR4 expressziójú esetekkel (351,6 vs 206,4;  $p=0,003$ ). Továbbá az alacsony CXCR4 expressziójú Binet A CLL esetek nagyobb arányban szorultak kezelésre (50% vs 13%). Azonban az ALC-ben, TTT-ben, kromoszóma-aberrációk meglétében szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk a két CXCR4 betegcsoport között Binet A CLL eseteknél.

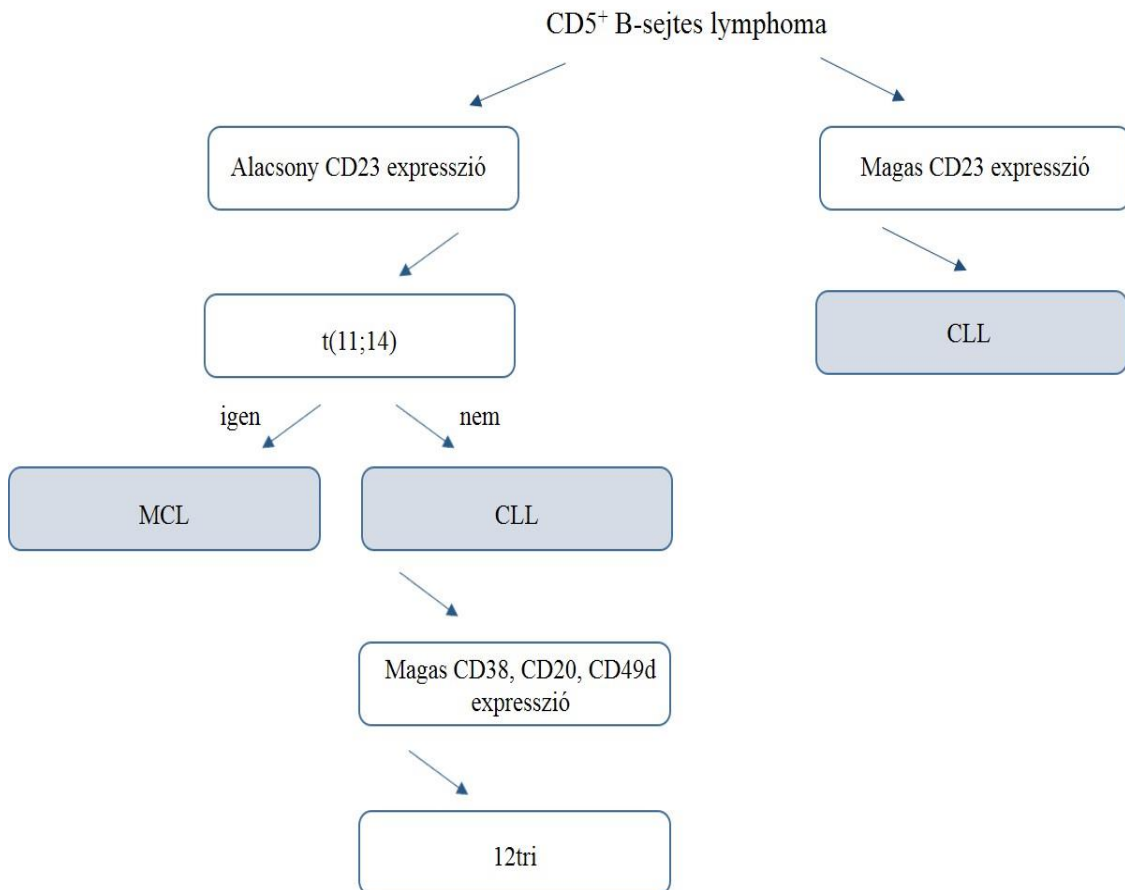
## 5. MEGBESZÉLÉS

A CLL indolens lefolyású megbetegedés, azonban a betegek egy részénél nagyon gyors progresszió, illetve malignus lymphomába való transzformáció alakul ki. A progresszió előrejelzése, korai felismerése kulcsfontosságú a terápia szempontjából. A prognosztikus faktorok sok esetben nemcsak a progressziót jelzik előre, hanem meghatározóak a betegség patogenezisében, így akár terápiás célponttá is válhatnak. A prognosztikus markerek áramlási citometriás vizsgálata gyors, könnyen alkalmazható, megbízható, valamint kiválóan használható követéses vizsgálatoknál. Kapuzással alpopulációk határozhatók meg, így az agresszívabb sejtcsoport is nyomon követhető. Jelen munkánkban az áramlási citométerrel detektálható CD23 és CD49d prognosztikus markerek szerepét vizsgáltuk CLL progressziójában.

Dolgozatom első részét a CD23 differenciál-diagnosztikai és prognosztikai markerrel kapcsolatos vizsgálataink képezték. Munkánkban megvizsgáltuk a magas és alacsony CD23 expressziójú esetek CD23 izotípus-eloszlását. A CD23a expresszióját minden CLL esetnél magasabbnak találtuk, mint a CD23b-t, ahogy más CD23<sup>+</sup> lymphománál (MCL, MZL), illetve normál B-sejtek esetében is. Irodalmi adatok alapján a CD23a a túléléshez, míg a CD23b a proliferációhoz járul hozzá [41]. A detektált magas CD23a és az alacsonyabb CD23b szint összhangban van a CLL-sejtek jellegzetességével, miszerint a periférián fokozott apoptózis-gátlást és csökkent proliferációt mutatnak. A CLL esetek többsége (CLL2) mindkét CD23 izoformát magasán expresszálta, míg a CLL-es minták egy kis részénél alacsonyabb CD23a és CD23b szintet detektáltunk (CLL1). A CLL1 minták CD23 izotípus expressziója azonban magasabb volt, mint az MCL és MZL eseteknél.

A csökkent CD23 izoformát mutató CLL1 csoport immunfenotípus alapján is eltért a CLL2 csoporttól. A CLL1 esetek alacsonyabb CD23, magasabb CD20, CD22 és CD38 expresszióval rendelkeztek, összehasonlítva a CLL2 mintákkal. Az atipikus fenotípust mutató CLL1 minták többsége (14/17) 12tri eltérést hordozott. Érdekes módon a CLL2 csoport egyikénél sem találtunk 12tri-t. A 12tri eltéréssel rendelkező CLL-sejtek atipikus fenotípusa és morfológiája ismert az irodalomban: magasabb felszíni Ig, CD38, CD49d,

CD18, CD29, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD79b, FMC7, illetve csökkent CD43 expresszió jellemző rájuk [27, 31, 33]. Azonban a 12tri összefüggését az alacsony CD23 expresszióval még nem közölték. Úgy gondoljuk, az áramlási citométerrel detektált alacsony CD23, magas CD38, CD20 expresszió hatékonyan jelezheti a 12tri meglétét. A 12tri CD23 expresszió alapján való előrejelzését a 36. ábrán foglaltuk össze.



**36. ábra A 12tri eltéréssel rendelkező CLL esetek lehetséges kiszűrése a CD23 expresszió alapján.**

Az alacsony CD23 expresszió, kiegészítve a magas CD38, CD20, CD49d fenotípussal jelezheti a 12tri-t hordozó CLL-eseteket. Ezekben az esetekben a t(11;14), vagy a ciklinD1 expresszió alapján ki kell zárni az MCL lehetőségét.

Ismert, hogy a 12tri aberrációval rendelkező CLL esetek fokozott CD49d expresszióval rendelkeznek [35, 137]. Ezt támogatja megfigyelésünk, miszerint a CD49d és a CD23 szint között fordított korrelációt detektáltunk. A CD49d mellett más migrációban fontos integrin expressziója is magasabb 12tri-t hordozó CLL mintákban (CD11a, CD11b, CD18, CD29) [33]. Emellett ezek az esetek fokozott adhéziót és motilitást mutatnak [33]. A magas CD49d és egyéb integrin expresszió fokozott nyirokcsomó homingot indukálhat, mely magyarázhatja a 12tri-t hordozó CLL betegekre különösen jellemző masszív nyirokcsomó megnagyobbodást és a gyakori Richter-transzformációt [138, 139].

A 12-es triszómiás esetek eltéréseket mutatnak a CD49d működését tekintve. Érdekes módon a 12tri lézióval rendelkező CLL mintáknál a CXCL12 nem képes kiváltani a CD49d/CD29 konformációváltását, azonban a CCL21 igen [140]. Emellett egérmodellben elvégzett vizsgálatokkal bizonyították azt is, hogy a 12tri esetekben a CXCR4-CXCL12 tengely gátlása nem befolyásolta, míg a 12tri-t nem hordozó eseteknél nagy mértékben csökkentette a csontvelői homingot [140]. Ezen megfigyelések alapján a 12tri aberrációt hordozó CLL-sejtek nemcsak fenotípusosan mutatnak eltéréseket, hanem biológiailag is különböznek. Ezek ismeretében feltehető, hogy a 12tri-vel rendelkező CLL betegek eltérő terápiát igényelnek.

A fokozott integrin-aktivitás, homing ellenére a 12 tri-t hordozó eseteket a közepes rizikójú csoportba sorolják [18]. Fournier és munkatársai azt találták, hogy a CD23b expresszió növekedése önmagában a CLL-sejtek G0 fázisból G1/S fázisba lépését indukálja [141]. Emellett a CD23a izotípus túlélésbeli szerepéről számolnak be [43]. Kísérleteinkben a 12tri-t hordozó CLL1 esetek csökkent CD23a és CD23b expressziót mutattak a CLL2 csoporthoz képest. Az említett közlemények alapján az alacsony CD23a és CD23b szint csökkent proliferációs aktivitással és túléléssel társulhat, így ezeknek az eseteknek jobb prognózissal kellene rendelkezniük. Ezzel szemben klinikai adataink szerint az alacsonyabb CD23 expressziót mutató CLL1 csoport sokkal agresszívebbnek mutatkozott: ezen betegek előrehaladottabb Rai-stádiummal kerültek diagnózisra, nagyobb arányban igényeltek kezelést, valamint alacsonyabb ALC értékkel rendelkeztek, mint a CLL2 betegek, bár a különbségek nem bizonyultak szignifikánsnak. Eredményeinket alátámasztva Jurisic és munkatársai a CD23 expresszió negatív

korrelációját találták a túléléssel, csontvelői prolymphocytá infiltrációval és a perifériás lymphocytá számmal [48]. A CLL1 betegek alacsonyabb perifériás sejtszámát a fokozott integrin-expresszió által közvetített homing magyarázhatja.

A 12tri-t hordozó CLL betegek halálának fő oka a Richter-transzformáció és másodlagos malignus neoplazmák megjelenése [142]. Számos közlemény szerint a Richter-szindrómába való transzformáció egyik első lépése a 12tri kialakulása [28, 30, 143]. A Richter-transzformáció során változik az immunfenotípus: a CD5 és CD23 expresszió csökken vagy teljesen eltűnik az eredeti CLL-klónhoz képest [144, 145]. A CLL1 eseteknél detektált csökkent CD23 expresszió, valamint a 12tri a CD23 vesztes első lépését jelenthetik a transzformáció során.

Dolgozatom további részében a CD49d prognosztikus markert vizsgáltuk. Az áramlási citométerrel detektált prognosztikus markerek közül a CD49d rendelkezik a legerősebb prediktív szereppel [73]. A CD49d fontos közvetítője a CLL-sejtek és a protektív mikrokörnyezet közötti kapcsolatnak, mely meghatározó a tumorsejtek túlélésében, proliferációjában. Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, milyen szerepe van a fokozott CD49d expressziónak a CLL patogenezisében.

A CD49d és a CD38 korrelációja jól ismert az irodalomban, ezt saját beteganyagainkon is igazoltuk [76]. A CD49d és a vele egy komplexben lévő CD29 ( $\beta$ 1) lánc között is pozitív korrelációt detektáltunk. Összefüggést találtunk CD49d és a CD19 BCR-ko-receptor szintje között. Ezt magyarázhatja a CD49d és a BCR közti funkcionális kapcsolat, mely során a BCR szabályozza a CD49d/CD29 *inside-out* jelátvitelét [146]. A CD23 és CXCR4 molekulákkal fordított korrelációt detektáltunk, utóbbit a dolgozat további részében részletezem. Érdekes módon nem találtunk összefüggést a CD49d és a vele egy makromolekuláris komplexben lévő CD44 adhéziós molekula között.

A CLL-sejtek egyik jellegzetessége az apoptózis-rezisztencia. Eredményeink alapján CLL-sejteken a CD49d nem indukál közvetlen apoptózis-gátlást ligandjával, a VCAM-1 molekulával kezelve. Továbbá a csontvelői mikrokörnyezet modellezésére alkalmazott

BMSC ko-kultúrában a stróma túlélést-segítő hatása függetlennek bizonyult a CLL-sejtek CD49d expressziójától. A CD49d túlélésbeli szerepéről ellentmondásosak az irodalomban megjelent adatok. Összhangban eredményeinkkel, két független tanulmány szerint a CD49d-gátló antitesttel való kezelés csökkent adhéziót indukált, azonban a CLL-sejtek túlélését nem befolyásolta [53, 82]. Ehhez hasonlóan egy korábbi közlemény is az adherens és nem adherens CLL-frakciók hasonló apoptózis-rátáját említi fibronektinnel kezelt felszínen [147]. Ezzel szemben Zucchetto és munkatársai VCAM-1 transzfektált fibroblasztokkal, illetve VCAM-1 felszínen való tenyésztés hatására a CD49d<sup>+</sup> esetek jobb túléléséről számoltak be [81, 124]. Érdekes módon a CD49d apoptózis-védő hatását legelőször 7 nap után detektálták, a legkifejezettebb apoptózis-gátlást pedig 21 nap elteltével találták. Az eltérő eredmény feltehetőleg a különböző tenyésztési körülményekkel magyarázható. Kísérleteinkben 3, illetve 7 napos sejt kultúrákat alkalmaztunk. A 7. napnál megfigyelt magas apoptózis értékek miatt nem tartottuk fenn tovább a kultúrákat. A CLL-sejtekre jellemző gyors *in vitro* spontán apoptózis okán korábbi közlemények szintén maximum 7 napos sejt kultúrák túlélési eredményeiről számolnak be [53, 82, 102, 103, 147].

Az irodalomban megjelent eredmények, illetve saját megfigyelések alapján a CD49d-t expresszáló CLL-sejtek nagyobb adhéziót mutatnak VCAM-1 molekulával kezelt felszínhez. Habár a CD49d-közvetített adhézió közvetlenül nem vált ki apoptózis-gátlást, fontos szerepe van a CLL-sejtek és a szupportív mikrokörnyezeti sejtek kapcsolódásában. A sejt-sejt kapcsolódás során a CLL-sejt modulálja a járulékos sejtek citokin- és kemokin-szekréciónak, fokozva a tumorsejtek túlélését. Plander és munkatársai CLL-sejt-BMSC-ko-kultúrában a stróma fokozott anti-apoptotikus hatású IL-6 és IL-8 termeléséről számoltak be [102]. Egy másik közlemény alapján a CLL-sejtek a BMSC-k CCL4, CCL11 és CXCL10 szekréciónak fokozzák [104]. Egy friss közlemény szerint a BMSC-k által termelt extracelluláris vezikulák is védik a CLL-sejteket [148].

Eredményeink szerint a CD49d a túlélés mellett, közvetlen proliferáció-indukáló szereppel sem rendelkezik. VCAM-1 kezelés, illetve BMSC ko-kultúra nem váltott ki proliferációt sem a CD49d<sup>+</sup>, sem a CD49d<sup>-</sup> eseteknél. Pár esetben (4/65) a tenyésztési körülményektől függetlenül detektáltunk osztódó perifériás CLL-populációt. Ezeknél az

eseteknél a proliferáló frakció aránya alacsony volt (3-6%), fenotípusuk alapján az erős aktivációs molekula (CD5<sup>++</sup>, CD19<sup>++</sup>), magas CD86 kostimulációs molekula és a fokozott adhéziós molekula (CD38<sup>+</sup>, CD49d<sup>+</sup>) expresszió a T-sejtekkel való interakcióra utalhat, melyek elengedhetetlenek a proliferációhoz. Valószínűsíthető, hogy a proliferatív populáció a közelmúltban recirkulálhatott a nyirokcsomóból, a proliferáció legfőbb helyszínéről [121].

Kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy a CD49d nem funkcionális inaktivitás miatt nem vált ki közvetlen apoptózis-gátlást és proliferációt. Konformáció-specifikus antitesttel történő vizsgálataink szerint a CD49d/CD29 komplex inaktív, alacsony affinitású konformációban van jelen a CLL-sejtek felszínén, összhangban Ganghammer és munkatársainak közleményével [140]. Különböző kezelések hatására (pl. VCAM-1, CXCL12) sikerült kiváltanunk a CD49d/CD29 molekula magas affinitású formáját, tehát a komplex ligandkötés hatására normál aktivációra képes.

CLL-sejtekkel ellentétben myelomás sejteken alapállapotban alacsony és magas affinitású konformációt is detektáltunk [149]. Kutatócsoportunk egy korábbi közleménye alapján normál plazmasejtekkel összehasonlítva az MM sejtek kisebb arányban fejezik ki az aktivált CD29 formát, valamint a teljes CD29 expresszió is alacsonyabb [149]. Érdekes módon myeloma multiplexben a nagyarányú aktivált CD29 (>90%) molekulával rendelkező esetek kedvezőbb terápiás választ mutatnak. Feltételezzük, hogy előbb a CD49d/CD29 inaktivitásával, majd downregulációjával csökken a csontvelői sejtekhez történő adhézió, így a perifériára kerülnek, mely sokkal agresszívebb kórlefolyást okoz. CLL esetén, mivel alapállapotban inaktív a CD49d/CD29, ezért az aktiváltságával valószínűleg nem prediktálható a kezelés sikeressége.

Kísérleteinkben a VCAM-1 kezelés nagyfokú aktin-átrendeződést indukált a CD49d<sup>+</sup> esetekben, hasonlóan egy korábbi közléssel [150]. A CD49d-nek kulcsszerepe van a citoskeleton átrendeződésével kapcsolatos folyamatokban, mint az adhézió, migráció, homing. Több tanulmány a CD49d<sup>+</sup> CLL-sejtek nagyobb migrációs képességéről, illetve fokozottabb csontvelői homingjáról számol be, összehasonlítva a CD49d<sup>-</sup> esetekkel [33, 53, 140, 151]. A CD49d<sup>+</sup> CLL-sejtek fokozottabb homingjára utalhat az a megfigyelésünk is, miszerint a CD49d<sup>+</sup> CLL-es betegek alacsonyabb perifériás abszolút



lymphocyták számmal rendelkeznek diagnózisukkor, bár ez az eredmény nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. Feltételezzük, hogy az alacsonyabb ALC a nagyobb mértékű migráció és szöveti visszatartás miatt valósul meg. Másodlagos lymphoid szövetekben a CD49d expresszió emelkedik, tovább fokozva a jótékony mikrokörnyezeti sejtekkel való adhéziót. Igazolva a korábbi eredményeket, kutatócsoportunk is fokozott CD49d expressziót talált csontvelői mikrokörnyezetben, hasonlóan az irodalmi adatokkal [102, 103]. Emellett nyirokcsomóban is magasabb CD49d expressziót detektáltak, összehasonlítva periférián keringő CLL-sejtekkel [152].

Adataink szerint a CD49d fordított korrelációt mutat a CXCR4 kemokinreceptorral, összhangban egy korábbi közléssel [140]. Irodalmi adatok alapján a CD49d pozitivitás és az alacsony CXCR4 expresszió lymphadenopathiával társul [78, 153]. Kísérleteinkben a CD49d<sup>+</sup>, alacsony CXCR4 fenotípusú CLL-sejtek nagyobb spontán apoptózist mutattak, összehasonlítva a CD49d<sup>-</sup>, magas CXCR4 expressziójú esetekkel. A CLL-sejtek, vagy legalábbis bizonyos alpopulációjuk, folyamatosan recirkulálnak a periféria és a lymphoid szövetek között. A másodlagos nyirokszövetek sokkal előnyösebb niche-t jelentenek a mikrokörnyezeti sejtek anti-apoptotikus és növekedési szignáljai miatt. Feltételezzük, hogy a közelmúltban a jótékony szöveti környezettel kapcsolatba került CLL-sejtek izolálva sokkal érzékenyebbek a szupportív szignálok hiányára. Úgy gondoljuk ez a „death by neglect” hatás felelős a CD49d<sup>+</sup>, alacsony CXCR4 expressziójú populáció fokozott sejtpusztulásáért.

Bár a csontvelői mikrokörnyezetben a strómasejtek védőhatása a CLL-sejtek CD49d expressziójától függetlennek bizonyult, jól korrelált a CXCR4 expresszióval. Az alacsony CXCR4 fenotípusú CLL-sejtek a magasabb spontán apoptózis-értékek ellenére nagyobb arányú túlélést mutattak strómasejtek jelenlétében, mint a magas CXCR4 expressziójú esetek. Ez alapján úgy gondoljuk, az alacsony CXCR4 kifejeződésű CLL-sejtek sokkal érzékenyebbek a túlélést segítő mikrokörnyezeti szignálokra, illetve azok hiányára. Mivel kísérleteinkben az alacsony CXCR4 szint jól jelezte a mikrokörnyezettől való függést, feltételezzük, hogy a mikrokörnyezetet célzó terápiák alkalmazása előtt hasznos lehet a CXCR4 expresszió vizsgálata.

Habár a CXCR4 jól korrelál a mikrokörnyezeti érzékenységgel, klinikai adatainkat elemezve önálló prognosztikus hatását nem láttuk. A klinikailag változatos Binet A

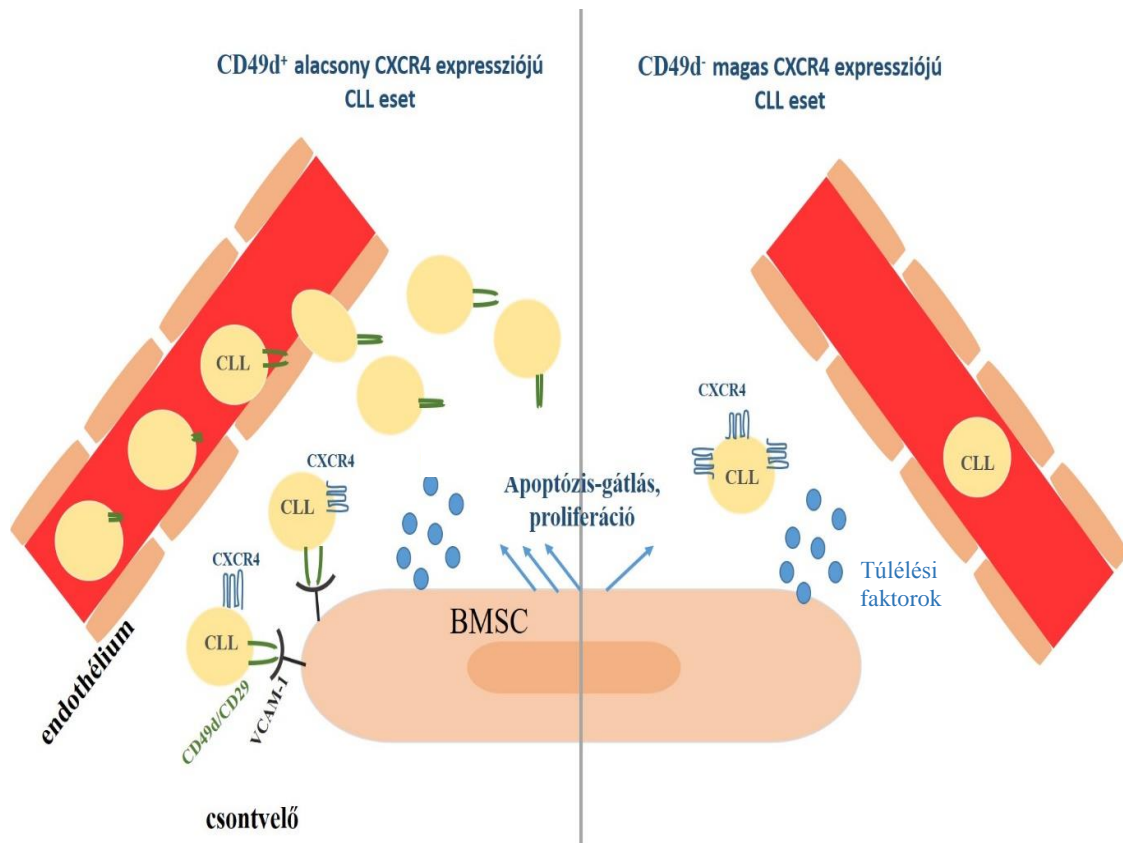
stádiumot vizsgálva, az alacsony CXCR4 expressziójú betegeknél szignifikánsan magasabb LDH-szintet találtunk, mely nagyobb turnover rátát jelezhet, illetve ezek a betegek nagyobb arányban szorultak kezelésre. Azonban a CD49d molekulával való fordított korreláció miatt a CXCR4 önálló szerepét nehéz elkülöníteni.

A CD49d pozitivitás negatív prognosztikus hatását igazoltuk saját beteg anyagunkon. Az irodalmi adatoknak megfelelően a CD49d<sup>+</sup> CLL-es betegek előrehaladottabb Rai- és Binet-stádiummal rendelkeztek diagnóziskor, szignifikánsan magasabb LDH szintet mutattak, nagyobb arányban igényeltek kezelést, rövidebb az első kezelésig eltelt idő, valamint több citogenetikai eltérés volt detektálható bennük, mint a CD49d<sup>-</sup> betegcsoport esetén [72-76].

A CLL-sejtek a mikrokoznyezetnek megfelelően változtatják az immunfenotípusukat, mely hozzájárul a túléléshez, proliferációhoz. Megvizsgáltuk, hogy a perifériás vérben szolubilis formában, valamint az endothél sejtek, BMSC-k felszínén jelen lévő VCAM-1 képes-e aktiválni a CLL-sejteket. Adataink alapján a VCAM-1 nem vált ki immunfenotípus-változást a CD49d-n keresztül. Azonban BMSC-k jelenlétében a CLL-sejtek aktívabb, agresszívebb felszíni mintázatát detektáltuk. Stróma hatására a CLL-sejteken fokozódik a CD5 aktivációs marker szintje, CD49d<sup>+</sup> CLL-sejteknél még kifejezettebben. Ko-kultúrában a korábbi eredményeknek megfelelően emelkedett CD49d, CD29, CD44 adhéziós molekula szintet detektáltunk, mely megteremti a fokozott adhéziót a mikrokoznyezet elemeivel [102, 128]. BMSC-eredetű antigének kiválthatják a BCR stimulációját, mely hozzájárulhat az általunk detektált fokozott CD19 expresszióhoz. A BCR antigénkötése magyarázhatja a stróma jelenlétében csökkent CXCR4 expressziót is, egyetértésben korábbi eredményekkel [153]. Emellett a BMSC-k által termelt CXCL12 is indukálhatja az alacsonyabb CXCR4 felszíni expressziót receptor-internalizáció révén [103]. A CLL-sejtek emelkedett CD126 expressziót mutatnak normál B-sejtekhez képest, mely fokozott STAT-3 expresszióval és kemorezisztenciával korrelál [154]. Kísérleteinkben magasabb CD126 szintet detektáltunk strómasejtek hatására. Ezek ismeretében a CD126 szerepet játszhat a CLL-sejtek és a mikrokoznyezet közti kommunikációban, valamint a mikrokoznyezet-

indukálta terápia-rezisztenciában. Korábbi közleményekkel ellentétben a CD38 expresszió esetén nem láttunk egyértelmű változást stróma hatására [103].

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a CD49d prognosztikus marker nem közvetlen apoptózis-gátlással és proliferáció-indukcióval, hanem az előnyös mikrokörnyezetbe való homing és a szupportív sejtekkel kialakított adhézió révén járul hozzá a CD49d<sup>+</sup> CLL esetek agresszívebb kórképéhez (37. ábra). A CD49d<sup>+</sup> CLL-sejtek alacsonyabb CXCR4 szintet mutatnak, mely populáció érzékenyebb a mikrokörnyezet szignáljaira. Ezen eredmények ismeretében úgy gondoljuk, a mikrokörnyezetet célzó terápiaik egyik fontos feladata, hogy mobilizálják a nagyobb mikrokörnyezeti függéssel rendelkező CD49d<sup>+</sup> alacsony CXCR4 expressziójú populációt a protektív mikrokörnyezetből.



### 37. ábra CD49d<sup>+</sup> és CD49d<sup>-</sup> CLL esetek eltérő patogenezeise.

A CD49d az előnyös szöveti mikrokörnyezetbe való homing közvetítésével, valamint a szupportív sejtek és a CLL-sejtek közötti közvetlen kapcsolat kialakításával járul hozzá a CD49d<sup>+</sup> esetek agresszívebb kórképéhez. A CD49d<sup>+</sup> alacsony CXCR4 expressziójú populáció nagyobb mikrokörnyezeti függéssel jellemezhető.

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

### A CD23 molekulával kapcsolatos főbb megállapítások:

1. A CLL-sejtek a CD23a és CD23b izotípust egyaránt expresszálják, a CD23a izotípus relatív expressziója minden esetben magasabb, mint a CD23b szintje.
2. Az alacsonyabb CD23a és CD23b expresszió alapján elkülöníthető egy betegcsoport, melyre csökkent CD23, fokozott CD38, CD20, CD22 expresszió, agresszívebb kórlefolyás és a 12-es triszómia nagyfokú előfordulása jellemző.
3. Az alacsony CD23, magas CD20 és CD38 expressziók alapján a 12-es triszómia előfordulása jól becsülhető.

### A CD49d molekulával kapcsolatos főbb megállapítások:

4. A CD49d ligandja, a VCAM-1 nem indukál közvetlen apoptózis-gátlást, proliferációt és immunfenotípus-váltást, viszont CD49d<sup>+</sup> CLL-sejtekben aktin-átrendeződést vált ki. Ennek ismeretében feltételezzük, hogy a fokozott homing és mikroenvironmenti sejtekkel való adhézió állhat a CD49d negatív prognosztikus hatásának hátterében és nem közvetlen apoptózis-gátlás.
5. A CD49d/CD29 komplex alapállapotban inaktív konformációban van jelen a CLL-sejtek felszínén, de aktiváló stimulusok kiváltják a magas affinitású, ligandkötésre képes konformációt.
6. A CD49d fordított korrelációt mutat a CXCR4 kemokinreceptorral, melynek expressziója korrelál a CLL-sejtek mikroenvironmenti érzékenységével, de önálló prognosztikus szereppel nem bír.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A krónikus lymphocytás leukémia (CLL) egy indolens lefolyású B-sejtes non-Hodgkin-lymphoma, a betegek egy részére azonban gyors progresszió, magas malignitású lymphomába való transzformáció jellemző. Munkánkban a magas kockázatú csoportot jelző CD23 és CD49d prognosztikus faktorok szerepét vizsgáltuk CLL progressziójában. A CLL egyik legfontosabb differenciál-diagnosztikai markere a CD23, ennek ellenére a CLL-sejtek változó mértékben expresszálják, alacsony expressziója prognosztikus jelentőséggel bír. Kísérleteinkben meghatároztuk a CD23 izotípusok arányát a különböző CD23 expressziójú csoportokban. A CD23a expresszióját minden CLL esetnél magasabbnak találtuk, mint a CD23b-t. A CLL-es minták egy kis részénél alacsonyabb CD23a és CD23b szintet detektáltunk, mely csoport fenotípusosan is eltért: alacsonyabb CD23, fokozott CD38, CD20, CD22 expresszió, valamint agresszívebb kórlefolyás és a 12-es triszómia nagyfokú előfordulása volt jellemző. Eredményeink alapján az áramlási citométerrel detektálható fenotípus megbízhatóan jelezheti a 12-es triszómia meglétét. Adataink szerint az alacsony CD23 expresszió magas CD49d szinttel korrelált, mely adhéziós molekulaként a mikrokörnyezeti interakciók fontos közvetítője. Perifériás vérből izolált, különböző CD49d expressziójú CLL-sejteket tenyésztettünk a CD49d ligandjával, VCAM-1 molekulával fedett felszínen és vizsgáltuk az apoptózist, proliferációt, aktin-átrendeződést és immunfenotípus-változást. Eredményeink alapján a CD49d kezelése önállóan nem váltott ki apoptózis-gátlást, proliferációt és fenotípus-váltást, azonban jelentős aktin-átrendeződést detektáltunk a CD49d<sup>+</sup> CLL-sejteknel. Igazoltuk, hogy a CD49d/CD29 komplex alapállapotban inaktív, azonban aktiváló stimulusok hatására normál aktivációra képes. A szupportív csontvelői mikrokörnyezet modellezéseként strómasejt ko-kultúrában tenyésztettünk CLL-sejteket. A strómasejtek apoptózis-védőhatása függetlennek bizonyult a CLL-sejtek CD49d expressziójától, viszont a CD49d molekulával fordítottan korreláló CXCR4 kemokin receptor expressziója jól jelezte a CLL-sejtek mikrokörnyezeti függését. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a CD49d nem direkt apoptózis-gátláson keresztül járul hozzá a CLL-sejtek fokozott túléléséhez, hanem az előnyös szöveti mikrokörnyezetbe való homing közvetítésével, valamint a szupportív sejtek és a CLL-sejtek közötti közvetlen kapcsolat kialakításával.

## 8. SUMMARY

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is an indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma, however some patients are characterized by rapid progression and transformation to more aggressive lymphoma. The main aim of our study was to investigate the role of prognostic factors CD23 and CD49d in CLL progression. The CD23 is one of the most important differential diagnostic markers in CLL, but its expression is variable on CLL cells, moreover low CD23 expression has prognostic significance. We analyzed the expression of the CD23 isotypes in CLL cases with different CD23 expression. We demonstrated a higher CD23a than CD23b expression in all CLL cases. In a patient subgroup lower CD23a and CD23b level was detected, which cases had distinct immunophenotype: lower surface CD23, higher CD38, CD20 and CD22 expression, furthermore aggressive clinical course and carrying trisomy 12 was detected. According our results, this specific immunophenotype in CLL detected by flow cytometry can predict trisomy 12. According our data, low CD23 expression shows correlation with high CD49d level. As adhesion molecule, the CD49d is a key determinant of interactions between CLL cells and the microenvironment. Isolated peripheral blood CLL cells with different CD49d expression were cultured with CD49d ligand, VCAM-1, then apoptosis, proliferation, actin remodelling and immunophenotype was analyzed. VCAM-1 treatment did not induce direct apoptosis protection, proliferation or phenotype change, but resulted in robust actin reorganisation by CD49d<sup>+</sup> CLL cells. We proved that the CD49d/CD29 complex is expressed in inactive, low-affinity conformation, but undergoes normal activation process after stimulation. Mimicking the supporting bone marrow microenvironment, CLL cells were cultured with bone marrow stromal cells. Interestingly, the apoptosis-protection of bone marrow stromal cells was independent from the CD49d expression, but the CXCR4 chemokine receptor expression, which showed inverse correlation with CD49d, indicated the microenvironment dependency. On the basis of our data, we suppose that the CD49d may contribute to enhanced survival of CD49d<sup>+</sup> CLL cells by mediating homing and adhesion to the protective lymphoid tissues and not by direct inhibition of apoptosis.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Jaffe, ES., Harris, N.L., Stein, H., Vardiman, JW. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissue. IARC Press, Lyon, 2001: 168-170.
2. Inamdar, K.V., and Bueso-Ramos, C.E. (2007). Pathology of chronic lymphocytic leukemia: an update. *Ann Diagn Pathol* 11, 363-389.
3. Matolcsy, A., Udvardy, M., and Kopper, L. Hematológiai betegségek atlasza. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2006: 222-231.
4. Herishanu, Y., and Polliack, A. (2005). Chronic lymphocytic leukemia: a review of some new aspects of the biology, factors influencing prognosis and therapeutic options. *Transfus Apher Sci* 32, 85-97.
5. Király, A.P., Alpár, D., Fésüs, V., Marosvári, D., Matolcsy, A., and Bödör, C. (2016). Introduction to the molecular diagnostic methods of oncohematology. *Magy Onkol* 60, 88-98.
6. Mucsi, O. (2016). Treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Magy Onkol* 60, 127-136.
7. Gorczyca, W. Flow Cytometry in Neoplastic Hematology. CRC Press, Boca Raton, 2010: 211-235.
8. Nguyen, G., Diamond, LW. and Braylan, RC. Flow Cytometry in Hematopathology. Humana Press, Totowa, 2003: 306-307.
9. Amaya-Chanaga, C.I., and Rassenti, L.Z. (2016). Biomarkers in chronic lymphocytic leukemia: Clinical applications and prognostic markers. *Best Pract Res Clin Haematol* 29, 79-89.
10. Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A., and Bloomfield, C.D. (1999). World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 17, 3835-3849.
11. Barna, G., Reiniger, L., Tatrai, P., Kopper, L., and Matolcsy, A. (2008). The cut-off levels of CD23 expression in the differential diagnosis of MCL and CLL. *Hematol Oncol* 26, 167-170.

12. Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N., and Pasternack, B.S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *46*, 219-234.
13. Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M.T., Monconduit, M., Belabbes, S., and Gremy, F. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* *48*, 198-206.
14. Romond, E.H., Perez, E.A., Bryant, J., Suman, V.J., Geyer, C.E., Davidson, N.E., Tan-Chiu, E., Martino, S., Paik, S., Kaufman, P.A., Swain, S.M., Pisansky, T.M., Fehrenbacher, L., Kutteh, L.A., Vogel, V.G., Visscher, D.W., Yothers, G., Jenkins, R.B., Brown, A.M., Dakhil, S.R., Mamounas, E.P., Lingle, W.L., Klein, P.M., Ingle, J.N., and Wolmark, N. (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* *353*, 1673-1684.
15. Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., and Norton, L. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* *344*, 783-792.
16. Stilgenbauer, S., Bullinger, L., Lichter, P., Döhner, H., and German, C.L.L.S.G.C.I.I. (2002). Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* *16*, 993-1007.
17. Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S.M., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K.R., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *94*, 1840-1847.
18. Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M., and Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* *343*, 1910-1916.



19. Rodríguez, A.E., Hernández, J., Benito, R., Gutiérrez, N.C., García, J.L., Hernández-Sánchez, M., Risueño, A., Sarasquete, M.E., Ferriñán, E., Fisac, R., de Coca, A.G., Martín-Núñez, G., de Las Heras, N., Recio, I., Gutiérrez, O., De Las Rivas, J., González, M., and Hernández-Rivas, J.M. (2012). Molecular characterization of chronic lymphocytic leukemia patients with a high number of losses in 13q14. *PloS one* 7, e48485.
20. Hernández, J.A., Rodríguez, A.E., González, M., Benito, R., Fontanillo, C., Sandoval, V., Romero, M., Martín-Núñez, G., de Coca, A.G., Fisac, R., Galende, J., Recio, I., Ortuño, F., García, J.L., de las Rivas, J., Gutiérrez, N.C., San Miguel, J.F., and Hernández, J.M. (2009). A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica* 94, 364-371.
21. Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., and Croce, C.M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13944-13949.
22. Rossi, D., Rasi, S., Spina, V., Bruscaggin, A., Monti, S., Ciardullo, C., Deambrogi, C., Khiabani, H., Serra, R., Bertoni, F., Forconi, F., Laurenti, L., Marasca, R., Dal-Bo, M., Rossi, F.M., Bulian, P., Nomdedeu, J., Del Poeta, G., Gattei, V., Pasqualucci, L., Rabadan, R., Foa, R., Dalla-Favera, R., and Gaidano, G. (2013). Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 121, 1403-1412.
23. Rodríguez-Vicente, A.E., Díaz, M.G., and Hernández-Rivas, J.M. (2013). Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogeneous disease. *Cancer Genet* 206, 49-62.
24. Wawrzyniak, E., Kotkowska, A., Blonski, J.Z., Siemieniuk-Rys, M., Ziolkowska, E., Giannopoulos, K., Robak, T., and Korycka-Wolowicz, A. (2014). Clonal evolution in CLL patients as detected by FISH versus chromosome banding analysis, and its clinical significance. *Eur J Haematol* 92, 91-101.
25. Konikova, E., and Kusenda, J. (2003). Altered expression of p53 and MDM2 proteins in hematological malignancies. *Neoplasma* 50, 31-40.

26. Puiggros, A., Blanco, G., and Espinet, B. (2014). Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *Biomed Res Int* 2014, 435983.
27. Matutes, E., Oscier, D., Garcia-Marco, J., Ellis, J., Copplestone, A., Gillingham, R., Hamblin, T., Lens, D., Swansbury, G.J., and Catovsky, D. (1996). Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol* 92, 382-388.
28. Chigrinova, E., Rinaldi, A., Kwee, I., Rossi, D., Rancoita, P.M., Strefford, J.C., Oscier, D., Stamatopoulos, K., Papadaki, T., Berger, F., Young, K.H., Murray, F., Rosenquist, R., Greiner, T.C., Chan, W.C., Orlandi, E.M., Lucioni, M., Marasca, R., Inghirami, G., Ladetto, M., Forconi, F., Cogliatti, S., Votavova, H., Swerdlow, S.H., Stilgenbauer, S., Piris, M.A., Matolcsy, A., Spagnolo, D., Nikitin, E., Zamo, A., Gattei, V., Bhagat, G., Ott, G., Zucca, E., Gaidano, G., and Bertoni, F. (2013). Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome. *Blood* 122, 2673-2682.
29. Gonzalez-Gascon, Y.M.I., Hernandez-Sanchez, M., Rodriguez-Vicente, A.E., Sanzo, C., Aventin, A., Puiggros, A., Collado, R., Heras, C., Munoz, C., Delgado, J., Ortega, M., Gonzalez, M.T., Marugan, I., de la Fuente, I., Recio, I., Bosch, F., Espinet, B., Gonzalez, M., Hernandez-Rivas, J.M., Hernandez, J.A., Grupo Espanol de Leucemia Linfatica, C., and Grupo Cooperativo Espanol de Citogenetica, H. (2016). A high proportion of cells carrying trisomy 12 is associated with a worse outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol* 34, 84-92.
30. Strati, P., Abruzzo, L.V., Wierda, W.G., O'Brien, S., Ferrajoli, A., and Keating, M.J. (2015). Second cancers and Richter transformation are the leading causes of death in patients with trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 15, 420-427.
31. Quijano, S., Lopez, A., Rasillo, A., Sayagues, J.M., Barrena, S., Sanchez, M.L., Teodosio, C., Giraldo, P., Giralt, M., Perez, M.C., Romero, M., Perdiguier, L., and Orfao, A. (2008). Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the

- immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 74, 139-149.
32. Kienle, D.L., Korz, C., Hosch, B., Benner, A., Mertens, D., Habermann, A., Krober, A., Jager, U., Lichter, P., Dohner, H., and Stilgenbauer, S. (2005). Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. *J Clin Oncol* 23, 3780-3792.
  33. Riches, J.C., O'Donovan, C.J., Kingdon, S.J., McClanahan, F., Clear, A.J., Neuberg, D.S., Werner, L., Croce, C.M., Ramsay, A.G., Rassenti, L.Z., Kipps, T.J., and Gribben, J.G. (2014). Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells exhibit upregulation of integrin signaling that is modulated by NOTCH1 mutations. *Blood* 123, 4101-4110.
  34. Xu, Z.S., Zhang, J.S., Zhang, J.Y., Wu, S.Q., Xiong, D.L., Chen, H.J., Chen, Z.Z., and Zhan, R. (2015). Constitutive activation of NF-kappaB signaling by NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Rep* 33, 1609-1614.
  35. Benedetti, D., Tissino, E., Pozzo, F., Bittolo, T., Caldana, C., Perini, C., Martorelli, D., Bravin, V., D'Agaro, T., Rossi, F.M., Bomben, R., Santinelli, E., Zaja, F., Pozzato, G., Chiarenza, A., Di Raimondo, F., Del Poeta, G., Rossi, D., Gaidano, G., Dal Bo, M., Gattei, V., and Zucchetto, A. (2018). NOTCH1 mutations are associated with high CD49d expression in chronic lymphocytic leukemia: link between the NOTCH1 and the NF-kappaB pathways. *Leukemia* 32, 654-662.
  36. Cuneo, A., Rigolin, G.M., Bigoni, R., De Angeli, C., Veronese, A., Cavazzini, F., Bardi, A., Roberti, M.G., Tammiso, E., Agostini, P., Ciccone, M., Della Porta, M., Tieghi, A., Cavazzini, L., Negrini, M., and Castoldi, G. (2004). Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia* 18, 476-483.
  37. Marosvári, D., Alpár, D., Király, A.P., Rajnai, H., Reiniger, L., and Bödör, C. (2016). The genetic landscape of chronic lymphocytic leukemia. *Magy Onkol* 60, 118-125.
  38. Del Principe, M.I., Del Poeta, G., Buccisano, F., Maurillo, L., Venditti, A., Zucchetto, A., Marini, R., Niscola, P., Consalvo, M.A., Mazzone, C., Ottaviani,

- L., Panetta, P., Bruno, A., Bomben, R., Suppo, G., Degan, M., Gattei, V., de Fabritiis, P., Cantonetti, M., Lo Coco, F., Del Principe, D., and Amadori, S. (2006). Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *108*, 853-861.
39. Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marce, S., Lopez-Guillermo, A., Campo, E., and Montserrat, E. (2003). ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* *348*, 1764-1775.
40. Gobessi, S., Laurenti, L., Longo, P.G., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2007). ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood* *109*, 2032-2039.
41. Ticchioni, M., Charvet, C., Noraz, N., Lamy, L., Steinberg, M., Bernard, A., and Deckert, M. (2002). Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood* *99*, 3111-3118.
42. Yokota, A., Yukawa, K., Yamamoto, A., Sugiyama, K., Suemura, M., Tashiro, Y., Kishimoto, T., and Kikutani, H. (1992). Two forms of the low-affinity Fc receptor for IgE differentially mediate endocytosis and phagocytosis: identification of the critical cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 5030-5034.
43. Fournier, S., Yang, L.P., Delespesse, G., Rubio, M., Biron, G., and Sarfati, M. (1995). The two CD23 isoforms display differential regulation in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* *89*, 373-379.
44. Hubmann, R., Duchler, M., Schnabl, S., Hilgarth, M., Demirtas, D., Mitteregger, D., Holbl, A., Vanura, K., Le, T., Look, T., Schwarzmeier, J.D., Valent, P., Jager, U., and Shehata, M. (2010). NOTCH2 links protein kinase C delta to the expression of CD23 in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) cells. *Br J Haematol* *148*, 868-878.
45. Schwarzmeier, J.D., Hubmann, R., Duchler, M., Jager, U., and Shehata, M. (2005). Regulation of CD23 expression by Notch2 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* *46*, 157-165.

46. Acharya, M., Borland, G., Edkins, A.L., Maclellan, L.M., Matheson, J., Ozanne, B.W., and Cushley, W. (2010). CD23/FcepsilonRII: molecular multi-tasking. *Clin Exp Immunol* 162, 12-23.
47. Sarfati, M. (1993). Interleukin-4 and the two isoforms of CD23 antigen: their possible contribution to the physiopathology of chronic lymphocytic leukemia disease. *Nouv Rev Fr Hematol* 35, 109-113.
48. Jurisic, V., Colovic, N., Kraguljac, N., Atkinson, H.D., and Colovic, M. (2008). Analysis of CD23 antigen expression in B-chronic lymphocytic leukaemia and its correlation with clinical parameters. *Med Oncol* 25, 315-322.
49. Sarfati, M., Bron, D., Lagneaux, L., Fonteyn, C., Frost, H., and Delespesse, G. (1988). Elevation of IgE-binding factors in serum of patients with B cell-derived chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 71, 94-98.
50. Molica, S., Levato, D., Dell'Olio, M., Matera, R., Minervini, M., Dattilo, A., Carotenuto, M., and Musto, P. (1996). Cellular expression and serum circulating levels of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Implications for prognosis. *Haematologica* 81, 428-433.
51. Dal-Bo, M., Bertoni, F., Forconi, F., Zucchetto, A., Bomben, R., Marasca, R., Deaglio, S., Laurenti, L., Efremov, D.G., Gaidano, G., Del Poeta, G., and Gattei, V. (2009). Intrinsic and extrinsic factors influencing the clinical course of B-cell chronic lymphocytic leukemia: prognostic markers with pathogenetic relevance. *J Transl Med* 7, 76.
52. Brachtl, G., Piñón Hofbauer, J., Greil, R., and Hartmann, T.N. (2014). The pathogenic relevance of the prognostic markers CD38 and CD49d in chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Hematology* 93, 361-374.
53. Brachtl, G., Sahakyan, K., Denk, U., Girbl, T., Alinger, B., Hofbauer, S.W., Neureiter, D., Hofbauer, J.P., Egle, A., Greil, R., and Hartmann, T.N. (2011). Differential bone marrow homing capacity of VLA-4 and CD38 high expressing chronic lymphocytic leukemia cells. *PLoS One* 6, e23758.
54. Calissano, C., Damle, R.N., Hayes, G., Murphy, E.J., Hellerstein, M.K., Moreno, C., Sison, C., Kaufman, M.S., Kolitz, J.E., Allen, S.L., Rai, K.R., and Chiorazzi, N. (2009). In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 114, 4832-4842.

55. Deaglio, S., Capobianco, A., Bergui, L., Durig, J., Morabito, F., Duhrsen, U., and Malavasi, F. (2003). CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* *102*, 2146-2155.
56. Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* *69*, 11-25.
57. Gahmberg, C.G., Fagerholm, S.C., Nurmi, S.M., Chavakis, T., Marchesan, S., and Grönholm, M. (2009). Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta* *1790*, 431-444.
58. Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res* *339*, 269-280.
59. Berlin, C., Berg, E.L., Briskin, M.J., Andrew, D.P., Kilshaw, P.J., Holzmann, B., Weissman, I.L., Hamann, A., and Butcher, E.C. (1993). Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* *74*, 185-195.
60. Gorfou, G., Rivera-Nieves, J., and Ley, K. (2009). Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr Mol Med* *9*, 836-850.
61. Hemler, M.E., Elices, M.J., Parker, C., and Takada, Y. (1990). Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol Rev* *114*, 45-65.
62. Brachtl, G., Pinon Hofbauer, J., Greil, R., and Hartmann, T.N. (2014). The pathogenic relevance of the prognostic markers CD38 and CD49d in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* *93*, 361-374.
63. Hartmann, T.N., Grabovsky, V., Wang, W., Desch, P., Rubenzer, G., Wollner, S., Binsky, I., Vallon-Eberhard, A., Sapoznikov, A., Burger, M., Shachar, I., Haran, M., Honczarenko, M., Greil, R., and Alon, R. (2009). Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow. *Cancer research* *69*, 3121-3130.
64. Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673-687.
65. Shimizu, Y., Rose, D.M., and Ginsberg, M.H. (1999). Integrins in the immune system. *Adv Immunol* *72*, 325-380.

66. Iademarco, M.F., Barks, J.L., and Dean, D.C. (1995). Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression by IL-4 and TNF-alpha in cultured endothelial cells. *J Clin Invest* 95, 264-271.
67. Fiorcari, S., Brown, W.S., McIntyre, B.W., Estrov, Z., Maffei, R., O'Brien, S., Sivina, M., Hoellenriegel, J., Wierda, W.G., Keating, M.J., Ding, W., Kay, N.E., Lannutti, B.J., Marasca, R., and Burger, J.A. (2013). The PI3-Kinase Delta Inhibitor Idelalisib (GS-1101) Targets Integrin-Mediated Adhesion of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Cell to Endothelial and Marrow Stromal Cells. *PloS one* 8.
68. Benedetti, D., Tissino, E., Caldana, C., Dal Bo, M., Bomben, R., Marconi, D., Ganghammer, S., Zaja, F., Pozzato, G., Di Raimondo, F., Hartmann, T.N., Del Poeta, G., VanMeter, A., Zucchetto, A., Espina, V., Liotta, L., and Gattei, V. Persistent CD49d engagement in circulating CLL cells: a role for blood-borne ligands? *Leukemia*.
69. Masumoto, A., and Hemler, M.E. (1993). Multiple activation states of VLA-4. Mechanistic differences between adhesion to CS1/fibronectin and to vascular cell adhesion molecule-1. *The Journal of biological chemistry* 268, 228-234.
70. Chigaev, A., and Sklar, L.A. (2012). Aspects of VLA-4 and LFA-1 regulation that may contribute to rolling and firm adhesion. *Front Immunol* 3, 242.
71. Lefort, C.T., and Ley, K. (2012). Neutrophil arrest by LFA-1 activation. *Front Immunol* 3, 157.
72. Shishido, S., Bonig, H., and Kim, Y.M. (2014). Role of integrin alpha4 in drug resistance of leukemia. *Front Oncol* 4, 99.
73. Bulian, P., Shanafelt, T.D., Fegan, C., Zucchetto, A., Cro, L., Nuckel, H., Baldini, L., Kurtova, A.V., Ferrajoli, A., Burger, J.A., Gaidano, G., Del Poeta, G., Pepper, C., Rossi, D., and Gattei, V. (2014). CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 32, 897-904.
74. Zucchetto, A., Bomben, R., Dal Bo, M., Bulian, P., Benedetti, D., Nanni, P., Del Poeta, G., Degan, M., and Gattei, V. (2006). CD49d in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlated expression with CD38 and prognostic relevance. *Leukemia* 20, 523-525; author reply 528-529.

75. Gattei, V., Bulian, P., Del Principe, M.I., Zucchetto, A., Maurillo, L., Buccisano, F., Bomben, R., Dal-Bo, M., Luciano, F., Rossi, F.M., Degan, M., Amadori, S., and Del Poeta, G. (2008). Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *111*, 865-873.
76. Shanafelt, T.D., Geyer, S.M., Bone, N.D., Tschumper, R.C., Witzig, T.E., Nowakowski, G.S., Zent, C.S., Call, T.G., Laplant, B., Dewald, G.W., Jelinek, D.F., and Kay, N.E. (2008). CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *Br J Haematol* *140*, 537-546.
77. Eksioğlu-Demiralp, E., Alpdoğan, O., Aktan, M., Firatli, T., Oztürk, A., Budak, T., Bayik, M., and Akoğlu, T. (1996). Variable expression of CD49d antigen in B cell chronic lymphocytic leukemia is related to disease stages. *Leukemia* *10*, 1331-1339.
78. Till, K.J., Lin, K., Zuzel, M., and Cawley, J.C. (2002). The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood* *99*, 2977-2984.
79. Parikh, S.A., Rabe, K.G., Call, T.G., Zent, C.S., Habermann, T.M., Ding, W., Leis, J.F., Schwager, S.M., Hanson, C.A., Macon, W.R., Kay, N.E., Slager, S.L., and Shanafelt, T.D. (2013). Diffuse large B-cell lymphoma (Richter syndrome) in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a cohort study of newly diagnosed patients. *Br J Haematol* *162*, 774-782.
80. Buggins, A.G., Levi, A., Gohil, S., Fishlock, K., Patten, P.E., Calle, Y., Yallop, D., and Devereux, S. (2011). Evidence for a macromolecular complex in poor prognosis CLL that contains CD38, CD49d, CD44 and MMP-9. *Br J Haematol* *154*, 216-222.
81. Zucchetto, A., Vaisitti, T., Benedetti, D., Tissino, E., Bertagnolo, V., Rossi, D., Bomben, R., Dal Bo, M., Del Principe, M.I., Gorgone, A., Pozzato, G., Gaidano, G., Del Poeta, G., Malavasi, F., Deaglio, S., and Gattei, V. (2012). The CD49d/CD29 complex is physically and functionally associated with CD38 in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* *26*, 1301-1312.



82. Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., De Bruyn, C., and Stryckmans, P. (1998). Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* *91*, 2387-2396.
83. Koopman, G., Keehnen, R.M., Lindhout, E., Newman, W., Shimizu, Y., van Seventer, G.A., de Groot, C., and Pals, S.T. (1994). Adhesion through the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54) and the VLA-4 (CD49d)-VCAM-1 (CD106) pathways prevents apoptosis of germinal center B cells. *J Immunol* *152*, 3760-3767.
84. de la Fuente, M.T., Casanova, B., Moyano, J.V., Garcia-Gila, M., Sanz, L., Garcia-Marco, J., Silva, A., and Garcia-Pardo, A. (2002). Engagement of alpha4beta1 integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. *J Leukoc Biol* *71*, 495-502.
85. Zucchetto, A., Tripodo, C., Benedetti, D., Deaglio, S., Gaidano, G., Del Poeta, G., and Gattei, V. Monocytes/macrophages but not T lymphocytes are the major targets of the CCL3/CCL4 chemokines produced by CD38(+)CD49d(+) chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* *150*, 111-113.
86. Plander, M., Seegers, S., Ugocsai, P., Diermeier-Daucher, S., Ivanyi, J., Schmitz, G., Hofstadter, F., Schwarz, S., Orso, E., Knuchel, R., and Brockhoff, G. (2009). Different proliferative and survival capacity of CLL-cells in a newly established in vitro model for pseudofollicles. *Leukemia* *23*, 2118-2128.
87. Asslaber, D., Grossinger, E.M., Girbl, T., Hofbauer, S.W., Egle, A., Weiss, L., Greil, R., and Hartmann, T.N. (2013). Mimicking the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia - where does the journey go? *Br J Haematol* *160*, 711-714.
88. Collins, R.J., Verschuer, L.A., Harmon, B.V., Prentice, R.L., Pope, J.H., and Kerr, J.F. (1989). Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol* *71*, 343-350.
89. Choi, M.Y., Kashyap, M.K., and Kumar, D. (2016). The chronic lymphocytic leukemia microenvironment: Beyond the B-cell receptor. *Best Pract Res Clin Haematol* *29*, 40-53.

90. Burger, J.A. (2013). The CLL cell microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 792, 25-45.
91. Burger, J.A., and Gribben, J.G. (2014). The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol* 24, 71-81.
92. ten Hacken, E., and Burger, J.A. (2014). Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia--focus on the B-cell receptor. *Clin Cancer Res* 20, 548-556.
93. Mudry, R.E., Fortney, J.E., York, T., Hall, B.M., and Gibson, L.F. (2000). Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood* 96, 1926-1932.
94. Thompson, P.A., and Wierda, W.G. (2016). Eliminating minimal residual disease as a therapeutic end point: working toward cure for patients with CLL. *Blood* 127, 279-286.
95. Vitale, C., and Burger, J.A. (2016). Chronic lymphocytic leukemia therapy: new targeted therapies on the way. *Expert Opin Pharmacother* 17, 1077-1089.
96. Ponzoni, M., Doglioni, C., and Caligaris-Cappio, F. (2011). Chronic lymphocytic leukemia: the pathologist's view of lymph node microenvironment. *Semin Diagn Pathol* 28, 161-166.
97. Messmer, B.T., Messmer, D., Allen, S.L., Kolitz, J.E., Kudalkar, P., Cesar, D., Murphy, E.J., Koduru, P., Ferrarini, M., Zupo, S., Cutrona, G., Damle, R.N., Wasil, T., Rai, K.R., Hellerstein, M.K., and Chiorazzi, N. (2005). In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 115, 755-764.
98. Ghia, P., Strola, G., Granziero, L., Geuna, M., Guida, G., Sallusto, F., Ruffing, N., Montagna, L., Piccoli, P., Chilosi, M., and Caligaris-Cappio, F. (2002). Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol* 32, 1403-1413.
99. Caligaris-Cappio, F., Ghia, P., Gottardi, D., Parvis, G., Gregoret, M.G., Nilsson, K., and Schena, M. (1992). BCL-2 in B-chronic lymphocytic leukemia. *Curr Top Microbiol Immunol* 182, 279-286.

100. Kitada, S., Andersen, J., Akar, S., Zapata, J.M., Takayama, S., Krajewski, S., Wang, H.G., Zhang, X., Bullrich, F., Croce, C.M., Rai, K., Hines, J., and Reed, J.C. (1998). Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* *91*, 3379-3389.
101. Ruan, J., Hyjek, E., Kermani, P., Christos, P.J., Hooper, A.T., Coleman, M., Hempstead, B., Leonard, J.P., Chadburn, A., and Rafii, S. (2006). Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* *12*, 5622-5631.
102. Plander, M., Ugocsai, P., Seegers, S., Orso, E., Reichle, A., Schmitz, G., Hofstadter, F., and Brockhoff, G. (2011). Chronic lymphocytic leukemia cells induce anti-apoptotic effects of bone marrow stroma. *Ann Hematol* *90*, 1381-1390.
103. Purroy, N., Abrisqueta, P., Carabia, J., Carpio, C., Palacio, C., Bosch, F., and Crespo, M. (2015). Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG ODN promotes proliferation of chemoresistant CLL cells phenotypically comparable to those proliferating in vivo. *Oncotarget* *6*, 7632-7643.
104. Trimarco, V., Ave, E., Facco, M., Chiodin, G., Frezzato, F., Martini, V., Gattazzo, C., Lessi, F., Giorgi, C.A., Visentin, A., Castelli, M., Severin, F., Zambello, R., Piazza, F., Semenzato, G., and Trentin, L. (2015). Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia (CLL) tumor B cells and mesenchymal stromal cells (MSCs): implications for neoplastic cell survival. *Oncotarget* *6*, 42130-42149.
105. Kurtova, A.V., Balakrishnan, K., Chen, R., Ding, W., Schnabl, S., Quiroga, M.P., Sivina, M., Wierda, W.G., Estrov, Z., Keating, M.J., Shehata, M., Jager, U., Gandhi, V., Kay, N.E., Plunkett, W., and Burger, J.A. (2009). Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood* *114*, 4441-4450.
106. Schrottner, P., Leick, M., and Burger, M. (2010). The role of chemokines in B cell chronic lymphocytic leukaemia: pathophysiological aspects and clinical impact. *Ann Hematol* *89*, 437-446.

107. Schulz, A., Toedt, G., Zenz, T., Stilgenbauer, S., Lichter, P., and Seiffert, M. (2011). Inflammatory cytokines and signaling pathways are associated with survival of primary chronic lymphocytic leukemia cells in vitro: a dominant role of CCL2. *Haematologica* 96, 408-416.
108. Daneshmanesh, A.H., Hojjat-Farsangi, M., Khan, A.S., Jeddi-Tehrani, M., Akhondi, M.M., Bayat, A.A., Ghods, R., Mahmoudi, A.R., Hadavi, R., Osterborg, A., Shokri, F., Rabbani, H., and Mellstedt, H. (2012). Monoclonal antibodies against ROR1 induce apoptosis of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leukemia* 26, 1348-1355.
109. Lutzny, G., Kocher, T., Schmidt-Supprian, M., Rudelius, M., Klein-Hitpass, L., Finch, A.J., Durig, J., Wagner, M., Haferlach, C., Kohlmann, A., Schnittger, S., Seifert, M., Wanninger, S., Zaborsky, N., Oostendorp, R., Ruland, J., Leitges, M., Kuhnt, T., Schafer, Y., Lampl, B., Peschel, C., Egle, A., and Ringshausen, I. (2013). Protein kinase c-beta-dependent activation of NF-kappaB in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vivo. *Cancer Cell* 23, 77-92.
110. Burger, J.A., Tsukada, N., Burger, M., Zvaifler, N.J., Dell'Aquila, M., and Kipps, T.J. (2000). Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 96, 2655-2663.
111. Vladimirova, R., Popova, D., Vikentieva, E., and Guenova, M. (2015). Chronic Lymphocytic Leukemia- Microenvironment and B cells. In *Leukemias-Updates and New Insights*. pp. 247-276.
112. Girbl, T., Hinterseer, E., Grossinger, E.M., Asslaber, D., Oberascher, K., Weiss, L., Hauser-Kronberger, C., Neureiter, D., Kerschbaum, H., Naor, D., Alon, R., Greil, R., and Hartmann, T.N. (2013). CD40-mediated activation of chronic lymphocytic leukemia cells promotes their CD44-dependent adhesion to hyaluronan and restricts CCL21-induced motility. *Cancer Res* 73, 561-570.
113. Ramsay, A.G., Johnson, A.J., Lee, A.M., Gorgun, G., Le Dieu, R., Blum, W., Byrd, J.C., and Gribben, J.G. (2008). Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest* 118, 2427-2437.

114. Kabanova, A., Sanseviero, F., Candi, V., Gamberucci, A., Gozzetti, A., Campoccia, G., Bocchia, M., and Baldari, C.T. (2016). Human Cytotoxic T Lymphocytes Form Dysfunctional Immune Synapses with B Cells Characterized by Non-Polarized Lytic Granule Release. *Cell Rep* *15*, 2313.
115. Riches, J.C., Davies, J.K., McClanahan, F., Fatah, R., Iqbal, S., Agrawal, S., Ramsay, A.G., and Gribben, J.G. (2013). T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* *121*, 1612-1621.
116. Brusa, D., Serra, S., Coscia, M., Rossi, D., D'Arena, G., Laurenti, L., Jaksic, O., Fedele, G., Inghirami, G., Gaidano, G., Malavasi, F., and Deaglio, S. (2013). The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* *98*, 953-963.
117. Dai, Z.S., Chen, Q.F., Lu, H.Z., and Xie, Y. (2009). Defective expression and modulation of B7-2/CD86 on B cells in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Hematol* *89*, 656-663.
118. Beyer, M., Kochanek, M., Darabi, K., Popov, A., Jensen, M., Endl, E., Knolle, P.A., Thomas, R.K., von Bergwelt-Baildon, M., Debey, S., Hallek, M., and Schultze, J.L. (2005). Reduced frequencies and suppressive function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood* *106*, 2018-2025.
119. Kay, N.E., and Zarling, J.M. (1984). Impaired natural killer activity in patients with chronic lymphocytic leukemia is associated with a deficiency of azurophilic cytoplasmic granules in putative NK cells. *Blood* *63*, 305-309.
120. Davids, M.S., and Burger, J.A. (2012). Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Open J Hematol* *3*.
121. Calissano, C., Damle, R.N., Marsilio, S., Yan, X.J., Yancopoulos, S., Hayes, G., Emson, C., Murphy, E.J., Hellerstein, M.K., Sison, C., Kaufman, M.S., Kolitz, J.E., Allen, S.L., Rai, K.R., Ivanovic, I., Dozmorov, I.M., Roa, S., Scharff, M.D., Li, W., and Chiorazzi, N. (2011). Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Mol Med* *17*, 1374-1382.

122. Quiroga, M.P., Balakrishnan, K., Kurtova, A.V., Sivina, M., Keating, M.J., Wierda, W.G., Gandhi, V., and Burger, J.A. (2009). B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood* *114*, 1029-1037.
123. Burger, J.A., Quiroga, M.P., Hartmann, E., Burkle, A., Wierda, W.G., Keating, M.J., and Rosenwald, A. (2009). High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* *113*, 3050-3058.
124. Zucchetto, A., Benedetti, D., Tripodo, C., Bomben, R., Dal Bo, M., Marconi, D., Bossi, F., Lorenzon, D., Degan, M., Rossi, F.M., Rossi, D., Bulian, P., Franco, V., Del Poeta, G., Deaglio, S., Gaidano, G., Tedesco, F., Malavasi, F., and Gattei, V. (2009). CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res* *69*, 4001-4009.
125. Gu, B., Dao, L.P., and Wiley, J. (2001). Impaired transendothelial migration of B-CLL lymphocytes: a defect linked to low L-selectin expression. *Leuk Lymphoma* *42*, 5-12.
126. Till, K.J., Spiller, D.G., Harris, R.J., Chen, H., Zuzel, M., and Cawley, J.C. (2005). CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and alpha4beta1 integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium. *Blood* *105*, 4813-4819.
127. Gutjahr, J.C., Greil, R., and Hartmann, T.N. (2015). The Role of CD44 in the Pathophysiology of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front Immunol* *6*, 177.
128. Fedorchenko, O., Stiefelhagen, M., Peer-Zada, A.A., Barthel, R., Mayer, P., Ecke, L., Breuer, A., Crispatzu, G., Rosen, N., Landwehr, T., Lilienthal, N., Mollmann, M., Montesinos-Rongen, M., Heukamp, L., Durig, J., Hallek, M., Fingerle-Rowson, G., and Herling, M. (2013). CD44 regulates the apoptotic response and promotes disease development in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *121*, 4126-4136.
129. Redondo-Munoz, J., Ugarte-Berzal, E., Terol, M.J., Van den Steen, P.E., Hernandez del Cerro, M., Roderfeld, M., Roeb, E., Opdenakker, G., Garcia-

- Marco, J.A., and Garcia-Pardo, A. (2010). Matrix metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia b cell survival through its hemopexin domain. *Cancer Cell* 17, 160-172.
130. Redondo-Munoz, J., Escobar-Diaz, E., Samaniego, R., Terol, M.J., Garcia-Marco, J.A., and Garcia-Pardo, A. (2006). MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood* 108, 3143-3151.
131. Matsui, M., Nunez, R., Sachi, Y., Lynch, R.G., and Yodoi, J. (1993). Alternative transcripts of the human CD23/Fc epsilon RII. A possible novel mechanism of generating a soluble isoform in the type-II cell surface receptor. *FEBS Lett* 335, 51-56.
132. Chigaev, A., Waller, A., Amit, O., Halip, L., Bologna, C.G., and Sklar, L.A. (2009). Real-time analysis of conformation-sensitive antibody binding provides new insights into integrin conformational regulation. *The Journal of biological chemistry* 284, 14337-14346.
133. Barthel, S.R., Johansson, M.W., McNamee, D.M., and Mosher, D.F. (2008). Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *Journal of leukocyte biology* 83, 1-12.
134. Luque, A., Gomez, M., Puzon, W., Takada, Y., Sanchez-Madrid, F., and Cabanas, C. (1996). Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355-425) of the common beta 1 chain. *J Biol Chem* 271, 11067-11075.
135. Arroyo, A.G., Garcia-Pardo, A., and Sanchez-Madrid, F. (1993). A high affinity conformational state on VLA integrin heterodimers induced by an anti-beta 1 chain monoclonal antibody. *J Biol Chem* 268, 9863-9868.
136. Rossi, D., Zucchetto, A., Rossi, F.M., Capello, D., Cerri, M., Deambrogi, C., Cresta, S., Rasi, S., De Paoli, L., Bodoni, C.L., Bulian, P., Del Poeta, G., Ladetto, M., Gattei, V., and Gaidano, G. (2008). CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 93, 1575-1579.

137. Zucchetto, A., Caldana, C., Benedetti, D., Tissino, E., Rossi, F.M., Hutterer, E., Pozzo, F., Bomben, R., Dal Bo, M., D'Arena, G., Zaja, F., Pozzato, G., Di Raimondo, F., Hartmann, T.N., Rossi, D., Gaidano, G., Del Poeta, G., and Gattei, V. (2013). CD49d is overexpressed by trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells: evidence for a methylation-dependent regulation mechanism. *Blood* *122*, 3317-3321.
138. Liso, V., Capalbo, S., Lapietra, A., Pavone, V., Guarini, A., and Specchia, G. (1999). Evaluation of trisomy 12 by fluorescence in situ hybridization in peripheral blood, bone marrow and lymph nodes of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* *84*, 212-217.
139. Shanafelt, T.D., Hanson, C., Dewald, G.W., Witzig, T.E., LaPlant, B., Abrahamson, J., Jelinek, D.F., and Kay, N.E. (2008). Karyotype evolution on fluorescent in situ hybridization analysis is associated with short survival in patients with chronic lymphocytic leukemia and is related to CD49d expression. *J Clin Oncol* *26*, e5-6.
140. Ganghammer, S., Hutterer, E., Hinterseer, E., Brachtl, G., Asslaber, D., Krenn, P.W., Girbl, T., Berghammer, P., Geisberger, R., Egle, A., Zucchetto, A., Kruschinski, A., Gattei, V., Chigaev, A., Greil, R., and Hartmann, T.N. (2015). CXCL12-induced VLA-4 activation is impaired in trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells: a role for CCL21. *Oncotarget* *6*, 12048-12060.
141. Fournier, S., Rubio, M., Delespesse, G., and Sarfati, M. (1994). Role for low-affinity receptor for IgE (CD23) in normal and leukemic B-cell proliferation. *Blood* *84*, 1881-1886.
142. Solomon, B.M., Rabe, K.G., Slager, S.L., Brewer, J.D., Cerhan, J.R., and Shanafelt, T.D. (2013). Overall and cancer-specific survival of patients with breast, colon, kidney, and lung cancers with and without chronic lymphocytic leukemia: a SEER population-based study. *J Clin Oncol* *31*, 930-937.
143. Brynes, R.K., McCourty, A., Sun, N.C., and Koo, C.H. (1995). Trisomy 12 in Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* *104*, 199-203.



144. Parrens, M., Sawan, B., Dubus, P., Lacombe, F., Marit, G., Vergier, B., Reiffers, J., de Mascarel, A., and Merlio, J.P. (2001). Primary digestive Richter's syndrome. *Mod Pathol* *14*, 452-457.
145. Mao, Z., Quintanilla-Martinez, L., Raffeld, M., Richter, M., Krugmann, J., Burek, C., Hartmann, E., Rudiger, T., Jaffe, E.S., Muller-Hermelink, H.K., Ott, G., Fend, F., and Rosenwald, A. (2007). IgVH mutational status and clonality analysis of Richter's transformation: diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma in association with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) represent 2 different pathways of disease evolution. *Am J Surg Pathol* *31*, 1605-1614.
146. Dal Bo, M., Tissino, E., Benedetti, D., Caldana, C., Bomben, R., Del Poeta, G., Gaidano, G., Rossi, F.M., Zucchetto, A., and Gattei, V. (2014). Microenvironmental interactions in chronic lymphocytic leukemia: the master role of CD49d. *Semin Hematol* *51*, 168-176.
147. de la Fuente, M.T., Casanova, B., Garcia-Gila, M., Silva, A., and Garcia-Pardo, A. (1999). Fibronectin interaction with alpha4beta1 integrin prevents apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax. *Leukemia* *13*, 266-274.
148. Crompton, E., Van Damme, M., Pieters, K., Vermeersch, M., Perez-Morga, D., Mineur, P., Maerevoet, M., Meuleman, N., Bron, D., Lagneaux, L., and Stamatopoulos, B. (2017). Extracellular vesicles of bone marrow stromal cells rescue chronic lymphocytic leukemia B cells from apoptosis, enhance their migration and induce gene expression modifications. *Haematologica* *102*, 1594-1604.
149. Mark, A., Varga, G., Timar, B., Kriston, C., Szabo, O., Deak, L., Matolcsy, A., and Barna, G. (2017). The effect of microenvironmental factors on the development of myeloma cells. *Hematol Oncol* *35*, 741-745.
150. Buchner, M., Baer, C., Prinz, G., Dierks, C., Burger, M., Zenz, T., Stilgenbauer, S., Jumaa, H., Veelken, H., and Zirlik, K. (2010). Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *115*, 4497-4506.
151. Walsby, E., Buggins, A., Devereux, S., Jones, C., Pratt, G., Brennan, P., Fegan, C., and Pepper, C. (2014). Development and characterization of a physiologically

- relevant model of lymphocyte migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 123, 3607-3617.
152. Pasikowska, M., Walsby, E., Apollonio, B., Cuthill, K., Phillips, E., Coulter, E., Longhi, M.S., Ma, Y., Yallop, D., Barber, L.D., Patten, P., Fegan, C., Ramsay, A.G., Pepper, C., Devereux, S., and Buggins, A.G. (2016). Phenotype and immune function of lymph node and peripheral blood CLL cells are linked to transendothelial migration. *Blood* 128, 563-573.
153. Saint-Georges, S., Quettier, M., Bouyaba, M., Le Coquil, S., Lauriente, V., Guittat, L., Levy, V., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Varin-Blank, N., Le Roy, C., and Ledoux, D. (2016). Protein kinase D-dependent CXCR4 down-regulation upon BCR triggering is linked to lymphadenopathy in chronic lymphocytic leukaemia. *Oncotarget* 7, 41031-41046.
154. Liu, F.T., Jia, L., Wang, P., Farren, T., Li, H., Hao, X., and Agrawal, S.G. (2015). CD126 and Targeted Therapy with Tocilizumab in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* 22, 2462-2469.

## 10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### Disszertációhoz kapcsolódó saját publikációk jegyzéke

1. **Kriston C**, Bodor C, Szenthe K, Banati F, Bankuti B, Csernus B, Reiniger L, Csomor J, Matolcsy A, Barna G. Low CD23 expression correlates with high CD38 expression and the presence of trisomy 12 in CLL. *Hematol Oncol.* 2017;35(1):58-63. **IF: 3.193**
2. Mark A, Varga G, Timar B, **Kriston C**, Szabo O, Deak L, Matolcsy A, Barna G. The effect of microenvironmental factors on the development of myeloma cells. *Hematol Oncol.* 2017;35(4):741-5. **IF: 3.193**
3. **Kriston C**, Plander M, Mark A, Sebestyén A, Bugyik E, Matolcsy A, Barna G. In contrast to high CD49d, low CXCR4 expression indicates the dependency of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells on the microenvironment. *Ann Hematol.* 2018;97(11):2145-52. **IF: 2.845**

### Disszertációtól független saját publikációk jegyzéke

4. Jeney A, Hujber Z, Szoboszlai N, Fullar A, Olah J, Pap E, Mark A, **Kriston C**, Kralovanszky J, Kovalszky I, Vekey K, Sebestyén A. Characterisation of bioenergetic pathways and related regulators by multiple assays in human tumour cells. *Cancer Cell Int.* 2016;16:4. **IF: 2.74**
5. Hujber Z, Petovari G, Szoboszlai N, Danko T, Nagy N, **Kriston C**, Krencz I, Paku S, Ozohanics O, Drahos L, Jeney A, Sebestyén A. Rapamycin (mTORC1 inhibitor) reduces the production of lactate and 2-hydroxyglutarate oncometabolites in IDH1 mutant fibrosarcoma cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1):74. **IF: 6.217**

6. Nagy AM, Fekete R, Horvath G, Koncsos G, **Kriston C**, Sebestyén A, Giricz Z, Kornyei Z, Madarasz E, Tretter L. Versatility of microglial bioenergetic machinery under starving conditions. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2018;1859(3):201-14. **IF: 4.280**
  
7. Marosvari D, Nagy N, **Kriston C**, Deak B, Hajdu M, Bodor C, Csala I, Bago AG, Szallasi Z, Sebestyén A, Reiniger L. Discrepancy Between Low Levels of mTOR Activity and High Levels of P-S6 in Primary Central Nervous System Lymphoma May Be Explained by PAS Domain-Containing Serine/Threonine-Protein Kinase-Mediated Phosphorylation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2018;77(4):268-73. **IF: 3.490**
  
8. Takacs F, **Tolnai-Kriston C**, Hernadfoi M, Szabo O, Szaloki G, Szepesi A, Czeti A, Matolcsy A, Barna G. The Effect of CD86 Expression on the Proliferation and the Survival of CLL Cells. *Pathol Oncol Res.* 2018. **IF: 1.935**

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki mindazoknak, akik PhD munkámban segítségemre voltak.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Barna Gábornak, hogy az első pillanattól kezdve feltétlen bizalommal és barátsággal fogadott a laborjában. Hálás vagyok, hogy bevezetett az áramlási citometria, valamint a leukémia, lymphoma diagnosztika izgalmas, folyamatos újdonságokkal teli világába. Köszönöm a sok útmutató tanácsot és a rengeteg bátorítást, lelkesítést.

Köszönöm Prof. Dr. Matolcsy Andrásnak, hogy lehetővé tette, hogy az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben végezhessem PhD munkámat, valamint támogatta az intézetben maradásomat. Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Kovalszky Ilonának és Prof. Dr. Matolcsy Andrásnak, a Semmelweis Egyetem Patológiai Doktori Iskola volt és jelenlegi vezetőjének a támogatásukért.

Hálás vagyok Dr. Plander Márknak, hogy rendelkezésünkre bocsátotta az általa izolált BMSC-sejteket a ko-kultúrák kísérletekhez. Elméleti és gyakorlati tanácsaival, előremutató ötleteivel, valamint a publikációk megírásában nyújtott segítségével nagyban hozzájárult a PhD munka elkészültéhez, köszönöm.

Köszönöm Kovácsné Dr. Márk Ágnesnek bizalmát és barátságát a laborban és azon kívül is, akivel a szakmai kérdések mellett az anyukaság örömeit is bármikor megoszthatjuk egymással.

Köszönettel tartozom Szabó Orsinak, hogy megmutatta az áramlási citometria gyakorlati trükkjeit, valamint, hogy vidám zenékkal, finomságokkal tette színessé a laboros hétköznapiakat.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Sebestyén Annának, aki bizalmával, lelkesedésével és tanácsaival mindig új lendületet adott a kísérleteknek. Köszönöm a számos baráti és szakmai beszélgetést és a közös munkát.

Hálás vagyok Csorba Gézáne Marica és Dankó Titanilla segítségéért, tanácsaiért és kedves szavaiért, ami miatt mindig jó volt a Szövettenyésztő laboratóriumban dolgozni. Köszönöm Dr. Nagy Noéminek a lelkes segítségét, vidámságát.

Köszönettel tartozom Dr. Paku Sándornak, Dr. Bugyik Edinának és Szűcs Armandának a phalloidin festésben és a konfokális mikroszkópozásban, kiértékelésben nyújtott segítségükért.

Köszönöm Dr. Bödör Csabának, Dr. Király Péter Attilának, Gángó Ambrusnak, Kiss Richárdnak, Gulácsi Edinának, Bárányné Pallag Adriennek, Budai Bernadettnek, Lukácsiné Nagy Anna Veronikának és Gróf Stefániának, hogy segítettek a molekuláris vizsgálatokban.

Köszönetemet fejezem ki Deák Lindának és Dr. Papp Gergőnek a FISH vizsgálatokért és kiértékelésekért.

Köszönöm Dr. Rajnai Hajnalka házi opponensemnek a doktori dolgozatom elbírálását, hasznos tanácsait és észrevételeit.

Köszönöm Dr. Csomor Juditnak, Dr. Szepesi Ágotának, Dr. Tímár Botondnak, Dr. Csernus Balázsnak, Dr. Rajnai Hajnalkának és Dr. Mózes Rékának, hogy bizalommal fogadtak a Hematopatológiai munkacsoportban.

Köszönöm az I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet összes munkatársának a kellemes munkahelyi légkört.

Hálás köszönetemet fejezem ki családomnak: Anyukámnak, Levinek, Nagyinak, Sándornak, Icának, Zolinak, Jucinak, Gábornak, Eninek és Joli mamának a meghitt, meleg családi légkörért, a folyamatos támogatásért és, hogy örömem, bánatom mindig megértő fülekre talál. Anyukámnak köszönöm, hogy olyan példát mutat, amit én is igyekszem tovább vinni.

Végezetül köszönöm Férjemnek, Zolinak a szeretetét és támogatását, valamint kisfiunknak, Vilmosnak állandó vidámságát, amivel minden napomat örömtelivé tesz.