

A sejtes mikrokönyezet szerepe a follicularis lymphoma csontvelői terjedésében

Doktori értekezés

Dr. Rajnai Hajnalka

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Matolcsy András, egyetemi tanár, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Erdélyi Dániel egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Kajtár Béla egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina, egyetemi tanár, Ph.D.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Csóka Mónika, egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Mikala Gábor, főorvos, Ph.D.

Budapest
2013

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések Jegyzéke	4
2. Irodalmi háttér.....	7
2.1. A centrum germinatívum.....	7
2.1.1. A B-lymphocyták érése	8
2.1.2. Sejt-sejt interakciók a B-sejt érés során.....	8
2.1.3. A centrum germinatívum sejtjei	9
2.1.4. Gap junctionok szerepe a B-sejt érésben	12
2.2. Érett B-sejtes non-Hodgkin lymphomák	15
2.3. Follicularis lymphoma.....	16
2.3.1. Hisztológiai jellemzők	16
2.3.2. Immunhisztokémiai jellemzők	17
2.3.3. Klinikai prognosztikai tényezők és stádium beosztás	19
2.3.4. Follicularis lymphoma terápiája.....	20
2.3.5. Molekuláris pathogenezis	20
2.3.7. Csontvelői manifesztáció	22
2.3.6. Reaktív mikrokörnyezeti sejtek follicularis lymphomában	24
3. Célkitűzések.....	28
4. Módszerek	30
4.1. Beteganyag.....	30
4.2. Szöveti microarray	31
4.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok	33
4.3.1. Immunhisztokémiai metszetek értékelése a különböző T-sejt csoportok és macrophágok esetén.....	34
4.3.2. Immunhisztokémiai metszetek értékelése az FDC markerek esetén.....	38
4.3.3. Fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálatok.....	39
4.3.4. A fluoreszcens immunhisztokémiai metszetek értékelése	40

4.4. Statisztikai analízis	41
4.5. Etikai vonatkozások	41
5. Eredmények	42
5.1. A malignus sejtek fenotípusa a nyirokcsomó és csontvelő mintákban	42
5.2. A nyirokcsomóban és a hozzá tartozó csontvelő mintában észlelt tumoros infiltráció reaktív mikrokörnyezeti sejtjeinek vizsgálata	44
5.3. A csontvelői tumoros infiltráció FDC hálózatának vizsgálata	46
5.4. A csontvelői tumoros infiltráció területén észlelhető connexin43 expresszió	49
5.5. A nyirokcsomó reaktív mikrokörnyezetének vizsgálata csontvelő infiltrációval társuló és csontvelői infiltrációt nem mutató esetekben.....	51
5.6. A nyirokcsomó FDC hálózatának vizsgálata	53
5.7. Connexin 43 expresszió nyirokcsomói lokalizációjában	56
6. Megbeszélés.....	58
7. Következtetések	66
8. Összefoglalás	67
9. Abstract	68
10. Irodalomjegyzék	69
11. Saját publikációk jegyzéke	88
11.1 Az értekezés témájában megjelent közlemények.....	88
11.2 Egyéb témában megjelent közlemények	88
12. Köszönetnyilvánítás	90

1. Rövidítések Jegyzéke

ABC	Aktivált B-sejt
ACTN1	Actinin, alpha 1
AID	Aktiváció-indukált citidin deamináz
ATP	Adenozin trifoszfát
BAFF/BLys	B-sejt aktiváló faktor/B-lymphocyta stimulátor
B2M	β 2-mikroglobulin szint
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCL6	B-cell lymphoma 6
C3AR1	Komplement komponens 3a receptor 1
cAMP	Ciklikus adenozin monofoszfát
CD	Sejt differenciációs antigén
CHOP	Cyclophosphamid, doxorubicin, vincristin, prednison
CLL	Chronicus lymphocytas leukemia
CREBBP	CREB-kötő protein
CVP	Cyclophosphamid, vincristin, prednison
Cx43	Connexin 43
CXCL13	Chemokin (C-X-C motif) ligand 13
CXCR5	Chemokin (C-X-C motif) receptor 5
D	Diverzitás régió
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC	Dendritikus sejt
DLBCL	Diffúz nagy B-sejtes lymphoma
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
EPHA7	Ephrin-A receptor 7
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FC	Fragment crystallizable
FCGR1A	IgG nagy affinitású Fc fragmensla receptor
FDC	Follicularis dendriticus sejt
FL	Follicularis lymphoma
FLIPI	Follicularis Lymphoma International Prognostic Index

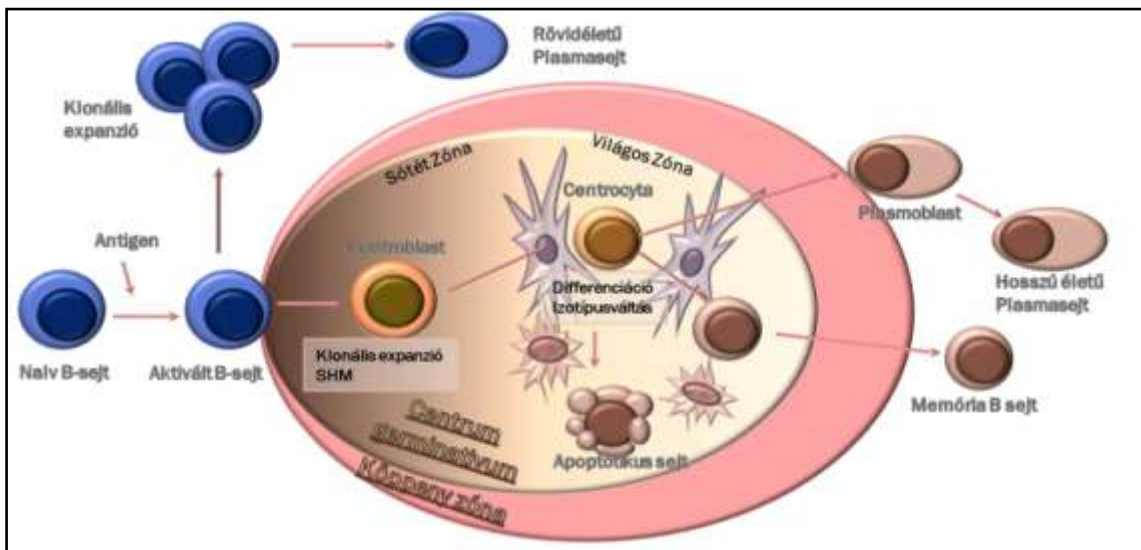
FOXP3	Forkhead box P3
GC	Centrum germinatív
GCB	Centrum germinatívum B-sejt
Hb	Hemoglobin
HRP	Tormaperoxidáz
ICAM-1	Intercellularis Adhéziós Molekula 1
ICOS	Indukálható T-sejt Co-Stimulator
ICOSL	Indukálható T-sejt Co-Stimulator Receptor
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin nehéz lánc
IL	Interleukin
IRF4/MUM1	Multiple myeloma oncogene-1/Interferon regulator faktor 4
ITK	Indukálható T-sejt kináz
J	Joining régió
LDH	Szérum laktát dehidrogenáz
LEF1	Lymphoid enhancer-kötő faktor 1
LFA1	Lymphocyta funkció-asszociált antigén 1
LGMN	Legumain
LoDLIN	Legnagyobb nyirokcsomó legnagyobb átmérője
LPS	Lipopolisaccharid
LT	Lymphotoxin
MEF2B	Myocyta enhancer faktor 2B
MLL2	Myeloid/lymphoid vagy mixed-lineage leukemia 2
MMP	Matrix metalloproteáz
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGFR	Idegi növekedési faktor receptor
NHL	Non-Hodgkin lymphoma
NLC	Nursing-like sejt
NO	Nitrogén-monoxid
OS	Teljes túlélés
PBDLBCL	Primer csont diffúz nagy B-sejtes lymphoma

PD1	Programozott sejthalál 1
PFS	Progresszió mentes túlélés
PI3K	Phosphoinozitol 3-kináz
PKC α	Protein kináz C α
R	Rituximab
RAG	Rekombináció-aktiváló gén
Rap1 GTPase	Ras-kapcsolt protein 1 guanozin trifoszfát hidroláz
SEPT10	Septin 10
SHM	Szomatikus hipermutáció
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STAT4	Signal transducer and activator of transcription 4
TBS	Tris-buffered saline
TCR	T-cell receptor
TEC	Thymus epithel sejtek
TMA	Tissue microarray
TNF	Tumor necrosis factor
TLR5	Toll-like receptor 5
TNFAIP3/A20	TNF alpha-induced protein 3
TNFRSF14	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14
TNFSF13B	Tumor necrosis factor ligand superfamily, member 13B
V	Variabilis régió
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
WHO	World Health Organization

2. Irodalmi háttér

2.1. A centrum germinatívum

A lymphoid szövetek a lymphocyta fejlődés, érés és immunválasz szinterei és fontos szabályozói. Lényegileg három fő funkciót töltenek be. (1) Megfelelő stromalis környezetet biztosítanak a lymphoid sejtek fejlődése során. (2) Támogatják a B-lymphocyták szelekcióját a nagy affinitású B-sejtek túlélésével (pozitív szelekció), ill. a nem funkcionális, vagy autoreaktív antigén receptorral rendelkező B-lymphocyták elpusztításával (negatív szelekció). (3) Szabályozzák továbbá az immunválasz hatékonyságát és (pontosságát) lefolyását, mely különböző lymphoid sejtípusok összehangolt együttműködésének köszönhető[1].



1. Ábra. B-lymphocyta fejlődés.

A csontvelőből kilépő, immunoglobulin nehézlánc(IGH) génátrendezett naiv B-lymphocyták a nyirokcsomóba vándorolnak, ahol antigén inger hatására aktiválódnak, majd elsődlegesen klonális expanzió (primer immunválasz, ill. szénhidrát antigénekre adott válasz esetén) után rövidéletű plazmasejtekévé érnek. Másrészt, ismételt antigén ingerre centroblast morfológiát mutató aktivált B-lymphocytákként a nyirokcsomó csírcentrumának (centrum germinatívumának) sötét zónájában immunoglobulin könnyű és nehézlánc génjeik szomatikus hipermutációkat szenvednek. Ezután a centrocyta morfológiájú sejtek a nyirokcsomó világos zónájában a follicularis dendritikus sejtek (FDC) által kínált antigénekhez kapcsolódva pozitív affinitási szelekció, majd IGH izotípus váltás után immunoglobulin termelő plazmasejtekévé és memória B-sejtekévé differenciálódnak.

2.1.1. A B-lymphocyták érése

A B-lymphocyta fejlődés (1. Ábra) során a csontvelő naiv B-sejtjeiben lejátsszódik az immunglobulin nehézlánc (IgH) génátrendeződés, amely folyamat során a RAG1 és RAG2 (Recombination-activating gene 1 és 2) aktivációja segítségével megtörténik az IgH variábilis (V), diverzitás (D), és joining (J) régióinak rekombinációja [2-4]. Majd a naiv B-sejt antigénnel való találkozást követően a nyirokcsomó centrum germinatívumába kerül, ahol lejátsszódik az immunglobulinok affinitás érése, melynek során a szomatikus hipermutáció (SHM) folyamatának következtében az Immunglobulin gén variábilis régiójában random mutációk keletkeznek. Az érés ezen stádiumában folyamatos jellegű, „ongoing” szomatikus mutációs aktivitás zajlik, melynek következtében intraklonális divergencia alakul ki, vagyis a B-sejt populáció heterogénné válik. Az SHM kialakulásához szükséges az aktiváció-indukált citidin deamináz (AID) jelenléte, melynek expressziója centrum germinatívum (GC) B-lymphocytákra specifikus[5, 6].

2.1.2. Sejt-sejt interakciók a B-sejt érés során

A csontvelőből kikerülő naiv B-sejtek a nyirokcsomó T-sejt gazdag zónájába vándorolnak először, ahol a CD4⁺ T-sejtekkel és antigén prezentáló sejtekkel történő interakción keresztül aktiválódnak. A B-lymphocyták folliculusba történő migrációjában a CXCL13-CXCR5 kemokin – kemokin-receptor pár játszik fontos szerepet. A CXCL13-at a follicularis dendritikus sejtek termelik[7], míg a CXCR5-öt minden érett B-lymphocyta expresszálja[8]. A centrum germinatívumban CXCR5-öt expresszáló follicularis helper T (T_{FH}) sejtek, antigén prezentáló dendritikus sejtek, illetve macropgahok találhatóak[9]. A centrum germinatívum reakció kialakulásához B-lymphocyta sejt felszíni receptorok valamint T-sejtek illetve antigén prezentáló sejtek által expresszált ligandok interakciója szükséges. Ezek közül a legfontosabb a minden B-lymphocyta által expresszált tumor necrosis factor (TNF)-receptor családba tartozó CD40 és a T-helper sejtek által expresszált ligandja a CD40L. Az aktivált B-sejtek egyrészt fejlődhetnek direkt módon antitest szekretáló sejtekké a plasmoblastok

növekedését és differenciálódását biztosító extrafolliculáris területeken. Továbbá GC-precursor B-sejtek alakulhatnak ki belőlük, melyet követően keringő IgM+ IgD+ B-lymphocytákból és follicularis dendriticus sejt (FDC) hálózatból felépülő primer folliculusokba vándorolnak, ahol gyorsan proliferálnak, illetve kiszorítják az IgM+IgD+ B-lymphocytákat, melyek a GC köpenyzónáját képezik. Az érett GC két részből épül fel, a proliferáló B-sejtekből álló sötét zónából és a kis, nem osztódó centrocytákból, FDC hálózatból, T-sejtekből és macrophágokból álló világos zónából[10] (2.Ábra).

2.1.3. A centrum germinatívum sejtjei

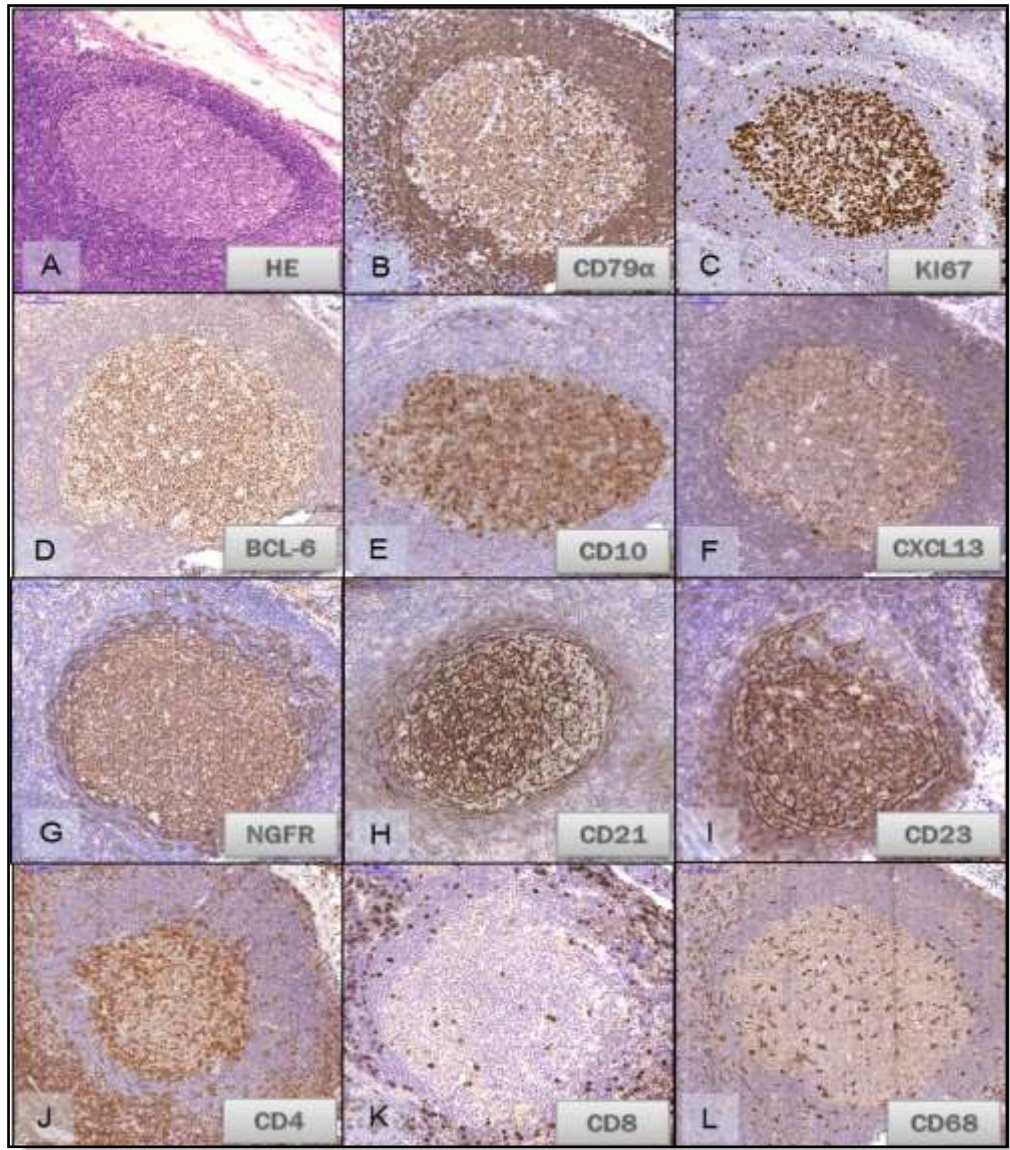
A follicularis helper T-sejtek heterogén csoportot alkotnak a T-sejt populáción belül. A centrum germinatívumban PD1+ follicularis helper T-sejtek kapcsolódnak a GC B-sejtekhez, különböző molekula-párokon keresztül, úgymint T-sejt receptor (TCR) és a major histocompatibilitási komplex II-es típusa (MHC-II); CD28-B7 család tagjai; CD40 és CD40L; ICOS és ICOSL; PD1 és ligandja a PDL1 és az IL-21 és IL-21R, melyek az affinitásérően átesett memória B-sejtek és a hosszú életű plazmasejtek érésében játszanak fontos szerepet[11, 12]. A CD57+ follicularis helper T-sejtek a GC B-sejtek immunglobulin produkcióját indukálják[13].

A centrum germinatívum reakció kontrollját a FOXP3+ regulátoros T-lymphocyták (T_{reg} -sejtek) végzik. A T_{reg} -sejtek TCR receptoron keresztüli aktiváció következtében, a T_{FH} -sejtek szupressziója által gátolhatják a GC B-sejtek proliferációját [14], illetve az izotípus váltás folyamatának direkt gátlásával a B-sejtek Ig produkcióját [15, 16]. Továbbá a granzyme-dependens, valamint a részben perforin-dependens útvonalon keresztül szelektíven sejthalált váltanak ki a GC B-sejtekben[16]. Emellett gátolják a CD4+ és CD8+ T-sejtek mediálta effektor immunválaszt, mely folyamat segítségével fenntartják az immun-homeosztázist és szuppresszálják a nem megfelelő immunválaszt.

A macrophágok egy kifejezetten heterogén sejtpopulációt jelentenek, mely sejtek funkcióját jelentős mértékben befolyásolja a mikrokörnyezet amelyben elhelyezkednek. A GC macrophágjai phagocytálják az apoptózison átesett B-sejtek maradványait, melyek a macrophágok cytoplasmájában észlelhetőek, jellegzetes

mikroszkópos képet kölcsönözve e phagocytáló sejteknek, melyeket tingible body macrophágoknak nevezzük [17]. Fontos szerepet játszanak a centrum germinativum reakció kialakulásában, illetve a B-sejtes tolerancia szabályozásában[17]. A STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) expressziót mutató macrophágok negatívan befolyásolják a CD4+ T-lymphocyták antigén specifikus aktivációját[18].

A GC B-sejtek kifejezett proliferációját és apoptózisát az FDC hálózat indukálja. Egyrészt megakadályozza a sejtek apoptózisát az antigén-antitest kapcsolaton keresztül, melynek során az immunkomplexeket FC receptorokhoz (CD32, CD23) és complement receptorokhoz kötve (CD21, CD35) mutatja be a B-sejteknek; a kapcsolat B-sejt receptoron keresztül megy végbe. Másrészt szabályozza a sejtek proliferációját, illetve az immunválasz specificitását és szenzitivitását. A CD44, az intercellularis adhéziósmolekula-1 (ICAM-1) és vascularis sejt adhéziósmolekula-1 (VCAM-1) elősegíti a sejt-sejt kapcsolatot. A tumor nekrozis faktor családba tartozó B-sejt aktiváló faktor (BAFF/BLys) meggátolja a GC B-sejtek apoptózisát, míg az interleukin-15 (IL-15) fokozza a GC B-sejtek proliferációját[19].



2. Ábra. Reaktív nyirokcsomó secunder folliculusának sejttözetétele.

A: Reaktív secunder folliculus mely körülötte az aszimmetrikus köppenyzónával. A csíracentrumban az ún. tingibilis macrophágok alig festődő foltokként látszanak.

B,C,D,E. A csíracentrum és a köppenyzóna B-lymphocytái CD79 α pozitívak. A csíracentrum B-sejtjei a sötétzónában elmeszve közel 100%-os proliferációs (Ki67) aktivitást mutatnak és aktivált B-sejt (CD10, BCL-6) markereket expresszálnak.

F,G,H,I: Az LNGFR reakció egyenletes kiterjedésű, az FDC hálózatot is magában foglaló, stromalis sejthálózatot jelöl a csíracentrumban, míg a CD21, CD23 FDC markerek itt kifejezett polarizációt mutatnak, ami a CXCL13 kemokin expressziója alapján is megfigyelhető.

J: Nagyszámú CD4+ T-lymphocytá mind interfolliculáris, mind folliculáris lokalizációban.

K: CD8+ T-lymphocytá follicularis lokalizációban csupán elvétve látható.

L: A CD68+ macrophágok, beleértve a „tingibilis” sejteket, enyhe polarizációja azonosítható.

2.1.4. Gap junctionok szerepe a B-sejt érésben

A direkt sejt-sejt kommunikáció csatornái, vagyis az ún. gap junctionok széles körben megtalálhatóak szolid szöveteken, illetve lymphoid szövetek sejtjein is, úgymint csontvelő, thymus, illetve a másodlagos lymphoid szervek (1. Táblázat)[20].

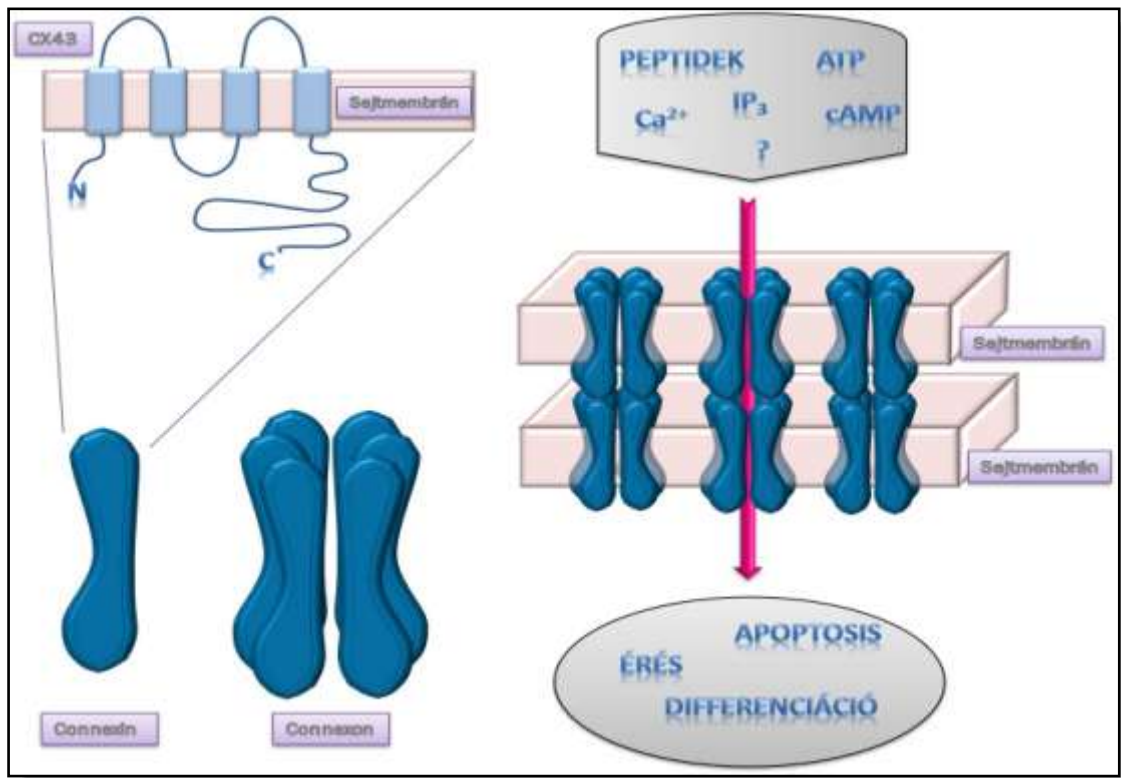
A gap junction csatornákat formázó connexin molekula négyszer halad át a sejtmembránon, ahol hexamer hemicsatornává oligomerizálódva ún. connexonokat hoznak létre (3. Ábra). A szomszédos sejtek connexonjai egymással összekapcsolódva közvetlen metabolikus kapcsolatot (gap junction) hoznak létre a két sejt citoplazmája között. A gap junction csatornák 1,2kDa tömegű molekulák és ionok - ATP, cAMP és peptidek - transzferét teszik lehetővé a sejtek között[21].

1. Táblázat. Az immunrendszer sejtjeinek connexin 43 expressziója

Connexin izotípus	Sejttípus	Funkció	Kapcsolódó sejtek	Referencia
	Csontvelői dendritikus sejt (DC)	Dendritikus sejt aktiváció	DC-DC	[22]
	Csontvelői stroma sejtek	Hematopoiesis	Stroma sejtek-HSC	[23]
	Follicularis dendritikus sejtek	GC kialakulás	FDC – B-sejt	[24]
Cx43	Macrophágok	Gyulladás	Macrophág-Intestinalis endothel	[25]
	Thymus epithel sejtek (TEC)	T-sejt fejlődés	TEC – T-sejt progenitor	[26]
	T-lymphocyta	Érés	T-sejt – T-sejt	[27]
	B-lymphocyta	Antitest szekréció	T-sejt – B-sejt	[28]
	NK-sejt	Aktiváció	NK-sejt – NK-sejt	[27]

A 21 humán connexin legősibb és legszélesebb körben kimutatató izotípusa a connexin 43 (Cx43), melynek kitüntetett szerepe van a lymphoid sejtek és a stromalis sejtek kommunikációjában[21]. A centrum germinatívumokban a Cx43 az FDC sejtek

centrocytákat körülölelő nyúlványain helyezkedik el legsűrűbben (4.Ábra) [29]. Ismételt antigéninger hatására kialakuló másodlagos nyiroktüszőkben nagy számban jelennek meg, ami felveti szerepüket a humorális immunválasz folyamatában. A FDC – B-sejt interakcióban feltételezett szerepüket támasztja alá, hogy mind az FDC mind a centrocyták membránjában kimutatható.



3. Ábra. A Connexin 43 és a gap junctionok szerkezete.

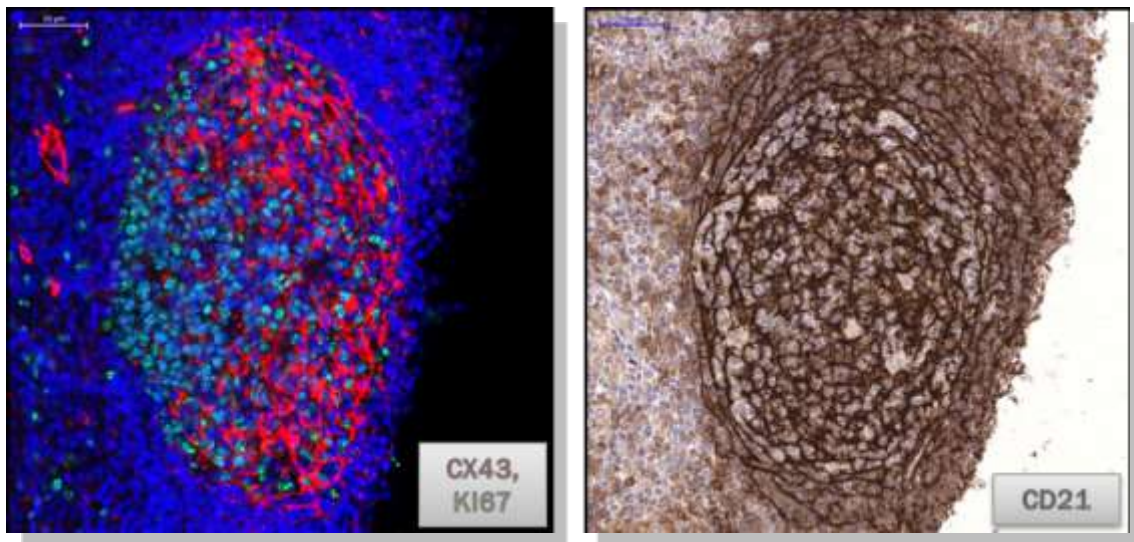
A connexin molekula négyszer halad át a plazmamembránon, melynek során két extracelluláris loopot alkot, mely a csatorna kialakításáért felelős. A citoplazmatikus C-terminalis farok a csatornafunkció szabályozásában tölt be fontos szerepet. A gap junction egy hat connexinből álló félcsatorna, melyet connexonnak nevezünk. Csatorna funkcióját egy másik sejt connexonjához kapcsolódva nyeri el. A csatorna a sejtek érésében, differenciációjában és az apoptózisban szerepet játszó kis molekulák és peptidek passzív transzportját teszi lehetővé.

Ex vivo tenyésztett lymphoid folliculusokban igazolták, hogy az FDC hálózatsejtek a gap junctionokon keresztül mind a szomszédos FDC sejttel, mind a környező B-sejtekkel képesek kapcsolatot teremteni [20]. A B-lymphocyták immunglobulin termelése csökken gap junction inhibitor jelenlétében, mely a Cx43

csatornákon keresztüli interakciók Ig produkcióban betöltött szerepét támasztja alá[28]. A gap junction kapcsolaton keresztül proliferációt szabályozó szignálok is juthatnak a sejtekbe. A csatornák upregulációjával a sejtek proliferációja és növekedése gátlódik, míg downreguláció esetén a proliferáció fokozódik[30]. A Cx43 aktivációjának szerepét le írták a B-lymphocyták LFA1 mediált Rap1 GTPase aktivációjában, illetve az ezzel kapcsolatos B-sejt migrációban és adhézióban[31].

A különböző T-lymphocyta szubpopulációk szempontjából is ismert a Cx43 expressziójának fontossága. A T-sejtek thymusbeli érése során jelentős szerepe van a direkt sejt-sejt kommunikációnak, ugyanis ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy Cx43 deficiens egérben a T-sejtérés terminális stádiumának károsodása volt megfigyelhető[32]. Fontos szerepet töltenek be a CD4+ T-lymphocyták proliferációjának és klonális expanziójának kontrolljában is[33].

A Cx43 szerepe ismert a FOXP3+ regulátoros T-sejtek képződésében, a Cx43 gén deléciója egérben a T_{reg}-lymphocyták számának csökkenését eredményezte [34]. Emellett a connexinek expressziója az immunrendszer sejtjeinek nagy részén megfigyelhető, upregulációjuk mutatható ki gyulladásos faktorok (LPS, IFN- γ) hatására [35].

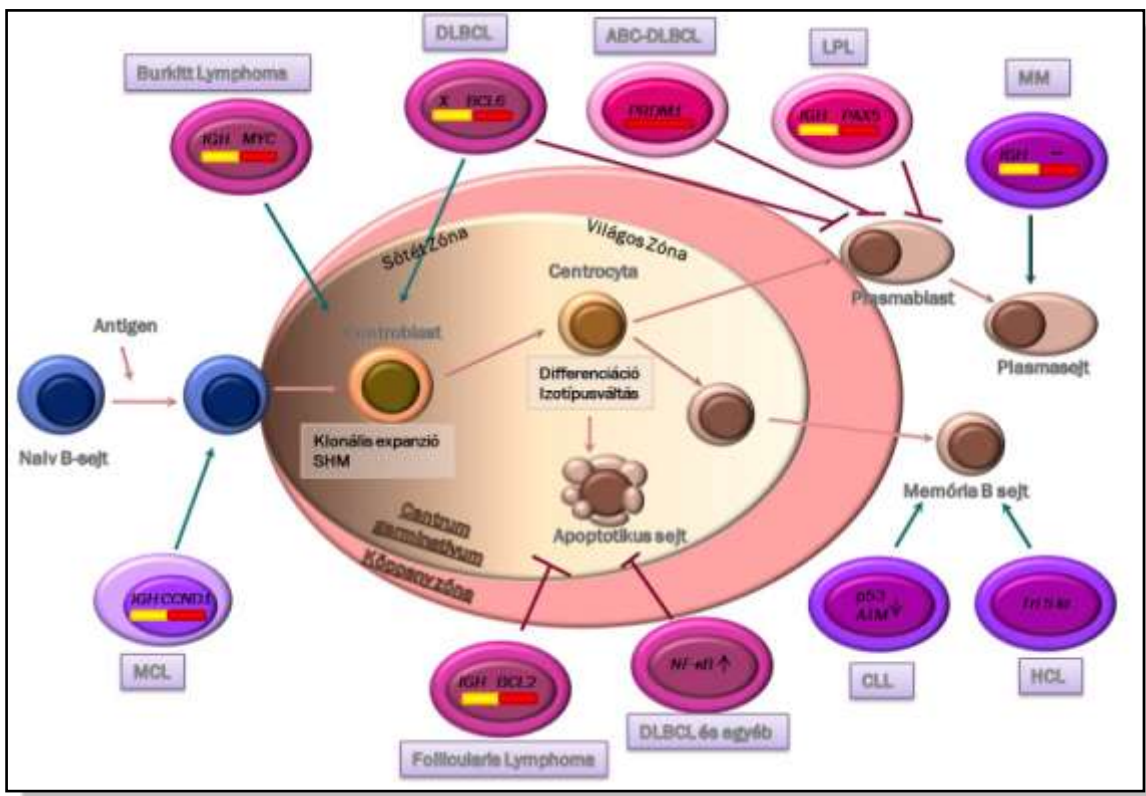


4. Ábra. Connexin 43 expresszió nyirokcsomói secuder folliculusban.

Az connexin 43 (piros) expresszió az FDC hálózatnak megfelelően a reaktív centrum germinatívum világos zónájára jellemző a proliferáló (Ki67, zöld) sötét zónában csupán (Bal, immunfluoreszcencia). CD21 (komplement C3d receptor) expresszió a nyiroktüsző sorozatmetszetén az FDC hálózat mentén egyenletes eloszlást mutat.

2.2. Érett B-sejtes non-Hodgkin lymphomák

Az érett B-sejtes non-Hodgkin lymphomák különböző mértékben differenciált B-lymphocytás eredetű daganatos megbetegedések, melyek esetében a malignus sejtek morfológiája, fenotípusa és genotípusa hasonlít a megfelelő differenciáltsági fokú normál B-sejtekére[36]. A betegségcsoportban gyakoriak az immunoglobulin (Ig) gén és különböző proto-onkogének transzlokációi, amelyek konstitutívan aktív proto-onkogén expressziót és ezzel autonóm, kontrollálatlan sejtproliferációt, illetve apoptózis gátlást eredményeznek (5. Ábra).



5. Ábra. Érett B-sejtes non-Hodgkin lymphomák sejteredete.

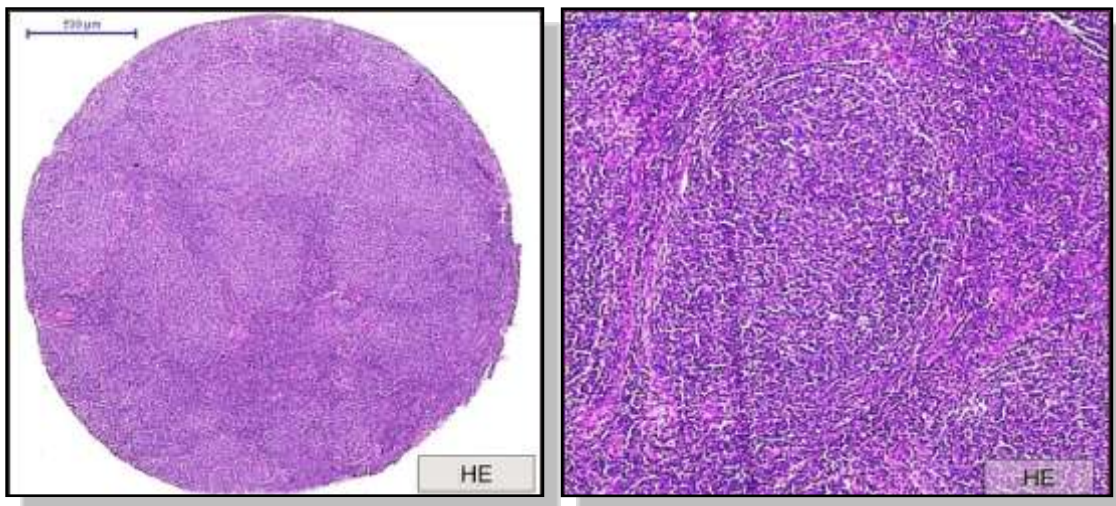
Az érett B-sejtes NHL-ákra az az antigén expressziójellemző, amely megfelel annak a B-sejt fejlődési stádiumnak, amelyben a kóros lymphocyták megrekednek. Az ábrán a különböző érett B-sejtes NHL-ák felosztása látható sejteredetük és domináns genetikai eltéréseik alapján.

2.3. Follicularis lymphoma

A follicularis lymphoma egy indolens, alacsony malignitású B-sejtes non-Hodgkin lymphoma (NHL), mely Európában és Észak-Amerikában az összes NHL körülbelül 20%-át teszi ki [37]. Közép-Európában az előfordulási gyakorisága ennél alacsonyabb [38]. A diagnóziskori medián életkor 60 év, enyhe női predominanciával [37].

2.3.1. Hisztológiai jellemzők

A follicularis lymphoma morfológiai, fenotípusos és molekuláris sajátosságai emlékeztetnek a secunder lymphoid folliculusok normál centrum germinativumaira, amely a felveti a lymphoma sejtek centrum germinativum B-sejt eredetét (6. Ábra) [36, 37].



6.Ábra. Follicularis lymphoma.

100%-ban follicularis szerveződést mutató FL. A folliculusok változó nagyságúak, szorosan helyezkednek el. A folliculusokat centroblastok és centrocytak építik fel, hiányoznak belőlük a normál secunder folliculusokban észlelhető tingibilis macrophágok.

A tumorsejtek a differenciálódási foka alapján morfológiailag lehetnek centrocytákhoz (kis-, középnagy sejtek) illetve centroblastokhoz (nagy sejtek) hasonló sejtek. A centrocyta és centroblast morfológiájú sejtek arányának megfelelően megkülönböztetünk grade I (centrocyták), grade II (centrocyták és centroblastok), grade IIIA (túlnyomóan centroblastok, de még centrocyták is láthatóak) illetve grade IIIB (nagy kiterjedésű, csak centroblastokból álló mezők) FL-t. Számos vizsgálat igazolja, hogy a hisztológiai grade meghatározhatja, illetve befolyásolhatja a betegség prognózisát [37].

A neoplasticus folliculusok a normál centrum germinativumokhoz hasonlóan számos reaktív sejtípust tartalmaznak, úgymint különböző T-lymphocyta szubtypusokat, macrophagokat és follicularis dendriticus sejteket (FDC). A secunder folliculusokra jellemző tingibilismacrophagok azonban hiányoznak [39]. Morfológiailag megkülönböztetünk follicularis és diffúz területeket, melyeket a follicularis dendritikus sejtek hálózata jellemez. A diffúz területeken nem mutatható ki FDC hálózat. Amennyiben a diffúz területeket főként centrocyták alkotják, az klinikai szignifikanciát nem hordoz, azonban ha ezen területek főként centroblastokból épülnek fel akkor a kórképet diffúz nagy B-sejtes lymphomaként kell kezelni. A follicularis lymphoma mintázatát a follicularis és diffúz területek aránya határozza meg. Follicularis a mintázat, ha a tumoros nyirokcsomóban észlelt mintázat > 75%-a follicularis, 25% és 75% között follicularis és diffúz, illetve fokálisan follicularis/predomináns diffúz, ha a területek <25%-a follicularis [37].

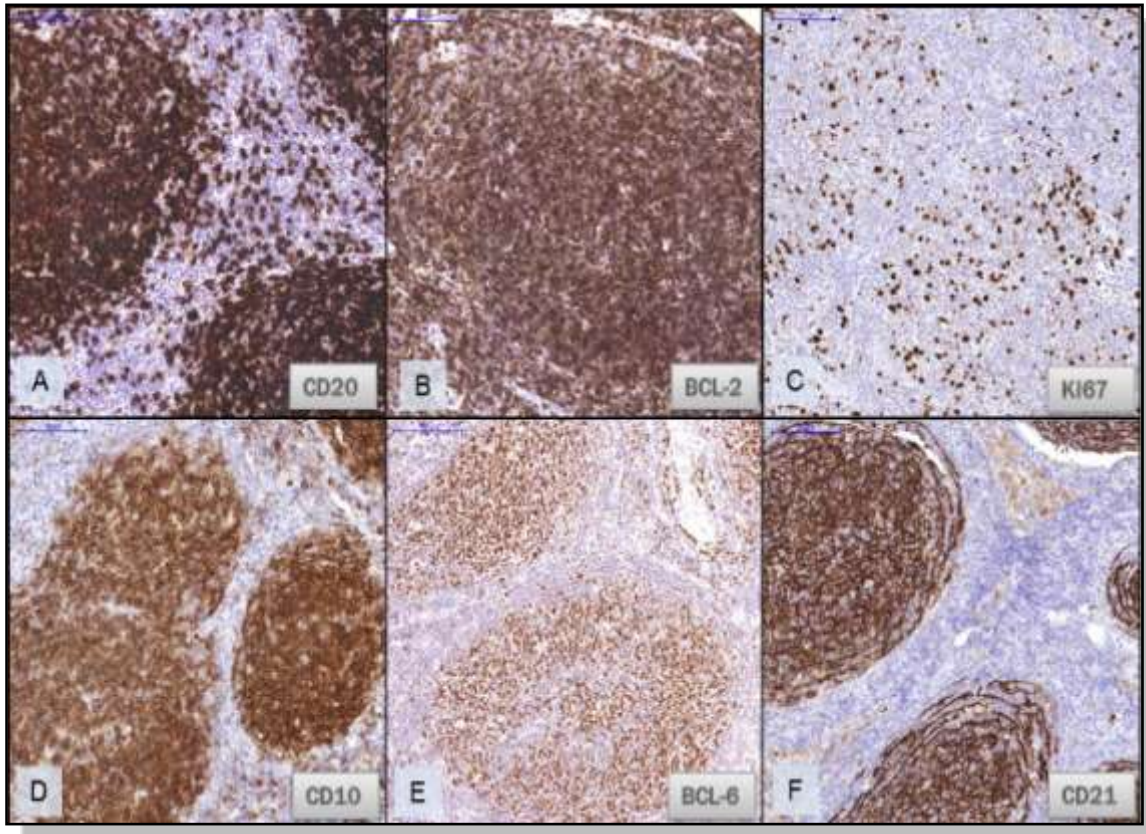
2.3.2. Immunhisztokémiai jellemzők

A neoplasticus folliculusokat felépítő sejtek centrum germinativum B-sejt eredetét alátámasztja az immunfenotípusuk.

A sejtek sejt felszíni immunoglobulint expresszálnak, mely leggyakrabban IgM, azonban ritkán IgD, IgG és IgA expresszió is előfordulhat. Jellemző a B-lymphocyta asszociált antigének expressziója, úgymint CD19, CD20, CD22 és CD79 α [37]. Továbbá

jellemző rájuk a Bcl-6 és CD10 antigének kifejezése, melyek specifikusan a centrum germinativum B-lymphocytákban expresszálódnak (7. Ábra) [40, 41].

A konstitutív Bcl-2 expresszió következtében a neoplasticus folliculusok B-sejtjei BCL2 pozitívak. A tumorsejtek CD5 és CD43 illetve IRF4/MUM1 negatívak.



7. Ábra. Antigén expresszió follicularis lymphomában.

A: A tumoros folliculusokban a B-lymphocyták erős CD20 expressziót mutatnak. B: A t(14;18) Bcl-2/IgH transzlokáció miatt fokozottan expresszálják a Bcl-2 proteint. C: Ki-67 markerrel a proliferációs ráta a normál folliculusokénál alacsonyabb. D,E: A tumorsejtek centrum germinativum B-lymphocyta eredetét a kifejezett CD10 és Bcl-6 expresszió támasztja alá. F: Follicularis dendritikus sejt hálózatot reprezentáló CD21 expresszió a tumoros folliculusokban.

2.3.3. Klinikai prognosztikai tényezők és stádium beosztás

A follicularis lymphoma klinikai szempontból heterogén betegség. Számos prognosztikai tényező került meghatározásra, úgymint az életkor, abetegség stádiuma, „tumor burden”, csontvelői érintettség, szisztémás tünetek, általános állapot, szérum laktát dehidrogenáz (LDH) szint, hemoglobin (Hb) szint, vérsüllyedés, és β 2-mikroglobulin (B2M) szint [42-46]. 2004-ben egy nemzetközi együttműködés eredményeképpen megalkották a Follicular Lymphoma International Prognostic Indexet (FLIPI) [45]. Az indexet a betegek életkora, a betegség stádiuma, a hemoglobin szint, az érintett nodalis területek száma és az LDH szint alapján állapítják meg. A FLIPI-t alkotó tényezőket azonban az anti-CD20 monoclonalis antitest megjelenése előtt határozták meg, így az akkor alkalmazott kezelések nem felelnek meg a mai terápiás protokolloknak. 2003-ban prospektív vizsgálatot indítottak a FLIPI aktualizálása céljából, amely alapján 2009-ben megalkották a FLIPI 2-t. Ezen index alapján a fő prognosztikus tényezők a beteg életkora, a hemoglobin szint, a β 2-mikroglobulin szint, a legnagyobb nyirokcsomó legnagyobb átmérője (LoDLIN), és a csontvelői érintettség, melyek alapján alacsony, közepes és magas rizikójú betegcsoportok határozhatóak meg. Ezen eltérő csoportok progressziómentes túlélése és teljes túlélése szignifikánsan különböző [47].

A follicularis lymphoma stádium meghatározást az Ann Arbor staging rendszer szerint végezzük (2. Táblázat) [48, 49].

2. Táblázat. Ann Arbor Stádium rendszer

Stádium	Érintettség
I. Stádium	Egy nyirokcsomó régióra lokalizálódó betegség
II. Stádium	Két nyirokcsomó régióra, vagy lymphoid szervre lokalizálódó folyamat a rekesz egy oldalán.
III. Stádium	Nyirokcsomó, vagy nyirokszerv érintettség a rekesz mindkét oldalán.
IV. Stádium	Disszeminált betegség.

2.3.4. Follicularis lymphoma terápiája

A follicularis lymphoma egy gyógyíthatatlan indolens non-Hodgkin lymphoma, mely a kezdeti terápiára jól válaszol, azonban gyakran relabál. Relapszus esetén a tumorsejtek már kevésbé érzékenyek a kemoterápiás szerekre [50, 51].

A betegek kevesebb, mint 10%-ánál észlelhető a diagnóziskor alacsony stádiumú (stage I-II) betegség. Ezen betegeknél lokális irradiációt alkalmaznak elsődleges kezelésként [52].

A betegek nagy részénél diagnóziskor általában előrehaladott betegség észlelhető. Az előrehaladott betegséggel rendelkező páciensek kezelésében nagy áttörést jelentett a CD20 antigén ellenes monoklonális antitest (Rituximab) bevezetése a kezelési protokollba [53]. Számos tanulmány bizonyította a Rituximabbal kombinált kemoterápiás protokoll jobb hatékonyságát a csupán kemoterápiás protokollal szemben (pl. CHOP vs. R-CHOP). Ezen tanulmányokban mind a progressziómentes túlélés, mind a teljes túlélés jobbnak bizonyult a Rituximabbal kombinált karon [54, 55].

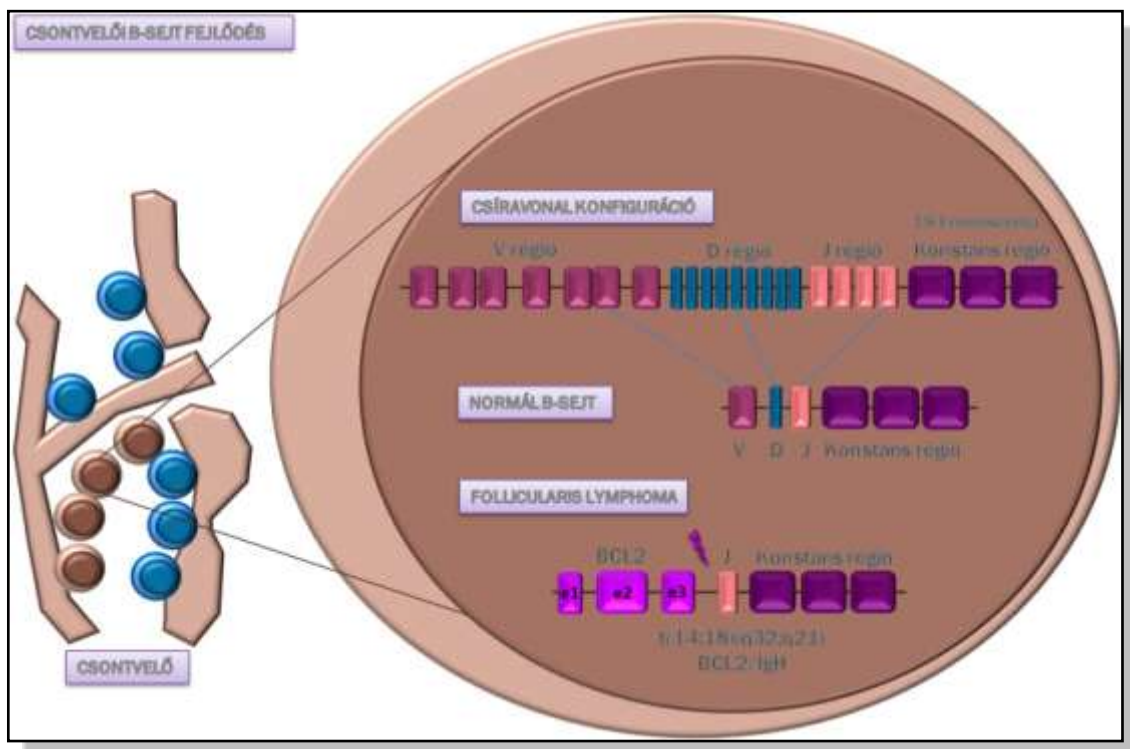
Relapszus esetén számos terápiás eljárás áll rendelkezésre a relapszus mértékének függvényében, úgymint Rituximab monoterápia és kombinációs terápia, radio-immunoterápia és őssejt-transzplantáció [56-58].

Mivel a follicularis lymphoma még mindig a gyógyíthatatlan betegségek körébe tartozik intenzív gyógyszerkutatás folyik új terápiás célpontok feltárása érdekében. Ilyenek a monoklonális antitestek (CD80 és CD22 antigén ellenes antitestek) [59, 60], idiotípus vakcinák (Idiotípus-KLH vakcina)[61], immunmodulátor szerek (IL-2) [62], tirozin kináz inhibitorok (PI3K, BTK és SRC kináz inhibitorok)[63], epigenetikai célpontokat támadó szerek (EZH2 inhibitor) [64].

2.3.5. Molekulárispathogenezis

Az FL esetek megközelítőleg 85-90%-ában kimutatható a t(14;18)(q32;q21) transzlokáció, amely során a 18-as kromoszómán elhelyezkedő *BCL2* gén a 14-es kromoszómán található *Ig* nehézlánc génhez kapcsolódik [65, 66]. A follicularis

lymphoma kialakulásának hátterében álló t(14;18) Bcl-2/IgH transzlokáció a VDJ rekombináció hibájának a következménye (8. Ábra), melynek következtében a Bcl-2 antiapoptotikus protein overexpressziója jön létre[67]. Az immunglobulin könnyűlánc génekhez asszociált ritka variáns transzlokációk, úgymint a t(2;18) és a t(18;22) biológiailag egyenértékűek a gyakoribb t(14;18) transzlokációval[68]. Az aktuális lymphomagenézis hipotézis alapján, mivel a BCL-2 antiapoptotikus hatása mellett ismert antiproliferatív hatással is rendelkezik[69], továbbá a t(14;18) transzlokáció egészséges egyének vérében is kimutatható [70], feltételezhető, hogy a BCL2 overexpressziója önmagában nem elégséges a lymphoma kialakulásához. Follicularis lymphomában a transzlokáció mellett egyéb cytogenetikai eltérések is kimutathatóak, mely alátámasztja, hogy a lymphomagenézishez addicionális eltérések is szükségesek.



8. Ábra. A BCL2/IgH génfüzió kialakulása.

A csíravonalbeli immunglobulin nehézlánc gén VDJ szakaszának rekombinációja a csontvelői naiv B-sejtekben történik a B-lymphocita fejlődés során. A rekombináció hibájából eredendően alakul ki a Bcl-2 génnek az IGH gén promótere mögé történő áthelyeződése, melynek következtében kialakul a t(14;18)(q32;q21) transzlokáció.

A leggyakoribb genetikai eltérések az 1p36 és a 6q régiók deléciója [71]. Az 1p36 régió érintettsége esetén a *TNFRSF14* gén gyakori genetikai eltérései voltak kimutathatóak (18-46%). Ez a gén olyan receptort kódol, mely a T-sejt interakcióban játszik fontos szerepet [72, 73]. A rosszabb prognózist mutató, 6q delécióval rendelkező esetek vizsgálata az NF- κ B útvonal negatív regulátorának, a TNFAIP3/A20 fehérjének és az EPHA7 receptor tirozin kináznak, mint esetleges tumor szuppresszorgéneknek az érintettségét írta le [74]. Az elmúlt években rohamosan fejlődő szekvenálási technikák eredményeképpen rekurrens mutációkat fedeztek fel különböző hiszton modifikációkat végző fehérjéket kódoló génekben. A hiszton metiltranszferázok csoportjába tartozó MLL2 inaktiváló mutációja az FL esetek 89%-ában, az EZH2 aktiváló mutációi 24%-ban voltak jelen [75]. A hiszton acetilázok csoportjába tartozó MEF2B inaktiváló mutációi 15%-ban [75], míg a CREBBP inaktiváló mutációi 39%-ban voltak kimutathatóak [76]. Ezen fehérjék közül a legtöbbet vizsgált és legjobban karakterizált az EZH2 hiszton metil transzferáz, melynek Y641 pontmutációja a részletesebb vizsgálatok alapján az első közleményben szereplőnél gyakoribbnak (12-22%) bizonyult, illetve korai mutációkként jelennek meg follicularis lymphomában [77-79].

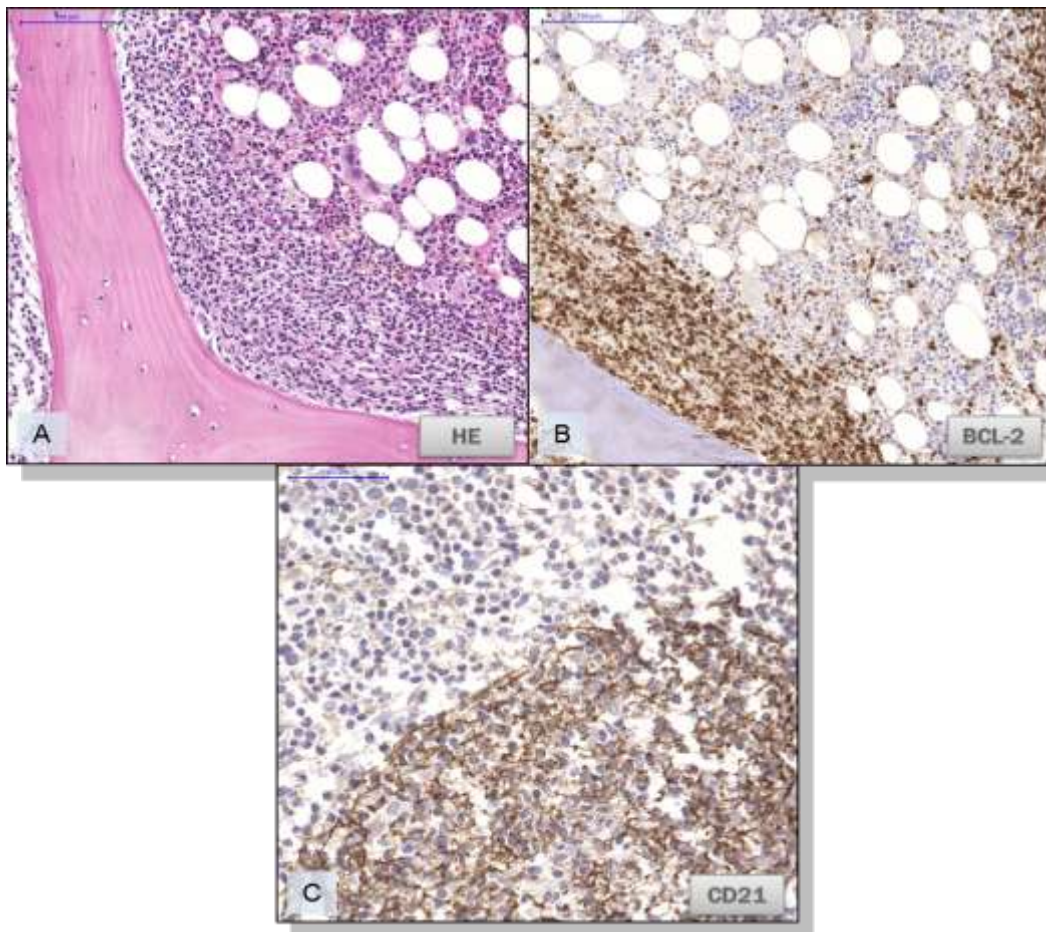
2.3.7. Csontvelői manifesztáció

Follicularis lymphomában az esetek 40-70%-ában diagnóziskor csontvelői érintettség észlelhető, mely rosszabb prognózissal társul [45, 47, 80-82].

Szövettanilag a tumorsejtek a csontvelőben paratrabecularis lokalizációban helyezkednek el, azonban észlelhető interstitialis terjedés is. Ritkán follicularis növekedési mintázat is látható, azonban az esetek nagy részében az infiltrátum diffúz, centrocyta fenotípusú sejtekből áll, melyek CD10 és BCL-6 expressziót mutatnak (9. Ábra) [37].

Annak ellenére, hogy a tumorsejtek mind a nyirokcsomóban, mind a csontvelőben ugyanabból a neoplasticus klónból származnak számos morfológiai, fenotípusos és genetikai különbség fedezhető fel a két különböző lokalizációban észlelhető tumorsejtek között. A cytológiai grade általában alacsonyabb a csontvelőben, mint a nyirokcsomóban. A follicularis lymphoma sejtek gyakran elveszítik a BCL-6 és CD10

expressziót a csontvelőben. Emellett az IgH gén mutációs mintázata is jelentős különbségeket mutat a két lokalizációban[83, 84]. Munkacsoportunk előző vizsgálataiban megállapította, hogy a nyirokcsomóban és csontvelőben különböző lymphoma sejt szubklónok azonosíthatóak, a csontvelőben észlelhető egy nyirokcsomó-független csoport is, amely mellett a nyirokcsomóból származó szubklónok is jelen vannak [83].



9. Ábra. Csontvelői érintettség follicularis lymphomában.

A: A HE metszetben paratrabecularis mintázatot mutató lymphoma infiltrátuma látható a csontvelőben.
 B: A tumorsejtek BCL-2 pozitívak. C: CD21 antigént expresszáló FDC hálózat megjelenése a csontvelői tumoros infiltráció területén.

Normál csontvelőben a haemopoieticus sejtek számára az osteoblastok, stroma sejtek, endothelsejtek és a mesenchymalis őssejtek biztosítják a mikrokoznyezetet. A

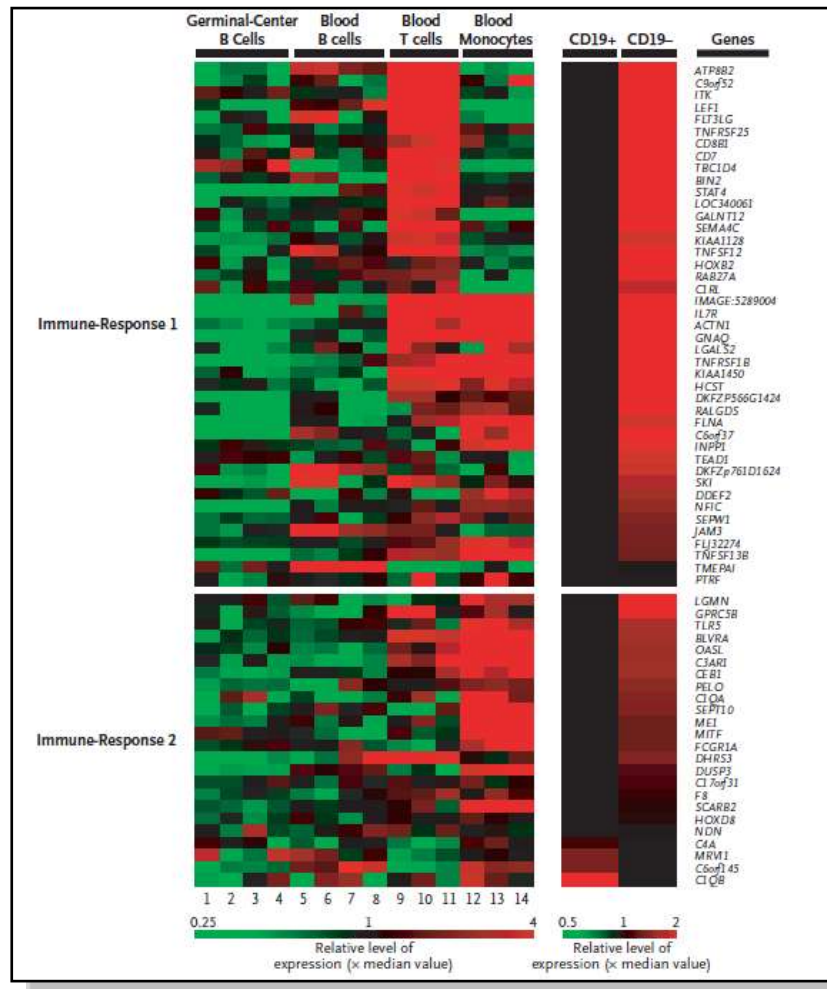
csontvelői stromát alkotó reticularis sejtek fontos szerepet játszanak a haemopoiesis szabályozásában különböző sejt-sejt kapcsolatok és citokin szekréció segítségével [85]. Ezen reticularis sejtekre jellemző a sejtfelszíni alacsony affinitású idegi növekedési faktor receptor (LNGFR, low-affinity nerve growth factor receptor), a VCAM-1 és a CD105/endoglein expressziója [86,87]. Az LNGFR a tumor nekrózis faktor receptor család egyik tagja. Széles körben expresszált molekula, kifejeződik a neuronokon, számos mesenchymalis sejt típusban, úgymint a nyirokcsomók follicularis dendritikus sejtjein, illetve a csontvelő stromalis sejtjein [88, 89]. Follicularis lymphoma csontvelői infiltrációja esetén azonban megjelenhetnek a nyirokcsomóra karakterisztikus follicularis dendritikus sejtek [90]. Azonban az nem ismert, hogy ezen sejtek a csontvelőben lévő mesenchymalis stromalis sejtekből in situ differenciációval jönnek létre vagy a nyirokcsomói follicularis dendritikus sejtek importálásával alakulnak ki.

2.3.6. Reaktív mikrokörnyezeti sejtek follicularis lymphomában

Follicularis lymphomában a neoplasticus folliculusok számos reaktív sejtet tartalmaznak, úgymint különböző T-lymphocyták, macrophágok és FDC. In vitro vizsgálatok alapján az apoptosis jelátviteli útvonalának károsodása ellenére a lymphoma sejtek nem tenyészthetők [91, 92]. A lymphoma sejtek proliferációjához szükséges sejt-sejt kapcsolat a T-sejtekkel és az FDC-vel. IL-2 illetve IL-4 szekretáló CD4+ helper T-sejtekkel együtt tenyésztve a lymphoma sejtek fokozott proliferációt mutatnak [93]. Továbbá a sejtek növeszthetők CD40 antigént prezentáló stromalis sejtekkel együtt IL-4 szekretáló közegben. A CD40 receptor jelentős jelátviteli út része, mely a B-sejtek és T-sejtek interakciójában játszik fontos szerepet [94, 95].

Dave és munkatársai prognosztikai markereket keresve array alapú génexpressziós vizsgálatot végeztek follicularis lymphomában szenvedő betegek nyirokcsomó mintáin, amely megerősítette a mikrokörnyezet prognosztikai szerepét a betegségben (10. Ábra). Vizsgálatuk során a génexpresszió alapján két eltérő prognosztikai csoportot különböztettek meg. A kedvező prognózisú „Immun válasz-1” génexpressziós mintázatot mutató csoportba T-lymphocytákra jellemző (CD7, CD8B1,

ITK, LEF1 és STAT4) és macrophágokra jellemző gének (ACTN1 és TNFSF13B) overexpressziója volt jellemző. Míg a kedvezőtlen prognózisú „Immun válasz-2” génexpressziós mintázatú csoportban macrophágokra és dendritikus sejtekre jellemző gének (TLR5, FCGR1A, SEPT10, LGMN és C3AR1) overexpressziója volt megfigyelhető [96].

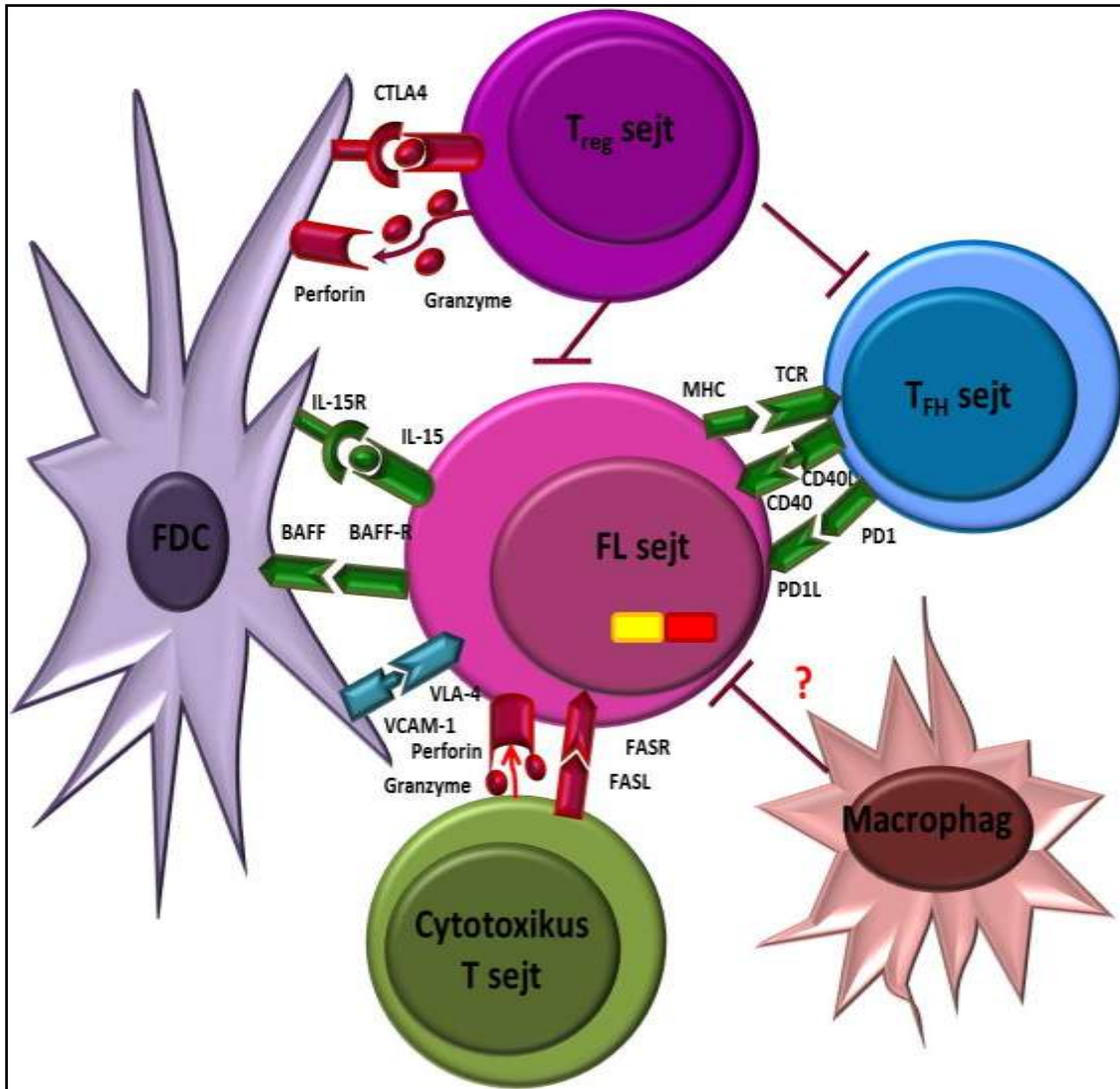


10. Ábra. Az „Immun válasz 1” és „Immun válasz 2” prognosztikai csoportokra jellemző génexpressziós profil (Dave és munkatársai)[96].

Ezen a megfigyelésen alapulva számos immunhisztokémiai vizsgálaton alapuló tanulmány indult, melyek a mikrokörnyezet sejtösszetételét összefüggésbe hozták a betegség prognózisával és a túléléssel. Follicularis lokalizációban a CD4+ T-lymphocytákat a FLIPI indextől független prognosztikai tényezőként határozták meg, emelkedett számuk rosszabb prognózisú betegség esetén volt megfigyelhető. Összefüggést találtak továbbá a betegség transzformációja és a CD4+ T-lymphocyták szám között [97]. A magas CD8+ cytotoxikus T-lymphocyták szám pozitív prognosztikus faktorként jelent meg a nyirokcsomói lokalizációtól függetlenül [98, 99]. Magas arányú PD1+ T_{FH} lymphocyták és FOXP3+ T_{reg} lymphocyták infiltrációja a teljes túlélés független meghatározójának bizonyult [100-103]. A CD57+ lymphocyták nem mutattak összefüggést a túléléssel a különböző vizsgálatok során [97, 98]. A macrophágok tumorsejtekre kifejtett hatásáról az irodalomban ellentmondó eredmények szerepelnek [98, 104, 105]. Az FDC hálózat szerepét vizsgálva azt a megfigyelést tették, hogy a CD21 antigén expressziójának csökkenése előjelezheti a betegség transzformációját [106].

Ismert továbbá, hogy a tumorsejtek közvetlen befolyással lehetnek a nem tumoros mikrokörnyezet sejtjeire is. A tumoros B-sejtek IL-12 szekréciója a T-lymphocyták kimerülését válthatja ki [107]. Továbbá a lymphomasejtek kiválthatják a T-lymphocyták konverzióját FOXP3+ T_{reg}-lymphocytákká, melyek bizonyos vizsgálatok eredményei alapján gátolhatják a CD4+ illetve a CD8+ T-lymphocyták proliferációját és aktivitását [108, 109].

A mikrokörnyezetet célzó vizsgálatok a follicularis lymphoma reaktív mikrokörnyezetének két meghatározó tulajdonságát tárták fel: (1) közvetlen antitumoralis hatással bír, illetve fokozza bizonyos terápiás szerek hatását, (2) azonban ezzel együtt segítheti is a tumoros B-lymphocyták túlélését és proliferációját (11. Ábra) [110].



11. Ábra. A mikrokörnyezet sejtjeinek feltételezett hatása a follicularis lymphoma tumorsejtjeire.

A tumorsejtek túlélését follicularis lymphomában a tumor mikrokörnyezetében észlelhető reaktív immunsejtek (specifikus s T-lymphocyták, macrophágok és dendritikus sejtek) befolyásolják.

3. Célkitűzések

Számos génextpressziós és immunhisztokémiai vizsgálatokon alapuló tanulmány számolt be a reaktív nyirokcsomói mikrokörnyezet prognosztikai szerepéről follicularis lymphomában. Ugyanakkor a mikrokörnyezet lymphoma terjedésre gyakorolt hatásáról nincsen adat az irodalomban. Továbbá nem tisztázott a reaktív sejtes mikrokörnyezet hatása a csontvelői tumorpopulációra.

Munkánk során a következő kérdéseket vizsgáltuk:

- I. A nyirokcsomói és csontvelői tumorsejtek karakterizálása és összehasonlító vizsgálata
- II. Nodalis follicularis lymphoma reaktív mikrokörnyezeti különbségeinek és hasonlóságainak összehasonlító vizsgálata ugyanazon betegből származó csontvelői infiltrátum reaktív mikrokörnyezetével, a két lokalizációban észlelhető tumorsejtek fenotípusbeli különbségeinek szempontjából
 - Reaktív T-lymphocytá szubpopulációk és macrophágok összehasonlító vizsgálata
 - Stromalis reticularis sejtes hálózat összetételének vizsgálata
 - Connexin 43 expressziójának vizsgálata a reticularis sejteken
- III. A csontvelői infiltrációval rendelkező illetve nem rendelkező esetek nyirokcsomói mikrokörnyezetének összehasonlító vizsgálata, a reaktív mikrokörnyezet tumor progressziót befolyásoló hatásának vizsgálata szempontjából
 - Reaktív T-lymphocytá szubpopulációk és macrophágok összehasonlító vizsgálata
 - Follicularis dendriticus sejthálózat vizsgálata

- IV. A nyirokcsomó reaktív mikro környezet sejtösszetételének vizsgálata a különböző grade-del rendelkező betegcsoportokban
- Reaktív T-lymphocytá szubpopulációk és macrophágok összehasonlító vizsgálata
 - Follicularis dendriticus sejtálózat vizsgálata
- V. Connexin 43 expresszió vizsgálata follicularis lymphomában
- Az expresszió összehasonlítása reaktív nyirokcsomók Cx43 expressziójával
 - Cx43 expresszió vizsgálata a csontvelői infiltrációval rendelkező és nem rendelkező betegek nyirokcsomóiból mintákon
 - Cx43 expresszió vizsgálata a különböző grade-ű csoportokban

4. Módszerek

4.1. Beteganyag

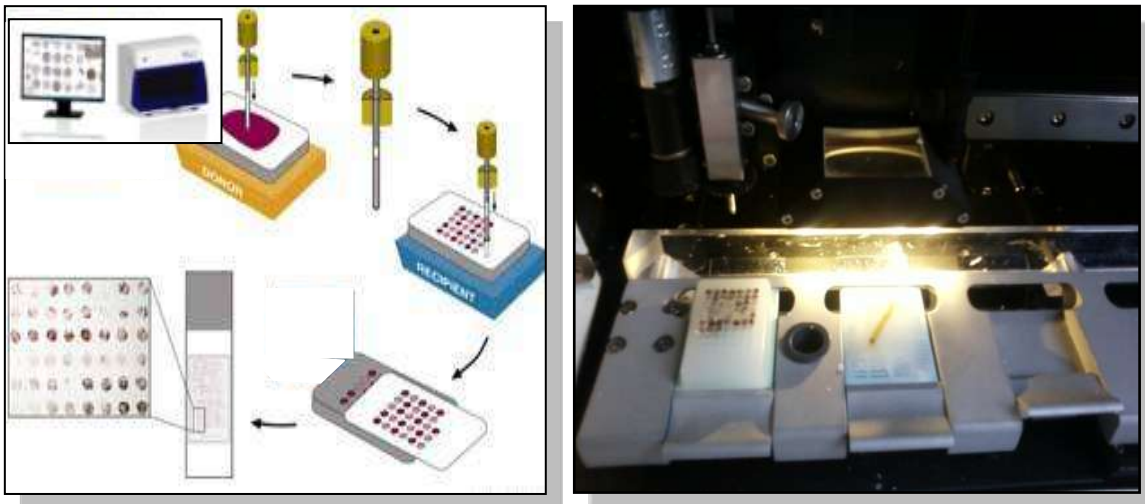
Vizsgálataink kivitelezéséhez harmincöt kezeletlen beteg formalinban rögzített, paraffinba ágyazott nyirokcsomó és csontvelő biopsziás mintáit használtuk (3. Táblázat). A diagnózisokat a Semmelweis Egyetem I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében, illetve az Országos Onkológia Intézetben állították fel. A diagnózis a World Health Organisation (WHO) lymphoid tumorokra használt klasszifikációja alapján került megállapításra [37]. A nyirokcsomói és csontvelőmintavétel minden esetben a diagnosztikus és staging eljárások részét képezte. Kontrollként 6 reaktív nyirokcsomót és 15 csontvelői mintát használtunk.

3. Táblázat. Klinikai betegadatok.

Betegadatok	Csontvelői infiltráció		Összes
	Pozitív	Negatív	
Betegek (Nő/Férfi)	20 (12/8)	15 (9/6)	35 (21/14)
Életkor (Median/Tartomány)	48.7 (26-82)	49.7 (33-74)	49.2 (26-82)
Nyirokcsomói grade			
Grade 1	1 (5%)	3 (20%)	4 (11,4%)
Grade 2	16 (80%)	6 (40%)	22 (62,9%)
Grade 3	3 (15%)	6 (40%)	9 (25,7%)
Terápiás válasz			
Komplett remisszió	5	13	18
Parciális remisszió	13	2	15
Nincs	2	0	2
FLIPI			
Alacsony rizikó	2	9	11
Közepes rizikó	12	5	17
Magas rizikó	6	1	7

4.2. Szöveti microarray

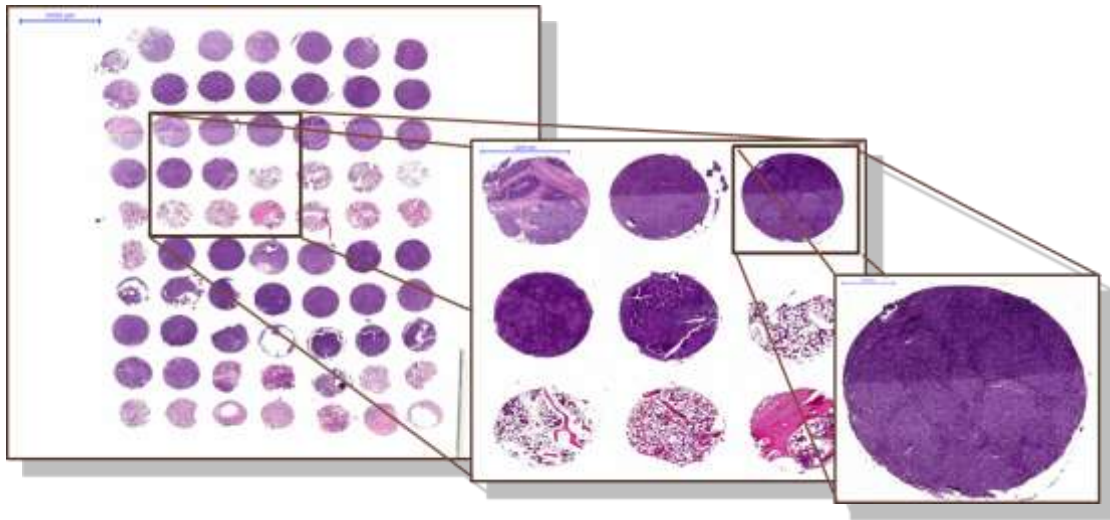
A szöveti microarray blokkokat (TMA) egy számítógép vezérelt automatizált TMA készítő berendezéssel készítettük (TMA Master, 3D HISTECH Ltd, Budapest, Hungary) (12. Ábra). A reprezentatív területeket Hematoxillin-eosin festett metszeteken jelöltük be, melynek segítségével relokalizálhatóvá váltak ezen területek a formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintákon.



12. Ábra. A TMA készítés sematikus bemutatása.

A donor blokkok kijelölt területéről 2 mm-es szövet core-okat számítógép vezérelt TMA készítő berendezéssel helyeztük a recipiens blokkba, az x-y koordináták mentén jól azonosítható pozíciókba, ami a számítógép által automatikusan készített xls formátumú adatbázisból könnyen visszakereshető volt.

A nyirokcsomói mintákból legalább két darab 2 mm átmérőjű szövethengert (core) helyeztünk át a befogadó blokkba. Csontvelő biopsziák esetén egy vagy kettő hengert transzferáltunk a befogadó blokkba. A mintákból kettő darab 70 core-os TMA készült. A TMA blokkokból 3 µm vastagságú metszeteket metszettünk adhézions szilánnal bevont felszínű SuperFros Ultra Plus tárgylemezekre (13. Ábra).



13. Ábra. TMA metszet hematoxin-eosin festéssel.

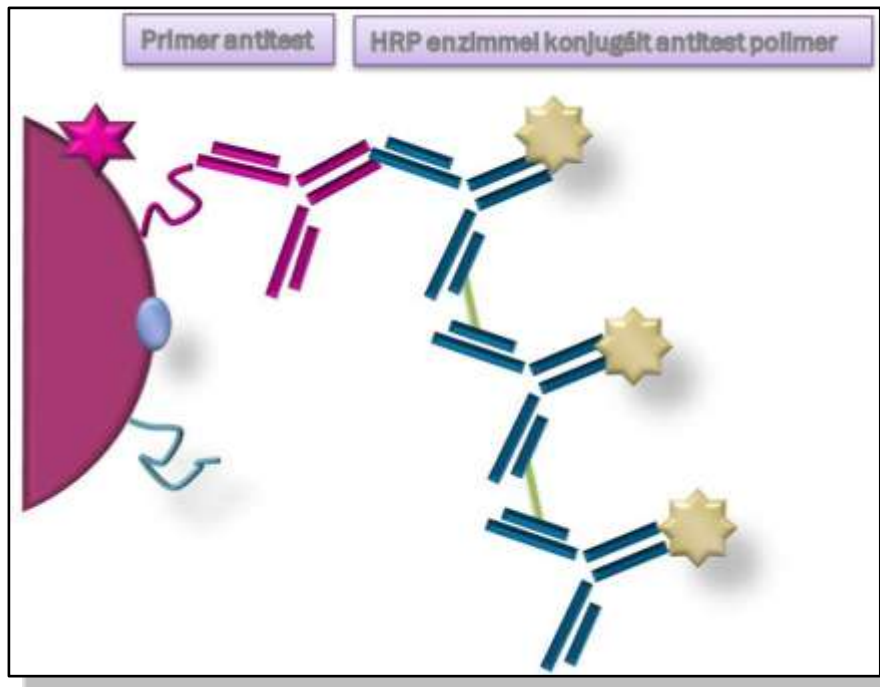
A tumoros és reaktív nyirokcsomó és csontvelői mintákból vett core-okból készült TMA blokkokból 3 µm vastagságú metszetek készültek, amelyek HE festett átnézeti mikroszkópos képét mutatja az ábra.

4. Táblázat. Az immunhisztokémiai vizsgálatokban alkalmazott antitest klónok és hígításaik.

Antitest	Sejt	Klón	Feltáró oldat	Hígítás
Bcl-2	FL B-sejt; T sejt	bcl2/100/D5	Tris-EDTA (pH9.0)	1:10
Bcl-6	B-lymphocya	PG-B6p	Tris-EDTA (pH9.0)	1:5
CD10	B-lymphocya	56C6	Tris-EDTA (pH9.0)	1:20
CD21	FDC	1F8	Citrát puffer (pH6.1)	1:20
CD23	FDC	1B12	Citrát puffer (pH6.1)	1:10
LNGFR	Stromalis sejtek	7F10	Tris-EDTA (pH9.0)	1:300
CXCL13	FDC	-	Target Retrieval Solution	1:1500
Ki67	Proliferációs marker	MIB-1	Tris-EDTA (pH9.0)	1:50
CD4	T _h -lymphocya	4B12	Tris-EDTA (pH9.0)	1:10
CD8	T _c -lymphocya	4B11	Tris-EDTA (pH9.0)	1:20
CD57	T _{FH} -lymphocya	NK1	Tris-EDTA (pH9.0)	1:10
CD68	Macrophág	KP1	Citrát puffer (pH6.1)	1:100
PD1	T _{FH} -lymphocya	NAT	Tris-EDTA (pH9.0)	1:100
FOXP3	T _{reg} -lymphocya	Poliklonális	Target Retrieval Solution	1:3000

4.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok

A metszeteket deparaffináltuk xilol oldattal, majd leszálló etanol sor felhasználásával víztelenítettük. Desztillált vízzel való öblítést követően az endogén peroxidáz aktivitás blokkolásának céljából a lemezeket 20 percig 1,5%-os hidrogén peroxidmetanolos



oldatába helyeztük.

14. Ábra. Az immunhisztokémiai reakció sematikus rajza.

A vizsgálni kívánt antigén kimutatására használt primer antitesthez secunder, IgG ellenes, torna-peroxidáz enzimmel konjugált antitest polimer kötődik.

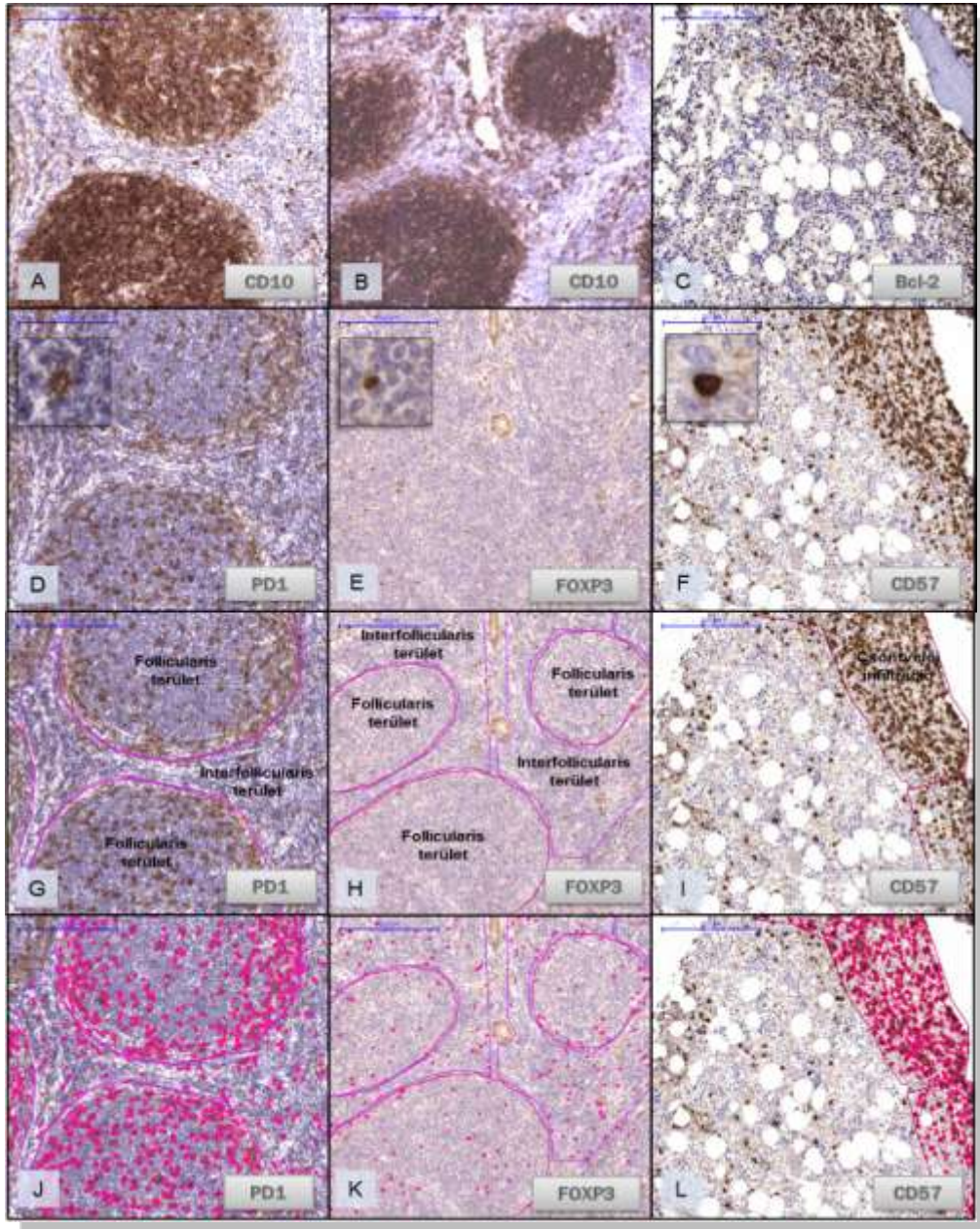
Az antigénfeltárást elektromos kuktában túlnyomáson ~ 105 °C-on 45 percig végeztük 0.1 M-os citrát pufferben (pH6.1), 0.1 M Tris és 0.01 M EDTA (pH9.0) pufferek keverékében, vagy pH6.1-es TRS oldatban (Target Retrieval Solution, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). Az immunreakciókhoz biotinmentes anti-nyúl/egér IgG konjugált polimer, Novolink™ (Novocastra, Newcastle, Egyesült Királyság) detektáló rendszert használtunk (14. Ábra). A metszeteket először az ún. „Protein block” komponenssel inkubáltuk 10 percig az aspecifikus antitest-kötődés elkerülése érdekében, majd a 4. Táblázatban részletezett hígítású primer antitestekkel

kereskedelmi antitesthígító oldatot alkalmazva (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) egy órán át szobahőmérsékleten. Ezután a mintákat detergenst tartalmazó „Post primer” komponenssel inkubáltuk 30 percig a polimer hatékonyabb penetrációjának céljából, majd torna-peroxidáz (HRP) enzimmel konjugált anti-nyúl/egér IgG polimerrel 30 percig szobahőmérsékleten. Az inkubációs lépések között a metszeteket 2x5 percig neutrális 0.1 M-os TBS pufferben mostuk. Az immunreakciót a DAB szubsztrát/chromogén kit segítségével hívtuk elő, majd a sejtmagokat hematoxilinnel festettük. A reakciók pozitív kontrolljaként a reaktív nyirokcsomóban, illetve normál morfológiájú csontvelő minták ismert lokalizációiban észlelt reakciók szolgálták. Negatív kontrollként a primer antitestek egér, illetve nyúl normál szérummal történő helyettesítése szolgált, ahol az elhanyagolható háttérfestésen kívül egyik esetben sem kaptunk reakciót.

4.3.1. Immunhisztokémiai metszetek értékelése a különböző T-sejt csoportok és macrophágok esetén

Az immunhisztokémiai reakció elvégzését követően a lemezeket 20X nagyítású nagy látószögű (NA=0.83) Zeiss objektívet alkalmazva (Carl Zeiss MicroImaging Inc, Jena, Germany) teljes metszet digitalizálással szkenneltük Panoramic scan berendezéssel (3DHISTECH). A pozitívan festődő sejteket a Panoramic Viewer HistoQuant modulja segítségével határoztuk meg vizuális felügyelet mellett. Elsőként a vizsgálandó területeket jelöltük ki a szkennelt metszeteken, nyirokcsomói minta esetén a CD10 festés, csontvelői minta esetén a bcl2 festés alapján (15. ábra A, B, C). Az immunfestett (15. ábra D, E, F) nyirokcsomói mintákon a follicularis és interfollicularis területeket, a csontvelői mintákon a csontvelői tumoros infiltráció területét jelöltük permanens annotációkat alkalmazva a digitális metszeteken (15. ábra G, H, I). Az értékelés során legalább 6 follicularis és interfollicularis területet, vagy minimum 1mm² nagyságú területet vizsgáltunk. A sejtméret és a pozitív sejtek intenzitás határértékének beállítását követően a szoftver automatikusan megszámlolta a kijelölt objektumokat (sejteket) és az adatokat xls file-ban gyűjtötte (15. ábra J, K, L,). A legnagyobb sejtméretet a lymphocyta mérettartományba eső sejtek esetén citoplazmatikus festődést

mutató antitestek esetén 15 µm felső határban, sejtmagfestődés esetén 10 µm felső határban, míg macrophágokat festő antitestek esetén 25 µm alsó határban állapítottuk meg.



15. Ábra. Az immunhisztokémiai vizsgálatok értékelésének menete.

A, B, C: A manuális annotációkat a nyirokesomói mintákon a CD10, a csontvelői mintákon a Bcl-2 festés alapján jelöltük ki.

D, E, F: Reprezentatív minták PD1, FOXP3 és CD57 immunhisztokémiai festésekre.

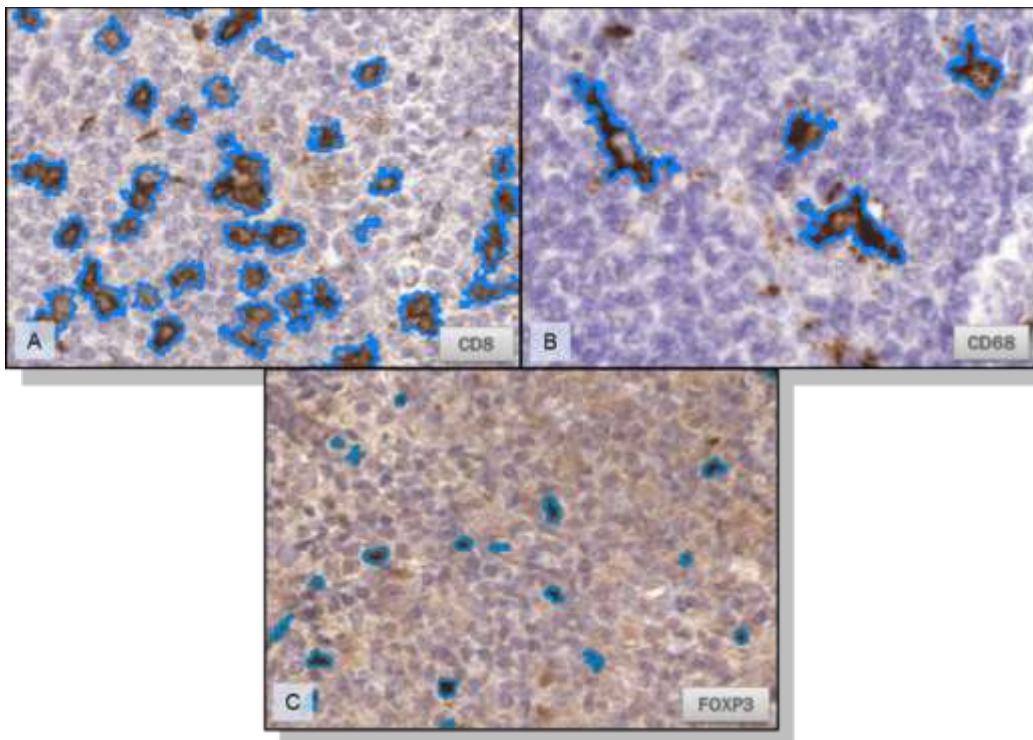
G, H, I: A follicularis és interfollicularis területek, valamint a csontvelői infiltráció jelölése manuálisan, permanens annotációkkal.

J, K, L: A manuális sejt méret és színintenzitás beállítást követő automatikus analízis.

Citoplazmatikus festés esetén, ha a pozitív sejtek klaszterekben helyezkedtek el, a szoftver nem volt képes az egyes sejtek biztos elkülönítésére, emiatt a citoplazmatikus festések esetén a pozitívan festődő sejtek által elfoglalt terület százalékos arányát számszerűsítettük az összes sejtre vonatkoztatva a következő képletet alkalmazva:

$$\frac{\text{Pozitív sejtek területe}}{\text{Pozitív sejtek + Negatív sejtek területe}}$$

Ezt a számítást kizárólag a lymphocyta mérettartományban elhelyezkedő citoplazmatikus festődést mutató sejtek esetén alkalmaztuk. Macrophág specifikus festés (CD68), illetve sejtmag pozitivitást mutató festés (FOXP3) esetén sejtszám/0,1 mm² meghatározást végeztünk (16. Ábra).



16. Ábra. Automatizált objektum analízis különböző immunhisztokémiai festések esetén.

A: Lymphocyta mérettartományba eső sejtek esetén a pozitív sejtek területszázaléka került megállapításra.

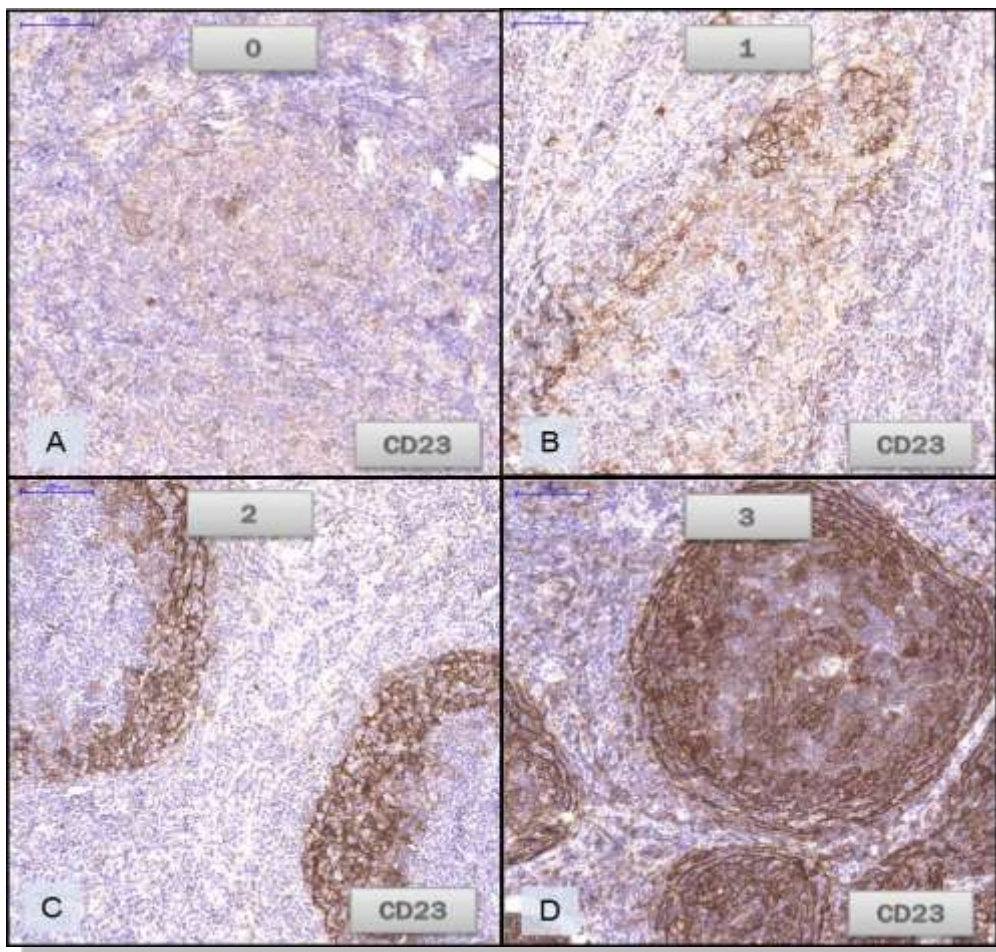
B: Macrophágok immunhisztokémiai vizsgálata esetén az alsó mérethatár beállítását követően sejtszámot határoztunk meg.

C: Sejtmagfestés esetén a felső mérethatár beállítását követően a sejtszámot határoztuk meg.

4.3.2. Immunhisztokémiai metszetek értékelése az FDC markerek esetén

A nyirokcsomó follicularis területeinek vizsgálata során értékeltük a follicularis dendritikus sejt hálózat megtartottságát és teljességét. A csontvelőben észlelhető FDC hálózat vizsgálata során a különböző FDC markerek megjelenési intenzitását és kiterjedtségét értékeltük (17. Ábra, 5. Táblázat).

Az értékelésnél 4 lépcsős pontrendszert („score”) használtunk, melynek alapján külön értékeltük az FDC hálózat CD21, CD23, CXCL13 és LNGFR expresszióját, nyirokcsomóban a follicularis területeken, illetve a csontvelői infiltráció területén.



17. Ábra. Az FDC hálózat értékelésére használt rendszer reprezentatív bemutatása CD23 immunhisztokémiai festés esetén.

5. Táblázat. A nyirokcsomói FDC hálózat értékelésének rendszere.

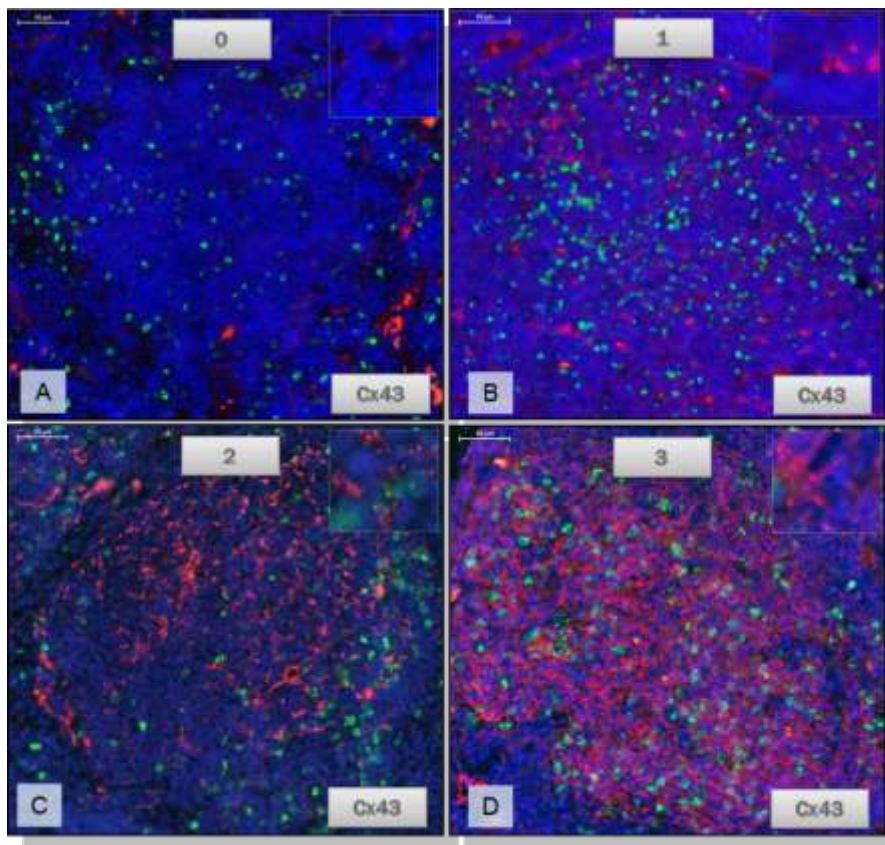
Antitest	Alacsony		Magas	
	0	1	2	3
CD21	Negatív vagy <10%	11-25%	26-50%	>50%
CD23	Negatív vagy <10%	11-25%	26-50%	>50%
CXCL13	Negatív vagy <5%	6-10%	11-25%	>25%
NGFR	Negatív vagy <10%	11-50%	51-75%	>75%

4.3.3. Fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálatok

A metszeteket xilolos deparaffinálást követően rehidráltuk leszálló etanol sorban. Az antigénfeltárást elektromos kuktában (Avair, Biofa, Veszprem, Hungary) végeztük 0.1 M Tris 0.01 M EDTA puffer (pH=9.0) alkalmazva 20 percig ~105 °C-on. Következő lépésben a metszeteket 20 másodpercig 0,25%-os Gibco trypsinnel (1:50; Life Technologies, Carlsbad, CA) emésztettük, majd 20 perces protein blokkolást végeztünk 1%-os BSA-t tartalmazó TBS pufferrel. Ezután a metszeteket poliklonális nyúl Cx43 antitest (1:100, #3512, Cell Signaling, Beverly, MA) és egér monoklonális CD20 (B-Ly1, Dako, Glostrup, Denmark), vagy Ki67 (MIB-1, Dako, Glostrup, Denmark) antitest keverékével éjszakán át (16h), majd 90 percig Alexa Fluor 546 (piros) fluorokrómmal konjugált kecske anti-nyúl IgG (1:200, A11035) és Alexa Fluor 488 (zöld, A11001) fluorokrómmal konjugált kecske anti-egér IgG (1:200) keverékével. A sejtmagokat kék színű Hoechst (1:1000, B2883, mindhárom Invitrogen-Life Technologies, Eugene, OR, USA) fluorokrómmal 60 másodpercig festettük. A festett lemezeket 20X objektívvel (NA=0.83; Carl Zeiss) felszerelt Panoramic Scan berendezéssel (3D HISTECH) 3 csatornán (RGB) digitalizáltuk. A több fókuszú, több rétegben végzett fluoreszcens digitalizáció lehetővé tette az <1µm-nél is kisebb connexin jelek vizsgálatát és pontos értékelését a jelek gyengülésének és álnegativitásnak kizárása mellett. A metszeteket az inkubációk között 2x5 percig mostuk 0.1 M-os TBS-ben (pH 7,4), majd fluoreszcens fedőanyaggal lefedtük.

4.3.4. A fluoreszcens immunhisztokémiai metszetek értékelése

A Connexin 43 expressziót vizsgáltuk nyirokcsomói lokalizációban, valamint a csontvelői tumoros infiltrátum területén is. A Cx43 expresszióval együttesen vizsgáltuk a specifikus FDC elemek jelenlétét. Az értékelést szintén 4 fokozatú score-rendszer segítségével végeztük a nyirokcsomó follicularis területein (18. Ábra, 6. táblázat).



18. Ábra. A Connexin 43 értékelésére használt rendszer reprezentatív bemutatása.

Kombinált Cx43 (piros), Ki67 (zöld) sejtmagfestés (piros) jelölés.

6. Táblázat. A nyirokcsomói Cx43 expresszió értékelésének score-rendszere.

Score	Cx43 expresszió
0	Negatív vagy <10%
1	<25%
2	<50%
3	>50%

4.4. Statisztikai analízis

A klinikopatológiai és az immunhisztokémiai jellemzők közötti összefüggések vizsgálata esetén a normál eloszlás fennállásának vizsgálatát követően a normál eloszlást mutató független és függő változókat Student-féle kétmintás t-próbával vizsgáltuk. A normál eloszlástól eltérő eloszlást mutató változók vizsgálata során Mann-Whitney U-próbát és Wilcoxon próbát alkalmaztunk. Ordinális változók esetén Fisher egzakt próbát alkalmaztunk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0.05$ értéket tekintettük. A statisztikai analízis során Statistica 9.1 szoftvert használtuk (StatSoft. Inc., Tulsa, OK, USA).

4.5. Etikai vonatkozások

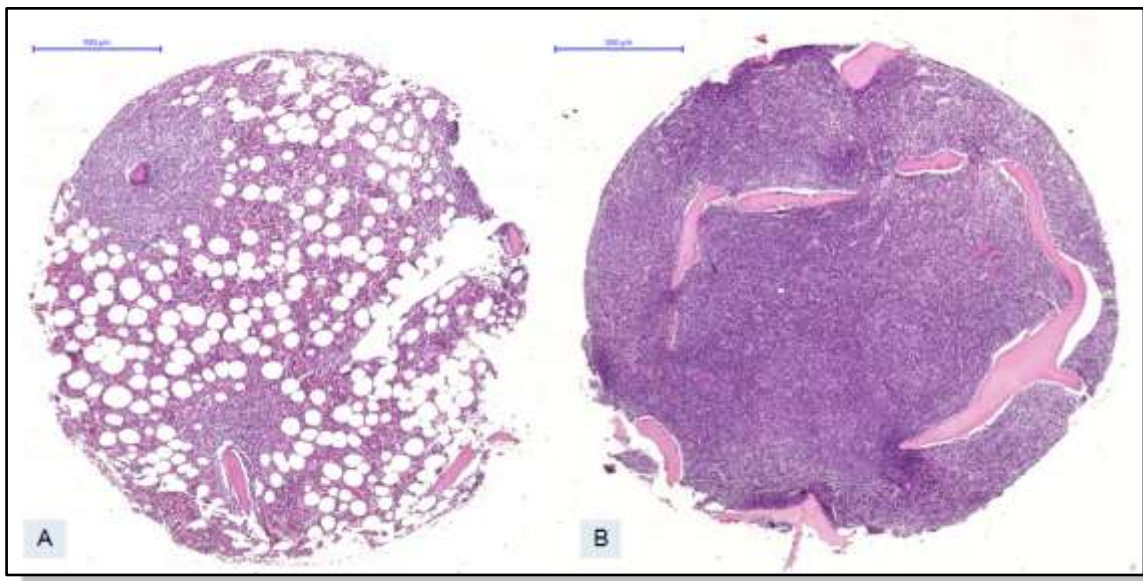
Kutatásaink mindenben a hatályos jogszabályok szerint jártunk el a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának (TUKEB) engedélyének birtokában.

5. Eredmények

5.1. A malignus sejtek fenotípusa a nyirokcsomó és csontvelő mintákban

A 20 kezeletlen beteg nyirokcsomó és csontvelő mintapárjainak vizsgálata során összehasonlítottuk a tumorsejtek citológiai grade-jét, proliferációs rátáját, illetve immunfenotípusát a WHO kritériumoknak megfelelően.

A vizsgált 20 csontvelői infiltrációval rendelkező esetből 15-ben paratrabecularis és diffúz, míg 5 esetben csupán paratrabecularis mintázatot mutató infiltrátum volt megfigyelhető (19. Ábra). Diffúz infiltrátum esetén 4 mintában secunder folliculus képződés is igazolható volt.

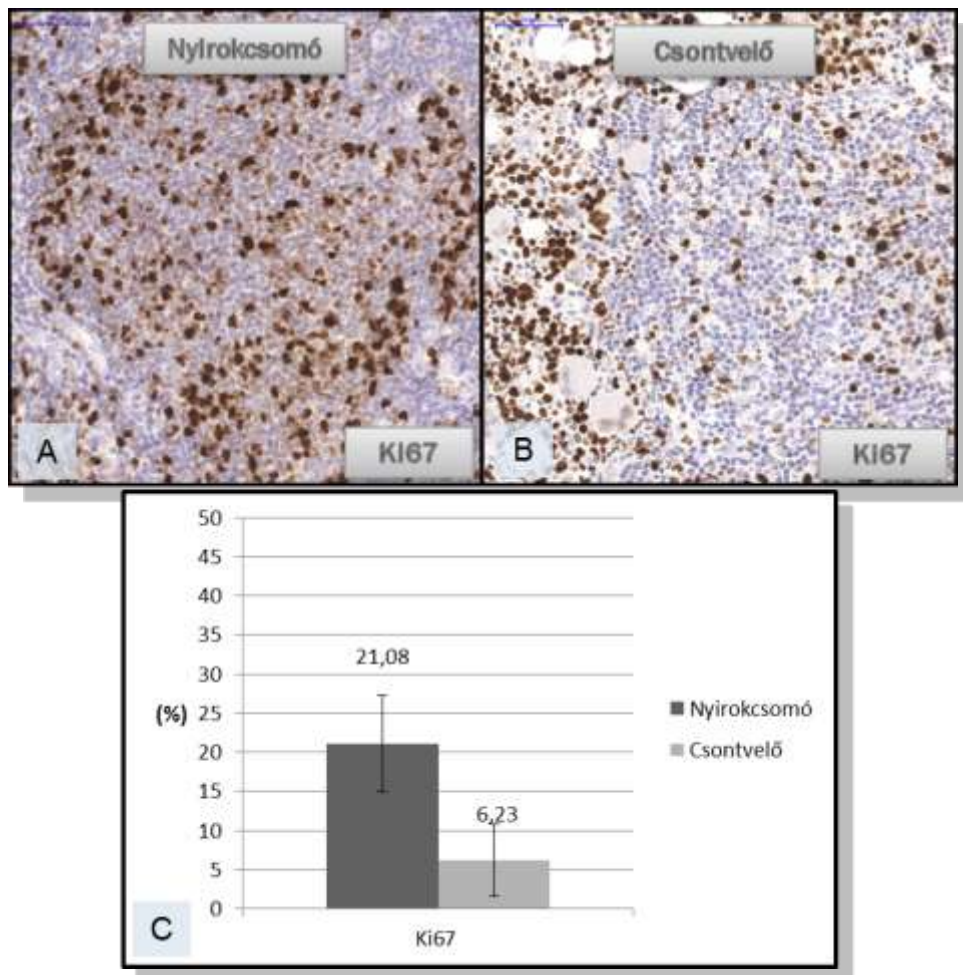


19. Ábra. A csontvelői infiltráció mintázata.

A: Paratrabecularis mintázat, B: Diffúz mintázat.

Tizenkét esetben volt megfigyelhető ún. „downgrade”-ing a csontvelőben a nyirokcsomóhoz képest. Egy esetben mindkét minta grade 1 volt. 16 esetben a

nyirokcsomó grade 2 volt, míg a megfelelő csontvelőpárok 9 esetben grade 1, 7 esetben grade 2. Három esetben, a nyirokcsomóban grade 3 tumor volt azonosítható, míg a hozzájuk tartozó csontvelők mindhárom esetben alacsonyabb grade-t mutattak (1 esetben grade 2, két esetben grade 1). Nem találtunk olyan esetet ahol a csontvelői grade magasabbnak bizonyult volna a nyirokcsomói grade-nél. A tumorsejtek mind a csontvelőben, mind a nyirokcsomóban BCL2, BCL6 és CD10 pozitívnak bizonyultak. Ki67 immunhisztokémiai vizsgálattal szignifikáns különbség mutatkozott a nyirokcsomók és a hozzájuk tartozó csontvelői minta tumorsejtjeinek proliferációs rátája között ($21.08 \pm 6.19\%$ versus $6.23 \pm 4.61\%$; Wilcoxon próba; $p < 0.0001$) (20. Ábra).



20.Ábra. A csontvelői és nyirokcsomói tumorsejtek proliferációs rátája.

A, B: A reprezentatív csontvelői és nyirokcsomói Ki67 immunhisztokémiai preparátumokon megfigyelhető, hogy a csontvelőben jelentősen alacsonyabb a tumorsejtek proliferációs rátája.

C: Az immunhisztokémiai vizsgálat kvantitatív értékelésével szignifikáns különbség mutatkozott a csontvelői és nyirokcsomói lymphoma sejtek proliferációs rátája között ($p < 0.0001$).

5.2. A nyirokcsomóban és a hozzá tartozó csontvelő mintában észlelt tumoros infiltráció reaktív mikrokörnyezeti sejtjeinek vizsgálata

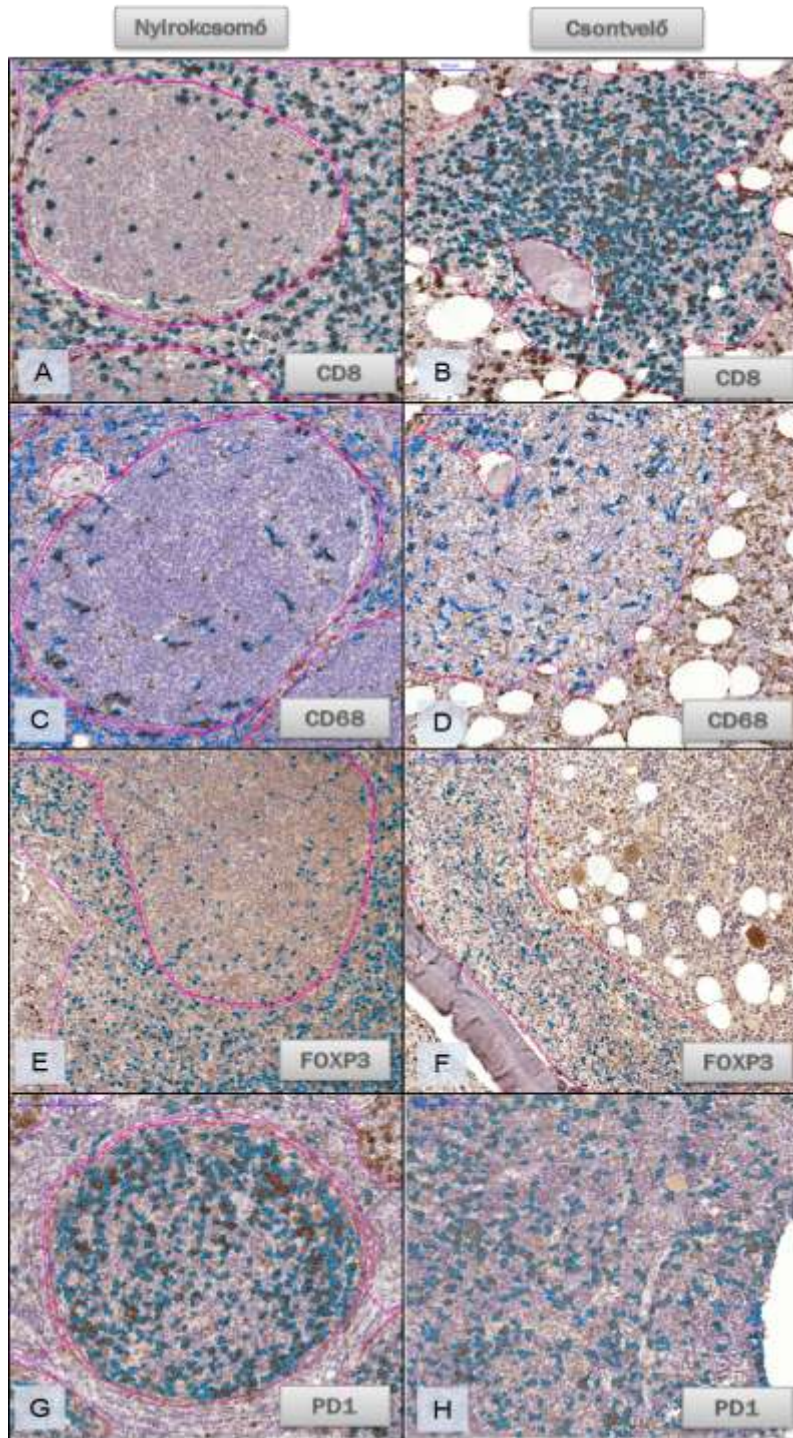
A HistoQuant programmal végzett képanalízissel vizsgáltuk a csontvelői és nyirokcsomói tumoros komponens reaktív mikrokörnyezetének összetételét a különböző T-lymphocytá szubcsoportokra és macrophágokra koncentrálva. Eredményeink alapján a nyirokcsomóban észlelt malignus follicularis területek mikrokörnyezetének sejtösszetétele és mértéke jelentős különbségeket mutatott a csontvelői infiltráció mikrokörnyezetéhez képest. Szignifikánsan alacsonyabb PD1+ T-lymphocytá számot ($5.89 \pm 3.15\%$ vs $18.59 \pm 8.64\%$; *Wilcoxon próba*; $p = 0.002$) észleltünk a csontvelői infiltrációban a nyirokcsomó follicularis területeihez viszonyítva. Továbbá szignifikánsan magasabb CD8+ T-lymphocytá ($11.02 \pm 7.61\%$ vs $5.51 \pm 2.41\%$; *Wilcoxon próba*; $p = 0.004$), FOXP3+ regulátoros T-lymphocytá (151.00 ± 86.39 cells/0.1 mm² vs 76.85 ± 39.64 cells/0.1 mm²; *Student félet-próba*; $p = 0.005$) és CD68+ macrophag (131.41 ± 52.59 cells/0.1mm² vs 38.77 ± 15.28 cells/0.1mm²; *Wilcoxon próba*; $p < 0.0001$) számot észleltünk a csontvelőben a nyirokcsomóhoz képest (21, 22. Ábra).

A CD4+ T-lymphocytá és CD57+ T-lymphocytá szám nem különbözött a két tumoros komponensben (7. Táblázat).

Az összehasonlító elemzést az interfollicularis területeket vizsgálva is elvégeztük, azonban különbség a sejtes komponensek között nem volt megfigyelhető.

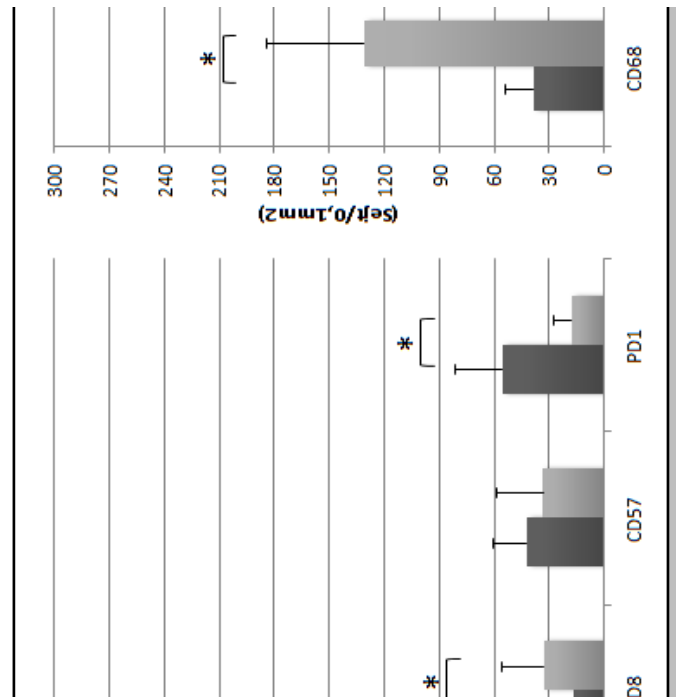
7. Táblázat. A csontvelői és nyirokcsomói mikrokörnyezet összehasonlítása.

Antitest	Csontvelő (Átlag±SD)	Nyirokcsomó (Átlag±SD)	p	Próba
CD4	25.55±12.82%	26.1±12.1%	0,916	Wilcoxon próba
CD8	11.02±7.61%	5.51±2.41%	0.004	Wilcoxon próba
FOXP3	151.00±86.39 /0.1 mm ²	76.85±39.64/0.1 mm ²	0.005	Student fële t-próba
CD57	11.1±8.57%	14.07±5.96%	0,162	Wilcoxon próba
PD1	5.89±3.15%	18.59±8.64%	0.002	Wilcoxon próba
CD68	131.41±52.59/0.1mm ²	38.77±15.28/0.1mm ²	$p < 0.0001$	Wilcoxon próba



21. Ábra. A nyirokcsomói és csontvelői immunhisztokémiai festések képanalízisének reprezentatív ábrázolása.

A képek az egymáshoz tartozó nyirokcsomói és csontvelői párokat reprezentálják. A csontvelőinfiltrátum, illetve a nyirokcsomó follicularis területei piros annotációval jelöltek. A pozitív sejtek kék színnel jelöltek.

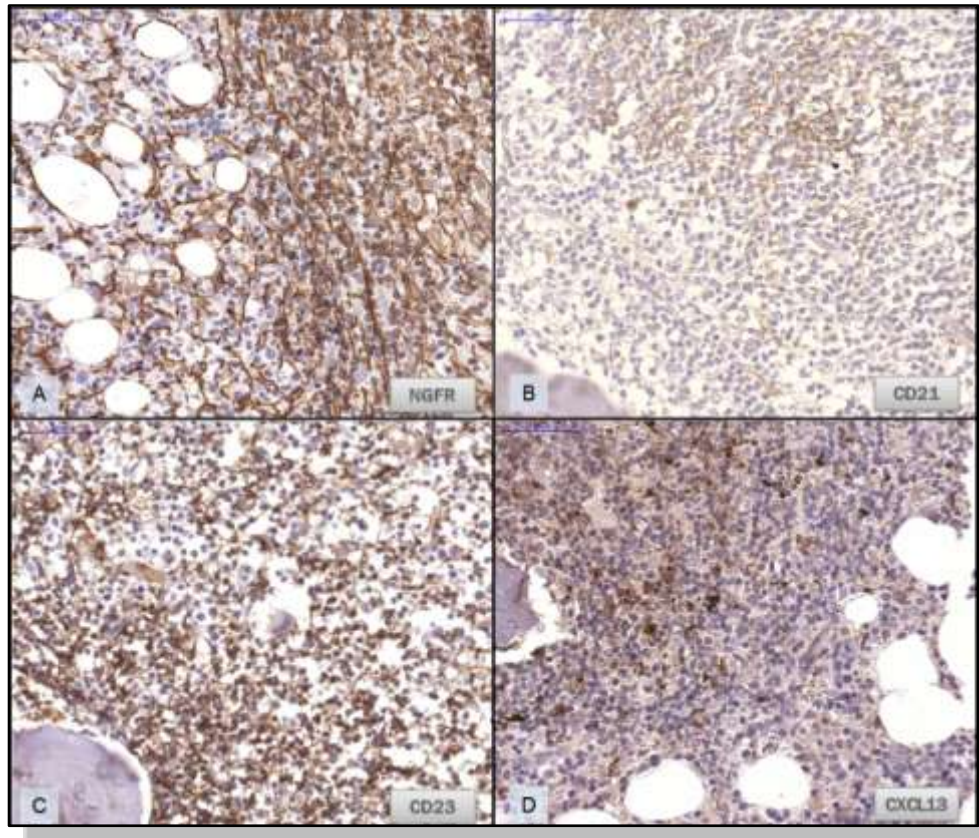


22. Ábra. A nyirokcsomói és csontvelői tumorkomponens reaktív mikrokörnyezeti sejtösszetételének összehasonlító vizsgálata (n=20).

A CD4, CD8, CD57 és PD1 értékek az antitest pozitív sejtek területszázalékát jelölik, míg a FOXP3 és CD68 értékek a pozitív sejtek számát jelölik. Az oszlopdiagrammokon az átlag, illetve a standard deviáció látható.

5.3. A csontvelői tumoros infiltráció FDC hálózatának vizsgálata

A csontvelői infiltrátum stromalis sejt-komponensének vizsgálata során értékeltük a normál, tumormentes csontvelőben észlelt mesenchymalis stromalis sejt hálózatot. Normál csontvelőben az LNGFR expresszió a stromalis komponenst jelölte. Az LNGFR expresszió alapján tumoros infiltrátum területén a reticularis sejt hálózat a normál csontvelőhöz képest kifejezetten hyperplasticus volt (23. Ábra A).



23.Ábra. A csontvelői infiltrátum stromalis sejtkomponensének vizsgálata.

A: LNGFR immunhisztokémiai vizsgálattal az infiltrátum területén észlelt denz stromalis sejtálózat mellett a normál csontvelői stromasejtek is jelölődtek.

B, C: CD21 és CD23 pozitív FDC hálózat csupán a tumoros infiltrátumon belül jelölődött.

D: CXCL13 expresszáló sejtek intenzíven jelölődtek a tumoros infiltrátum területén, azonban elszórtan a normál csontvelőben is jelen voltak.

CD21 és CD23 immunhisztokémiai vizsgálatokkal a normál csontvelőben nem észlelhető pozitívítást mutató stromalis sejt.

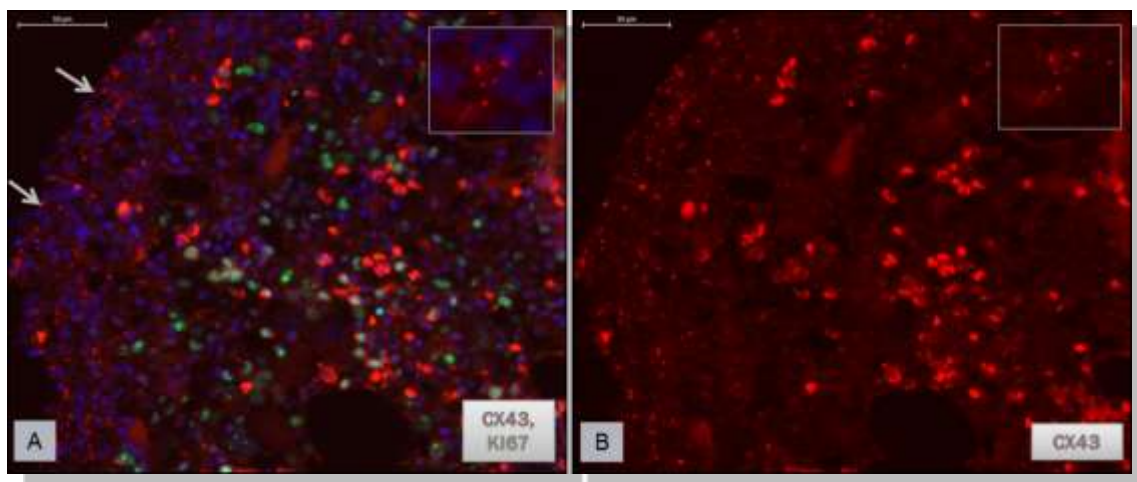
CD21 (complement receptor) markerrel a paratrabecularis mintázatot mutató infiltrátumban csupán elszórtan voltak megfigyelhetőek follicularis dendritikus sejtek. Diffúz infiltrátum esetén egyrészt diffúzan elhelyezkedő CD21 pozitív FDC hálózat, másrészt helyenként noduláris mintázatú FDC hálózat rajzolódik ki (23. Ábra B).

CD23 (FC receptor) immunhisztokémiai vizsgálattal fejlettebb hálózat mutatkozik, mint CD21 ellenes antitesttel. A hálózat diffúzan mind a paratrabecularis mintázatú, mind a diffúz mintázatú infiltrátum területén megfigyelhető volt (23. Ábra C).

A normál csontvelőben elszórtan látható csupán egy-egy CXCL13-t termelő stromalis sejt. A tumoros infiltrátumban az esetek nagy részében (10/16) kimutatható volt a CXCL13 kemokint termelő FDC hálózat (23. Ábra D).

5.4. A csontvelői tumoros infiltráció területén észlelhető connexin43 expresszió

A Cx43 csontvelői expressziójának vizsgálata során a normál csontvelőben Cx43 expresszió csupán elvétve volt látható, míg a csontvelői lymphoma infiltrátum területén kifejezett Cx43 expresszió volt megfigyelhető (24. Ábra).



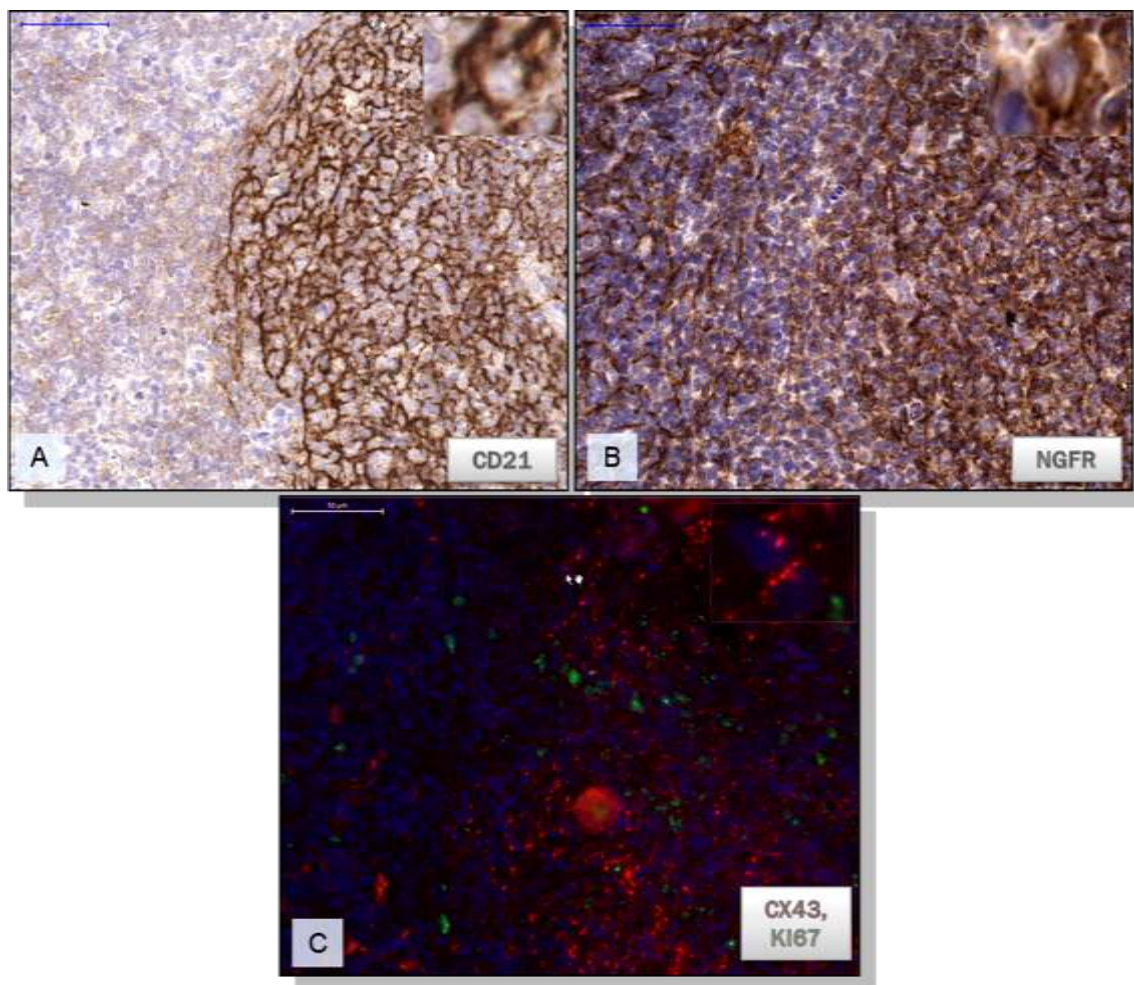
24. Ábra. Cx43 expresszió a csontvelői lymphoma infiltrátumban és a normál csontvelő.

A tumoros infiltrátumban az FDC hálózatnak megfelelően észlelhető a Cx43 gap junction plakkot (piros) reprezentáló $<1\mu\text{m}$ -nél is kisebb jelek (fehér nyilak). Az $1\mu\text{m}$ -nél nagyobb jeleket a vörösvértestek autofluoreszcenciája adja. Az infiltrátumban a Ki67 pozitív proliferáló sejtek száma lényegesen alacsonyabb a környező csontvelőtől.

A. Kombinált Cx43 (piros), Ki67 (zöld) sejtmagfestés (piros) jelölés.

B. Cx43 (rodamin – piros) reakció.

A Cx43 expresszió különböző dendritikus sejtes markerekkel összhangban történő vizsgálata során összefüggést észleltünk a specifikus FDC markerek és a Cx43 expressziója között. A normál csontvelői reticularis sejteket is jelölő LNGFR antigén vizsgálata során az LNGFR+ stromalis sejtes hálózat hyperplasticusnak bizonyult a csontvelői infiltrátumban, továbbá a Cx43 expresszió is emelkedettnek bizonyult. A legintenzívebb Cx43 expressziót a CD21+ FDC hálózat megjelenése esetén észleltük a csontvelői infiltrátumban, mely legkifejezettebben diffúz infiltrátumban megjelenő follicularis mintázat esetén volt látható (25. Ábra).



25. Ábra. Cx43 expresszió diffúz csontvelői infiltrátum melletti tumoros folliculusban.

A: CD21 pozitív follicularis mintázatot mutató FDC hálózat diffúz csontvelői infiltrátum területén.

B: LNGFR ellenes antitesttel az FDC hálózat mellett diffúz stromalis sejthálózat is azonosítható.

C: Magas Cx43 expresszió (piros) és Ki67 pozitív proliferáló tumorsejt frakció (zöld) a CD21 pozitív folliculusnak megfelelő területen (sejtmagfestés - kék).

5.5. A nyirokcsomó reaktív mikrokörnyezetének vizsgálata csontvelő infiltrációval társuló és csontvelői infiltrációt nem mutató esetekben

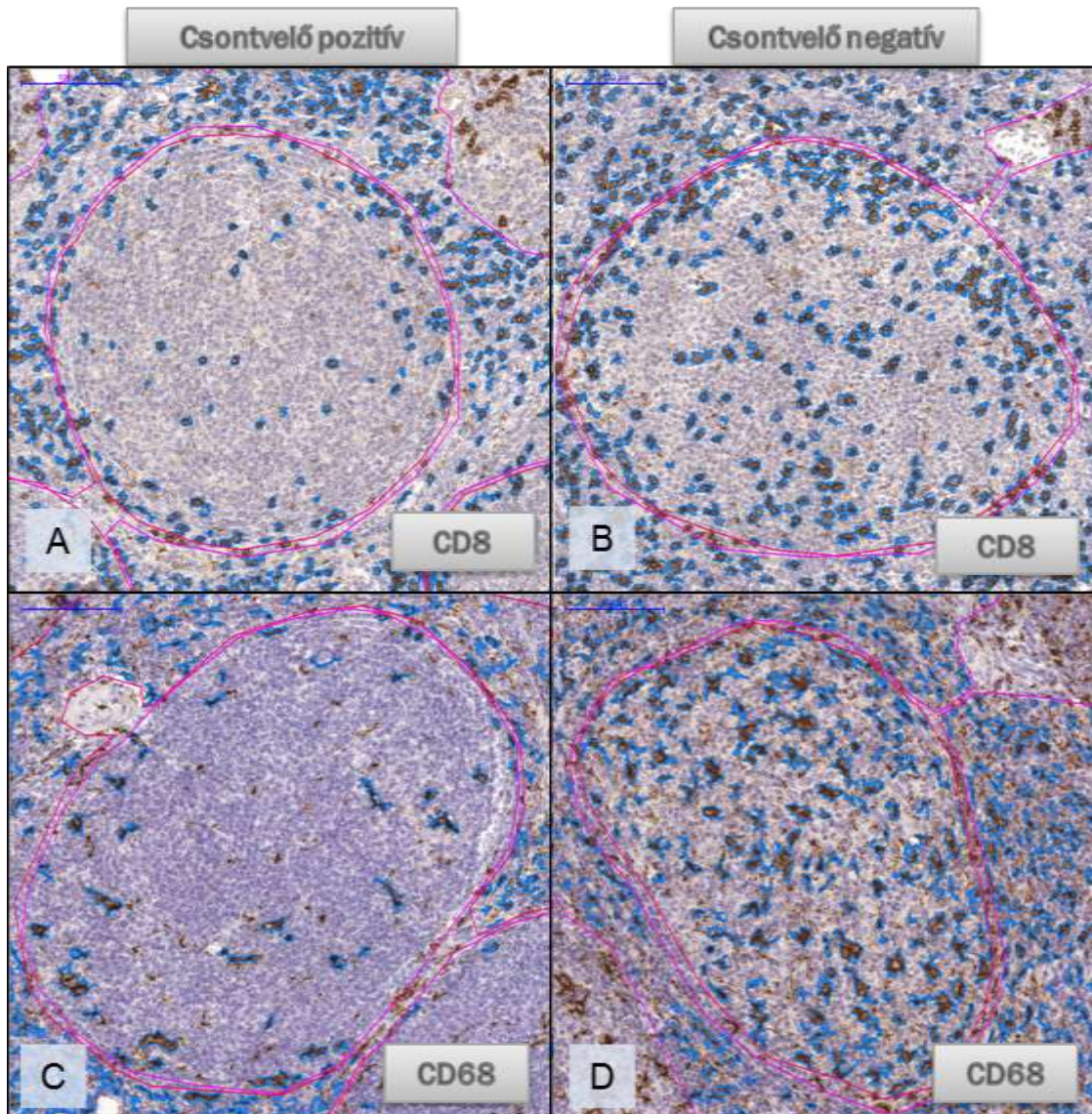
A reaktív nyirokcsomói mikrokörnyezet csontvelői terjedést befolyásoló hatásának meghatározása céljából összehasonlítottuk a csontvelő infiltrációval rendelkező, illetve csontvelő infiltrációt nem mutató esetek mikrokörnyezeti összetételét. A vizsgálat során külön értékeltük a nyirokcsomó follicularis és interfollicularis területeit. A follicularis területek mikrokörnyezeti összetételét vizsgálva szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a CD8+ T-lymphocyták ($5.57 \pm 2.36\%$ vs $10.02 \pm 9.6\%$; Mann-Whitney U teszt; $p=0.04$) és a CD68+ macrophágok ($38.15 \pm 15.03 \text{ cells}/0.1 \text{ mm}^2$ vs $62.59 \pm 30.62 \text{ cells}/0.1 \text{ mm}^2$; Student félé t-próba $p=0.004$) száma a csontvelői infiltrációt mutató csoportban (8. Táblázat, 26, 27. Ábra).

8. Táblázat. A csontvelői infiltrációval társuló és nem társuló csoportok nyirokcsomói mikrokörnyezetének összehasonlítása.

Antitest	Csontvelői érintettség		p	Próba
	Pozitív (Átlag \pm SD)	Negatív (Átlag \pm SD)		
CD4	25.31 \pm 10.85%	27.71 \pm 12.44%	0.446	Mann-Whitney U teszt
CD8	5.57 \pm 2.36%	10.02 \pm 9.6%	0.042	Mann-Whitney U teszt
FOXP3	77.35 \pm 37.87/0.1 mm ²	107.57 \pm 77.6/0.1 mm ²	0.137	Student félé t-próba
CD57	13.64 \pm 5.79%	12.36 \pm 8.47%	0.404	Mann-Whitney U teszt
PD1	16.62 \pm 8.2%	13.68 \pm 7.02%	0.377	Mann-Whitney U teszt
CD68	38.15 \pm 15.03/0.1 mm ²	62.59 \pm 30.62/0.1 mm ²	0.004	Student félé t-próba

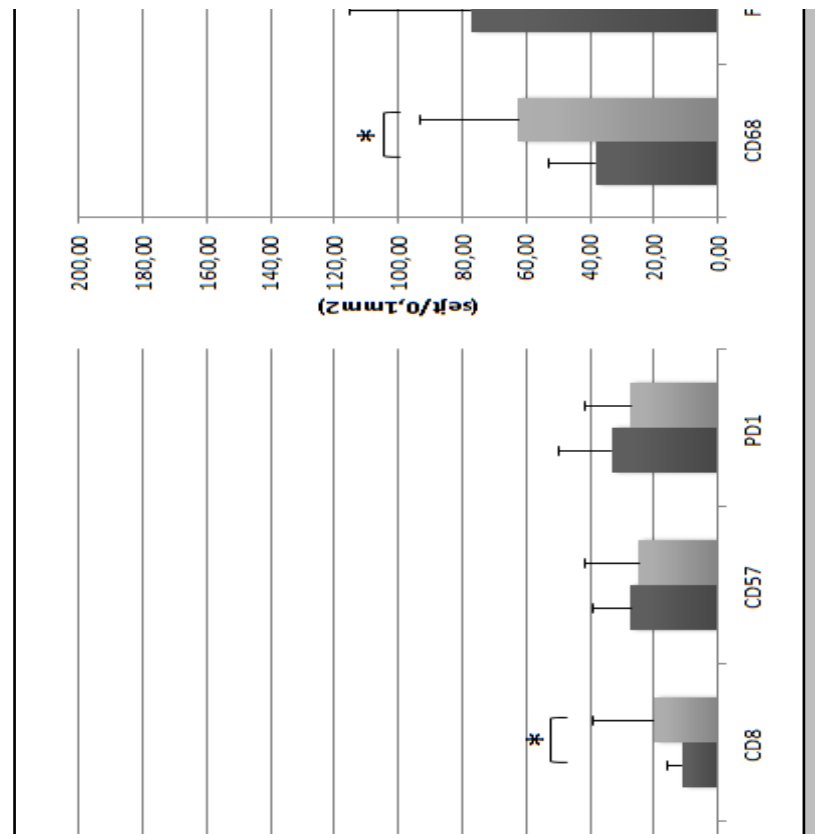
Az interfollicularis területek reaktív sejtösszetételét vizsgálva nem észleltünk különbséget a két csoportban.

Vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a CD4+ T-lymphocyták, aCD8+ T-lymphocyták, a FOXP3+ T-lymphocyták, a CD57+ T-lymphocyták és a CD68+ macrophágok túlnyomórészt interfollicularisan helyezkedtek el, míg a PD1+ T-lymphocyták follicularis lokalizációt mutattak. Két esetben megfigyeltük a CD8+ T-sejtek perifollicularis halmozódását.



26. Ábra. Csontvelői infiltrációval társuló, illetve csontvelői infiltrátum nélküli FL esetek nyirokcsomó mintáinak CD8 és CD68 immunhisztokémiai vizsgálata.

A follicularis területek piros annotációval jelöltek. A pozitív sejtek kék színnel jelöltek.



27. Ábra. A nyirokcsomói tumoros komponens follicularis területén észlelhető reaktív sejtek aránya csontvelői infiltrátummal rendelkező (n=20) és nem rendelkező (n=15) FL esetekben.

A CD4, CD8, CD57 és PD1 értékek az antitest pozitív sejtek területszázalékát jelölik, míg a FOXP3 és CD68 értékek a pozitív sejtek számát jelölik. Az oszlopdiagramokon az átlag, illetve a standard deviáció látható.

5.6. A nyirokcsomó FDC hálózatának vizsgálata

A csontvelői terjedést elősegítő és gátló nyirokcsomói sejtes mikrokörnyezet vizsgálata során értékeltük a follicularis dendritikus sejtes hálózat jelenlétét a két csoportban, illetve a normál secunder folliculus FDC hálózatához viszonyítva (28. Ábra, 9. Táblázat).

Nem észleltünk szignifikáns különbséget a stromalis sejtek antigén expressziójának intenzitásában a csontvelői terjedést mutató, illetve a csontvelői infiltrációval nem járó csoportok között. Legegyesesebb expresszió az LNGFR

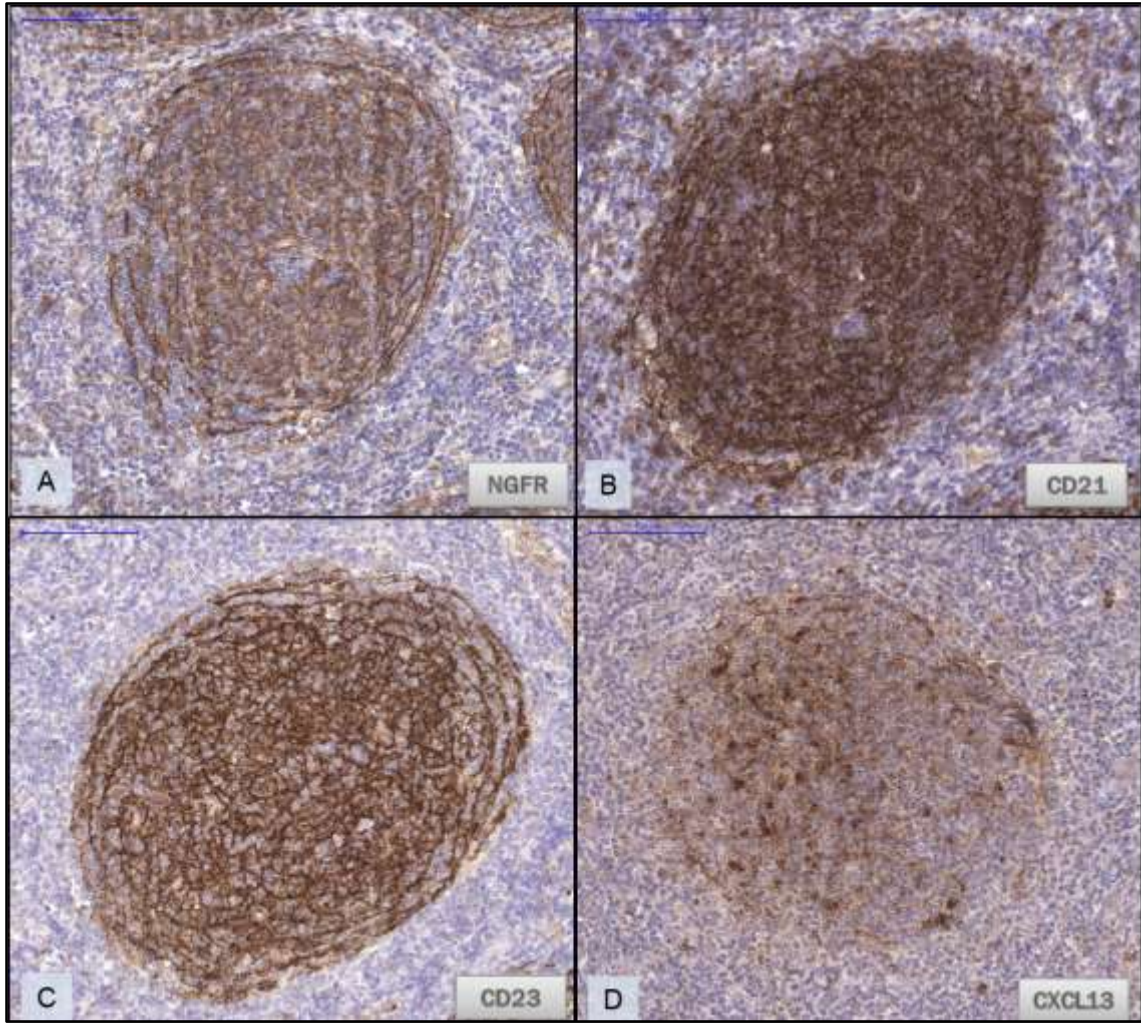
antitesttel volt észlelhető, a csontvelői infiltrációval rendelkező csoportban minden esetben jelen volt LNGFR expresszió, míg a csontvelői érintettség nélküli csoportban az esetek 87%-ban (13/15) volt megfigyelhető. A specifikus FDC markereket (CD23, CD21) vizsgálva az expresszió inhomogénnek mutatkozott mindkét csoportban.

A CXCL13 kemokin expressziója alacsonynak, azonban homogénnek mutatkozott mindkét csoportban.

A csoportokat lymphoma grade alapján osztályozva nem volt észlelhető különbség az alacsony és magas grade-del rendelkező esetekben.

9. Táblázat. A csontvelői infiltrációval társuló és nem társuló csoportok nyirokcsomói FDC hálózatának összehasonlítása.

Antitest	Csontvelői érintettség		p
	Pozitív	Negatív	
LNGFR (Alacsony (0,1)/magas (2,3))	7/13	10/5	0.092
CD21 (Alacsony (0,1)/magas (2,3))	5/15	7/8	0.282
CD23 (Alacsony (0,1)/magas (2,3))	6/14	9/6	0.097
CXCL13 (Alacsony (0,1)/magas (2,3))	15/5	12/2	0.672



28.Ábra. A nyirokcsomó stromalis sejt komponensének vizsgálata FL-ben.

A: NGFR immunhisztokémiai vizsgálattal a tumoros nyirokcsomó follicularis területein denz sejhálózat jelölődik. Az interfollicularis területeken is elszórtan megfigyelhető volt egy-egy pozitív stromalis sejt.

B, C: CD21 és CD23 pozitív FDC hálózat jelenléte specifikus volt a follicularis területekre.

D: CXCL13 expresszáló sejtek túlnyomóan a follicularis területekre lokalizálódtak.

5.7. Connexin 43 expresszió nyirokcsomói lokalizációban

A tumoros nyirokcsomó follicularis régióiban a Cx43 expresszió diffúzabb és csökkent intenzitású volt a normál nyirokcsomók másodlagos nyiroktüszőihez képest. Az antigén kifejeződése elvesztette a normál folliculusra jellemző polarizációját (29. Ábra).

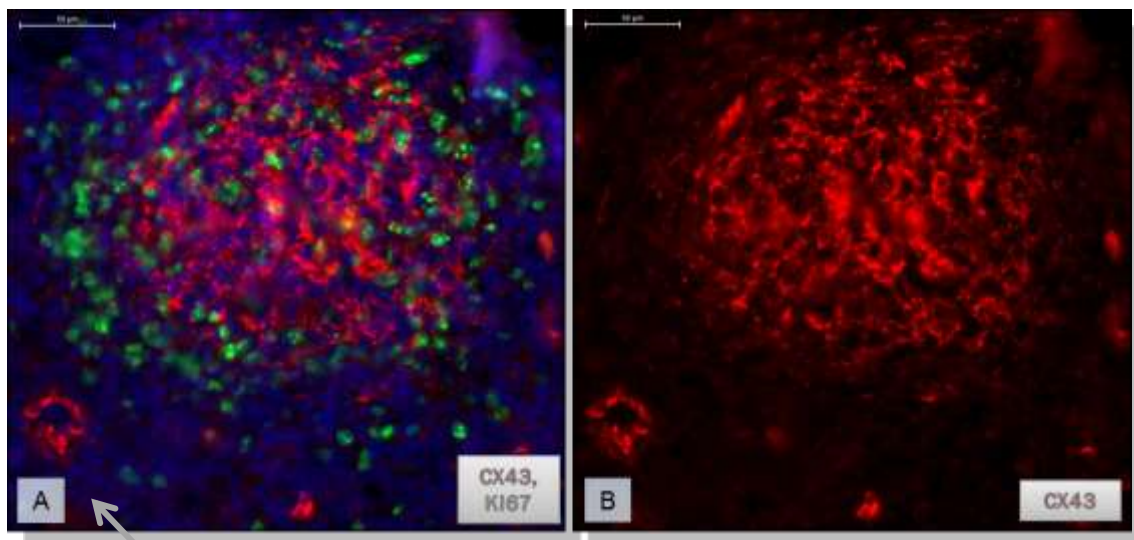
Nem találtunk szignifikáns összefüggést a Cx43 expresszió és a betegség csontvelői progressziója között. A csontvelői manifesztációt mutató csoportban az alacsony Cx43 expressziót mutató esetek száma 5, míg a magas expressziót mutató esetek száma 13. Két esetben a Cx43 expresszió nem volt vizsgálható. A csontvelői infiltrátumot nem adó esetekben az alacsony expressziójú esetek száma 3, míg a magas expressziójú esetek száma 12 volt ($p=0.699$).

Szintén nem volt szignifikáns kapcsolat a Cx43 expresszió és a tumor grade között. Az alacsony grade-del (grade I-II) rendelkező esetekben alacsony Cx43 expresszió volt megfigyelhető 5 esetben, míg magas 19 esetben. A magas grade-del (grade III) rendelkező esetekben alacsony Cx43 expresszió volt azonosítható 3, míg magas 6 esetben ($p=0.651$).

A kevésbé specifikus stromalis sejtes marker (LNGFR) és az FDC specifikus CD21 és CD23 expresszióval korrelációban vizsgálva a CX43 expressziója összefüggést mutatott a follicularis dendritikus sejtes hálózat jelenlétével a follicularis régióban (10. táblázat).

10. Táblázat. A stromalis és follicularis dendritikus sejtes markerek korrelációja a Cx43 expresszióval.

Antitest	Connexin 43 expresszió		p
	Alacsony	Magas	
LNGFR (Alacsony (0,1)/magas (2,3))	3/4	12/11	1
CD21 (Alacsony (0,1)/magas (2,3))	3/4	8/15	1
CD23 (Alacsony (0,1)/magas (2,3))	3/4	10/13	1



29. Ábra. Cx43 expresszió FL nyirokcsomóban.

A Cx43 expresszió follicularis lokalizációban az FDC hálózatnak megfelelően a legkifejezettebb. Interfollicularisan elszórtan főként a lympho-endothel sejtekben (szürke nyíl) és a stromalis sejtek mentén látható. A. Kombinált Cx43 (piros), Ki67 (zöld) sejtmagfestés (piros) jelölés. B. Cx43 (rodamin – piros) reakció.

6. Megbeszélés

Follicularis lymphomában a reaktív mikrokörnyezet kiemelkedő szerepet játszik a tumorsejtek fenotípusának formálásában valamint tumorsejtek terjedésében. Munkánk során jelentős különbségeket tártunk fel a nyirokcsomói és csontvelői tumorsejtek fenotípusa, a reaktív mikrokörnyezet összetétele, illetve az FDC hálózat jellege és a sejtek connexin expressziója között. Emellett a tumorsejtek terjedésének vizsgálata során jelentős különbségeket észleltünk azon nyirokcsomó minták reaktív mikrokörnyezete között, melyeknél észlelhető volt a csontvelő érintettsége, a csontvelő infiltrációt nem mutató mintákhoz képest.

Az azonos betegből származó nyirokcsomói és csontvelői minták összehasonlító vizsgálata során mind hasonlóságokat, mind különbségeket észleltünk a reaktív mikrokörnyezet szempontjából. A CD4+ T-sejtek és a CD57+ T-sejtek aránya megegyezett mind a két lokalizációban. Emellett a csontvelői tumoros infiltráció területén minden mintában észlelhető volt specifikus FDC hálózat, amely a normál csontvelőben nincs jelen. Nem ismert, hogy a tumorsejtek a nyirokcsomói mikrokörnyezethez hasonló mikrokörnyezetet a csontvelőben megtalálható reticularis sejtek transzdifferentiálásával, vagy a már érett sejtek importálása által teremtik meg maguknak. Ghia és munkatársai által leírt *'importing'* hipotézis alapján a csontvelőben lévő malignus tumorsejtek a nyirokcsomóban megtalálható mikrokörnyezethez hasonló sejtes környezetet alakítanak ki maguk körül, ezzel biztosítva növekedésüket és túlélésüket a csontvelőben [111]. A mikrokörnyezet fontosságát a B-lymphocytá fejlődés szempontjából számos *in vitro* vizsgálat igazolta, melynek során azt észlelték, hogy a follicularis lymphoma sejtek stromalis sejtek, CD40 receptor illetve CD4+ T-lymphocyták együttes jelenléte nélkül nem képesek a proliferációra [93, 94, 112]. A follicularis dendritikus sejtek anti-apoptotikus szignálokat közvetítenek a B-sejtek számára, míg a T-lymphocyták CD40L és citokinek szekretálásával a B-sejtek differenciációjának elősegítésében játszanak kiemelkedő szerepet [113]. A specifikus FDC kialakításának szükségességét tükrözi az a megfigyelés, hogy a tumor necrosis factor α és lymphotoxin $\alpha 1\beta 2$ (TNF α /LT) stimulációval csontvelői mesenchymális

stromalis sejtekből generált FDC-szerű sejtek hatékonyabban biztosítják a malignus B-lymphocyták túlélését, mint maguk a csontvelői mesenchymális stromalis sejtek [114].

A nyirokcsomó és csontvelő összehasonlító vizsgálata során jelentős különbségeket észleltünk, mind a tumoros, mind a reaktív sejtösszetétel tekintetében. A mikrokoznyezetet vizsgálva a csontvelőben szignifikánsan magasabbarányban voltak jelent CD8+ cytotoxicus T-lymphocyták, FOXP3+ regulátoros T-lymphocyták, CD68+ macrophágok valamint jelentősen kevesebb PD1+ T-lymphocytát észleltünk, a vele párosított nyirokcsomói mintákhoz képest. Eredményeink megerősítették a korábbi megfigyelést, miszerint a malignus B-lymphocyták alacsonyabb grade-del és proliferációs rátával rendelkeznek a csontvelőben[115]. Ezen eltérések magyarázhatóak a mikrokoznyezet sejtösszetételének különbségeivel, amely a csontvelőben elősegítheti a magasabb Ki67 indexel rendelkező és éretlen fenotípusú B-lymphocyták eliminációját a csontvelőben. A CD8+ cytotoxicus T-lymphocyták, illetve a CD68+ macrophágok képesek közvetlen antitumorális immunválasz segítségével illetve kemokinek termelésével eliminálni a B-lymphocytákat [116]. A magasabb T_{reg}-lymphocytá szám és a magasabb T_{reg}- és PD1+ T_{FH}-lymphocytá arány a csontvelőben ugyancsak szelektív daganatgátló tényezőként jelenhet meg, mivel a T_{reg}-lymphocyták közvetlenül is gátolhatják a B-sejt proliferációt [117]. A T_{reg}-lymphocyták közvetve is hatással vannak a tumorsejtek proliferációs aktivitására, mivel gátolhatják a T_{FH}-lymphocyták funkcióját [118-120].

A csontvelői és a nyirokcsomói mikrokoznyezetben észlelt különbségek azonban szekunder eltérésként is felfoghatóak, melyet a tumoros sejtpopulációban észlelt eltérések is magyarázhatnak. Munkacsoportunk illetve más kutatócsoportok is leírták, hogy a nyirokcsomóból a csontvelőbe kerülő tumorsejtek mellett egy olyan follicularis lymphoma tumorsejt populáció is kimutatható a csontvelőben, amely nem a nyirokcsomóból származik[115, 121]. Ez a megfigyelés felveti azt a lehetőséget, hogy a nyirokcsomói mikrokoznyezettel korábban nem érintkező klónok más mikrokoznyezeti jeleket igényelnek a túléléshez. Ezt a hipotézist az is alátámaszthatja, hogy a PD1+ T_{FH}-sejtek – melyek normálisan a nyirokcsomó centrum germinatívumainak alkotói és a B-lymphocyták immunglobulin szekretáló B-sejtekké történő differenciációjában játszanak fontos szerepet– alacsonyabb arányban fordulnak elő a csontvelői mikrokoznyezetben[12].

A csontvelői infiltrációt mutató, illetve a csontvelőt nem infiltráló esetek nyirokcsomói mikrokörnyezetének összehasonlító vizsgálata során szignifikáns eltéréseket észleltünk. A csontvelői terjedést nem mutató esetekben jelentősen alacsonyabb arányú CD8+ lymphocytákból és CD68+ macrophágokból álló infiltráció volt megfigyelhető, mely felveti a mikrokörnyezet befolyásoló szerepét a tumorsejtek csontvelőbe történő migrációjának szempontjából.

Ezen megfigyelés összhangban áll azon vizsgálati eredményekkel, melyek szerint a CD8+ T-lymphocyták jelenléte összefügg a kedvezőbb túléléssel FL-ben [97, 99, 122]. Ennek hátterében a CD8+ T-lymphocyták direkt cytotoxicus hatása, illetve citokin szekréción (IFN- γ) keresztül kiváltott hatása állhat [116]. Az éretlen B-sejtek migrációját az IFN- γ szabályozza, mivel részese az IFN- γ – PI3K – PKC α kemokin jelátviteli útvonalnak, mely gátolja a citoskeletonátrendeződését (actin polimerizáció), az adhéziót és így a B-sejtek migrációját [123].

Az infiltráló macrophágok aránya szintén szignifikánsan különbözött a két csoportban. Eredményeink alapján a magasabb arányú macrophag infiltráció megakadályozza a betegség progresszióját és a csontvelői infiltráció kialakulását. Az irodalomban a macrophágok szerepe follicularis lymphomában a prognózis és a progresszió tekintetében vitatott. Dave és munkatársai génexpressziós vizsgálatuk alapján két mintázatot határozott meg, az „Immun válasz-1” mintázat jó prognózisú FL esetekben volt megfigyelhető, mely csoportban különböző T-sejtekre és macrophágokra jellemző gének overexpresszióját mutatták ki, míg az „Immun válasz-2” mintázat a rossz prognózisú esetekben volt észlelhető, mely esetekre macrophágokra illetve dendritikus sejtekre karakterisztikus gének overexpressziója volt jellemző [96]. Farinha és munkatársai megfigyelése alapján a CD68+ macrophágok mennyisége a túlélés független prediktora és a betegség rossz kimenetelét jelzi előre [104]. Ezzel ellentétben más vizsgálat alapján a kifejezettebb CD68+ macrophag infiltráció megakadályozza a betegség progresszióját és ezáltal az ún. „immunsurveillance mintázat” részét képezik [122]. A macrophágok prognosztikus jelentőségének felderítését célzó vizsgálatok ellentétes megfigyeléseinek hátterében a különböző kezelési protokollok állhatnak [124]. Konvencionális kemoterápiás protokollok alkalmazása esetén a magas arányú macrophag infiltráció negatív prognosztikus tényezőként szerepel, azonban prognosztikai értéke megfordult, amikor a kemoterápiát Rituximabbal kombinálták [104,

125, 126]. Ismert, hogy az anti-CD20 monoklonális antitest által kiváltott B-sejt depléción a macrophágok aktiváló FC γ R expressziójától függ [127]. Emellett ismert tumorprogresszió gátló mechanizmus a CD68+ macrophágok által termelt reaktív oxigén és nitrogén (nitrogén-monoxid, NO) gyökök hatása. Továbbá magas NO koncentráció gátolja a mátrix metalloproteinázok (MMP) aktivitását, amely enzimek fontos szerepet játszanak az extracelluláris mátrix átépítésében és ezáltal a metasztázisok kialakulásának mechanizmusában [128, 129].

Vizsgálataink során nem észleltünk összefüggést a FOXP3+ T_{reg}-lymphocyták aránya és a csontvelői manifesztáció jelenléte között. Korábbi, a T_{reg}-lymphocyták infiltrációja és a betegség túlélésének összefüggését vizsgáló irodalmi adatok alapján a FOXP3+ sejtek nagyarányú infiltrációja meghatározta a progressziómentes túlélést (PFS), a teljes túlélést (OS) valamint előre jelezte a betegség transzformációját is. Emellett a FLIPI index mellett a FOXP3+ sejtes infiltrációt a teljes túlélés független meghatározójának írták le, vagyis magasabb FOXP3+ T_{reg} lymphocyták aránya a betegség kedvezőbb prognózisát jelezte előre [100, 103, 130].

A T_{FH}-lymphocyták száma és a csontvelői infiltráció kialakulása tekintetében sem észleltünk összefüggést. PD1+ T_{FH}-sejtek nagyarányú jelenlétét pozitív prognosztikus tényezőként határozták meg, emellett megállapították, hogy tumor follicularis compartmentjének PD1+ T-lymphocyták infiltrációja FLIPI-től független meghatározója a teljes túlélésnek [102]. A tumor emelkedett arányú CD57+ T-lymphocyták infiltrációját negatív prognosztikus markerként írták le [98].

Alvaro és munkatársai immunhisztokémiai vizsgálatok alapján kétféle reaktív sejtes infiltrátum mintázatot határoztak meg. Az ún. „Immunosurveillance” típus az indolens klinikai lefolyású betegséget jellemzi, melyre emelkedett CD4+, CD8+ és FOXP3+ T-lymphocyták, alacsony CD57+ T-lymphocyták és magas CD68+ macrophag sejtszám jellemző. Az agresszív klinikai lefolyású betegséget az „Immun escape” mintázat jellemzi, mely esetén alacsony CD4+, CD8+ és FOXP3+ T-lymphocyták, magas CD57+ T-lymphocyták és alacsony CD68+ macrophag infiltráció észlelhető [98]. Ezen megfigyelések összhangban állnak a vizsgálatunk során észlelt eredményekkel, miszerint a magas CD8+ T-lymphocyták és a CD68+ macrophag arány gátolja a betegség progresszióját.

Számos klinikai vizsgálat van folyamatban, melynek során a különböző kezelési protokollokat értékelik a mikrokörnyezeti infiltrátum fényében. Korábban már említésre került a CD68+ macrophágok emelkedett számának előnyös prognosztikus hatása a rituximabbal kezelt betegeken [125, 126]. Fludarabinnal, illetve CVP (Cyclophosphamid, vincristin, és prednison) protokollal kezelt betegcsoportok összehasonlító vizsgálata során észlelték, hogy a CVP protokollal kezelt betegek esetében a denz FOXP3+ T_{reg}-lymphocytá és CD68+ infiltrátum, illetve a megtartott FDC hálózat jó prognosztikai tényezőként szerepeltek, míg a fludarabinnal kezelt betegcsoportban ennek az ellenkezője volt megfigyelhető [124]. In vitro vizsgálatok alapján megfigyelték, hogy a FL sejtek negatívan befolyásolják a tumort infiltráló T-lymphocyták hatását, ami azonban lenalidomid kezeléssel kivédhető volt [131].

A follicularis dendriticus sejtek alapvető szerepe ismert normál B-lymphocyták túlélésének és proliferációjának szabályozásában. A stromalis sejtek felelősek a normál GC fenotípust prezentáló CXCR4+ CXCR5+ CCR7- FL B-sejtek homing-jáért [132]. A CXCL12, a CXCR4 ligandja felelős mind a csontvelőben, mind a nyirokcsomóban a tumoros B-lymphocyták toborzásáért [114]. Az FDC hálózat szerepét a tumor prognózisának meghatározásában már az első génexpressziós vizsgálatok felvetették [96], melyek során az FDC-re jellemző gének a rossz prognózist jelentő „Immun válasz-2” csoportban jelentek meg. Immunhisztokémiai vizsgálatokkal kétféle alcsoportot írtak le az FDC hálózat alapján: egy, a normál CG-hez hasonló expressziójú stromával rendelkező és egy alacsonyán differenciált stromával rendelkező alcsoportot [133]. Shiozawa és munkatársai összefüggést találtak az FDC immunfenotípusának változása és a betegség progressziója között. Az FDC hálózat CD21 negativitását rossz prognosztikai tényezőként határozták meg, illetve a CD21 expresszió eltűnését összefüggésbe hozták a betegség diffúz nagy B-sejtes lymphomába történő transzformációjával [106]. Ezzel szemben az FDC sejtek CD23, CD35 és CD54 expressziójának vizsgálata során nem találtak kapcsolatot a betegség kimenetele szempontjából [134]. Vizsgálataink során nem észleltünk összefüggést különböző specifikus FDC markerek (CD21 és CD23), az FDC által szekretált CXCL13, illetve a stromalis sejt marker LNGFR expressziója valamint a csontvelői infiltráció kialakulása között. Az alacsony (grade I-II) és magas (grade III) grádusú esetek összehasonlítása során nem észleltünk összefüggést a tumor grade és a follicularis dendriticus sejtes

hálózat fenotípusa között. Cui és munkatársai vizsgálták a betegség klinikai stádiuma és az FDC hálózat jelenléte közötti összefüggést, melynek során azt tapasztalták, hogy a magas stádiumú (Stage III-IV) esetekben GC-hez hasonló, hyperplasticus FDC hálózat volt megfigyelhető, míg az alacsony klinikai stádiumú esetekre (Stage I-II) alacsonyan differenciált stromalis hálózat volt jellemző [135]. In vivo és in vitro vizsgálatok eredményeiből ismert, hogy a stromalis sejtes hálózat központi szerepet játszik a tumorsejtek proliferációjának fenntartásában, a betegség progressziójában. További vizsgálatok leírták az FDC hálózat szerepét a betegség kemoterápiás szer rezisztenciájának kifejlődésében is [136]. A betegség patogenezisében betöltött jelentős szerepüket figyelembe véve az FDC hálózat fontos terápiás célpontot jelenthet FL-ban. Úgy mint a CXCR4 antagonisták alkalmazása az FDC hálózat tumorsejtekre kifejtett protektív mikrokörnyezeti hatásának kivédésére [137]. Az anti-VLA4 antitest natalizumab szintén ígéretes szer a B-sejtek és stromalis sejtek adhéziójának megakadályozására [136].

A follicularis dendritikus sejtes hálózat és a B-lymphocyták közvetlen kapcsolatát biztosító gap junctionokat alkotó fehérjék fontos szerepet töltenek be a normál B-lymphocyták fejlődésében [138]. A Cx43 csatornákon keresztüli direkt sejt-sejt kommunikáció FDC sejt hálózat funkcióinak összehangolásában is szerepet játszhat. A Cx43 csatornákon keresztüli közvetlen sejt-sejt kapcsolatot a B-sejtek és az FDC hálózat közötti funkcionális festék transzfer vizsgálatokkal bizonyították [24]. Ugyancsak leírták Cx43 csatornák szerepét a csontvelői stroma sejtekben a normál haematopoiesis támogatásában [139, 140]. Vizsgálataink során a csontvelőben a tumoros infiltrátum területén Cx43 expresszió fokozódás volt megfigyelhető, mely legkifejezettebb az FDC markereket expresszáló sejtes hálózat sejtjein volt. A Cx43 képes befolyásolni a B-lymphocyták actin citoskeletonjának átrendeződését, és ezáltal a BCR receptor mediált B-sejt vándorlást. Emellett a Cx43 képes aktiválni a Rap1 GTPáz-t, mely szintén fontos szerepet játszik a B-sejtek terjedésében és az immun szinapszisok kialakításában [31, 141]. Azonban vizsgálataink során nem észleltünk összefüggést a nyirokcsomóban megfigyelhető tumoros folliculusok területén azonosítható Cx43 expresszió, illetve a tumoros B-sejtek csontvelői terjedése között. A gap junction connexinek akár csatornaként, akár közvetlen fehérje interakciókon keresztül szerepet játszanak a sejtek proliferációjának kontrolljában. Retinoidokkal

támogatott fokozott expressziójuk gátolja a proliferációt, míg az scr onkogén aktivációja révén a Cx43 fehérje foszforilációja a csatornák gátlását eredményezi, mellyel fokozott sejtproliferációt eredményez[30]. A jelenséget a normál hematopoiesisben is megfigyelték, azonban ellentétes hatással, amikor is cytoablatív kezelést követően Cx43+/- egerekben gátoltnak bizonyult a hematopoiesis[32]. Vizsgálataink során nem észleltünk összefüggést a tumorra jellemző grade és a sejtek Cx43 expressziója között. A nyirokcsomói tumoros területeken ugyanakkor a Cx43 expressziója összefüggést mutatott a CD21, ill. CD23 pozitív FDC hálózat fejlettségével. A csontvelőben a nyirokcsomóra jellemző mértékű Cx43 expresszió csupán a CD21+ FDC hálózattal összefüggésben volt észlelhető. A csupán NGFR és CXCL13 expressziót mutató stromalis sejthálózat területén a follicularis régióban mértnél szignifikánsan alacsonyabb Cx43 expressziót figyeltünk meg. Ismerve a kommunikációs csatornáknak a sejtciklus kontrollban betöltött szerepét, az emelkedett Cx43 expresszió csontvelői follicularis lymphoma infiltrátumokban hozzájárulhat a tumorsejtek mérsékeltebb proliferációjához és grade-jéhez a nyirokcsomói tumorsejtekhez viszonyítva. A Cx43 expresszió prognosztikus összefüggései follicularis lymphomában további vizsgálatokat igényelnek klinikailag követett betegek szövetmintáin.

A mikrokörnyezet kitüntetett szerepe a betegség prognózisának meghatározásában egyéb non-Hodgkin lymphomákban is ismert. A chronicus lymphocytás leukemiára (CLL) jellemző proliferációs centrumokban specifikus stromalis sejtek, úgynevezett nursing-like sejtek (NLC) azonosíthatók, mely sejtek in vitro körülmények között megakadályozzák a CLL sejtek apoptózist [142]. Emellett reaktív CD4+ T-lymphocyták is észlelhetőek a CLL-es nyirokcsomókban melyek CD40/CD40L interakciókkal biztosítják a B-sejtek túlélését[143]. Munkacsoportunk vizsgálatai alapján CLL-ben ezen proliferációs centrumokat felelhetnek meg a betegség transzformáció kiindulási helyének[144].

Diffúz nagy B-sejtes lymphomában (DLBCL) Monti és munkatársai génexpressziós vizsgálatokkal három alcsoportot különítettek el: (1) OxPhos klaszter, melyben magas BCL-2 szint volt azonosítható; (2) BCR/proliferációs klaszter, melyben a sejtciklus-gének és a BCR szignálút génjeinek expresszója volt domináló; (3) és a HR klaszter (Host response, host válasz), melyben a reaktív T- és NK-lymphocyták és interdigitáló dendritikus sejtek mintázata volt domináló [145]. Ezen három különböző

csoport azonban nemmutatott összefüggést a diffúz nagy B-sejtes lymphomában ismert sejteredet által meghatározott (Aktivált B-sejt (ABC) és Centrum germinatívum (GCB) B-sejt eredet) csoportokkal [146]. Staudt és munkatársai DLBCL-ben meghatároztak egy génexpressziós profilt, amely összefüggést mutatott a kedvező prognózissal. Ezen expressziós profilban a malignus B-sejtekre jellemző gének mellett reaktív macrophágokra és fibroblastokra jellemző gének expressziója volt megfigyelhető, ez utóbbiak expressziója összefüggést mutatott az alacsony betegség stádiummal és jellemzőbb volt a GCB sejteredetű DLBCL-re [147].

Primer csont diffúz nagy B-sejtes lymphomában (PB-DLBCL) munkacsoportunk összefüggést írt le a teljes túlélés és a tumort infiltráló CD8+ cytotoxikus T-lymphocyták aránya között. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy 5% feletti CD8+ T-lymphocytás infiltráció, alacsony Bcl-2 expresszió és alacsony proliferációs ráta (Ki67<57%) meghatározza a betegség kedvező prognózisát[148].

Megfigyeléseink és az irodalmi adatok alapján elmondható, hogy a mikrokörnyezet reaktív sejtes komponensei kiemelkedő szerepet játszanak az érett B-sejtes lymphomák viselkedésének és prognózisának meghatározásában. A csontvelői és nyirokcsomói kompartment összehasonlításával megállapítottuk, hogy a malignus tumorsejtek és a mikrokörnyezet sejtjei kétirányú kölcsönhatásban állnak egymással, illetve a tumorsejtek kialakítják a túléléshez szükséges reaktív mikrokörnyezetet. A csontvelői infiltrációt mutató, illetve a csontvelőt nem infiltráló follicularis lymphoma esetek nyirokcsomói mikrokörnyezetének összehasonlító vizsgálata feltárta, hogy a cytotoxikus T-lymphocyták és a macrophágok kiemelkedő szerepet játszhatnak a tumorsejtek terjedésének és migrációjának megakadályozásában, emiatt a nyirokcsomói tumoros komponensben észlelhető alacsony arányuk a csontvelői érintettség prognosztikus markere lehet.

7. Következtetések

A Dolgozat fő megállapításai és új megfigyelései a következők:

- A csontvelői lokalizációban észlelhető tumorsejtek alacsonyabb proliferációs rátája és down grading-je figyelhető meg anyirokcsomói tumoros komponenshez képest.
- A csontvelőt infiltráló tumorsejtek kialakítják a túlélésüket biztosító mikrokörnyezetet, úgymint a proliferációs stimulust biztosító follicularis dendriticus sejthálózatot, illetve a follicularis helper T-lymphocytá sejtjes környezetet, valamint a tumorsejtek proliferációját és terjedését reguláló, cytotoxikus T-lymphocytá, regulatoros T-lymphocytá továbbá macrophag tartalmú sejtjes környezet, illetve sejt-sejt kapcsolatokat a mikrokörnyezetben található sejtekkel, melyek azonban a tumorsejtekre visszahatva befolyásolják fenotípusukat.
- A csontvelői terjedést mutató és a csontvelőt nem infiltráló esetek mikrokörnyezetének összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a cytotoxikus T-lymphocyták és a macrophagok kiemelkedő szerepet játszanak a tumorsejtek terjedésének és migrációjának megakadályozásában, emiatt a nyirokcsomói tumoros komponensben észlelhető alacsony arányuk a csontvelői érintettség prognosztikus markere lehet.
- A nyirokcsomó follicularis dendritikus sejtjeinek és a B-lymphocytáknak a közvetlen kapcsolatát biztosító CX43 fehérje expressziója nem mutat összefüggést a tumor grade-jével, illetve a betegség csontvelői progressziójával

8. Összefoglalás

A follicularis lymphoma (FL) egy indolens megbetegedés, klinikai lefolyása során az esetek 50-80%-ában alakul ki csontvelői érintettség, mely rossz prognosztikai tényező. Napjainkban egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak a tumor mikrokörnyezetének, vagyis a daganatot infiltráló immunsejtek vizsgálatának. Irodalmi adatok alapján a betegség prognózisa és a túlélés a nem malignus immunsejtek génextpressziós profiljának változásaival mutat összefüggést.

Munkánk célkitűzése a follicularis lymphoma nyirokcsomói és csontvelői mikrokörnyezetének analízise patológiai és immunológiai jellemzők, illetve a klinikai viselkedés tükrében. Az immunhisztokémiai vizsgálatokat szöveti multiblokk technológia felhasználásával végeztük, melynek során vizsgáltuk a nyirokcsomói és csontvelői mikrokörnyezetben található lymphocytá csoportokat, macrophágákat és follicularis dendritikus sejteket, illetve a stromalis sejtek connexin 43 expresszióját.

Eredményeink alapján szignifikáns különbség volt kimutatható az egyazon beteghez tartozó tumoros nyirokcsomó és csontvelői infiltrátum reaktív immunsejtmintázata között, illetve a csontvelőben nyirokcsomói stromalis sejtekre jellemző antigéneket expresszáló FDC hálózat jelent meg. Szignifikáns különbség mutatkozott csontvelői manifesztációval rendelkező, illetve nem rendelkező esetek nyirokcsomói reaktív sejt összetételében. A csontvelői infiltrációt mutató esetekben a CD8+ T-lymphocyták illetve a CD68+ macrophágok alacsonyabb számban voltak jelen. Az FDC hálózat fenotípusa nem különbözött a két csoportban, illetve a betegség grade-el sem mutatott összefüggést. A connexin 43 expresszió jelentősen csökkentnek mutatkozott a normál nyirokcsomóéhoz képest, emellett diffúz lokalizáció volt megfigyelhető a normál nyirokcsomóban észlelhető polarizációval ellentétben.

Eredményeink alapján az egyazon beteghez tartozó tumoros nyirokcsomó - csontvelő párok különböző reaktív sejtmintázata segíthet magyarázatot adni arra a jelenségre, hogy miért található jelentős különbség a tumorsejtek fenotípusa között a csontvelői és nyirokcsomói lokalizáció esetén. Megfigyeléseink a sejtes immunitás általános szuppressziójáról tanúskodnak, ami lehetővé teszi a tumorsejtek migrációját továbbá azt, hogy azok kikerüljék a szervezet immunválasztát.

9. Abstract

Follicular lymphoma is an indolent non-Hodgkin lymphoma. In about 40-70% of the cases is associated with bone marrow (BM) involvement, which is considered a negative prognostic marker. Previous gene expression studies suggested that immune-microenvironment of FL plays an important role in prognosis and clinical behavior of the disease.

The aim of our work was to analyze the immune-microenvironment of the bone marrow and lymph node in respect of the pathological and immunological characteristics, and to investigate the correlation with the clinical features. Automated image-segmentation-based quantitation was performed in whole digital slides of tissue microarrays (TMA) of formalin-fixed paraffin-embedded tissue biopsies.

We analyzed specific subsets of T-lymphocytes, macrophages, stromal cells and the connexin 43 expression of stromal cells in the microenvironment of FL. We found significantly more CD8⁺ T-lymphocytes, FOXP3⁺T-lymphocytes, and CD68⁺macrophages and fewer PD1⁺T-lymphocytes in the BM than in the matching LN samples. We also observed the presence of lymph node specific FDC in the malignant infiltration of the bone marrow. Furthermore, we found significantly less CD8⁺ cytotoxicT-cells and CD68⁺macrophages in cases involving the BM compared to those localized only to the LNs. The follicular dendritic cell network didn't show any differences regarding the two groups, and we haven't observed any association with the grade of the tumor cells. Connexin 43 expression was significantly lower compared to normal lymph nodes, and had a diffuse expression in contrast to the polarized expression pattern in the normal secunder follicles.

Our study showed that different tumor cell growth in the LN and BM may generate different microenvironment, and suggested that the reduced number of cytotoxic T-lymphocytes and macrophages in LNs favors BM infiltration of neoplastic cells in FL.

10. Irodalomjegyzék

1. Boehm T and Bleul CC, The evolutionary history of lymphoid organs. *Nat Immunol*, 2007. 8(2): p. 131-5.
2. Rajewsky K, Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, 1996. 381(6585): p. 751-8.
3. Hess J, Laumen H, Muller KB, and Wirth T, Molecular genetics of the germinal center reaction. *J Cell Physiol*, 1998. 177(4): p. 525-34.
4. MacLennan IC, Liu YJ, Oldfield S, Zhang J, and Lane PJ, The evolution of B-cell clones. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1990. 159: p. 37-63.
5. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, and Honjo T, Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 2000. 102(5): p. 553-63.
6. Berek C, Berger A, and Apel M, Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*, 1991. 67(6): p. 1121-9.
7. Cyster JG, Ansel KM, Reif K, Ekland EH, Hyman PL, Tang HL, Luther SA, and Ngo VN, Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev*, 2000. 176: p. 181-93.
8. Forster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, and Lipp M, A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell*, 1996. 87(6): p. 1037-47.
9. Cyster JG, B cell follicles and antigen encounters of the third kind. *Nat Immunol*, 2010. 11(11): p. 989-96.
10. Klein U and Dalla-Favera R, Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(1): p. 22-33.
11. Nutt SL and Tarlinton DM, Give and take in the germinal center. *Nat Immunol*, 2010. 11(6): p. 464-6.
12. Nutt SL and Tarlinton DM, Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends? *Nat Immunol*, 2011. 12(6): p. 472-7.

13. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, and Butcher EC, Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med*, 2001. 193(12): p. 1373-81.
14. Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, Srivastava M, Divekar DP, Beaton L, Hogan JJ, Fagarasan S, Liston A, Smith KG, and Vinuesa CG, Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med*, 2011. 17(8): p. 975-82.
15. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, and Kim CH, Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 2005. 175(7): p. 4180-3.
16. Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, and Shevach EM, Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*, 2006. 107(10): p. 3925-32.
17. Smith JP, Burton GF, Tew JG, and Szakal AK, Tingible body macrophages in regulation of germinal center reactions. *Dev Immunol*, 1998. 6(3-4): p. 285-94.
18. Cheng F, Wang HW, Cuenca A, Huang M, Ghansah T, Brayer J, Kerr WG, Takeda K, Akira S, Schoenberger SP, Yu H, Jove R, and Sotomayor EM, A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity*, 2003. 19(3): p. 425-36.
19. Park CS and Choi YS, How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology*, 2005. 114(1): p. 2-10.
20. Krenacs T and Rosendaal M, Gap-junction communication pathways in germinal center reactions. *Dev Immunol*, 1998. 6(1-2): p. 111-8.
21. Oviedo-Orta E and Howard Evans W, Gap junctions and connexin-mediated communication in the immune system. *Biochim Biophys Acta*, 2004. 1662(1-2): p. 102-12.
22. Matsue H, Yao J, Matsue K, Nagasaka A, Sugiyama H, Aoki R, Kitamura M, and Shimada S, Gap junction-mediated intercellular communication between dendritic cells (DCs) is required for effective activation of DCs. *J Immunol*, 2006. 176(1): p. 181-90.

23. Cancelas JA, Koevoet WL, de Koning AE, Mayen AE, Rombouts EJ, and Ploemacher RE, Connexin-43 gap junctions are involved in multiconnexin-expressing stromal support of hemopoietic progenitors and stem cells. *Blood*, 2000. 96(2): p. 498-505.
24. Krenacs T, van Dartel M, Lindhout E, and Rosendaal M, Direct cell/cell communication in the lymphoid germinal center: connexin43 gap junctions functionally couple follicular dendritic cells to each other and to B lymphocytes. *Eur J Immunol*, 1997. 27(6): p. 1489-97.
25. Martin CA, Homaidan FR, Palaia T, Burakoff R, and el-Sabban ME, Gap junctional communication between murine macrophages and intestinal epithelial cell lines. *Cell Adhes Commun*, 1998. 5(6): p. 437-49.
26. Fonseca PC, Nihei OK, Urban-Maldonado M, Abreu S, de Carvalho AC, Spray DC, Savino W, and Alves LA, Characterization of connexin 30.3 and 43 in thymocytes. *Immunol Lett*, 2004. 94(1-2): p. 65-75.
27. Oviedo-Orta E, Hoy T, and Evans WH, Intercellular communication in the immune system: differential expression of connexin40 and 43, and perturbation of gap junction channel functions in peripheral blood and tonsil human lymphocyte subpopulations. *Immunology*, 2000. 99(4): p. 578-90.
28. Oviedo-Orta E, Gasque P, and Evans WH, Immunoglobulin and cytokine expression in mixed lymphocyte cultures is reduced by disruption of gap junction intercellular communication. *Faseb j*, 2001. 15(3): p. 768-74.
29. Krenacs T and Rosendaal M, Immunohistological detection of gap junctions in human lymphoid tissue: connexin43 in follicular dendritic and lymphoendothelial cells. *J Histochem Cytochem*, 1995. 43(11): p. 1125-37.
30. Loewenstein WR and Rose B, The cell-cell channel in the control of growth. *Semin Cell Biol*, 1992. 3(1): p. 59-79.
31. Machtaler S, Dang-Lawson M, Choi K, Jang C, Naus CC, and Matsuuchi L, The gap junction protein Cx43 regulates B-lymphocyte spreading and adhesion. *J Cell Sci*, 2011. 124(Pt 15): p. 2611-21.
32. Montecino-Rodriguez E, Leathers H, and Dorshkind K, Expression of connexin 43 (Cx43) is critical for normal hematopoiesis. *Blood*, 2000. 96(3): p. 917-24.

33. Oviedo-Orta E, Perreau M, Evans WH, and Potalicchio I, Control of the proliferation of activated CD4+ T cells by connexins. *J Leukoc Biol*, 2010. 88(1): p. 79-86.
34. Kuczma M, Lee JR, and Kraj P, Connexin 43 signaling enhances the generation of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol*, 2011. 187(1): p. 248-57.
35. Eugenin EA, Branes MC, Berman JW, and Saez JC, TNF-alpha plus IFN-gamma induce connexin43 expression and formation of gap junctions between human monocytes/macrophages that enhance physiological responses. *J Immunol*, 2003. 170(3): p. 1320-8.
36. Schneider T and Matolcsy A, Follicularis Lymphoma, in *Hematológiai betegségek atlasza*, A Matolcsy, M Udvardy, and L Kopper, Editors. 2006, Medicina Könyvkiadó RT.: Budapest, Hungary. p. 262-268.
37. Harris NL, Swerdlow SH, Jaffe ES, Ott G, Nathwani NB, De Jong D, Yoshino T, and Spagnolo D, Follicular Lymphoma, in *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*, SH Swerdlow, et al., Editors. 2008, International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon. p. 220-226.
38. Anderson JR, Armitage JO, and Weisenburger DD, Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. *Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. Ann Oncol*, 1998. 9(7): p. 717-20.
39. Leich E, Ott G, and Rosenwald A, Pathology, pathogenesis and molecular genetics of follicular NHL. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2011. 24(2): p. 95-109.
40. Shaffer AL, Rosenwald A, and Staudt LM, Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(12): p. 920-32.
41. Klein U and Dalla-Favera R, Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol.*, 2008. 8(1): p. 22-33.
42. Leonard RC, Hayward RL, Prescott RJ, and Wang JX, The identification of discrete prognostic groups in low grade non-Hodgkin's lymphoma. The Scotland and Newcastle Lymphoma Group Therapy Working Party. *Ann Oncol*, 1991. 2(9): p. 655-62.

43. Decaudin D, Lepage E, Brousse N, Brice P, Harousseau JL, Belhadj K, Tilly H, Michaux L, Cheze S, Coiffier B, and Solal-Celigny P, Low-grade stage III-IV follicular lymphoma: multivariate analysis of prognostic factors in 484 patients--a study of the groupe d'Etude des lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol*, 1999. 17(8): p. 2499-505.
44. Federico M, Vitolo U, Zinzani PL, Chisesi T, Clo V, Bellei G, Magagnoli M, Liberati M, Boccomini C, Niscola P, Pavone V, Cuneo A, Santini G, Brugiattelli M, Baldini L, Rigacci L, and Resegotti L, Prognosis of follicular lymphoma: a predictive model based on a retrospective analysis of 987 cases. *Intergruppo Italiano Linfomi. Blood*, 2000. 95(3): p. 783-9.
45. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, Au WY, Bellei M, Brice P, Caballero D, Coiffier B, Conde-Garcia E, Doyen C, Federico M, Fisher RI, Garcia-Conde JF, Guglielmi C, Hagenbeek A, Haioun C, LeBlanc M, Lister AT, Lopez-Guillermo A, McLaughlin P, Milpied N, Morel P, Mounier N, Proctor SJ, Rohatiner A, Smith P, Soubeyran P, Tilly H, Vitolo U, Zinzani PL, Zucca E, and Montserrat E, Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood*, 2004. 104(5): p. 1258-65.
46. Federico M, Guglielmi C, Luminari S, Mammi C, Marcheselli L, Gianelli U, Maiorana A, Merli F, Bellei M, Pozzi S, Stelitano C, Lazzaro A, Gobbi PG, Baldini L, Bergantini S, Fregoni V, and Brugiattelli M, Prognostic relevance of serum beta2 microglobulin in patients with follicular lymphoma treated with anthracycline-containing regimens. A GISL study. *Haematologica*, 2007. 92(11): p. 1482-8.
47. Federico M, Bellei M, Marcheselli L, Luminari S, Lopez-Guillermo A, Vitolo U, Pro B, Pileri S, Pulsoni A, Soubeyran P, Cortelazzo S, Martinelli G, Martelli M, Rigacci L, Arcaini L, Di Raimondo F, Merli F, Sabbatini E, McLaughlin P, and Solal-Celigny P, Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. *J Clin Oncol*, 2009. 27(27): p. 4555-62.
48. Smithers DW, Summary of papers delivered at the Conference on Staging in Hodgkin's Disease (Ann Arbor). *Cancer Res*, 1971. 31(11): p. 1869-70.

49. Ultmann JE and Moran EM, Diagnostic evaluation and clinical staging in Hodgkin's disease: usefulness and problems of the Ann Arbor staging classification in primary staging and staging in relapse. *Natl Cancer Inst Monogr*, 1973. 36: p. 333-45.
50. Johnson PW, Rohatiner AZ, Whelan JS, Price CG, Love S, Lim J, Matthews J, Norton AJ, Amess JA, and Lister TA, Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. *J Clin Oncol*, 1995. 13(1): p. 140-7.
51. Ardeschna KM, Smith P, Norton A, Hancock BW, Hoskin PJ, MacLennan KA, Marcus RE, Jelliffe A, Vaughan G, Hudson, and Linch DC, Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2003. 362(9383): p. 516-22.
52. Guadagnolo BA, Li S, Neuberg D, Ng A, Hua L, Silver B, Stevenson MA, and Mauch P, Long-term outcome and mortality trends in early-stage, Grade 1-2 follicular lymphoma treated with radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006. 64(3): p. 928-34.
53. Fisher RI, LeBlanc M, Press OW, Maloney DG, Unger JM, and Miller TP, New treatment options have changed the survival of patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*, 2005. 23(33): p. 8447-52.
54. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, Schmitz N, Lengfelder E, Schmits R, Reiser M, Metzner B, Harder H, Hegewisch-Becker S, Fischer T, Kropff M, Reis HE, Freund M, Wormann B, Fuchs R, Planker M, Schimke J, Eimermacher H, Trumper L, Aldaoud A, Parwaresch R, and Unterhalt M, Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*, 2005. 106(12): p. 3725-32.
55. Marcus R, Imrie K, Belch A, Cunningham D, Flores E, Catalano J, Solal-Celigny P, Offner F, Walewski J, Raposo J, Jack A, and Smith P, CVP

- chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood*, 2005. 105(4): p. 1417-23.
56. Martinelli G, Schmitz SF, Utiger U, Cerny T, Hess U, Bassi S, Okkinga E, Stupp R, Stahel R, Heizmann M, Vorobiof D, Lohri A, Dietrich PY, Zucca E, and Ghielmini M, Long-term follow-up of patients with follicular lymphoma receiving single-agent rituximab at two different schedules in trial SAKK 35/98. *J Clin Oncol*, 2010. 28(29): p. 4480-4.
 57. Cheson BD, Radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphomas. *Curr Drug Targets*, 2006. 7(10): p. 1293-300.
 58. Rohatiner AZ, Nadler L, Davies AJ, Apostolidis J, Neuberg D, Matthews J, Gribben JG, Mauch PM, Lister TA, and Freedman AS, Myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma at the time of second or subsequent remission: long-term follow-up. *J Clin Oncol*, 2007. 25(18): p. 2554-9.
 59. Leonard JP, Friedberg JW, Younes A, Fisher D, Gordon LI, Moore J, Czuczman M, Miller T, Stiff P, Cheson BD, Forero-Torres A, Chieffo N, McKinney B, Finucane D, and Molina A, A phase I/II study of galiximab (an anti-CD80 monoclonal antibody) in combination with rituximab for relapsed or refractory, follicular lymphoma. *Ann Oncol*, 2007. 18(7): p. 1216-23.
 60. Leonard JP, Schuster SJ, Emmanouilides C, Couture F, Teoh N, Wegener WA, Coleman M, and Goldenberg DM, Durable complete responses from therapy with combined epratuzumab and rituximab: final results from an international multicenter, phase 2 study in recurrent, indolent, non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*, 2008. 113(10): p. 2714-23.
 61. Freedman A, Neelapu SS, Nichols C, Robertson MJ, Djulbegovic B, Winter JN, Bender JF, Gold DP, Ghalie RG, Stewart ME, Esquibel V, and Hamlin P, Placebo-controlled phase III trial of patient-specific immunotherapy with mitumprotimut-T and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*, 2009. 27(18): p. 3036-43.
 62. Friedberg JW, Neuberg D, Gribben JG, Fisher DC, Canning C, Koval M, Poor CM, Green LM, Daley J, Soiffer R, Ritz J, and Freedman AS, Combination

- immunotherapy with rituximab and interleukin 2 in patients with relapsed or refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*, 2002. 117(4): p. 828-34.
63. Freedman A, Follicular lymphoma: 2012 update on diagnosis and management. *Am J Hematol*, 2012. 87(10): p. 988-95.
 64. McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, Liu Y, Graves AP, Della Pietra A, 3rd, Diaz E, LaFrance LV, Mellinger M, Duquenne C, Tian X, Kruger RG, McHugh CF, Brandt M, Miller WH, Dhanak D, Verma SK, Tummino PJ, and Creasy CL, EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature*, 2012. 492(7427): p. 108-12.
 65. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, and Croce CM, Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.*, 1985. 228(4706): p. 1440-3.
 66. Cleary ML and Sklar J, Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1985. 82(21): p. 7439-43.
 67. McDonnell TJ and Korsmeyer SJ, Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature*, 1991. 349(6306): p. 254-6.
 68. Meijerink JP, t(14;18), a journey to eternity. *Leukemia*, 1997. 11(12): p. 2175-87.
 69. Zinkel S, Gross A, and Yang E, BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ*, 2006. 13(8): p. 1351-9.
 70. Limpens J, Stad R, Vos C, de Vlaam C, de Jong D, van Ommen GJ, Schuurin E, and Kluin PM, Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood*, 1995. 85(9): p. 2528-36.
 71. Johnson NA, Al-Tourah A, Brown CJ, Connors JM, Gascoyne RD, and Horsman DE, Prognostic significance of secondary cytogenetic alterations in follicular lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008. 47(12): p. 1038-48.
 72. Cheung KJ, Johnson NA, Affleck JG, Severson T, Steidl C, Ben-Neriah S, Schein J, Morin RD, Moore R, Shah SP, Qian H, Paul JE, Telenius A, Relander

- T, Lam W, Savage K, Connors JM, Brown C, Marra MA, Gascoyne RD, and Horsman DE, Acquired TNFRSF14 mutations in follicular lymphoma are associated with worse prognosis. *Cancer Res*, 2010. 70(22): p. 9166-74.
73. Launay E, Pangault C, Bertrand P, Jardin F, Lamy T, Tilly H, Tarte K, Bastard C, and Fest T, High rate of TNFRSF14 gene alterations related to 1p36 region in de novo follicular lymphoma and impact on prognosis. *Leukemia*, 2012. 26(3): p. 559-62.
74. Oricchio E, Nanjangud G, Wolfe AL, Schatz JH, Mavrakis KJ, Jiang M, Liu X, Bruno J, Heguy A, Olshen AB, Socci ND, Teruya-Feldstein J, Weis-Garcia F, Tam W, Shaknovich R, Melnick A, Himanen JP, Chaganti RS, and Wendel HG, The Eph-receptor A7 is a soluble tumor suppressor for follicular lymphoma. *Cell*, 2011. 147(3): p. 554-64.
75. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, Johnson NA, Severson TM, Chiu R, Field M, Jackman S, Krzywinski M, Scott DW, Trinh DL, Tamura-Wells J, Li S, Firme MR, Rogic S, Griffith M, Chan S, Yakovenko O, Meyer IM, Zhao EY, Smailus D, Moksa M, Chittaranjan S, Rimsza L, Brooks-Wilson A, Spinelli JJ, Ben-Neriah S, Meissner B, Woolcock B, Boyle M, McDonald H, Tam A, Zhao Y, Delaney A, Zeng T, Tse K, Butterfield Y, Birol I, Holt R, Schein J, Horsman DE, Moore R, Jones SJ, Connors JM, Hirst M, Gascoyne RD, and Marra MA, Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*, 2011. 476(7360): p. 298-303.
76. Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, Fabbri G, Grunn A, Trifonov V, Kasper LH, Lerach S, Tang H, Ma J, Rossi D, Chadburn A, Murty VV, Mullighan CG, Gaidano G, Rabadan R, Brindle PK, and Dalla-Favera R, Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature*, 2011. 471(7337): p. 189-95.
77. Bodor C, O'Riain C, Wrench D, Matthews J, Iyengar S, Tayyib H, Calaminici M, Clear A, Iqbal S, Quentmeier H, Drexler HG, Montoto S, Lister AT, Gribben JG, Matolcsy A, and Fitzgibbon J, EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma. *Leukemia*, 2011. 25(4): p. 726-9.

78. Ryan RJ, Nitta M, Borger D, Zukerberg LR, Ferry JA, Harris NL, Iafrate AJ, Bernstein BE, Sohani AR, and Le LP, EZH2 codon 641 mutations are common in BCL2-rearranged germinal center B cell lymphomas. *PLoS One*, 2011. 6(12): p. e28585.
79. Bodor C, Grossmann V, Popov N, Okosun J, O'Riain C, Tan K, Marzec J, Araf S, Wang J, Lee AM, Clear A, Montoto S, Matthews J, Iqbal S, Rajnai H, Rosenwald A, Ott G, Campo E, Rimsza LM, Smeland EB, Chan WC, Braziel RM, Staudt LM, Wright G, Lister TA, Elemento O, Hills R, Gribben JG, Chelala C, Matolcsy A, Kohlmann A, Haferlach T, Gascoyne RD, and Fitzgibbon J, EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. *Blood*, 2013. 122(18): p. 3165-8.
80. Bennett JM, Cain KC, Glick JH, Johnson GJ, Ezdinli E, and O'Connell MJ, The significance of bone marrow involvement in non-Hodgkin's lymphoma: the Eastern Cooperative Oncology Group experience. *J Clin Oncol*, 1986. 4(10): p. 1462-9.
81. Rambaldi A, Carlotti E, Oldani E, Della Starza I, Baccarani M, Cortelazzo S, Lauria F, Arcaini L, Morra E, Pulsoni A, Rigacci L, Rupolo M, Zaja F, Zinzani PL, Barbui T, and Foa R, Quantitative PCR of bone marrow BCL2/IgH+ cells at diagnosis predicts treatment response and long-term outcome in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2005. 105(9): p. 3428-33.
82. Romaguera JE, McLaughlin P, North L, Dixon D, Silvermintz KB, Garnsey LA, Velasquez WS, Hagemester FB, and Cabanillas F, Multivariate analysis of prognostic factors in stage IV follicular low-grade lymphoma: a risk model. *J Clin Oncol*, 1991. 9(5): p. 762-9.
83. Bogнар A, Csernus B, Bodor C, Reiniger L, Szepesi A, Toth E, Kopper L, and Matolcsy A, Clonal selection in the bone marrow involvement of follicular lymphoma. *Leukemia*, 2005. 19(9): p. 1656-62.
84. Nakamura Y, Sato Y, Yoshida K, Kakegawa E, Ito Y, Seyama A, Kayano H, and Bessho M, A molecular analysis of biclonal follicular lymphoma: further evidence for bone marrow origin and clonal selection. *Eur J Haematol*, 2009. 82(5): p. 398-403.

85. Kinashi T and Springer TA, Adhesion molecules in hematopoietic cells. *Blood Cells*, 1994. 20(1): p. 25-44.
86. Caneva L, Soligo D, Cattoretti G, De Harven E, and Deliliers GL, Immunoelectron microscopy characterization of human bone marrow stromal cells with anti-NGFR antibodies. *Blood Cells Mol Dis*, 1995. 21(2): p. 73-85.
87. Wilkins BS and Jones DB, Immunohistochemical characterization of intact stromal layers in long-term cultures of human bone marrow. *Br J Haematol*, 1995. 90(4): p. 757-66.
88. Thompson SJ, Schatteman GC, Gown AM, and Bothwell M, A monoclonal antibody against nerve growth factor receptor. Immunohistochemical analysis of normal and neoplastic human tissue. *Am J Clin Pathol*, 1989. 92(4): p. 415-23.
89. Labouyrie E, Dubus P, Groppi A, Mahon FX, Ferrer J, Parrens M, Reiffers J, de Mascarel A, and Merlio JP, Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am J Pathol*, 1999. 154(2): p. 405-15.
90. Vega F, Medeiros LJ, Lang WH, Mansoor A, Bueso-Ramos C, and Jones D, The stromal composition of malignant lymphoid aggregates in bone marrow: variations in architecture and phenotype in different B-cell tumours. *Br J Haematol*, 2002. 117(3): p. 569-76.
91. Tweeddale ME, Lim B, Jamal N, Robinson J, Zalcborg J, Lockwood G, Minden MD, and Messner HA, The presence of clonogenic cells in high-grade malignant lymphoma: a prognostic factor. *Blood*, 1987. 69(5): p. 1307-14.
92. Ford RJ, Kouttab NM, Sahasrabudhe CG, Davis FM, and Mehta SR, Growth factor-mediated proliferation in B cell non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*, 1985. 65(6): p. 1335-41.
93. Umetsu DT, Esserman L, Donlon TA, DeKruyff RH, and Levy R, Induction of proliferation of human follicular (B type) lymphoma cells by cognate interaction with CD4+ T cell clones. *J Immunol*, 1990. 144(7): p. 2550-7.
94. Johnson PW, Watt SM, Betts DR, Davies D, Jordan S, Norton AJ, and Lister TA, Isolated follicular lymphoma cells are resistant to apoptosis and can be grown in vitro in the CD40/stromal cell system. *Blood*, 1993. 82(6): p. 1848-57.
95. Eray M, Postila V, Eeva J, Ripatti A, Karjalainen-Lindsberg ML, Knuutila S, Andersson LC, and Pelkonen J, Follicular lymphoma cell lines, an in vitro

- model for antigenic selection and cytokine-mediated growth regulation of germinal centre B cells. *Scand J Immunol*, 2003. 57(6): p. 545-55.
96. Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, Fisher RI, Braziel RM, Rimsza LM, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Greiner TC, Weisenburger DD, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Connors JM, Lansdorp PM, Ouyang Q, Lister TA, Davies AJ, Norton AJ, Muller-Hermelink HK, Ott G, Campo E, Montserrat E, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Yang L, Powell J, Zhao H, Goldschmidt N, Chiorazzi M, and Staudt LM, Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*, 2004. 351(21): p. 2159-69.
 97. Wahlin BE, Aggarwal M, Montes-Moreno S, Gonzalez LF, Roncador G, Sanchez-Verde L, Christensson B, Sander B, and Kimby E, A unifying microenvironment model in follicular lymphoma: outcome is predicted by programmed death-1--positive, regulatory, cytotoxic, and helper T cells and macrophages. *Clin Cancer Res*, 2010. 16(2): p. 637-50.
 98. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, Lopez C, Jaen J, Bosch R, and Pons LE, Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol*, 2006. 24(34): p. 5350-7.
 99. Wahlin BE, Sander B, Christensson B, and Kimby E, CD8+ T-cell content in diagnostic lymph nodes measured by flow cytometry is a predictor of survival in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(2 Pt 1): p. 388-97.
 100. Lee AM, Clear AJ, Calaminici M, Davies AJ, Jordan S, MacDougall F, Matthews J, Norton AJ, Gribben JG, Lister TA, and Goff LK, Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3-positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. *J Clin Oncol*, 2006. 24(31): p. 5052-9.
 101. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, and Dirnhofer S, Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma,

- follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, 2008. 93(2): p. 193-200.
102. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Roncador G, Villamor N, Colomo L, Martinez A, Hamoudi R, Howat WJ, Montserrat E, and Campo E, High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*, 2009. 27(9): p. 1470-6.
103. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, Montserrat E, Campo E, and Banham AH, High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*, 2006. 108(9): p. 2957-64.
104. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, Shumansky K, Spinelli JJ, Gill K, Klasa R, Voss N, Connors JM, and Gascoyne RD, Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood*, 2005. 106(6): p. 2169-74.
105. Alvaro T, Lejeune M, Camacho FI, Salvado MT, Sanchez L, Garcia JF, Lopez C, Jaen J, Bosch R, Pons LE, Bellas C, and Piris MA, The presence of STAT1-positive tumor-associated macrophages and their relation to outcome in patients with follicular lymphoma. *Haematologica*, 2006. 91(12): p. 1605-12.
106. Shiozawa E, Yamochi-Onizuka T, Yamochi T, Yamamoto Y, Naitoh H, Kawakami K, Nakamaki T, Tomoyasu S, Kushima M, and Ota H, Disappearance of CD21-positive follicular dendritic cells preceding the transformation of follicular lymphoma: immunohistological study of the transformation using CD21, p53, Ki-67, and P-glycoprotein. *Pathol Res Pract*, 2003. 199(5): p. 293-302.
107. Yang ZZ, Grote DM, Ziesmer SC, Niki T, Hirashima M, Novak AJ, Witzig TE, and Ansell SM, IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest*, 2012. 122(4): p. 1271-82.

108. Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, and Ansell SM, Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2006. 107(9): p. 3639-46.
109. Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, and Ansell SM, Attenuation of CD8(+) T-cell function by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res*, 2006. 66(20): p. 10145-52.
110. Ame-Thomas P and Tarte K, The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: Role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Semin Cancer Biol*, 2013.
111. Ghia P, Granziero L, Chilosi M, and Caligaris-Cappio F, Chronic B cell malignancies and bone marrow microenvironment. *Semin Cancer Biol.*, 2002. 12(2): p. 149-55.
112. Petrasch S, Kosco M, Perez-Alvarez C, Schmitz J, and Brittinger G, Proliferation of non-Hodgkin-lymphoma lymphocytes in vitro is dependent upon follicular dendritic cell interactions. *Br J Haematol.*, 1992. 80(1): p. 21-6.
113. Choe J, Li L, Zhang X, Gregory CD, and Choi YS, Distinct role of follicular dendritic cells and T cells in the proliferation, differentiation, and apoptosis of a centroblast cell line, L3055. *J Immunol.*, 2000. 164(1): p. 56-63.
114. Ame-Thomas P, Maby-El Hajjami H, Monvoisin C, Jean R, Monnier D, Caulet-Maugendre S, Guillaudeux T, Lamy T, Fest T, and Tarte K, Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood*, 2007. 109(2): p. 693-702.
115. Bogнар A, Csernus B, Bodor C, Reiniger L, Szepesi A, Toth E, Kopper L, and Matolcsy A, Clonal selection in the bone marrow involvement of follicular lymphoma. *Leukemia.*, 2005. 19(9): p. 1656-62.
116. Maby-El Hajjami H, Ame-Thomas P, Pangault C, Tribut O, DeVos J, Jean R, Bescher N, Monvoisin C, Dulong J, Lamy T, Fest T, and Tarte K, Functional alteration of the lymphoma stromal cell niche by the cytokine context: role of indoleamine-2,3 dioxygenase. *Cancer Res*, 2009. 69(7): p. 3228-37.

117. Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, and Shevach EM, Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood.*, 2006. 107(10): p. 3925-32. .
118. Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, and Mackay CR, Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(11): p. 853-65.
119. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, and Kim CH, Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.*, 2005. 175(7): p. 4180-3.
120. Lim HW, Hillsamer P, Kim CH, and . Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. *J Clin Invest*, 2004. 114(11): p. 1640-9.
121. Nakamura Y, Sato Y, Yoshida K, Kakegawa E, Ito Y, Seyama A, Kayano H, and Bessho M, A molecular analysis of biclonal follicular lymphoma: further evidence for bone marrow origin and clonal selection. *Eur J Haematol.*, 2009. 82(5): p. 398-403.
122. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, Lopez C, Jaen J, Bosch R, and Pons LE, Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol.*, 2006. 24(34): p. 5350-7.
123. Flaishon L, Lantner F, HersHKoviz R, Levo Y, and Shachar I, Low levels of IFN-gamma down-regulate the integrin-dependent adhesion of B cells by activating a pathway that interferes with cytoskeleton rearrangement. *J Biol Chem*, 2001. 276(50): p. 46701-6.
124. de Jong D, Koster A, Hagenbeek A, Raemaekers J, Veldhuizen D, Heisterkamp S, de Boer JP, and van Glabbeke M, Impact of the tumor microenvironment on prognosis in follicular lymphoma is dependent on specific treatment protocols. *Haematologica*, 2009. 94(1): p. 70-7.
125. Canioni D, Salles G, Mounier N, Brousse N, Keuppens M, Morchhauser F, Lamy T, Sonet A, Rousselet MC, Foussard C, and Xerri L, High numbers of tumor-associated macrophages have an adverse prognostic value that can be

- circumvented by rituximab in patients with follicular lymphoma enrolled onto the GELA-GOELAMS FL-2000 trial. *J Clin Oncol*, 2008. 26(3): p. 440-6.
126. Taskinen M, Karjalainen-Lindsberg ML, Nyman H, Eerola LM, and Leppa S, A high tumor-associated macrophage content predicts favorable outcome in follicular lymphoma patients treated with rituximab and cyclophosphamide-doxorubicin-vincristine-prednisone. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(19): p. 5784-9.
127. Minard-Colin V, Xiu Y, Poe JC, Horikawa M, Magro CM, Hamaguchi Y, Haas KM, and Tedder TF, Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV. *Blood*, 2008. 112(4): p. 1205-13.
128. Weiss JM, Ridnour LA, Back T, Hussain SP, He P, Maciag AE, Keefer LK, Murphy WJ, Harris CC, Wink DA, and Wiltrott RH, Macrophage-dependent nitric oxide expression regulates tumor cell detachment and metastasis after IL-2/anti-CD40 immunotherapy. *J Exp Med*, 2010. 207(11): p. 2455-67.
129. Ridnour LA, Windhausen AN, Isenberg JS, Yeung N, Thomas DD, Vitek MP, Roberts DD, and Wink DA, Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(43): p. 16898-903.
130. Farinha P, Al-Tourah A, Gill K, Klasa R, Connors JM, and Gascoyne RD, The architectural pattern of FOXP3-positive T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. *Blood*, 2010. 115(2): p. 289-95.
131. Ramsay AG, Clear AJ, Kelly G, Fatah R, Matthews J, Macdougall F, Lister TA, Lee AM, Calaminici M, and Gribben JG, Follicular lymphoma cells induce T-cell immunologic synapse dysfunction that can be repaired with lenalidomide: implications for the tumor microenvironment and immunotherapy. *Blood*, 2009. 114(21): p. 4713-20.
132. Lopez-Giral S, Quintana NE, Cabrerizo M, Alfonso-Perez M, Sala-Valdes M, De Soria VG, Fernandez-Ranada JM, Fernandez-Ruiz E, and Munoz C, Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin

- lymphomas with widespread nodular dissemination. *J Leukoc Biol*, 2004. 76(2): p. 462-71.
133. Chang KC, Huang X, Medeiros LJ, and Jones D, Germinal centre-like versus undifferentiated stromal immunophenotypes in follicular lymphoma. *J Pathol*, 2003. 201(3): p. 404-12.
 134. Jin MK, Hoster E, Dreyling M, Unterhalt M, Hiddemann W, and Klapper W, Follicular dendritic cells in follicular lymphoma and types of non-Hodgkin lymphoma show reduced expression of CD23, CD35 and CD54 but no association with clinical outcome. *Histopathology*, 2011. 58(4): p. 586-92.
 135. Cui W, Che L, Sato Y, Huang X, Takata K, Orita Y, Goto N, Maeda Y, Tanimoto M, and Yoshino T, Nodal follicular lymphoma without complete follicular dendritic cell networks is related to localized clinical stage. *Pathol Int*, 2011. 61(12): p. 737-41.
 136. Mraz M, Zent CS, Church AK, Jelinek DF, Wu X, Pospisilova S, Ansell SM, Novak AJ, Kay NE, Witzig TE, and Nowakowski GS, Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin alpha-4-beta-1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br J Haematol*, 2011. 155(1): p. 53-64.
 137. Hu Y, Gale M, Shields J, Garron C, Swistak M, Nguyen TH, Jacques G, Fogle R, Siders W, and Kaplan J, Enhancement of the anti-tumor activity of therapeutic monoclonal antibodies by CXCR4 antagonists. *Leuk Lymphoma*, 2012. 53(1): p. 130-8.
 138. Neijssen J, Pang B, and Neefjes J, Gap junction-mediated intercellular communication in the immune system. *Prog Biophys Mol Biol*, 2007. 94(1-2): p. 207-18.
 139. Montecino-Rodriguez E and Dorshkind K, Regulation of hematopoiesis by gap junction-mediated intercellular communication. *J Leukoc Biol*, 2001. 70(3): p. 341-7.
 140. Rosendaal M and Krenacs TT, Regulatory pathways in blood-forming tissue with particular reference to gap junctional communication. *Pathol Oncol Res*, 2000. 6(4): p. 243-9.

141. Lin KB, Freeman SA, Zabetian S, Brugger H, Weber M, Lei V, Dang-Lawson M, Tse KW, Santamaria R, Batista FD, and Gold MR, The rap GTPases regulate B cell morphology, immune-synapse formation, and signaling by particulate B cell receptor ligands. *Immunity*, 2008. 28(1): p. 75-87.
142. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, Zvaifler NJ, and Kipps TJ, Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood*, 2005. 106(3): p. 1012-20.
143. Schattner EJ, Mascarenhas J, Reyfman I, Koshy M, Woo C, Friedman SM, and Crow MK, Chronic lymphocytic leukemia B cells can express CD40 ligand and demonstrate T-cell type costimulatory capacity. *Blood*, 1998. 91(8): p. 2689-97.
144. Balogh Z, Reiniger L, Rajnai H, Csomor J, Szepesi A, Balogh A, Deak L, Gagy E, Bodor C, and Matolcsy A, High rate of neoplastic cells with genetic abnormalities in proliferation centers of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2011. 52(6): p. 1080-4.
145. Monti S, Savage KJ, Kutok JL, Feuerhake F, Kurtin P, Mihm M, Wu B, Pasqualucci L, Neuberg D, Aguiar RC, Dal Cin P, Ladd C, Pinkus GS, Salles G, Harris NL, Dalla-Favera R, Habermann TM, Aster JC, Golub TR, and Shipp MA, Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood*, 2005. 105(5): p. 1851-61.
146. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Jr., Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, and Staudt LM, Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 2000. 403(6769): p. 503-11.
147. Staudt LM and Dave S, The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol*, 2005. 87: p. 163-208.
148. Rajnai H, Heyning FH, Koens L, Sebestyen A, Andrikovics H, Hogendoorn PC, Matolcsy A, and Szepesi A, The density of CD8+ T-cell infiltration and

expression of BCL2 predicts outcome of primary diffuse large B-cell lymphoma of bone. *Virchows Arch*, 2013.

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1 Az értekezés témájában megjelent közlemények

Rajnai H, Bodor C, Balogh Z, Gagy E, Csomor J, Krenacs T, Toth E, Matolcsy A
Impact of the reactive microenvironment on the bone marrow involvement of follicular
lymphoma. *Histopathology* 60:(6B) pp. E66-E75. (2012)

IF: 2.857

Balogh Z, Reiniger L, Rajnai H, Csomor J, Szepesi A, Balogh A, Deak L, Gagy E,
Bodor C, Matolcsy A. High rate of neoplastic cells with genetic abnormalities in
proliferation centers of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia and lymphoma* 52:(6)
pp. 1080-1084. (2011)

IF: 2.580

Rajnai H, Heyning FH, Koens L, Sebestyén A, Andrikovics H, Hogendoorn PCW,
Matolcsy A, Szepesi A. The Density of CD8+ T-Cell Infiltration And Expression of
BCL2 Predicts Outcome Of Primary Diffuse Large B-Cell Lymphoma Of Bone.
Virchows Archive DOI 10.1007/s00428-013-1519-9

IF: 2.676

11.2 Egyéb témában megjelent közlemények

Bodor C, Grossmann V, Popov N, Okosun J, O'Riain C, Tan K, Marzec J, Araf S, Wang
J, Lee AM, Montono S, Matthews J, Iqbal S, Rajnai H, Rosenwald A, Ott G, Campo E,
Rimsza LM, Smeland EB, Chan WC, Braziel RM, Staudt LM, Wright G, Lister TA,
Elemento O, Hills R, Gribben J, Chelala C, Matolcsy A, Kohlmann A, Haferlach T
Gascoyne RD, Fitzgibbon J. EZH2 mutations are frequent and represent an early event
in follicular lymphoma. *Blood* 122:(18) pp. 3165-3168. (2013)

IF: 9.060

Szepesi Agota, Csomor Judit, Rajnai Hajnalka, Eros Nora, Wikonkal Norbert, Karpati Sarolta, Matolcsy Andras, Marschalko Marta. Primary cutaneous aggressive epidermotropic CD8+T-cell lymphoma: report of two cases with no evidence of systemic disease. *European journal of dermatology* 22:(5) pp. 690-691. (2012)

IF: 1.756

Balla P, Moskovszky L, Sapi Z, Forsyth R, Knowles H, Athanasou N, Szendroi M, Kopper L, Rajnai H, Pinter F, Petak I, Benassi MS, Picci P, Conti A, Krenacs T. Epidermal growth factor receptor signalling contributes to osteoblastic stromal cell proliferation, osteoclastogenesis and disease progression in giant cell tumour of bone *Histopathology* 59:(3) pp. 376-389. (2011)

IF: 3.082

Bödör Cs, Rajnai H, Tímár B, Csomor J, Matolcsy A. BCR-ABL mRNS expressziós szintek valós idejű kvantitatív PCR-rel történő követése krónikus myeloid leukaemiás betegek esetében. *Hematológia-Transzfuziológia* 40: pp. 7-14. (2007)

IF: -

Bodor C, Schmidt O, Csernus B, Rajnai H, Szende B. DNA and RNA isolated from tissues processed by microwave-accelerated apparatus MFX-800-3 are suitable for subsequent PCR and Q-RT-PCR amplification. *Pathology And Oncology Research* 13:(2) pp. 149-152. (2007)

IF: 1.272

Rajnai H, Bödör C, Reiniger L, Tímár B, Csernus B, Szepesi Á, Csomor J, Matolcsy A. Új lehetőség a krónikus myeloproliferatív betegségek diagnosztikájában: a JAK2 mutáció kimutatása. *Orvosi hetilap* 147:(45) pp. 2175-2179. (2006)

IF: -

12. Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt köszönettel tartozom szüleimnek, hogy lehetővé tették tanulmányaimat, testvéreimnek és tágabb családomnak, hogy mindig szerető környezetet biztosítottak nekem.

Köszönöm Matolcsy András Professzor Úrnak és Dr. Kopper László Professzor Úrnak, hogy intézetükben végezhettem a PhD tanulmányaimat.

Köszönöm Dr. Matolcsy András Professzor Úrnak, témavezetőmnek, hogy a laborjában dolgozhattam és hogy szakmai tanácsaival ellátott, munkámat mindvégig segítette.

Köszönettel tartozom Dr. Csomor Juditnak, Dr. Szepesi Ágotának, és Dr. Krenács Tibornak, hogy gyakran fordulhattam hozzájuk a szakmai segítségért.

Köszönettel tartozom Szilágyi Ilonának, Laczik Cecíliának és Tegzes Erzsébetnek, hogy bármikor segítségért fordulhattam hozzájuk.

Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak és barátaimnak Dr. Bödör Csabának, Dr. Reiniger Lillának, Dr. Szurián Kingának, Dr. Balogh Zsófiának, Dr. Gagyi Évának és Dr. Timár Botondnak az együtt eltöltött munka- és szabadidőért és az önzetlen szakmai segítségért.

Köszönöm Bárányné Pallag Adriennének, Parsch Editnek, Budai Bernadettnek és Deák Lindának a labormunkában nyújtott segítséget.

Köszönöm, hogy segítettek a baráti és vidám hangulat megteremtésében a házonbelül és azon kívül is: Dr. Teleki Ivett, Dr. Mózes Réka, Dr. Pócza Péter, Dr. Székely Tamás, Dr. Csernus Balázs, Dr. Fónyad László, Dr. Baghy Kornélia, Dr. Micsik Tamás, Dr. Király Péter, Dr. Barna Gábor.

Köszönöm az I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet minden munkatársának.