

KRÓNIKUS LYMPHOCYTÁS LEUKÉMIA SEJTEK ÉS A MIKORKÖRNYEZET KÖLCSÖNHATÁSÁNAK JELENTŐSÉGE A BETEGSÉG PROGRESSZIÓJÁBAN

Doktori Tézisek

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

Bevezetés

A Krónikus lymphocytás leukémia a felnőttek leggyakoribb leukémiája a nyugati országokban, melyet az érett B-sejtes tumorok közé sorol a WHO klasszifikáció. A CLL a sejtek cytológiai képe, immunfenótipusa, génexpressziós profilja alapján egyforma betegségnek látszik, de a klinikai lefolyása rendkívül változatos. A betegség prognózisát a diagnóziskor befolyásolja a tumor tömeg, genetikai eltérések, jelátviteli (ZAP70) és adhéziós fehérjék (CD38, CD49d) kifejeződése.

A CLL pathogenézisében főleg az apoptózis rezisztencia, de az osztódás is szerepet játszik. A CLL-sejtek túlélésért és osztódásáért mikrokörnyezeti hatások is felelősek. *In vitro* sejt kultúra médiumban tenyésztve a CLL-sejtek gyorsan pusztulnak, de csontvelői eredetű stromasejtek (BMSCs) és egér fibroblasztok is közvetlen adhézió és citokinek révén javítják a CLL-sejtek túlélését. A CLL-sejt proliferáció az ún. pseudofollikulusokban történik. A Pseudofollikulusokat stroma sejtek, osztódó CLL-sejtek és velük interakcióban aktivált (CD40 ligandot expresszáló) T-lymphocyták alkotják. *In vitro* körülmények között CD40L és különböző T-sejt eredetű citokinek képesek a nyugvó CLL-sejtek proliferációját indukálni.

Célkitűzések

1. Csontvelői stromasejt kultúrák létrehozása és vizsgálata
2. CLL pseudofollikulus *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 pseudofollikulusok *in vitro* modelljében
4. CLL-sejtek csontvelői stromasejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata

Módszerek

21 CLL-ben szenvedő beteg perifériás vérmintáit vizsgáltuk az *in vitro* kísérletekbe, ill. 15 beteg csontvelő és perifériás vérmintáit klinikai mérésekben.

A BMSCs kultúrákat kezeletlen betegek normális csontvelő aspirátumaiból izolált mononukleáris sejtekből alapítottuk és átlagosan 6 hétig tenyésztettük őket.

Vizsgáltuk a BMSCs immunfenotípusát, citokin szekrécióját áramlási cytometriával és génexpressziós tulajdonságait real-time PCR-ral.

A CLL-sejteket perifériás mononukleáris sejtek közül izoláltuk.

A CLL-sejteket különböző sejt kultúra feltételek között tenyésztettük: 1. BMSCs fedett lemezekon, 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 arattuk.

A tenyésztés előtt és után vizsgáltuk sejtek immunfenotípusát, néhány gén expresszióját real time PCR-ral, a proliferációt multiparaméteres DNS analízissel, a túlélést sejtszám és az apoptotikus frakció meghatározással.

Eredmények

BMSCs kultúrák létrehozása és jellemzése

Csontvelői aspirátumok mononukleáris sejteiből FCS tartalmú médiumban egyéb kiegészítők nélkül 4-6 hét alatt érett, monolayer alkotó BMSCs tenyészetek fejlődtek ki. Fiatalabb donorok csontvelői mononukleáris sejteiből jelentősen több csontvelői

stromasejt képződött. A BMSCs VCAM-1, ICAM-1 adhéziós molekulák, valamint az IL6, IL8 citokinek és CXCL12 kemokin génjeit is magas szinten fejezték ki. A CD40, IL-1 β , TNF α mRNS is kimutatható volt bennük, de lényegesen alacsonyabb szinten. A génexpressziós eredményeknek megfelelően az IL6, IL8 citokinek nagy mennyiségben szekretáltak.

BMSCs és citokinek CLL-sejtekre gyakorolt hatásai

BMSCs hatására a CLL sejtek a vizsgált antigének többségének expresszióját fokozták, különösen a CD23, CD69 aktivációs antigéneket, a HLA-DR, CD86 koreceptorokat és CD54 (ICAM-1), CD49d adhéziós antigéneket. A B-sejt jellegért felelős PAX5 gén expressziója viszont csökkent.

Az *in vitro* eredmények megerősítéséhez összehasonlítottuk a csontvelő és perifériás vér CLL-sejtek CD49d expresszióját. A csontvelői sejtek normalizált CD49d expressziója mindig magasabb volt, mint a perifériás vér CLL-sejtjeinek.

A sCD40L csak gyenge addicionális hatást gyakorolt a BMSCs-n tenyésztett CLL-sejtek immunfenotípusára és gén expressziójára. Az antigének közül a CD11c, CD18, CD40, CD54 és HLADR kifejeződése indukálódott, míg a CD20 és CD184 kifejeződése csökkent.

A BMSC-n sCD40L jelenlétében tenyésztett CLL-sejteken IL4 hatására drámai módon fokozódott a CD23, CD40, CD54, CD86 antigének kifejeződése, míg a CD45, a B-sejt specifikus antigének CD19, CD20, adhéziós antigének CD49d, CD44 és a kemokin receptor CD184 (CXCR4) viszont csökkent, valamint nem változott a CD138 antigén expressziója. IL4 hatására jelentősen nőtt az IRF4 mRNS és az IRF4 fehérje expressziója a CLL-sejtekben. A PAX5 és Blimp1 gének kifejeződése nem változott.

IL2 és IL10 hatására a vizsgált adhéziós antigének többségének -CD11c, CD18, CD44, CD49d, CD54- expressziója fokozódott, míg a SDF-1 receptor CD184 kifejeződése csökkent.

CLL-sejtek különböző proliferációs és túlélési képességeinek feltárása

A 21 vizsgálat CLL eset egyikében sem tudunk osztódó sejteket kimutatni a perifériás vérben. Az alkalmazott sejt kultúra körülmények közül csak a sCD40L, IL2 és IL10 „koktél” váltott ki 8 esetben osztódást a BMSCs-n tenyésztett CLL-sejtek között. Mindegyik thrombocytopeniás esetből izolált CLL-sejt képes volt osztódni. Két olyan esetből származó CLL-sejtek is osztódtak, ahol a thrombocytaszám a normál tartomány alsó határán helyezkedett el (140-166 G/l). A sejtciklus S és G2/M fázisában lévő sejtek aránya 0,7-7,8% között változott a tenyésztés végén. Az osztódó sejtek számos adhéziós molekulát és T-sejt koreceptort intenzívebben fejeztek ki, de 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.

A BMSCs *in vitro* csökkentették a CLL-sejtek spontán apoptózisát. BMSCs nélkül sejt kultúra médiumban a proliferációra képes CLL-sejtek és a nem osztódó sejtek azon csoportja, amelyik csírasejtvonal IgV_H és/vagy $5 \times 10^4/\mu\text{l}$ feletti perifériás lymphocytákkal rendelkeztek sokkal jobb túlélést mutattak, mint az osztódásra nem képes sejtek másik csoportja. A különböző citokinek (sCD40L, IL4, IL2+10) önmagukban és kombinációban is nagyon heterogén módon befolyásolták a CLL-sejtek túlélését mind a BMSCs-n, mind a médiumban

CLL-sejtek csontvelői stromasejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata

CLL-sejtek jelenlétében a BMSCs-ben szignifikánsan emelkedett az ICAM1 és CD40, míg nem változott a VCAM1 és CXCL12 mRNS kifejeződése. CLL-sejtek hatására jelentősen nőtt a felülúszóban az IL8, IL1 β és TNF α szintje is. Az IL6 szekréció is nőtt, de ez nem érte el a statisztikai szignifikancia határát. A BMSCs és CLL-sejtekben a citokin mRNS-ek meghatározásával kimutattuk, hogy az IL1 β , IL6 és IL8 főleg a BMSCs-ből, míg a TNF α szekréció a CLL-sejtekből származott.

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.
3. A csontvelői mikrokörnyezet *in vivo* is fokozza a CLL-sejtek felszínén a CD49d antigén kifejeződését.
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.
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.
10. CLL-sejteken 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.
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.

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. *Biochemia 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.