

Az immunfenotípus és prognosztikus markerek szerepének vizsgálata krónikus lymphocytás leukémia progressziójában

Doktori tézisek

Tolnai-Kriston Csilla

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető:

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

Hivatalos bírálók:

Dr. Jáksó Pál, Ph.D., biológus

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

Szigorlati bizottság elnöke:

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

Szigorlati bizottság tagjai:

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

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

Budapest

2019

1. Bevezetés

A krónikus lymphocytás leukémia (CLL) a leggyakoribb felnőttkori leukémia-típus a nyugati országokban. A WHO osztályozása alapján az érett B-sejtes non-Hodgkin-lymphomák csoportjába tartozik. A CLL mérsékelt malignitású, indolens lefolyású megbetegedés, mely a csontvelőben alakul ki és leukémiás vérképpel jár. A betegség előrehaladtával pedig a nyirokesomókat és más lymphoid szöveteket is érintheti.

A CLL heterogén megbetegedés, mely **rendkívül változatos klinikai lefolyással rendelkezik**. A CLL-es esetek körülbelül egyharmada évekig nem igényel terápiát, a túlélés akár több évtized is lehet, míg az agresszívebb kórlefolyást mutató betegek a kezeléseik ellenére is csak néhány hónapos túlélést mutatnak. Az esetek 5-30%-ánál a CLL malignus non-Hodgkin-lymphomává transzformálódik. Leggyakrabban diffúz nagy B-sejtes lymphomává (ezt nevezzük Richter-szindrómának) vagy prolymphocytás leukémiává alakul át, ritkábban Hodgkin-lymphomává. A CLL transzformációja agresszívebb kórlefolyással és rövidebb túléléssel társul.

Számos prognosztikus tényező segíti a betegség lefolyásának megítélését. A Rai- és Binet-féle klinikai stádiumbesorolás mellett számos újabb molekuláris markert alkalmaznak. Egy ideális **prognosztikus marker** nemcsak az agresszívebb kórlefolyást jelzi, hanem a betegség patogeneziséhez is hozzájárul, így **terápiás célpontként szolgálhat**. Ezért újabb prognosztikus markerek kutatása kulcsfontosságú a CLL esetében is.

A CLL-es betegek közel 80%-ában mutatható ki valamilyen kromoszóma-aberráció, melyek közül több prognosztikus szereppel is bír. A leggyakoribb eltérések a FISH vizsgálattal kimutatható 13q, 11q, 17p és 6q deléció, valamint a **12-es triszómia** (12tri). A 12tri a közepes rizikócsoporthoz tartozik. A közepes prognózis ellenére azonban számos közlemény szerint a 12tri **korai progresszióval és nagyon agresszív klinikai képpel társul**. A 12tri-ban nagyobb a Richter-transzformáció és másodlagos tumorok incidenciája is, összehasonlítva a 12tri-t nem hordozó esetekkel.

A prognosztikus markerek áramlási citometriás vizsgálata gyors, könnyen alkalmazható, megbízható, valamint kiválóan használható követéses vizsgálatoknál. Kapuzással alpopulációk határozhatók meg, így az agresszívebb sejtcsoport is nyomon követhető. CLL-ben a ZAP-70, CD23, CD38 és CD49d prognosztikus markereket detektáljuk áramlási citométerrel.

A CLL-sejtek egyik jellegzetessége az emelkedett CD23 expresszió. A CD23 (FcεRII) az alacsony affinitású IgE receptor. A **CD23 antigénnek két izoformája van, a CD23a és CD23b**, melyek csak az N-terminális intracitoplazmatikus doménben térnek el. A CD23 izoformák expresszióját az IL-4 mellett az IFN γ , a NOTCH2 jelút, valamint a BCR antigénkötése is befolyásolja. A CLL-re jellemző **a CD23 overexpressziója és eltérő szabályzása a normál B-sejtekhez képest**. Normál B-sejtekkel ellentétben a CLL-sejteken mindkét izoforma konstitutívan expresszálódik. A CD23a CLL-ben főként a túléléshez járulhat hozzá, míg a CD23b izoforma expressziója proliferációval társul. A CD23 a CD5⁺ lymphomák, a CLL és a köpenysejtes lymphoma (MCL) elkülönítésében fontos differenciál-diagnosztikai marker. Azonban a **CLL-sejtek változó mértékben expresszálják a CD23 molekulát**. A CD23 expresszió mértéke **prognosztikai jelentőséggel is bír**: a CD23 szint fordítottan korrelál az abszolút lymphocyta számmal és a csontvelői prolymphocyta aránnyal, továbbá az alacsonyabb CD23 expresszió rövidebb túléléssel társul.

CLL-ben a legmegbízhatóbb áramlási citométerrel detektált prognosztikus marker a **CD49d** molekula, más néven az $\alpha 4$ integrin alegység. A CLL-sejtek felszínén a CD49d főként a CD29 ($\beta 1$) láncsal asszociálva fejeződik ki, ezt VLA-4 adhéziós molekulának is nevezik. A CD49d/CD29 a sejt-sejt és sejt-extracelluláris mátrix interakciók kialakításában vesz részt. A heterodimer ligandjai a VCAM-1 (CD106) adhéziós molekula, valamint az extracelluláris mátrix-alkotó fibronectin. Mint az integrinekre általánosan jellemző, **a CD49d/CD29 többféle konformációs állapotban** lehet jelen a sejtek felszínén, melyek befolyásolják a molekula ligandkötő-affinitását. Alapállapotban az integrinek alacsony affinitással jellemezhetők. Különböző aktiváló szignálok, mint a BCR, kemokinreceptorok stimulációjának hatására konformációváltozás indukálódik és kialakul a receptor ligandkötésre alkalmas aktív formája. A ligandkötés számos cytoskeletális komponens és intracelluláris jelátviteli út aktiválására képes, melyek befolyásolják az adhéziót, migrációt, túlélést és a proliferációt.

Míg a normál B-sejteken a CD49d nagy arányban van jelen, a CLL-sejtek felszínén különböző mértékben expresszálódik. **A magas CD49d szint kedvezőtlen prognosztikai tényező**; a CD49d pozitivitás rövidebb össz túléléssel és korábbi terápiás indikációval társul. Magasabb CD49d expressziót detektáltak előrehaladott stádiumban (Rai III, IV), a Richter-szindrómába való transzformációnál, illetve lymphadenopátia

esetén. A CD49d elengedhetetlen a CLL-sejtek migrációjában és homingjában. CD49d⁺ CLL-sejtek nagyobb migrációs kapacitással rendelkeznek, mint a CD49d⁻ CLL-sejtek, továbbá a CD49d⁺ esetekre kifejezettebb csontvelői infiltráció jellemző. CLL-sejtek esetén azonban ellentmondó eredmények jelentek meg a CD49d közvetlen anti-apoptotikus szerepéről. Az eddigi eredmények alapján nem tisztázott, hogy a CD49d által kiváltott adhézió direkt vagy indirekt módon járul-e hozzá a CD49d⁺ CLL-sejtek fokozott túléléséhez. A CD49d proliferációban betöltött szerepe szintén nem egyértelmű az irodalom alapján.

A CLL esetében régóta jól ismert, hogy a belső, genetikai faktorok mellett a **mikrokörnyezetnek** is kulcsszerepe van a betegség patogenezisében. A mikrokörnyezet és a CLL-sejtek közötti komplex kapcsolatok meghatározóak a CLL-sejtek **apoptózis-rezisztenciájában, a proliferációban, a homingban, a szöveti retencióban, illetve az immunválasz elkerülésében** (immune escape). Emellett a mikrokörnyezetből származó szupportív szignálok hozzájárulnak a CLL-sejtek kemorezisztenciájához és terápiát követően a minimális reziduális betegség (MRD) jelenlétéhez. A CLL-sejtek -vagy legalábbis a perifériás CLL pool egy része- képes recirkulálni a periféria és a lymphoid szövetek között. A progresszióhoz elengedhetetlen, hogy a perifériáról a szövetekbe jussanak, mivel a csontvelő és a másodlagos nyirokszövetek előnyösebb környezetet jelentenek a CLL-sejtek számára. A CLL-sejtek homingjában az integrinek, különösen a CD49d/CD29 szerepe kulcsfontosságú. A lymphoid szövetekbe vándorlást kemokinek és receptoraik irányítják. CLL-ben meghatározó a CXCL12 kemokin-grádiens irányába történő migráció, melynek receptora a CLL-sejtek felszínén expresszálandó **CXCR4**. A CXCL12 a CXCR4 receptorhoz kötődve kemotaxist, migrációt, aktin-polimerizációt indukál a CLL-sejtekben, ezen kívül direkt túlélést-segítő szerepét is leírták.

2. Célkitűzések

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

1. A CD23 expresszió szerepe a CLL prognózisában:

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

2. A magas CD49d expresszió szerepének vizsgálata:

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

3. Módszerek

Beteganyagok: kísérleteinkhez CLL, valamint más CD23⁺ lymphoma (MCL-köpenysejtes lymphoma, MZL-marginális zóna lymphoma) perifériás vérmintákból izoláltunk lymphoma sejteket, egyes esetekben csontvelő aspirátumot használtunk.

Molekuláris vizsgálatok: a CD23 izotípusok expresszióját RNS izolálást és reverz transzkripciót követően mRNS szinten vizsgáltuk hagyományos, illetve kvantitatív real-time PCR-rel. A real-time PCR analízishez TaqMan® génexpressziós rendszert használtunk. A CD23 izoformák relatív expresszióját $\Delta\Delta C_T$ módszerrel határoztuk meg.

Immunfenotípus meghatározása áramlási citometriával: az áramlási citometriás mérésekhez a sejteket fluoreszcens festékkel direkt jelölt monoklonális antitestekkel jelöltük. A méréseket FACSCalibur áramlási citométerrel végeztük el, az eredmények kiértékelése CellQuest Pro szoftverrel történt.

FISH: a CD23 expresszióval kapcsolatos CLL eseteknél a del11q23, del17p13, del13q, 12tri, az MCL eseteknél a t(11;14) kromoszómaaberrációkat FISH analízissel detektáltuk.

Sejtenyésztés: CLL-sejteket önmagukban, VCAM-1 fedett felszínen vagy csontvelői strómasejt (*bone marrow stromal cell*-BMSC) ko-kultúrában tenyésztettük 7 napig.

Apoptózis-mérés: tenyésztést követően annexinV/propídium-jodid (PI) analízist végeztünk áramlási citométerrel detektálva.

Sejtciklus vizsgálat és proliferációs markerek detektálása: fixálás és alkalikus extrakciót követően a PI fluoreszcenciája alapján határoztuk meg az proliferáló sejtek arányát. Emellett anti-Ki67 és anti-ciklinD2 festést alkalmaztunk áramlási citométerrel detektálva.

A CD29 konformációváltozásának valós idejű detektálása áramlási citometriával: a CD29 lánc magas affinitású konformációjára specifikus anti-CD29 antitestet alkalmaztunk. Az aktiváció valós időben történt az alábbi stimulusk hozzáadásával: VCAM-1, CXCL12, közvetlenül aktiváló CD29 antitest (TS2/16). A maximálisan kiváltható aktív konformációt 3 mM MnCl₂ stimulációval értük el.

Aktin-átrendeződés vizsgálata: phalloidin-jelölést végeztünk. A mintákról konfokális mikroszkóppal készítettünk képeket, majd ezeket ImageJ 1.48k programmal analizáltuk.

Statisztika: Wilcoxon-, Mann-Whitney-tesztet vagy Spearman- korrelációs koefficiens meghatározását alkalmaztunk, kategorikus változóknál (Rai, Binet stádiumok) X^2 -tesztet használtunk. SPSS szoftverrel végeztük el az analízist, $p < 0,05$ értéket tekintve szignifikánsnak.

4. Eredmények

A különböző CD23 expresszió szerepe a CLL prognózisában

A CD23 izotípusok expressziójának vizsgálata

Hagyományos PCR-technikával elemezve a CLL-es esetek kis részében csak a CD23a izotípust detektáltuk (CLL1 esetek), a minták többségében mind a CD23a, mind a CD23b izoforma jelen volt (CLL2 esetek). Kvantitatív real-time PCR-rel vizsgálva a CD23 izotípusok relatív expresszióját, a CLL1 csoportban is jelen volt a CD23b izoforma. A CD23a relatív expressziója mindegyik CLL-mintánál magasabb volt, mint a CD23b. A CLL1 és CLL2 csoportokat elemezve alacsonyabb CD23a és CD23b szintet figyeltünk meg a CLL1 esetekben. Azonban a CLL1 esetek magasabb CD23 izotípus expressziót mutattak, mint az MCL, MZL sejtek és normál B-sejtek.

A CLL1 és CLL2 esetek immunfenotípusa

A CLL1 esetek alacsonyabb CD23, magasabb CD38, CD20, CD22 expressziót mutattak, összehasonlítva a CLL2 csoporttal. Mivel a CLL1 esetek fenotípusa hasonlóan mutatkozott az atípusos CD23⁺ MCL-lel, minden CLL1 mintánál elvégeztük az MCL-re jellemző t(11;14) FISH-vizsgálatot. Minden általunk vizsgált CLL1 eset negatív volt a t(11;14) transzlokációra.

A CLL1 és CLL2 csoportok klinikai adatainak összehasonlítása

A CLL1 esetek agresszívebb kórleíyást mutattak: előrehaladottabb Rai-stádiummal kerültek diagnózisra, nagyobb volt a kezelést igénylő esetek aránya, továbbá a CLL1 csoport alacsonyabb perifériás fehérvérsejt-számmal rendelkezett. Azonban a különbségek nem bizonyultak szignifikánsnak.

Prognosztikai markerek vizsgálata a CLL1 és CLL2 csoportokban

Összehasonlítva a citogenetikai prognosztikus markerek jelenlétét a két CLL csoportban, a CLL1 esetek többsége (14/17) rendelkezett 12-es triszómiával, míg, a CLL2 betegek egyikében sem találtunk 12tri-t.

A magas CD49d expresszió szerepének vizsgálata

A CD49d expresszió korrelációja prognosztikus és mikrokörnyezeti interakcióban részt vevő markerekkel

Pozitív korrelációt találtunk a CD38, CD29, és a CD19 szintjével. A CD23 és CXCR4 esetén szignifikáns negatív összefüggést figyeltünk meg a CD49d expressziójával.

A CD49d direkt apoptózis-gátló szerepének vizsgálata

Összevetve a különböző CD49d expressziójú csoportokat, sem a CD49d⁺, sem a CD49d⁻ esetekben nem tapasztaltunk apoptózis-gátlást VCAM-1-kezelés hatására. A csontvelői környezet modellezésére alkalmazott BMSC-sejtek csökkentették a CLL-sejtek spontán apoptózisát. A BMSC-k által kiváltott túlélési hatás függetlennek bizonyult a CLL-sejtek CD49d expressziójától, azonban összefüggést mutatott a CXCR4 szinttel: alacsony CXCR4 kifejeződés esetén nagyobb mértékű volt a stróma protektív hatása. A CD49d⁺ alacsony CXCR4 expressziójú esetek magasabb spontán apoptózis-rátával rendelkeztek.

A CD49d-VCAM-1 kapcsolódás proliferáció-indukáló hatásának vizsgálata

Kísérleteinkben sem a VCAM-1 kezelés, sem a BMSC-ko-kultúra nem indukált proliferációt a CD49d⁺ és CD49d⁻ CLL-sejteknél.

A CD49d/CD29 komplex aktív konformációjának vizsgálata

Mivel kísérleteinkben a CD49d stimulációja sem túlélési, sem proliferáció-indukáló hatást nem váltott ki, megvizsgáltuk jelen van-e, illetve kiváltható-e a CD49d/CD29 komplex aktív konformációja a CLL-sejtek felszínén. Konformáció-specifikus antitesttel elvégzett kísérleteink alapján perifériás vérből, illetve csontvelőből izolált CLL-sejteken a CD49d/CD29 komplex inaktív konformációban van jelen. Különböző aktiváló stimulusok hatására (VCAM-1, CXCL12) a CD49d/CD29 normál aktivációra képes, kialakul a magas affinitású konformáció.

CD49d⁺ és CD49d⁻ CLL-sejtek aktin-átrendeződésének vizsgálata VCAM-1 hatására

CD49d⁺ CLL-sejtek esetén a VCAM-1 jelentős aktin-átrendeződést váltott ki, összehasonlítva a kontroll (BSA) lemezre adherált CLL-sejtekkel. A CD49d⁻ CLL-sejteknél nem detektáltunk különbséget az F-aktin-formációban a VCAM-1-kezelt és kontroll minták között.

CD49d⁺ és CD49d⁻ CLL-sejtek immunfenotípus-változása VCAM-1 vagy BMSC-ko-kultúra hatására

A VCAM-1 kezelés nem indukált változást a felszíni molekulák expressziójában egyik CD49d-csoportban sem. BMSC ko-kultúrában szignifikánsan emelkedett CD5, CD49d, CD44, CD19, CD126 szintet detektáltunk, míg a CXCR4 expressziója csökkent strómasejtek jelenlétében. A CD38, CD80, CD86 és ROR1 változása nem mutatott egyértelmű tendenciát. A különböző CD49d expressziójú csoportokat összehasonlítva a CD49d⁺ CLL-sejteknél szignifikánsan nagyobb mértékben növekedett a CD5 expresszió stróma jelenlétében, mint a CD49d⁻ eseteknél.

Különböző CD49d és CXCR4 expressziójú betegcsoportok klinikai adatainak elemzése

Saját beteganyagunkon igazoltuk a CD49d negatív prognosztikus hatását: a CD49d⁺ esetek előrehaladottabb stádiummal kerültek diagnózisra, magasabb LDH szinttel rendelkeztek, nagyobb arányban szorultak kezelésre, rövidebbnek bizonyult az első kezelésig eltelt idő, valamint nagyobb arányban rendelkeztek valamilyen citogenetikai eltéréssel. Érdekes módon a CD49d⁺ betegeknek alacsonyabb perifériás abszolút lymphocyták számot detektáltunk, bár ez nem mutatkozott szignifikánsnak. Összehasonlítva a különböző CXCR4 expressziójú betegcsoportokat, nem találtunk szignifikáns eltérést a klinikai paraméterek tekintetében.

5. Következtetések

A CLL egy indolens lefolyású B-sejtes non-Hodgkin-lymphoma, a betegek egy részére azonban gyors progresszió, magas malignitású lymphomába való transzformáció jellemző. Munkánkban a magas kockázatú csoportot jelző CD23 és CD49d prognosztikus faktorok szerepét vizsgáltuk CLL progressziójában.

Elemeztük a magas és alacsony CD23 expressziójú esetek CD23 izotípus-eloszlását. A CD23a expresszióját minden CLL esetnél magasabbnak találtuk, mint a CD23b-t, ahogy más CD23⁺ lymphománál (MCL, MZL), illetve normál B-sejtek esetében is. Irodalmi adatok alapján a CD23a a túléléshez, míg a CD23b a proliferációhoz járul hozzá. A detektált magas CD23a és az alacsonyabb CD23b szint összhangban van a CLL-sejtek jellegzetességével, miszerint a periférián fokozott apoptózis-gátlást és csökkent proliferációt mutatnak. A CLL-es minták egy kis részénél alacsonyabb CD23a és CD23b szintet detektáltunk (CLL1), mely csoport immunfenotípus alapján is elkülönült: alacsonyabb CD23, magasabb CD20, CD22 és CD38 expresszióval rendelkeztek, emellett nagy arányban hordozták a 12tri eltérést. A 12tri-val rendelkező esetek nemcsak fenotípusosan mutatnak eltéréseket, hanem biológiailag is különböznek. Ezek ismeretében feltehető, hogy a 12tri-vel rendelkező CLL betegek eltérő terápiát igényelnek. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, az áramlási citométerrel detektált alacsony CD23, magas CD38, CD20 expresszió hatékonyan jelezheti a 12tri-t hordozó eseteket. A 12tri által jelzett közepes prognózis ellenére a CLL1 eseteknél agresszívebb kórlefolyást detektáltunk. Eredményeinket alátámasztva korábbi közlemények szerint a 12tri korai progresszióval és nagyon agresszív klinikai képpel társul, valamint a CD23 expresszió negatív korrelációját találták a túléléssel és a csontvelői prolymphocytá aránnyal. A Richter-transzformáció során változik az immunfenotípus: a CD5 és CD23 expresszió csökken vagy teljesen eltűnik az eredeti CLL-klónhoz képest. A CLL1 eseteknél detektált csökkent CD23 expresszió, valamint a 12tri a CD23 vesztes első lépését jelenthetik a transzformáció során.

A továbbiakban a CD49d prognosztikus markerrel kapcsolatos eredményeinket ismertetem. Összefüggést találtunk az alacsony CD23 és a magas CD49d szint között. Továbbá a CD49d pozitív korrelációt mutatott a CD38 prognosztikus markerrel, a vele egy komplexben lévő CD29 láncsal és a CD19 BCR ko-receptorral. Utóbbi magyarázhatja a CD49d és a BCR közti funkcionális kapcsolatot, mely során a BCR

szabályozza a CD49d/CD29 jelátvitelét. Kísérleteinkben megvizsgáltuk a CD49d közvetlen túlélésbeli szerepét, melyről az irodalomban ellentmondó eredményeket találunk. Adataink szerint a CD49d nem indukál közvetlen apoptózis-gátlást ligandjával, a VCAM-1 molekulával kezelve. Továbbá a csontvelői mikrokörnyezet modellezésére alkalmazott BMSC ko-kultúrában a stróma túlélést-segítő hatása függetlennek bizonyult a CLL-sejtek CD49d expressziójától. A CD49d az apoptózis-gátlás mellett, közvetlen proliferációt és immunfenotípus-váltást sem vált ki, azonban ez nem funkcionális inaktivitás következménye. Vizsgálataink szerint a CD49d/CD29 komplex inaktív, alacsony affinitású konformációban van jelen a CLL-sejtek felszínén, de ligandkötés és aktiváló stimulusok hatására kialakul a molekula magas affinitású formája. Kísérleteinkben a VCAM-1 kezelés nagyfokú aktin-átrendeződést indukált a CD49d⁺ esetekben. A CD49d-nek kulcsszerepe van a citoskeleton átrendeződésével kapcsolatos folyamatokban, mint az adhézió, migráció, homing. Több tanulmány a CD49d⁺ CLL-sejtek nagyobb migrációs képességéről, illetve fokozottabb csontvelői homingjáról számol be, összehasonlítva a CD49d⁻ esetekkel. A CD49d⁺ CLL-sejtek fokozottabb homingjára utalhat az a megfigyelésünk is, miszerint a CD49d⁺ CLL-es betegek alacsonyabb abszolút lymphocita számmal rendelkeznek diagnóziskor, bár ez az eredmény nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. Feltételezzük, hogy az alacsonyabb abszolút lymphocita szám a nagyobb mértékű migráció és szöveti visszatartás miatt valósul meg. A CD49d fordított korrelációt mutat a CXCR4 kemokinreceptorral. Kísérleteinkben a CD49d⁺, alacsony CXCR4 fenotípusú CLL-sejtek nagyobb spontán apoptózist mutattak, összehasonlítva a CD49d⁻, magas CXCR4 expressziójú esetekkel. A CLL-sejtek, vagy legalábbis bizonyos alpopulációjuk, folyamatosan recirkulálnak a periféria és a lymphoid szövetek között. A másodlagos nyirokszövetek sokkal előnyösebb niche-t jelentenek a mikrokörnyezeti sejtek anti-apoptotikus és növekedési szignáljai miatt. Feltételezzük, hogy a közelmúltban a jótékony szöveti környezettel kapcsolatba került CLL-sejtek izolálva sokkal érzékenyebbek a szupportív szignálok hiányára. Úgy gondoljuk ez a „death by neglect” hatás felelős a CD49d⁺, alacsony CXCR4 expressziójú populáció fokozott sejtpusztulásáért. Bár a csontvelői mikrokörnyezetben a strómasejtek védőhatása a CLL-sejtek CD49d expressziójától függetlennek bizonyult, jól korrelált az alacsony CXCR4 expresszióval. Mivel kísérleteinkben az alacsony CXCR4 szint jól jelezte a mikrokörnyezettől való

függést, feltételezzük, hogy a mikrokörnyezetet célzó terápiák alkalmazása előtt hasznos lehet a CXCR4 expresszió vizsgálata. A CXCR4 önálló prognosztikus szereppel nem rendelkezik.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a CD49d prognosztikus marker nem közvetlen apoptózis-gátlással és proliferáció-indukcióval, hanem az előnyös mikrokörnyezetbe való homing és a szupportív sejtekkel kialakított adhézió révén járul hozzá a CD49d⁺ CLL esetek agresszívebb kórképéhez.

A CD23 molekulával kapcsolatos főbb megállapítások:

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

A CD49d molekulával kapcsolatos főbb megállapítások:

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

6. Saját publikációk jegyzéke

Disszertációhoz kapcsolódó saját publikációk jegyzéke

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

Disszertációtól független saját publikációk jegyzéke

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

6. Nagy AM, Fekete R, Horvath G, Koncsos G, **Kriston C**, Sebestyén A, Giricz Z, Kornyei Z, Madarasz E, Tretter L. Versatility of microglial bioenergetic machinery under starving conditions. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2018;1859(3):201-14. **IF: 4.280**

7. Marosvari D, Nagy N, **Kriston C**, Deak B, Hajdu M, Bodor C, Csala I, Bago AG, Szallasi Z, Sebestyén A, Reiniger L. Discrepancy Between Low Levels of mTOR Activity and High Levels of P-S6 in Primary Central Nervous System Lymphoma May Be Explained by PAS Domain-Containing Serine/Threonine-Protein Kinase-Mediated Phosphorylation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2018;77(4):268-73. **IF: 3.490**

8. Takacs F, **Tolnai-Kriston C**, Hernadfoi M, Szabo O, Szaloki G, Szepesi A, Czeti A, Matolcsy A, Barna G. The Effect of CD86 Expression on the Proliferation and the Survival of CLL Cells. *Pathol Oncol Res.* 2018. **IF: 1.935**

