

# ULOGA TNF- $\alpha$ I IFN- $\gamma$ U INTERAKCIJAMA TUMORSKIH STANICA I STANICA TUMORSKOG MIKROOKOLIŠA U PRIMARNOM MEDIJASTINALNOM B-STANIČNOM LIMFOMU

---

Gršković, Paula

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:667323>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Paula Gršković

**ULOGA TNF- $\alpha$  I IFN- $\gamma$  U  
INTERAKCIJAMA TUMORSKIH  
STANICA I STANICA TUMORSKOG  
MIKROOKOLIŠA U PRIMARNOM  
MEDIJASTINALNOM B-STANIČNOM  
LIMFOMU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Paula Gršković

**THE ROLE OF TNF- $\alpha$  AND IFN- $\gamma$  IN THE  
INTERACTIONS BETWEEN TUMOUR  
CELLS AND TUMOUR  
MICROENVIRONMENT CELLS IN PRIMARY  
MEDIASTINAL B CELL LYMPHOMA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.

Ovaj je doktorski rad izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, pod vodstvom prof. dr. sc. Petre Korać u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

#### Informacije o mentoru:

Prof. dr. sc. Petra Korać završila je diplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu 2002. godine, gdje je 2007. godine i doktorirala u području imunobiologije i fiziologije. Godine 2009. završila je stručni magisterij Upravljanje u znanosti na Medicinskom fakultetu/Školi narodnog zdravlja „Andrija Štampar“. Od svibnja 2004. godine bila je zaposlena kao znanstveni novak-asistent/viši asistent Medicinskog fakulteta u Zagrebu s radnim mjestom u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KB Merkur. Od rujna 2012. godine zaposlena je na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta gdje trenutno radi kao redoviti profesor. Predaje na kolegijima „Genomi“, „Medicinska genetika“, „Molekularna dijagnostika“, „Metode istraživanja u molekularnoj biologiji“, „Razvoj znanstvene misli u biologiji“, „Rezistencija virusa na lijekove“, „Molekularna dijagnostika neoplazmi“, „Biology 1“ i „Biology 2“. Predavač je i na Zdravstvenom Veleučilištu u Zagrebu i Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Sudjeluje u istraživanjima europskih i hrvatskih projekata u području biologije tumora, molekularne dijagnostike, medicinske genetike i infektivnih bolesti. Do sada je objavila 40 znanstvenih i 11 stručnih radova i sudjelovala u istraživanjima koja su rezultirala s 84 izlaganja na znanstvenim i stručnim skupovima. Bila je mentor velikog broja završnih i diplomskih radova na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta i na Zdravstvenom veleučilištu. Usavršavala se na znanstvenim ustanovama u Njemačkoj, Nizozemskoj, Francuskoj, Ujedinjenom Kraljevstvu i Gani. Znanstvena je suradnica u polju kliničkih medicinskih znanosti te znanstvena savjetnica u polju biologije.

## Zahvale

Mentorici prof. dr. sc. Petri Korać, za pet i pol divnih godina koje su proletjele, a zna se da vrijeme leti kad se zabavljaš. Hvala za sve savjete, pomoć, razgovore o znanstvenim i neznastvenim temama, čajeve, kolače, čokolade, knjige i tisuću drugih stvari za koje bi mi trebao još jedan dokument duljine ovog da ih sve nabrojim.

Prof. dr. sc. Ingi Urlić, prof. dr. sc. Maji Matulić i dr. sc. Katarini Caput Mihalić za svu pomoć i savjete oko eksperimenata.

Prof. dr. sc. Slavku Gašparovu, dr. med. i Suzani Hančić, mag. med. lab. diag. za svu pomoć s uzorcima (a i za svu drugu pomoć tijekom godina koja nije imala veze s doktoratom).

This research would not have been possible without the support of Dr. K. Mellert, Dr. S. Bruderlein and Prof. Dr. P. Möller whom we are very grateful for providing the cell line MedB-1.

„Partnericama u zločinu“, Valeriji Begić prof. i dr. sc. Suzani Harabajsi mag. med. lab. diag., za međusobnu potporu na putu prema doktoratima.

Maji Ledinski mag. biol. mol. i Karli Ostojić mag. nutr. clin. za sve čokolade koje su nas održavale u pogonu i za ustrajne pokušaje da organizirate Secret Santa koje ja obično upropastim jer se izlanem.

„Malom vijeću“ (abecednim redom jer ste svi jednako važni): dr. sc. Renati Bibi, Adeli Kodrnji, mag. edu., Bruni Komazecu mag. biol. mol., dr. sc. Karli Košpić, dr. sc. Dori Markulin, dr. sc. Damjanu Mitiću i dr. sc. Marinu Radovčiću, za sve kave, diskusije i smijeh bez kojih bi ovih pet i pol godina bilo puno monotonije.

Mojim diplomantima, službenim i neslužbenim (redom kojim su dolazili): Mariji Rozman mag. biol. mol., Tei Mejovšek mag. biol. exp., Matku Bazdanu mag. biol. mol., Jeleni Vojvodić mag. biol. mol., Anji Krstulović mag. biol. mol., Valentinu Mihaliću, Klari Rajković i Nini Vidović, za zajednički rad i boost mojim sposobnostima i životopisu kao komentoru vaših diplomskih radova.

Mojoj obitelji i prijateljima, koji me uvijek u svemu podržavaju, iako im nije baš uvijek jasno čime se bavim. Eto, sad ćemo imati uvezenu kopiju doktorata pa imate štivo za čitanje.

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

**ULOGA TNF- $\alpha$  I IFN- $\gamma$  U INTERAKCIJAMA TUMORSKIH STANICA I STANICA  
TUMORSKOG MIKROOKOLIŠA U PRIMARNOM MEDIJASTINALNOM B-  
STANIČNOM LIMFOMU**

PAULA GRŠKOVIĆ

Prirodoslovno-matematički fakultet

Primarni medijastinalni B-stanični limfom (PMBCL) je agresivni tip nehodgkinskog limfoma (NHL). Dijeli karakteristike s difuznim B-velikostaničnim limfomom (DLBCL), ali i s klasičnim Hodgkinovim limfomom (cHL), uključujući aberacije gena uključenih u regulaciju imunskog odgovora. U ovom istraživanju ekspresija gena *TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , *cREL*, *CXCL10*, *CXCR3*, *PD-L1* i *PD-1* u uzorcima tkiva PMBCL-a bila je uspoređena s njihovom ekspresijom u netumorskim limfocitima B i T metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR). Modelne stanične linije PMBCL-a Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p bile su tretirane s različitim koncentracijama TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  tijekom 24 i 48 sati, a zatim se kvantificirala ekspresija gena *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1* metodom qPCR. Dulji tretman s TNF- $\alpha$  uzrokovao je povišenje ekspresije *cREL*, što bi moglo utjecati na ekspresiju nizvodnih gena. Tretman s IFN- $\gamma$  potaknuo je visoku ekspresiju *CXCL10*, koja je potencijalno bila niska u uzorcima tumora pacijenata i netretiranim staničnim linijama zbog niske ekspresije IFN- $\gamma$ . Ekspresija *PD-L1* nije pokazala ujednačen odgovor na tretmane u različitim staničnim linijama. Ovi rezultati sugeriraju da tumorske stanice stvaraju upalni mikrookoliš i reguliraju kemotaksiju limfocita T kako bi izbjegle imunski odgovor.

(78 stranica, 22 slike, 5 tablica, 191 literaturni navod, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: tumorski mikrookoliš, PMBCL, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , PD-L1

Mentor: prof. dr. sc. Petra Korać

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Inga Urlić, prof. dr. sc. Maja Matulić, doc. dr. sc. dr. med. Snježana Dotlić

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of Biology

**THE ROLE OF TNF- $\alpha$  AND IFN- $\gamma$  IN THE INTERACTIONS BETWEEN TUMOUR  
CELLS AND TUMOUR MICROENVIRONMENT CELLS IN PRIMARY  
MEDIASTINAL B CELL LYMPHOMA**

PAULA GRŠKOVIĆ

Faculty of Science

Primary mediastinal B-cell lymphoma (PMBCL) is an aggressive type of non-Hodgkin lymphoma (NHL). It shares features with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), but also with classical Hodgkin lymphoma (cHL), including aberrations of genes involved in the regulation of immune response. In this study, the expression of genes *TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , *cREL*, *CXCL10*, *CXCR3*, *PD-L1* and *PD-1* was compared between PMBCL tissue samples and non-tumour B- and T-cells using quantitative polymerase chain reaction (qPCR). PMBCL model cell lines Farage, U2940, MedB-1 and Karpas1106p were treated with different concentrations of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  over 24 and 48 hours, which was followed by the quantification of *cREL*, *CXCL10* and *PD-L1* expression using qPCR. Prolonged exposure to TNF- $\alpha$  increased the expression of *cREL*, and possibly the expression of downstream genes. IFN- $\gamma$  strongly induced *CXCL10* expression, which seemed to be inhibited in non-treated PMBCL cell lines and patients' tissue samples. The expression of *PD-L1* did not display uniform response to the treatments across various cell lines. These results suggest that PMBCL tumour cells create proinflammatory microenvironment and regulate T-cell chemotaxis in order to avoid immune response.

(78 pages, 22 figures, 5 tables, 191 references, original in Croatian)

Keywords: tumour microenvironment, PMBCL, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , PD-L1

Supervisor: Prof. dr. sc. Petra Korać

Reviewers: Prof. dr. sc. Inga Urlić, Prof. dr. sc. Maja Matulić, Doc. dr. sc. dr. med. Snježana Dotlić



## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Literaturni pregled.....	4
2.1. Nastanak tumora.....	4
2.1.1. Limfomi.....	4
2.1.2. Primarni medijastinalni B-stanični limfom.....	5
2.2. Interakcije tumorskih stanica i tumorskog mikrokoliša.....	6
2.2.1. Faktor tumorske nekroze alfa.....	7
2.2.2. Interferon gama.....	8
2.2.3. cREL.....	9
2.2.4. Interakcija CXCL10/CXCR3.....	10
2.2.5. Interakcija PD-L1/PD-1.....	10
3. Materijali i metode.....	12
3.1. Materijali.....	12
3.1.1. Uzorci pacijenata.....	12
3.1.2. Stanične linije.....	13
3.1.2.1. Modelne stanične linije.....	13
3.1.2.2. Kontrolna stanična linija.....	14
3.2. Metode.....	14
3.2.1. Mikrodisekcija.....	14
3.2.2. Izolacija RNA.....	15
3.2.3. Reverzna transkripcija.....	16
3.2.4. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.....	17
3.2.5. Stanična kultura.....	19

3.2.5.1. Tretmani.....	20
3.2.6. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu za tretmane s TNF- $\alpha$ i IFN- $\gamma$ .....	22
3.2.7. Statistička analiza rezultata.....	23
4. Rezultati.....	25
4.1. Analiza ekspresije gena <i>TNF-<math>\alpha</math></i> , <i>IFN-<math>\gamma</math></i> , <i>cREL</i> , <i>CXCL10</i> , <i>CXCR3</i> , <i>PD-L1</i> i <i>PD-1</i> u uzorcima pacijenata s primarnim medijastinalnim B-staničnim limfomom .....	25
4.1.1. Koncentracije i čistoće uzoraka RNA izoliranih iz uzoraka tumorskog tkiva pacijenata i iz izdvojenih germinalnih centara i interfolikularnih zona netumorskih tonzila.....	25
4.1.2. Usporedba ekspresije gena <i>TNF-<math>\alpha</math></i> , <i>IFN-<math>\gamma</math></i> , <i>cREL</i> , <i>CXCL10</i> , <i>CXCR3</i> , <i>PD-L1</i> i <i>PD-1</i> u uzorcima tumorskog tkiva i netumorskim limfocitima B i T.....	25
4.2. Analiza ekspresije gena <i>TNF-<math>\alpha</math></i> , <i>cREL</i> , <i>CXCL10</i> i <i>PD-L1</i> u tumorskim staničnim linijama.....	27
4.2.1. Koncentracije i čistoće uzoraka RNA izoliranih iz taloga staničnih linija Farage, U2940, MedB-1, Karpas1106p i HeLa.....	27
4.2.2. Ekspresija <i>TNF-<math>\alpha</math></i> u netretiranim staničnim linijama.....	27
4.2.3. Analiza ekspresije gena <i>cREL</i> , <i>CXCL10</i> i <i>PD-L1</i> u tumorskim staničnim linijama nakon tretmana s TNF- $\alpha$ .....	28
4.2.3.1. Usporedba ekspresije gena <i>cREL</i> , <i>CXCL10</i> i <i>PD-L1</i> u tumorskim staničnim linijama nakon tretmana s različitim koncentracijama TNF- $\alpha$ i netretiranim tumorskim staničnim linijama.....	28
4.2.3.2. Usporedba ekspresije gena <i>cREL</i> , <i>CXCL10</i> i <i>PD-L1</i> nakon 24 i 48 sati tretmana s TNF- $\alpha$ .....	32
4.2.3.3. Usporedba ekspresije gena <i>cREL</i> , <i>CXCL10</i> i <i>PD-L1</i> u modelnim staničnim linijama u odnosu na staničnu liniju HeLa nakon tretmana s TNF- $\alpha$ .....	38
4.2.4. Analiza ekspresije gena <i>CXCL10</i> i <i>PD-L1</i> u tumorskim staničnim linijama nakon tretmana s IFN- $\gamma$ .....	38
4.2.4.1. Usporedba ekspresije gena <i>CXCL10</i> i <i>PD-L1</i> u tumorskim staničnim linijama nakon tretmana različitim koncentracijama IFN- $\gamma$ i netretiranim tumorskim staničnim linijama.....	38

4.2.4.2. Usporedba ekspresije gena <i>CXCL10</i> i <i>PD-L1</i> nakon 24 i 48 sati tretmana s IFN- $\gamma$ ...	41
4.2.4.3. Usporedba ekspresije gena <i>CXCL10</i> i <i>PD-L1</i> u modelnim staničnim linijama u odnosu na staničnu liniju HeLa nakon tretmana s IFN- $\gamma$ .....	46
5. Rasprava.....	47
6. Zaključak.....	55
7. Popis literature.....	56
8. Životopis.....	78

## 1. Uvod

Limfomi su heterogena skupina malignih tumora koji nastaju iz različitih razvojnih stadija limfoidne linije leukocita, koja uključuje limfocite B, limfocite T i prirodno ubilačke stanice (NK, od engl. *natural killer cells*). Klasifikacija i dijagnostika limfoma bazirane su na identifikaciji vrste i razvojnog stadija stanica limfoidne linije iz koje je tumor nastao. Glavna podjela limfoma je u dvije skupine: Hodgkinov limfom (HL), prepoznatljiv po pojavi specifičnih Reed-Sternbergovih stanica unutar upalnog infiltrata, i nehodgkinski limfomi (NHL), građeni dominantno od atipičnih limfocita različite veličine i razvojnih stadija. Jedan od agresivnih tumora koji pripada skupini nehodgkinskih limfoma je primarni mediastinalni B-stanični limfom (PMBCL, od engl. *primary mediastinal B-cell lymphoma*). Najčešće nastaje iz timusnih limfocita B u prsnoj koži i čini svega 2-3% svih nehodgkinskih limfoma (1). Ranije se smatrao podtipom difuznog B-velikostaničnog limfoma (DLBCL, od engl. *diffuse large B-cell lymphoma*), najčešćeg nehodgkinskog limfoma zapadnog svijeta kod odrasle populacije, ali se analizom profila genske ekspresije utvrdilo da je ekspresija dijela gena (*IL-13*, *JAK2*, *STAT1*, porodica *TNF*) u PMBCL-u povišena u odnosu na DLBCL, a razina ekspresije tih gena odgovara njihovoj razini ekspresije u klasičnom Hodgkinovom limfomu (cHL, od engl. *classical Hodgkin lymphoma*) (2, 3).

Faktor tumorske nekroze alfa ( $TNF-\alpha$ , od engl. *tumour necrosis factor  $\alpha$* ) dio je porodice proteina TNF i jedan je od proteina koji ima značajnu ulogu u međustaničnoj komunikaciji. Vežanjem na receptor  $TNF-\alpha$  preko transkripcijskih faktora, među kojima je i REL, aktivira stanični put  $NF\kappa B$  (od engl. *nuclear factor  $\kappa B$* ) u tumorskim stanicama (4), koji uzrokuje povišenu ekspresiju gena koji tumorskim stanicama omogućuju proliferaciju i izbjegavanje apoptoze (5). Amplifikacije gena *REL* također su opažene u PMBCL-u, a aberacije ovog gena pojavljuju se i u cHL-u te DLBCL-u (6). Jedan od gena čija se ekspresija inducira signalnim putem  $NF\kappa B$ , u interakciji sa signalnim putovima aktiviranim interferonom gama ( $IFN-\gamma$ ) je *CXCL10* (od engl. *C-X-C motif chemokine ligand 10*) (7), koji kodira kemokin koji privlači limfocite T na mjesto razvoja tumorskih stanica vežanjem na receptor CXCR3 (od engl. *CXC chemokine receptor 3*) na aktiviranim limfocitima T. Aktivirani limfociti T na membranama eksprimiraju protein PD-1 (od engl. *programmed cell death protein 1*), čija je prirodna uloga inhibicija imunskog odgovora nakon uklanjanja patogena u interakciji s ligandom PD-L1 (od engl. *programmed cell death ligand 1*) (8). Gen *PD-L1* se u genomu nalazi u regiji 9p24, uz gene *JAK2* i *STAT1*, a pokazalo se da značajan broj uzoraka (60%) PMBCL-a i cHL-a ima amplifikacije ove regije (9). Ekspresija *PD-L1* u tumorskim stanicama inducira se citokinima,

uključujući parakrinim djelovanjem IFN- $\gamma$  kojeg luče pridošli limfociti T i autokrinim djelovanjem CXCL10 (10, 11). Interakcija između PD-L1 i PD-1 dovodi do inaktivacije limfocita T i njihovog prelaska u stanje anergije (12) i inhibicije imunskog odgovora (13), što je jedan od načina kako tumori pospješuju svoj rast i onemogućavaju ponovnu uspostavu homeostaze imunskog sustava (14).

Svrha ovog rada je istraživanje potencijalnog modela mehanizma komunikacije između tumorskih stanica i limfocita T koji se temelji na signalizaciji posredovanoj s TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  u PMBCL-u. Cilj doktorske disertacije je istražiti promjene u ekspresiji gena *cREL*, *CXCL10*, *CXCR3*, *PD-L1* i *PD-1* u tumorskim stanicama PMBCL-a potaknute djelovanjem citokina TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ . Specifični ciljevi doktorske disertacije su prikupljanje dostupnih uzoraka PMBCL-a u kojima će se analizirati razina ekspresije gena *TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , *cREL*, *CXCL10*, *CXCR3*, *PD-L1* i *PD-1*, prikupljanje uzoraka netumorskih limfatičnih tkiva tonzile, iz kojih će se izolirati germinalni centri (stanice porijeklom kojih su stanice PMBCL-a) i zone limfocita T koje ih okružuju te analiza razine ekspresije gena *TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , *cREL*, *CXCL10*, *CXCR3*, *PD-L1* i *PD-1* u izdvojenim netumorskim populacijama stanica. Ostali specifični ciljevi uključuju određivanje razine ekspresije gena *TNF- $\alpha$* , *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1* u staničnim linijama koje su model PMBCL-a i kontrolnoj staničnoj liniji (stanicama epitelnog porijekla), odabir fiziološki primjerenih, optimalnih koncentracija citokina TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  i tretman odabranih staničnih linija, analiza ekspresije gena *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1* u tumorskim stanicama tretiranim s ljudskim rekombinantnim proteinom TNF- $\alpha$  koji luče i tumorske stanice i stanice mikrookoliša, analiza ekspresije gena *PD-L1* u tumorskim stanicama tretiranim ljudskim rekombinantnim proteinom IFN- $\gamma$  koji luče limfociti T te predlaganje mehanizama komunikacije tumorskih stanica i limfocita T njihovog mikrookoliša.

Prvi dio istraživanja napravljen je na uzorcima pacijenata kako bi se analizirala ekspresija gena od interesa u uzorcima tkiva koji osim tumorskih stanica obuhvaćaju i različite vrste drugih stanica i faktora koje čine specifičan tumorski mikrookoliš. Korištene metode uključuju izolaciju RNA iz parafinskih uzoraka PMBCL-a i mikrodiseciranih netumorskih tonzila koje su služile kao kontrolna skupina, reverznu transkripciju i lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR, od engl. *quantitative polymerase chain reaction*). Kako bi se utjecaj TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  na ekspresiju gena od interesa mogao pratiti u stvarnom vremenu, drugi dio istraživanja napravljen je na modelnim staničnim linijama PMBCL-a. Modelne stanične linije PMBCL-a Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p te stanična linija epitelnog porijekla HeLa bile su uzgojene i tretirane različitim koncentracijama TNF- $\alpha$  (5, 10,

20 i 50 ng/mL) i IFN- $\gamma$  (30 i 50 ng/mL) tijekom 24 i 48 sati, nakon čega je iz njih izolirana RNA. Nakon reverzne transkripcije, ekspresija gena od interesa analizirana je metodom qPCR kako bi se utvrdilo postoji li razlika u ekspresiji gena od interesa ovisno o duljini tretmana i koncentraciji agensa kojim su tretirane. Hipoteza istraživanja je da povišena ekspresija citokina TNF- $\alpha$  i citokina IFN- $\gamma$  dovodi do povišene ekspresije liganda PD-L1 na tumorskim limfocitima B, što dovodi do supresije imunološkog odgovora protiv tumorskih stanica kod pacijenata s dijagnozom PMBCL-a.

## 2. Literaturni pregled

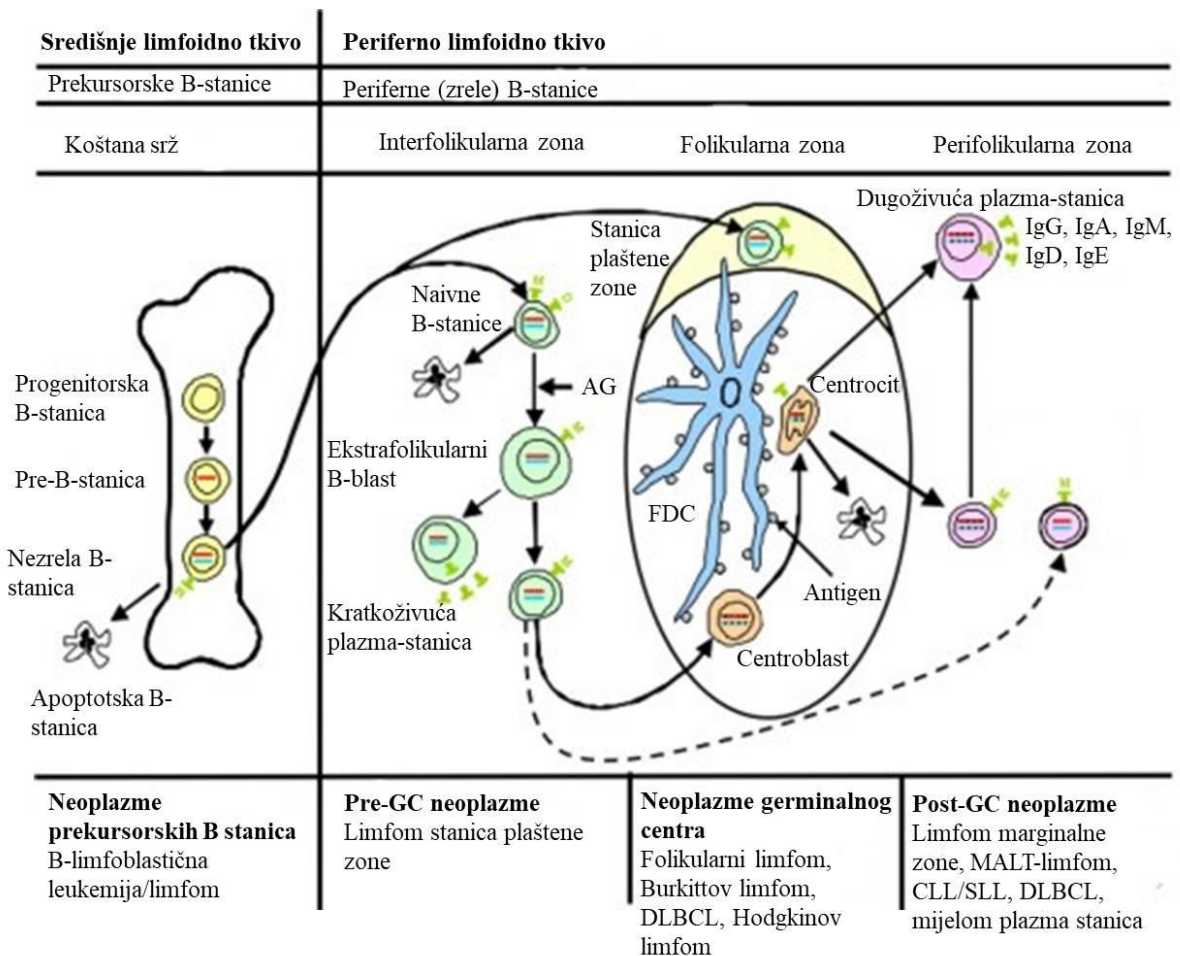
### 2.1. Nastanak tumora

Tumori su nakupine stanica koje karakterizira prekomjerna proliferacija bez fiziološke funkcije. Dije se na benigne tumore, koji su ograničeni na dio organizma gdje nastaju i ne šire se na okolna tkiva i organe, i maligne tumore koji se šire na okolna tkiva, a imaju i sposobnost metastaziranja, odnosno mogu se proširiti i na udaljene organe u organizmu kroz krvožilni ili limfni sustav (15). Osim prekomjerne proliferacije, tumorske stanice karakteriziraju i promjene u signalnim putovima koje utječu na metabolizam i preživljenje stanica te stvaranje mikrookoliša pogodnog za rast i razvoj tumora u interakciji s okolnim stanicama, uključujući stanice imunskog sustava (16). Iako je jedna od uloga imunskog sustava eliminacija transformiranih stanica iz kojih bi se mogao razviti tumor, stanice imunskog sustava također su podložne malignim promjenama. Tumori porijekla iz stanica imunskog sustava dijele se na tumore mijeloidnog porijekla, limfoidnog porijekla i porijekla histiocita/dendritičkih stanica. Ovisno o lokaciji nastanka tumora, tumori krvnih stanica dijele se na leukemije (ako je tumor porijekla iz koštane srži) i limfome (ako je tumor porijekla iz stanica koje se nalaze u drugim dijelovima limfnog sustava) (1).

#### 2.1.1. Limfomi

Limfomi su heterogena skupina malignih tumora koji nastaju iz različitih razvojnih stadija limfoidne linije leukocita, koja uključuje limfocite B, limfocite T i prirodno ubilačke stanice (NK, od engl. *natural killer cells*). Klasifikacija i dijagnostika limfoma bazirane su na identifikaciji vrste i razvojnog stadija stanica limfoidne linije iz koje je tumor nastao. Glavna podjela limfoma je u dvije skupine: Hodgkinov limfom (HL), prepoznatljiv po pojavi specifičnih Reed-Sternbergovih stanica unutar upalnog infiltrata, i nehodgkinski limfomi (NHL), građeni dominantno od atipičnih limfocita različite veličine i razvojnih stadija. NHL se dijele na B-stanične limfome, T-stanične limfome i limfome stanica NK, a T-limfomi i limfomi stanica NK se zbog srodnosti i imunofenotipskih i funkcionalnih svojstava koje stanice NK dijele s limfocitima T grupiraju zajedno. Za većinu B- i T-limfoma utvrđen je razvojni stadij limfocita B i T iz kojih oni nastaju, ali za neke entitete, npr. leukemiju vlasastih stanica (engl. *hairy cell leukemia*), nije utvrđen odgovarajući stadij netumorskih stanica iz kojih nastaje tumor (1). B-limfomi mogu nastati iz prekursorskih limfocita i zrelih limfocita B-imunofenotipa (Slika 1) (1), a iz timusnih limfocita B, posebne skupine aktiviranih B-stanica različitog fenotipa u odnosu na periferne limfocite B (17), nastaje

primarni medijastinalni B-stanični limfom (PMBCL, od engl. *primary mediastinal B-cell lymphoma*) (1).



Slika 1. Lokalizacija razvojnih stadija limfocita B i limfoma koji iz njih nastaju. Prilagođeno prema Swerdlow i suradnicima (1). GC – germinalni centar, AG – antigen, FDC – folikularne dendritičke stanice (engl. *follicular dendritic cells*). DLBCL – difuzni B-velikostanični limfom (engl. *diffuse large B-cell lymphoma*), MALT – limfoidno tkivo sluznice (engl. *mucosa-associated lymphoid tissue*), CLL – kronična limfocitična leukemija (engl. *chronic lymphocytic leukemia*), SLL – limfom malih limfocita (engl. *small lymphocytic lymphoma*).

### 2.1.2. Primarni medijastinalni B-stanični limfom

PMBCL je agresivni limfom koji nastaje iz timusnih limfocita B u prsnoj koži i čini svega 2-3% svih NHL-a. Češće se pojavljuje u mlađoj populaciji, s medijanom dobi dijagnoze oko 35 godina, i češći je kod žena nego kod muškaraca (u omjeru 1,7:1). Tumorske stanice ekspresiraju CD20, marker limfocita B, a tumor najčešće nastaje iz timusnih limfocita B u prsnoj koži pa pritiskanjem o plućna krila uzrokuje kašalj i zadihanost (1). Kod dijela



pacijenata (25-30%) pojavljuje se i opstrukcija gornje šuplje vene (18). Iako je u početnim fazama tumor uglavnom lokaliziran, može se proširiti nakon relapsa. Ranije se smatrao podtipom difuznog B-velikostaničnog limfoma (DLBCL, od engl. *diffuse large B-cell lymphoma*), najčešćeg agresivnog nehodgkinskog limfoma zapadnog svijeta kod odrasle populacije, ali se analizom profila genske ekspresije utvrdilo da je ekspresija dijela gena (*IL-13*, *JAK2*, *STAT1*, porodica *TNF*) u PMBCL-u povišena u odnosu na DLBCL, a razina ekspresije tih gena odgovara razini ekspresije u klasičnom Hodgkinovom limfomu (cHL, od engl. *classical Hodgkin lymphoma*) (2, 3). Svojstva koja PMBCL dijeli s DLBCL-om uključuju difuzni obrazac rasta, centroblastičnu morfologiju atipičnih limfocita, ekspresiju markera limfocita B: CD19, CD20, CD22 i CD79a (1, 19) te ekspresiju transkripcijskih faktora OCT2 i BOB1 (19). Ekspresija CD30 (19), visoka razina ekspresije PD-L1 (od engl. *programmed cell death ligand 1*) uzrokovana pojačanom aktivacijom puta JAK/STAT (od engl. *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) (9) i mutacije u genu *TNFAIP3*, koji kodira inhibitor puta NF $\kappa$ B (od engl. *nuclear factor  $\kappa$  B*) (20), su svojstva koja PMBCL dijeli s cHL-om. Za razliku od DLBCL-a, kromosomske aberacije gena *BCL2*, *BCL6* i *MYC* rijetko se pojavljuju kod PMBCL-a (1). Kromosomske aberacije koje su česte kod PMBCL-a uključuju translokacije regije 16p13.13 u kojoj se nalazi gen *CIITA*, koji kodira transaktivator klase II glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC, od engl. *major histocompatibility complex*) (21), i amplifikacije kraćeg kraka kromosoma 9, koji uključuje gene *JAK2*, *PD-L1* i *PD-L2*, čija povišena ekspresija utječe na inhibiciju imunskog odgovora u PMBCL-u (9, 2, 3). U nedostatku funkcionalnog proteina CIITA smanjena je ekspresija klase II molekula MHC na tumorskim limfocitima B zbog čega se tumorski antigeni ne mogu predstaviti pomoćničkim limfocitima T odgovornima za pokretanje antitumorskog odgovora (22). S druge strane, pojačana aktivnost kinaze Janus 2 (JAK2) dovodi do povišene ekspresije PD-L1 (9, 2, 3), odnosno PD-L2 (23, 24, 25), liganada koji u kontaktu s receptorom PD-1 (engl. *programmed cell death protein 1*) na aktiviranim limfocitima T dovode do inhibicije imunskog odgovora protiv tumora prelaskom aktiviranih limfocita T u stanje anergije. Sprečavanjem aktivacije imunskog odgovora i inhibicijom već postojeće imunodne reakcije u interakcijama s okolnim stanicama, tumorske stanice PMBCL-a izbjegavaju imunski odgovor i stvaraju mikrookoliš pogodan za svoj daljnji opstanak i diobe.

## 2.2. Interakcije tumorskih stanica i tumorskog mikrookoliša

Tumorski mikrookoliš uključuje izvanstanični matriks (ECM, od engl. *extracellular matrix*), krvožilni sustav, vezivno tkivo i stanice imunskog sustava koje infiltriraju tumor te sve

molekule koje komponente tumorskog mikrookoliša i same tumorske stanice luče. Uloga ECM-a u razvoju tumora bolje je istražena u solidnim tumorima nego u hematološkim neoplazmama, no pokazano je da su morfologija i sastav ECM-a promijenjeni kod HL-a u odnosu na netumorski limfni čvor i rane stadije folikularnog limfoma (FL), što sugerira da ECM ima ulogu i u razvoju hematoloških neoplazmi (26). Budući da je pokazano da interakcija s ECM-om utječe na sudbinu limfocita B u slezeni (27), važno je razumijeti ulogu ECM-a u patogenezi limfoma. Obrazac vaskularizacije razlikuje se između limfoma i solidnih tumora i upalnih procesa u netumorskim limfnim čvorovima (28), a uočena je i povezanost infiltracije tumora aktiviranim limfocitima T kroz endotelne venule čiji se broj u limfnom čvoru povećava nakon smanjenja broja regulacijskih limfocita T (29). Broj regulacijskih limfocita T povećan je u krvi pacijenata oboljelih od NHL u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika (30, 31), što korelira sa smanjenim brojem citotoksičnih limfocita T (32). Inhibicija imunskog odgovora se osim u smanjenom broju limfocita T očituje i u njihovom prelasku u stanje anergije kao posljedica kontakta između povišeno eksprimiranih liganada PD-L1 i PD-L2 na tumorskim stanicama i receptora PD-1 na limfocitima T (33). Iako PMBCL češće sadrži amplifikacije i translokacije gena *PD-L1* u odnosu na druge vrste limfoma, povišena ekspresija gena *PD-L1* u PMBCL-u u odnosu na netumorske reaktivne tonzile uočena je i u uzorcima bez ikakvih kromosomskih aberacija tog gena, a više od polovice uzoraka pacijenata oboljelih od PMBCL-a nema kromosomske aberacije gena *PD-L1* (34), što sugerira da kromosomske aberacije gena *PD-L1* nisu jedini uzrok povišene ekspresije ovog gena u PMBCL-u. Osim *PD-L1*, amplifikacije, mutacije i promjene ekspresije gena detektirane u PMBCL-u povezane s aktivacijom puta NF $\kappa$ B djelovanjem faktora tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ , od engl. *tumour necrosis factor  $\alpha$* ) (6, 20) sugeriraju da bi putovi aktivirani vezanjem TNF- $\alpha$  na receptore i proteini čija se ekspresija inducira preko TNF- $\alpha$  mogli imati značajnu ulogu u patogenezi PMBCL-a.

### 2.2.1. Faktor tumorske nekroze alfa

TNF- $\alpha$  dio je porodice proteina TNF, a ime je dobio prema svom toksičnom djelovanju na stanične linije u uvjetima *in vitro* (35). Proizvode ga uglavnom monociti, odnosno makrofagi tijekom akutne upale, ali mogu ga proizvoditi i druge vrste stanica, uključujući limfocite B (36, 37). Djelovanje TNF- $\alpha$  odvija se preko dva receptora: TNFR1, koji se nalazi na svim stanicama, i TNFR2, koji se uglavnom nalazi na stanicama imunskog sustava (38-41). Receptor TNFR1 sadrži domenu smrti (DD, od engl. *death domain*) preko koje može vezati druge proteine koje sadrže istu domenu i prenijeti signal koji usmjerava stanicu u apoptozu ili

nekrozu (42). Signalizacija preko ovog receptora također može usmjeriti stanicu prema preživljenju, odnosno aktivaciji proupalnog odgovora preko puta NF $\kappa$ B, ili apoptozi/nekrozi, ovisno o kompleksima proteina koji se vežu na TNFR1 (43). TNFR2 ne sadrži domenu smrti nego nakon vezanja liganda regrutira proteine TRAF i aktivira kaskadu koja dovodi do aktivacije puta NF $\kappa$ B i drugih staničnih putova (44, 45). TNF- $\alpha$  se pojavljuje u dva oblika, solubilni TNF- $\alpha$  (sTNF- $\alpha$ ) koji se uglavnom veže na TNFR1 i aktivira proupalne stanične putove, i membranski TNF- $\alpha$  (mTNF- $\alpha$ ) koji se veže na TNFR2 i regulira staničnu proliferaciju i preživljenje (46). sTNF- $\alpha$  nastaje cijepanjem mTNF- $\alpha$  od strane metaloproteinaze TACE (od engl. *TNF- $\alpha$  converting enzyme*) (47) i pokazuje smanjenu sposobnost aktivacije nizvodnih kaskada preko TNFR2 u odnosu na mTNF- $\alpha$  (48). Pokazano je da TNF- $\alpha$  ima važnu ulogu u međustaničnoj komunikaciji, imunosnom odgovoru, karcinogenezi i metastaziranju (49, 50), ali i da sudjeluje u putovima nastanka različitih autoimunih bolesti (51). Inhibitori TNF- $\alpha$  zasad se nisu pokazali uspješnima kao terapija kod pacijenata oboljelih od reumatskih bolesti i upalne bolesti crijeva (IBD, od engl. *inflammatory bowel disease*) zbog povećanog rizika od razvoja limfoma kod pacijenata izloženih terapiji (52, 53), dok sam TNF- $\alpha$  nije uspješno primijenjen kao antitumorska terapija zbog toksičnosti u visokim koncentracijama (54, 55). Nedostatak TNF i TNFR1 utječe na staničnu i strukturnu organizaciju germinalnih centara u sekundarnim limfnim tkivima (56), a deregulacija puta NF $\kappa$ B, čiji je aktivator TNF- $\alpha$ , pridonosi razvoju različitih vrsta B-limfoma (57-60). Street i suradnici pokazali su da se tumori ne razvijaju spontano kod mutanata miševa za gen *TNF- $\alpha$* , ali se razvijaju kod mutanata za gen *IFN- $\gamma$* , koji također kodira citokin s višestrukim ulogama u regulaciji imunosnog odgovora (61).

### 2.2.2. Interferon gama

Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) prvi puta je opisan kao inhibitor citotoksičnosti virusa Sindbis u ljudskim leukocitima (62). Jedini je interferon tipa II, a proizvode ga citotoksični i pomoćnički limfociti T tipa 1 (Th1), stanice NK, limfociti B i stanice koje prezentiraju antigene (APC, od engl. *antigen-presenting cells*) (63, 64). IFN- $\gamma$  veže se na receptor koji se sastoji od dva lanca, IFN- $\gamma$ R1 i IFN- $\gamma$ R2, koji su oba nužni za prijenos signala (65). Glavni stanični put aktiviran vezanjem IFN- $\gamma$  na receptor je put JAK/STAT, a IFN- $\gamma$  uzrokuje različite promjene u ekspresiji gena u različitim vrstama stanica (66, 67). Glavna fiziološka uloga IFN- $\gamma$  je aktivacija specifičnog imunosnog odgovora indukcijom ekspresije molekula MHC klase I i II (68, 69), indukcijom proliferacije i aktivacije citotoksičnih limfocita T uz djelovanje IL-2 (70) i usmjeravanjem pomoćničkih limfocita T prema fenotipu Th1 uz

djelovanje IL-12 (71). Pokazano je da učinkovitost IFN- $\gamma$  kao antitumorske terapije ovisi o duljini vremenskog perioda između nastanka tumora i terapije (72), lokalizaciji i duljini trajanja terapije (73, 74). Terapija tumora jajnika IFN- $\gamma$  u kombinaciji s kemoterapeutičima dosada je dala različite rezultate (75, 76), a IFN- $\gamma$  pokazao je antitumorski učinak kod leukemije T-stanica odraslih (ATL, od engl. *adult T-cell leukemia*) (77) i ponovne pojave tumora mokraćnog mjehura (78). cHL i neki podtipovi NHL, uključujući PMBCL, imaju dereguliranu ekspresiju puta JAK/STAT koji se aktivira vezanjem IFN- $\gamma$  zbog amplifikacije regije 9p24, koja uključuje gen *JAK2* (9, 79) ili zbog povišene ekspresije drugih aktivatora ovog puta (80). IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  djeluju kao međusobni aktivatori ekspresije u svrhu pojačavanja imunskog odgovora i pokazuju sinergistički antitumorski efekt (73, 81), no mogu imati i protumorski učinak i poboljšavati preživljenje i metastaziranje tumora (82, 83).

### 2.2.3. cREL

Transkripcijski faktor cREL dio je porodice proteina NF $\kappa$ B dominantno eksprimiran u limfnim tkivima (84). Ima ulogu u regulaciji preživljenja i razvoja limfocita B, a njegova deficijencija dovodi do poremećaja humoralnog imunskog odgovora (85-87). Gilmore i suradnici dokazali su onkogeni potencijal cREL (88), a genske aberacije gena *cREL* detektirane su u različitim vrstama limfoma, uključujući PMBCL (89), iako amplifikacija lokusa *cREL* nije korelirala s povećanom količinom transkripta *cREL* niti s aktivnošću puta NF $\kappa$ B u PMBCL-u (90). cREL se veže na DNA kao homodimer, ali može i stvarati heterodimere s drugim proteinima porodice NF $\kappa$ B (91), ovisno o vrsti stanice i tipu inducirajućeg signala (92). Vrsta signala također određuje put aktivacije puta NF $\kappa$ B, koji se dijele na kanonski, nekanonski i alternativne putove aktivacije. Kanonski put aktivacije NF $\kappa$ B posljedica je vezanja proupalnih citokina TNF- $\alpha$  i IL-1 na pripadajuće receptore, aktivacije receptora T-stanica (od engl. *T-cell receptor* (TCR)) i aktivacije receptora TLR (od engl. *toll-like receptors*). Nizvodna kinazna kaskada dovodi do fosforilacije proteina I $\kappa$ B $\alpha$ , inhibitora koji se veže na proteine porodice NF $\kappa$ B i zadržava ih u citoplazmi. Fosforilirani I $\kappa$ B $\alpha$  se ubikvitinira i zatim razgrađuje u proteosomu, dok slobodni proteini porodice NF $\kappa$ B ulaze u jezgru i vezanjem međusobno i na DNA reguliraju ekspresiju različitih gena (93). cREL inducira ekspresiju gena koji potiču proliferaciju, preživljenje i proupalni odgovor (94), a među genima čija je ekspresija pod kontrolom cREL je i *TNF- $\alpha$* , pa djelovanje TNF- $\alpha$  može autokrino pojačavati imunski odgovor (95). Pokazano je da se cREL veže i na promotore gena čija se ekspresija povisuje djelovanjem interferona (ISGs, od engl. *IFN-stimulated genes*), uključujući i *CXCL10* (od engl. *C-X-C motif chemokine ligand 10*) (96), a ekspresija

*CXCL10* je povišena i u stanicama glatkih mišića dišnog puta izloženima kombinaciji IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  (97).

#### 2.2.4. Interakcija CXCL10/CXCR3

CXCL10 je kemokin prvi puta otkriven kao dio imunskog odgovora potaknut IFN- $\gamma$  (98), što je glavni put aktivacije ekspresije CXCL10. Međutim, promotor *CXCL10* sadrži mjesta vezanja i za transkripcijske faktore neovisne o IFN- $\gamma$ , uključujući i mjesta vezanja za proteine porodice NF $\kappa$ B, stoga se njegova ekspresija može inducirati i djelovanjem drugih transkripcijskih faktora, čija aktivacija ovisi o drugim staničnim putovima (99). CXCL10 eksprimiran je u leukocitima (100), ali i u keratinocitima, endotelnim stanicama i fibroblastima (101), a njegov nedostatak rezultira smanjenom proliferacijom i regrutiranjem aktiviranih limfocita T na mjesto upale i inhibiranom imunskom reakcijom u miševima (102). Glavna uloga CXCL10 je kemotaksija stanica koje eksprimiraju njegov receptor CXCR3, što uključuje limfocite T (103), makrofage (104) i stanice NK (105), na mjesto upale. Diferencirani limfociti Th1, koji su dio specifičnog staničnog imunskog odgovora, i naivni limfociti T (Th0) eksprimiraju CXCR3 u većoj mjeri nego limfociti Th2, koji promoviraju humoralni imunski odgovor (106, 107), a blokiranje CXCR3 dovodi do smanjene regrutacije limfocita Th1 na mjesto upale (108). Osim kemotaksije, CXCL10 također ima antitumorski, odnosno proapoptotski efekt te inhibira angiogenezu (109, 110), no može i poticati proliferaciju stanica kod nekih vrsta tumora (111-113). CXCR3 je eksprimiran i na tumorskim stanicama u nekim vrstama B-limfoma (114), a visoka koncentracija CXCL10 u serumu pacijenata povezana je s visokom koncentracijom upalnih prognostičkih biomarkera, višim stadijem tumora i lošijim preživljenjem pacijenata oboljelih od DLBCL-a (115). CXCL10 eksprimiran je i u HL miješane celularnosti, ali njegova ekspresija u ovom tipu tumora korelira s infekcijom virusa Epstein-Barr (EBV, od engl. *Epstein-Barr virus*), pa bi prisutnost virusa mogao biti uzrok ekspresije CXCL10 (116). Dosad nije pokazana povezanost ekspresije CXCL10 i PD-L1 u limfomima, ali je ona istraživana u tumoru želuca (10) i u karcinomu vrata maternice kod pacijenata zaraženih HPV-om (od engl. *human papiloma virus*) (117), što sugerira da bi i CXCL10, uz TNF- $\alpha$  (118) i IFN- $\gamma$  (11), mogao sudjelovati u indukciji ekspresije PD-L1, čime tumori inhibiraju imunski odgovor.

#### 2.2.5. Interakcija PD-L1/PD-1

PD-1 je prvi put izoliran kao dio puta programirane stanične smrti u staničnim linijama 2B4.11 (mišji hibridomi limfocita T) i LyD9 koje su bile uzgajane bez IL-3 (stanična linija

mišjih hematopoetskih progenitora) (119). Ekspimiraju ga aktivirani limfociti T i B (120, 121), a promotor *PD-1* sadrži elemente vezanja za različite transkripcijske faktore pa se ekspresija ovog gena može inducirati različitim staničnim putovima, odnosno signalnim molekulama (122). Nedostatak PD-1 dovodi do razvoja autoimunih bolesti (123, 124), što je dovelo do zaključka da je fiziološka uloga PD-1 inhibicija patološkog imunskog odgovora. PD-1 regulira imunski odgovor u interakciji s dva liganda, PD-L1 (125) i PD-L2 (126). PD-L1 je ekspimiran u različitim vrstama aktiviranih hematopoetskih stanica (127, 128), ali i na endotelnim stanicama krvnih žila nakon izloženosti IFN- $\gamma$  (129), dok se PD-L2 ekspimiraju samo u APC (128). Promijenjena ekspresija PD-L1 uočena je kod različitih vrsta tumora koji na taj način izbjegavaju imunski odgovor (130), a uočeno je i da je ekspresija PD-1 u limfocitima T koji infiltriraju tumor (TIL, od engl. *tumor infiltrating lymphocytes*) značajno viša nego u limfocitima T u perifernoj krvi te da limfociti T koji ekspimiraju PD-1 imaju inhibirane efektorske funkcije, što se očituje u sniženoj ekspresiji IFN- $\gamma$  i IL-2 u odnosu na limfocite T koji ne ekspimiraju PD-1 (131). Blokada ove interakcije je istražena kao antitumorska terapija u različitim vrstama tumora, a pokazala je pozitivne rezultate kod tumora mokraćnog mjehura, melanoma, karcinoma debelog crijeva i hematopoetskih neoplazmi (132). Povećan broj kopija gena *PD-L1* detektiran je kod značajnog dijela pacijenata oboljelih od PMBCL-a (34, 133, 134) i povezan je s povišenom ekspresijom *PD-L1* (34), ali viša ekspresija *PD-L1* bila je uočena i kod tumora bez povećanog broja kopija gena (34). Razlog tome mogle bi biti povećan broj kopija gena koji sudjeluju u putovima indukcije ekspresije *PD-L1*, npr. *JAK2*, no nije zanemariv ni utjecaj tumorskog mikrookoliša čiji bi signalizacija mogla doprinijeti pojačanoj aktivnosti putova koji pomažu tumoru izbjeći imunski odgovor.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Uzorci pacijenata

U ovom istraživanju, ispitivana skupina sadržavala je 17 uzoraka tkiva PMBCL-a fiksiranih formalinom i uklopljenih u parafin dobivenih od pacijenata s dijagnozom PMBCL-a koji su zaprimljeni u bolnicu u periodu od 2004. do 2018. godine. Uzorci su prikupljeni iz arhive Zavoda za patologiju i citologiju Kliničke bolnice „Merkur“ u Zagrebu. Opći podaci o pacijentima kojima je dijagnosticiran PMBCL nalaze se u Tablici 1. Dio podataka nije bio dostupan za sve pacijente. Među pacijentima veći je udio žena i pacijenata mlađih od 35 godina, što je u skladu s dosad opaženom incidencijom PMBCL-a (1). Kod svih uzoraka bio je detektiran marker limfocita B CD20, a više od 50% uzoraka sadržavalo je tumorske stanice koje su ekspimirale CD30. Mali broj limfocita T koji ekspimiraju marker CD3 bio je prisutan kod pet od 14 uzoraka za koje su podaci bili dostupni, dok je preostalih devet uzoraka bilo obilno infiltrirano limfocitima T. Uzorci tkiva bili su prerezi tkiva debljine 4 µm, pohranjeni u epruvete na sobnoj temperaturi do izolacije nukleinskih kiselina.

Tablica 1. Opći podaci o pacijentima u ispitivanoj skupini.

		N	%
Spol	Ž	12	70,6
	M	5	29,4
Dob	< 35	10	58,8
	> 35	7	41,2
CD20	+	17	100
	-	0	0
CD30	+	6	54,5
	+/-	3	27,3
	-	2	18,2
CD3	gusto	6	42,9
	osrednje	3	21,4
	rijetko	5	35,7

Kontrolna skupina sadržavala je 17 uzoraka tkiva netumorskih tonzila uklonjenih zbog čestih upalnih reakcija obrađenih na Zavodu za patologiju i citologiju Kliničke bolnice „Merkur“ u Zagrebu u razdoblju od 2013. do 2021. godine. Od 17 kontrolnih uzoraka netumorskih tonzila, 10 je uzoraka bilo od ženskih pacijentica dok je ostatak bio od muških pacijenata. Više je tonzila uklonjeno pacijentima starijima od 35 godina (10) nego mlađima (7). Uzorci tkiva fiksirani formalinom i uklopljeni u parafin bili su narezani na prereze debljine 4 µm koji

su bili postavljeni na predmetna stakla, nakon čega su bili deparafinirani i obojeni hematoksilinom i eozinom (HE) te pohranjeni na +4°C.

Korištenje navedenih uzoraka za ovo istraživanje odobrilo je Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice „Mercur“ 31.03.2022. godine i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 15.12.2022. godine.

### 3.1.2. Stanične linije

#### 3.1.2.1. Modelne stanične linije

Kao model PMBCL-a koristila sam stanične linije Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p.

Stanična linija Farage porijeklom iz limfnog čvora 70-ogodišnje pacijentice prvotno je uspostavljena 1990. godine kao stanični model za DLBCL (135), no pokazano je da obrasci metilacije u njoj odgovaraju obrascima metilacije kod pacijenata oboljelih od PMBCL-a, a ne DLBCL-a (136). Kariotip stanične linije Farage je: 46(41–46)<2n>XX, a Dai i suradnici potvrdili su podatke o genomu stanične linije i njezinu stabilnost *in vitro* (137, 138). Stanice eksprimiraju markere limfocita B: CD19 i CD20, a ne eksprimiraju površinske ni citoplazmatske imunoglobuline. Vrijeme udvostručenja stanica ove stanične linije je 24-36 sati, a u stanicama je dokazana prisutnost EBV-a (135).

Stanična linija U2940 uspostavljena je 1991. godine iz pleuralne efuzije 18-ogodišnje pacijentice oboljele od DLBCL-a nastalog nakon kemoterapijskog tretmana za prvotno dijagnosticirani HL. Kao i kod stanične linije Farage, naknadno su utvrđene veće sličnosti s PMBCL-om nego s DLBCL-om (139, 140). Kariotip stanične linije U2940 prema Dai i suradnicima je: 45(43–45)X,-X, del(3)(p14p21), del(6)(q13q15), der(7)t(2;7)(q22;p22), dup(12)(q13q22), der(14)t(X;14)(q12;p11), t(16;16)(p12;p13), del(17)(p13) (138); slično originalno zabilježenom genotipu (ISCN): 45–46,-X, del(3)(p13p21), del(6)(q14q16), del(7)(p11),+i(7)t(2;7)(q23;q31), dup(12)(q12q21), der(14)del(X)(q21.1q21.3)t(X;14)(q11;p11), t(16;16)(p12;p13.3) (137). Stanice eksprimiraju markere limfocita B: CD19 i CD20, a vrijeme udvostručenja stanica je oko 50 sati (139).

Stanična linija MedB-1 uspostavljena je 1990. godine iz medijastinalne mase 27-ogodišnjeg pacijenta dijagnosticiranog s DLBCL-om usporedivim s PMBCL-om tijekom relapsa (141, 142). Originalni kariotip linije MedB-1 bio je: 47,XY,inv (X)(p22q13), +der(1)t(1;14)(q10;q10),+9,-14,-21,i(21q) (137), a slične rezultate dobili su i Dai i suradnici (138): 47(41–47)<2n>XY, inv(X)(p21;q12),+1,der(1)t(1;14)(p11;q11), t(2;12)(p24;p12),+9, der(10)t(10;20)(q25)(q11),-14,i(21)(q10). Stanice eksprimiraju markere limfocita B: CD19,



CD20 i CD22, a vrijeme udvostručenja stanica je oko 72 sata (142). Ovo istraživanje ne bi bilo moguće bez podrške dr. K. Mellert, dr. S. Bruderlein i prof.dr. P. Möller kojima sam zahvalna za ustupak alikvota stanica stanične linije MedB-1. (This research would not have been possible without the support of Dr. K. Mellert, Dr. S. Bruderlein and Prof. Dr. P. Möller whom we are very grateful for providing the cell line MedB-1.)

Stanična linija Karpas1106p uspostavljena je 1984. godine iz pleuralne efuzije 23-godišnje pacijentice kojoj je dijagnosticiran medijastinalni limfoblastični B-NHL odmah nakon dijagnoze, a linija Karpas1106a uspostavljena je iz astrocita iste pacijentice tijekom napretka bolesti (143). Analiza koju su proveli Nacheve i suradnici pokazala je kariotip: 49,X,del (2) (p11.2p13.3), der (3)t(2;3) (p13.3; p25.1), +i(9p), ins(12;?) (q13.1 q13.31, del (141) (q1.2q13.1), del (15) (q11.2q15.31, der (18) t (X;13;18) Iq28;q12.1;q21.3), -20, del (20) (q13.1q13.3) x2, der (X) (X;13;18) (q28;q12.1q21.31, +i (Xp) (143], a slični rezultati dobiveni su i u drugim istraživanjima (137, 138). Stanična linija Karpas1106p eksprimira markere limfocita B: CD19 i CD22, a vrijeme udvostručenja stanica je 60-100 sati (144).

### 3.1.2.2. Kontrolna stanična linija

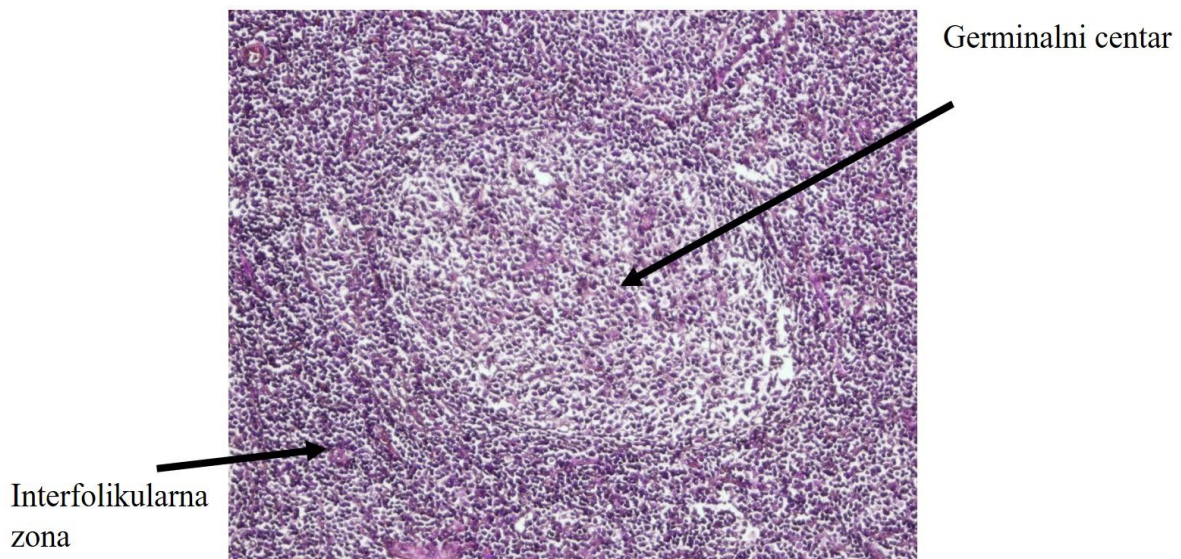
Stanična linija epitelnog porijekla HeLa najstarija je stanična linija korištena u istraživanjima, a uspostavljena je 1951. godine iz karcinoma vrata maternice 31-ogodišnje pacijentice. Stanice mogu sadržavati od 70 do 164 kromosoma, a sadrže četiri specifična markerska kromosoma po kojima je njihov kariotip prepoznatljiv (145). Stanice sadrže ljudski virus papiloma tip 18 (HPV-18, od engl. *human papiloma virus 18*) (145), a vrijeme udvostručenja stanica je 33-35 sati (146).

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Mikrodisekcija

Kako bih pripremila kontrolne uzorke za dio istraživanja koji sam provodila na uzorcima pacijenata, deparafinirane tkivne prezeze tonzila obojanih hematoksilinom i eozinom mikrodisekirala sam na mehaničkom mikrodisektoru Nikon Eclipse TE-2000S (Minato City, Tokyo, Japan)/Eppendorf TransferMan NK2 (Hamburg, Njemačka) kako bih izdvojila interfolikularne zone bogate limfocitima T (Slika 2) u čistoj vodi (AccuGENE™ Molecular Biology Water, Lonza, Basel, Švicarska). Nakon izdvajanja interfolikularnih zona i sušenja uzoraka na staklu, sa stakla sam sakupila germinalne centre bogate limfocitima B (Slika 2) u čistoj vodi (AccuGENE™ Molecular Biology Water, Lonza, Basel, Švicarska). Prikupljene

stanice u vodi sam centrifugirala, uklonila sam vodu i uzorke pohranila na  $-20^{\circ}\text{C}$  do izolacije nukleinskih kiselina.



Slika 2. Lokalizacija germinalnih centara bogatih limfocitima B i interfolikularnih zona bogatih limfocitima T u netumorskoj tonzili obojanoj hematoksilinom i eozinom (HE).

### 3.2.2. Izolacija RNA

Izolirala sam RNA iz parafinskih uzoraka PMBCL-a setom kemikalija Quick-DNA/RNA FFPE MiniPrep (Zymo Research, Irvine, CA, SAD) prema uputama proizvođača.

Prije izolacije pripremila sam otopine proteinaze K, DNaze I i pufera za ispiranje prema uputama proizvođača te razdijelila otopine enzima na manje volumene kako bih višak enzima pohranila na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Uzorke sam inkubirala 1 minutu na  $55^{\circ}\text{C}$  u deparafinacijskoj otopini kako bih uklonila parafin. Nakon uklanjanja deparafinacijske otopine, uzorke sam inkubirala u smjesi digestijskog pufera (2x Digestion Buffer), vode bez DNaza i RNaza i proteinaze K tri sata na  $55^{\circ}\text{C}$ , nakon čega je proteinaza inaktivirana zagrijavanjem na  $94^{\circ}\text{C}$  20 minuta. Uzorcima sam dodala pufer za lizu (DNA/RNA Lysis pufer) i centrifugirala ih, nakon čega sam supernatant prenijela na prvu ZymoSpin IICR kolonu i centrifugirala. U otopinu RNA na dnu kolektorske epruvete dodala sam jednak volumen 100%-tnog etanola i prenijela na novu ZymoSpin IICR kolonu te centrifugirala. RNA na koloni sam zatim tretirala DNazom I 15 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega sam je isprala puferom za ispiranje. Kolone sam prebacila u sterilne epruvete i eluirala RNA u  $25\ \mu\text{L}$  vode bez DNaza i RNaza. Koncentracije i čistoće izolirane

RNA izmjerila sam na spektrofotometrijskom uređaju NanoVue (GE Healthcare, Chicago, Illinois, SAD) te pohranila uzorke na  $-20^{\circ}\text{C}$  do reverzne transkripcije.

Prilikom izolacije RNA iz kontrolnih uzoraka netumorskih stanica dobivenih mikrodisekcijom reaktivnih tonzila preskočila sam korak deparafinacije. U pripremljene mikrodisecirane uzorke dodala sam digestijski pufer, vodu bez DNaza i RNaza i proteinazu K. Uzorke sam zatim inkubirala sat vremena na  $55^{\circ}\text{C}$  i potom 20 minuta na  $94^{\circ}\text{C}$ . Za daljnju izolaciju RNA iz kontrolnih uzoraka koristila sam protokol identičan protokolu za izolaciju RNA iz parafinskih uzoraka PMBCL-a.

### 3.2.3. Reverzna transkripcija

Izoliranu RNA reverznom sam transkripcijom prepisala u cDNA koristeći set kemikalija PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara, Kusatsu, Japan) prema uputama proizvođača navedenima u Tablici 2 uz korištenje nasumičnih heksamera kao početnica (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD).

Tablica 2. Sadržaj reakcijske smjese za reverznu transkripciju.

Smjesa	Reagens	Konačna koncentracija
Smjesa I	Nasumični heksameri ( $50\ \mu\text{M}$ ) (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)	$5\ \mu\text{M}$
	Smjesa deoksinukleotida ( $10\ \text{mM}$ ) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)	$1\ \text{mM}$
	RNA	$\leq 8\ \mu\text{L}$ ( $380\ \text{ng}$ )
	AccuGene voda (Lonza Group, Basel, Švicarska)	do $10\ \mu\text{L}$
Smjesa II	Smjesa I	$10\ \mu\text{L}$
	5x PSRT pufer (Takara, Kusatsu, Japan)	1x
	Reverzna transkriptaza PrimeScript ( $200\ \text{U}/\mu\text{L}$ ) (Takara, Kusatsu, Japan)	$5\ \text{U}/\mu\text{L}$
	Rekombinantni inhibitor RNaza ( $40\ \text{U}/\mu\text{L}$ ) (Takara, Kusatsu, Japan)	$1\ \text{U}/\mu\text{L}$
	AccuGene voda (Lonza Group, Basel, Švicarska)	do $20\ \mu\text{L}$

RNA izoliranu iz uzoraka PMBCL-a i RNA izoliranu iz svježe krvi koja je služila kao pozitivna kontrola dodala sam u smjesu nasumičnih heksamera (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD) i dNTP-ova (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) do maksimalne količine od 380 ng, što je bila maksimalna količina RNA iz uzorka najniže koncentracije. Ostatak do ukupnog volumena od 10  $\mu$ L dopunila sam vodom bez RNaza AccuGene Molecular Biology Water (Lonza Group, Basel, Švicarska). U negativnu kontrolu reverzne transkripcije sam umjesto uzorka RNA dodala vodu bez RNaza AccuGene Molecular Biology Water (Lonza Group, Basel, Švicarska). Uzorke sam zagrijala 5 minuta na 65°C u uređaju SimpliAmp (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD) kako bi se razbile sekundarne strukture RNA. Nakon hlađenja uzoraka na ledu barem 5 minuta, u smjesu I dodala sam smjesu II koja je sadržavala reverznu transkriptazu PrimeScript i pripadajući pufer, inhibitor RNaza i vodu. Reverznu transkripciju provela sam u uređaju SimpliAmp (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD) prema protokolu: 10 minuta na 30°C, 60 minuta na 42°C i 15 minuta na 70°C. Uzorke cDNA sam zatim pohranila na -20°C do lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.

#### 3.2.4. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Provela sam lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR, od engl. *quantitative polymerase chain reaction*) koristeći set kemikalija PowerUp Sybr Green (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD) i specifične početnice (Macrogen, Seul, Južna Koreja) prema protokolu navedenom u Tablici 3.

Tablica 3. Sadržaj reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu.

Reagens	Konačna koncentracija
2x PowerUp Sybr Green Mastermix (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD)	1x
Uzvodna početnica (10 $\mu$ M) (Macrogen, Seul, Južna Koreja)	0,05 $\mu$ M
Nizvodna početnica (10 $\mu$ M) (Macrogen, Seul, Južna Koreja)	0,05 $\mu$ M
cDNA	do 50 ng
AccuGene voda (Lonza Group, Basel, Švicarska)	do 20 $\mu$ L

Sekvencije početnica za gene od interesa (*TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , *cREL*, *CXCL10*, *CXCR3*, *PD-L1* i *PD-1*) i za endogenu kontrolu (*HPRT1*) nalaze se u Tablici 4. Početnice su dizajnirane u programu National Library of Medicine Primer-BLAST (147) i odabrane prema temperaturi

disocijacije, odnosno prijanjanja, kako bi temperatura prijanjanja bila ista za sve početnice (55°C). Osim temperature prijanjanja, kriteriji odabira parova početnica bili su da se jedna od početnica za pojedini produkt veže na mjesto spajanja eksona ili da produkt dobiven umnažanjem cDNA bude drugačije duljine nego produkt dobiven umnažanjem genomske DNA (gDNA), kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati u slučaju kontaminacije uzoraka s gDNA. Kod uzoraka PMBCL-a analizirana je ekspresija svih gena od interesa. Kod uzoraka netumorskih limfocita B analizirana je ekspresija gena *TNF- $\alpha$* , *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1*, dok je kod netumorskih limfocita T analizirana ekspresija gena *IFN- $\gamma$* , *CXCR3* i *PD-1*.

Tablica 4. Sekvencije početnica za gene od interesa i endogenu kontrolu.

Ime gena	Ime početnice	Sekvencija početnice
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	Uzvodna početnica	5'-CTGTAGCCCATGTTGTAGCAAAC-3'
	Nizvodna početnica	5'-TTGAAGAGGACCTGGGAGTAGAT-3'
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	Uzvodna početnica	5'-TGAAGAATTGGAAAGAGGAGAGTGA-3'
	Nizvodna početnica	5'-CCACACTCTTTTGGATGCTCTG-3'
<i>cREL</i>	Uzvodna početnica	5'-GAACCCAATTTATGACAACCGTGC-3'
	Nizvodna početnica	5'-TTTCATCTCCTCCTCTGACACTTC-3'
<i>CXCL10</i>	Uzvodna početnica	5'-AAAGCAGTTAGCAAGGAAAGGTCT-3'
	Nizvodna početnica	5'-CTGTGTGGTCCATCCTTGGAA-3'
<i>CXCR3</i>	Uzvodna početnica	5'-TGGTCCTTGAGGTGAGTGA-3'
	Nizvodna početnica	5'-CAGGCTGAAGTCCTGTGGG-3'
<i>PD-L1</i>	Uzvodna početnica	5'-GGGCATTCCAGAAAGATGAGGA-3'
	Nizvodna početnica	5'-AACCGTGACAGTAAATGCGTTC-3'
<i>PD-1</i>	Uzvodna početnica	5'-CCTGGTGCTGCTAGTCTGG-3'
	Nizvodna početnica	5'-GGTCCTCCTTCAGGGGC-3'
<i>HPRT1</i>	Uzvodna početnica	5'-CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT-3'
	Nizvodna početnica	5'-AGACGTTTCAGTCCTGTCCATAA-3'

Za detekciju ekspresije svakog gena pripremila sam posebnu smjesu PowerUp Sybr Green smjese, vode bez RNaza i specifičnih početnica u pločici s 96 jažica (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD) te sam u svaku jažicu dodala cDNA. Ispitala sam ispravnost qPCR-a dodavanjem cDNA koja je služila kao pozitivna kontrola u dvije jažice (replike) po smjesi za pojedini gen. Ispitala sam čistoću

kemikalija za reverznu transkripciju dodavanjem negativne kontrole reverzne transkripcije u dvije jažice (replike) po smjesi za pojedini gen. Ispitala sam čistoću kemikalija za qPCR dodavanjem vode bez RNaza umjesto uzorka cDNA u dvije jažice (replike) po smjesi za pojedini gen. Nakon dodavanja cDNA, pločicu sam prekrila ljepljivom folijom MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD), i centrifugirala 3 minute na 500xg. Reakciju sam provela u uređaju QuantStudio5 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD) a prethodno sam na pripadajućem programu QuantStudio™ Design & Analysis Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) pripremila optimizirani protokol (Tablica 5).

Tablica 5. Protokol za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu.

<b>Korak</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Trajanje</b>	<b>Broj ciklusa</b>
Aktivacija enzima uracilne DNA-glikozilaze	50°C	2 min	1
Aktivacija Dual-Lock DNA-polimeraze	95°C	10 min	1
Denaturacija	95°C	15 s	40
Prijanjanje početnica i elongacija	55°C	1 min	40
Krivulja taljenja	95°C	15 s	1
	55°C	1 min	1
	95°C	1 s	1

Nakon provedenog qPCR-a prikupila sam sve očitane vrijednosti Ct (od engl. *cycle threshold*) i kvantificirala ekspresiju gena od interesa metodom relativne kvantifikacije ddCt kako bih utvrdila postoji li razlika u ekspresiji gena od interesa između PMBCL-a i netumorskih limfocita B i T.

### 3.2.5. Stanična kultura

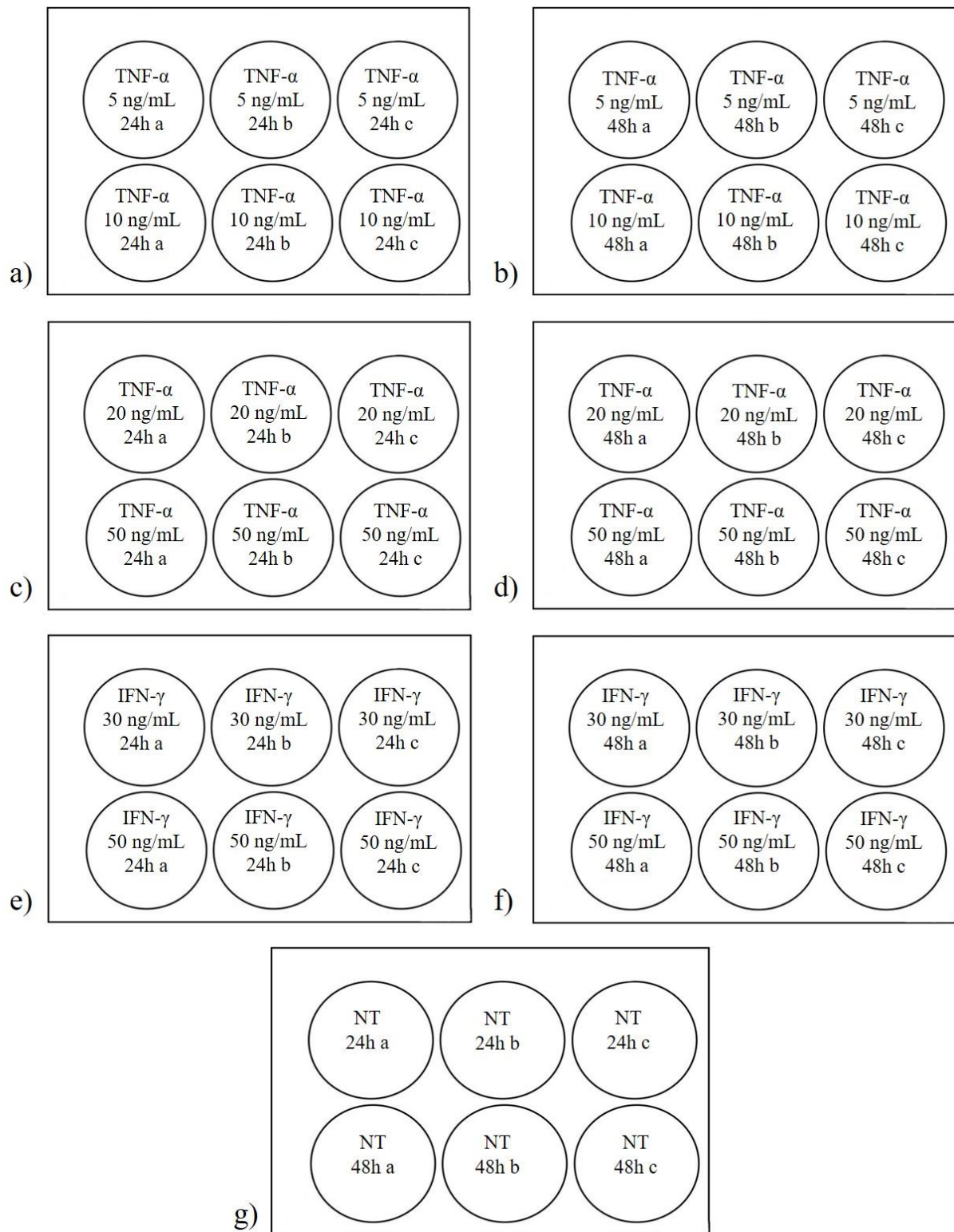
Modelne stanične linije Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p sam nakon odmrzavanja uzgajala u suspenziji u mediju RPMI 1640 s dodanim L-glutaminom (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) koji je sadržavao 10% fetusnog goveđeg seruma (FBS, od engl. *fetal bovine serum*) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) i 1% otopine antibiotika penicilin/streptomycin (Pen/Strep) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD). Stanice sam uzgajala u uvjetima 37°C i 5% CO<sub>2</sub> u netretiranim bočicama T-25 za suspenzijske stanice s

filterskim poklopcima (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka) i prošle su minimalno tri pasažiranja prije nasađivanja u ploče sa šest jažica i tretmana odabranim citokinima. Svaka dva do tri dana dodala sam im svježeg medija do maksimalnog volumena bočice, nakon čega sam dio volumena stanica prebacila u novu bočicu s dodatkom svježeg medija.

Kontrolnu staničnu liniju HeLa sam nakon odmrzavanja uzgajala u mediju DMEM s visokim udjelom glukoze (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) koji je sadržavao 10% FBS-a (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), 2% L-glutamina (L-glut) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) i 1% otopine antibiotika penicilin/streptomycin (Pen/Strep) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD). Stanice sam uzgajala u petrijevkama za adherentne stanice TC-Dish Cell+ (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka), a nakon minimalno tri pasažiranja nasadila sam ih u ploče sa šest jažica i tretirala odabranim citokinima. Stanice sam presađivala kad su bile  $\geq 90\%$  konfluentne.

#### 3.2.5.1. Tretmani

Stanične linije Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p nasadila sam u netretirane pločice sa šest jažica CytoOne Plate, Non-Treated (Starlab, Hamburg, Njemačka), a staničnu liniju HeLa sam nasadila u tretirane pločice CytoOne F-BTM TC Plate (Starlab, Hamburg, Njemačka). U svaku jažicu nasadila sam  $1,5 \times 10^5$  stanica u 1 mL medija RPMI 1640 u kojem su stanice uzgajane (Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p), odnosno u 1 mL medija DMEM u kojem su stanice uzgajane (HeLa). Stanične linije Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p sam nakon nasađivanja tretirala s četiri različite koncentracije TNF- $\alpha$  (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, SAD) i dvije različite koncentracije IFN- $\gamma$  (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, SAD) u triplikatima za svaku koncentraciju. Staničnu liniju HeLa sam nakon nasađivanja ostavila 24 sata da stanice adheriraju i onda tretirala s četiri različite koncentracije TNF- $\alpha$  i dvije različite koncentracije IFN- $\gamma$  u triplikatima za svaku koncentraciju (Slika 3).



Slika 3. Tretmani stanica u pločicama sa šest jažica. a) Tretman s 5 ng/mL (gornji red) i 10 ng/mL (donji red) TNF- $\alpha$  tijekom 24 sata u tri replike (a, b i c). b) Tretman s 5 ng/mL (gornji red) i 10 ng/mL (donji red) TNF- $\alpha$  tijekom 48 sati u tri replike (a, b i c). c) Tretman s 20 ng/mL (gornji red) i 50 ng/mL (donji red) TNF- $\alpha$  tijekom 24 sata u tri replike (a, b i c).



### Slika 3 – nastavak

d) Tretman s 20 ng/mL (gornji red) i 50 ng/mL (donji red) TNF- $\alpha$  tijekom 48 sati u tri replike (a, b i c). e) Tretman s 30 ng/mL (gornji red) i 50 ng/mL (donji red) IFN- $\gamma$  tijekom 24 sata u tri replike (a, b i c). f) Tretman s 30 ng/mL (gornji red) i 50 ng/mL (donji red) IFN- $\gamma$  tijekom 48 sati u tri replike (a, b i c). g) Netretirane stanice (NT) tijekom 24 sata (gornji red) i 48 sati (donji red).

Stanice sam skupila nakon 24 i 48 sati tretmana i iz njih izolirala RNA. Stanice koje su rasle u suspenziji (Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p) prebacila sam iz ploča sa šest jažica u sterilne epruvete i centrifugirala 5 minuta na 300 x g. Adherentne stanice HeLa sam prvo isprala u 1 mL PBS-a (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) i zatim im dodala 0,5 mL tripsina (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD). Stanice su zatim bile inkubirane u inkubatoru 3 minute na 37°C kako bi se odvojile od podloge. Nakon tripsinizacije, stanicama sam dodala 0,5 mL medija DMEM sa serumom i dobro ih resuspendirala, a zatim prebacila u sterilne epruvete i centrifugirala 5 minuta na 300 x g. Nakon centrifugiranja je daljnji protokol bio isti za sve stanične linije. Iz epruveta sam uklonila supernatant i talog resuspendirala u 1 mL PBS-a (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD). Nakon ponovnog centrifugiranja 5 minuta na 300xg, uklonila sam PBS i nastavila s izolacijom koristeći set kemikalija Quick-DNA/RNA FFPE MiniPrep (Zymo Research, Irvine, CA, SAD) od koraka dodavanja 600  $\mu$ L DNA/RNA Lysis Buffera. Ostatak protokola za izolaciju bio je isti kao i kod izolacije RNA iz parafinskih uzoraka PMBCL-a i kontrolnih uzoraka netumorskih limfocita.

#### 3.2.6. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu za tretmane s TNF- $\alpha$ i IFN- $\gamma$

RNA izoliranu iz staničnih linija Farage, U2940, MedB-1, Karpas1106p i HeLa reverzno sam transkribirala u cDNA prema istom protokolu kao i RNA izoliranu iz parafinskih uzoraka PMBCL-a i kontrolnih uzoraka netumorskih limfocita (Tablica 2), s maksimalnom količinom RNA do 500 ng, prije provođenja qPCR-a. Uz uzorke pripremila sam pozitivnu (RNA iz svježe krvi) i negativnu kontrolu reverzne transkripcije (voda AccuGene, Lonza Group, Basel, Švicarska).

U Tablici 3 naveden je sadržaj reakcijske smjese, a u Tablici 5 protokol za qPCR. Za sve uzorke tretirane s TNF- $\alpha$  analizirala sam ekspresiju gena *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1*, uz *HPRT1* kao endogenu kontrolu, s istim početnicama kao i za parafinske uzorke PMBCL-a (Tablica 4). Za sve uzorke tretirane s IFN- $\gamma$  analizirala sam ekspresiju gena *CXCL10* i *PD-L1*, uz *HPRT1* kao endogenu kontrolu, s istim početnicama kao i za parafinske uzorke PMBCL-a (Tablica 4).

Za detekciju ekspresije svakog gena pripremila sam posebnu smjesu PowerUp Sybr Green smjese, vode bez RNaza i specifičnih početnica u pločici s 96 jažica (Hard-Chell PCR Plates, thin-well, Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD) te sam u svaku jažicu dodala do 50 ng cDNA. Istu količinu cDNA sam dodala u pozitivnu kontrolu qPCR-a. Ispitala sam čistoću kemikalija za reverznu transkripciju dodavanjem negativne kontrole reverzne transkripcije u dvije jažice (replike) po smjesi za pojedini gen. Ispitala sam čistoću kemikalija za qPCR dodavanjem vode bez RNaza umjesto uzorka cDNA u dvije jažice (replike) po smjesi za pojedini gen. Nakon dodavanja cDNA, pločicu sam prekrila ljepljivom folijom Microseal 'B seal' (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD), i centrifugirala 3 minute na 500xg. Reakciju sam provela u uređaju CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD) a prethodno sam na pripadajućem programu CFX Manager Dx (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD) pripremila optimizirani protokol (Tablica 5). Nakon provedenog qPCR-a prikupila sam sve očitane vrijednosti Ct i kvantificirala ekspresiju gena od interesa metodom relativne kvantifikacije ddCt kako bih utvrdila postoji li razlika u ekspresiji gena od interesa *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1* između stanica staničnih linija Farage, U2940, MedB-1, Karpas1106p i HeLa tretiranih s TNF- $\alpha$  i netretiranih stanica, odnosno gena *CXCL10* i *PD-L1* između stanica staničnih linija Farage, U2940, MedB-1, Karpas1106p i HeLa tretiranih s IFN- $\gamma$  i netretiranih stanica. Usporedila sam i ekspresiju gena od interesa nakon 24 sata tretmana i nakon 48 sati tretmana te sam usporedila ekspresiju gena od interesa u modelnim staničnim linijama PMBCL-a u odnosu na staničnu liniju HeLa. Također sam relativno kvantificirala ekspresiju gena *TNF- $\alpha$*  u modelnim staničnim linijama PMBCL-a Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p u odnosu na staničnu liniju HeLa.

### 3.2.7. Statistička analiza rezultata

Rezultate dobivene laboratorijskim metodama na uzorcima pacijenata analizirala sam neparametrijskim testom Mann-Whitney kako bih utvrdila postoji li statistički značajna razlika u ekspresiji gena od interesa *TNF- $\alpha$* , *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1* između uzoraka PMBCL-a i netumorskih limfocita B, odnosno gena od interesa *IFN- $\gamma$* , *CXCR3* i *PD-1* između uzoraka PMBCL-a i netumorskih limfocita T. Statističku analizu napravila sam u programu STATISTICA, verzija 13.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Granica statističke značajnosti bila je postavljena na  $p < 0.05$ .

Rezultate dobivene na staničnim linijama testirala sam parametrijskim Studentovim t-testom kako bih utvrdila postoji li statistički značajna razlika u ekspresiji gena od interesa *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1* između stanica staničnih linija Farage, U2940, MedB-1, Karpas1106p i

HeLa tretiranih s TNF- $\alpha$  i netretiranih stanica, odnosno gena *CXCL10* i *PD-L1* između stanica staničnih linija Farage, U2940, MedB-1, Karpas1106p i HeLa tretiranih s IFN- $\gamma$  i netretiranih stanica. Također, usporedila sam ekspresiju gena od interesa nakon 24 i nakon 48 sati tretmana s citokinima TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  te sam usporedila ekspresiju gena od interesa između modelnih staničnih linija PMBCL-a i stanične linije HeLa nakon tretmana s istom koncentracijom citokina TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ . Statističku analizu napravila sam u programu STATISTICA, verzija 13.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Granica statističke značajnosti bila je postavljena na  $p < 0.05$  nakon Benjamini-Hochberg korekcije za multipla testiranja.

## 4. Rezultati

4.1. Analiza ekspresije gena *TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , *cREL*, *CXCL10*, *CXCR3*, *PD-L1* i *PD-1* u uzorcima pacijenata s primarnim medijastinalnim B-staničnim limfomom

4.1.1. Koncentracije i čistoće uzoraka RNA izoliranih iz uzoraka tumorskog tkiva pacijenata i iz izdvojenih germinalnih centara i interfolikularnih zona netumorskih tonzila

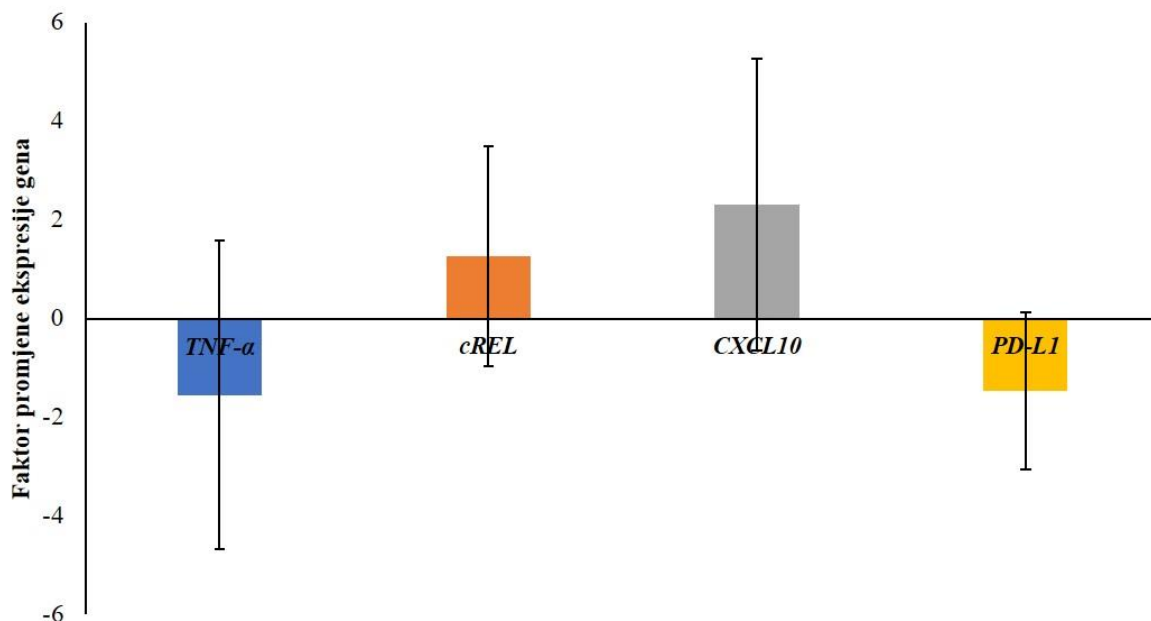
Koncentracije RNA izolirane iz 17 uzoraka PMBCL-a fiksiranih formalinom i uklopljenih u parafin bile su u rasponu između 47,6 i 332,1 ng/ $\mu$ L. Omjeri apsorbancija pri 260 i 280 nm bili su u rasponu između 1,82 i 1,99, ali RNA je bila dovoljno čista za primjenu daljnjih metoda. Omjeri apsorbancija pri 260 i 230 nm kod većine uzoraka bili su blizu ili veći od 2, što predstavlja čistu RNA.

Koncentracije RNA izolirane iz netumorskih limfocita T nakon izdvajanja interfolikularnih zona mehaničkom mikrodisekcijom iz 17 uzoraka netumorskih tonzila bile su u rasponu između 2,7 i 25,3 ng/ $\mu$ L. Koncentracije RNA izolirane iz netumorskih limfocita B nakon izdvajanja germinalnih centara mehaničkom mikrodisekcijom iz 17 uzoraka netumorskih tonzila bile su u rasponu između 3,8 i 33,7 ng/ $\mu$ L. Omjeri apsorbancija pri 260 i 280 nm i pri 260 i 230 nm bili su niži od idealnih (2,0-2,2), ali RNA je bila dovoljno čista za primjenu daljnjih metoda.

4.1.2. Usporedba ekspresije gena *TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , *cREL*, *CXCL10*, *CXCR3*, *PD-L1* i *PD-1* u uzorcima tumorskog tkiva i netumorskim limfocitima B i T

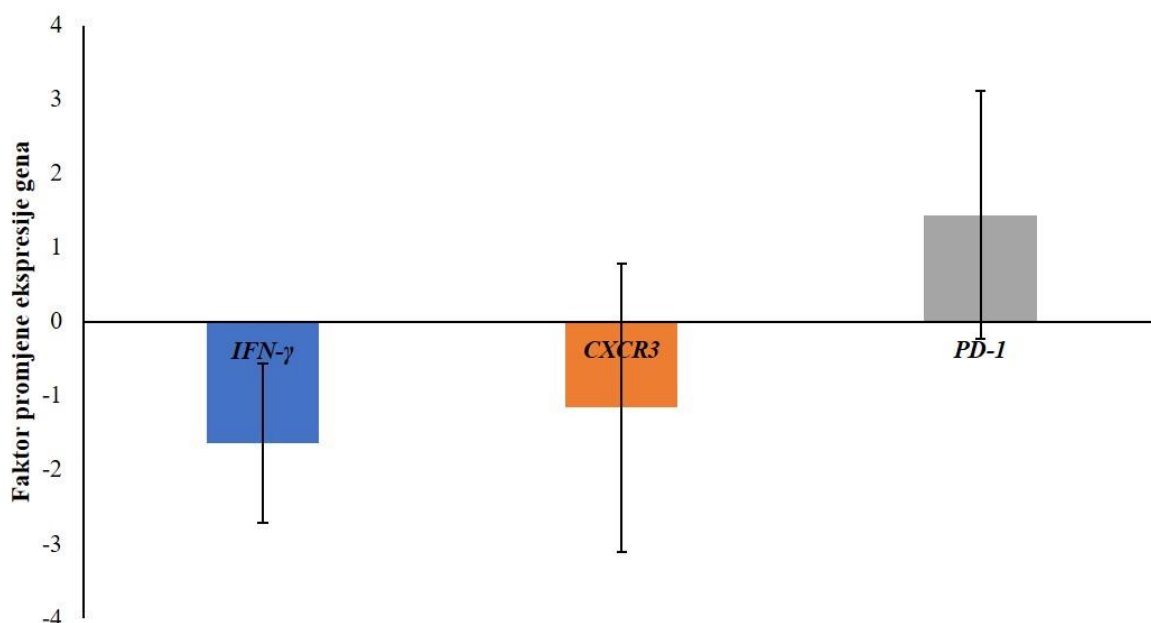
Nakon što sam iz uzoraka RNA reverznom transkripcijom dobila cDNA, metodom qPCR usporedila sam ekspresiju gena *TNF- $\alpha$* , *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1* između uzoraka PMBCL-a i netumorskih limfocita B te ekspresiju gena *IFN- $\gamma$* , *CXCR3* i *PD-1* između uzoraka PMBCL-a i netumorskih limfocita T. Dva uzorka PMBCL-a, dva uzorka netumorskih limfocita B i jedan uzorak netumorskih limfocita T bila su isključena iz istraživanja zbog nedostatka očitavanja vrijednosti Ct za endogenu kontrolu *HPRT1*.

Geni *cREL* i *CXCL10* kod PMBCL-a pokazali su viši obrazac ekspresije u usporedbi s netumorskim limfocitima B, dok su geni *TNF- $\alpha$*  i *PD-L1* pokazali niži obrazac ekspresije u tumorskom tkivu u odnosu na netumorske limfocite B, ali ekspresija istraživanih gena nije se statistički značajno razlikovala između PMBCL-a i netumorskih limfocita B (Slika 4).



Slika 4. Razina ekspresije gena *TNF-α* (plavo), *cREL* (narančasto), *CXCL10* (sivo) i *PD-L1* (žuto) u uzorcima pacijenata s primarnim medijastinalnim B-staničnim limfomom (PMBCL) u odnosu na kontrolne uzorke netumorskih limfocita B izdvojenih iz netumorskih tonzila.

Gen *PD-1* pokazao je viši obrazac ekspresije u tumorskom tkivu u usporedbi s netumorskim limfocitima T, dok su geni *IFN-γ* i *CXCR3* pokazali niži obrazac ekspresije u PMBCL-u u odnosu na netumorske limfocite T, ali ekspresija navedenih gena nije se značajno razlikovala u PMBCL-u u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 5).



Slika 5. Razina ekspresije gena *IFN-γ* (plavo), *CXCR3* (narančasto) i *PD-1* (sivo) u uzorcima

Slika 5 – nastavak

pacijenata s primarnim mediastinalnim B-staničnim limfomom (PMBCL) u odnosu na kontrolne uzorke netumorskih limfocita T izdvojenih iz netumorskih tonzila.

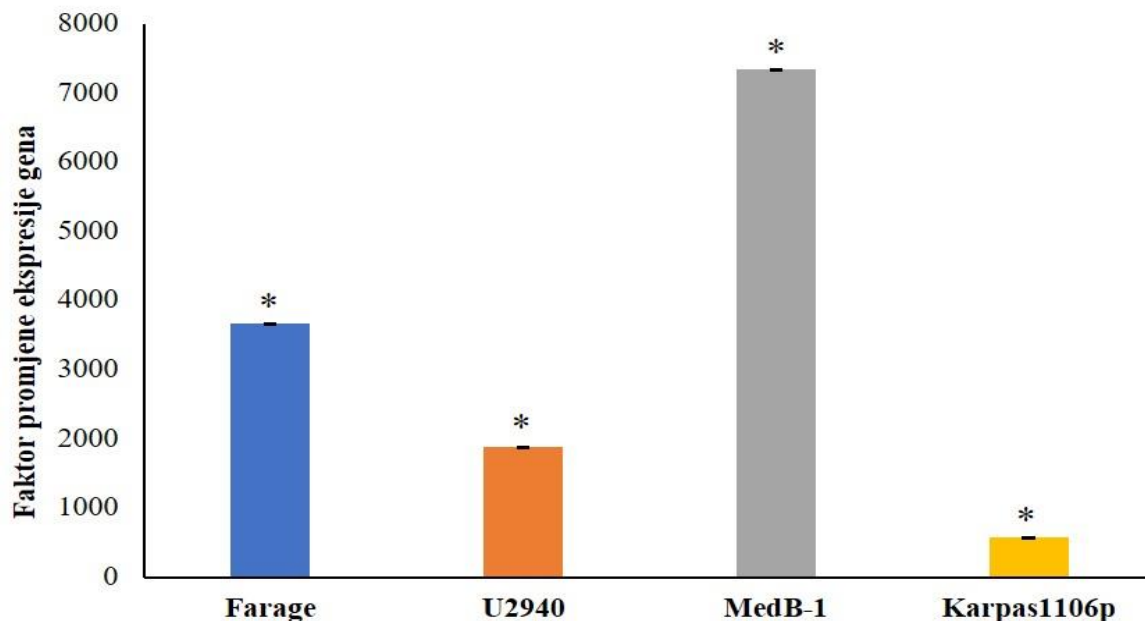
#### 4.2. Analiza ekspresije gena *TNF- $\alpha$* , *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1* u tumorskim staničnim linijama

##### 4.2.1. Koncentracije i čistoće uzoraka RNA izoliranih iz taloga staničnih linija Farage, U2940, MedB-1, Karpas1106p i HeLa

Koncentracije RNA izolirane iz 210 taloga stanica iz staničnih linija Farage, U2940, MedB-1, Karpas1106p i HeLa (42 taloga po staničnoj liniji – Slika 3) bile su u rasponu između 2,7 i 935,2 ng/ $\mu$ L. Omjeri apsorbancija pri 260 i 280 nm bili su u rasponu između 1,185 i 3,367, ali RNA je bila dovoljno čista za primjenu daljnjih metoda. Omjeri apsorbancija pri 260 i 230 nm kod većine uzoraka bili su blizu ili veći od 2, što predstavlja čistu RNA.

##### 4.2.2. Ekspresija *TNF- $\alpha$* u netretiranim staničnim linijama

Analiza ekspresije gena metodom qPCR pokazala je da netretirane stanične linije Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p, koje su model PMBCL-a, imaju značajno višu ekspresiju gena *TNF- $\alpha$*  u odnosu na netretiranu staničnu liniju epitelnog porijekla HeLa (Slika 6).



Slika 6. Razina ekspresije gena *TNF- $\alpha$*  u netretiranim staničnim linijama Farage (plavo), U2940 (narančasto), MedB-1 (sivo) i Karpas1106p (žuto) u odnosu na netretiranu staničnu liniju HeLa. \* –  $p < 0,05$ .

4.2.3. Analiza ekspresije gena *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1* u tumorskim staničnim linijama nakon tretmana s TNF- $\alpha$

4.2.3.1. Usporedba ekspresije gena *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1* u tumorskim staničnim linijama nakon tretmana različitim koncentracijama TNF- $\alpha$  i netretiranim tumorskim staničnim linijama

Nakon tretmana modelnih staničnih linija PMBCL-a Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p i kontrolne stanične linije epitelnog porijekla HeLa s 5, 10, 20 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$  tijekom 24 i 48 sati, ekspresija gena *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1* bila je uspoređena s njihovom ekspresijom u netretiranim stanicama (Slike 7-9).

Ekspresija gena *cREL* u staničnoj liniji Farage nakon 24 sata tretmana s različitim koncentracijama TNF- $\alpha$  nije bila značajno promijenjena u odnosu na netretirane stanice. U istoj staničnoj liniji, ekspresija *cREL* bila je značajno niža nakon 48 sati tretmana s 5 ng/mL TNF- $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice.

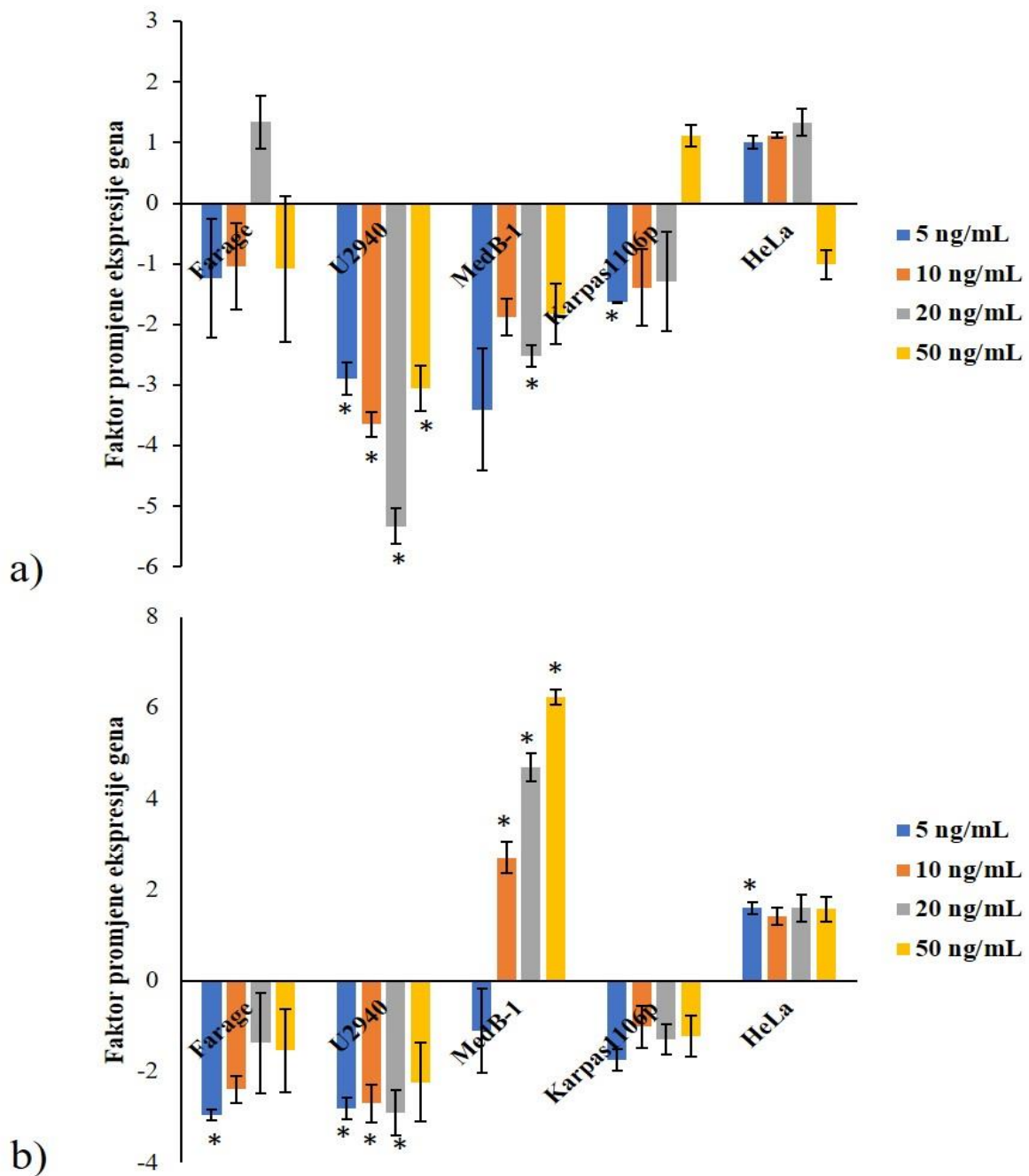
Ekspresija *cREL* u staničnoj liniji U2940 bila je značajno niža nakon 24 sata tretmana s 5, 10, 20 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$ . Najveća promjena u ekspresiji *cREL* u odnosu na netretirane stanice bila je opažena kod tretmana s 20 ng/mL TNF- $\alpha$ , dok je tretman s 5 ng/mL TNF- $\alpha$  uzrokovao najmanju promjenu u ekspresiji *cREL* u odnosu na netretirane stanice. Ekspresija *cREL* u staničnoj liniji U2940 bila je značajno niža i nakon 48 sata tretmana s 5, 10 i 20 ng/mL TNF- $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice, ali ne i nakon 48 sati tretmana s 50 ng/mL TNF- $\alpha$ .

Ekspresija *cREL* u staničnoj liniji MedB-1 bila je značajno niža nakon 24 sati tretmana s 20 ng/mL TNF- $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice, dok 24 sata tretmana s 5, 10 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$  nije uzrokovalo značajnu promjenu u ekspresiji *cREL*. Nakon 48 sati tretmana s 10, 20 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$ , ekspresija *cREL* u staničnoj liniji MedB-1 bila je značajno viša u odnosu na netretirane stanice, a nije bila značajno promijenjena nakon 48 sati tretmana s 5 ng/mL TNF- $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice.

Ekspresija *cREL* u staničnoj liniji Karpas1106p bila je značajno niža nakon 24 sata tretmana s 5 ng/mL TNF- $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice. Nakon 24 sata tretmana s 10, 20 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$  ekspresija *cREL* u istoj staničnoj liniji nije bila promijenjena u odnosu na netretirane stanice. Nakon 48 sati tretmana s različitim koncentracijama TNF- $\alpha$  ekspresija *cREL* nije bila značajno promijenjena u odnosu na netretirane stanice.

Ekspresija gena *cREL* u staničnoj liniji HeLa nije bila značajno promijenjena nakon 24 sata tretmana s 5, 10, 20 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$ . Nakon 48 sati tretmana s 5 ng/mL TNF- $\alpha$  ekspresija

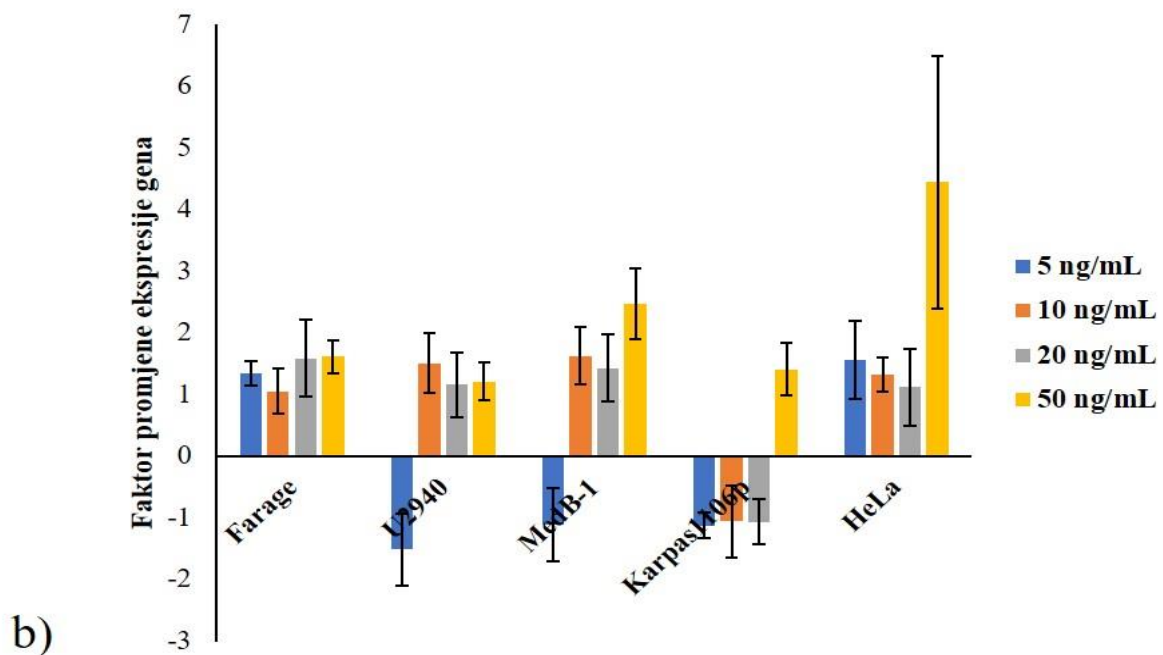
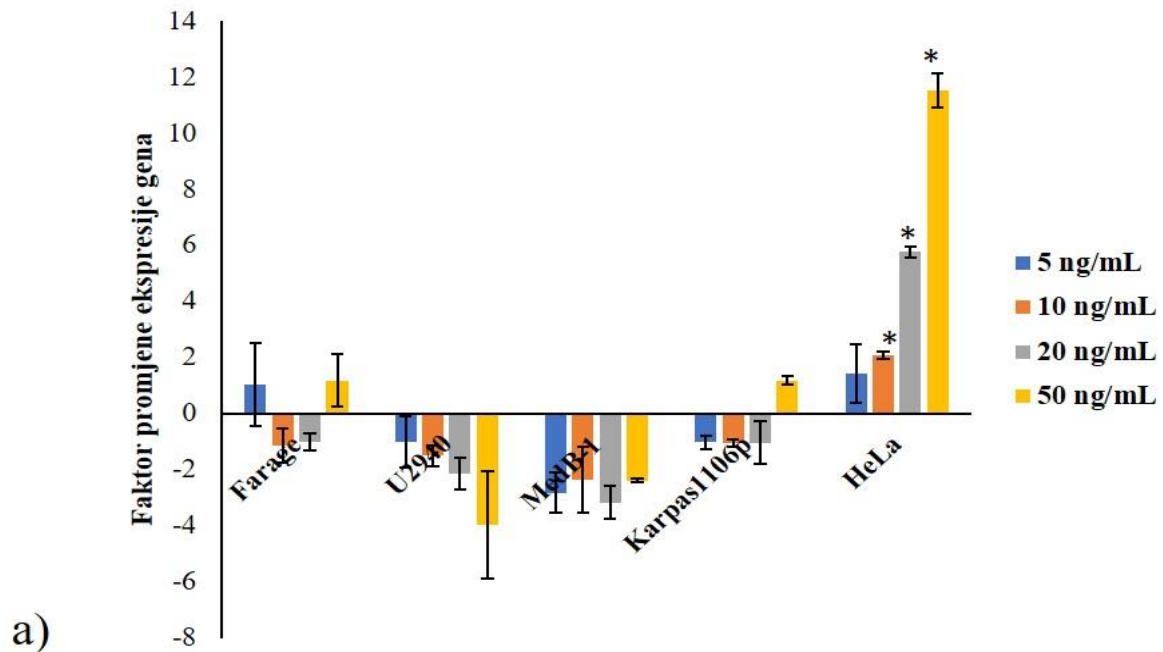
*cREL* u staničnoj liniji HeLa bila je značajno povišena, ali nakon 48 sati tretmana s 10, 20 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$  nije bilo promjene u ekspresiji gena *cREL*.



Slika 7. Razina promjene ekspresije gena *cREL* u staničnim linijama Farage, U2940, MedB-1, Karpas1106p i HeLa nakon tretmana s 5 (plavo), 10 (narančasto), 20 (sivo) i 50 (žuto) ng/mL TNF- $\alpha$  tijekom 24 sata (a) i tijekom 48 sati (b). \* –  $p < 0,05$ .



Tretman staničnih linija Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p nije doveo do značajne promjene u ekspresiji gena *CXCL10* ni nakon 24 sata ni nakon 48 sati tretmana s različitim koncentracijama TNF- $\alpha$ . Ekspresija *CXCL10* u staničnoj liniji HeLa bila je značajno viša nakon 24 sata tretmana s 10, 20 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice. Najveća promjena u ekspresiji *CXCL10* bila je nakon tretmana s 50 ng/mL TNF- $\alpha$ , a najmanja nakon tretmana s 10 ng/mL TNF- $\alpha$ . Nakon 48 sati tretmana s 5, 10, 20 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$  nije bilo razlike u ekspresiji gena *CXCL10* u staničnoj liniji HeLa u odnosu na netretirane stanice.



## Slika 8 – nastavak

Slika 8. Razina promjene ekspresije gena *CXCL10* u staničnim linijama Farage, U2940, MedB-1, Karpas1106p i HeLa nakon tretmana s 5 (plavo), 10 (narančasto), 20 (sivo) i 50 (žuto) ng/mL TNF- $\alpha$  tijekom 24 sata (a) i tijekom 48 sati (b). \* –  $p < 0,05$ .

Ekspresija gena *PD-L1* u staničnoj liniji Farage nije bila promijenjena ni nakon 24 sata ni nakon 48 sati tretmana s različitim koncentracijama TNF- $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice.

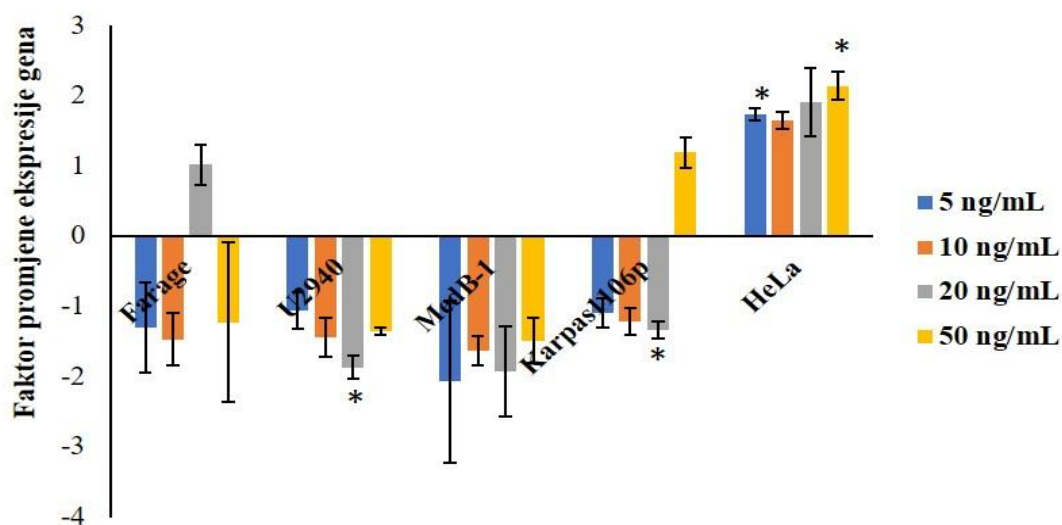
Ekspresija *PD-L1* u staničnoj liniji U2940 bila je značajno niža nakon 24 sata tretmana s 20 ng/mL TNF- $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice, dok tretmani s 5, 10 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$  tijekom 24 sata nisu uzrokovali značajnu promjenu ekspresije *PD-L1* u odnosu na netretirane stanice.

Ekspresija *PD-L1* u staničnoj liniji U2940 bila je značajno niža nakon 48 sati tretmana s 5 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice, a ekspresija *PD-L1* bila je niža nakon tretmana s 5 ng/mL TNF- $\alpha$  nego nakon tretmana s 50 ng/mL TNF- $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice.

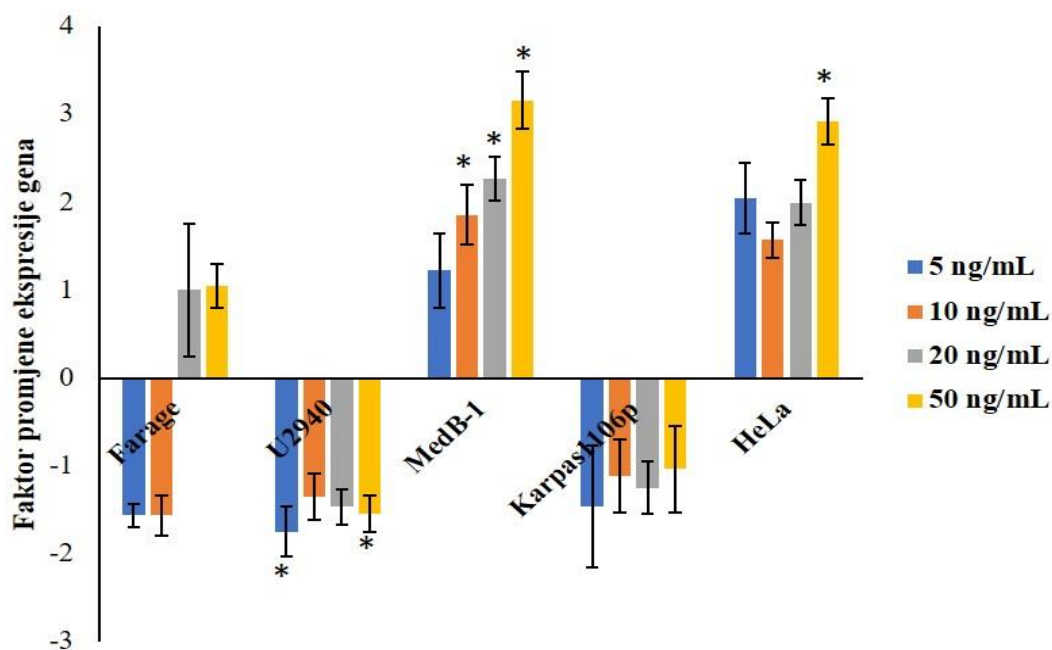
Ekspresija *PD-L1* u staničnoj liniji MedB-1 nije bila značajno promijenjena nakon 24 sata tretmana različitim koncentracijama TNF- $\alpha$ . Nakon 48 sati tretmana s 10, 20 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$ , ekspresija *PD-L1* u istoj staničnoj liniji bila je viša u odnosu na netretirane stanice i najviša nakon tretmana s 50 ng/mL TNF- $\alpha$ .

Ekspresija *PD-L1* u staničnoj liniji Karpas1106p bila je značajno niža nakon 24 sata tretmana s 20 ng/mL TNF- $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice, ali nije bila promijenjena nakon 24 sata tretmana s 5, 10 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice. Nakon 48 sati tretmana s različitim koncentracijama TNF- $\alpha$  nije bilo značajne razlike u ekspresiji *PD-L1* u istoj staničnoj liniji u odnosu na netretirane stanice.

Ekspresija *PD-L1* u staničnoj liniji HeLa bila je značajno viša nakon 24 sata tretmana s 5 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice. Ekspresija *PD-L1* bila je viša nakon tretmana s 50 ng/mL TNF- $\alpha$  nego s 5 ng/mL TNF- $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice. Nakon 48 sati tretmana ekspresija *PD-L1* u staničnoj liniji HeLa bila je značajno viša samo u skupini tretiranoj s 50 ng/mL TNF- $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice.



a)

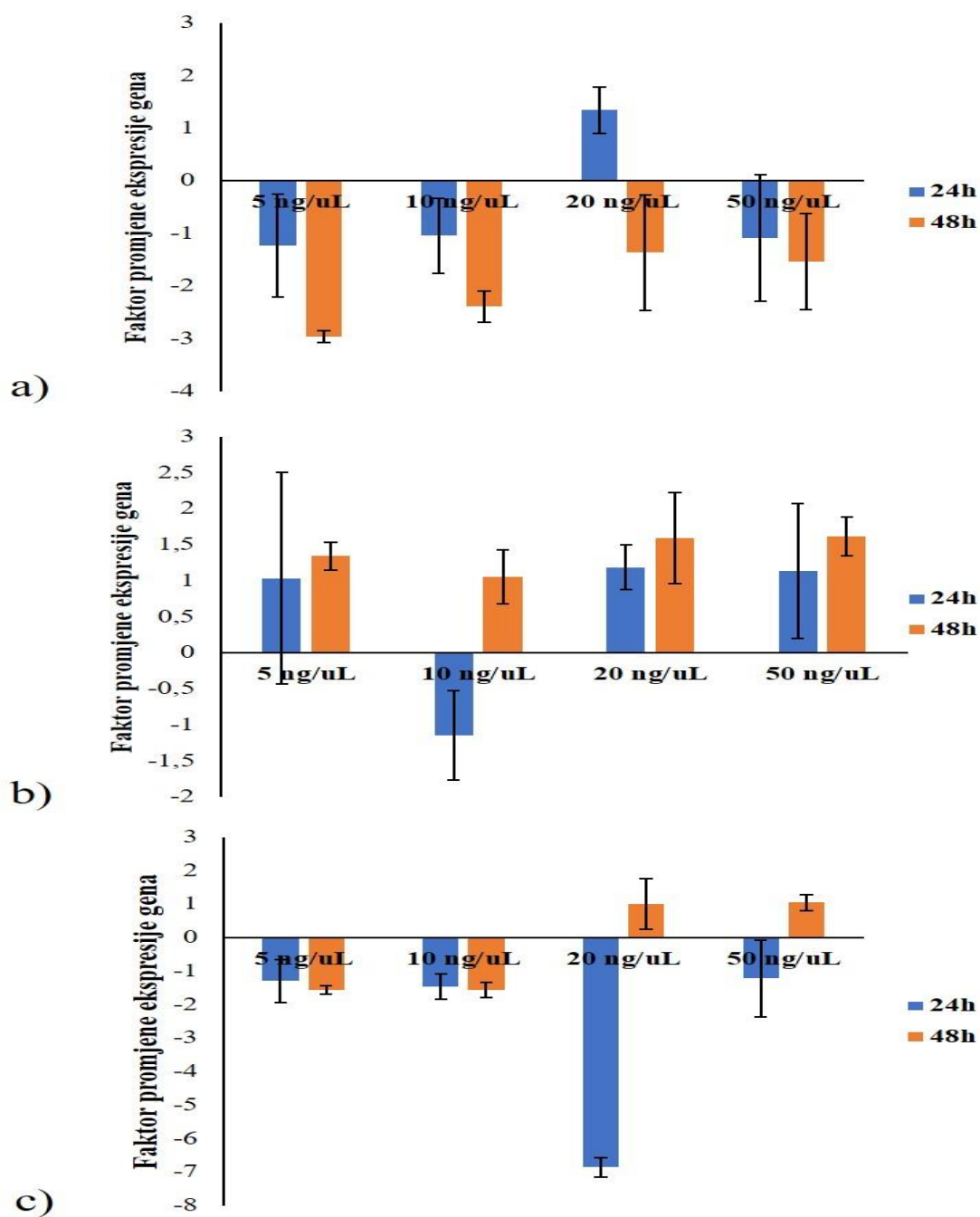


b)

Slika 9. Razina promjene ekspresije gena *PD-L1* u staničnim linijama Farage, U2940, MedB-1, Karpas1106p i HeLa nakon tretmana s 5 (plavo), 10 (narančasto), 20 (sivo) i 50 (žuto) ng/mL TNF- $\alpha$  tijekom 24 sata (a) i tijekom 48 sati (b). \* –  $p < 0,05$ .

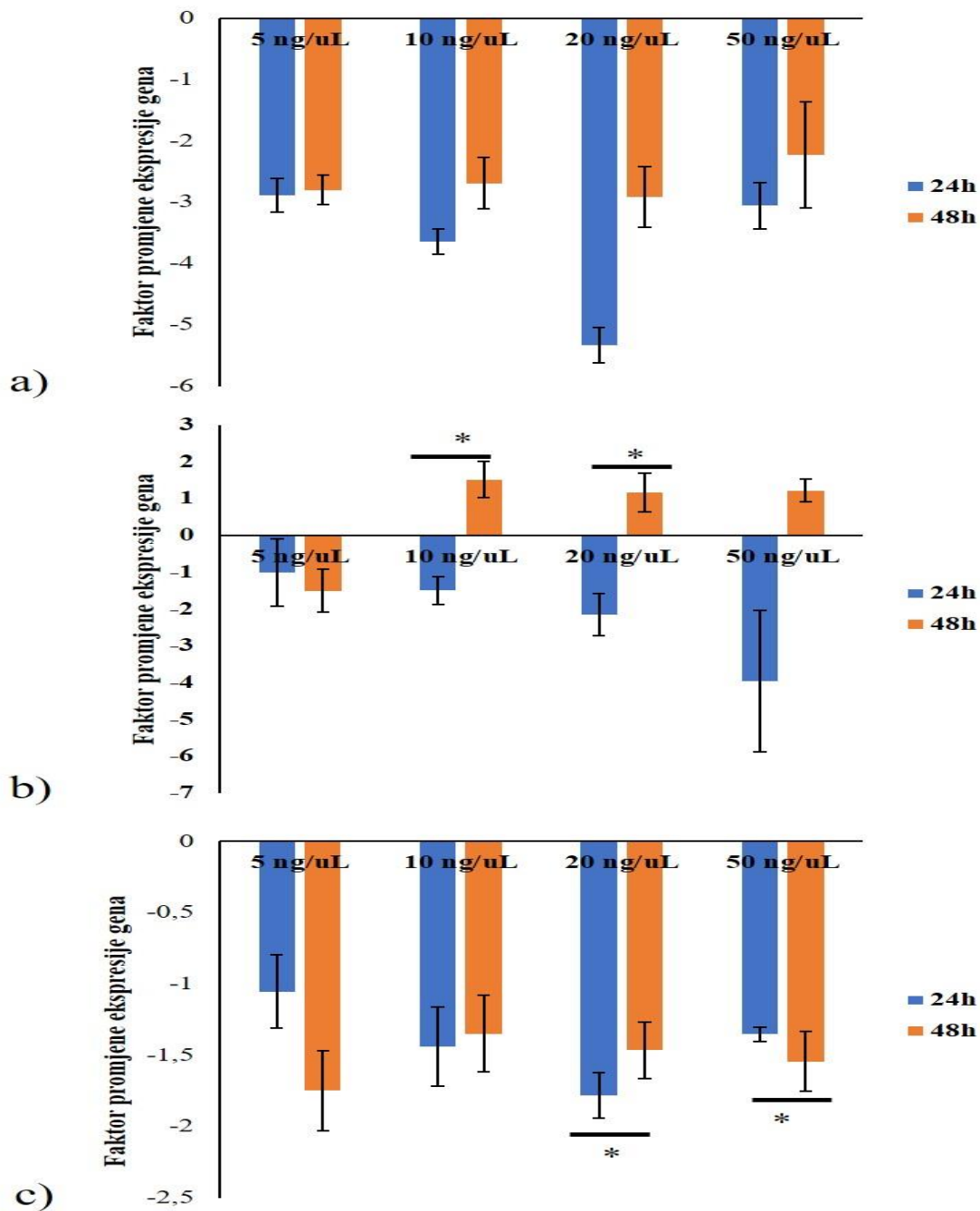
4.2.3.2. Usporedba ekspresije gena *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1* nakon 24 i 48 sati tretmana TNF- $\alpha$

U staničnoj liniji Farage nije bilo značajne razlike u ekspresiji gena *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1* između stanica tretiranih različitim koncentracijama TNF- $\alpha$  tijekom 24 i 48 sati (Slika 10).



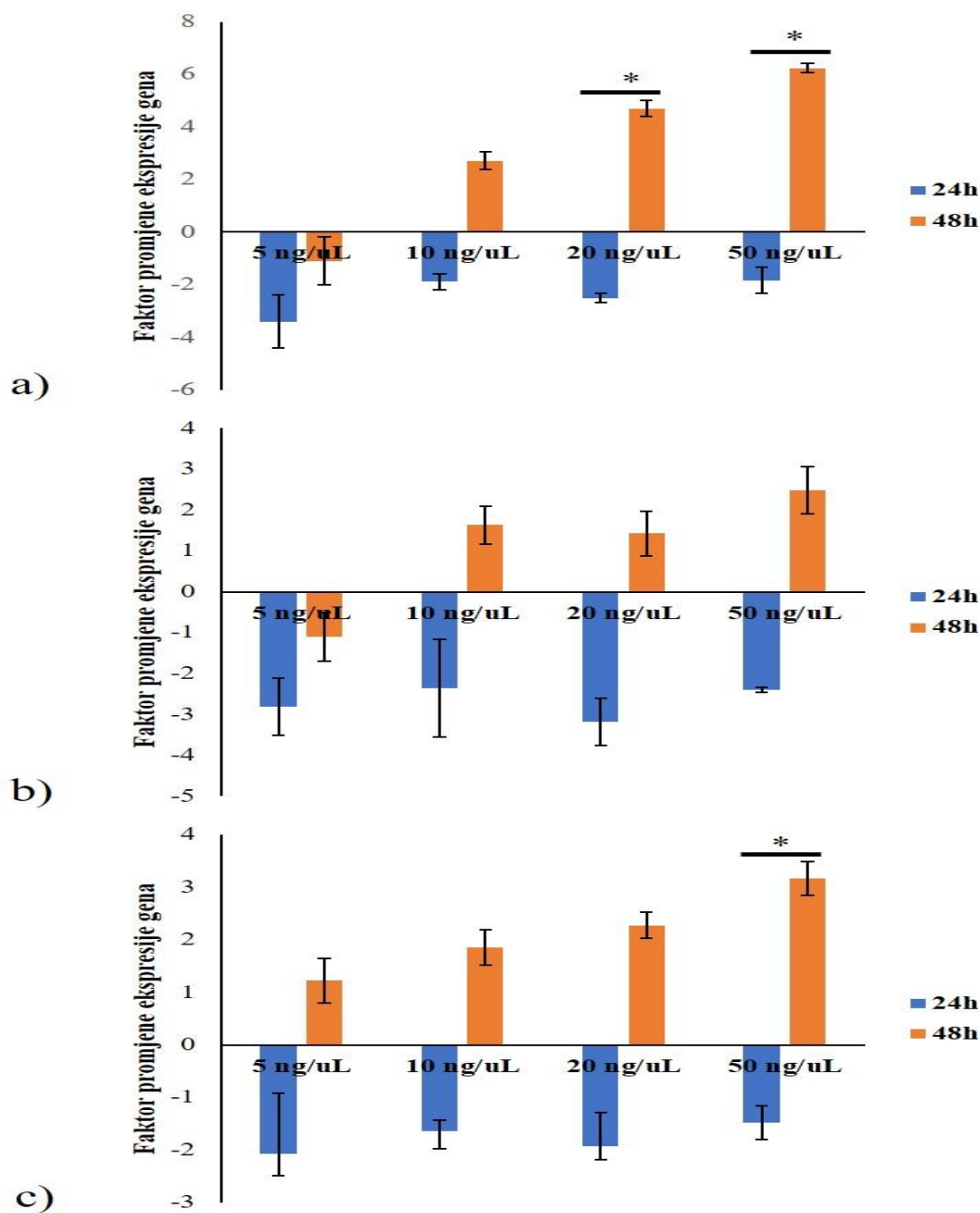
Slika 10. Razina promjene ekspresije gena *cREL* (a), *CXCL10* (b) i *PD-L1* (c) u staničnoj liniji Farage nakon tretmana različitim koncentracijama TNF- $\alpha$  (5, 10, 20 i 50 ng/mL) tijekom 24 sata (plavo) i 48 sati (narančasto). \* –  $p < 0,05$ .

U staničnoj liniji U2940 ekspresija gena *CXCL10* bila je značajno promijenjena između 24 i 48 sati nakon tretmana s 10 i 20 ng/mL TNF- $\alpha$  (Slika 11.b), a gena *PD-L1* nakon tretmana s 20 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$  (Slika 11.c). Ekspresija *PD-L1* bila je značajno viša u netretiranim stanicama 48 sati nakon nasađivanja nego u netretiranim stanicama 24 sata nakon nasađivanja.



Slika 11. Razina promjene ekspresije gena *cREL* (a), *CXCL10* (b) i *PD-L1* (c) u staničnoj liniji U2940 nakon tretmana različitim koncentracijama TNF- $\alpha$  (5, 10, 20 i 50 ng/mL) 24 sata (plavo) i 48 sati (narančasto). \* –  $p < 0,05$ .

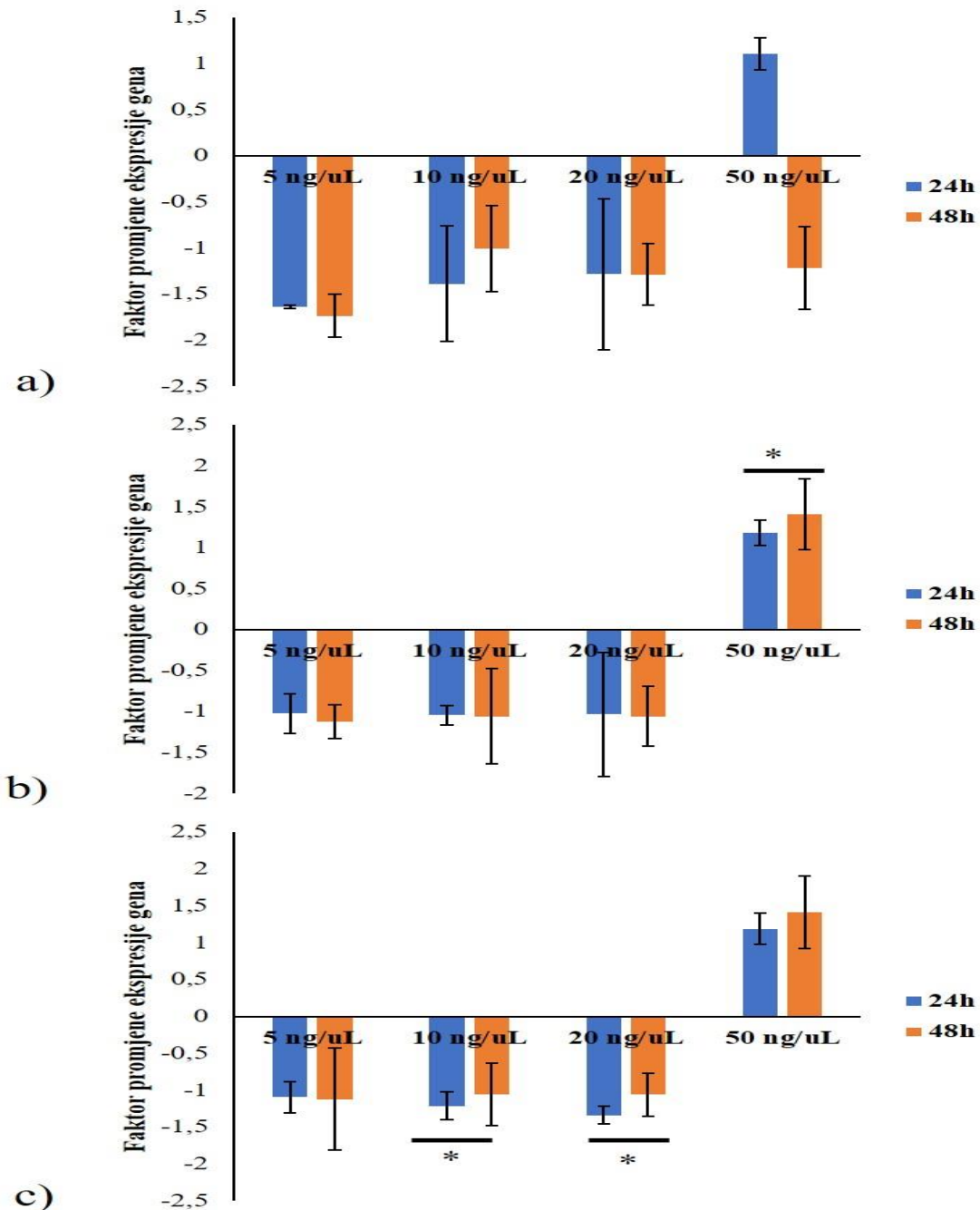
U staničnoj liniji MedB-1 ekspresija gena *cREL* bila je značajno promijenjena između 24 i 48 sati nakon tretmana s 20 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$  (Slika 12.a), a gena *PD-L1* nakon tretmana s 50 ng/mL TNF- $\alpha$  (Slika 12.c). Ekspresija *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1* bila je značajno niža u netretiranim stanicama 48 sati nakon nasađivanja nego u netretiranim stanicama 24 sata nakon nasađivanja.



Slika 12. Razina promjene ekspresije gena *cREL* (a), *CXCL10* (b) i *PD-L1* (c) u staničnoj liniji MedB-1 nakon tretmana različitim koncentracijama TNF- $\alpha$  (5, 10, 20 i 50 ng/mL) 24 sata (plavo) i 48 sati (narančasto). \* –  $p < 0,05$ .

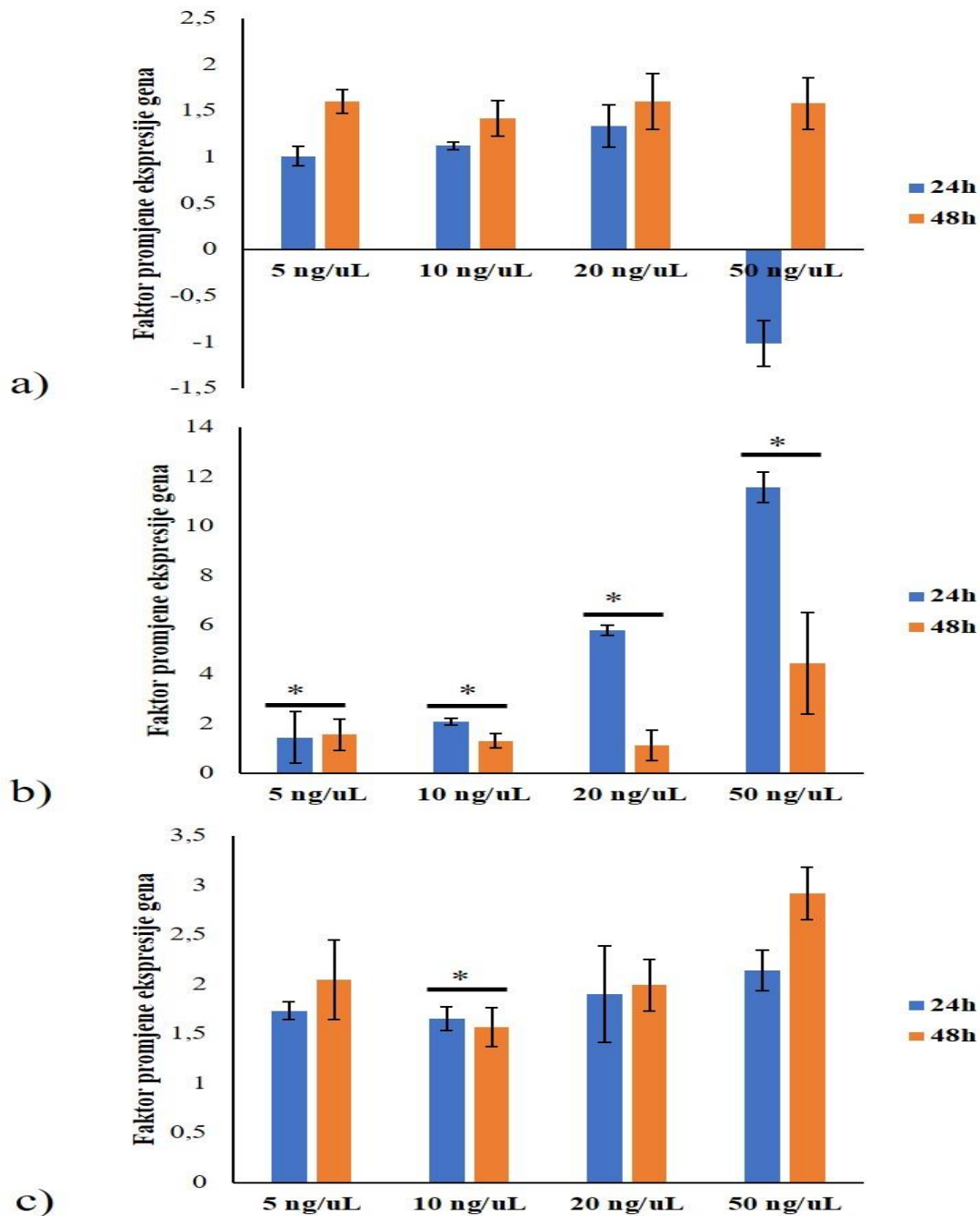
U staničnoj liniji Karpas1106p ekspresija gena *CXCL10* bila je značajno promijenjena između 24 i 48 sati nakon tretmana s 50 ng/mL TNF- $\alpha$  (Slika 13.b), a gena *PD-L1* nakon tretmana s 10 i 20 ng/mL TNF- $\alpha$  (Slika 13.c). Ekspresija *CXCL10* i *PD-L1* bila je značajno viša u

netretiranim stanicama 48 sati nakon nasađivanja nego u netretiranim stanicama 24 sata nakon nasađivanja.



Slika 13. Razina promjene ekspresije gena *cREL* (a), *CXCL10* (b) i *PD-L1* (c) u staničnoj liniji Karpas1106p nakon tretmana različitim koncentracijama TNF- $\alpha$  (5, 10, 20 i 50 ng/mL) 24 sata (plavo) i 48 sati (narančasto). \* –  $p < 0,05$ .

U staničnoj liniji HeLa ekspresija gena *CXCL10* bila je značajno promijenjena između 24 i 48 sati nakon svih tretmana s TNF- $\alpha$ , (Slika 14.b) a gena *PD-L1* nakon tretmana s 10 ng/mL TNF- $\alpha$  (Slika 14.c).



Slika 14. Razina promjene ekspresije gena *cREL* (a), *CXCL10* (b) i *PD-L1* (c) u staničnoj liniji HeLa nakon tretmana različitim koncentracijama TNF- $\alpha$  (5, 10, 20 i 50 ng/mL) 24 sata (plavo) i 48 sati (narančasto). \* –  $p < 0,05$ .



#### 4.2.3.3. Usporedba ekspresije gena *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1* u modelnim staničnim linijama u odnosu na staničnu liniju HeLa nakon tretmana s TNF- $\alpha$

Ekspresija gena *cREL*, *CXCL10* i *PD-L1* bila je značajno viša u modelnim staničnim linijama PMBCL-a Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p u odnosu na staničnu liniju HeLa kod netretiranih stanica i 24 sata i 48 sati nakon nasađivanja.

Ekspresija *cREL* bila je značajno viša nakon 24 sata i nakon 48 sati tretmana s 5, 10, 20 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$  u staničnim linijama Farage i MedB-1 u odnosu na staničnu liniju HeLa. U staničnim linijama U2940 i Karpas1106p nije bilo značajne razlike u ekspresiji *cREL* u odnosu na staničnu liniju HeLa nakon 24 sata tretmana s 20 ng/mL TNF- $\alpha$ . Nakon 48 sati tretmana, ekspresija *cREL* bila je značajno viša u svim tretiranim skupinama i u U2940 i Karpas1106p u odnosu na staničnu liniju HeLa.

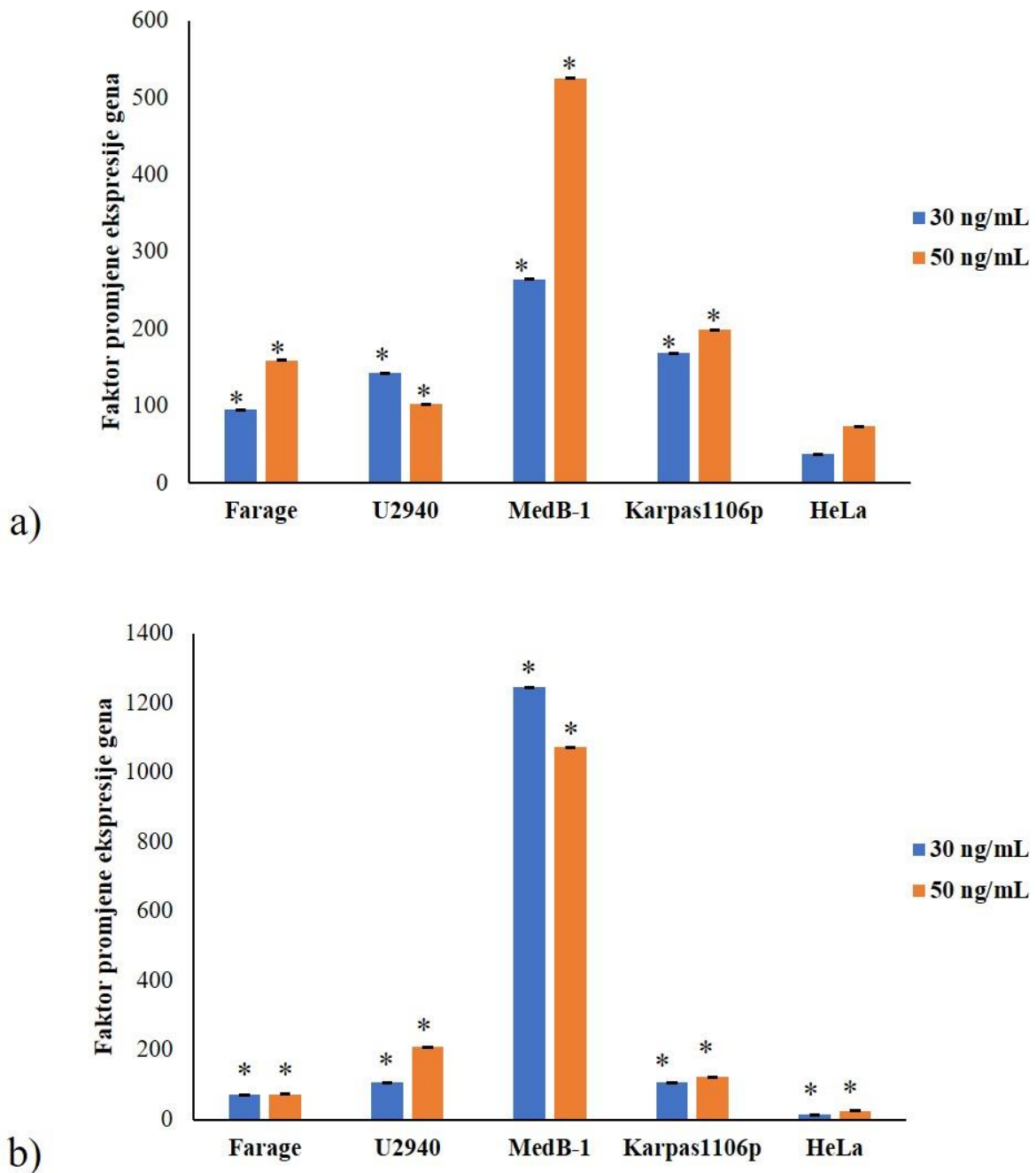
Ekspresija *CXCL10* bila je značajno viša nakon 24 sata i nakon 48 sati tretmana s 5, 10, 20 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$  u staničnim linijama Farage i MedB-1 u odnosu na staničnu liniju HeLa. Nije bilo značajne razlike u ekspresiji *CXCL10* u staničnoj liniji U2940 nakon 24 sata tretmana s 5 ng/mL, 20 ng/mL i 50 ng/mL TNF- $\alpha$  u odnosu na staničnu liniju HeLa. Ekspresija *CXCL10* nije bila značajno različita u staničnoj liniji Karpas1106p nakon 24 sata tretmana s 20 i 50 ng/mL TNF- $\alpha$  u odnosu na staničnu liniju HeLa. Nakon 48 sati tretmana ekspresija *CXCL10* bila je značajno viša i u U2940 i u Karpas1106p u odnosu na staničnu liniju HeLa kod svih koncentracija TNF- $\alpha$ .

Ekspresija gena *PD-L1* bila je značajno viša u svim staničnim linijama PMBCL-a u odnosu na staničnu liniju HeLa neovisno o koncentraciji i duljini trajanja tretmana s TNF- $\alpha$ .

#### 4.2.4. Analiza ekspresije gena *CXCL10* i *PD-L1* u tumorskim staničnim linijama nakon tretmana s IFN- $\gamma$

##### 4.2.4.1. Usporedba ekspresije gena *CXCL10* i *PD-L1* u tumorskim staničnim linijama nakon tretmana različitim koncentracijama IFN- $\gamma$ i netretiranim tumorskim staničnim linijama

Ekspresija gena *CXCL10* bila je značajno povišena u staničnim linijama Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p nakon 24 sata tretmana s 30 i 50 ng/mL IFN- $\gamma$  u odnosu na netretirane kontrole. Nije bilo značajne razlike u ekspresiji *CXCL10* u staničnoj liniji HeLa nakon 24 sata tretmana s 30 i 50 ng/mL IFN- $\gamma$  u odnosu na netretirane stanice (Slika 15.a). Ekspresija *CXCL10* bila je značajno povišena u svim staničnim linijama nakon 48 sati tretmana s 30 i 50 ng/mL IFN- $\gamma$  (Slika 15.b).



Slika 15. Razina promjene ekspresije gena *CXCL10* u staničnim linijama Farage, U2940, MedB-1, Karpas1106p i HeLa nakon tretmana s 30 (plavo) i 50 ng/mL (narančasto) IFN- $\gamma$  tijekom 24 sata (a) i tijekom 48 sati (b). \* –  $p < 0,05$ .

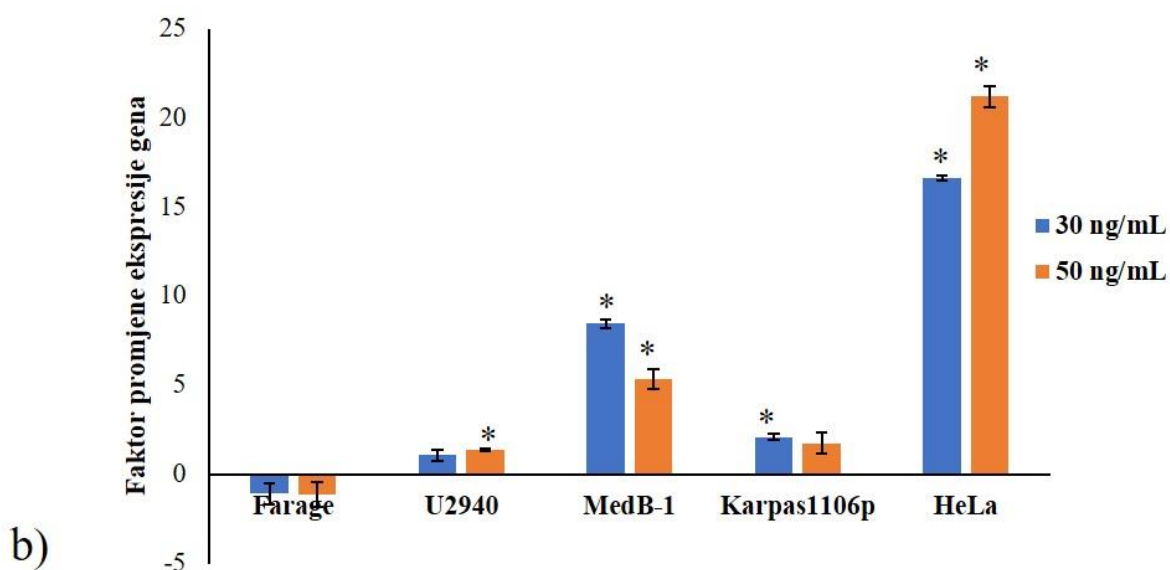
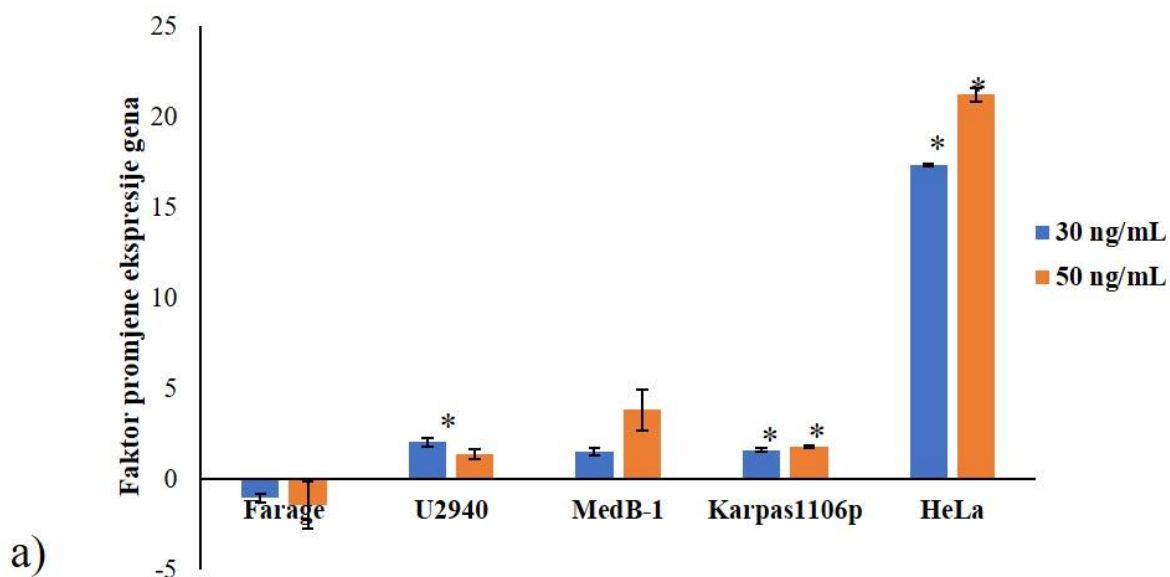
Ekspresija *PD-L1* nije bila značajno promijenjena u staničnoj liniji Farage ni nakon 24 sata ni nakon 48 sati tretmana s 30 i 50 ng/mL IFN- $\gamma$  u odnosu na netretirane stanice.

U staničnoj liniji U2940 ekspresija *PD-L1* bila je značajno viša nakon 24 sata tretmana s 30 ng/mL IFN- $\gamma$ , ali nije bilo razlike u ekspresiji *PD-L1* nakon 24 sata tretmana s 50 ng/mL IFN- $\gamma$ . Ekspresija *PD-L1* u istoj staničnoj liniji bila je značajno viša nakon 48 sati tretmana s 50 ng/mL IFN- $\gamma$ , ali ne i nakon 48 sati tretmana s 30 ng/mL IFN- $\gamma$ .

U staničnoj liniji MedB-1 nije bilo promjene u ekspresiji *PD-L1* nakon 24 sata tretmana ni s 30 ni s 50 ng/mL IFN- $\gamma$ . Nakon 48 sati tretmana ekspresija *PD-L1* bila je značajno viša kod obje koncentracije IFN- $\gamma$ .

U staničnoj liniji Karpas1106p ekspresija *PD-L1* bila je viša i nakon 24 sata tretmana i s 30 i s 50 ng/mL IFN- $\gamma$ . Nakon 48 sati tretmana ekspresija *PD-L1* bila je viša kod stanica tretiranih s 30 ng/mL IFN- $\gamma$ , ali ne i kod stanica tretiranih s 50 ng/mL IFN- $\gamma$ .

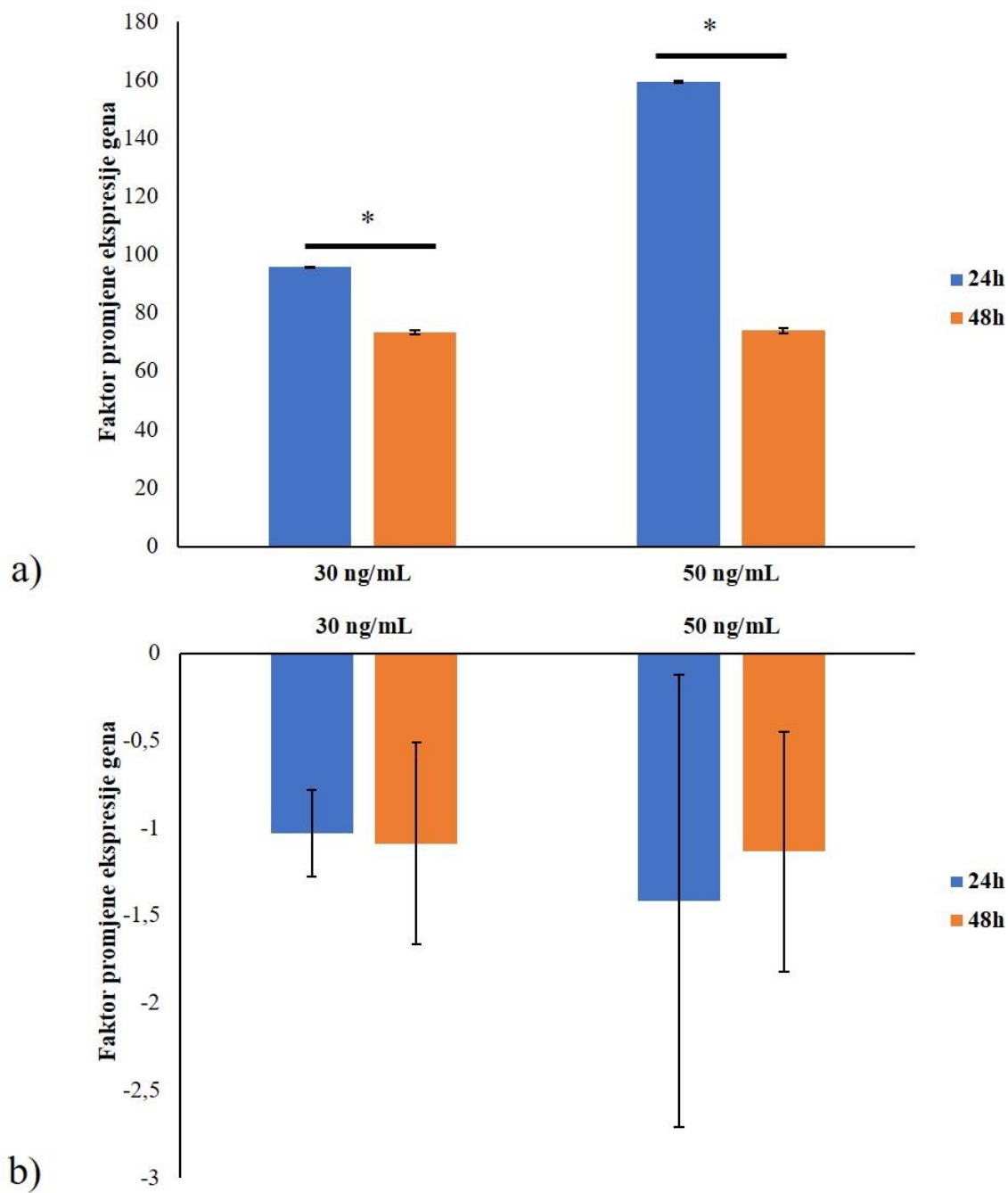
Ekspresija gena *PD-L1* bila je značajno viša u staničnoj liniji HeLa i nakon 24 sata i nakon 48 sati tretmana s 30 i 50 ng/mL IFN- $\gamma$  (Slika 16. a i b).



Slika 16. Razina promjene ekspresije gena *PD-L1* u staničnim linijama Farage, U2940, MedB-1, Karpas1106p i HeLa nakon tretmana s 30 (plavo) i 50 ng/mL (narančasto) IFN- $\gamma$  tijekom 24 sata (a) i tijekom 48 sati (b). \* –  $p < 0,05$ .

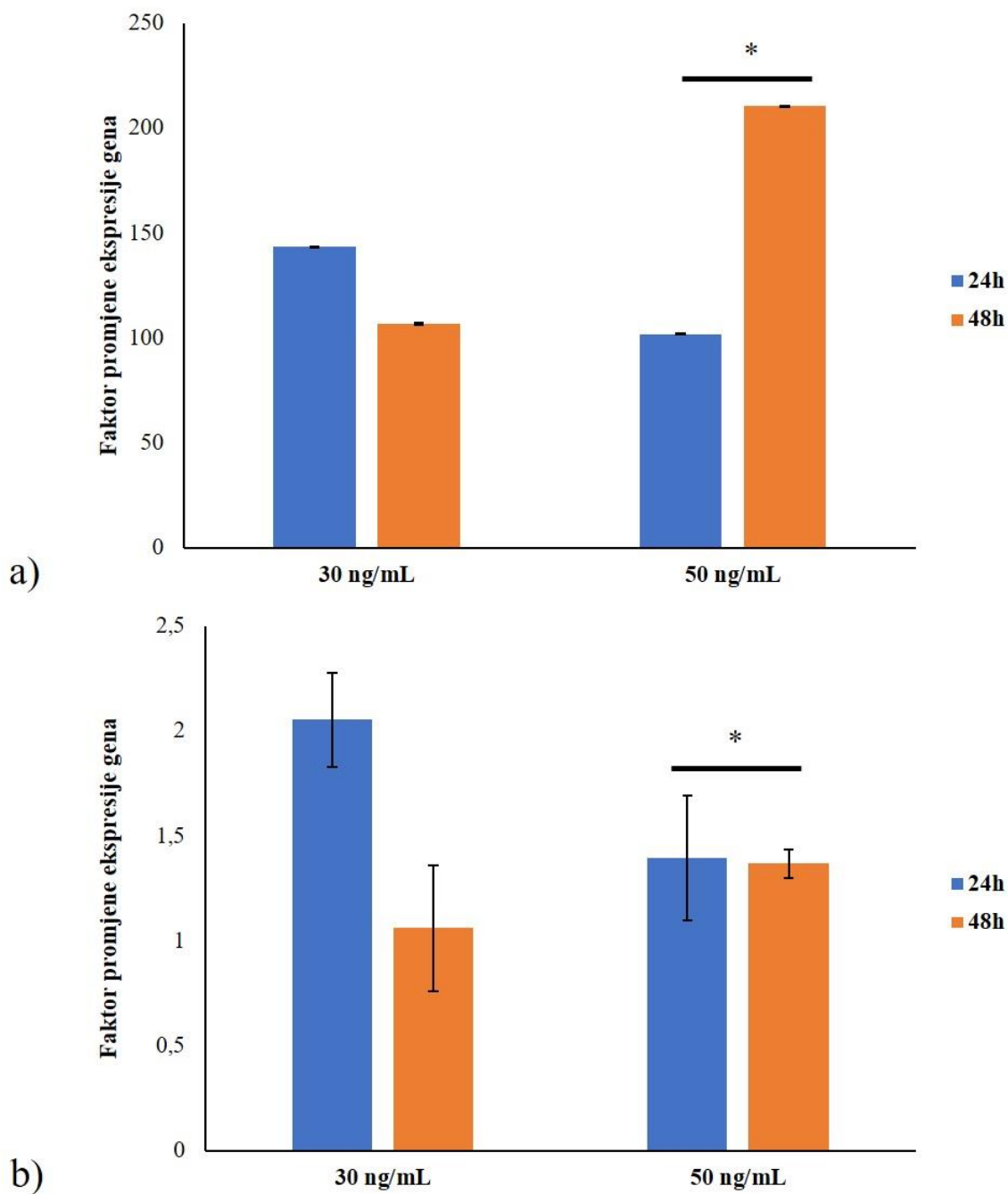
#### 4.2.4.2. Usporedba ekspresije gena *CXCL10* i *PD-L1* nakon 24 i 48 sati tretmana s IFN- $\gamma$

U staničnoj liniji Farage ekspresija *CXCL10* bila je značajno niža nakon 48 sati tretmana s IFN- $\gamma$  u odnosu na tretman 24 sata kod obje koncentracije IFN- $\gamma$  (30 i 50 ng/mL) (Slika 17.a). Ekspresija *PD-L1* nije bila značajno promijenjena između dvije vremenske točke tretmana (Slika 17.b).



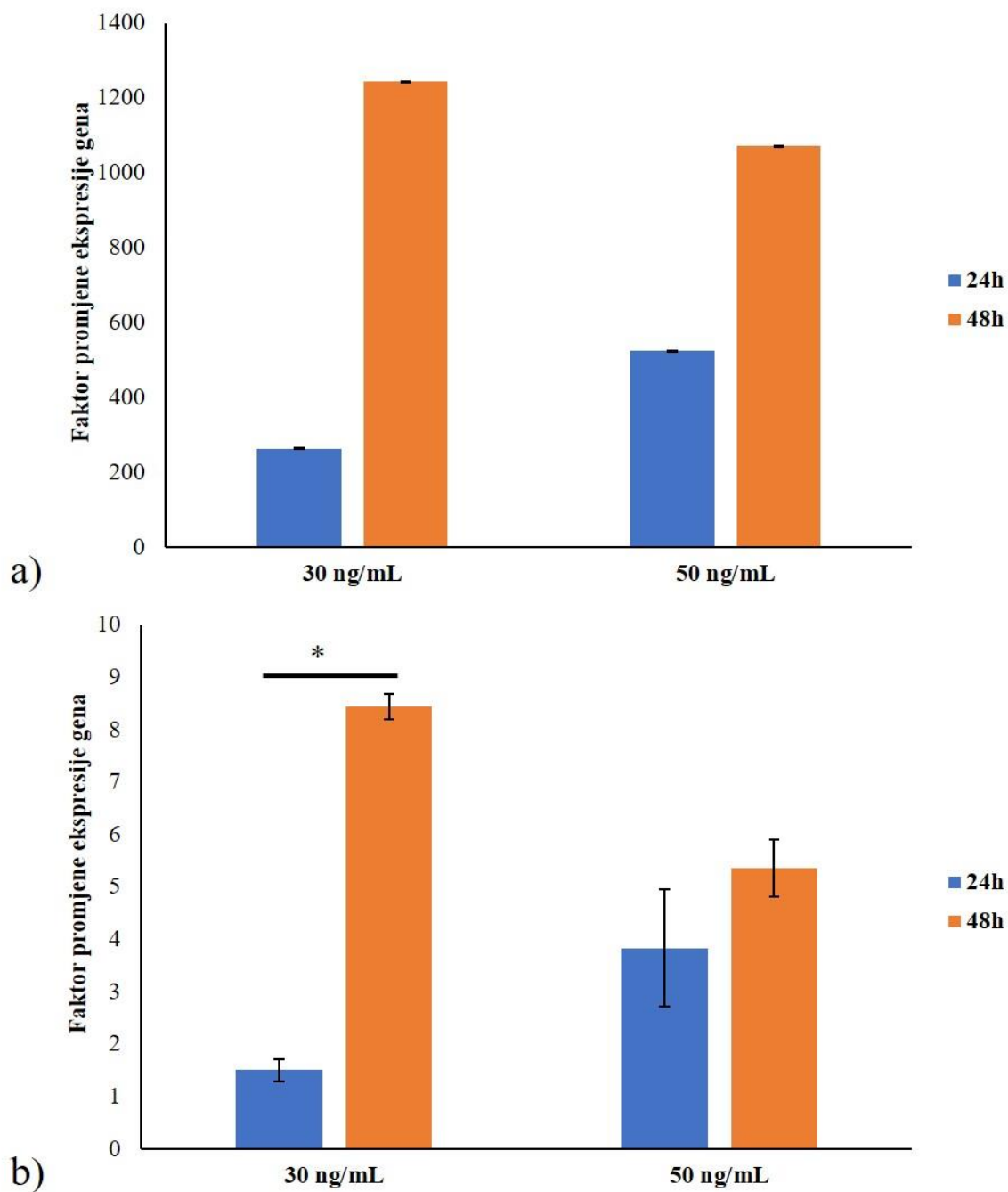
Slika 17. Razina promjene ekspresije gena *CXCL10* (a) i *PD-L1* (b) u staničnoj liniji Farage nakon tretmana s 30 i 50 ng/mL IFN- $\gamma$  24 (plavo) i 48 sati (narančasto). \* –  $p < 0,05$ .

U staničnoj liniji U2940 ekspresija *CXCL10* i *PD-L1* bila je značajno različita između tretmana s 50 ng/mL IFN- $\gamma$  tijekom 24 i 48 sati (Slika 18.a i b).



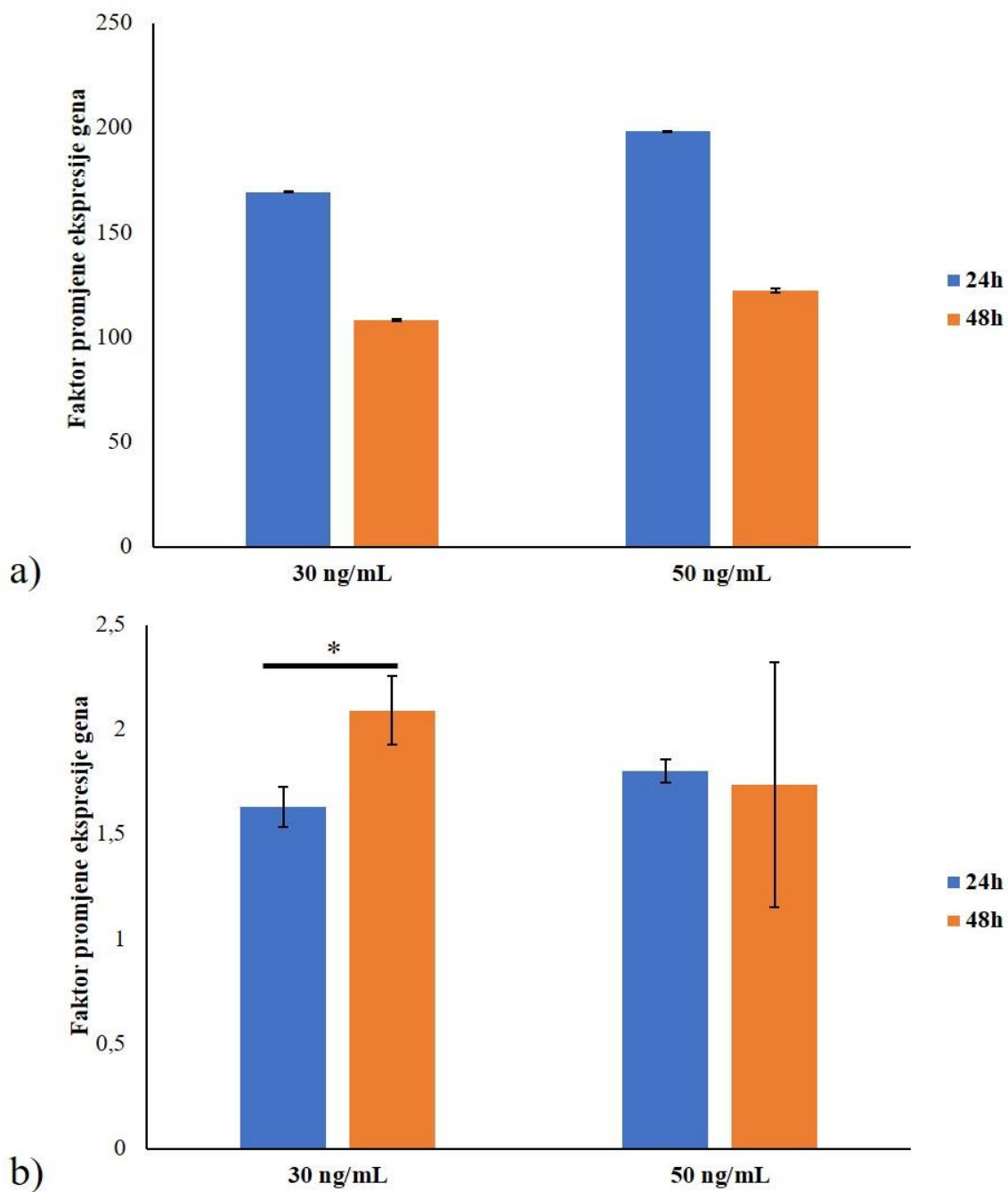
Slika 18. Razina promjene ekspresije gena *CXCL10* (a) i *PD-L1* (b) u staničnoj liniji U2940 nakon tretmana s 30 i 50 ng/mL IFN- $\gamma$  24 (plavo) i 48 sati (narančasto). \* –  $p < 0,05$ .

Ekspresija *CXCL10* u staničnoj liniji MedB-1 nije bila značajno promijenjena nakon 48 sati tretmana u odnosu na 24 sata tretmana neovisno o koncentraciji IFN- $\gamma$  (Slika 19.a). Ekspresija *PD-L1* bila je značajno različita između tretmana s 30 ng/mL IFN- $\gamma$  tijekom 24 i 48 sati (Slika 19.b).



Slika 19. Razina promjene ekspresije gena *CXCL10* (a) i *PD-L1* (b) u staničnoj liniji MedB-1 nakon tretmana s 30 i 50 ng/mL IFN- $\gamma$  24 (plavo) i 48 sati (narančasto). \* –  $p < 0,05$ .

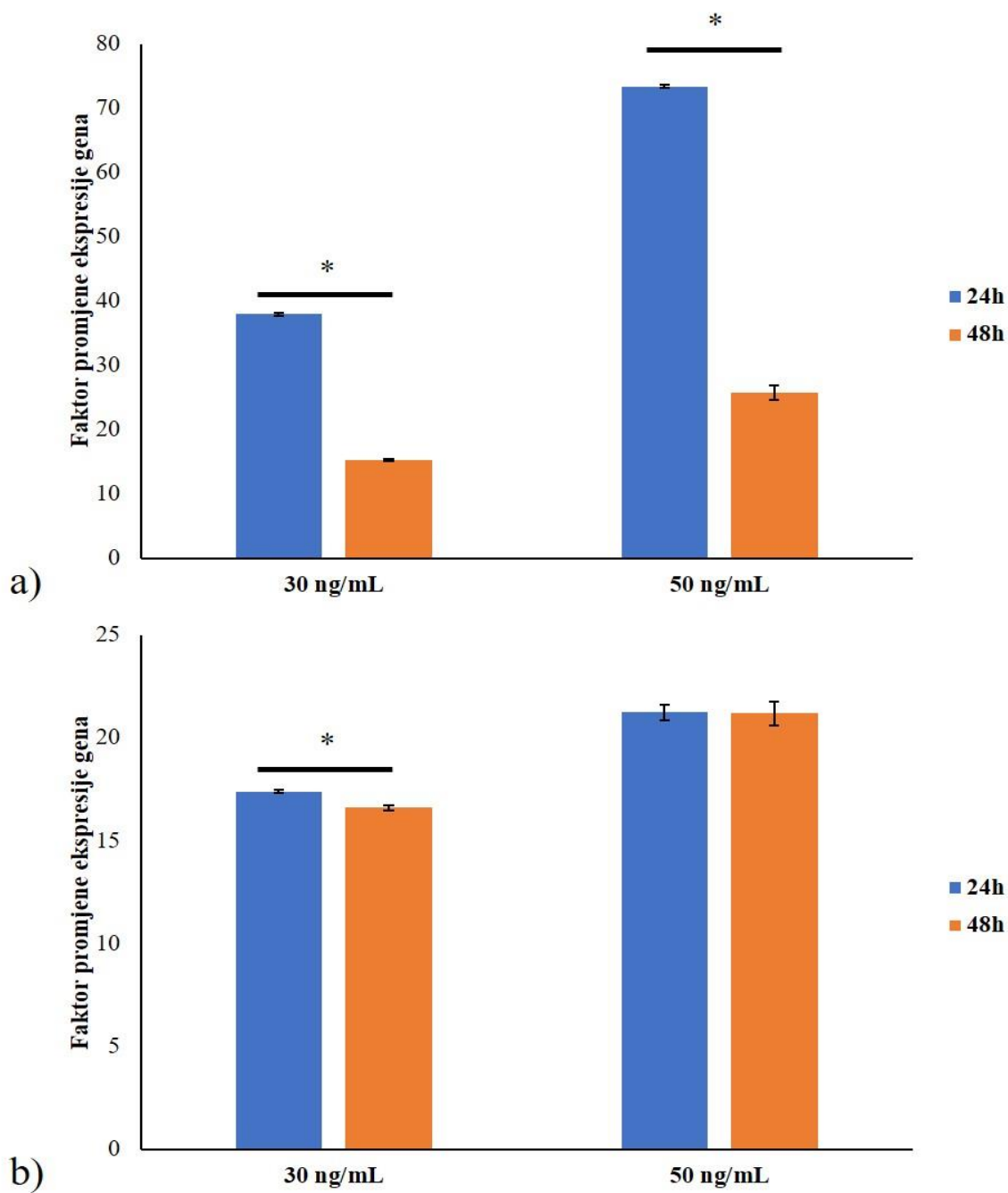
U staničnoj liniji Karpas1106p ekspresija *CXCL10* nije bila značajno promijenjena nakon 48 sati tretmana u odnosu na 24 sata tretmana neovisno o koncentraciji IFN- $\gamma$  (Slika 20.a). Ekspresija *PD-L1* bila je značajno različita između tretmana s 30 ng/mL IFN- $\gamma$  tijekom 24 i 48 sati (Slika 20.b).



Slika 20. Razina promjene ekspresije gena *CXCL10* (a) i *PD-L1* (b) u staničnoj liniji Karpas1106p nakon tretmana s 30 i 50 ng/mL IFN- $\gamma$  24 (plavo) i 48 sati (narančasto). \* –  $p < 0,05$ .

U staničnoj liniji HeLa ekspresija *CXCL10* bila je značajno niža nakon 48 sati tretmana s obje koncentracije IFN- $\gamma$  u odnosu na 24 sata tretmana (Slika 21.a). Ekspresija *PD-L1* bila je različita samo kod tretmana s 30 ng/mL IFN- $\gamma$  (Slika 21.b).





Slika 21. Razina promjene ekspresije gena *CXCL10* (a) i *PD-L1* (b) u staničnoj liniji HeLa nakon tretmana s 30 i 50 ng/mL IFN- $\gamma$  24 (plavo) i 48 sati (narančasto). \* –  $p < 0,05$ .

#### 4.2.4.3. Usporedba ekspresije gena *CXCL10* i *PD-L1* u modelnim staničnim linijama u odnosu na staničnu liniju HeLa nakon tretmana s IFN- $\gamma$

Ekspresija gena *CXCL10* i *PD-L1* bila je značajno povišena u staničnim linijama Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p u odnosu na staničnu liniju HeLa neovisno o duljini i koncentraciji tretmana s IFN- $\gamma$ .

## 5. Rasprava

U ovom istraživanju analizirana je ekspresija gena *TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , *cREL*, *CXCL10*, *CXCR3*, *PD-L1* i *PD-1* u uzorcima pacijenata oboljelih od PMBCL-a i uspoređena je s njihovom ekspresijom u netumorskim limfocitima B i T kako bi se ispitala njihova uloga u komunikaciji tumorskih stanica i stanica tumorskog mikrokoliša.

TNF- $\alpha$  ima ulogu u regulaciji imunskog odgovora, ali pokazano je da može doprinositi i različitim patološkim stanjima, uključujući tumore (148). Rezultati ove studije pokazali su niži obrazac ekspresije gena *TNF- $\alpha$*  u tumorskom tkivu pacijenata s PMBCL-om u odnosu na netumorske B-limfocite iz kojih se tumor razvio, no razlika nije bila statistički značajna. Ekspresija TNF- $\alpha$  niža je u nestimuliranim limfocitima B u mlađoj populaciji u odnosu na stariju populaciju (149, 150), što bi moglo biti povezano s češćom pojavnosti PMBCL-a kod mlađih pacijenata (1). Moguće je da je niska ekspresija *TNF- $\alpha$*  u netumorskim reaktivnim tonzilama rezultat normalnog fiziološkog smanjenja ekspresije TNF- $\alpha$  potrebnog za pojačanu aktivaciju limfocita B u reaktivnim tonzilama (149, 150). U PMBCL-u dosad nije opažena promjena ekspresije TNF- $\alpha$  u odnosu na netumorske limfocite B, ali su opažene aberacije i/ili mutacije gena koji sudjeluju u putu prijenosa signala TNF- $\alpha$  i aktivaciji puta NF $\kappa$ B kao što su *cREL* (89) i *TNFAIP3* (20). Viša ekspresija TNF- $\alpha$  povezana je s lošijim općim preživljenjem (OS, od engl. *overall survival*) pacijenata i lošijim preživljenjem bez napretka tumora (PFS, od engl. *progression-free survival*) u DLBCL-u bez specifikacija (DLBCL-NOS, od engl. *not otherwise specified*) (151) te s lošijom kliničkom slikom pacijenata oboljelih od različitih tipova leukemija (152). U HL-u je pokazano da konstitutivna aktivacija puta NF $\kappa$ B, čiji je jedan od glavnih aktivatora TNF- $\alpha$ , dovodi do povišene ekspresije nizvodnih gena koji kodiraju razne proteine, uključujući regulator staničnog ciklusa ciklin D2, antiapoptotske proteine BFL-1/A1, c-IAP2, TRAF1 i BCL-xL te stanične receptore CD86 i CD40 (5), što omogućava razvoj i opstanak tumora (153). Budući da PMBCL dijeli osobine i s DLBCL-om i s HL-om, slične posljedice mogla bi imati i promjena regulacije ekspresije puta NF $\kappa$ B u PMBCL-u.

Značajno viša ekspresija *TNF- $\alpha$*  u odnosu na staničnu liniju HeLa opažena je u sve četiri modelne stanične linije PMBCL-a (Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p) bez ikakvog tretmana, što je i očekivano, budući da su stanice imunskog sustava (porijekla kojeg su stanice PMBCL-a) primarni izvor TNF- $\alpha$  za razliku od epitelnih stanica (porijekla kojeg su stanice HeLa). Budući da stanice PMBCL-a i same mogu proizvoditi TNF- $\alpha$ , moguće je da

pojačano autokrino i parakrino djelovanje TNF- $\alpha$  potiče razvoj tumora, što je u skladu s rezultatima opaženima u DLBCL-u i HL-u (151, 5).

Transkripcijski faktor cREL jedan je od sastavnica puta NF $\kappa$ B i nužan je za regulaciju razvoja limfocita B i humoralnog imunskog odgovora (85-87), zbog čega je visoko eksprimiran u netumorskim reaktivnim tonzilama koje sadrže veliki broj zrelih limfocita B (154). U ovom istraživanju nije opažena statistički značajna razlika u ekspresiji *cREL* između PMBCL-a i netumorskih limfocita B, što bi moglo biti posljedica mogućih amplifikacija gena *cREL* u dijelu uzoraka PMBCL-a. Nedostatak korelacije između amplifikacije *cREL* i njegove ekspresije na transkripcijskoj i proteinskoj razini opažen u prijašnjim istraživanjima (155), slično kao i u DLBCL-u (156, 157) još uvijek ostaje nerazjašnjen. Neujednačena prisutnost amplifikacija *cREL* ili regije 2p16 u kojoj se on nalazi u različitim istraživanjima (6, 90, 133, 141, 158, 159) sugerira da sama amplifikacija *cREL* nije dovoljna za pojačanu aktivaciju puta NF $\kappa$ B koja bi mogla biti odgovorna za nastanak i/ili razvoj PMBCL-a, nego je potrebna ili dodatna mutacija (npr. gena *TNFAIP3*) ili izvanjski signal. Unatoč tome, cREL još uvijek ostaje zanimljiv predmet istraživanja zbog njegove mogućnosti uzrokovanja maligne transformacije limfoidnih stanica *in vitro* (88), uloge u razvoju DLBCL-a (160) te čestih amplifikacija u HL-u (161), što implicira njegovu ulogu u patogenezi tumora porijekla iz limfoidnih stanica u kojima je deregulirana ekspresija ili aktivnost puta NF $\kappa$ B.

Iznenadujuće, tretman TNF- $\alpha$  uzrokovao je značajan pad razine ekspresije *cREL* u staničnim linijama U2940, MedB-1 i Karpas1106p nakon 24-satnog tretmana, iako je bilo očekivano da će djelovanje TNF- $\alpha$  uzrokovati porast ekspresije *cREL*. Ekspresija gena *cREL* značajno je porasla u staničnoj liniji MedB-1 nakon 48 sati tretmana u odnosu na netretirane stanice, što se očituje i u usporedbi ekspresije *cREL* nakon 24 i 48 sati u ovoj staničnoj liniji pri višim koncentracijama tretmana. Efekt tretmana s TNF- $\alpha$  nakon 48 sati tretmana u ovoj liniji je još i veći jer je kod netretiranih stanica uočen pad ekspresije *cREL* nakon 48 sati u odnosu na netretirane stanice nakon 24 sata. U ostalim modelnim staničnim linijama ekspresija *cREL* ostala je značajno niža ili pokazivala padajući obrazac u odnosu na netretirane stanice. Međutim, primjetno je da se negativna razlika u ekspresiji između tretiranih i netretiranih stanica u staničnoj liniji U2940 smanjila, a u staničnoj liniji Karpas1106p prestala biti značajna, pa bi dulji tretman TNF- $\alpha$  mogao dovesti do povišene ekspresije *cREL* i u ovim staničnim linijama. Ovaj rezultat upućuje na to da dugotrajna izloženost TNF- $\alpha$  može potaknuti ekspresiju *cREL* i nizvodnih gena u stanicama PMBCL-a, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima u DLBCL-u (160). Nijedna od korištenih modelnih staničnih linija PMBCL-a ne sadrži amplifikaciju gena *cREL* (138), što sugerira da je aktivacija puta

NF $\kappa$ B preko cREL uzrokovana tretmanom TNF- $\alpha$ , a ne endogenom promijenjenom ekspresijom cREL. Jedan od gena čiju ekspresiju cREL kontrolira je upravo i TNF- $\alpha$  (95), zbog čega se može održati visoka razina ekspresije TNF- $\alpha$  i proupalni mikrookoliš koji odgovara tumoru. Razlike u odgovoru staničnih linija na tretman mogu biti uzrokovane i heterogenošću staničnih linija, budući da prema dostupnim podacima i današnjim dijagnostičkim kriterijima jedino stanična linija MedB-1 odgovara karakteristikama PMBCL-a iako se u literaturi sve navode kao njegov model (135, 138, 139, 142, 144).

Osim regulacije razvoja limfocita B i humoralnog imunogenog odgovora, cREL bi mogao biti i indirektni posrednik u komunikaciji s limfocitima T, budući da se može vezati i na promotor gena *CXCL10* (96), čiji proteinski produkt u interakciji s receptorom CXCR3 privlači limfocite T na mjesto upale. Moguće amplifikacije gena *cREL*, koje bi potencijalno mogle doprinijeti opaženom obrascu ekspresije ovog gena u PMBCL-u bi također mogle biti odgovorne i za viši obrazac ekspresije gena *CXCL10* u uzorcima pacijenata u ovom istraživanju. Iako netumorski limfociti B mogu proizvoditi *CXCL10* u kontaktu s limfocitima T specifičnima za određeni antigen pod utjecajem IFN- $\gamma$  (162), koji je glavni induktor ekspresije *CXCL10* (98), nisu primarni izvor ovog kemokina. Međutim, viša razina ekspresije *CXCL10* u DLBCL-u u odnosu na netumorsko tkivo (163) sugerira da tumorske stanice mijenjaju obrazac ekspresije *CXCL10*, moguće kako bi dodatno potaknule stvaranje proupalnog mikrookoliša. Također, velika količina *CXCL10* u serumu pacijenata oboljelih od DLBCL-a povezana je s većom količinom upalnih prognostičkih markera (visoka razina C-reaktivnog proteina, niski broj limfocita, mala količina albumina) i lošijim preživljenjem pacijenata (115, 164). U ovom istraživanju, ekspresija *CXCL10* u staničnim linijama Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p nakon 24 sata tretmana s TNF- $\alpha$  pokazala je padajući obrazac u odnosu na netretirane stanice bez statističke značajnosti. Nakon 48 sati tretmana s TNF- $\alpha$  ekspresija *CXCL10* pokazala je rastući obrazac, koji bi mogao postati statistički značajan nakon tretmana s TNF- $\alpha$  duljeg od 48 sati, budući da je statistički značajan porast u ekspresiji *CXCL10* nakon 48 sati tretmana s TNF- $\alpha$  u odnosu na 24 sata tretmana bio uočen kod stanične linije U2940 nakon tretmana s 10 i 20 ng/mL TNF- $\alpha$ . Statistički značajan porast u ekspresiji *CXCL10* nakon 48 sati tretmana s 50 ng/mL TNF- $\alpha$  u odnosu na 24 sata tretmana bio je uočen kod stanične linije Karpas1106p, no značajan porast ekspresije *CXCL10* bio je u uočen i kod netretiranih stanica 48 sati nakon nasađivanja u odnosu na netretirane stanice 24 sata nakon nasađivanja u ovoj staničnoj liniji. Ovi rezultati upućuju na to da porast ekspresije *CXCL10* između dvije vremenske točke u staničnoj liniji Karpas1106p nije posljedica tretmana s TNF- $\alpha$ . Ekspresija *CXCL10* u staničnoj liniji HeLa nakon 48 sati tretmana pala je

u odnosu na njegovu ekspresiju nakon 24 sata neovisno o koncentraciji TNF- $\alpha$ , sugerirajući da je mehanizam regulacije ekspresije *CXCL10* na koji utječe TNF- $\alpha$  u stanicama limfoidnog porijekla drugačiji od mehanizma regulacije ekspresije tog gena u stanicama epitelnog porijekla. Ovi rezultati sugeriraju da ekspresija *CXCL10* u PMBCL-u može biti regulirana putem NF $\kappa$ B, ali efekti djelovanja TNF- $\alpha$  nisu bili vidljivi unutar 48 sati. Privremeno održavanje niske razine *CXCL10* unutar tumorske mase onemogućilo bi infiltraciju velikog broja aktiviranih limfocita T kemotaksijom preko CXCR3, receptora *CXCL10* (103), a i potencijalno spriječilo infiltraciju tumorskog tkiva stanicama NK koje ekspimiraju PD-L1 i imaju antitumorski učinak (165). Naknadni porast ekspresije *CXCL10* mogao bi biti povezan s porastom ekspresije *PD-L1* u tumorskim stanicama nakon tretmana s TNF- $\alpha$  kada bi tumorske stanice mogle inhibirati imunski odgovor infiltriranih limfocita T koji ekspimiraju PD-1. Ovi se rezultati ne slažu s rezultatima Mitsushashi i suradnika (166), koji su ustanovili da blokiranje *Pd-l1* dovodi do povišenja ekspresije *Cxcl10 in vitro*, no razlog tome mogle bi biti razlike u mehanizmu koji povezuje *CXCL10* i PD-L1 između ljudskih i mišjih stanica, zbog čega povezanost *CXCL10* i PD-L1 zahtijeva daljnja istraživanja.

U istraživanoj skupini pacijenata opažen je niži obrazac ekspresije *PD-L1* u uzorcima tumorskog tkiva u odnosu na netumorske limfocite B, bez statističke značajnosti. Ekspresija *PD-L1* povišena je u netumorskim reaktivnim tonzilama (167) i u uzorcima PMBCL-a koji sadrže amplifikaciju regije 9p24 u kojoj se nalazi *PD-L1* (9, 34). Međutim, povišena ekspresija *PD-L1* uočena je i kod uzoraka bez amplifikacije ove regije (34). Također, istraživanje Camusa i suradnika pokazalo je da je visoka ekspresija *PD-L1* i *PD-L2* u PMBCL-u povezana s lošijim preživljenjem pacijenata (168). Uzorci DLBCL-a s povišenom ekspresijom *PD-L1* imali su smanjenu ekspresiju molekula HLA (od engl. *human leukocyte antigen*) na limfocitima T i pojačanu aktivaciju puta NF- $\kappa$ B (169). Blokiranje interakcije PD-L1/PD-1 dovodi do obnavljanja imunskog odgovora limfocita T uz ekspresiju IFN- $\gamma$  u HL-u (170) i anaplastičnom velikostaničnom limfomu (ALCL, od engl. *anaplastic large cell lymphoma*) (171). U ovom istraživanju, tretman s TNF- $\alpha$  uzrokovao je značajan porast ekspresije *PD-L1* u odnosu na netretirane stanice u staničnoj liniji MedB-1, koja sadrži tri kopije gena *PD-L1* (138), tek nakon 48 sati tretmana s višim koncentracijama (10, 20 i 50 ng/mL). Povišenje ekspresije *PD-L1* u staničnim linijama U2940 nakon tretmana s 20 ng/mL TNF- $\alpha$  i Karpas1106p nakon tretmana s 10 i 20 ng/mL TNF- $\alpha$  nakon 48 sati tretmana u odnosu na 24 sata tretmana može biti i neovisno o tretmanu s TNF- $\alpha$ , budući da su i netretirane stanice imale statistički značajan porast ekspresije *PD-L1* 48 sati nakon nasađivanja u odnosu na 24 sata nakon nasađivanja. Ovo opažanje nije neočekivano kod

stanične linije Karpas1106p, budući da ova stanična linija sadrži amplifikacije regije 9p24 u kojoj se nalazi *PD-L1*, ali stanična linija U2940 sadrži mikrodeleciju ove regije, koja uključuje i *PD-L1* (138). Dai i suradnici također su detektirali ekspresiju *PD-L1* u staničnoj liniji U2940, što sugerira da delecija ne obuhvaća kompletni gen *PD-L1* (138), no upitno je može li takav djelomično deletirani protein obavljati svoju ulogu u regulaciji imunskog odgovora. Nedostatak porasta ekspresije *PD-L1* kod linije Karpas1106p u odnosu na netretirane stanice u usporedbi sa staničnom linijom MedB-1 može se potencijalno objasniti razlikom u broju kopija gena *PD-L1*, ali i razlikom u fosforiliranosti proteina JAK i STAT6 u tim staničnim linijama (172). Heterogenost modelnih staničnih linija također može biti uzrok neujednačenih promjena u ekspresiji *PD-L1*, jer jedino stanična linija MedB-1 odgovara karakteristikama PMBCL-a prema današnjim dijagnostičkim kriterijima, iako se sve četiri korištene stanične linije navode kao model za PMBCL u literaturi (138). Ovi rezultati upućuju na zaključak da TNF- $\alpha$  nema efekt na ekspresiju *PD-L1* u PMBCL-u, ali ne isključuju njegov doprinos patologiji PMBCL-a kroz druge stanične putove.

Slično kao i gen *TNF- $\alpha$* , gen *IFN- $\gamma$*  je pokazao niži obrazac ekspresije u istraživanoj skupini pacijenata kojima je dijagnosticiran PMBCL u odnosu na netumorske limfocite T, ali bez statističke značajnosti. IFN- $\gamma$  je visoko eksprimiran u netumorskim limfocitima T reaktivnih tonzila (173, 174), a promijenjeni imunski odgovor ovisan o IFN- $\gamma$  može dovesti do nastanka različitih vrsta tumora, uključujući i limfome, što je pokazano na miševima (61, 175). Kod ljudi su opisani slučajevi pojave nehodgkinskih limfoma kod pacijenata s promijenjenim imunskim odgovorom ovisnim o IFN- $\gamma$  u kombinaciji s virusnim ili gljivičnim infekcijama (176, 177). Također, limfociti B iz krvi pacijenata oboljelih od tumora dojke, melanoma i gastrointestinalnih tumora pokazuju slabiji odgovor na IFN- $\gamma$  (178), a pojedine vrste tumora mogu razviti otpornost na djelovanje IFN- $\gamma$ , što smanjuje njihovu imunogenost i olakšava izbjegavanje imunskog odgovora (175). Niži obrazac ekspresije *IFN- $\gamma$*  i *CXCR3* u istraživanoj skupini pacijenata oboljelih od PMBCL-a u odnosu na netumorske limfocite T sugerira da mali broj limfocita T koji bi proizvodili IFN- $\gamma$  i dodatno pojačavali imunski odgovor prodire u tumorsko tkivo. Uloga *CXCR3* ispitana je u velikom broju istraživanja na različitim modelima (179), a iako je primarno eksprimiran u limfocitima T, makrofagima i stanicama NK, njegova ekspresija detektirana je i u različitim vrstama T-limfoma (180). Pokazano je i da je njegova ekspresija povišena u tumorskim stanicama u različitim vrstama B-limfoma, uključujući kroničnu limfocitičnu leukemiju/limfom malih limfocita (CLL/SLL, od engl. *chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma*) (181, 114), limfom plaštene zone (MCL, od engl. *mantle cell lymphoma*) (182) i limfom

porijeklom iz limfatičnog tkiva sluznice (MALT, od engl. *mucosa-associated lymphoid tissue*) (183, 184). Istraživanja broja CXCR3-pozitivnih limfocita T u HL-u dala su neujednačene rezultate (185, 186), a istraživanje Xu-Monette i suradnika pokazalo je da je povišena ekspresija *CXCL9*, jednog od liganada CXCR3, povezana s većom infiltracijom citotoksičnih limfocita T s niskom ekspresijom PD-1 u tumorsko tkivo DLBCL-a (187). Viši obrazac ekspresije PD-1 opažen u istraživanoj skupini pacijenata oboljelih od PMBCL-a sugerira da limfociti T koji infiltriraju tkivo PMBCL-a (čiji je broj mali, što sugerira niska razina ekspresije *IFN- $\gamma$*  i *CXCR3*) ekspresiraju PD-1, koji u kontaktu s PD-L1 na tumorskim stanicama inhibira imunski odgovor, što se može povezati s rezultatima Xu-Monette i suradnika (187).

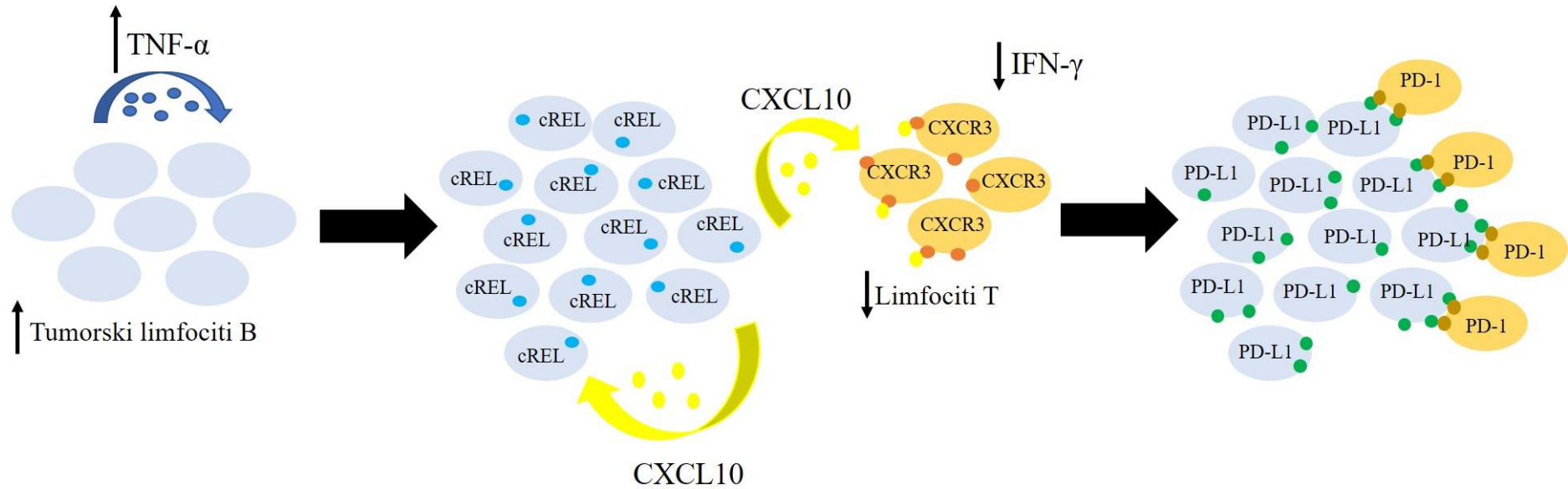
Tretman s *IFN- $\gamma$*  očekivano je uzrokovao porast ekspresije *CXCL10* u svim modelnim staničnim linijama PMBCL-a (98) tijekom kraćeg vremenskog razdoblja i u većoj mjeri nego u staničnoj liniji HeLa. Budući da je *IFN- $\gamma$*  značajno jači induktor ekspresije *CXCL10* od *TNF- $\alpha$* , moguće je da je imunski odgovor koji inducira *IFN- $\gamma$*  u PMBCL-u inhibiran kako ne bi došlo do nagle infiltracije velikog broja limfocita T u tumorsko tkivo. Iako je ekspresija *CXCL10* u svim modelnim staničnim linijama PMBCL-a ostala značajno viša i nakon 48 sati tretmana s *IFN- $\gamma$*  u odnosu na netretirane stanice, u staničnoj liniji Farage ekspresija *CXCL10* bila je značajno niža nego nakon 24 sata, a u staničnoj liniji U2940 viša, dok se u staničnim linijama MedB-1 i Karpas1106p nije statistički značajno razlikovala ovisno o duljini tretmana. Uzrok ovih razlika mogao bi biti različit broj kopija regija 9p24 između različitih staničnih linija, unutar koje se nalazi i gen *JAK2*, koji je odgovoran za poticanje ekspresije *CXCL10* (186), ali i fosforiliranost proteina JAK i STAT, koja utječe na njihovu aktivnost (172) i time na ekspresiju nizvodnih gena. U ovom istraživanju, uočena je i značajna razlika u ekspresiji *CXCL10* kod netretiranih stanica 24 i 48 sati nakon nasađivanja u obje stanične linije, koja je potencijalno uzrokovana autokrinim djelovanjem *TNF- $\alpha$*  ili pojačanim djelovanjem puta JAK/STAT zbog amplifikacije gena *JAK2* i aktivnosti proteina JAK i STAT, no ta razlika nije doprinijela razlici u ekspresiji *CXCL10* u ove dvije stanične linije nakon tretmana s *IFN- $\gamma$* . Budući da je *IFN- $\gamma$*  jak induktor ekspresije *CXCL10*, povišenje ekspresije *CXCL10* tijekom duljeg tretmana s *IFN- $\gamma$*  u staničnoj liniji U2940 nije neočekivano. S druge strane, pad ekspresije *CXCL10* u staničnoj liniji Farage nakon 48 sati tretmana s *IFN- $\gamma$*  mogao bi biti uzrokovan slabijim odgovorom na signale koji dolaze iz tumorskog mikrokoliša ili drugačijom aktivnosti proteina JAK2 i STAT u odnosu na ostale modelne stanične linije, posebno na liniju U2940, koja isto ima dva alela gena *JAK2* kao i stanična linija Farage (138). Zanimljiv je nedostatak ujednačene promjene ekspresije gena

*PD-L1* u modelnim staničnim linijama PMBCL-a u odnosu na ekspresiju *CXCL10*, budući da se ekspresija oba gena inducira putem JAK/STAT (188, 9).

Za razliku od *CXCL10*, ekspresija *PD-L1* je značajno porasla u staničnim linijama MedB-1 i Karpas1106p nakon 48 sati tretmana u odnosu na 24 sata tretmana s 30 ng/mL IFN- $\gamma$ , dok je ekspresija *PD-L1* pala u staničnoj liniji U2940 nakon 48 sati tretmana u odnosu na 24 sata tretmana s 50 ng/mL IFN- $\gamma$ . Unatoč tome što je u sve tri stanične linije opažen porast ekspresije *PD-L1* i u netretiranim stanicama nakon 48 sati u odnosu na netretirane stanice nakon 24 sata, razlika u ekspresiji *PD-L1* nakon 48 sati tretmana s IFN- $\gamma$  u odnosu na netretirane stanice u staničnoj liniji MedB-1 veća je nego razlika u ekspresiji *PD-L1* nakon 48 sati tretmana s TNF- $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice. Ovaj rezultat sugerira da je IFN- $\gamma$  potaknuo ekspresiju *PD-L1* u ovoj staničnoj liniji. Nedostatak razlike u ekspresiji *PD-L1* nakon 48 sati tretmana s TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  u staničnim linijama U2940 i Karpas1106p može također biti povezan s aberacijama *PD-L1* u tim linijama i aktivnosti puta JAK/STAT, koji utječe na ekspresiju gena *PD-L1*.

Dosadašnja istraživanja o efikasnosti različitih terapija za PMBCL nisu dala jedinstven rezultat, na što utječe niska učestalost bolesti i raznolikost korištenih terapija (189). Blokiranje interakcije PD-L1/PD-1 dosad je testirano kao moguća terapija u različitim vrstama tumora s visokom razinom ekspresije *PD-L1*, uključujući i PMBCL, s različitom razinom efikasnosti (189-191). Neujednačnost odgovora pacijenata na terapiju još uvijek nije razjašnjena, ali sugerira da razlika u tumorskom mikrokolišu u različitim tumorima utječe na efikasnost terapije. Prema rezultatima ovog istraživanja, predloženi mehanizam komunikacije tumorskih stanica i stanica tumorskog mikrokoliša u PMBCL-u (Slika 22) sugerira da dugotrajna izloženost tumorskih stanica autokrinom ili parakrinom djelovanju TNF- $\alpha$  povisuje ekspresiju *cREL*, što bi za posljedicu moglo imati povećanje ekspresije nizvodnih gena, od kojih je jedan *CXCL10*. Smanjena količina IFN- $\gamma$ , koji bi jače inducirao ekspresiju *CXCL10* u kraćem vremenskom periodu, je moguće usmjerena protiv nagle infiltracije velikog broja limfocita T i drugih stanica imunskog sustava koji eksprimiraju receptor CXCR3. One stanice koje su kemotaksijom preko *CXCL10* privučene u zonu tumora dolaze u kontakt s tumorskim stanicama s visokom ekspresijom PD-L1, čime se utišava efikasan odgovor protiv tumora. Ovaj mehanizam trebalo bi istražiti dodatnim analizama na većem broju uzoraka pacijenata i potencijalno primarnim tumorskim kulturama.





Slika 22. Predloženi mehanizam komunikacije tumorskih stanica i stanica tumorskog mikrookoliša u PMBCL-u. Autokrino i parakrino djelovanje TNF- $\alpha$  potiče ekspresiju transkripcijskog faktora cREL koji aktivira ekspresiju nizvodnih gena, uključujući i *CXCL10*. Mali broj infiltrirajućih limfocita T koji je kemotaksijom doveden u zonu tumorskih stanica prelazi u stanje anergije nakon interakcije PD-L1 na tumorskim stanicama s PD-1 na limfocitima T, čime se inhibira imunosni odgovor.

## 6. Zaključak

Analiza ekspresije gena *TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , *cREL*, *CXCL10*, *CXCR3*, *PD-L1* i *PD-1* u uzorcima pacijenata oboljelih od PMBCL-a nije pokazala statistički značajnu razliku u odnosu na netumorske limfocite B i T, moguće zbog malog broja uzoraka i velikih devijacija u rezultatima ekspresije.

Netretirane modelne stanične linije PMBCL-a Farage, U2940, MedB-1 i Karpas1106p imale su značajno višu ekspresiju *TNF- $\alpha$*  u odnosu na staničnu liniju epitelnog porijekla HeLa, što sugerira da *TNF- $\alpha$*  autokrino djeluje na modelne stanične linije PMBCL-a i inducira ekspresiju nizvodnih gena.

Ekspresija transkripcijskog faktora *cREL* bila je značajno niža nakon 24 sati tretmana s *TNF- $\alpha$*  i rasla je nakon 48 sati tretmana s *TNF- $\alpha$* .

*IFN- $\gamma$*  je značajno inducirao ekspresiju *CXCL10* u stanicama PMBCL-a već nakon 24 sata tretmana, dok ekspresija *CXCL10* nije bila značajno promijenjena ni nakon 48 sati tretmana s *TNF- $\alpha$* .

Tretmani *TNF- $\alpha$*  i *IFN- $\gamma$*  uzrokovali su različite promjene u ekspresiji *PD-L1* u PMBCL-u, što sugerira da ekspresija *PD-L1* ovisi i o drugim faktorima, a ne samo o izvanjskim signalima.

## 7. Popis literature

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J (2017) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th ed. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon
2. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, Chan WC, Zhao T, Haioun C, Greiner TC, Weisenburger DD, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Campo E, Montserrat E, Lopez-Guillermo A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Connors JM, Braziel R, Grogan TM, Fisher RI, Miller TP, LeBlanc M, Chiorazzi M, Zhao H, Yang L, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Staudt LM (2003). Molecular Diagnosis of Primary Mediastinal B Cell Lymphoma Identifies a Clinically Favorable Subgroup of Diffuse Large B Cell Lymphoma Related to Hodgkin Lymphoma. *J Exp Med* 198: 851-862. doi: 10.1084/jem.2003107.
3. Savage KJ, Monti S, Kutok JL, Cattoretti G, Neuberg D, De Leval L, Kurtin P, Dal Cin P, Ladd C, Feuerhake F, Aguiar RC, Li S, Salles G, Berger F, Jing W, Pinkus GS, Habermann T, Dalla-Favera R, Harris NL, Aster JC, Golub TR, Shipp MA (2003) The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 102: 3871-3879. doi:10.1182/blood-2003-06-1841.
4. Sasaki Y, Iwai, K (2016) Roles of the NF- $\kappa$ B pathway in B-lymphocyte biology. *Curr Top Microbiol Immunol* 393: 177-209. doi: 10.1007/82\_2015\_479.
5. Hinz M, Löser P, Mathas S, Krappmann D, Dörken B, Scheidereit C (2001) Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 97: 2798-2807. doi: 10.1182/blood.v97.9.279.
6. Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, Burek C, Ott G, Puig X, Yang L, Lopez-Guillermo A, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Gascoyne RD, Connors JM, Grogan TM, Braziel R, Fisher RI, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Simon R, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Montserrat E, Muller-Hermelink HK, Staudt LM, Campo E, Rosenwald A (2005). Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 106: 3183-3190. doi: 10.1182/blood-2005-04-1399.

7. Ohmori Y, Wyner L, Narumi S, Armstrong D, Stoler M, Hamilton TA (1993) Tumor necrosis factor-alpha induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines in vivo. *Am J Pathol* 142: 861-870.
8. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26: 677-704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
9. Green MR, Monti S, Rodig SJ, Juszczynski P, Currie T, O'Donnell E, Chapuy B, Takeyama K, Neuberg D, Golub TR, Kutok JL, Shipp MA (2010) Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 116: 3268-3277. doi: 10.1182/blood-2010-05-282780.
10. Zhang C, Li Z, Xu L, Che X, Wen T, Fan Y, Li C, Wang S, Cheng, Y, Wang X, Qu X, Liu Y (2018). CXCL9/10/11, a regulator of PD-L1 expression in gastric cancer. *BMC Cancer* 18: 462. doi: 10.1186/s12885-018-4384-8.
11. Garcia-Diaz A, Sanghoon Shin D, Homet Moreno B, Saco J, Escuin-Ordinas H, Abril Rodriguez G, Zaretsky JM, Sun L, Hugo W, Wang X, Parisi G, Puig Saus C, Torrejon DY, Graeber TG, Comin-Anduix B, Hu-Lieskovan S, Damoiseaux R, Lo RS, Ribas A (2017) Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep* 19: 1189-1201. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.031.
12. Wang Y, Wu L, Tian C, Zhang Y (2018). PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in malignant lymphomas. *Ann Hematol* 97: 229-237. doi: 10.1007/s00277-017-3176-6
13. Vari F, Arpon D, Keane C, Hertzberg MS, Talaulikar D, Jain S, Cui Q, Han E, Tobin J, Bird R, Cross D, Hernandez A, Gould C, Birch S, Gandhi MK (2018) Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL. *Blood* 131: 1809-1819. doi: 10.1182/blood-2017-07-796342.
14. Nicholas NS, Apollonio B, Ramsay AG (2016) Tumor microenvironment (TME)-driven immune suppression in B cell malignancy. *Biochim Biophys Acta* 1863: 471-482. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.1003.
15. Cooper GM (2000) *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sinauer Associates. Sunderland (MA) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
16. Anderson NM, Simon MC (2020) The Tumor Microenvironment. *Curr Biol* 30: R921-R925. doi: 10.1016/j.cub.2020.06.081.

17. Isaacson PG, Norton AJ, Addis BJ (1987) The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. *Lancet* 2: 1488-1491. doi: 10.1016/s0140-6736(87)92622-5.
18. Zinzani PL, Martelli M, Bertini M, Gianni AM, Devizzi L, Federico M, Pangalis G, Michels J, Zucca E, Cantonetti M, Cortelazzo S, Wotherspoon A, Ferreri AJ, Zaja F, Lauria F, De Renzo A, Liberati MA, Falini B, Balzarotti M, Calderoni A, Zaccaria A, Gentilini P, Fattori PP, Pavone E, Angelopoulou MK, Alinari L, Brugiattelli M, Di Renzo N, Bonifazi F, Pileri SA, Cavalli F (2002). Induction chemotherapy strategies for primary mediastinal large B-cell lymphoma with sclerosis: a retrospective multinational study on 426 previously untreated patients. *Haematologica* 87: 1258-1264.
19. Pileri SA, Gaidano G, Zinzani PL, Falini B, Gaulard P, Zucca E, Pieri F, Berra E, Sabattini E, Ascani S, Piccioli M, Johnson, PWM, Giardini R, Pescarmona E, Novero D, Piccaluga PP, Marafioti T, Alonso MA, Cavalli F (2003) Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma. High Frequency of BCL-6 Mutations and Consistent Expression of the Transcription Factors OCT-2, BOB.1, and PU.1 in the Absence of Immunoglobulins. *Am J Pathol* 162: 243-253. doi: 10.1016/s0002-9440(10)63815-1.
20. Schmitz R, Hansmann ML, Bohle V, Martin-Subero JI, Hartmann S, Mechtersheimer G, Klapper W, Vater I, Giefing M, Gesk S, Stanelle J, Siebert R, Küppers R (2009) TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med* 206: 981-989. doi: 10.1084/jem.20090528.
21. Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, Rui L, Kawahara M, Farinha P, Johnson NA, Zhao Y, Telenius A, Ben Neriah S, McPherson A, Meissner B, Okoye UC, Diepstra A, van den Berg A, Sun M, Leung G, Jones SJ, Connors JM, Huntsman DG, Savage KJ, Rimsza LM, Horsman DE, Staudt LM, Steidl U, Marra MA, Gascoyne RD (2011) MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature*, 471: 377-381. doi: 10.1038/nature09754.
22. Silacci P, Mottet A, Steimle V, Reith W, Mach B (1994) Developmental extinction of major histocompatibility complex class II gene expression in plasmocytes is mediated by silencing of the transactivator gene CIITA. *J Exp Med* 180: 1329-1336. doi: 10.1084/jem.180.4.1329.
23. Panjwani PK, Charu V, DeLisser M, Molina-Kirsch H, Natkunam Y, Zhao S (2018) Programmed death-1 ligands PD-L1 and PD-L2 show distinctive and restricted

- patterns of expression in lymphoma subtypes. *Hum Pathol* 71: 91-99. doi: 10.1016/j.humpath.2017.10.029.
24. Tanaka Y, Miyagi Maeshima A, Nomoto J, Makita S, Fukuhara S, Munakata W, Maruyama D, Tobinai K, Kobayashi Y (2018) Expression pattern of PD-L1 and PD-L2 in classical Hodgkin lymphoma, primary mediastinal large B-cell lymphoma, and gray zone lymphoma. *Eur J Haematol* 100: 511-517. doi: 10.1111/ejh.13033.
  25. Zhou H, Xu-Monette ZY, Xiao L, Strati P, Hagemester FB, He Y, Chen H, Li Y, Manyam GC, Li Y, Montes-Moreno S, Piris MA, Young KH (2020) Prognostic factors, therapeutic approaches, and distinct immunobiologic features in patients with primary mediastinal large B-cell lymphoma on long-term follow-up. *Blood Cancer J* 10: 49. doi: 10.1038/s41408-020-0312-7.
  26. Alfano M, Locatelli I, D'Arrigo C, Mora M, Vozzi G, De Acutis A, Pece R, Tavella S, Costa D, Poggi A, Zocchi MR (2022) Lysyl-Oxidase Dependent Extracellular Matrix Stiffness in Hodgkin Lymphomas: Mechanical and Topographical Evidence. *Cancers (Basel)* 14: 259. doi: 10.3390/cancers14010259.
  27. Song J, Lokmic Z, Lämmermann T, Rolf J, Wu C, Zhang X, Hallmann R, Hannocks MJ, Horn N, Ruegg MA, Sonnenberg A, Georges-Labouesse E, Winkler TH, Kearney JF, Cardell S, Sorokin L (2013) Extracellular matrix of secondary lymphoid organs impacts on B-cell fate and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E2915-E2924. doi: 10.1073/pnas.1218131110.
  28. Gloger M, Menzel L, Grau M, Vion AC, Anagnostopoulos I, Zapukhlyak M, Gerlach K, Kammertöns T, Hehlhans T, Zschummel M, Lenz G, Gerhardt H, Höpken UE, Rehm A (2020) Lymphoma Angiogenesis Is Orchestrated by Noncanonical Signaling Pathways. *Cancer Res* 80: 1316-1329. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1493.
  29. Hindley JP, Jones E, Smart K, Bridgeman H, Lauder SN, Ondondo B, Cutting S, Ladell K, Wynn KK, Withers D, Price DA, Ager A, Godkin AJ, Gallimore AM (2012) T Cell Trafficking Facilitated by High Endothelial Venules is Required for Tumor Control after Regulatory T Cell Depletion. *Cancer Res* 72: 5473-5482. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1912.
  30. Lin H, Sun XF, Zhen ZJ, Xia Y, Ling YJ, Huang HQ, Xia ZJ, Lin TY (2009) Correlation between peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> regulatory T cell and clinical characteristics of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Ai Zheng* 28: 1186-1192. doi: 10.5732/cjc.009.10180.

31. Mittal S, Marshall NA, Duncan L, Culligan DJ, Barker RN, Vickers MA (2008) Local and systemic induction of CD4+CD25+ regulatory T-cell population by non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 111: 5359-5370. doi: 10.1182/blood-2007-08-105395.
32. Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM (2006) Attenuation of CD8+ T-Cell Function by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Res* 66: 10145-10152. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1822.
33. Chong LC, Twa DDW, Mottok A, Ben-Neriah S, Woolcock BW, Zhao Y, Savage KJ, Marra MA, Scott DW, Gascoyne RD, Morin RD, Mungall AJ, Steidl C (2016) Comprehensive characterization of programmed death ligand structural rearrangements in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 128: 1206-1213. doi: 10.1182/blood-2015-11-683003.
34. Twa DD, Chan FC, Ben-Neriah S, Woolcock BW, Mottok A, Tan KL, Slack GW, Gunawardana J, Lim RS, McPherson AW, Kridel R, Telenius A, Scott DW, Savage KJ, Shah SP, Gascoyne RD, Steidl C (2014) Genomic rearrangements involving programmed death ligands are recurrent in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 123: 2062-2065. doi: 10.1182/blood-2013-10-535443.
35. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72: 3666-3670. doi: 10.1073/pnas.72.9.3666.
36. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Krönke M, Mak TW (1993) Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73: 457-467. doi: 10.1016/0092-8674(93)90134-c.
37. Matthes T, Werner-Favre C, Tang H, Zhang X, Kindler V, Zubler RH (1993) Cytokine mRNA expression during an in vitro response of human B lymphocytes: kinetics of B cell tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL)6, IL-10, and transforming growth factor beta 1 mRNAs. *J Exp Med* 178: 521-528. doi: 10.1084/jem.178.2.521
38. Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino, Jr MA, Goeddel DV (1991) The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 88: 9292-9296. doi: 10.1073/pnas.88.20.9292
39. Dembic Z, Loetscher H, Gubler U, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Lesslauer W (1990) Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct

- intracellular, domain sequences. *Cytokine* 2: 231-237. doi: 10.1016/1043-4666(90)90022-1.
40. Loetscher H, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, Lesslauer W (1990) Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61: 351-359. doi: 10.1016/0092-8674(90)90815-v.
41. Armitage RJ (1994) Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* 6: 407-413. doi: 10.1016/0952-7915(94)90119-8.
42. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74, 845-853. doi: 10.1016/0092-8674(93)90464-2.
43. Micheau O, Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114: 181-190. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00521-x.
44. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45-65. doi: 10.1038/sj.cdd.4401189.
45. Xie P (2013) TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. *J Mol Signal* 8: 7. doi: 10.1186/1750-2187-8-7.
46. Luettig B, Decker T, Lohmann-Matthes ML (1989) Evidence for the existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: an integral protein and a molecule attached to its receptor. *J Immunol* 143: 4034-4038.
47. Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, Warner J, Willard D, Becherer JD (1997) Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385: 733-736. doi:10.1038/385733a0.
48. Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83: 793-802. doi: 10.1016/0092-8674(95)90192-2.
49. Ham B, Fernandez MC, D'Costa Z, Brodt P (2016) The diverse roles of the TNF axis in cancer progression and metastasis. *Trends Cancer Res* 11: 1-27.



50. Laha D, Grant R, Mishra P, Nilubol N (2021) The Role of Tumor Necrosis Factor in Manipulating the Immunological Response of Tumor Microenvironment. *Front Immunol* 12: 656908. doi: 10.3389/fimmu.2021.656908.
51. Jang D, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, Lee SR, Yang SH (2021) The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) in Autoimmune Disease and Current TNF- $\alpha$  Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci* 22: 2719. doi: 10.3390/ijms22052719.
52. Calip GS, Patel PR, Adimadhyam S, Xing S, Wu Z, Sweiss K, Schumock GT, Lee TA, Chiu BCH (2018) Tumor necrosis factor-alpha inhibitors and risk of non-Hodgkin lymphoma in a cohort of adults with rheumatologic conditions. *Int J Cancer* 143: 1062-1071. doi: 10.1002/ijc.31407.
53. Dahmus J, Rosario M, Clarke K (2020) Risk of Lymphoma Associated with Anti-TNF Therapy in Patients with Inflammatory Bowel Disease: Implications for Therapy. *Clin Exp Gastroenterol* 13: 339-350. doi: 10.2147/CEG.S237646.
54. Kettelhut IC, Fiers W, Goldberg AL (1987) The toxic effects of tumor necrosis factor in vivo and their prevention by cyclooxygenase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 4273-4277. doi: 10.1073/pnas.84.12.4273
55. Roberts NJ, Zhou S, Diaz, Jr. LA, Holdhoff M (2011) Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent. *Oncotarget* 2: 739-751. doi: 10.18632/oncotarget.344
56. Pasparakis M, Alexopoulou L, Grell M, Pfizenmaier K, Bluethmann H, Kollias G (1997) Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6319-6323. doi: 10.1073/pnas.94.12.6319.
57. Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q, Bertoni F, Ponzoni M, Scandurra M, Califano A, Bhagat G, Chadburn A, Dalla-Favera R, Pasqualucci L (2009) Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 459: 717-721. doi: 10.1038/nature07968.
58. Calado DP, Zhang B, Srinivasan L, Sasaki Y, Seagal J, Unitt C, Rodig S, Kutok J, Tarakhovsky A, Schmidt-Supprian M, Rajewsky K (2010) Constitutive canonical NF-kappaB activation cooperates with disruption of BLIMP1 in the pathogenesis of activated B cell-like diffuse large cell lymphoma. *Cancer Cell* 18: 580-589. doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.024.

59. Honma K, Tsuzuki S, Nakagawa M, Tagawa H, Nakamura S, Morishima Y, Seto M (2009) TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 114: 2467-2475. doi: 10.1182/blood-2008-12-194852.
60. Hailfinger S, Nogai H, Pelzer C, Jaworski M, Cabalzar K, Charton JE, Guzzardi M, Decaillet C, Grau M, Dorken B, Lenz P, Lenz G, Thome M (2011) Malt1-dependent RelB cleavage promotes canonical NF-kappaB activation in lymphocytes and lymphoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14596-14601. doi: 10.1073/pnas.1105020108
61. Street SEA, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ (2002) Suppression of Lymphoma and Epithelial Malignancies Effected by Interferon  $\gamma$ . *J Exp Med* 196: 129-134. doi: 10.1084/jem.20020063
62. Wheelock EF (1965) Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by Phytohemagglutinin. *Science* 149: 310-311. doi: 10.1126/science.149.3681.310.
63. Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S, Nakanishi K (1998) IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 161: 3400-3407.
64. Gołab J, Zagózdzon R, Stokłosal T, Kamiński R, Kozar K, Jakóbiśiak M (2000) Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18--a bridge too far? *Immunol Lett* 72: 153-157. doi: 10.1016/s0165-2478(00)00178-4.
65. Kotenko SV, Izotova LS, Pollack BP, Mariano TM, Donnelly RJ, Muthukumaran G, Cook JR, Garotta G, Silvennoinen O, Ihle JN, Pestka S (1995) Interaction between the components of the interferon gamma receptor complex. *J Biol Chem* 270: 20915-20921. doi: 10.1074/jbc.270.36.20915.
66. de Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, Silverman RH, Williams BR (2001) Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* 69: 912-920.
67. Majoros A, Platanitis E, Kernbauer-Holzl E, Rosebrock F, Muller M, Decker T (2017) Canonical and non-canonical aspects of JAK-STAT signaling: lessons from interferons for cytokine responses. *Front Immunol* 8: 29. doi:10.3389/fimmu.2017.00029.
68. Shirayoshi Y, Burke PA, Appella E, Ozato K (1988) Interferon-induced transcription of a major histocompatibility class I gene accompanies binding of inducible nuclear

- factors to the interferon consensus sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5884-5888. doi:10.1073/pnas.85.16.5884
69. Amaldi I, Reith W, Berte C, Mach B (1989) Induction of HLA class II genes by IFN-gamma is transcriptional and requires a trans-acting protein. *J Immunol* 142: 999-1004.
70. Maraskovsky E, Chen WF, Shortman K (1989) IL-2 and IFN-gamma are two necessary lymphokines in the development of cytolytic T cells. *J Immunol* 143: 1210-1214.
71. Schulz EG, Mariani L, Radbruch A, Hofer T (2009) Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12. *Immunity* 30: 673-683. doi:10.1016/j.immuni.2009.03.013
72. Briesemeister D, Sommermeyer D, Loddenkemper C, Loew R, Uckert W, Blankenstein T, Kammertoens T (2011) Tumor rejection by local interferon gamma induction in established tumors is associated with blood vessel destruction and necrosis. *Int J Cancer* 128: 371-378. doi:10.1002/ijc.25350
73. Thom AK, Fraker DL, Taubenberger JK, Norton JA (1992) Effective regional therapy of experimental cancer with perilesional administration of tumour necrosis factor-alpha + interferon-gamma. *Surg Oncol* 1: 291-298. doi:10.1016/0960-7404(92)90090-8
74. Cantell K, Hirvonen S, Pyhala L, De Reus A, Schellekens H (1983) Circulating interferon in rabbits and monkeys after administration of human gamma interferon by different routes. *J Gen Virol* 64: 1823-1826. doi:10.1099/0022-1317-64-8-1823
75. Windbichler GH, Hausmaninger H, Stummvoll W, Graf AH, Kainz C, Lahodny J, Denison U, Müller-Holzner E, Marth C (2000) Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial. *Br J Cancer* 82: 1138-1144. doi: 10.1054/bjoc.1999.1053.
76. Alberts DS, Marth C, Alvarez RD, Johnson G, Bidzinski M, Kardatzke DR, Bradford WZ, Loutit J, Kirn DH, Clouser MC, Markman M, GRACES Clinical Trial Consortium (2008) Randomized phase 3 trial of interferon gamma-1b plus standard carboplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel alone for first-line treatment of advanced ovarian and primary peritoneal carcinomas: Results from a prospectively designed analysis of progression-free survival. *Gynecol Oncol* 109: 174-181. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.01.005.

77. Tamura K, Makino S, Araki Y, Imamura T, Seita M (2006) Recombinant interferon beta and gamma in the treatment of adult T-cell leukemia. *Cancer* 99: 1059-1062. doi: 10.1002/1097-0142(19870315)99:6<1059::aid-cncr2820590602>3.0.co;2-m.
78. Giannopoulos A, Constantinides C, Fokaeas E, Stravodimos C, Giannopoulou M, Kyroudi A, Gounaris A (2003) The immunomodulating effect of interferon-gamma intravesical instillations in preventing bladder cancer recurrence. *Clin Cancer Res* 9: 5550-5558.
79. Xue X, Huang W, Qiu T, Guo L, Ying J, Ning L (2020) DLBCL with amplification of JAK2/PD-L2 exhibits PMBCL-like CNA pattern and worse clinical outcome resembling those with MYD88 L265P mutation. *BMC Cancer* 20: 816. doi: 10.1186/s12885-020-07293-3.
80. Viganò E, Gunawardana J, Mottok A, Van Tol T, Mak K, Chan FC, Chong L, Chavez E, Woolcock B, Takata K, Twa D, Shulha HP, Telenius A, Kutovaya O, Hung SS, Healy S, Ben-Neriah S, Leroy K, Gaulard P, Diepstra A, Kridel R, Savage KJ, Rimsza L, Gascoyne R, Steidl C (2018) Somatic IL4R mutations in primary mediastinal large B-cell lymphoma lead to constitutive JAK-STAT signaling activation. *Blood* 131: 2036-2046. doi: 10.1182/blood-2017-09-808907.
81. Salim T, Serksen CL, May EE (2016) Investigating the Role of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  Activation on the Dynamics of iNOS Gene Expression in LPS Stimulated Macrophages. *PLoS One* 11: e0153289. doi: 10.1371/journal.pone.0153289
82. Benci JL, Johnson LR, Choa R, Xu Y, Qiu J, Zhou Z, Xu B, Ye D, Nathanson KL, June CH, Wherry EJ, Zhang NR, Ishwaran H, Hellmann MD, Wolchok JD, Kambayashi T, Minn AJ (2019) Opposing Functions of Interferon Coordinate Adaptive and Innate Immune Responses to Cancer Immune Checkpoint Blockade. *Cell* 178: 933-948.e14. doi: 10.1016/j.cell.2019.07.019
83. Kobelt D, Zhang C, Clayton-Lucey IA, Glaubien R, Voss C, Siegmund B, Stein U (2020) Pro-inflammatory TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  Promote Tumor Growth and Metastasis via Induction of MACC1. *Front Immunol* 11: 980. doi: 10.3389/fimmu.2020.00980
84. Carrasco D, Weih F, Bravo R (1994) Developmental expression of the mouse c-rel proto-oncogene in hematopoietic organs. *Development* 120: 2991-3004. doi: 10.1242/dev.120.10.2991.
85. Tumang JR, Owyang A, Andjelic S, Jin Z, Hardy RR, Liou ML, Liou HC (1998) c-Rel is essential for B lymphocyte survival and cell cycle progression. *Eur J Immunol*

- 28: 4299-4312. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199812)28:12<4299::AID-IMMU4299>3.0.CO;2-Y.
86. Heise N, De Silva NS, Silva K, Carette A, Simonetti G, Pasparakis M, Klein U (2014) Germinal center B cell maintenance and differentiation are controlled by distinct NF- $\kappa$ B transcription factor subunits. *J Exp Med* 211: 2103-2118. doi: 10.1084/jem.20132613.
87. Harling-McNabb L, Deliyannis G, Jackson DC, Gerondakis S, Grigoriadis G, Brown LE (1999) Mice lacking the transcription factor subunit Rel can clear an influenza infection and have functional anti-viral cytotoxic T cells but do not develop an optimal antibody response. *Int Immunol* 11: 1431-1439. doi: 10.1093/intimm/11.9.1431.
88. Gilmore TD, Cormier C, Jean-Jacques J, Gapuzan ME (2001) Malignant transformation of primary chicken spleen cells by human transcription factor c-Rel. *Oncogene* 20: 7098-7103. doi: 10.1038/sj.onc.1204898.
89. Kober-Hasslacher M, Schmidt-Supprian M (2019) The Unsolved Puzzle of c-Rel in B Cell Lymphoma. *Cancers (Basel)* 11: 941. doi: 10.3390/cancers11070941.
90. Feuerhake F, Kutok JL, Monti S, Chen W, LaCasce AS, Cattoretti G, Kurtin P, Pinkus GS, de Leval L, Harris NL, Savage KJ, Neuberg D, Habermann TM, Dalla-Favera R, Golub TR, Aster JC and Shipp MA (2005) NF $\kappa$ B activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood* 106: 1392-1399. doi: 10.1182/blood-2004-12-4901
91. Chen FE, Ghosh G (1999) Regulation of DNA binding by Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors: structural views. *Oncogene* 18: 6845-6852. doi: 10.1038/sj.onc.1203224.
92. Saccani S, Pantano S, Natoli G (2003) Modulation of NF- $\kappa$ B activity by exchange of dimers. *Mol Cell* 11: 1563-1574. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00227-2.
93. Perkins ND, Gilmore TD (2006) Good cop, bad cop: The different faces of NF- $\kappa$ B. *Cell Death Differ* 13: 759-772. doi: 10.1038/sj.cdd.4401838.
94. Gilmore TD, Gerondakis S (2011) The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease. *Genes Cancer* 2: 695-711. doi: 10.1177/1947601911421925
95. Bunting K, Rao S, Hardy K, Woltring D, Denyer GS, Wang J, Gerondakis S, Frances Shannon M (2007) Genome-wide analysis of gene expression in T cells to identify targets of the NF- $\kappa$ B transcription factor c-Rel. *J Immunol* 178: 7097-7109. doi: 10.4049/jimmunol.178.11.7097.

96. Wei L, Fan M, Xu L, Heinrich K, Berry MW, Homayouni R, Pfeffer LM (2008) Bioinformatic Analysis Reveals cRel as a Regulator of a Subset of Interferon-Stimulated Genes. *J Interferon Cytokine Res* 28: 541-551. doi: 10.1089/jir.2007.0136
97. Hardaker EL, Bacon AM, Carlson K, Roshak AK, Foley JJ, Schmidt DB, Buckley PT, Comegys M, Panettieri Jr RA, Sarau HM, Belmonte KE (2004) Regulation of TNF-alpha- and IFN-gamma-induced CXCL10 expression: participation of the airway smooth muscle in the pulmonary inflammatory response in chronic obstructive pulmonary disease. *FASEB J* 18:191-193. doi: 10.1096/fj.03-0170fje.
98. Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV (1985) Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 315: 672-676. doi: 10.1038/315672a0.
99. Spurrell JCL, Wiehler S, Zaheer RS, Sanders SP, Proud D (2005) Human airway epithelial cells produce IP-10 (CXCL10) in vitro and in vivo upon rhinovirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L85-L95. doi: 10.1152/ajplung.00397.2004.
100. Pellegrino A, Antonaci F, Russo F, Merchionne F, Ribatti D, Vacca A, Dammacco F (2004) CXCR3-binding chemokines in multiple myeloma. *Cancer Lett* 207: 221-227. doi: 10.1016/j.canlet.2003.10.036.
101. Luster AD, Ravetch JV (1987) Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10) *J Exp Med* 166: 1084-1097. doi: 10.1084/jem.166.4.1084.
102. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD (2002) IFN- $\gamma$ -Inducible Protein 10 (IP-10; CXCL10)-Deficient Mice Reveal a Role for IP-10 in Effector T Cell Generation and Trafficking. *J Immunol* 168, 3195-3204. doi: 10.4049/jimmunol.168.7.3195.
103. Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B (1996) Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 184: 963-969. doi: 10.1084/jem.184.3.963.
104. Pandey V, Fleming-Martinez A, Bastea L, Doeppler HR, Eisenhauer J, Le T, Edenfield B, Storz P (2021) CXCL10/CXCR3 signaling contributes to an inflammatory microenvironment and its blockade enhances progression of murine pancreatic precancerous lesions. *eLife* 10: e60646. doi: 10.7554/eLife.60646.

105. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F (2004) Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- $\gamma$  for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5: 1260-1265. doi: 10.1038/ni1138.
106. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A (1998) Flexible Programs of Chemokine Receptor Expression on Human Polarized T Helper 1 and 2 Lymphocytes. *J Exp Med* 187: 875-883. doi: 10.1084/jem.187.6.875.
107. Kim CH, Rott L, Kunkel EJ, Genovese MC, Andrew DP, Wu L, Butcher EC (2001) Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest* 108: 1331-1339. doi: 10.1172/JCI13543.
108. Xie JH, Nomura N, Lu M, Chen SL, Koch GE, Weng Y, Rosa R, Di Salvo J, Mudgett J, Peterson LB, Wicker LS, DeMartino JA (2003) Antibody-mediated blockade of the CXCR3 chemokine receptor results in diminished recruitment of T helper 1 cells into sites of inflammation. *J Leukoc Biol* 73: 771-780. doi: 10.1189/jlb.1102573.
109. Pertl U, Luster AD, Varki NM, Homann D, Gaedicke G, Reisfeld RA, Lode HN (2001) IFN-gamma-inducible protein-10 is essential for the generation of a protective tumor-specific CD8 T cell response induced by single-chain IL-12 gene therapy. *J Immunol* 166: 6944-6951. doi: 10.4049/jimmunol.166.11.6944.
110. Angiolillo A, Sgadari C, Taub D, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G (1995) Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 182: 155-62. doi: 10.1084/jem.182.1.155.
111. Lo BK, Yu M, Zloty D, Cowan B, Shapiro J, McElwee KJ (2010) CXCR3/ligands are significantly involved in the tumorigenesis of basal cell carcinomas. *Am J Pathol* 176: 2435-2446. doi: 10.2353/ajpath.2010.081059.
112. Datta D, Flaxenburg JA, Laxmanan S, Geehan C, Grimm M, Waaga-Gasser AM, Briscoe DM, Pal S (2006) Ras-induced modulation of CXCL10 and its receptor splice variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 cells: relevance for the development of human breast cancer. *Cancer Res* 66: 9509-9518. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4345.
113. Maru SV, Holloway KA, Flynn G, Lancashire CL, Loughlin AJ, Male DK, Romero IA (2008) Chemokine production and chemokine receptor expression by human glioma cells: role of CXCL10 in tumour cell proliferation. *J Neuroimmunol* 199: 35-45. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.04.029.

114. Jones D, Benjamin RJ, Shahsafaei A, Dorfman DM (2000) The chemokine receptor CXCR3 is expressed in a subset of B-cell lymphomas and is a marker of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 95:627-632. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.04.029.
115. Hong JY, Ryu KJ, Lee JY, Park C, Ko YH, Kim WS, Kim SJ (2017) Serum level of CXCL10 is associated with inflammatory prognostic biomarkers in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* 35:480-486. doi: 10.1002/hon.2374.
116. Teichmann M, Meyer B, Beck A, Niedobitek G (2005) Expression of the interferon-inducible chemokine IP-10 (CXCL10), a chemokine with proposed anti-neoplastic functions, in Hodgkin lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol* 206: 68-75. doi: 10.1002/path.1745.
117. Chen X, He H, Xiao Y, Hasim A, Yuan J, Ye M, Li X, Hao Y, Guo X (2021) CXCL10 Produced by HPV-Positive Cervical Cancer Cells Stimulates Exosomal PDL1 Expression by Fibroblasts via CXCR3 and JAK-STAT Pathways. *Front Oncol* 11: 629350. doi: 10.3389/fonc.2021.629350.
118. Wang X, Yang L, Huang F, Zhang Q, Liu S, Ma L, You Z (2017) Inflammatory cytokines IL-17 and TNF- $\alpha$  up-regulate PD-L1 expression in human prostate and colon cancer cells. *Immunol Lett* 184: 7-14. doi: 10.1016/j.imlet.2017.02.006.
119. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T (1992) Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 11: 3887-3895. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x.
120. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T (1996) Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8: 765-772. doi: 10.1093/intimm/8.5.765.
121. Iwai Y, Okazaki T, Nishimura H, Kawasaki A, Yagita H, Honjo T (2002) Microanatomical localization of PD-1 in human tonsils. *Immunol Lett* 83: 215-220. doi: 10.1016/S0165-2478(02)00088-3.
122. Bally APR, Austin JW, Boss JM (2016) Genetic and epigenetic regulation of PD-1 expression. *J Immunol* 196: 2431-2437. doi: 10.4049/jimmunol.1502643
123. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T (1999) Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11:141-151. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80089-8.
124. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, Sasayama S, Mizoguchi A, Hiai H, Minato N, Honjo T (2001) Autoimmune dilated



- cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291: 319-322. doi: 10.1126/science.291.5502.319.
125. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T (2000) Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med* 192: 1027-1034. doi: 10.1084/jem.192.7.1027.
126. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ (2001) PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2: 261-268. doi: 10.1038/85330.
127. Ishida M, Iwai Y, Tanaka Y, Okazaki T, Freeman GJ, Minato N, Honjo T (2002) Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett* 84: 57-62. doi: 10.1016/S0165-2478(02)00142-6.
128. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, Shin T, Tsuchiya H, Pardoll DM, Okumura K, Azuma M, Yagita H (2002) Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* 169: 5538-5545. doi: 10.4049/jimmunol.169.10.5538.
129. Eppihimer MJ, Gunn J, Freeman GJ, Greenfield EA, Chernova T, Erickson J, Leonard JP (2002) Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation* 9: 133-145. doi: 10.1080/713774061.
130. Han Y, Liu D, Li L (2020) PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* 10: 727-742.
131. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, Rosenberg SA (2009) Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114:1537-1544. doi: 10.1182/blood-2008-12-195792.
132. Salmaninejad A, Khoramshahi V, Azani A, Soltaninejad E, Aslani S, Zamani MR, Zal M, Nesaei A, Hosseini SM (2018) PD-1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms. *Immunogenetics* 70: 73-86. doi: 10.1007/s00251-017-1015-5.

133. Wessendorf, S., Barth, T., Viardot, A. Mueller A, Kestler HA, Kohlhammer H, Lichter P, Bentz M, Döhner H, Möller P, Schwaenen C (2007) Further delineation of chromosomal consensus regions in primary mediastinal B-cell lymphomas: an analysis of 37 tumor samples using high-resolution genomic profiling (array-CGH). *Leukemia* 21: 2463-2469. doi: 10.1038/sj.leu.2404919.
134. Mottok A, Hung SS, Chavez EA, Woolcock B, Telenius A, Chong LC, Meissner B, Nakamura H, Rushton C, Viganò E, Sarkozy C, Gascoyne RD, Connors JM, Ben-Neriah S, Mungall A, Marra MA, Siebert R, Scott DW, Savage KJ, Steidl C (2019) Integrative genomic analysis identifies key pathogenic mechanisms in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 134:802-813. doi: 10.1182/blood.2019001126.
135. <https://www.atcc.org/products/crl-2630> (13.4.2022.)
136. Eberle FC, Rodriguez-Canales J, Wei L, Hanson JC, Killian JK, Sun HW, Adams LG, Hewitt SM, Wilson WH, Pittaluga S, Meltzer PS, Staudt LM, Emmert-Buck MR, Jaffe ES (2011) Methylation profiling of mediastinal gray zone lymphoma reveals a distinctive signature with elements shared by classical Hodgkin`s lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Haematologica* 96: 558-566. doi: 10.3324/haematol.2010.033167.
137. ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Karger, Basel, 1995.
138. Dai H, Ehrentraut S, Nagel S, Eberth S, Pommerenke C, Dirks WG, Geffers R, Kalavalapalli S, Kaufmann M, Meyer C, Faehnrich S, Chen S, Drexler HG, MacLeod RAF (2015) Genomic Landscape of Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma Cell Lines. *PLoS One* 10: e0139663. doi: 10.1371/journal.pone.0139663.
139. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-634> (14.04.2022.)
140. Sambade C, Berglund M, Lagercrantz S, Sallstrom J, Reis RM, Enblad G, Glimelius B, Sundstrom C (2006) U-2940, a human B-cell line derived from a diffuse large cell lymphoma sequential to Hodgkin lymphoma. *International Journal of Cancer* 118: 555-563. doi: 10.1002/ijc.21417.
141. Bentz M, Barth TF, Brüderlein S, Bock D, Schwerer MJ, Baudis M, Joos S, Viardot A, Feller AC, Müller-Hermelink HK, Lichter P, Döhner H, Möller P (2001) Gain of chromosome arm 9p is characteristic of primary mediastinal B-cell lymphoma (MBL): comprehensive molecular cytogenetic analysis and presentation of a novel MBL cell

- line. *Genes Chromosomes Cancer* 30: 393-401. doi: 10.1002/1098-2264(2001)9999:9999<::aid-gcc1105>3.0.co;2-i.
142. Möller P, Brüderlein S, Sträter J, Leithäuser F, Hasel C, Bataille F, Moldenhauer G, Pawlita M, Barth TF (2001) MedB-1, a human tumor cell line derived from a primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Int J Cancer* 92: 348-353. doi: 10.1002/ijc.1211.
143. Nacheva E, Dyer MJ, Metivier C, Jadayel D, Stranks G, Morilla R, Heward JM, Holloway T, O'Connor S, Bevan PC, Larsen CJ, Karpas A (1994) B-cell non-Hodgkin's lymphoma cell line (Karpas 1106) with complex translocation involving 18q21.3 but lacking BCL2 rearrangement and expression. *Blood* 84: 3422-3428.
144. [https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigma/cb\\_06072607](https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigma/cb_06072607) (19.04.2022.)
145. <https://www.atcc.org/products/ccl-2> (19.04.2022.)
146. Sato S, Rancourt A, Sato Y, Satoh MS (2016) Single-cell lineage tracking analysis reveals that an established cell line comprises putative cancer stem cells and their heterogeneous progeny. *Sci Rep* 6: 23328. doi: 10.1038/srep23328.
147. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (15.09.2020.)
148. Kalliolias GD, Ivashkiv LB (2016) TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 12: 49-62. doi: 10.1038/nrrheum.2015.169
149. Frasca D, Romero M, Diaz A, Alter-Wolf S, Ratliff M, Landin AM, Riley RL, Blomberg BB (2012) A molecular mechanism for TNF- $\alpha$ -mediated down-regulation of B cell responses. *J Immunol* 188: 279-286. doi: 10.4049/jimmunol.1003964.
150. Frasca D, Diaz A, Romero M, Landin AM, Blomberg BB (2014) High TNF- $\alpha$  levels in resting B cells negatively correlate with their response. *Exp Gerontol* 0: 116-122. doi: 10.1016/j.exger.2014.01.00.
151. Nakayama S, Yokote T, Hirata Y, Akioka T, Miyoshi T, Hiraoka N, Iwaki K, Takayama A, Nishiwaki U, Masuda Y, Nishimura Y, Tsuji M, Hanafusa T (2014) TNF- $\alpha$  expression in tumor cells as a novel prognostic marker for diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *Am J Surg Pathol* 38: 228-234. doi: 10.1097/PAS.0000000000000094.
152. Zhou X, Li Z, Zhou J (2017) Tumor necrosis factor  $\alpha$  in the onset and progression of leukemia. *Exp Hematol* 45: 17-26. doi: 10.1016/j.exphem.2016.10.005.
153. Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer HD, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C, Dörken B (1997) Constitutive

- nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 100: 2961-2969. doi: 10.1172/JCI119849.
154. Almaden JV, Liu YC, Yang E, Otero DC, Birnbaum H, Davis-Turak J, Asagiri M, David M, Goldrath AW, Hoffmann A (2016) B-cell survival and development controlled by the coordination of NF- $\kappa$ B family members RelB and cRel. *Blood* 127: 1276-1286. doi: 10.1182/blood-2014-10-606988.
155. Weniger MA, Gesk S, Ehrlich S, Martin-Subero JI, Dyer MJS, Siebert R, Möller P, Barth TFE (2007) Gains of REL in primary mediastinal B-cell lymphoma coincide with nuclear accumulation of REL protein. *Genes Chromosomes Cancer* 46:406-415. doi: 10.1002/gcc.20420.
156. Odqvist L, Montes-Moreno S, Sánchez-Pacheco RE, Young KH, Martín-Sánchez E, Cereceda L, Sánchez-Verde L, Pajares R, Mollejo M, Fresno MF, Mazon F, Ruíz-Marcellán C, Sánchez-Beato M, Piris MA (2014) NF $\kappa$ B expression is a feature of both activated B-cell-like and germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 27: 1331-1337. doi: 10.1038/modpathol.2014.34.
157. Li L, Xu-Monette ZY, Ok CY, Tzankov A, Manyam GC, Sun R, Visco C, Zhang M, Montes-Moreno S, Dybkaer K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Richards KL, Hsi ED, Choi WWL, van Krieken JH, Huh J, Ponzoni M, Ferreri AJM, Møller MB, Wang J, Parsons BM, Winter JN, Piris MA, Pham LV, Medeiros LJ, Young KH (2015) Prognostic impact of c-Rel nuclear expression and REL amplification and crosstalk between c-Rel and the p53 pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* 6: 23157-23180. doi: 10.18632/oncotarget.4319.
158. Rodig SJ, Savage KJ, LaCasce AS, Weng AP, Harris NL, Shipp MA, Hsi ED, Gascoyne RD, Kutok JL (2007) Expression of TRAF1 and nuclear c-Rel distinguishes primary mediastinal large cell lymphoma from other types of diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 31: 106-112. doi: 10.1097/01.pas.0000213334.40358.0e.
159. Palanisamy N, Abou-Elella AA, Chaganti SR, Houldsworth J, Offit K, Louie DC, Terayu-Feldstein J, Cigudosa JC, Rao PH, Sanger WG, Weisenburger DD, Chaganti RSK (2002) Similar patterns of genomic alterations characterize primary mediastinal large-B-cell lymphoma and diffuse large-B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 33: 114-122. doi: 10.1002/gcc.10016.
160. Faumont N, Taoui O, Collares D, Jais JP, Leroy K, Prévaud L, Jardin F, Molina TJ, Copie-Bergman C, Petit B, Gourin MP, Bordessoule D, Troutaud D, Baud V,

- Feuillard J (2021) c-Rel Is the Pivotal NF- $\kappa$ B Subunit in Germinal Center Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A LYSA Study. *Front Oncol* 11: 638897. doi: 10.3389/fonc.2021.638897.
161. Barth TFE, Martin-Subero JI, Joos S, Menz CK, Hasel C, Mechtersheimer G, Parwaresch RM, Lichter P, Siebert R, Möller P (2003) Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 101: 3681-3686. doi: 10.1182/blood-2002-08-2577.
162. Hoff ST, Salman AM, Ruhwald M, Ravn P, Brock I, Elsheikh N, Andersen P, Agger EM (2015) Human B cells produce chemokine CXCL10 in the presence of Mycobacterium tuberculosis specific T cells. *Tuberculosis (Edinb)* 95: 40-47. doi: 10.1016/j.tube.2014.10.005.
163. Zhou X, Guo S, Shi Y (2022) Comprehensive analysis of the expression and significance of CXCLs in human diffuse large B-cell lymphoma. *Sci Rep* 12: 2817. doi: 10.1038/s41598-022-06877-2.
164. Ansell SM, Maurer MJ, Ziesmer SC, Slager SL, Habermann TM, Link BK, Witzig TE, Macon WR, Dogan A, Cerhan JR, Novak AJ (2012) Elevated Pretreatment Serum Levels of Interferon-inducible Protein-10 (CXCL10) Predict Disease Relapse and Prognosis in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Patients. *Am J Hematol* 87: 865-869. doi: 10.1002/ajh.23259.
165. Saudemont A, Jouy N, Hetuin D, Quesnel B (2005) NK cells that are activated by CXCL10 can kill dormant tumor cells that resist CTL-mediated lysis and can express B7-H1 that stimulates T cells. *Blood* 105: 2428-2435. doi: 10.1182/blood-2004-09-3458.
166. Mitsuhashi A, Kondoh K, Horikawa K, Koyama K, Nguyen NT, Afroj T, Yoneda H, Otsuka K, Ogino H, Nokihara H, Shinohara T, Nishioka Y (2021) Programmed death (PD)-1/PD-ligand 1 blockade mediates antiangiogenic effects by tumor-derived CXCL10/11 as a potential predictive biomarker. *Cancer Sci* 112: 4853-4866. doi: 10.1111/cas.15161.
167. Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Shlomchik MJ (2010) PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol* 11: 535-542. doi: 10.1038/ni.1877.
168. Camus V, Viailly PJ, Drieux F, Veresezan EL, Sesques P, Haioun C, Durot E, Patey M, Rossi C, Martin L, Rainville V, Bohers E, Ruminy P, Penther D, Kaltenbach S, Bruneau J, Paillassa J, Tournilhac O, Willaume A, Antier C, Lazarovici J, Lévêque E,

- Decazes P, Becker S, Tonnelet D, Berriolo-Riedinger A, Gaulard P, Tilly H, Molina TJ, Traverse-Glehen A, Jardin F (2023) High PDL1/PDL2 gene expression correlates with worse outcome in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood Adv* 7: 7331-7345. doi: 10.1182/bloodadvances.2023011169.
169. Godfrey J, Tumuluru S, Bao R, Leukam M, Venkataraman G, Phillip J Fitzpatrick C, McElherne J, MacNabb BW, Orłowski R, Smith SM, Kline J (2019) PD-L1 gene alterations identify a subset of diffuse large B-cell lymphoma harboring a T-cell–inflamed phenotype. *Blood* 133: 2279-2290. doi: 10.1182/blood-2018-10-879015.
170. Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, Sakai T, Hishizawa M, Tashima M, Kondo T, Ohmori K, Kurata M, Hayashi T, Uchiyama T (2008) PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood* 111: 3220-3224. doi: 10.1182/blood-2007-05-085159.
171. Andorsky DJ, Yamada RE, Said J, Pinkus GS, Betting DJ, Timmerman JM (2011) Programmed death ligand 1 is expressed by non-hodgkin lymphomas and inhibits the activity of tumor-associated T cells. *Clin Cancer Res* 17: 4232-4244. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2660.
172. Guiter C, Dusanter-Fort I, Copie-Bergman C, Boullard ML, Le Gouvello S, Gaulard P, Leroy K, Castellano F (2004) Constitutive STAT6 activation in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 104: 543-549.
173. Quiding M, Granström G, Nordström I, Ferrua B, Holmgren J, Czerkinsky C (1993) High frequency of spontaneous interferon-gamma-producing cells in human tonsils: role of local accessory cells and soluble factors. *Clin Exp Immunol* 91: 157-163. doi: 10.1111/j.1365-2249.1993.tb03372.x.
174. Geißler K, Weigel C, Schubert K, Rubio I, Guntinas-Lichius O (2020) Cytokine production in patients with recurrent acute tonsillitis: analysis of tonsil samples and blood. *Sci Rep* 10: 13006. doi: 10.1038/s41598-020-69981-1.
175. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert ES, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD (1998) Demonstration of an interferon  $\gamma$ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7556-7561. doi: 10.1073/pnas.95.13.7556.
176. Bax HI, Freeman AF, Anderson VL, Vesterhus P, Laerum D, Pittaluga S, Wilson WH, Holland SM (2013) B-cell lymphoma in a patient with complete interferon gamma receptor 1 deficiency. *J Clin Immunol* 33: 1062-1066. doi: 10.1007/s10875-013-9907-0.

177. Tanigaki T, Kimizuka Y, Maki Y, Sato C, Yoshimatsu S, Ogata H, Nomura S, Nishimura M, Serizawa Y, Ito K, Igarashi S, Kurata Y, Ohno T, Miyata J, Fujikura Y, Sato K, Ogata S, Kawana A (2022) Development of intravascular large B-cell lymphoma during prophylactic antibiotic treatment for anti-interferon-gamma autoantibody syndrome: A case report. *J Infect Chemother* 28: 1562-1566. doi: 10.1016/j.jiac.2022.07.015.
178. Critchley-Thorne RJ, Simons DL, Yan N, Miyahira AK, Dirbas FM, Johnson DL, Swetter SM, Carlson RW, Fisher GA, Koong A, Holmes S, Lee PP (2009) Impaired interferon signaling is a common immune defect in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 9010-9015. doi: 10.1073/pnas.0901329106.
179. Groom JR, Luster AD (2011) CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol* 89: 207-215. doi: 10.1038/icb.2010.158.
180. Jones D, O'Hara C, Kraus MD, Perez-Atayde AR, Shahsafaei A, Wu L, Dorfman DM (2000) Expression pattern of T-cell-associated chemokine receptors and their chemokines correlates with specific subtypes of T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 96: 685-690.
181. Trentin L, Agostini C, Facco M, Piazza F, Perin A, Siviero M, Gurrieri C, Galvan S, Adami F, Zambello R, Semenzato G (1999) The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis. *J Clin Invest* 104: 115-121. doi: 10.1172/JCI7335.
182. Zhu MX, Wan WL, Hong Y, Wang YF, Dong F, Jing HM (2020) Expression and role of MIG/CXCR3 axis in mantle cell lymphoma. *Exp Cell Res* 397:112365. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112365.
183. Ohshima K, Suefuji H, Karube K, Hamasaki M, Hatano B, Tutiya T, Yamaguchi T, Suzuki K, Suzumiya J, Kikuchi M (2003) Expression of chemokine receptor CXCR3 and its ligand, mig, in gastric and thyroid marginal zone lymphomas. Possible migration and autocrine mechanism. *Leuk Lymphoma* 44: 329-336. doi: 10.1080/1042819031000060546.
184. Suefuji H, Ohshima K, Karube K, Kawano R, Nabeshima K, Suzumiya J, Hayabuchi N, Kikuchi M (2005) CXCR3-positive B cells found at elevated frequency in the peripheral blood of patients with MALT lymphoma are attracted by MIG and belong to the lymphoma clone. *Int J Cancer* 114: 896-901. doi: 10.1002/ijc.20823.
185. Greaves P, Clear A, Owen A, Iqbal S, Lee A, Matthews J, Wilson A, Calaminici M, Gribben JG (2013) Defining characteristics of classical Hodgkin lymphoma

- microenvironment T-helper cells. *Blood* 122: 2856-2863. doi: 10.1182/blood-2013-06-508044.
186. Wu, R., Sattarzadeh, A., Rutgers, B, Diepstra A, van den Berg A, Visse L (2016) The microenvironment of classical Hodgkin lymphoma: heterogeneity by Epstein–Barr virus presence and location within the tumor. *Blood Cancer J* 6: e417. doi: 10.1038/bcj.2016.26.
187. Xu-Monette ZY, Xiao M, Au Q, Padmanabhan R, Xu B, Hoe N, Rodríguez-Perales S, Torres-Ruiz R, Manyam GC, Visco C, Miao Y, Tan X, Zhang H, Tzankov A, Wang J, Dybkær K, Tam W, You H, Bhagat G, Hsi ED, Ponzoni M, Ferreri AJM, Møller MB, Piris MA, van Krieken JH, Winter JN, Westin JR, Pham LV, Medeiros LJ, Rassidakis GZ, Li Y, Freeman GJ, Young KH (2019) Immune Profiling and Quantitative Analysis Decipher the Clinical Role of Immune-Checkpoint Expression in the Tumor Immune Microenvironment of DLBCL. *Cancer Immunol Res* 7: 644-657. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0439.
188. Han C, Fu J, Liu Z, Huang H, Luo L, Yin Z (2010) Dipyrithione inhibits IFN-gamma-induced JAK/STAT1 signaling pathway activation and IP-10/CXCL10 expression in RAW264.7 cells. *Inflamm Res* 59: 809-816. doi: 10.1007/s00011-010-0192-6.
189. Savage KJ (2022) Primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 140: 955-970. doi: 10.1182/blood.2020008376.
190. Xu-Monette ZY, Zhou J, Young KH (2018) PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas. *Blood* 131: 68-83. doi: 10.1182/blood-2017-07-740993.
191. Fan J, Shen X, Wang Y, Zhou HL, Liu G, Li YL, Xu ZX (2020) Biomarkers for immune checkpoint therapy targeting programmed death 1 and programmed death ligand 1. *Biomed Pharmacother* 130: 110621. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110621.



## 8. Životopis

Paula Gršković diplomirala je na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2018. godine. U studenom 2018. godine počela je raditi kao asistentica na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu gdje je i danas zaposlena.

Kao asistentica sudjelovala je u nastavi kolegija „Genetika“, „Kultura animalnih stanica“, „Molekularna biologija stanice“, „Molekularna dijagnostika“, „Medicinska genetika“ i „Metode istraživanja u molekularnoj biologiji“ na Zavodu za molekularnu biologiju. Kao koordinatorica Zavoda za molekularnu biologiju sudjelovala je na manifestaciji Dan i noć PMF-a 2020./2021. Bila je komentorica na pet diplomskih radova.

Područje njezinog znanstvenog zanimanja su mehanizmi nastanka i razvoja tumora te efekti tumorskog mikrookoliša na odgovor imunskog sustava. Dosada je sudjelovala u istraživanjima komponenti tumorskog mikrookoliša u razvoju folikularnog limfoma i utjecaja tumorskog mikrookoliša na genomsku nestabilnost klasičnog Hodgkinovog limfoma. Sudjelovala je u analizi ekspresije gena s ulogom u replikaciji i ponovnoj uspostavi kromatina u netumorskim limfocitima B, indolentnom limfomu (folikularni limfom) i agresivnom limfomu (difuzni B-velikostanični limfom). Također, sudjelovala je u analizi kvalitete nukleinskih kiselina izoliranih iz citoloških razmaza adenokarcinoma pluća.

Kao istraživač od 2018. sudjeluje na projektu „Uloga plazminogenškoga aktivatora u epitelno-mezenhimskoj tranziciji“ (potpora Sveučilišta), a od 2019. do 2023. godine sudjelovala je na projektu „Centar kompetencija u molekularnoj dijagnostici“ (CEKOM).

Sudjelovala je na četiri znanstvena i stručna skupa.

Koautor je na četiri originalna znanstvena rada i četiri pregledna rada.