

**KRÓNIKUS LYMPHOCYTÁS LEUKÉMIA SEJTEK ÉS A
MIKROKÖRNYEZET KÖLCSÖNHATÁSÁNAK JELENTŐSÉGE A
BETEGSÉG PROGRESSZIÓJÁBAN**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

DR. PLANDER MÁRK

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Matolcsy András egyetemi tanár, MTA doktora

Hivatalos Bírálók: Dr. Nagy Zsolt, egyetemi adjunktus, PhD

Dr. Bodó Imre, főorvos, PhD

Szigorlati Bizottság elnöke: Dr. Sréter Lídia, egyetemi tanár, MTA doktora

Szigorlati Bizottság tagjai: Dr. Csóka Mónika, egyetemi docens, PhD

Dr. Mikala Gábor, főorvos, PhD

Budapest

2012

Tartalomjegyzék

I.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
II.	BEVEZETÉS	7
	1. Krónikus Lymphocytás Leukémia (CLL) klasszifikáció, diagnózis	7
	2. A CLL genetikája, eredete, prognosztikája	9
	3. CLL-sejtek osztódása	11
	4. CLL-sejtek apoptózis rezisztenciája	12
	5. DNS analízis lymphoproliferatív betegségekben	13
III.	CÉLKÍTŰZÉSEK	16
IV.	MÓDSZEREK	17
	1. Betegek	17
	2. A csontvelői stromasejt (BMSCs) kultúrák előkészítése	18
	3. Stromasejtek immunfenotípezálása	18
	4. Citokinek mérése	18
	5. CLL sejtek izolálása	19
	6. Sejtkultúra	19
	7. Multiparaméteres DNS analízis	19
	8. Apoptózis analízis	21
	9. A túlélő sejtpopuláció számítása	21
	10. IRF4 immunhisztokémiai jelölése	22
	11. Immunfixáció	22
	12. Génexpressziós analízis	22
	13. IgV _H család meghatározás	23
	14. Az IgH V, D és J régiók szekvenálása	25
	15. Statisztika	26

V. EREDMÉNYEK	27
1. Csontvelői eredetű stromasejt kultúrák fejlődése	27
2. Csontvelői eredetű stromasejtek jellemzése	29
3. BMSCs jelentős immunfenotípus változást indukált a CLL-sejteken, míg a sCD40L csak marginális hatást fejtett ki	31
4. CLL-sejtek IL4 hatására képesek normális B-sejtekhez hasonlóan differenciálódni	35
5. IL2 és IL10 kombináció hatására megváltozott a CLL-sejtek BMSCs és sCD40L indukálta immunfenotípusa	37
6. Osztódásra csak a klinikailag progresszív esetekből származó CLL-sejtek indukálhatók	37
7. A CLL-sejtek <i>in vitro</i> különböző túlélési képességekkel rendelkeznek	41
8. CLL-sejtek indukálták a BMSCs fokozott ICAM1 kifejeződését és citokin szekrécióját	44
9. A csontvelői mikrokörnyezet <i>in vivo</i> fokozza a CLL-sejtek CD49d expresszióját	47
VI. MEGBESZÉLÉS	49
VII. KÖVETKEZTETÉSEK	55
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS	56
IX. SUMMARY	57
X. IRODALOMJEGYZÉK	58
XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	71
XII. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	73

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

APC:	Allophycocyanin
ATM:	Ataxia-telangiectasia mutated gén
Bax:	Bcl-2 associated X protein
BCR:	B-sejt receptor
bFGF:	Basic fibroblast growth factor
Bcl-2:	B-cell lymphoma 2 protein
BMSCs :	Csontvelői stromasejtek
BM-MNC:	Csontvelő aspirátumból izolált mononukleáris sejtek
BLIMP1:	B-lymphocyte-induced maturation protein
BSAP:	B-cell lineage-specific activator protein
CLL :	Krónikus lymphocytás leukémia
Cy7:	Indocyanine 7
DMEM:	Dulbecco modified Eagle médium
EDTA:	Etiléndiamin-tetraecetsav
FCS:	Fetal calf serum
FI:	Fluoreszcencia intenzitás
FISH:	Fluoreszcens in situ hybridizáció
FITC:	Fluoreszcein isothiocyanate
FR1:	Framework region
FSC:	Forward scatter

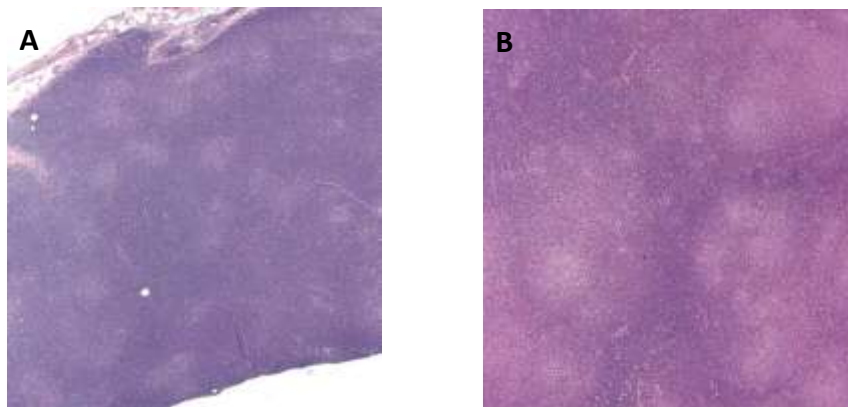
HCDR3:	Ig nehéz lánc complementarity determining region 3
Hgb:	Haemoglobin
ICAM1:	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
Ig:	Immunglobulin
IGHV:	Immunglobulin nehéz lánc variábilis régió
IRF4:	Interferon regulatory factor 4
LFA1:	Lymphocyte function-associated antigen 1
mAb:	Monoklonális antitest
MBL:	Monoclonal B-cell lymphocytosis
MGUS:	Monoclonal gammopathy of undetermined significance
mTOR:	Mammalian Target of Rapamycin
nHL:	non-Hodgkin lymphoma
PAX5:	Paired box domain 5
PE:	Phycoerytrin
PECAM-1:	Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1
PerCP:	Peridinin-chlorophyll
PBS:	Phosphate buffered saline
PBMC:	Perifériás vér mononukleáris sejtek
Pgp-1:	P-glycoprotein-1
PI3K:	Phosphatidylinositol 3'-kináz
PTK:	Protein tirozin kináz
RFI:	Relatív fluoreszcencia intenzitás

RLT:	RNeasy Lysis Buffer
SAHA:	Suberoylanilide hydroxamic acid
sCD40L:	solubilis CD40 Ligand
SDF-1:	Stroma cell-derived factor-1
SEM:	Standard error of the mean
SHM:	Somatic hypermutation
SLL:	Small lymphocytic lymphoma
SSC:	Side scatter
SYK:	Spleen tyrosine kináz
T _H :	Helper T-lymphocyta
TCL1:	T-Cell Leukemia/Lymphoma 1A
Thr:	Thrombocyta
TP53:	Tumor Protein p53
VCAM1:	Vascular cell adhesion protein 1
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
VLA4:	Very late antigen 4
ZAP-70:	Zeta-chain-associated protein kinase

II. BEVEZETÉS

1. Krónikus Lymphocytás Leukémia (CLL) klasszifikáció, diagnózis

A Krónikus lymphocytás leukémia a felnőttek leggyakoribb leukémiája a nyugati országokban, melyet az érett B-sejtes tumorok közé sorol a WHO klasszifikáció. A nyugati féltekén a CLL incidenciája átlagosan 4 eset 100000 egyéneként évente. Az incidencia az életkorral nő, 80 év feletiekben már meghaladja a 30 esetet 100000 egyéneként évente. Az átlagos életkor a betegség diagnózisakor 69 év. A CLL esetek csak 14%-a fiatalabb 55 évesnél. A típusos betegséget citológiailag monomorf, kis lymphocyták akkumulációja jellemzi, melyek heterokromatinnal rendelkeznek és nucleolus nem különböztethető meg a sejtmagban. A CLL sejtek felszínén jellegzetes antigén mintázat mutatható ki; intenzíven fejezik ki a CD5, CD23 antigéneket, míg a CD22, CD20 antigén és az immunglobulin könnyűlánc gyengén jelölődik. A WHO definíció szerint a B-sejtek száma meg kell, hogy haladja az $5 \times 10^3/\mu\text{l}$.¹ A WHO klasszifikáció a CLL fejezetben tárgyal még két rokon entitást a monoklonális B-sejtes lymphocytosist (MBL) és a kis lymphocytás lymphomát (SLL).¹



1. **Ábra.** CLL infiltrált csontvelő (A) és nyirokcsomó (B) szövettani képe. A világos területek megfelelnek a pseudofolikulusoknak. (HE festés, 4x nagyítás).

A MBL egy relatíve újonnan leírt daganatmegelőző állapot, ahol definíció szerint a monoklonális B-sejtek száma kisebb, mint 5×10^9 sejt/l és nincs kimutatható lymphadenomegalia, organomegalia, autoimmun betegség. A B-sejtek lehetnek CD5

antigént kifejező – CLL-típusú vagy CD5 negatív non-CLL-típusú sejtek. Az MBL rendkívül gyakori; a 40 évnél idősebb populáció 3,5%-ban kimutatható. A CLL-típusú MBL évente 1-4%-ban progrediál kezelést igénylő CLL-be, ami nagyon hasonló a monoklonális gammopathia (MGUS) myelomába való progresszió gyakoriságához².

A SLL a CLL nem leukémiás formája, ahol a perifériás vérben a B-sejtek száma nem haladhatja meg az 5 G/l-t, viszont a sejtek immunfenotípusa és az infiltrált nyirokcsomók hisztológiai képe megegyezik.¹

CLL-ben mindig érintett a csontvelő és a perifériás vér, de gyakran jár lymphadenomegaliával, hepatosplenomegaliával. A Binet és Rai stádiumbeosztásokban is ezeket a régiókat és a csontvelő elégtelenséget osztályozzuk (1. táblázat).³

1. Táblázat: Stádium beosztás CLL-ben³

Stádium	Definíció	Átlagos túlélés
Alacsony kockázat		
Binet A	Hgb>10 g/dl, Thr>100 G/l, <3 nyirokcsomó régió érintett	>10 év
Intermedier kockázat		
Binet B	Hgb>10 g/dl, Thr>100 G/l, ≥3 nyirokcsomó régió érintett	7 év
Magas kockázat		
Binet C	Hgb<10 g/dl, Thr<100 G/l	1,5-2,5 év
Alacsony kockázat		
Rai 0	Lymphocytosis>5 G/l	>10 év
Intermedier kockázat		
Rai I	Lymphocytosis és lymphadenomegalia	7 év
Rai II	Lymphocytosis és hepato/splenomegalia	
Magas kockázat		
Rai III	Lymphocytosis és Hgb<11 g/dl	1,5-3 év
Rai IV	Lymphocytosis és Thr<100 G/l	

Hgb: Haemoglobin, Thr: thrombocyt

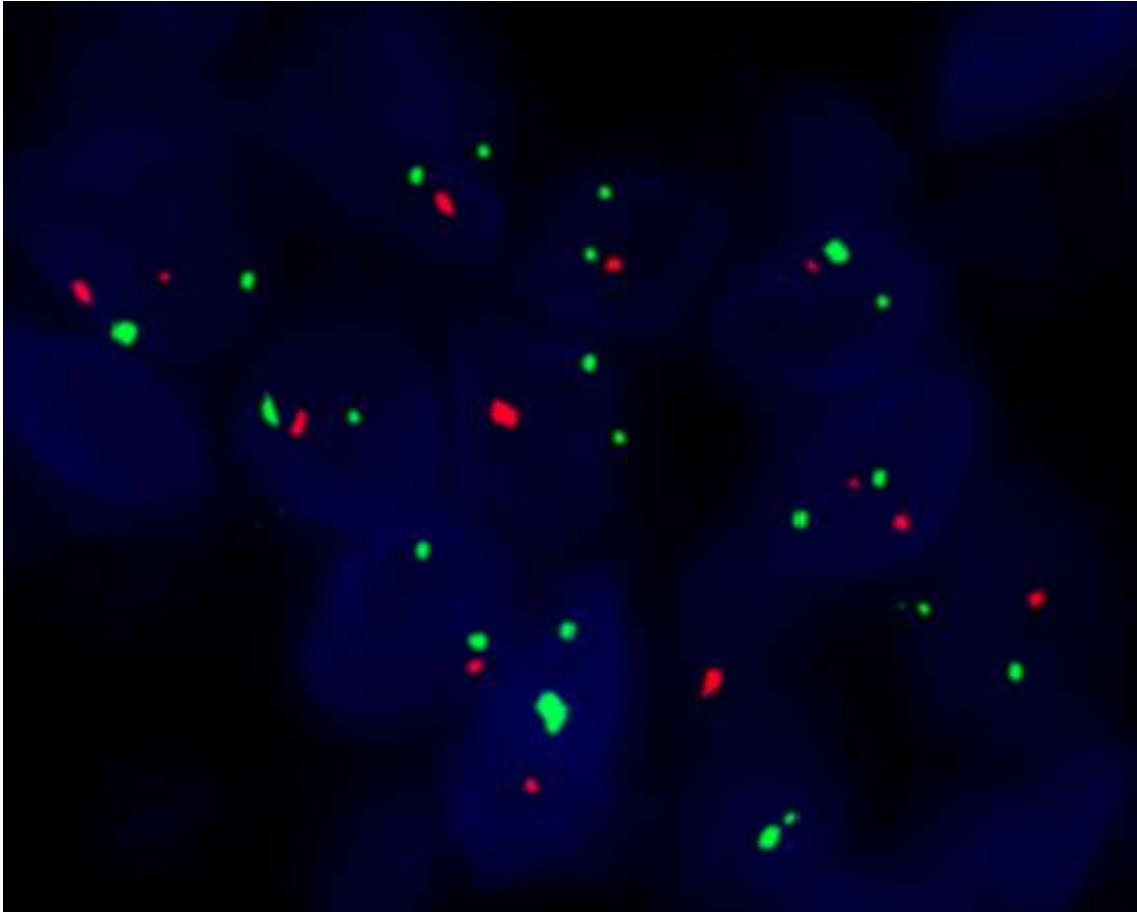
2. A CLL genetikája, eredete, prognosztikája

A CLL egy érett B-sejtes daganat, ezért a sejtek immunglobulin génjei (Ig-gén) monoklonálisan átrendezettek és az esetek 40-50%-ban nem mutáltak, azaz 98% feletti homológiát mutatnak az Ig csírasejtvonal szekvenciával.¹ Klasszikus felfogás szerint a szomatikusan hypermutált IgV_H-t tartalmazó B-sejtes tumorok már az antigéntől függő B-sejt fejlődés follikulusban zajló szakaszából származnak vagy már azon keresztül értek, míg a nem mutált IgV_H-t tartalmazó tumorok még antigén naív, prefollikuláris eredetűek.

A CLL esetek gén expressziós profilja jellegzetes, leginkább a memória B-sejtekhez hasonlít, és nem tér el lényegesen a mutált és naív IgV_H génnel rendelkező eseteké.⁴ A CLL-esetek Ig repertoárjában néhány IgV_H gén különösen gyakran fordul elő, pl. IgV_H1-69, IgV_H4-34, IgV_H3-21. A szomatikus hypermutáció (SHM) nem egyformán érinti az IgV_H géneket; az IgV_H1-69 általában nem mutált, míg a IgV_H4-34 többnyire hypermutált.⁵ Kimutatták továbbá azt is, hogy az IgH és IgL gének jellemző módon rendeződnek át, így egyforma ún. sztereotípusos HCDR3 szekvenciák keletkeznek.⁶ A sztereotípusos B-sejt receptor (BCR) gének sokkal gyakrabban fordulnak elő a nem mutált IgV_H génnel rendelkező esetekben, mint hypermutáltakban (40% vs 10%).⁷ Néhány IgV_H gén gyakoribb előfordulása és a sztereotípusos BCR gének használta felveti bizonyos (auto) antigének szelekciós hatását és a BCR szignalizáció fontosságát a CLL pathogenezisében.¹ A nem mutált IgV génnel rendelkező CLL esetekben valószínűleg autoantigének vagy T-sejt független lipopolysaccharidok indukálják a B-sejt érést. A nem mutált IgV_H génnel rendelkező CLL-esetek kb. 80%-ban rendelkeznek polireaktív antitestekkel, melyek egyik gyakori célpontja a nem izom eredetű myosin nehézlánc IIA.⁷

A CLL-esetek többségében FISH vizsgálattal kimutatható kromoszóma abnormalitás; 55% 13q-, 18% 11q-, 16% 12 triszóma, 7% 17p-, 6% 6q- és 29%-ban egynél több eltérés.¹ A 13q deleció során két mikroRNS; miR-15 és miR16 expressziója csökken, ami az antiapoptotikus Bcl-2 expresszió fokozódásához és a CLL-sejtek in vivo akkumulációjához vezet.⁸ 17-es kromoszóma rövid karján található célgén a P53, mely DNS károsodás esetén sejtciklust gátol és apoptózist indukál a p21 és BAX fehérjéken keresztül.⁹ A del11q esetén az ATM gén inaktiválódik, mely a P53 regulációjában

játszik szerepet.⁵ További két miRNS; a miR29a/29b és miR181a/181b a TCL1 és rajta keresztül az AKT/mTOR aktivációt szabályozza, így befolyásolva a proliferációt és az apoptózist.¹⁰



2. **Ábra. CLL-sejtek a 17p delécióval.** FISH vizsgálat során a zöld színű próba a 17-es kromoszóma centromer, piros színű próba a 17p13 régióra specifikus. A sejtek többségében az egyik 17-es kromoszóma p13 régiója hiányzik.

A CLL esetek hasonló cytológiai és immunfenotípus sajátosságai ellenére a betegség lefolyása rendkívül heterogén, ezért a betegség prognózisának megítélése fontos a diagnózis felállítását követően. A túlélést meghatározó legfontosabb prognosztikai adat a tumor tömeggel korreláló klinikai stádium; kedvezőtlen az előrehaladott stádiumra jellemző anaemia és thrombocytopenia (RAI III-IV és Binet C stádiumok) (1.

Táblázat).¹¹ A tumor tömeggel jó összefüggést mutat a β 2-microglobulin szintje is.¹¹ A betegség korai stádiumában kedvezőtlen prognózist jelez a nem mutált IgV_H ¹², az ezzel asszociált ZAP-70 kifejeződés¹³, a CD38¹⁴ és a CD49d¹⁵ expresszió.

A ZAP-70 egy receptor asszociált protein thyrozin kináz (PTK), mely fiziológiásan T és NK-sejtekben található meg. A CLL-esetek génexpressziós vizsgálatainak során derült ki, hogy a ZAP-70 az egyike annak a néhány génnek, mely csak a nem mutált IGV génnel rendelkező esetekben expresszálódik.¹³ CLL-sejtek BCR aktivációja során a ZAP-70 a CD79b molekulához kötődik és fokozza a BCR szignalizációt.¹⁶ Érdekes módon a ZAP70 molekula erősíti a CXCR4 és CCR7 citokin receptorok jelátvitelét is, így javítva a sejtek kemotaxisát és túlélését is.¹⁷

PECAM-1 (CD31) a CD38 egyetlen ismert ligandja, mely képes a CD38 kötésével IL2 aktiváció mellett CLL-sejt proliferációt kiváltani és a sejtek *in vitro* túlélését javítani.¹⁸

A CD49d a VLA4 adhéziós molekula része, amely a legfontosabb ligandja az antiapoptotikus hatású VCAM-1 fehérjének a stromasejtek felszínén.¹⁹

Független negatív prognosztikai tényező az ATM (11q) és a TP53 (17p) gének deléciója és a TP53 mutációja is.²⁰

3. CLL-sejtek osztódása

Az osztódó CLL-sejtek alacsony aránya miatt a CLL-sejtek csökkent apoptózis készségét tartjuk a betegség fő pathomechanizmusának.²¹ Osztódó sejtek azonban CLL-ben is kimutathatók az ún. Proliferációs centrumokban vagy Pseudo-follikulusokban (PC). A PC-t aktivált, CD40L pozitív T_H -sejtek, stromasejt hálózat és osztódó CLL-sejtek alkotják, melyek Ki-67, Survivin és Bcl-2 pozitívak, a CD23 antigént intenzívebben hordozzák, míg bennük a p27 fehérje nem mutatható ki.²²⁻²⁵ Az IRF4 transzkripciós faktor is eltérően fejeződik ki a proliferációs centrumokban, mint a környező lymphocytákban.²⁶ A B-sejtek mellett immunhisztokémiai vizsgálatokkal a csontvelői stromasejteken is kimutattak CD40 antigént, ami lehetővé tehet interakciót az aktivált T-sejtekkel.²⁷

T-sejt eredetű citokinekkal és CD40 Liganddal elvégzett *in vitro* kísérletek bizonyítják a T-lymphocyták fontosságát a CLL pathomechanizmusában, bár egymásnak ellentmondó eredmények is születtek a CD40L és IL4 CLL proliferációt indukáló és apoptózis ellenes hatásáról^{23, 28-32}. Kimutatták, hogy az IL2 és IL10 fokozza a CD40L CLL-sejt osztódást indukáló hatását³³. Normális B-sejtekben az IL4 az IgE irányú izotípusváltást váltja ki, míg az addicionális IL10 fokozza az *in vitro* plazmasejt irányú differenciálódást és az IgE szekréción³⁴.

Proliferáció klinikai jelentőségére utalhat a rövid lymphocyta duplikációs idő negatív prognosztikai szerepe.¹¹ A PC-k száma és mérete azonban nem mutatott összefüggést sem a teljes túléléssel, sem a progressziómentes túléléssel.³⁵

Több kísérletből is kiderült már, hogy a CLL-sejtek különböző proliferációs kapacitással rendelkeznek; *in vivo* mérésekkel kimutatták, hogy a betegség progressziója és nagyobb CLL-sejt képződés között összefüggés áll fenn³⁶. A kedvezőtlen prognózisú CLL esetekből származó sejtek CpG oligodeoxynukleotid stimulálása gyakrabban eredményezett proliferációt *in vitro* és az Akt-mTOR jelátviteli út aktiválódott³⁷. Az indukálható proliferáció prediktív értékűnek bizonyult a rövidebb progressziómentes és teljes túlélésre is.³⁸ Jahrsdörfer és munkatársai eredményei szerint a kedvezőtlen prognózisú citogenetikai eltérések magasabb LDH szinttel társulnak, amely fokozottabb osztódás és proliferáció szerepére utalhat CLL-ben.³⁹

4. CLL-sejtek apoptózis rezisztenciája

CLL-sejtek akkumulációját *in vivo* a hosszú életidőnek tulajdonítjuk, de *in vitro*, médiumban tartva a sejtek gyorsan pusztulnak.⁴⁰ Az apoptózis során az antiapoptotikus fehérjék; Bcl-2, Mcl-1, Bcl-x_L mRNS-ei, illetve a Bcl-2/Bax mRNS-ek aránya csökken.⁴¹ Humán BMSCs és egér fibroblasztok CLL-sejtekkel közös sejt kultúrában viszont jelentősen javítják a CLL-sejtek túlélését.^{30,42} Fibroblasztok hatására aktivált marad a PI3K/Akt/NF-κB jelátviteli út és fenntartják az antiapoptotikus hatású Bcl-x_L expressziót.⁴³

A CLL-sejtek túlélése tehát a mikrokoznyezetből származó humorális és celluláris faktoroknak köszönhető. Csontvelő eredetű stromasejtek közvetlen sejt-sejt kontaktus révén önmagukban is képesek a CLL-sejtek túlélését javítani⁴². A CLL és stromasejtek közti kölcsönhatást adhéziós molekulák közvetítik; VLA-4 és ligandja VCAM-1 (CD106), valamint a LFA-1 a ligandjával ICAM-1 (CD54)⁴². A stromasejtek több olyan citokint is szekretálnak, melyek javítják a CLL-sejtek túlélését, mint IL1 β , IL6, IL8, SDF-1 (CXCL12) és bFGF⁴⁴⁻⁴⁸.

Kísérleti eredmények igazolják, hogy a CLL-sejtek képesek mikrokoznyezetük befolyásolására; VEGF és más angiogenikus citokineket szekretálnak fokozva a csontvelő vaszkularitását és a daganat vérellátását⁴⁹⁻⁵⁰. A CLL-sejtek szignifikánsan emelték CLL eredetű stromasejtek bFGF szekréciónját sejt kultúrában⁵¹.

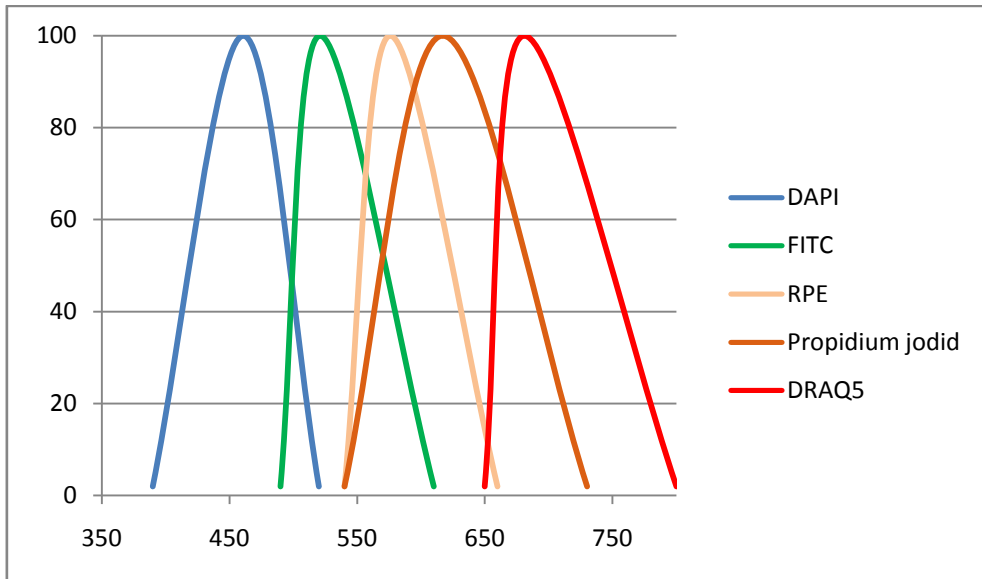
A mikrokoznyezet kulcsfontosságát mutatja az is, hogy a gyógyszerfejlesztés is a stromasejt-CLL kapcsolat, ill. az angiogenezis gátlását célozza meg. Két myeloma kezelésében már bevált gyógyszer a CLL kezelésében is ígéretes lehet; a thalidomid és a lenalidomid hatásosságát már klinikai tanulmányban is vizsgálták⁵²⁻⁵³. Egy PI3K inhibitor⁵⁴, histone deacetylase inhibitor (SAHA)⁵⁵ és egy SYK inhibitor⁵⁶ is gátolta *in vitro* a CXCR4 hatásait.

5. DNS analízis lymphoproliferatív betegségekben

A sejtek áramlási cytometriás DNS analízise alkalmas módszer a sejt ciklus, az aneuploidia és a DNS fragmentáció kapcsán az apoptózis vizsgálatára is.

A lymphomák proliferációs rátája független, kedvezőtlen prognosztikai faktornak bizonyult.⁵⁷⁻⁵⁸ A proliferációs aktivitás immunhisztokémiai meghatározásával szemben több előnnyel is rendelkezik; 1. a hisztológiai grade nem mindig mutat korrelációt az osztódó sejtek arányával⁵⁸, 2. egyidejűleg több tízezer sejt és 3. párhuzamosan több antigén jelölését is lehetővé teszi. Ennek segítségével kicsi tumoros populációk is vizsgálhatóvá válnak.⁵⁹ A párhuzamos antigén jelölés azért is fontos, mert B-sejtes non-Hodgkin lymphomában (nHL) az osztódó B-sejtek számával az osztódó, normális T-sejtek száma is emelkedik.⁶⁰

A fluoreszcens DNS festékek spektrális és DNS-kötő képességei technikailag megnehezítik a megbízható multiparaméteres DNS analízist. A leggyakrabban használt DNS festék, a propidium jodid széles emissziós spektruma gyakorlatilag lehetetlenné teszi a PE használatát.⁶¹ A sztöchiometrikus DNS kötődés a másik kritikus pont, amit befolyásol a kromatin kondenzáltsága, a festék szerkezete, tömege, az előkészítés, a DNS és festék aránya. A nagyméretű, interkalálódó DNS festékek, a 7-AAD-nek a leggyengébb a DNS kötő képessége. Non-sztöchiometrikus DNS kötődés esetén az aneuploidia meghatározása problémás lehet.⁶² Az UV fényvel gerjeszthető DAPI lehetővé teszi a klasszikus, 488 nm hullámhosszúságú fényt kibocsátó argonion lézerrel gerjeszthető FITC, PE, PerCP fluoreszcens festékek használatát, kis mérete miatt DNS kötő képessége is kiváló és enyhe fixálás esetén is már bejut a sejtekbe.⁶³ Fixálás megváltoztatja a sejt felszíni antigének szerkezetét és csökkenti a már sejthez kötött fluoreszcens festékek emissziós képességét. A másik, multiparaméteres DNS analízishez használható optimális festék a DRAQ5. DRAQ5 egy vitális festék, mely a DAPI-hoz hasonlóan minimális fixálást igényel. Abszorpciós spektruma egyedülálló módon több maximummal rendelkezik (622 -676 nm, 240 and 314 nm, 485–520 nm), ezért optimális módon csak az egy argon lézerrel rendelkező cytometereken használható.⁶⁴ A festék az infravörös tartományban emittál, ezért jól kombinálható a FITC és PE festékekkel.⁶⁵



3. Ábra. Fluoreszcens festékek emissziós spektrumai és spektrális átfedések. A DAPI és DRAQ5 DNA festékek és a két leggyakrabban használt antitest-konjugált festék - a FITC és RPE emissziós spektrumai között alig van átfedés, míg a propidium jodid mindkettő használatát korlátozza.

III. CÉLKITŰZÉSEK

- 1.** Csontvelői stromasejt kultúrák létrehozása és vizsgálata
- 2.** CLL pseudofolikulus in vitro modellezése: csontvelői stromasejt kultúrákban CD40 ligand és különböző citokin kombinációk CLL sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata
- 3.** CLL-sejtek különböző proliferációs és túlélési képességeinek feltárása a pseudofolikulusok in vitro modelljében
- 4.** CLL-sejtek csontvelői stromasejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata

IV. MÓDSZEREK

1. Betegek

A Regensburgi Egyetem etikai bizottságának engedélyével 21 CLL-ben szenvedő beteg mintáit, 7 nő és 14 férfi, átlagos életkor 65 év (39-84) az *in vitro* kísérletekbe, ill. 15 másik beteg mintáját klinikai mérésekbe vontunk be. A betegek a Helsinki deklaráció értelmében adták beleegyezésüket a vizsgálathoz. A diagnózist a standard klinikai irányelveknek¹ megfelelően állították fel. A vizsgált betegek vagy még soha vagy az elmúlt 3 hónapban nem kaptak CLL ellenes kezelést. A 21 *in vitro* kísérletekbe bevont beteg klinikai adatait a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. Táblázat: A 21 beteg klinikai és prognosztikai tulajdonságai

BETEGEK	THR x10 ⁹ /L	HGBI G/dL	LYMPHO- CYTA-SZÁM	ZAP70+	CD38+	MUTÁCIÓS ÁLLAPOT	MUTÁCIÓS- ARÁNY, %	Ig V-GÉN	Kor	Nem	KORÁBBI HEMO- TERÁPIA	CSONTVELŐ INFILTRÁCIÓ
20	25	6.6	9.4	72	31.2	UM ¹	0	1-69	66	F	Igen	>90%
9	49	10.1	42.0	70	50.0	UM	0	1-69	73	F	Igen	60%
28	100	13.7	43.0	53	44.8	UM	1.8	3-23	67	F	Nem	90%
11	114	12.4	87.0	41	38.0	UM	0	3-48	57	F	Nem	nv
23	115	11.6	119.0	35	1.6	M	12.4	3-7	39	N	Nem	nv
29	115	9.5	63.2	41	2.5	M	4	3-30	78	N	Igen	nv
33	140	11.3	65.0	54	32.0	UM	0	3-23	84	F	Nem	nv
17	166	11.5	304.0	83	10.0	UM	0.4	1-2	57	F	Igen	60%
13	140	12.9	69.3	6	8.0	NM ²	NM	ND	79	N	Nem	nv
16	150	12.2	42.6	21	45.0	UM	0	3-33	72	N	Igen	77%
19	153	14.3	16.0	37	8.7	UM	0.4	3-30	58	N	Igen	80%
21	167	14.5	15.0	32	0.9	UM	0	1-69	55	F	Nem	60%
31	180	13.0	74.0	13	6.6	UM	0	1-69	66	F	Nem	nv
27	211	15.7	115.7	11	4.1	M	8.0	4-34	64	F	Nem	nv
30	166	14.1	8.0	8	0.5	M	9.6	1-18	78	F	Nem	nv
18	171	17.0	20.0	11	4.6	M	9.1	3-30	67	F	Nem	20%
15	185	15.0	15.7	35	5.0	M	7.0	1-69	68	F	Nem	20%
12	200	14.3	40.0	5	18.0	M	5.9	2-5	73	F	Nem	nv
22	207	14.9	42.8	6	0.3	M	4.5	4-61	46	F	Nem	nv
32	220	14.4	10.0	13	2.0	NM	NM	4-55P	76	N	Nem	nv
14	223	13.9	38.0	6	10.0	M	5.1	3-53	73	N	Nem	nv

Thr: thrombocyta, Hgb:haemoglobin, UM: nem mutált, M: mutált, NM: nem meghatározott, F: férfi, N:nő, nv: nem vizsgált.

2. A csontvelői stromasejt (BMSCs) kultúrák előkészítése

Rutin diagnosztikai célra levett csontvelő aspirátumokból izoláltunk mononukleáris sejteket (BM-MNC) Ficoll-Hypaque grádiens segítségével. Kizárólag kezeletlen, nem CLL-ben szenvedő betegek csontvelő aspirátumát használtuk, melyben kóros populáció nem volt kimutatható. 6-lyukú tenyésztőlemezen $6-8 \cdot 10^5$ BM-MNC tenyésztettünk lyukanként 1 ml Dulbecco modified Eagle médiumban (DMEM; Seromed-Biochrom) 37 °C-on, ami még 20% FCS-t, 100 U/mL penicillint és 100 µg/mL streptomycint tartalmazott. 1 hét után teljes médiumcserével a ki nem tapadt sejteket is eltávolítottuk, majd hetente két alkalommal történt médiumcsere. Átlagosan 4 hét után alakult ki összefüggő réteg, amit egy-két alkalommal osztottunk szét. Az érett, összefüggő réteg átlagosan $1-2 \cdot 10^5$ stromasejtet tartalmazott lyukanként. A BMSC sejteket RLT-ben (Qiagen Inc.) vettük fel mRNS izolálásához.

3. Stromasejtek immunfenotípezálása

A stromasejteket 0,04% EDTA oldattal távolítottuk el a lemezekről 37 °C-on. A sejteket mostuk, majd $5 \cdot 10^5$ sejt/100 µl koncentrációban inkubáltuk konjugált monoklonális antitestekkel. Mosás után a sejteket 0,5 ml PBS pufferben szuszpendáltuk és LSR II áramlási-cytométeren (BD Biosciences) mértük.

4. Citokinek mérése

A sejt kultúrák felülúszóiból határoztuk meg a szekretált citokinek szintjét Beadlyte Human Multi-Cytokine Detection System 3 (Upstate Biotechnology) segítségével. Ezzel a rendszerrel egyidejűleg mérhető az IL1β, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, TNFα, IFNγ és GM-CSF szintje 0,7 pg/ml koncentrációtól. A jelölés során a mintákat először Beadlyte Anti-Human Multi-Cytokine gyöngyökkel, majd biotinizált Beadlyte Anti-Human Multi-Cytokine antitestekkel, végül Beadlyte Streptavidin-Phycoerythrin-nel inkubáltuk. A mintákat Luminex® 100™ műszerrel analizáltuk.

5. CLL sejtek izolálása

Perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC) Ficoll-Hypaque gradiensen keresztül, centrifugálással izoláltunk, majd a sejteket konjugált monoklonális antitestekkel jelöltük:

FITC-jelölt anti-glycophorin A, PE-jelölt anti-CD14, anti-CD56 és allophycocyanin (APC)-jelölt anti-CD3. A lymphocytákra eső, jelöletlen sejteket FACSAria Cell Sorter (BD Biosciences) segítségével szortoltuk ki. Az így izolált sejtpopuláció legalább 98%-ban tartalmazott CD19, CD5 kettősen pozitív CLL- sejteket.

6. Sejtkultúra

A CLL-sejteket 10^6 sejt/0,5 ml koncentrációban tenyésztettük a következő körülmények között; 1. BMSCs fedett lemezeken, 2. BMSCs és sCD40L, 3. BMSCs, sCD40L és IL4, 4. BMSCs, sCD40L, IL2 és IL10, 5. DMEM médiumban, 6. médium és sCD40L, 7. médium, sCD40L és IL4, 8. médium, sCD40L, IL2 és IL10. A sejteket 84 óra inkubálás után szedtük fel.

A sejtkultúrában alkalmazott csontvelői stromasejtek érettek voltak és nem differenciálódtak makrofágokká vagy zsírsejteké. A sejtkultúrákban 10% FCS-t, 100 U/mL penicillint és 100 µg/mL streptomycint tartalmazó DMEM médiumot, illetve humán rekombináns reagenseket alkalmaztunk; sCD40L: 1 µg/ml koncentrációban, IL4: 10 ng/ml, IL2: 100 U/ml, IL10: 10 ng/ml (mind PeproTech EC, illetve sCD40L PeproTech EC és R&D Systems).

7. Multiparaméteres DNS analízis

A gyártó által előírt módon először a sejtfelszíni antigéneket jelöltük fluoreszcens festékekkel konjugált monoklonális antitestekkel. Az alkalmazott antitesteket a 3. táblázatban soroltuk fel. 1,5% formaldehidet tartalmazó ún. FACS lysing oldattal (BD Biosciences) a vörösvértesteket oldottuk és egyidejűleg a sejteket is fixáltuk. Mosás után a sejteket 2%-os DAPI oldattal (Molecular Probes) jelöltük, majd LSR II áramlási-

cytométeren (BD Biosciences) mértük. Az adatokat FACSDiva software (BD Biosciences) vagy Wincycle software (Phoenix Flow Systems) segítségével értékeltük.

Az antigén kifejeződést és sejt-ciklus megoszlást a CD5, CD19 pozitív - CLL populációban vizsgáltuk. Doublet-ek elkülönítéséhez a DAPI “Signal Area és Signal Width” paramétereket használtuk. Az antigén sűrűséget relatív fluoreszcencia intenzitásban (RFI) fejeztük ki. Az RFI-t a jelölt CLL-sejtek és a negatív kontroll közepes fluoreszcencia intenzitás (MFI) arányából számoltuk ki. Negatív kontrollként izotípus kontrollokat használtunk.

3. Táblázat: Immunfenotipizáláshoz alkalmazott monoklonális antitestek

Antigén	Fluorokróm	Gyártó	Klón
HLADR	FITC	BC/IOT	B8.122
CD69	FITC	BD	Leu-23
CD49d	FITC	BC/IOT	HP2/1
CD38	FITC	BC/IOT	T16
CD44	FITC	BD	J173
Glycophorine A	FITC	DAKO	JC159
CD106	FITC	BD	51-10C9
CD23	PE	BD	EBVCS-5
CD40	PE	BC	EA-5
CD18	PE	BD	c6.7
CD54	PE	BD	LB-2
CD138	PE	Serotec	B-B4
CD86	PE	BD	B70/B7-2
CD14	PE	BC/IOT	RM062
CD56	PE	BD	My31

CD20	PerCP	BD	L27
CD19	PE-Cy5	BD	HIB19
CD3	APC	BD	SK7
CD5	APC	BD	L17F12
CD11c	APC	BD	S-ACL-3
CD19	APC	BD	SJ25C1
CD38	APC	BD	HB-7
CD45	APC	BC/IOT	J33
CD184	APC	BD	12G5
CD5	PE-Cy7	BD	L17F12
CD25	FITC	BC/IOT	B1.49.9

8. Apoptózis analízis

5 x 10⁵ szortolt vagy sejtkultúrából izolált CLL-sejtet hideg PBS pufferben mostunk, majd 100 µl annexin-kötő pufferben (BD Biosciences) szuszpendáltuk, ami 1 µg/ml koncentrációban tartalmazott propidium jodidot (PI) (Sigma Aldrich) és 5 µl FITC-konjugált annexin V-öt (BD Biosciences). 15 perces inkubációs idő után a mintákhoz további 400 µl annexin-kötő puffert adtunk, majd LSR II flow-cytometeren mértük és FACSDiva software-rel értékeltük. Az élő sejtek PI és annexin V-negatívak maradtak.

A DNS fragmentációt DAPI festéssel vizsgáltuk a fentebb leírtaknak megfelelően. Az apoptotikus sejtek normálnál kevesebb DNS-t tartalmaznak és a sub-G1 régióban láthatók.

9. A túlélő sejtpopuláció számítása

A tenyésztett CLL-sejteket Casy Cell Counter Model DT segítségével számoltuk. Az élő sejtek számát az abszolút sejttszámból kivont Annexin V pozitív frakció adta. A

kultúrába vitt Annexin V negatív sejtszámot vettük 100%-nak. A CLL-sejtek túlélését a sejt-kultúra előtt és után számított élő sejtek különbsége jelentette.

10. IRF4 immunhisztokémiai jelölése

Formalinnal fixált CLL sejtek cytospin preparátumait használtuk az IRF4 immunhisztokémiai jelöléséhez. A cytospineket magas hőmérsékleten előkezeltük, majd 11 µg/mL koncentrációban MUM1-antitesttel (Dako) 32 percig inkubáltuk. A fehérjét streptavidin-biotin complex módszerrel detektáltuk (sABC) (Ventana), a sejtmagokat pedig hematoxylinnal (Merck) jelöltük.

11. Immunfixáció

A sejt-kultúrák szupernatánsában immunfixációs technikát (Hydragel, Sebia) alkalmaztunk az immunglobulinok, kappa és lambda szabad könnyűláncok vizsgálatához. Az immunfixációt hígítatlan mintákon végeztük követve a gyártó ajánlásait. Myelomás betegek szérumát használtuk pozitív kontrollként.

12. Génexpressziós analízis

Az mRNS-t QIA-Amp mRNA isolation mini kit (QIAGEN) segítségével izoláltuk, RNS tisztaságát és integritását Agilent 2100 bioanalyzer-rel (Agilent Technologies) ellenőriztük, cDNS-t pedig ImProm-II Reverse Transcriptase System (Promega) segítségével szintetizáltattuk. A gén expressziós méréseket TaqMAN génexpressziós módszerrel (AssayOnDemand, Applied Biosystems) végeztük HT-7900 real time PCR géppel (Applied Biosystems). Deltadelta-Ct módszert alkalmazva SDS2.2 software segítségével (ABI) analizáltuk az eredményeket.

13. IgV_H család meghatározás

CLL-sejtekből izolált 50 ng DNS mintát amplifikáltunk V_H család specifikus FR1 sense és J-régió antisense primerekkel^{66,67} (4. Táblázat). Betegenként hat különböző reakciót végeztünk, mindegyikben három, különböző fluoreszcensen jelölt FR1 primert és 1 J-régió primert használtunk: 1. mix 6FAM-V1/3/7, NED-V5 és HEX-V6; 2. mix NED-V1/7, HEX-V2 és 6FAM-V4; mindkettőt J-régió A, B vagy C primerekkel kombináltuk.

A reakciókeverék 25 µl oldat volt, mely 3 sense és 1 antisense primer, 200 µM 4 dNTP, 1,5 mM MgCl₂ és 5U AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems) elegyből állt. A PCR eljárás első fázisa 5 percig tartott 95 °C, a második fázis 36 ciklusból állt 40 másodperc 55°C, 95°C és 72°C-on, a harmadik fázis 10 percig tartott 72°C hőmérsékleten.

PCR termékeket ABI PRISM® 3100-*Avant* Analizálón GeneScan v.3.7 software (Applied Biosystems) segítségével vizsgáltuk. A fragmentek mérete 330 és 400 bp között változott.

A V-primer kötőhelyén lévő mutációk esetén un. leader primert használtunk⁶⁷ (5. Táblázat) a PCR eljárás kondícióit némileg változtatva: 1. fázis 5 percig tartott 94 °C, a 2. fázis 32 ciklusból 45 másodperc 94°C, 30 másodperc 60°C, 45 másodperc 72°C, a 3. fázis 10 percig tartott 72°C hőmérsékleten. A fragmentek mérete 500 és 550 bp között változott.

4. Táblázat. IgV_H gén PCR, fragment analízis és szekvenáláshoz alkalmazott primerek.

PRIMER	Jelölés és szekvencia	koncentráció
FR1-V1/3/7	(6FAM)-GGT GCA GCT GGT GSA GTC	200 nM
FR1-V1/7	(NED)-CCT CAG TGA AGG TYT CCT GC	80 nM
FR1-V2	(HEX)-ACC TTG ARG GAG TCT GGT CC	80 nM
FR1-V4	(6FAM)-GAC CCT CTC CCT CAC CTG YG	80 nM
FR1-V5	(NED)-AAA GCC CGG GGA GTC TCT G	320 nM
FR1-V6	(HEX)-CCC TCG CAG ACC CTC TCA C	320 nM
Join A	CCT GAG GAG ACG GTG ACC	320 nM
Join B	CCT GAA GAG ACG GTG ACC A	80 nM
Join C	CCT GAG GAG ACA GTG ACC AG	80 M

5. Táblázat. IgV_H gén leader régió PCR és szekvenáláshoz alkalmazott primerek.

PRIMER	Jelölés és szekvencia	koncentráció
Leader-V _L 2	CAC (G/A)CT CCT GCT GCT GAC CA	400 nM
Leader-V _L 3a	GCT GGG TTT TCC TTG TTG C	400 nM
Leader-V _L 3b	ATG GAG TT(T/G) GG(A/G) CTG AGC TG	400 nM
Leader-V _L 4	GCT CCC AGA TGG GGT CCT G	400 nM
Leader-V _L 5	CTC CTC CTG GCT GTT CTC C	400 nM
Leader-V _L 6	CTG TCT CCT TCC TCA TCT TCC	400 nM

14. Az IgH V, D és J régiók szekvenálása

50 ng tisztított PCR terméket szekvenáltunk 20 µl BigDye® Terminator v1.1 szekvenáló Kit (Applied Biosystems) és 6,4 pmol jelöletlen sense és antisense primer segítségével. Az eljárás első fázisa 35 15 másodperces ciklusból állt 95°C és 55°C, a második fázis 4 percig tartott 60°C-os hőmérsékleten. Az értékelést Sequencing Analysis v.3.7 software segítségével végeztük. A szekvenciákat a Gene-DB <http://imgt.cines.fr/>, V-Base <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/> és GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/> adataival hasonlítottuk össze. A mutáció arányát a megváltozott nukleotidok és a V_H gén germline nukleotid számának arányából számoltuk. Az első 20-40 bázis nem ismert, mert ezt a sense primer fedte.

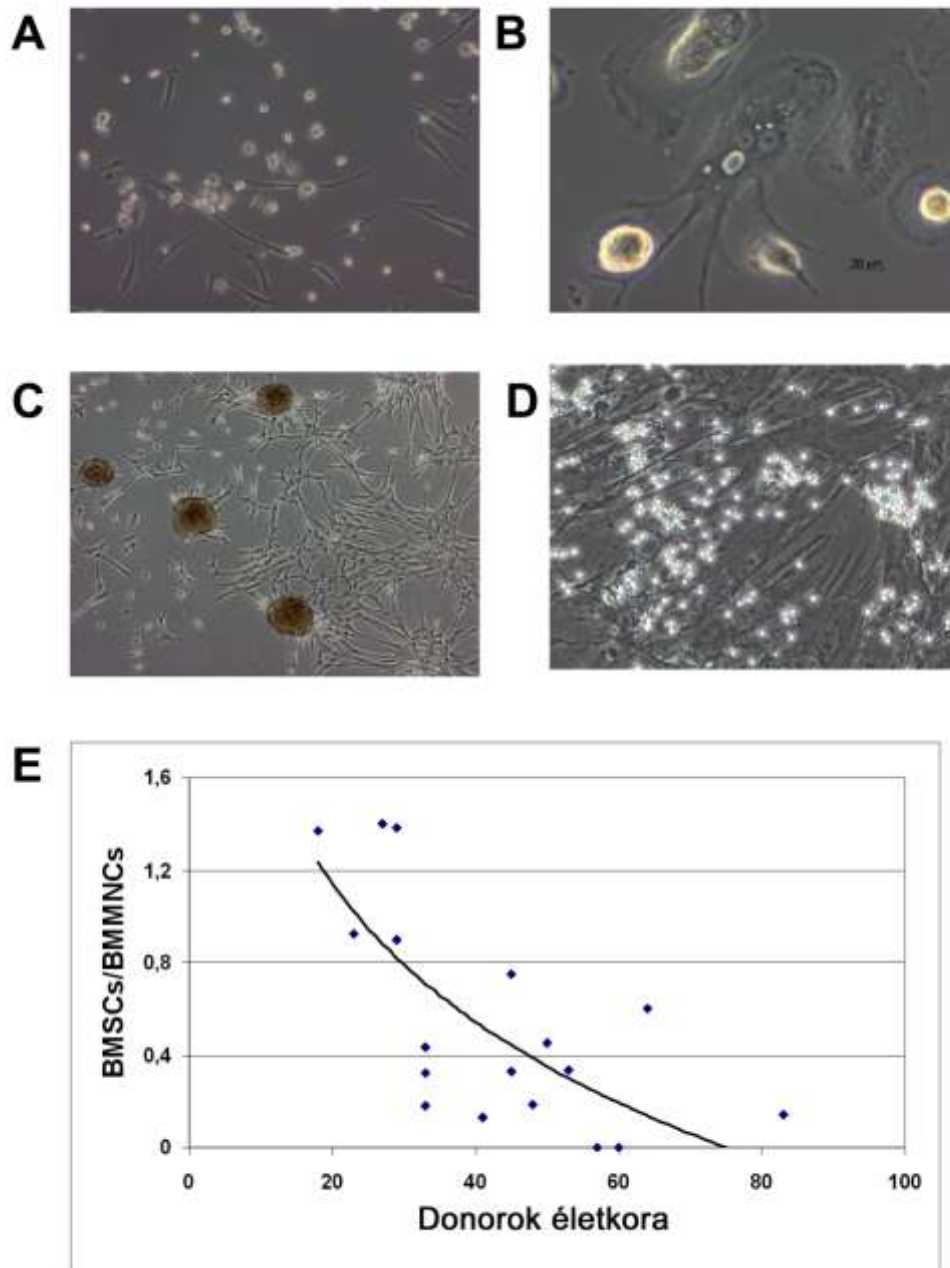
15. Statisztika

Statisztikai analízisekhez függő mintáknál egymintás t-próbát, független mintáknál kétmintás t-próbát használtunk. Az analízist SigmaPlot 8 programon végeztük, $p < 0,05$ -öt véve szignifikánsnak. Az eredményeket átlag \pm SEM formájában ábrázoltuk, ahol * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ szignifikancia szintet jelent.

V. EREDMÉNYEK

1. Csontvelői eredetű stromasejt kultúrák fejlődése

Normális, nem CLL-es betegekből származó csontvelői aspirátumokból izolált mononukleáris sejtekből 3-5 nap alatt adherens, kerek vagy orsó alakú sejtek jelentek meg, melyekhez lymphoid morfológiájú sejtek tapadtak. Néhány nap elteltével ezek hosszú nyúlványok segítségével hálózatot képeztek (4.a. ábra), illetve dupla sejtmag alakult ki bennük (4.b. ábra). 2-3 hét alatt az összes lymphoid sejt levált és az adherens sejtek góciókban osztódva bonyolult noduláris struktúrákat hoztak létre (4.c. ábra). Az adherens sejtek osztódási képességét befolyásolta a donorok életkora. Fiatalabb donorok csontvelői mononukleáris sejtjeiből jelentősen több csontvelői stromasejt képződött (4.e. ábra). Átlagosan 6 hét (4-10 hét) után a csontvelői eredetű stromasejtek elveszítették osztódási képességüket, nagy kerek sejtekké alakultak és konfluens monolayer képeztek (4.d. ábra).

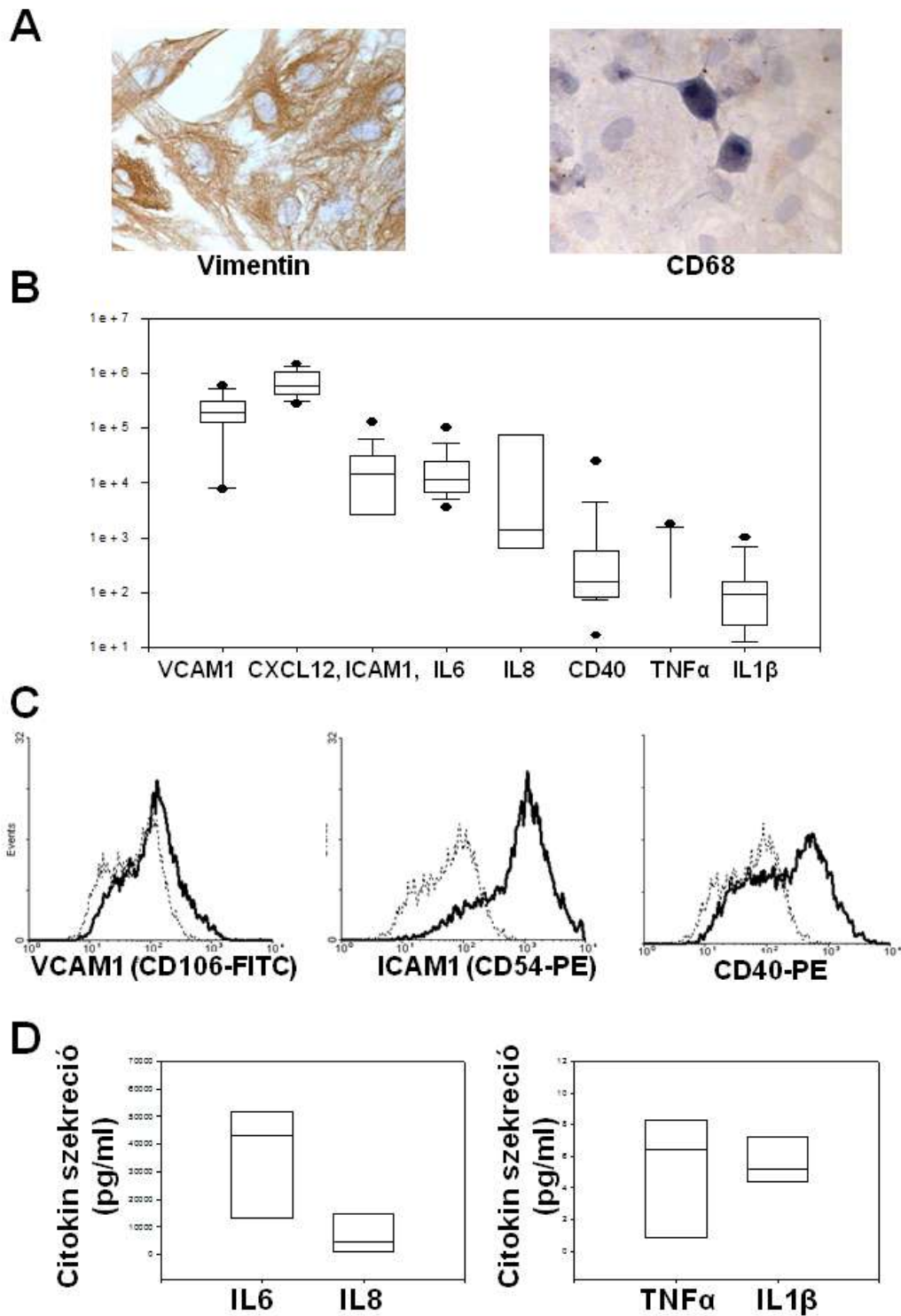


4. **Ábra. Csontvelői stromasejtek *in vitro* fejlődése.** **A.** Egy hetes stromasejt kultúra adherens, orsó-alakú stromasejt elő alakokkal és rájuk tapadó lymphocytákkal (nagyítás 20x). **B.** Stromasejtek kettős sejtmaggal, hosszú nyúlványokkal és hozzájuk kötődő, túlélő lymphocytákkal (nagyítás 100x). **C.** Góccokban proliferáló stromasejtek, melyek a mátrix meszesedés jeleként nodulusokat képeznek (nagyítás 20x). **D.** Érett csontvelői stromasejtek CLL sejtekkel (nagyítás 20x). **E.** Fiatal donorokból izolált csontvelői

mononukleáris sejtekből több stromasejt fejlődik. Rövidítések: BMSCs csontvelői eredetű stromasejtek, BMMNCs csontvelői eredetű mononukleáris sejtek.

2. Csontvelői eredetű stromasejtek jellemzése

Megvizsgáltuk a kifejlődött stromasejtek néhány olyan gén-, antigén expresszióját, citokin szekrécióját, melyek jellemzőek a stromasejtekre, valamint jelentőséggel bírnak a CLL-sejt apoptózisgátlásban. A stromasejtekben a mesenchymális eredetű citoszkeleton fehérje, vimentin erősen festődött, míg a sejtek többsége a monocyta és szöveti makrofág antigént (CD68) egyáltalán nem fejezte ki (5.a. ábra). Jellemzően a stromasejtekre CD45 mRNS-t nem tudtunk kimutatni⁶⁸, mely bizonyítja a stromasejtek nem-hemopoetikus eredetét (nem közölt adat). VCAM-1, ICAM-1 adheziós molekulák, valamint az IL6, IL8 citokinek és CXCL12 kemokin génjei is magas szinten fejeződtek ki. A CD40, IL-1 β , TNF α mRNS szinten bár kimutatható volt, de lényegesen alacsonyabb mértékben, mint az IL6 és IL8 (5.b. ábra). A génexpressziós vizsgálatok eredményeihez hasonlóan a stromasejtek felszínén a VCAM-1, ICAM-1, CD40 antigéneket immunfenotípezálással is kimutattuk (5.c. ábra). Multiplex bead assay–vel a sejt kultúrák felülúszóiban nagy mennyiségű IL6, IL8 és lényegesen kevesebb IL-1 β , TNF α citokint detektáltunk (5.d. ábra).



5. Ábra. Csontvelői stromasejtek jellemzői. A. Csontvelői stromasejtek vimentint tartalmaznak, de CD68 általában nem mutatható ki rajtuk (nagyítás 100x). **B.** A stromasejtek nagy mennyiségben fejezik ki a VCAM1, CXCL12, ICAM1, IL6 és

kevésbé, de még kimutathatóan az IL-1 β , CD40, TNF α génjeit. Az eredményeket box plot formában a medián, 10, 25, 75, 90 percentilisek és szórás bemutatásával ábráztuk. **C.** Stromasejtek felszíni antigén expressziója mAb (fekete vonal), Izotípus kontroll (szaggatott vonal). **D.** A szupernatánsban magas koncentrációban mértünk IL-6 és IL-8, valamint alacsonyabb koncentrációban IL-1 β , TNF α citokineket.

3. BMSCs jelentős immunfenotípus változást indukált a CLL-sejteken, míg a sCD40L csak marginális hatást fejtett ki

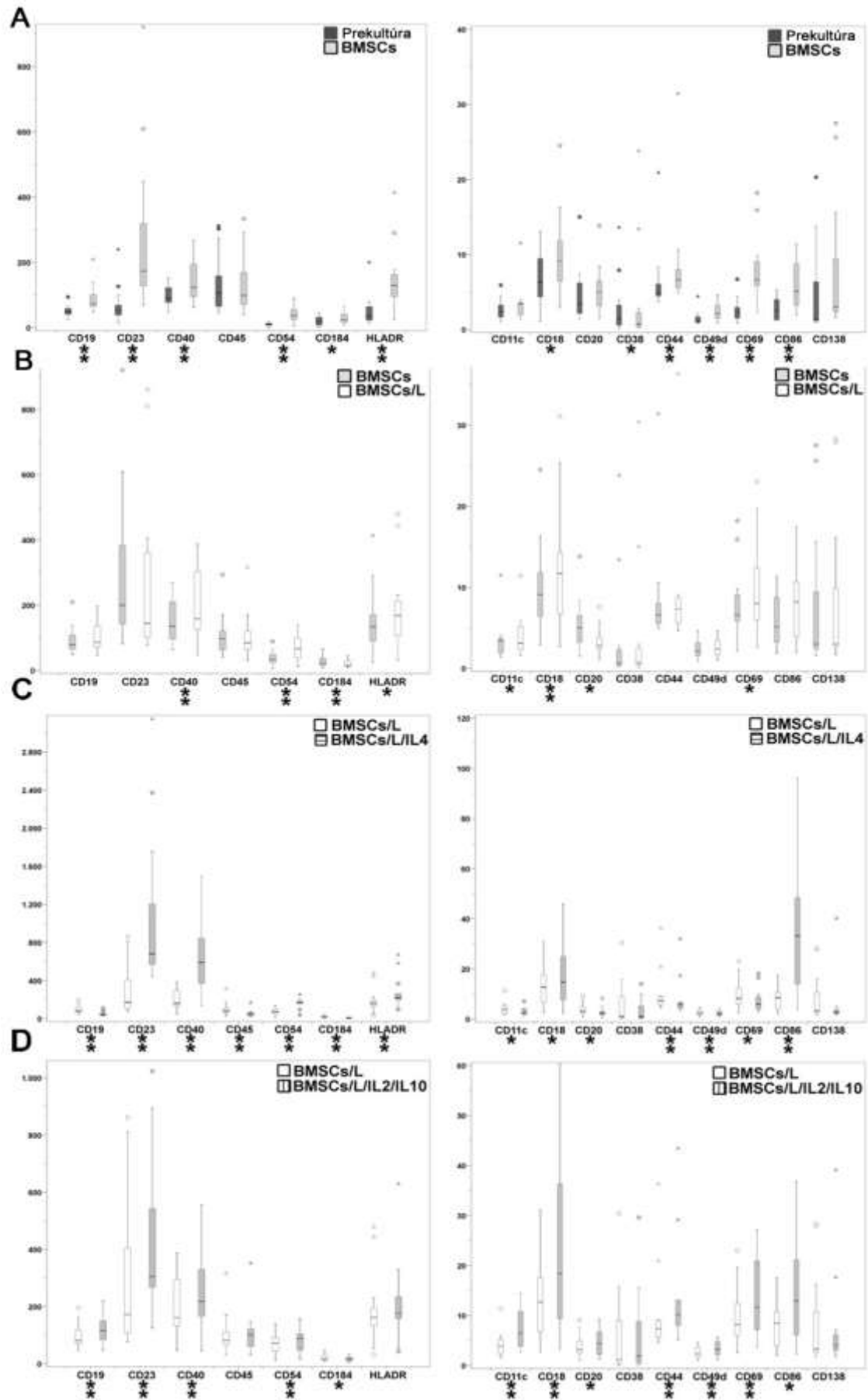
BMSCs hatására a CLL sejtek a vizsgált antigének többségének expresszióját fokozták a 84 órás sejt kultúra végére. CD23, CD69 aktivációs antigének, HLA-DR, CD86 (B7-2) koreceptorok és CD54 (ICAM-1), CD49d antigének expressziós szintje három-, négyszeresére nőtt, míg a CD19, CD40, Pgp-1 (CD44) kifejeződése másfél-, kétszeresére fokozódott. A CD45 expresszió nem változott. (6.a. Ábra)

CLL sejtek differenciálódását néhány plazmasejt érésben szerepet játszó gén expressziójával is vizsgáltuk; 1. IRF4, normális B-sejtekben a CD40L és IL4 célpontja⁶⁹, 2. PAX5, a BSAP fehéréjét kódolja és nélkülözhetetlen a B-sejt irányú differenciálódáshoz⁷⁰, 3. BLIMP1, a PAX5 transzkripció gátlója⁷¹, 4. CD138 (Syndecan-1) érett plazmasejt marker⁷².

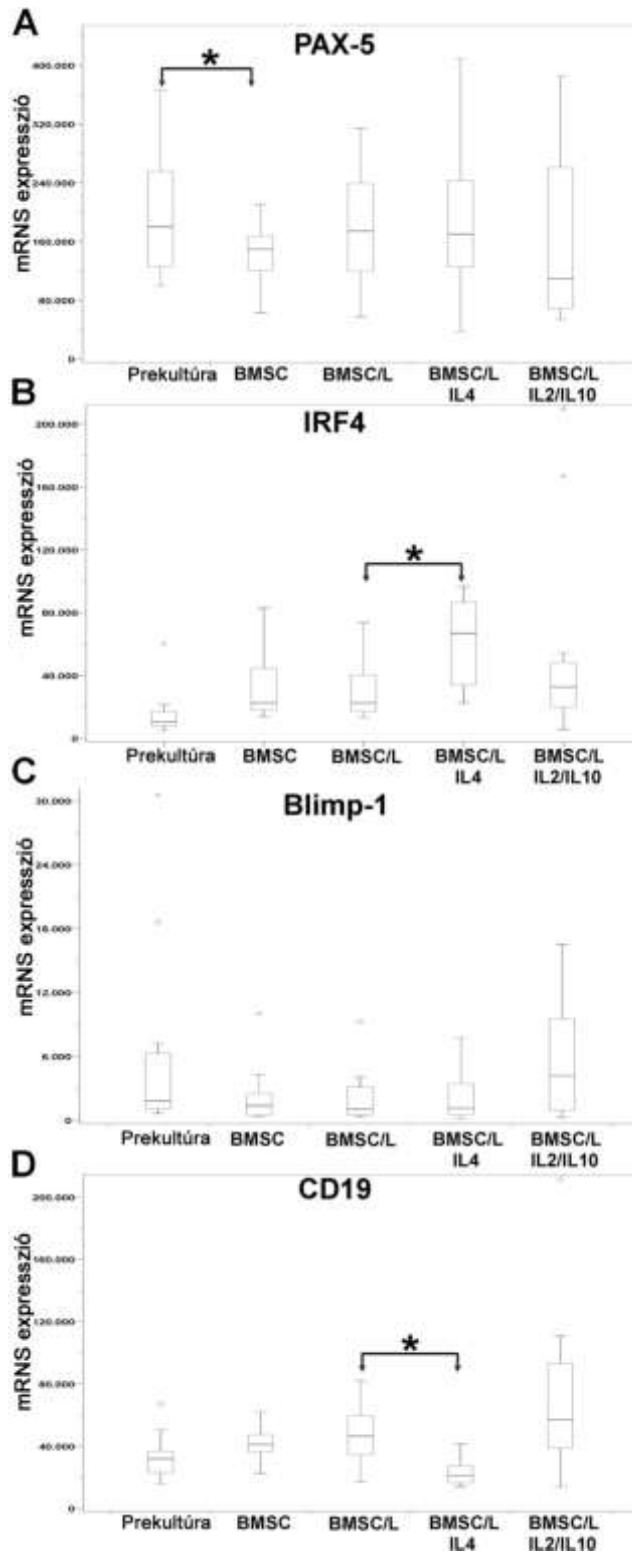
A perifériás vérből izolált CLL-sejtek a PAX5 és IRF4 mRNS-t erősen, míg a BLIMP1 gént gyengén fejték ki (7.a-c. ábra). CD138 mRNS alig vagy egyáltalán nem volt kimutatható az izolált és a tenyésztett CLL-sejtekben (nem közölt adat).

BMSCs hatására a CLL-sejtekben csökkent a PAX5 és BLIMP1 expresszió, míg az IRF4 mRNS szintje emelkedett, de e változások közül csak a PAX5 bizonyult statisztikailag szignifikánsnak (7.a-c. ábra).

A sCD40L csak gyenge addicionális hatást gyakorolt a BMSCs-n tenyésztett CLL-sejtek immunfenotípusára (6.b. ábra) és gén kifejeződésére (7. ábra). Az antigének közül a CD11c, CD18, CD40, CD54 és HLADR kifejeződése indukálódott, míg a CD20 és CD184 kifejeződése szignifikánsan csökkent, de a változások mértéke kisebb volt a BMSCs indukálta változásokhoz képest (6.a-b. ábra).



6. Ábra. BMSCs és T-sejt eredetű citokinek befolyásolják a CLL-sejtek immunfenotípusát. 84 órás tenyésztés után a CLL-sejteket immufenotívizáltuk. **A.** Fekete színnel a sejt kultúra előtti, szürke színnel BMSCs-en tenyésztett sejtek antigén expressziója. **B.** Szürke színnel BMSCs-en, fehér színnel a BMSCs-en CD40 Liganddal tenyésztett sejtek antigén expressziója. **C.** Fehér színnel a BMSCs-en CD40 Liganddal, horizontális csíkokkal a BMSCs-en CD40 Liganddal és IL4 citokinnel tenyésztett sejtek antigén expressziója, **D.** Fehér színnel a BMSCs-en CD40 Liganddal, vertikális csíkokkal a BMSCs-en CD40 Liganddal és IL2, IL10 citokinekkal tenyésztett sejtek antigén expresszióját ábrázoltuk. 15-18 kísérletből származó relatív fluoreszcencia intenzitásokat (RFI) box plot formában a medián, 25, 75 percentilisek, a szórás és a kieső (gyűrű) és extrém kieső (háromszög) értékek bemutatásával ábrázoltuk. Az RFI változásokat egymintás t-próbával analizáltuk, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.001$ esetén tekintettünk egy különbséget szignifikáns mértékűnek.



7. **Ábra. CLL-sejtek transzkripciós analízise.** RNS expressziót tetszőleges egységekben ábrázoltuk a 18s RNS expresszióhoz képest. A BMSC-ből származó RNS kontaminációt a VCAM-1 RNS meghatározásával vizsgáltuk és elhanyagolhatónak találtuk. 11-12 kísérletből származó relatív mRNS kifejeződések box plot formában a

medián, 25, 75 percentilisek, a szórás és a kieső (gyűrű) és extrémén kieső (háromszög) értékek bemutatásával ábrázoltuk, a változásokat páros t-próbával analizáltuk, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$ esetén tekintettünk egy különbséget szignifikáns mértékűnek.

4. CLL-sejtek IL4 hatására képesek normális B-sejtekhez hasonlóan differenciálódni

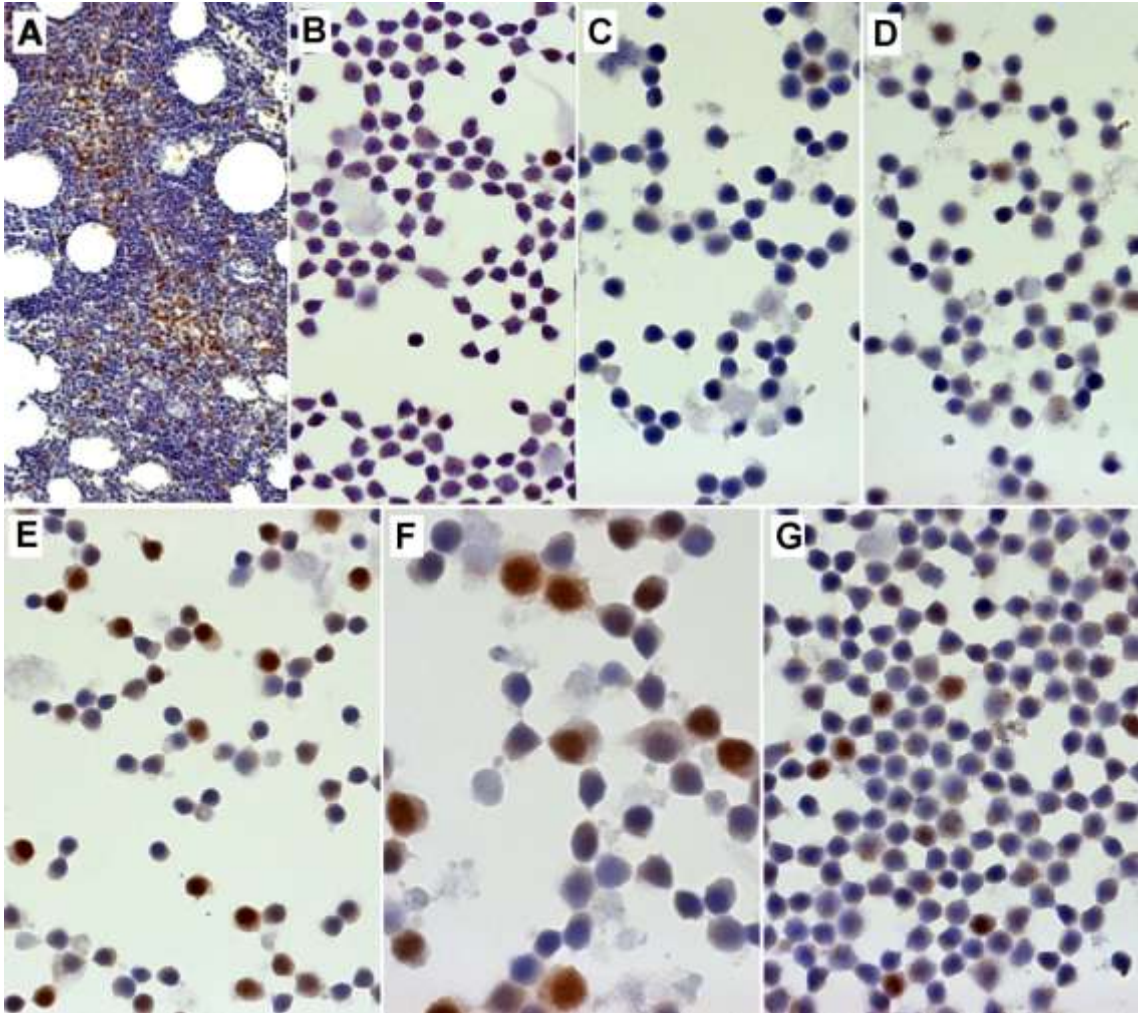
A BMSC-n sCD40L jelenlétében tenyésztett CLL-sejteken IL4 hatására drámai módon fokozódott a CD23, CD40, CD54, CD86, míg kisebb mértékben, de szintén nőtt a CD18, HLADR antigének kifejeződése is. További antigének expressziója, mint a CD45, az aktivációs antigén CD69, B-sejt specifikus antigének CD19, CD20, adhéziós antigének CD11c, CD49d, CD44 és a kemokin receptor CD184 (CXCR4) viszont csökkentek. Az IL4 nem befolyásolta a CD138 antigén expresszióját (6.c. ábra). A CD19 mRNS az antigénhez hasonlóan csökkent (7.d. ábra).

12 vizsgált esetből 10-ben az IL4 hatására jelentősen nőtt az IRF4 mRNS mennyisége a BMSCs-n sCD40L mellett tenyésztett CLL-sejtekben (7.b. ábra).

Az IRF4 transzkripció vizsgálatok eredményét CLL infiltrált crista biopsziás metszeteken és tenyésztett CLL-sejtek cytospin preparátumain immunhisztokémiával is megerősítettük. A csontvelő biopsziás mintákban IRF4 pozitív sejtek góckban vagy elszórtan, de mindig kimutathatóak voltak (8.a. ábra). A perifériás vérből származó CLL-sejtek heterogén módon fejezték ki az IRF4 antigént (8.b. ábra). BMSC-n sCD40L, illetve IL2 és IL10 jelenlétében sem fokozódott IRF4 kifejeződés (8.c,d,g. ábra). IL4 hatására az erősen pozitív sejtek száma nőtt, valamint a sejtek többségében legalább enyhe IRF4 termelés indult meg (8.e. ábra). A legintenzívebb IRF4 festődés a nagyobb sejtek excentrikus sejtmagjában figyelhető meg (8.f. ábra).

A B-sejt jellegért felelős PAX5 mRNS (7.a. ábra), a plazmasejt specifikus BLIMP1 mRNS (7.c. ábra) és a CD138 mRNS (nem közölt adat) termelés nem változott. Az IL4 hatására fokozódó IRF4 és csökkenő CD19, CD20 és CD45 kifejeződés plazmasejt irányú differenciálódásra utalhat, annak ellenére, hogy a BLIMP1 és CD138 expresszió nem indukálódott. A plazmasejt irányú differenciálódás lehetőségét tovább vizsgáltuk a szekretált immunglobulinok meghatározásával a sejtkultúrák szupernatánsában, de

immunfixációval 5 vizsgált eset egyikében sem tudtunk immunglobulint kimutatni (nem közölt adat).



8. Ábra. CLL sejtekben IRF4 kifejeződés vizsgálata immunhisztokémiával. **A.** CLL infiltrált csontvelő; IRF4 pozitív (barna) sejtek láthatók (eredeti nagyítás 20x). **B-G.** Szortolt és tenyésztett CLL-sejtek IRF4 immunhisztokémiai festése cytospin preparátumokon (eredeti nagyítás 40x, F képen 100x): **B.** szortolt CLL-sejtek, **C.** BMSC-n, **D.** BMSC-n CD40 liganddal, **E-F.** BMSC-n CD40 liganddal és IL4 citokinnel, **G.** BMSC-n CD40 liganddal és IL2, IL10 citokinekkal tenyésztett CLL-sejtek.

5. IL2 és IL10 kombináció hatására megváltozott a CLL-sejtek BMSCs és sCD40L indukálta immunfenotípusa

IL2 és IL10 hatására a vizsgált adhéziós antigének többségének -CD11c, CD18, CD44, CD49d, CD54- expressziója fokozódott, míg a SDF-1 receptor CD184 kifejeződése csökkent. A B-sejt specifikus CD19, CD20, az aktivációs antigén CD23, CD69 és a T-sejt kostimulátor CD40 és CD86 is felregulálódott. IL2 és IL10 kombináció nem változtatta meg a CD45, HLADR expressziót, illetve heterogén módon befolyásolta a CD38 kifejeződését (6.d. ábra). Az IL4 hatásához képest itt a CD23, CD40, CD86 indukció mértéke kisebb volt (6.c-d. ábra). Az összes vizsgált esetben az antigén változások hasonló mértékben, a proliferációtól függetlenül alakultak ki.

IL2 és IL10 kombináció hatására a tenyésztett CLL-sejtekben PAX5 mRNS expresszió nem változott, míg a CD19, IRF4, és BLIMP1 mRNS emelkedett, de ezek a változások matematikailag nem voltak szignifikánsak (7. ábra).

6. Osztódásra csak a klinikailag progresszív esetekből származó CLL-sejtek indukálhatók

Az antigén struktúrát nem befolyásoló enyhe fixáció és a kiváló DNS kötődésű, alacsony spektrális átfedést okozó DNS festék, a DAPI segítségével a multiparameter DNS jelölés követelményeit kielégítő analízist végeztünk⁶⁵.

A 21 vizsgált CLL eset egyikében sem tudtunk osztódó sejteket kimutatni a perifériás vérben (9.a. ábra). A BMSCs, sCD40L és az IL4 sem önmagában, sem kombinációban nem indukált osztódást a tenyésztett CLL-sejtekben (nem közölt adat). A sCD40L indukcióhoz két különböző gyártó reagensét, több koncentrációban (0,5; 1,0; 3,0; és 5,0 µg/ml) is kipróbáltuk, de proliferációt egyik esetben sem tudtunk kimutatni (nem közölt adat).

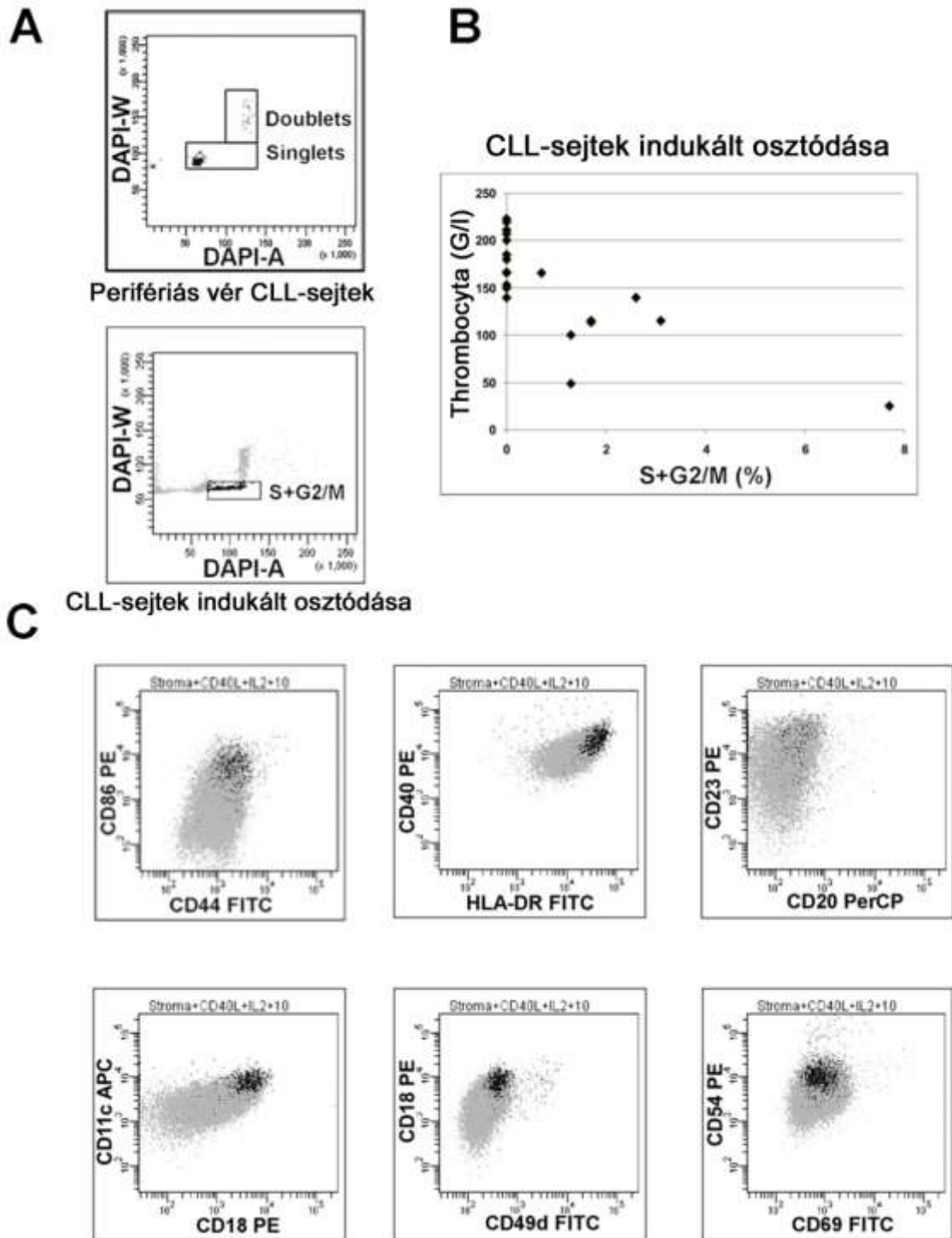
A sCD40L, IL2 és IL10 koktél váltott ki 21-ből 8 esetben osztódást a BMSCs-n tenyésztett CLL-sejtek között (9.a. ábra).

Mindegyik thrombocytopeniás esetből izolált CLL-sejtek képesek voltak osztódni. Két olyan esetből származó CLL-sejtek is osztódtak, ahol a thrombocytaszám a normál tartomány alsó határán helyezkedett el (140-166 G/l). Egyik betegnél sem észleltünk autoimmun thrombocytopeniára utaló izolált thrombocytopeniát a betegség progresszióját mutató egyéb jelek nélkül. A nyolc proliferációképes eset közül hatban csírasejtvonal nukleotid szekvenciájú IgV_H régiót, hétben anaemiát, mindegyikben ZAP70 és csak 5-ben CD38 kifejeződését mutattunk ki (2. Táblázat, első nyolc beteg). A sejtciklus S és G2/M fázisában lévő sejtek aránya 0,7-7,8% között változott 84 órás tenyésztés után (9.b. ábra). A különböző proliferációs válasz nem függött össze a kontamináló T-sejtek számával, mivel a T-lymphocyták aránya a sejt kultúra végén mindig 1% alatt volt (nem közölt adat), illetve az IL2R α (CD25) kifejeződéssel sem, ami rendkívül heterogén módon fokozódott a tenyésztés során (10. ábra).

Egy specifikus proliferáció-asszociált CLL immunfenotípus ismerete megkönnyítené a kicsiny osztódó populációk azonosítását és megbízható DNS analízis elvégzését, ezért vizsgáltuk az S+G2/M kapuba eső sejtek immunfenotípusát. Az osztódó sejtek a CD44, CD54, CD18, CD11c, CD49d adhéziós molekulákat és CD40, HLADR, CD86 T-sejt koreceptorokat intenzívebben fejezték ki. Az osztódó sejtek többségén az alacsony affinitású IgE receptor, CD23 szintén intenzívebben jelent meg, ugyanakkor a CD69, egy másik aktivációs antigén expressziója nem fokozódott. Az intenzívebb antigén kifejeződés és a nagyobb sejtméret közötti összefüggést az FSC/SSC plotba visszakupuzással kizártuk (9.c. ábra).

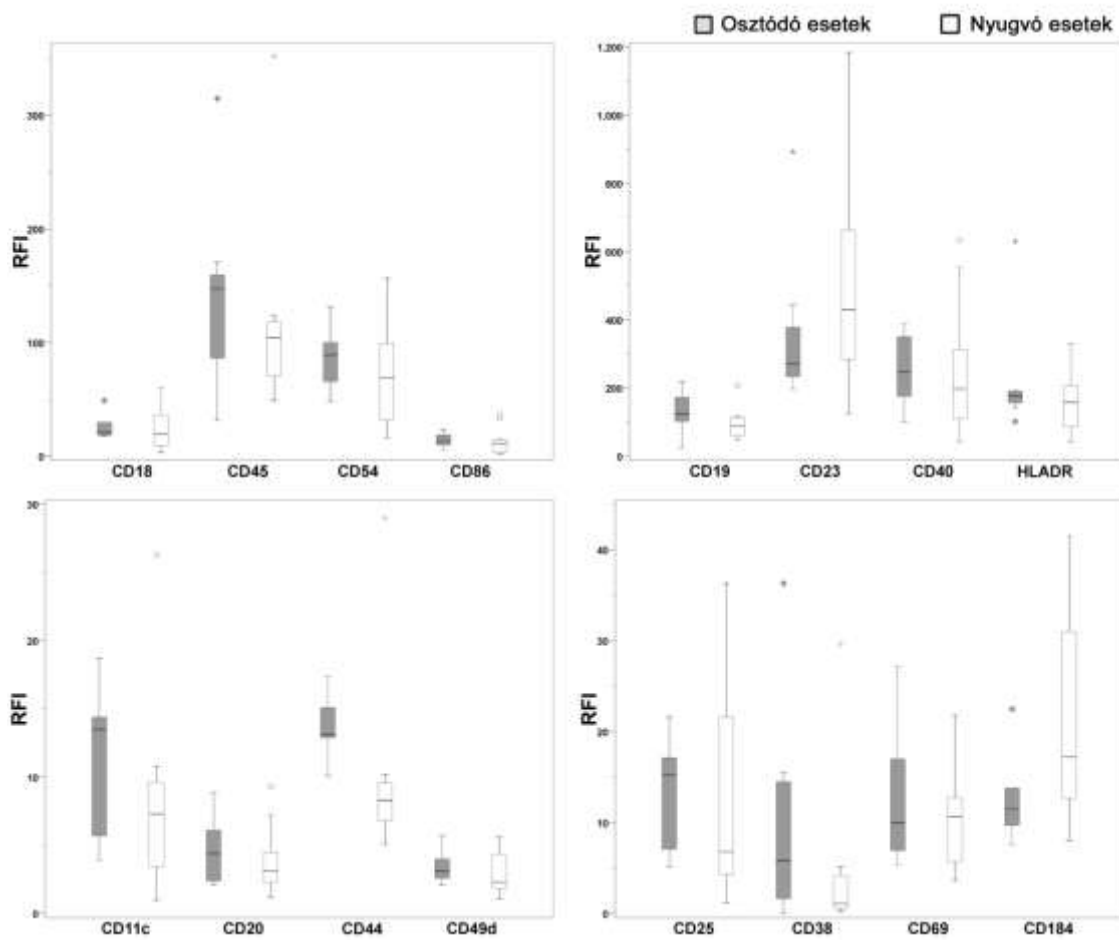
A kapuzott S+G2/M és G0/G1 fázisú sejtek immunfenotípusa minden vizsgált antigén esetében átfedett, így a különböző antigén intenzitások alapján az osztódó populáció nem különböztethető meg (9.c. ábra).

A BMSCs-n tenyésztett CD40L, IL2, IL10 citokinekkal stimulált osztódóképes és nem osztódóképes esetek antigén expressziói összességükben sem különböztek egymástól (10. ábra).



9. **Ábra. CLL-sejt proliferáció vizsgálata.** A. CLL-sejtek (CD5+, CD19+) sejt-ciklus analízise DAPI jelöléssel. Perifériás vérben osztódó CLL-sejtek nem mutathatók ki (felső plot). BMSCs-n tenyésztett CLL-sejtek osztódásra indukálhatóak CD40L, IL2,

IL10 citokinekkal (alsó plot). **B.** A diagram a thrombocytaszám és az indukálható osztódás közötti összefüggést mutatja. A csökkent thrombocytaszámmal rendelkező esetekben sikerült sejtosztódást indukálni. Az S+G2/M fázisban lévő sejtek aránya 0,7-7,8% között változott a 84 órás tenyésztés végén. **C.** A proliferáció asszociált immunfenotípus látható az S+G2/M fázisú sejtek kapuzásával. Osztódó sejteket fekete, G0/G1 fázisú sejteket szürke színnel ábrázoltuk.



10. Ábra. Az osztódó és osztódásra nem képes CLL-esetek immunfenotípusának összehasonlítása. A BMSCs-n tenyésztett CD40L, IL2, IL10 citokinekkal stimulált CLL-esetek immunfenotípusa lényegesen nem különbözött egymástól. Az RFI értékeket box plot formában a medián, 25, 75 percentilisek, a szórás és a kieső (gyűrű) és extrém kieső (háromszög) értékek bemutatásával ábrázoltuk.

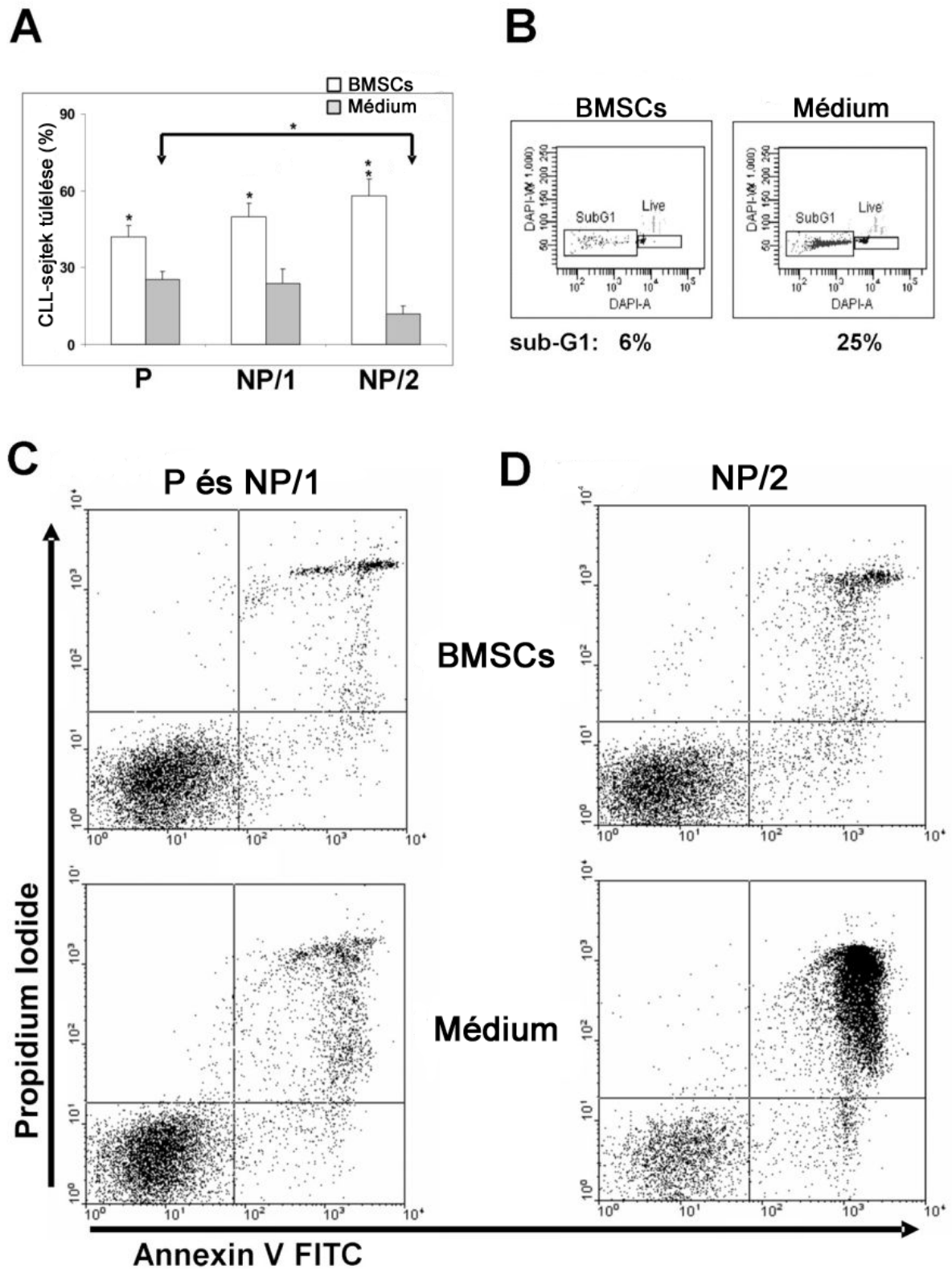
7. A CLL-sejtek *in vitro* különböző túlélési képességekkel rendelkeznek

Hasonlóan korábbi eredményekhez kimutattuk, hogy *in vitro* a BMSCs megóvják a CLL-sejteket a spontán apoptózistól. Ezzel szemben a médiumban tenyésztett CLL-sejtek többsége apoptotizál, amit a fokozott DNS fragmentációval is demonstráltunk (sub-G1 régió) (11.b. ábra). A BMSCs azonban nem biztosított teljes védelmet az apoptózistól, ugyanis a tenyésztés végére az élő (annexin V negatív) CLL-sejtek aránya kb. 50-30%-kal csökkent (11.a. ábra). A CLL sejthalált szabályozó két legfontosabb gén; az apoptózist gátló Bcl-2 és az apoptózist fokozó Bax kifejeződésének aránya is csökkent, mind a BMSCs, mind a médiumban való tenyésztés során. Ez a csökkenő tendencia mutatja a BMSCs inkomplett apoptózist gátló hatását az *in vitro* tenyésztés során. (12. ábra).

Anyagunkban a médiumban tenyésztett CLL-sejtek között azonban különböző túlélési rátákat észleltünk. A proliferációra képes CLL-sejtek (P) sokkal jobb túlélést mutattak médiumban, mint az osztódásra nem képes sejtek egyik csoportja (NP/2, Pat 12,14,15,18,22,30,32) a 84 órás sejtkultúra végén (11.a,c-d. ábra). Nem osztódó sejtek azon csoportja (NP/1), amelyik csírasejtvonal IgV_H (Pat 16,19,21,31) és/vagy $5 \times 10^4/\mu\text{l}$ feletti perifériás lymphocita számmal rendelkeztek az osztódásra képes sejtekhez hasonló jó túlélési képességekkel rendelkeztek a médiumban (11.a,c-d. ábra).

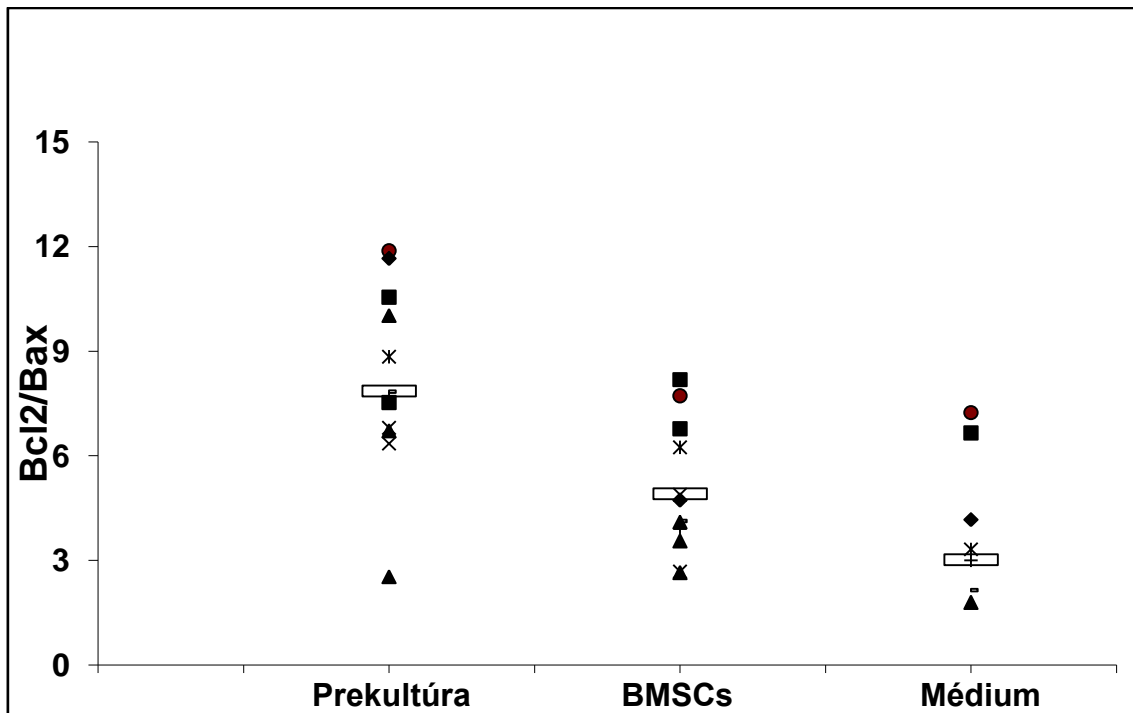
Az indolens esetekből származó CLL-sejteknek fokozottabb mértékű apoptózist-gátlást biztosított a BMSCs, mint a proliferációra képes sejteknek, de ez a különbség nem bizonyult statisztailag is szignifikánsnak (11.a. ábra).

A különböző citokinek (sCD40L, IL4, IL2+10) önmagunkban és kombinációban is nagyon heterogén módon befolyásolták a CLL-sejtek túlélését mind a BMSCs-n, mind a médiumban (13. ábra és nem közölt adat)

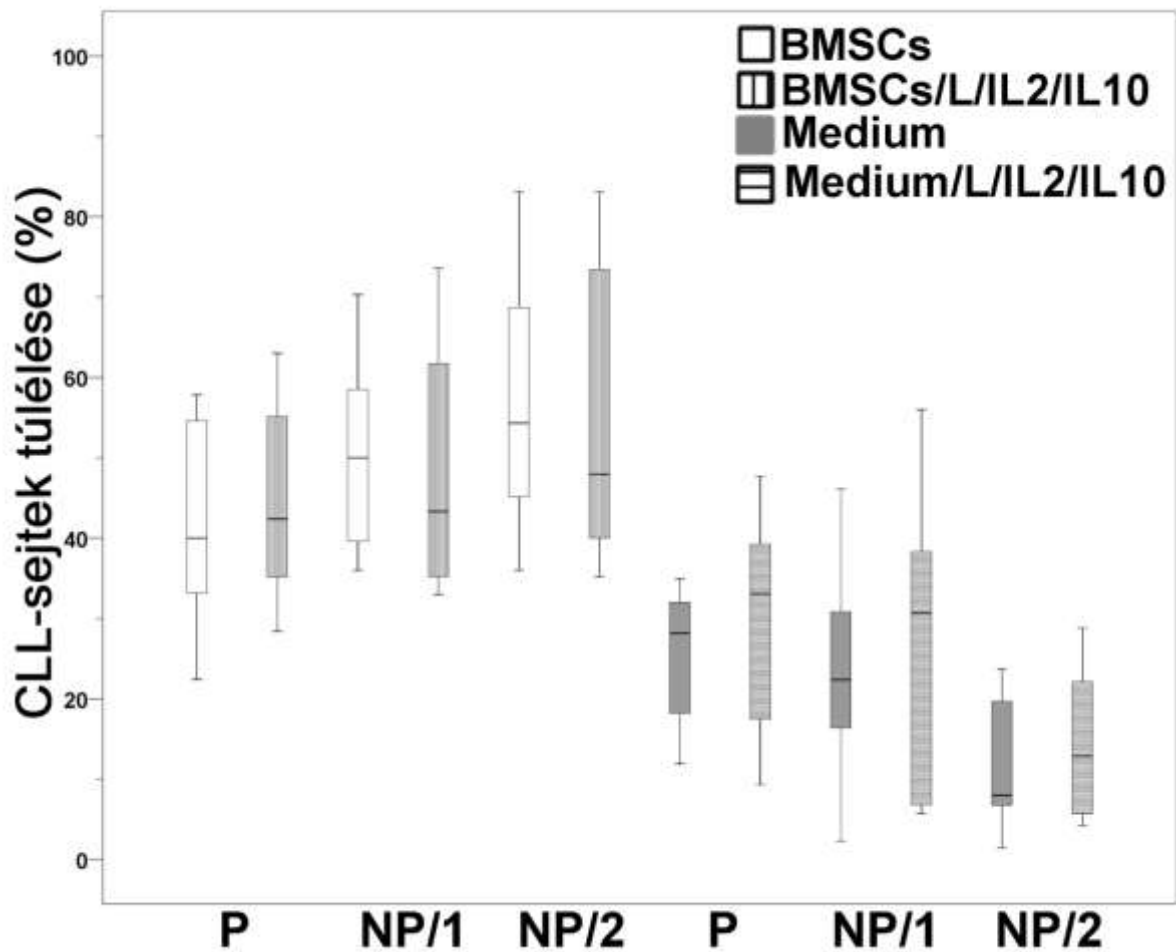


11. Ábra. CLL-sejtek túlélése BMSCs-n vagy sejtkultúra médiumban. A. CLL-sejtek túlélését az abszolút sejtszám és Annexin V jelölés alapján számoltuk ki. P:

indukálható osztódásra képes sejtek, NP/1 nem osztódó esetek kedvezőtlenebb prognózissal, NP/2 nem osztódó esetek kedvezőbb prognózissal. Fehér oszlopok: CLL-sejt túlélés BMSCs-n, szürke oszlopok: CLL-sejt túlélés médiumban. A túlélési eredményeket 8 P, 6 NP/1 és 7 NP/2 eset analízisével kaptuk, a változásokat kétmintás t-próbával analizáltuk, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.001$ esetén tekintettünk egy különbséget szignifikáns mértékűnek. **B.** Apoptózis meghatározás a DNS tartalom mérésével. A fixált, apoptotikus sejtek elveszítik a degradálódott DNS tartalmuk egy részét, így egy csökkent DNS tartalmú un. sub-G1 populáció jelenik meg. **C-D.** Apoptózis meghatározás Annexin-V és PI jelöléssel. Az élő sejtek nem jelölődnek, korai apoptotikus sejtek Annexin V pozitívak, de PI negatívak, késői apoptotikus sejtek kettősen pozitívak.



12. Ábra. CLL-sejtekben az antiapoptoikus Bcl2 és a proapoptotikus Bax gének kifejeződése az izoláláskor és a tenyésztés során. *In vitro* körülmények között fokozódik a Bax gén kifejeződése és csökken a Bcl2/Bax gének expressziójának aránya. A csontvelői eredetű stromasejtek apoptózist gátló tulajdonságának megfelelően a Bax expresszió fokozódása kisebb, mint a médium történt tenyésztés során, de a különbség statisztikailag nem szignifikáns.



13. Ábra. CLL-sejtek túlélése CD40L, IL2 és IL10 citokinek hatására. A citokinek jelentősen nem befolyásolták a CLL-sejtek apoptózisát a 84 órás sejtenyésztés során.

8. CLL-sejtek indukálták a BMSCs fokozott ICAM1 kifejeződését és citokin szekrécióját

Vizsgáltuk a CLL-sejtek csontvelői stromára kifejtett olyan hatásait, amelyekkel a CLL-sejtek a saját túlélésüket javíthatják.

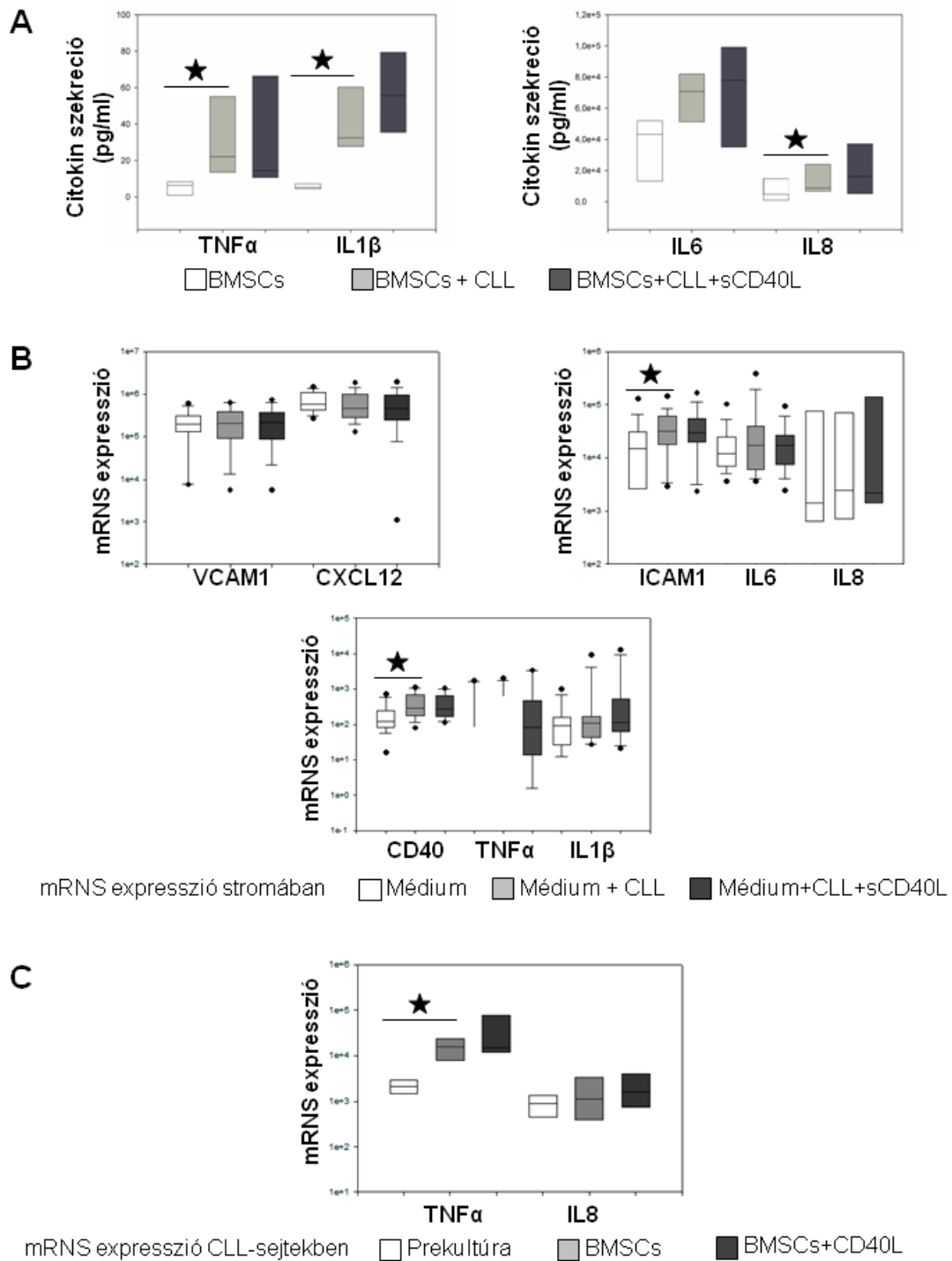
CLL-sejtek jelenlétében a BMSCs-ben szignifikánsan emelkedett az ICAM1 és CD40, míg nem változott a VCAM1 és CXCL12 mRNS expressziója. A sCD40L nem

befolyásolta tovább a ko-receptorok expresszióját, míg a CXCL12 kifejeződés némileg csökkent (14.b. Ábra).

CLL-sejtek hatására jelentősen megváltozott a sejt kultúrákban a citokin szekréció is. A sejt kultúrák felülszójában szignifikánsan nőtt az IL8, IL1 β és TNF α szintje is (14.a. Ábra). Az IL6 szekréció is nőtt, de a változás statisztikailag nem volt szignifikáns ($p=0,079$). A sCD40L sejt kultúrához adása tovább fokozta az IL1 β és IL8 szekrécióját is (14.a. Ábra).

A BMSCs és CLL-sejtekben a citokin mRNS-ek meghatározásával vizsgáltuk a szekretált citokinek eredetét. A BMSCs-ben jelentős mennyiségű IL1 β , IL6 és IL8 mRNS-t mutattunk ki (14.b. Ábra). CLL sejtekben csak marginális mennyiségű IL1 β és IL6 (nem közölt adat), valamint rendkívül gyenge IL8 kifejeződést észleltünk. CLL-sejtek azonban lényegesen jobban expresszálták a TNF α mRNS-t, mint a BMSCs (14.b-c. Ábra).

Eredményeink alapján a sejt kultúrákban észlelt magas IL6, IL8, IL1 β koncentráció valószínűleg a BMSCs-ből, míg a TNF α szekrécióemelkedés döntően a CLL-sejtekből származik.

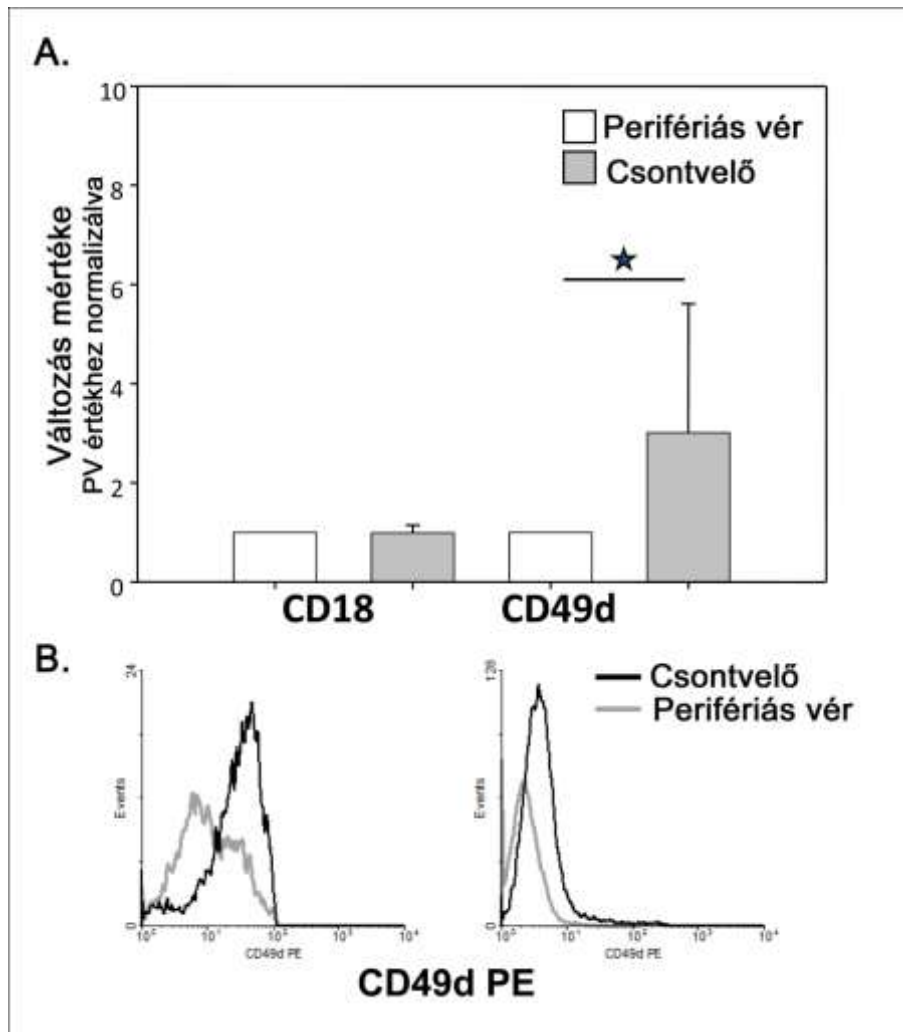


14. Ábra. Citokin termelés és gén expresszió változása különböző sejtkultúra feltételek között. **A.** Citokin szekreció meghatározás a felülűszóban. Fehér színnel a BMSCs, szürke színnel BMSCs és CLL-sejtek kultúrájában, sötétszürke színnel CD40 liganddal stimulált BMSCs- és CLL-sejtek kokultúrájában mért citokin szekreciót jelöltük. **B.**

mRNS kifejeződés stromasejtekben. CLL-sejtek hatására a stromasejtekben jelentősen megnőtt az ICAM1 és CD40 gének kifejeződése. Fehér színnel a médiumban tartott, szürke színnel CLL-sejtekkel való sejt kultúrában, sötétszürke színnel a CLL-sejtekkel és CD40 liganddal stimulált BMSCs mRNS kifejeződését jelöltük. C. mRNS kifejeződés a CLL-sejtekben, melyek szignifikánsan több TNF α mRNS-et fejeztek ki, mint a stromasejtek. Fehér színnel a perifériás vér CLL-sejtek, szürke színnel BMSCs-kel kultúrában, sötétszürke színnel a BMSCs és CD40 liganddal stimulált CLL-sejtek mRNS kifejeződését jelöltük. Az ábrázolt citokin szekréción és mRNS kifejeződési értékeket legalább 5 kísérletből kaptuk, a változásokat egymintás t-próbával analizáltuk, * $p \leq 0.05$ esetén tekintettünk egy különbséget szignifikáns mértékűnek.

9. A csontvelői mikrokörnyezet *in vivo* fokozza a CLL-sejtek CD49d expresszióját

In vitro kísérleteinkben észleltük, hogy a BMSCs-n tenyésztett CLL-sejtek felszínén a CD49d és CD18 kifejeződés is fokozódott (6. Ábra). A BMSCs CLL-sejtekre gyakorolt *–in vitro* észlelt- stimuláló hatását *in vivo* is meg kívántuk erősíteni úgy, hogy a betegek csontvelői és perifériás vér CLL-sejtjein a CD49d és CD18 kifejeződést összehasonlítottuk. 5 olyan CLL mintát, amin a perifériás vérben is csaknem 100%-os CD49d és/vagy CD18 expressziót észleltünk kizártunk. A maradék 10 esetben, a csontvelői sejtek normalizált CD49d expressziója mindig magasabb volt, mint a perifériás vér CLL-sejtjeinek, ami igazolja az *in vitro* eredményeinket. Ezzel szemben a CD18 expresszió hasonló volt a csontvelői és perifériás vér CLL-sejtjein is (15. Ábra).



15. Ábra. CD18 és CD49d antigén kifejeződés vizsgálata perifériás vér és csontvelői CLL-sejteken. A. CD49d intenzívebben fejeződik a csontvelői CLL-sejteken. Fehér oszlop: perifériás vér, szürke oszlop csontvelői expresszió. Az eredményeket 10 perifériás vér és csontvelői minta CD18, ill. CD49d RFI összehasonlításával kaptuk. **B.** Perifériás vér és csontvelői CLL-sejtek CD49d expressziójának összehasonlítása. Szürke vonal perifériás vér, fekete vonal csontvelői CLL-sejteken észlelt CD49d FI.

VI. MEGBESZÉLÉS

Munkámban a CLL-sejtek és a csontvelői mikrokörnyezet kölcsönhatásait vizsgáltam. A csontvelői mikrokörnyezet kedvez a CLL-sejteknek, ezért a csontvelő már a CLL legkorábbi stádiumaiban is infiltrált. A csontvelői stromasejtek a CLL-sejteket még a citosztatikum indukálta apoptózistól is megvédik, ami szerepet játszhat a betegség ilyen módon való gyógyíthatatlanságában⁵¹.

Kísérleteimben fókuszáltam az ún. Pseudofollikulusra (PC), ahol a CLL-sejtek valószínűleg T-sejt indukálta proliferációja zajlik.^{23,25} A PC CLL-sejtek mellett stroma-sejtekből, aktivált helper T-sejtekből áll, így egy *in vitro* modell létrehozásához is ezekre az elemekre volt szükség. Az irodalomban általában alkalmazott egér fibroblaszt sejtek (3T3) és a kereskedelmi forgalomban elérhető, lymphotrop vírussal immortalizált humán BMSC sejt vonal (pl. HS-5) sem tűnt ideálisnak humán lymphocyták tenyésztéséhez. Ezért, néhány daganatos betegséggel nem infiltrált és vérképzést befolyásoló szerrel nem kezelt egyén (pl. ITP diagnózis felállításakor) csontvelő aspirátumából izoláltunk és tenyésztettünk BMSC-t. CLL-ben az eleve abnormális T-sejtek⁷³ helyettesítése nehezebb feladatnak ígérkezett; allogén T-lymphocyták valószínűleg citotoxikus reakcióba léptek volna a CLL-sejtekkel, míg autológ T-sejtek alkalmazása nehezen standardizálható, mert a T-sejtek koreceptorok és citokin szekréció révén bonyolult, aktiváltsági fokuktól függően egyéni módon befolyásolják a CLL-sejteket. CLL-ben a T-sejt diszfunkció mértéke is különbözhet. A fenti okok miatt az irodalomból jól ismert módon csupán szolubilis CD40 Ligand és citokinek révén pótoltuk a T-lymphocytákat^{23, 28-33}.

Az *in vitro* kultúrák alapját a stromasejtek képezték, mert médiumban a CLL-sejtek nem tarthatók fenn, gyorsan pusztulnak⁴⁰. A BMSC kultúrák átlagosan 6 hét tenyésztés után veszítették el osztódási képességüket és monomorf, kerek sejtekké differenciálódtak. Osztódási kapacitásukat leginkább a donor életkora befolyásolta; két 60 év körüli donor izolált sejtjei egyáltalán nem osztódtak. Az alkalmazott sejt kultúra médiumban (DMEM+FCS) az izolált sejtek csak fibroblastoid irányba differenciálódtak és adhéziós fehérje, citokin szekréciójuk tekintetében is homogénnek bizonyultak. Kifejezték a

CLL-sejtek adhéziójához szükséges molekulákat (ICAM1, VCAM1, CD40), valamint a szekretáltak a jellemző citokineket.^{27,42} Ellentétben egy korábbi közléssel⁶⁸, stromasejtjeink a CLL-sejtek stimulálására képes IL1 β és TNF α -át is szekretáltak kis mennyiségben.

A T-sejteket mindenképp legalább CD40 liganddal kellett helyettesíteni, mert a PC-ben CD40 ligandot kifejező T-sejtek találhatóak^{23,25}. A CD40L kombinációjaként még IL4 és IL2/IL10 citokineket is választottuk, mivel ezek proliferációt kiváltó hatásai korábbról ismertek voltak^{28,33}.

A BMSCs-n tenyésztett CLL-sejteken a CD23, CD69 antigének felregulálódása erős aktivációt jelez. A CLL-sejteken az adhéziós fehérjék (CD18, CD54, CD49d) és koreceptorok (CD40, HLADR) expresszió fokozódása elősegítheti, mind a CLL-BMSCs, mind a CLL-T-sejt interakciót. Érdekes módon a CLL-sejteken fokozódott a CD19 kifejeződése is, ugyanakkor a CD19 gén expressziójáért felelős PAX5 gén expressziója csökkent. Jelenleg a PAX5 gén egyetlen ismert represszora a Blimp1 fehérje⁷¹, melynek kifejeződése azonban szintén csökkent a BMSCs hatására, tehát valószínűleg nem ez felelős a PAX5 gátlásáért.

CD40L csupán enyhe addicionális hatást fejtett ki, a BMSCs mellett fokozva néhány koreceptor (CD40, ICAM1, HLADR) kifejeződését.

Normál B-sejtek szimultán aktivációja CD40L és IL4 citokinnel a STAT6 és NF- κ B szignáltranszdukciós úton keresztül magas szintű IRF4 expresszióhoz vezet⁶⁹. CLL-sejteken ezek a jelátviteli utak valószínűleg intaktak, mivel IL4 hatására az IRF4 és célgénjeinek, a CD23, HLADR-nek is fokozódott a kifejeződése. Sem a sCD40L, sem az IL2/IL10 nem fokozta az IRF4 szintézisét, ezért az IL4 citokinnek ebben kulcs-szerep tulajdonítható. Az IL4 hatására erősen fokozódó antigéneknek, mint B7-2 (CD86), CD40, ICAM1, leginkább a T-sejt irányú interakcióban játszhatnak szerepet *in vivo*.¹⁰⁸

A B-lymphocytá plazmasejt átmenet során az IRF4 szintje fokozatosan nő⁷⁴, indukálja a Blimp1 szintézisét, majd ez gátolja a Pax5⁷¹ és fokozza a Xbp1 expressziót⁷⁵. A fenti változások következtében expandál az endoplazmatikus retikulum, nő az immunglobulin szintézis és szekréció⁷⁵.

Plazmasejt érés során a sejt felszíni CD19, CD20, CD45 expresszió csökken, majd a plazmablasztos stádium után CD138 jelenik meg^{72,76}. Az általunk alkalmazott PC modellben IL4 hatására a fokozódó IRF4 és csökkenő sejt felszíni CD19, CD20, CD45 expresszió plazmasejt irányú differenciálódásra utalhat. A plazmasejt érés azonban nem teljes, mert a PAX5 expresszió megtartott, Blimp1 és a plazmasejtekre jellegzetes sejt felszíni CD38, CD138 nem indukálódott, illetve Ig szekréciót sem észleltünk a szupernatánsban. Blimp1 hiányára utal a magas CD23 kifejeződés is, mivel a Blimp1 köti az IRF4 transzkripciós faktort és így gátolja a CD23b promotert⁶⁹. Több oka is lehet az inkomplett plazmasejt differenciálódásnak modellünkben: IL10 stimuláció hiánya az IL4 mellett³⁴, az állandó sCD40L jelenlét⁷⁶, a rövid inkubációs időtartam⁷⁷, valamint a daganatsejtekre jellemző érési blokk⁷⁸.

A közelmúltban IL4 hatására bekövetkező CXCR4 expresszió csökkenést mutattak ki humán monocytákon a mi eredményeinkhez hasonlóan⁷⁹. Nyirokcsomóból izolált CLL-sejteken is alacsonyabb CXCR4 kifejeződés észlelhető, mely a CXCL12 indukálta receptor endocytosis mellett lehet *in vivo* IL4 hatás következménye⁸⁰⁻⁸¹.

Csontvelői stromasejtek is kifejezik az IL4 receptort⁸² és IL4 hatására indukálódik rajtuk a VCAM1 expresszió⁸³, ezért az IL4 indirekt módon is befolyásolhatja a CLL-sejteket. Az általunk észlelt IL4 okozta változások, azonban valószínűleg az IL4 közvetlen hatásának tarthatók, mert többségük BMSCs nélkül is kiváltható leukocytákon^{32,69,79}.

IL2/IL10 stimuláció hatására is egy jellegzetes antigénmintázat alakult ki; kifejezetten nőtt az integrinek, a hialuronsav receptor (CD44), aktivációs antigének és koreceptorok expressziója. Az integrinek és CD44 kulcsfontosságúak CLL-ben, mivel ezek mediálják az adhéziót a stromasejtekhez⁴², illetve a CD44 és β -integrin hordozó CLL-ben jellegzetes a diffúz csontvelő infiltráció és gyakrabban szükséges kezelés⁸⁴.

Eredményeink alapján kimondható, hogy az osztódó CLL-sejtek aránya a perifériás vérben rendkívül alacsony és ezek multiparaméteres áramlási cytometriával nem mutathatók ki. Az általunk alkalmazott sejt kultúrában a sCD40L trimer nem indukált sejtosztódást ellentétben korábbi közleményekkel^{23,28}, pedig két kereskedelmi forgalomban is elérhető molekula több koncentrációját is kipróbáltuk. Az IL2/IL10

kombináció csak a CLL-sejtek egy részénél indukált osztódást hasonlóan a CpG-ODN hatásához³⁷. Az osztódásra képes CLL-sejtek mind rossz prognózisú esetekből származtak. A csökkent thrombocytaszám jelezte legérzékenyebben az osztódási képességet, aminek hátterében a proliferációval együtt járó fokozottabb csontvelői infiltráció állhat. A vizsgált esetekből rendelkezésre álló csontvelő biopsziákban diffúz csontvelői infiltráció látszott, ami támogatja feltételezésünket. Az alacsony *in vitro* proliferációs ráta valószínűleg a hiányzó közvetlen T-sejt és CLL-sejt közötti interakció hiányának köszönhető⁸⁵.

Az osztódó frakció meghatározása fontos lenne CLL-ben is, mert non-Hodgkin lymphomákban a proliferáció és progresszió összefüggést mutat⁸⁶. CLL infiltrált csontvelői aspirátumban az osztódó sejtek aránya nagyon alacsony, ezért megbízható DNS analízis kivitelezése csaknem lehetetlen. Kapuzást megkönnyítő, proliferáció specifikus immunfenotípust azonban nem tudtunk kimutatni. A T-sejtekkel való jobb kölcsönhatását segítheti elő az osztódó CLL-sejtek intenzívebb adhéziós antigén és koreceptor kifejeződése. A Ki-67 pozitív, nagyméretű CLL-sejtek a PC-ben az *in vitro* proliferáló CLL-sejtekhez hasonlóan intenzívebben fejezik ki a CD23 antigént, ami alátámasztja a sejt kultúránk hitelességét²⁴.

A CLL-sejtek csökkent apoptózis képességét tartjuk napjainkban a betegség fő pathomechanizmusának²¹, ezért a sejtek túlélését is vizsgáltuk munkánkban. A BMSCs kedvező hatását a CLL-sejtek túlélésére eredményeink megerősítették. A kedvező prognózisú esetek CLL-sejtjei érdekes módon jobb túlélést mutattak BMSCs-n, ami esetleg a kedvező cytogenetikai eltérésekkel rendelkező esetek magasabb Bcl-2 expresszió következménye lehet³⁹. Médiumban a CLL-sejtek túlélésében jelentős különbségeket észleltünk; az indukálható proliferációjú CLL-esetek (P) és a nem mutált IgV_H vagy magasabb lymphocytá számmal rendelkező esetek (NP/1) jobb túlélést mutattak médiumban. A kedvezőtlen prognózisú esetek csökkent apoptózis képességét magyarázhatja magasabb Bax degradációs aktivitásuk⁸⁷. Ellentétben korábbi közleményekkel^{29,30,88}, munkánkban sem a CD40L, sem az IL4 antiapoptotikus hatását nem tudtuk bizonyítani. A különbségek a sejt kultúrák közötti eltérésekből eredhetnek; egyrészt mi tenyésztettünk először CLL-sejteket humán csontvelői stromasejteken különböző citokinekkal, másrészt a túlélő sejt populációt az abszolút sejtszám és az

apoptotikus sejtpopuláció meghatározásával számoltuk, nem pedig csak az élő vagy apoptotikus populáció meghatározásával^{29,30,88}. A sejtkultúra elején elpusztult sejtek a sejtkultúra végére valószínűleg már csak törmelék képeznek, ami abszolút szám meghatározás nélkül egyszerűen figyelmen kívül marad. Egy IL4 fázis I/II tanulmány eredményei is az IL4 heterogén hatására utalnak CLL-ben hasonlóan a mi in vitro eredményeinkhez⁸⁹.

Disszertációm másik fontos témáját képezte a CLL-sejtek csontvelői stroma apoptózisgátló tulajdonságaira kifejtett hatásának vizsgálata. A CLL-sejtek túlélése főleg a stromasejtekhez való adhéziótól függ. Ha mikroporózus membránnal vagy adhéziós molekulát gátló mAb-vel akadályozzák az adhéziót, jelentősen csökken a BMSCs CLL-sejt túlélését javító hatása^{42,51}. Kimutattuk, hogy a CLL-sejtek képesek fokozni az adhéziót a BMSCs-hez két módon is; 1. CLL-sejtek hatására az antiapoptotikus adhéziós molekula, az ICAM1 expressziója fokozódik a BMSCs-ben, 2. CLL-sejtek felszínén is nő az adhéziós molekulák ligandjainak (CD49d, CD18) kifejeződése. A csontvelői stroma jótékony hatását igazolja az is, hogy a csontvelő aspirátum CLL-sejtjei intenzívebben expresszálják a CD49d molekulát, mint ugyanazon beteg perifériás vér CLL-sejtjei. CD18 indukcióját nem lehetett kimutatni ex vivo, aminek hátterében a CD18 komplex regulációja állhat, pl. T-sejt eredetű citokinek által⁹⁰⁻⁹².

Az adhézió mellett BMSCs eredetű citokinek, mint TNF α , CXCL12, IL1 β , IL6 és IL8 is javítják a CLL-sejtek túlélését^{93,94,96}. A CXCL12 a CLL-aktiváció mellett még az adhéziós molekulák magas affinitású konformációváltozásáért is felelős^{95,96}. CLL betegekben a TNF α , IL6 és IL8 magasabb szérumszintjei korrelációt mutatnak a magasabb mortalitással^{93,97-101}. A keringő CLL-sejtek is kifejezik a TNF α , IL1 β , IL6 és IL8 mRNS-t¹⁰²⁻¹⁰⁴.

Vizsgálatainkkal az elsők között térképeztük fel a BMSCs és CLL-sejt interakció kapcsán a citokin szekréció változásait. Kimutattuk a TNF α , IL1 β , IL6 és IL8 jelentős szekréció fokozódását. A fő aktivációs citokin, a TNF α szekréciója döntően a CLL-sejtekben indukálódik az interakcióban. A TNF α autokrin és parakrin növekedési faktorként is hat CLL-ben és a stromasejtek citokin (pl. IL8) termelését is serkenti¹⁰⁵⁻¹⁰⁶. Csontvelői CLL-sejtek nagyobb mennyiségben tartalmazzák a TNF α -t, mint a perifériás

vér CLL-sejtek, ami szintén a CLL-sejtek megváltozott viselkedésre utal a csontvelői mikrokörnyezetben⁹⁹. A myeloma sejtekhez hasonlóan valószínűleg itt is a BMSCs-hez történő adhézió a felelős az IL6 termelés indukciójáért¹⁰⁷. A jelentős IL8 szekréciónövekedés ellenére nem tapasztaltunk fokozott mRNS kifejeződést sem a BMSCs, sem a CLL-sejtekben hasonlóan korábban közölt adatokhoz, melyek az IL8 mRNS konstitutív expressziójáról számoltak be¹⁰². Az IL6 és IL8 jelentőségére hívja fel a figyelmet az a klinikai tanulmány, ahol a lenalidomidra adott terápiás válasz és a citokinek plazma szintje között összefüggést találtak⁵³.

A B-lymphocyták és a dendritikus sejtek képesek kötni az aktivált T-lymphocytákat CD40 - CD40 Ligand (CD154) interakcióval. Kísérleteinkben a CD40L nem fokozta a BMSCs antiapoptótikus hatásait, ami következménye lehet a CLL-sejtekre gyakorolt közvetlen hatás és/vagy a BMSCs stimulálás hiányának. CD40L hatására ugyanis sem az adhéziós molekulák, sem a citokinek expressziója nem fokozódott a BMSCs-ben. CD40L hatásának hiánya nem mond ellent a T-sejtek szerepének CLL-ben, mivel CLL-sejt-T-sejt kölcsönhatás valószínűleg számos receptor (CD58-CD2, CD27-CD70, LFA1-CD54) és citokin (pl. IL2) hatás eredőjeként valósul meg⁸⁵. B-sejtes nHL csontvelői infiltrációja esetén a stromasejteken CD40 expressziót észlelték²⁷. Kimutattuk, hogy CLL-sejtek hatására is fokozódik a BMSCs CD40 expressziója, amely elősegítheti a BMSCs-T-sejt kapcsolódást. CD40 antigént hordozó dendritikus sejtek CD40L hatására kifejezik a B7 molekulát és T-sejt aktiváló citokineket szekretálnak¹⁰⁸.

VII. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Csontvelő aspirátumból izolált mononukleáris sejtekből átlagosan 6 hét alatt stroma sejt kultúra hozható létre, mely érett, hemopoetikus sejtek *in vitro* tenyésztésre alkalmas. Fiatalabb donorok aspirátumából jelentősen több csontvelői stromasejt képződik.
2. BMSCs hatására *in vitro* a CLL sejtek különösen az aktivációs és adhéziós antigének kifejeződését fokozták. (Új megállapítás)
3. A csontvelői mikrokörnyezet *in vivo* is fokozza a CLL-sejtek felszínén a CD49d antigén kifejeződését. (Új megállapítás)
4. A sCD40L gyenge, addicionális hatást fejtett ki a BMSCs-n tenyésztett CLL-sejtek immunfenotípusára és génexpressziójára.
5. IL4 hatására jellegzetesen változó immunfenotípus és a fokozódó IRF4 gén kifejeződése plazmasejt irányú differenciálódásra utalhat. (Új megállapítás)
6. Az IL2 és IL10 kombinációja is fokozta a legtöbb antigén kifejeződését, de ezek a sejtek proliferációs képességétől függetlenek voltak.
7. A perifériás vérben osztódó CLL-sejtet nem tudtunk kimutatni.
8. *In vitro* CLL-sejt osztódást csak a BMSCs, sCD40L, IL2 és IL10 citokin kombináció segítségével tudtunk kiváltani.
9. A CLL-sejtek *in vitro* indukálható osztódási képessége legjobb korrelációt a thrombocytopenia-val mutatott. (Új megállapítás)
10. CLL-sejtek felszínén proliferáció specifikus antigén kifejeződést nem sikerült kimutatni.
11. A BMSCs részleges védelmet biztosítottak a CLL-sejteknek az apoptózistól.
12. A kedvezőtlen prognózisú CLL-esetek sejtjei jobb túlélést mutattak *in vitro* médiumban, mint a kedvező prognózisú esetek sejtjei. (Új megállapítás)
13. Az alkalmazott citokinek nem javították jelentősen a CLL-sejtek *in vitro* túlélését.
14. CLL-sejtek javították a BMSCs antiapoptotikus tulajdonságait az ICAM-1 kifejeződés és citokinek (IL6, IL8, IL1 β) szekréciójának fokozódásával. (Új megállapítás)

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

A krónikus lymphocytás leukémia (CLL) az érett B-sejtek daganatos megbetegedése. A CLL-sejtek túlélésért és osztódásáért is valószínűleg mikrokörnyezeti hatások felelősek. Munkám célja a csontvelői stroma és CLL-sejtek közötti azon kölcsönhatások vizsgálata volt, melyek a CLL-sejtek túlélését javítják, valamint egy *in vitro* pseudofolikulus modell létrehozása, hogy a CLL-sejtek viselkedése és a klinikai lefolyása közötti összefüggést tanulmányozzam.

A kísérletek során 21 különböző, CLL-ben szenvedő beteg perifériás véréből izolált CLL-sejteket tenyésztettem médiumban vagy allogén eredetű, normális csontvelői stromasejteken (BMSC) különböző citokin kombinációk jelenlétében.

Eredményeink alapján a stromasejtek csökkentették a CLL-sejtek apoptózisát, miközben a stromasejtek fokozták az IL8 és IL6 citokinek szekrécióját, valamint az ICAM és CD40 mRNS-ek expresszióját, a CLL-sejtek felszínén pedig jelentősen emelkedett a CD18, CD49d antigének kifejeződése, melyek ligandként szolgálnak az ICAM1 és VCAM1 adhéziós molekuláknak. Perifériás vérrel összehasonlítva csontvelő aspirátum CLL-sejteken magasabb CD49d expressziót mutattunk ki.

Kísérleteim során több különbséget is találtam az indolens és progresszív esetekből származó CLL-sejtek tulajdonságaiban; csak a progresszív esetek CLL-sejtjeit tudtuk proliferációra indukálni stromasejteken tenyésztve sCD40L/IL2/IL10 citokin kombináció segítségével. Az osztódó képesség legjobb klinikai előrejelzője a thrombocytopenia volt. A progresszív esetekből származó CLL-sejtek médiumban sokkal jobb túlélést is mutattak, mint az indolens esetekből izolált sejtek.

Az IL4 indukálta az IRF4 kifejeződését és egy olyan antigén mintázat megjelenését, mely leginkább plazmasejt irányú differenciálódásra utalhat.

Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy csontvelői eredetű stromasejtek javítják a CLL-sejtek túlélést és a CLL-sejtek képesek fokozni a csontvelői stromasejtek apoptózis ellenes tulajdonságait. A CLL progressziójáért a különböző túlélési kapacitás mellett az eltérő proliferációs képesség is felelős, mely thrombocytopéniával és anaemiával járó csontvelő elégtelenségben nyilvánul meg.

IX. SUMMARY

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a malignancy of mature B-lymphocytes. The prolonged life span and proliferation of CLL cells *in vivo* are assumed to depend on the surrounding microenvironment.

My aim was to study the molecular interactions between CLL cells and their surrounding stroma to identify factors that help CLL cells to resist apoptosis and to establish an *in vitro* model for pseudofollicles to characterize the behavior of CLL-cells in relation to clinical courses with different outcomes.

Sorted CLL cells from 21 patients were cultured *in vitro* on allogeneous, normal bone marrow stromal cells (BMSCs) in the presence/absence of different cytokines.

The interaction between CLL cells and BMSCs rescued CLL cells from apoptosis, whilst BMSCs showed a significant increase in IL8, IL6 secretion and up-regulated the expression of ICAM-1 and CD40 mRNA. In turn, CLL cells significantly up-regulated the expression of CD18 and CD49d that are ligands for the critical adhesion molecules on BMSCs. We found a significantly higher expression of CD49d on CLL cells in bone marrow aspirates compared to peripheral blood CLL cells in patient samples.

We found more differences in the characteristics of CLL-cells from progressive and indolent cases; only CLL-cells from progressive clinical cases were inducible to proliferate by a combination of soluble CD40L/IL-2/IL-10 in co-culture with stromal cells. Lower platelet counts predicted most reliably the proliferation capacity. Furthermore, CLL-cells from clinically indolent cases had a far worse survival rate in medium than the cells from poor prognostic cases.

IL-4 increased interferon regulatory factor-4 expression and induced a specific immunophenotype, which may imply plasmacytic differentiation.

Thus, we can conclude that BMSCs improved the survival of CLL-cells and CLL-cells exert a strong effect on BMSCs in favour of their own apoptosis resistance. Along with these results, not only a different resistance to apoptosis, but also proliferation contributes to the progression of CLL resulting in bone marrow failure with thrombocytopenia and anemia.

X. IRODALOMJEGYZÉK

1. Müller-Hermelink HK, Montserrat E, Catovsky D, Campo E, Harris NL, Stein H. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. In: Swerdlow SH (szerk.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC, Lyon, 2008; 180-182.
2. Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis. ASH Education Program Book. 2009; 430-439
3. Eichorst B, Hallek M and Dreyling M. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2010; 21(Supp 5):162-164.
4. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri A, Califano A, Dalla-Favera R. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. J. Exp. Med. 2001; 194(11):1625-38.
5. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai K, Rassenti LZ, Kipps TJ, Dighiero G, Schroeder HW Jr, Ferrarini M, Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. J Clin Invest. 1998; 102(8):1515-25.
6. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T, Belhoul L, Stella S, Stavroyianni N, Crespo M, Hadzidimitriou A, Sutton L, Bosch F, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, Montserrat E, Fassas A, Dighiero G, Caligaris-Cappio F, Merle-Béral H, Ghia P, Davi F. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. Blood. 2007; 109(1):259-70.
7. Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. J Intern Med. 2008; 264(6):549-62.

8. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(39):13944-9.
9. Blagosklonny MV. Mitotic arrest and cell fate: why and how mitotic inhibition of transcription drives mutually exclusive events. *Cell Cycle*. 2007; 6(1):70-4.
10. Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Volinia S, Alder H, Liu CG, Rassenti L, Calin GA, Hagan JP, Kipps T, Croce CM. Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res*. 2006; 66(24):11590-3.
11. Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood*. 2004; 103(4):1202-10.
12. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis ER, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med*. 2001; 194:1639 - 1648.
13. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marcé S, López-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003; 348(18):1764-75.
14. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002; 99(3):1023–1029.
15. Shanafelt TD, Geyer SM, Bone ND, Tschumper RC, Witzig TE, Nowakowski GS, Zent CS, Call TG, Laplant B, Dewald GW, Jelinek DF, Kay NE. CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *Br J Haematol*. 2008; 140(5):537-46.

16. Chen L, Apgar J, Huynh L, Dicker F, Giago-McGahan T, Rassenti L, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005; 105(5):2036-41.
17. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, Alexander HD, Carey BS, Farrugia J, Gardiner A, Mould S, Oscier D, Copplestone JA, Prentice AG. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*. 2006; 107(9):3584-92.
18. Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, Dürig J, Morabito F, Dührsen U, Malavasi F. CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2003; 102(6):2146-55.
19. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*. 1999; 94(11):3658-67.
20. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000; 343(26):1910-6.
21. Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, Wang HG, Zhang X, Bullrich F, Croce CM, Rai K, Hines J, Reed JC. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with *In vitro* and *In vivo* chemoresponses. *Blood*. 1998; 91(9):3379-89.
22. Schmid C, Isaacson PG. Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (B-CLL): an immunophenotypic study. *Histopathology*. 1994; 24(5):445-51.
23. Granziero L, Ghia P, Circosta P, Gottardi D, Strola G, Geuna M, Montagna L, Piccoli P, Chilosi M, Caligaris-Cappio F. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001; 97(9):2777-83.
24. Lampert A, Wotherspoon A, van Noorden S, Hasserjian RP. High expression of CD23 in the proliferation centers of chronic lymphocytic leukemia in lymph nodes and spleen. *Hum Path*. 1999; 30:648-654.
25. Ghia P, Strola G, Granziero L, Geuna M, Guida G, Sallusto F, Ruffing N,

- Montagna L, Piccoli P, Chilosi M, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol.* 2002; 32(5):1403-1.
26. Soma LA, Craig FE, Swerdlow SH. The proliferation center microenvironment and prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Hum Pathol.* 2006; 37(2):152-9.
27. Vega, F., Medeiros L. J., W. H. Lang, A. Mansoor, C. Bueso-Ramos, and D. Jones. 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):569-76.
28. Fluckiger AC, Rossi JF, Bussel A, Bryon P, Banchereau J, DeFrance T. Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia B cells activated via surface Igs or CD40 to B-cell tropic factors. *Blood.* 1992; 15; 80(12):3173-81.
29. Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 1999; 106(4):995-1004.
30. Buske C, Gogowski G, Schreiber K, M. Rave-Fränk, Hiddemann W, Wörmann B. Stimulation of B-chronic lymphocytic leukemia cells by murine fibroblasts, IL4, anti-CD40 antibodies, and the soluble CD40 ligand. *Exp Hematol.* 1997; 25(4):329-37
31. Karray S, DeFrance T, Merle-Béral H, Banchereau J, Debré P, Galanaud P. Interleukin 4 counteracts the interleukin 2-induced proliferation of monoclonal B cells. *J Exp Med.* 1988; 168(1):85-94.
32. Dancescu M, Rubio-Trujillo M, Biron G, Bron D, Delespesse G, Sarfati M. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J Exp Med.* 1992; 176(5):1319-26.
33. Fluckiger, A. C., P. Garrone, I. Durand, J. P. Galizzi, and J. Banchereau. Interleukin 10 (IL10) upregulates functional high affinity IL2 receptors on normal and leukemic B-lymphocytes. *J Exp Med.* 1993.178(5):1473-81.
34. Kobayashi N, Nagumo H, Agematsu K. IL10 enhances B-cell IgE synthesis by promoting differentiation into plasma cells, a process that is inhibited by CD27/CD70 interaction. *Clin Exp Immunol.* 2002; 129(3):446-52.

35. Asplund SL, McKenna RW, Howard MS, Kroft SH. Immunophenotype does not correlate with lymph node histology in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2002; 26(5):624-9.
36. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, Murphy EJ, Koduru P, Ferrarini M, Zupo S, Cutrona G, Damle RN, Wasil T, Rai KR, Hellerstein MK, Chiorazzi N. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest*. 2005; 115(3):755-64.
37. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Petlickovski A, Pelosi M, Chiusolo P, Sica S, Leone G, Efremov DG. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia*. 2007; 21(1):110-20.
38. Tarnani M, Laurenti L, Longo PG, Piccirillo N, Gobessi S, Mannocci A, Marietti S, Sica S, Leone G, Efremov DG. The proliferative response to CpG-ODN stimulation predicts PFS, TTT and OS in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2010; 34(9):1189-94.
39. Jahrsdörfer B, Wooldridge JE, Blackwell SE, Taylor CM, Link BK, Weiner GJ. Good prognosis cytogenetics in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated *in vitro* with low susceptibility to apoptosis and enhanced immunogenicity. *Leukemia*. 2005; 19(5):759-66.
40. Collins RJ, Verschuer LA, Harmon BV, Prentice RL, Pope JH, Kerr JF. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol*. 1989; 71(3):343-50.
41. Sanz L, Garcia-Marco JA, Casanova B, de La Fuente MT, García-Gila M, Garcia-Pardo A, Silva A. Bcl-2 family gene modulation during spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 315(3):562-7.
42. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, de Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*. 1998; 91(7):2387-96.

43. Cuní S, Pérez-Aciego P, Pérez-Chacón G, Vargas JA, Sánchez A, Martín-Saavedra FM, Ballester S, García-Marco J, Jordá J, Durántez A. A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. 2004; 18(8):1391-400.
44. Jewell AP, Lydyard PM, Worman CP, Giles FJ, Goldstone AH. Growth factors can protect B-chronic lymphocytic leukaemia cells against programmed cell death without stimulating proliferation. *Leuk Lymphoma*. 1995; 18:159-62.
45. Reittie JE, Yong KL, Panayiotidis P, Hoffbrand AV. Interleukin-6 inhibits apoptosis and tumour necrosis factor induced proliferation of B-chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma*. 1996; 22:83-90.
46. Francia di Celle P, Mariani S, Riera L, Stacchini A, Reato G, Foa R. Interleukin-8 induces the accumulation of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells by prolonging survival in an autocrine fashion. *Blood*. 1996; 87(10):4382-9
47. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 2000; 96(8):2655-63.
48. König A, Menzel T, Lynen S, Wrazel L, Rosén A, Al-Katib A, Raveche E, Gabrilove JL. Basic fibroblast growth factor (bFGF) upregulates the expression of bcl-2 in B cell chronic lymphocytic leukemia cell lines resulting in delaying apoptosis. *Leukemia*. 1997; 11(2):258-65.
49. Kay NE, Bone ND, Tschumper RC, Howell KH, Geyer SM, Dewald GW, Hanson CA, Jelinek DF. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules. *Leukemia*. 2002; 16(5):911-9.
50. Molica S, Vacca A, Ribatti D, Cuneo A, Cavazzini F, Levato D, Vitelli G, Tucci L, Roccaro AM, Dammacco F. Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002; 100(9):3344-51.
51. Kay NE, Shanafelt TD, Strege AK, Lee YK, Bone ND, Raza A. Bone biopsy derived marrow stromal elements rescue chronic lymphocytic leukemia B-cells from spontaneous and drug induced cell death and facilitates an "angiogenic switch". *Leuk. Res*. 2007; 31(7):899-906.

52. Chanan-Khan A, Miller KC, Takeshita K, Koryzna A, Donohue K, Bernstein ZP, Mohr A, Klippenstein D, Wallace P, Zeldis JB, Berger C, Czuczman MS. Results of a phase 1 clinical trial of thalidomide in combination with fludarabine as initial therapy for patients with treatment-requiring chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*. 2005; 106(10):3348-52.
53. Ferrajoli A, Lee BN, Schlette EJ, O'Brien SM, Gao H, Wen S, Wierda WG, Estrov Z, Faderl S, Cohen EN, Li C, Reuben JM, Keating MJ. Lenalidomide induces complete and partial remissions in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008; 111(11):5291-7.
54. Niedermeier M, Hennessy BT, Knight ZA, Henneberg M, Hu J, Kurtova AV, Wierda WG, Keating MJ, Shokat KM, Burger JA. Isoform-selective phosphoinositide 3'-kinase inhibitors inhibit CXCR4 signaling and overcome stromal cell-mediated drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: a novel therapeutic approach. *Blood*. 2009; 113(22):5549-57.
55. Stamatopoulos B, Meuleman N, De Bruyn C, Delforge A, Bron D, Lagneaux L. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces apoptosis, downregulates the CXCR4 chemokine receptor and impairs migration of chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*. 2010; 95(7):1136-43.
56. Buchner M, Baer C, Prinz G, Dierks C, Burger M, Zenz T, Stilgenbauer S, Jumaa H, Veelken H, Zirlik K. Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010; 115(22):4497-506.
57. Braylan CR. Flow-cytometric DNA analysis in the diagnosis and prognosis of lymphoma. *Hematopathol* 1993; 99:374-380.
58. Czader M, Porwit A, Tani E, Ost A, Mazur J, Auer G. DNA image cytometry and the expression of proliferative markers (proliferating cell nuclear antigen and Ki67) in non-Hodgkin's lymphoma. *Mod Pathol*. 1994; 8:865-873.
59. Stetler-Stevenson M, Braylan RC. Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders. *Sem Hemat*. 2001; 38:111-123.
60. Ffrench MM, Magaud JP, Ffrench P, Berger F, Devaux Y, Duhaut P, Shen N, Coiffier B, Bryon PA. Heterogeneity of neoplastic and reactive cell proliferation

- in non-Hodgkin's lymphomas linked to patient survival. *Hematopathol.* 1994; 101:413–420.
61. Brockhoff G, Endl E, Minuth W, Hofstaedter F, Knuechel R. Options of flow cytometric three-color DNA measurements to quantitate EGFR in subpopulations of human bladder cancer. *Anal Cell Pathol.* 1996; 11:55–70.
 62. Bauer KD, Duque RE, Shankey V. 1993. *Clinical flow cytometry -principles and applications.* Baltimore: Williams and Wilkins. p 117–142.
 63. Carbonari M, Tedesco T, Fiorilli M. A unified procedure for conservative (morphology) and integral (DNA and immunophenotype) cell staining for flow cytometry. *Cytometry.* 2001; 44:120–125.
 64. Smith PJ, Blunt N, Wiltshire M, Hoy T, Teesdale-Spittle P, Craven RM, Watson JV, Amos B, Errington RJ, Patterson LH. Characteristics of a novel deep red/infrared fluorescent cell-permeant DNA probe, DRAQ5, in intact human cells analyzed by flow cytometry, confocal and multiphoton microscopy. *Cytometry.* 2000; 40:280–291.
 65. Plander M, Brockhoff G, Barlage S, Schwarz S, Rothe G, Knuechel R. Optimization of three- and four-color multiparameter DNA analysis in lymphoma specimens. *Cytometry A.* 2003; 54(1):66-74.
 66. Meier VS, Ruffle A, Gudat F. Simultaneous evaluation of T- and B-cell clonality, t(11;14) and t(14;18), in a single reaction by a four-color multiplex polymerase chain reaction assay and automated high-resolution fragment analysis: a method for the rapid molecular diagnosis of lymphoproliferative disorders applicable to fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, blood, and bone marrow aspirates. *Am J Pathol.* 2001; 159(6):2031-43.
 67. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai K, Rassenti LZ, Kipps TJ, Dighiero G, Schroeder HW Jr, Ferrarini M, Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest.* 1998; 102(8):1515-25.
 68. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG: Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology and Potential Applications. *Stem Cells* 2001; 19:180-192
 69. Pernis AB. The role of IRF4 in B and T cell activation and differentiation. *J*

- Interferon Cytokine Res. 2002; 22(1):111-20.
70. Nutt SL, Morrison AM, Dörfler P, Rolink A, Busslinger M. Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *EMBO J.* 1998; 17(8):2319-33.
 71. Lin KI, Angelin-Duclos C, Kuo TC, Calame K. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(13):4771-80.
 72. Bataille R, Jégo G, Robillard N, Barillé-Nion S, Harousseau JL, Moreau P, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica.* 2006; 91(9):1234-40.
 73. Christopoulos P, Pfeifer D, Bartholome K, Follo M, Timmer J, Fisch P, Veelken H. Definition and characterization of the systemic T-cell dysregulation in untreated indolent B-cell lymphoma and very early CLL. *Blood.* 2011; 117(14):3836-46.
 74. Sciammas R, Shaffer AL, Schatz JH, Zhao H, Staudt LM, Singh H. Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity.* 2006; 25(2):225-36.
 75. Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, Lee AH, Qian SB, Zhao H, Yu X, Yang L, Tan BK, Rosenwald A, Hurt EM, Petroulakis E, Sonenberg N, Yewdell JW, Calame K, Glimcher LH, Staudt LM. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity.* 2004; 21(1):81-93.
 76. Jégo G, Bataille R, Pellat-Deceunynck C. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood.* 2001; 97(6):1817-22.
 77. Avery DT, Ellyard JI, Mackay F, Corcoran LM, Hodgkin PD, Tangye SG. Increased expression of CD27 on activated human memory B cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage. *J Immunol.* 2005; 174(7):4034-42.
 78. Stevenson F, Sahota S, Zhu D, Ottensmeier C, Chapman C, Oscier D, Hamblin T. Insight into the origin and clonal history of B-cell tumors as revealed by

- analysis of immunoglobulin variable region genes. *Immunol Rev.* 1998; 162:247-59.
79. Creery D, Weiss W, Graziani-Bowering G, Kumar R, Aziz Z, Angel JB, Kumar A. Differential regulation of CXCR4 and CCR5 expression by interleukin (IL)-4 and IL-13 is associated with inhibition of chemotaxis and human immunodeficiency Virus (HIV) type 1 replication but not HIV entry into human monocytes. *Viral Immunol.* 2006; 19(3):409-23.
80. Ghobrial IM, Bone ND, Stenson MJ, Novak A, Hedin KE, Kay NE, Ansell SM. Expression of the chemokine receptors CXCR4 and CCR7 and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma. *Mayo Clin Proc.* 2004; 79(3):318-25.
81. López-Giral S, Quintana NE, Cabrerizo M, Alfonso-Pérez M, Sala-Valdés M, De Soria VG, Fernández-Rañada JM, Fernández-Ruiz E, Muñoz 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):462-71.
82. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* 2003; 102: 3483–3493.
83. Stolze B, Ebell W, Welte K. Different binding mechanisms of myeloid leukemic cells to adhesion molecules on bone marrow stromal fibroblasts induced by TNF-alpha and IL-4. *Ann Hematol.* 1998; 77: 265–274.
84. De Rossi G, Zarccone D, Mauro F, Cerruti G, Tenca C, Puccetti A, Mandelli F, Grossi CE. et al. Adhesion molecule expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: malignant cell phenotypes define distinct disease subsets. *Blood.* 1993; 81: 2679–2687.
85. Tretter T, Schuler M, Schneller F, Brass U, Esswein M, Aman MJ, Huber C, Peschel C. Direct cellular interaction with activated CD4(+) T cells overcomes hyporesponsiveness of B-cell chronic lymphocytic leukemia in vitro. *Cell Immunol.* 1998; 189: 41–50.
86. Joensuu H, Klemi PJ, Jalkanen S. Biologic progression in non-Hodgkin's lymphoma. A flow cytometric study. *Cancer.* 1990; 65: 2564–2571.

87. Agrawal SG, Liu FT, Wiseman C, Shirali S, Liu H, Lillington D, Du MQ, Syndercombe-Court D, Newland AC, Gribben JG, Jia L. Increased proteasomal degradation of Bax is a common feature of poor prognosis chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008; 111:2790–2796.
88. Grdisa M. Influence of CD40 ligation on survival and apoptosis of B-CLL-cells in vitro. *Leuk Res*. 2003; 27: 951–956.
89. Lundin J, Kimby E, Bergmann L, Karakas T, Mellstedt H, Osterborg A. Interleukin 4 therapy for patients with chronic lymphocytic leukaemia: a phase I/II study. *Br J Haematol*. 2001; 112: 155–160.
90. Weber KS, Klickstein LB, Weber C. Specific activation of leukocyte beta2 integrins lymphocyte function-associated antigen-1 and Mac-1 by chemokines mediated by distinct pathways via the alpha subunit cytoplasmic domains. *Mol Biol Cell*. 1999; 10(4):861-73.
91. Röpke C, Gladstone P, Nielsen M, Borregaard N, Ledbetter JA, Svejgaard A, Odum N. Apoptosis following interleukin-2 withdrawal from T cells: evidence for a regulatory role of CD18 (beta 2-integrin) molecules. *Tissue Antigens*. 1996; 48(2):127-35.
92. Wagner C, Hänsch GM, Stegmaier S, Deneffle B, Hug F, Schoels M. The complement receptor 3, CR3 (CD11b/CD18), on T lymphocytes: activation-dependent up-regulation and regulatory function. *Eur J Immunol*. 2001; 31(4):1173-80.
93. Hulkkonen J, Vilpo J, Vilpo L, Koski T, Hurme M. Interleukin-1 beta, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 plasma levels and cytokine gene polymorphisms in chronic lymphocytic leukemia: correlation with prognostic parameters. *Haematologica*. 2000; 85(6):600-6.
94. Meinhardt G, Wendtner CM, Hallek M. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. *J Mol Med*. 1999; 77(2):282-93.
95. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994; 76(2):301-14.
96. Burger JA, and Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*. 2006; 107(5):1761-7.

97. Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, O'Brien S, Lee BN, Lerner S, Kurzrock R. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood*. 2001; 97(1):256-63.
98. Jewell AP, Worman CP, Giles FJ, Goldstone AH. Serum levels of TNF, IL-6 and sCD23 correlate with changes in lymphocyte count in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia receiving interferon-alpha therapy. *Leuk Lymphoma*. 1997; 24(3-4):327-33.
99. Bojarska-Junak A, Hus I, Szczepanek EW, Dmoszyńska A, Roliński J. Peripheral blood and bone marrow TNF and TNF receptors in early and advanced stages of B-CLL in correlation with ZAP-70 protein and CD38 antigen. *Leuk Res*. 2008; 32(2):225-33.
100. Wierda WG, Johnson MM, Do KA, Manshouri T, Dey A, O'Brien S, Giles FJ, Kantarjian H, Thomas D, Faderl S, Lerner S, Keating M, Albitar M. Plasma interleukin 8 level predicts for survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2003; 120(3):452-6.
101. Kara IO, Sahin B, Gunesacar R. Expression of soluble CD27 and interleukins-8 and -10 in Bcell chronic lymphocytic leukemia: correlation with disease stage and prognosis. *Adv Ther*. 2007; 24(1):29-40.
102. di Celle PF, Carbone A, Marchis D, Zhou D, Sozzani S, Zupo S, Pini M, Mantovani A, Foa R. Cytokine gene expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of constitutive interleukin-8 (IL-8) mRNA expression and secretion of biologically active IL-8 protein. *Blood*. 1994; 84(1):220-8.
103. Zheng Z, Venkatapathy S, Rao G, Harrington CA. Expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia suggests deficient CD1-mediated immunity, polarized cytokine response, altered adhesion and increased intracellular protein transport and processing of leukemic cells. *Leukemia*. 2002; 16(12):2429-37.
104. Stratowa C, Löffler G, Lichter P, Stilgenbauer S, Haberl P, Schweifer N, Döhner H, Wilgenbus KK. CDNA microarray gene expression analysis of B-cell chronic lymphocytic leukemia proposes potential new prognostic markers involved in lymphocyte trafficking. *Int J Cancer*. 2001; 91(4):474-80.

105. Cordingley FT, Bianchi A, Hoffbrand AV, Reittie JE, Heslop HE, Vyakarnam A, Turner M, Meager A, Brenner MK. Tumour necrosis factor as an autocrine tumour growth factor for chronic Bcell malignancies. *Lancet*. 1988; 1(8592):969-71.
106. Lisignoli G, Toneguzzi S, Pozzi C, Piacentini A, Grassi F, Ferruzzi A, Gualtieri G, and Facchini A. Chemokine expression by subchondral bone marrow stromal cells isolated from osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) patients. *Clin Exp Immunol*. 1999; 116(2): 371–378.
107. Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, Urashima M, Yamamoto K, Libermann TA, Anderson KC. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood*. 1996; 87(3):1104-12.
108. Abbas AK and Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. 2005; Chapter 8, page 173.

XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Disszertációhoz kapcsolódó saját publikációk jegyzéke

1. **Plander M**, Seegers S, Ugocsai P, Diermeier-Daucher S, Iványi J, Schmitz G, Hofstädter F, Schwarz S, Orsó E, Knüchel R, Brockhoff G. Different proliferative and survival capacity of CLL-cells in a newly established in vitro model for pseudofollicles. *Leukemia*. 2009; 23:2118-2128.
2. **Plander M**, Seegers S, Ugocsai P, Iványi JL, Schwarz S, Orsó E és Brockhoff G. Krónikus lymphocytás leukémia sejtek javítják a csontvelői stromasejtek apoptózis gátló tulajdonságait. *Hemat Transzf.* 2009; 42:66- 73.
3. **Plander M**, Ugocsai P, Seegers S, Orsó E, Reichle A, Schmitz G, Hofstädter F, Brockhoff G. Chronic lymphocytic leukemia cells induce anti-apoptotic effects of bone marrow stroma. *Ann Hematol.* 2011; 90(12):1381-90.

Disszertációtól független saját publikációk jegyzéke

1. **Plander M**, Brockhoff G, Barlage S, Schwarz S, Rothe G, Knuechel R. Optimization of three- and four-color multiparameter DNA analysis in lymphoma specimens. *Cytometry A*. 2003; 54(1):66-74.
2. Iványi JL, Marton É, Gyánó G, **Plander M**: Krónikus myeloid leukémiás betegek korszerű kezelési lehetőségei- imatinib mesylate-terápiával szerzett tapasztalatainkról. *MOTESZ Magazin*, 2004. S3-4. s30-32.
3. **Plander M**, Salamon A, Toldy E, Iványi J: A celluláris immunválasz vizsgálata a Dupuytren-betegségben. *Magy. Belorv. Arch.* 2005.59.s7.
4. Brockhoff G, Heckel B, Schmidt-Bruecken E, **Plander M**, Hofstaedter F, Vollmann A, Diermeier S. Differential impact of Cetuximab, Pertuzumab and Trastuzumab on BT474 and SK-BR-3 breast cancer cell proliferation. *Cell Prolif.* 2007; 40(4):488-507.
5. **Plander M**, Salamon A, Toldy E, Kiss Gy, Kovács GL. Cellular immune response in Dupuytren's disease. *Biochimica Medica* 2008; 18(2):193-201.

6. Iványi JL, Marton E, **Plander M**, Gyánó G, Czumbil L, Tóth Cs. Központi idegrendszeri lymphomás betegek kezelése osztályunkon. Orv. Hetil. 2009; 18150(42):1937-44.
7. Iványi JL, Marton E, **Plander M**. A JAK2^{V617F}-mutáció jelentősége krónikus myeloproliferatív neoplasiás betegeinkben. Orv Hetil. 2011; 152(45):1795-803.

XII. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Regensburgi Egyetem Pathológiai Intézetében egykori munkatársaimnak dr. Gero Brockhoff, dr. Stephan Schwarz, Silvia Seegers, Prof. dr. Ferdinand Hofstädter, a Regensburgi Egyetem Klinikai Kémia Intézetében dr. Ugocsai Péter, dr. Orsó Evelyn, az Aacheni Egyetem Pathológia Intézetében Prof. dr. Ruth Knüchel-nek támogatását.

A Vas Megyei Markusovszky Kórházban dr. Iványi János Főorvos úrnak és Prof. Dr. Nagy Lajos Igazgató úrnak a támogatását.

A Katholischer Akademischer Ausländer Dienst és a Bayerische Forschung Stiftung anyagi támogatását.

Családomnak a kitartását.