

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

**LYN fördert die Leukämie-Unterstützung durch  
Fibroblasten im CLL-Mikromilieu via Regulierung  
von c-JUN und Thrombospondin-1**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Alexander Frederik vom Stein  
aus Bergisch Gladbach

promoviert am 16.Juli 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek  
2. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. G. F. Sengle  
3. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. B. von Tresckow

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Für die dieser kumulativen Promotion zugrunde liegende Publikation<sup>1</sup> wurden wesentliche konzeptionelle, experimentelle, analytische und darstellende Arbeitsschritte durch mich geleistet. Hierin wurde ich von Herrn Prof. Dr. Hallek und Frau Dr. Nguyen betreut, die insbesondere auch die finanziellen und strukturellen Ressourcen für dieses Projekt zur Verfügung stellten.

Nachfolgend wird mein eigener Beitrag sowie der Beitrag der Ko-Autoren an der Publikation genauer erläutert:

Die dargestellten experimentellen *in vitro* Arbeiten wurden maßgeblich durch mich geplant und ausgewertet. Hierin wurde ich durch Frau Dr. Nguyen supervidiert. Insbesondere etablierte ich die Anwendung der CRISPR-Cas9 Technologie in verschiedenen Stroma-Zellen in der Arbeitsgruppe, die zur Generation verschiedener Gen-Knockouts im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde. Es erfolgte die Generierung der zentralen LYN<sup>KO</sup> HS-5 und NKtert Zell-Linien, sowie deren Ko-Kultur mit CLL-Zellen, eigenständig von mir.

Auf Basis dieser etablierten Protokolle erhielt ich im Weiteren Unterstützung in der Durchführung der *in vitro* Arbeiten durch die technischen Assistentinnen Frau Bohner und Frau Zölzer, die Experimente unter meiner Planung sowie Anleitung durchführten (insbesondere qPCR-Analysen). Frau Lukas half im Rahmen ihrer Bachelor- und Master-Arbeit sowie einer SHK-Tätigkeit bei der Durchführung von *in vitro* Experimenten (insbesondere die Generierung/Analyse von FAP-Knockout HS-5 Zell-Linien sowie Untersuchung von THBS-1-Überexpression, CD47-Blockade und JUN-Knockout). Außerdem half Herr von Lom im Rahmen seiner durch Prof. Dr. Hallek betreuten medizinischen Promotion an der *in vitro*-Datengenerierung (PBMC-Stimulierung und Messung der Expression von Adhäsions-Molekülen). Die entsprechenden Experimente wurden von mir geplant und die erhobenen Daten gemeinsam von Frau Lukas / Herrn von Lom und mir ausgewertet.

Zur zeitnahen Fertigstellung und Revision der Publikation führten Frau Dr. Kohlhas, Herr Dr. Reinartz und Frau Saggau (alle Arbeitsgruppe Hallek, Klinik I für Innere Medizin, Uniklinik Köln)

eigenständig weitere *in vitro* Experimenten durch. Diese wurden maßgeblich gemeinsam geplant und von mir ausgewertet. Frau Dr. Zhao und Frau Prof. Dr. Bruns aus der Abteilung für Viszeralchirurgie der Uniklinik Köln stellten Zell-Linien zu Verfügung, die von mir mit Hilfe zuvor genannter Personen für *in vitro* Experimente genutzt wurden.

Die von mir generierten HS-5 Zellen wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Häupel und Herrn Prof. Dr. Oellerich an der Medizinischen Klinik 2 der Universitätsmedizin Frankfurt massenspektrometrisch untersucht. Die Durchführung der Massenspektrometrie und Auswertung der Rohdaten erfolgte durch sie. Weitere proteomische, transkriptomische und epigenomische Untersuchung wurden nach Vorbereitung der Proben von mir in der Core Facility des CECAD-Instituts sowie dem Cologne-Center for Genomics analysiert.

Die bioinformatischen Analysen dieser Daten erfolgte gemeinsam mit Frau Dr. Rebollido-Rios (Klinik I für Innere Medizin, Uniklinik Köln) und Herrn Dr. Abdallah (Bioinformatics Core Facility des CECAD Institut, Universität zu Köln). Die Interpretation der Daten erfolgte maßgeblich durch mich und Frau Dr. Nguyen.

Herr Dr. Koch (Arbeitsgruppe Hallek, Klinik I für Innere Medizin, Uniklinik Köln) führte selbstständig das *in vivo* Experiment zur Transplantation leukämischer Zellen in chimäre Mäuse durch. Die Darstellung seiner Ergebnisse in der Publikation erfolgte durch mich.

Im Rahmen der Revisionsarbeit erfolgte die Analyse von humanen CLL-Lymphknoten mittels bildgebender Massenzytometrie. Die klinischen Proben wurden von Herrn PD Dr. Bröckelmann (Klinik I für Innere Medizin, Uniklinik Köln), Herrn Dr. Lohneis (Hämatopathologie Lübeck und Klinik für Pathologie, Uniklinik Köln) und Herrn Prof. Dr. Büttner (Klinik für Pathologie, Uniklinik Köln) zur Verfügung gestellt und klinisch annotiert. Herr Bachurski (Arbeitsgruppe Hallek, Klinik I für Innere Medizin, Uniklinik Köln) führte die experimentellen Schritte durch und Frau Rose und Frau Prof. Dr. Bozek (beide Zentrum für Molekulare Medizin und Institut für biomedizinische Informatik, Universität zu Köln) die bioinformatische Analyse. Diese wurde in enger Kooperation mit mir und Frau Dr. Nguyen geplant und ausgewertet.

Die Ergebnisse der verschiedenen Experimente wurden durch mich zusammengetragen, die Abbildungen der Publikation sämtlich von mir erstellt. Das Schreiben der ersten Manuscript-Version sowie der Revisions-Schrift erfolgte von mir. Diese wurden im Weiteren durch Frau Dr. Nguyen, Prof. Dr. Hallek und mich überarbeitet und vervollständigt.

#### Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 08.03.2025



Unterschrift: Alexander vom Stein

## Danksagung

Die vorliegende Promotionsarbeit und die Entstehung dieser Dissertation wären ohne die Unterstützung zahlreicher Menschen nicht möglich gewesen, denen ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen möchte. Dank ihnen blicke ich auf acht Jahre Forschungsarbeit in der AG Hallek zurück – eine Zeit, die nicht nur unglaublich abwechslungsreich und lehrreich war, sondern mich auch gefordert, gefördert und geprägt hat. Trotz gelegentlicher Frustration und Anstrengung bot sie mir stets die Möglichkeit, meinen Interessen nachzugehen, meinen Horizont zu erweitern sowie Neues auszuprobieren und zu entdecken. Dafür bin ich sehr dankbar.

Zunächst danke ich Herrn Prof. Hallek, der mir als Doktorvater den Zugang zu seinem Labor eröffnete und mich durch seine umfassende Förderung maßgeblich unterstützte. Dabei prägte er meine Herangehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen und begleitete meine klinische wie auch akademische Entwicklung nachhaltig.

Mein besonderer Dank gilt Hien, die mich bei den Experimenten betreut und angeleitet hat. Mit großer Geduld und Kompetenz hat sie mir das nötige Handwerkszeug der Forschung vermittelt und mir viel Freiraum für meine eigenen Forschungsinteressen eingeräumt. Wann immer ich mich in Details verlor, half sie mir, wieder auf den richtigen Weg zu finden.

Allen weiteren Mitgliedern des Labors danke ich für ihre anhaltende Unterstützung. Sie haben mir nicht nur das experimentelle Arbeiten von Grund auf beigebracht, sondern auch dafür gesorgt, dass Forschung trotz gelegentlicher Rückschläge immer wieder Freude machte. Ein besonderer Dank gebührt Max, der mir die ersten Schritte im Labor zeigte und mir in den Inkubationspausen das Kicker-Spielen beibrachte. Viktoria und Sebastian danke ich für ihre anhaltende Unterstützung und dafür, dass sie mir als positive Vorbilder dienen. Heidi danke ich für ihre hervorragende Organisation und ihre Bereitschaft, sich um alle Aspekte des Labors zu kümmern.

Meinen Freunden und vor allem meiner Familie möchte ich aus tiefstem Herzen danken. Sie haben mich über all die Jahre unterstützt, motiviert und manches Mal für mich zurückgesteckt. Wann immer ich den Fokus verlor, haben sie mich aufgebaut und mir neuen Antrieb gegeben.

Mein letzter Dank gilt den Patientinnen und Patienten sowie ihren Angehörigen. Ohne ihre Bereitschaft, ihr Blut für Forschungszwecke zur Verfügung zu stellen, wären viele Experimente dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>7</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>12</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Die chronisch lymphatische Leukämie</b>	<b>13</b>
<b>2.1.1. Klinische Aspekte der CLL</b>	<b>13</b>
(1) Diagnosekriterien	13
(2) Symptomatik	13
(3) Prognostische Faktoren	14
<b>2.1.2. Therapie</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Das Tumormikromilieu der CLL</b>	<b>18</b>
<b>2.2.1. Zelluläre Zusammensetzung des Tumormikromilieus</b>	<b>19</b>
<b>2.2.2. Mesenchymale Zellen im CLL-Tumormikromilieu</b>	<b>20</b>
(1) Effektormechanismen der CLL-Unterstützung durch Stroma Zellen	21
(2) Induktionsmechanismen in MSZ durch Kontakt zu CLL-Zellen	23
<b>2.3 Krebs assoziierte Fibroblasten</b>	<b>25</b>
<b>2.3.1. Signalwege der KAF-Aktivierung</b>	<b>28</b>
<b>2.3.2. KAF in hämatologischen Erkrankungen</b>	<b>29</b>
<b>2.4 Die LYN-Kinase</b>	<b>31</b>
<b>2.4.1. Struktur und Regulation</b>	<b>31</b>
<b>2.4.2. Molekulare Funktion</b>	<b>32</b>
<b>2.4.3. Expression</b>	<b>32</b>
<b>2.4.4. Zelluläre Funktion</b>	<b>33</b>
(1) Zelluläre Funktion von LYN in hämatopoetischen Zellen	34
(2) Zelluläre Funktion von LYN in nicht-hämatopoetischen Zellen	35
<b>2.5 Die LYN-Kinase in CLL</b>	<b>37</b>
<b>2.5.1. Molekulare Funktion</b>	<b>37</b>
<b>2.5.2. Inhibition der LYN-Kinase</b>	<b>37</b>
<b>2.5.3. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe</b>	<b>38</b>
<b>2.6 Fragestellungen und Ziel der Arbeit</b>	<b>41</b>

<b>3. PUBLIKATION</b>	<b>42</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>43</b>
<b>4.1. Einordnung der murinen Daten</b>	<b>45</b>
<b>4.1.1. Vergleich mit vorherigen Ergebnissen des TCL1- Mausmodells</b>	<b>45</b>
<b>4.1.2. Abstoßungsreaktionen als möglicher Konfounder im TCL1-Modell</b>	<b>46</b>
<b>4.2. LYN in der Regulation inflammatorischer Signalwege</b>	<b>47</b>
<b>4.2.1. Der Zelltyp-spezifische Einfluss von LYN auf Inflammationsprozesse</b>	<b>47</b>
<b>4.2.2. Proinflammatorische Signale als zentrale Mechanismen eines supportive CLL-TMM</b>	<b>48</b>
<b>4.2.3. Zytokine und multizelluläre Interaktionen im CLL-TMM</b>	<b>49</b>
<b>4.3. LYN als Regulator in matrizellulären Signalwegen</b>	<b>51</b>
<b>4.3.1. Veränderungen der extrazellulären Matrix</b>	<b>51</b>
<b>4.3.2. Modulation der THBS-1 und BGN Expression</b>	<b>53</b>
<b>4.3.3. Transkriptionelle Regulation von THBS-1</b>	<b>54</b>
<b>4.4. Translationale Relevanz der Arbeit</b>	<b>56</b>
<b>4.4.1. LYN-Inhibition in der CLL-Therapie</b>	<b>56</b>
<b>4.4.2. LYN-Inhibition zur KAF Reprogrammierung</b>	<b>57</b>
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>59</b>
<b>6. ANHANG</b>	<b>71</b>
<b>6.1. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>71</b>
<b>6.2. Tabellenverzeichnis</b>	<b>71</b>

## Abkürzungsverzeichnis

2R-Patienten	doppelt refraktäre Patienten
ACTA2	engl.: <i>Actin Alpha 2</i> (Gen-Name von $\alpha$ -SMA)
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AP-1	engl.: <i>Activator-Protein 1</i>
apKAF	antigenpräsentierende Krebs assoziierte Fibroblasten
APRIL	engl.: <i>A Proliferation-Inducing Ligand</i>
ATAC	engl.: <i>Assay for Transposase-Accessible Chromatin</i>
ATF	engl.: <i>Activating Transcription Factor</i>
ATM	engl.: <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
BAFF	engl.: <i>B-cell Activating Factor</i>
BCL-2	engl.: <i>B-Cell Lymphoma 2</i>
BCL2i	BCL2-Inhibitor
BCL-XL	engl.: <i>B-Cell Lymphoma-Extra Large</i>
BCR-ABL	Fusionsgen BCR (engl.: <i>Breakpoint Cluster Region</i> ) und ABL (engl.: <i>Abelson Murine Leukemia</i> )
BGN	Biglykan
BLK	engl.: <i>B Lymphocyte Kinase</i>
BR	Bendamustin/Rituximab
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
BTKi	BTK-Inhibitor
BZR	B Zell Rezeptor
CAR-T	engl.: <i>Chimeric Antigen Receptor T cell</i>
CCL19	engl.: <i>C-C Motif Ligand 19</i>
CCL2	engl.: <i>C-C Motif Ligand 2</i>
CCL21	engl.: <i>C-C Motif Ligand 21</i>
CD	engl.: <i>Cluster of Differentiation</i>
CD20-AK	CD20-Antikörper
CD40-L	CD40 Ligand
CHK	engl.: <i>Checkpoint Kinase</i>
c-JUN	engl.: <i>Cellular Jun Proto-Oncogene</i>
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
COL1A1	engl.: <i>Collagen Type 1 Alpha 1</i>
COPD	engl.: <i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>

CSK	engl.: <i>c-Src Kinase</i>
CTGF	engl.: <i>Connective Tissue Growth Factor</i>
CXCL1	engl.: <i>C-X-C Motif Chemokine 1</i>
CXCL10	engl.: <i>C-X-C Motif Chemokine 10</i>
CXCL12	engl.: <i>C-X-C Motif Chemokine 12</i>
CXCL13	engl.: <i>C-X-C Motif Chemokine 13</i>
CXCL8	engl.: <i>C-X-C Motif Chemokine 8</i>
DLBCL	Diffus Großzelliges B-Zell Lymphom (engl.: <i>Diffuse Large B Cell Lymphoma</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
EPHA2	engl.: <i>Ephrin Type-A Receptor 2</i>
Epo-R	Erythropoietin Rezeptor
ERK	engl.: <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
ESMO	engl.: <i>European Society for Medical Oncology</i>
EV	Extrazelluläre Vesikel
EZM	Extrazelluläre Matrix
E $\mu$ -TCL1	CLL-Mausmodell mit Expression des Onkogens TCL1 in B-Zellen
FAK	engl.: <i>Focal Adhesion Kinase</i>
FAP	engl.: <i>Fibroblast Activation Protein</i>
FCR	Fludarabin/Cyclophosphamid/Rituximab
FDZ	Follikular Dendritische Zellen
FGR	engl.: <i>Fgr proto-oncogene</i> (benannt nach Feline Gardner-Rasheed Sarcoma Virus)
FL	Follikuläres Lymphom
FLT3	engl.: <i>FMS-like Tyrosine Kinase 3</i>
FN-1	engl.: <i>Fibronectin-1</i>
FRZ	Fibroblastische Retikulumzellen
FYN	engl.: <i>Fgr/Yes Novel Tyrosine Kinase</i>
G-CSF-R	engl.: <i>Granulocyte-Colony Stimulationg Factor-Receptor</i>
HCK	engl.: <i>Hematopoietic Cell Kinase</i>
HL	Hodgkin Lymphom
HS1	engl.: <i>Hematopoietic Specific Protein 1</i>
HS-5	engl.: <i>Human Marrow Stroma Cell Line 5</i>
ICAM-1	engl.: <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IFN- $\gamma$	Interferon Gamma

IGHV	variable Immunglobulinschwerkette (engl.: <i>Immunglobulin Heavy chain variable region</i> )
IgM	Immunglobulin M
iKAF	inflammatorische Krebs assoziierte Fibroblasten
IL-1	Interleukin-1
IL-15	Interleukin-15
IL-2	Interleukin-2
IL-21	Interleukin-21
IL2R	Interleukin-2-Rezeptor
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IRF	Interferon regulierender Faktor
ITAM	Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes-Aktivator-Motiv
ITGB-1	engl.: <i>Integrin Subunit Beta-1</i>
ITGB-2	engl.: <i>Integrin Subunit Beta-2</i>
ITIM	Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes-Inhibitor-Motiv
JAK	Januskinase
KAF	Krebs assoziierte Fibroblasten (engl.: <i>Cancer associated Fibroblasts</i> )
LCK	engl.: <i>Lymphocyte-Specific Protein Tyrosine Kinase</i>
LFA-1	engl.: <i>Lymphocyte Function-associated Antigen-1</i>
LIF	engl.: <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRRC15	engl.: <i>Neuropilin-1 and Leucine-rich Repeat containing Protein 15</i>
LT $\beta$ R	Lymphotoxin-Rezeptor beta
LYN	engl.: <i>Lck/Yes Novel Tyrosine Kinase</i>
MAPK	engl.: <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MAPK1	engl.: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase 1</i>
MCL-1	engl.: <i>Myeloid Cell Leukemia-1</i>
MHC-II	engl.: <i>Major Histocompatibility Complex II</i>
MMP	Matrix Metalloproteinase
MSZ	Mesenchymale Stromazellen
MyD88	engl.: <i>Myeloid Differentiation Factor 88</i>
myKAF	myofibroblastische Krebs assoziierte Fibroblasten
NF $\kappa$ B	engl.: <i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-cells</i>
NKtert	engl.: <i>Human Telomerase Catalytic Subunit (hTERT)-Transfected Human Stromal Cells</i>

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLRP3	<i>engl.: NLR (nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing) family pyrin domain containing 3</i>
NOTCH1	<i>engl.: Neurogenic Locus Notch Homolog 1</i>
NOTCH2	<i>engl.: Neurogenic Locus Notch Homolog 2</i>
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen ( <i>engl.: Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> )
PDGF	<i>engl.: Platelet Derived Growth Factor</i>
PDGFR-β	<i>engl.: Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta</i>
PFS	Progressionsfreies Überleben ( <i>engl.: Progression Free Survival</i> )
PI3K	<i>engl.: Phosphatidylinositol-3 Kinase</i>
PIR-B	<i>engl.: Paired Immunoglobulin-Like Receptor B</i>
PKA	Proteinkinase A
PKC-β	<i>engl.: Protein Kinase C-β</i>
PLCγ2	Phospholipase C Gamma 2
PMA	Phorbol-12-myristat 13-acetat
POSTN	Periostin
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PTPB1	<i>engl.: Protein-Tyrosine Phosphatase 1B</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROR1	<i>engl.: Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor 1</i>
SF3B1	<i>engl.: Splicing Factor 3b Subunit 1</i>
SFKs	Src Familien Kinase
SH	Src-Homologiedomänen
SHIP1/2	<i>engl.: SH2 Domain-Containing Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase 1/2</i>
SHP1/2	<i>engl.: SH2 Domain-Containing Phosphatase 1/2</i>
SIRP-α	<i>engl.: Signal-Regulatory Protein Alpha</i>
SRC	<i>engl.: Src proto-oncogene</i> (benannt nach dem Rous Sarcoma Virus)
STAT	<i>engl.: Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SYK	<i>engl.: Spleen Tyrosine Kinase</i>
TAK1	TGF-β-aktivierte Kinase 1
TCL1	<i>engl.: T-Cell Leukemia 1</i>
TFEB	Transkriptionsfaktor EB
TGF-β	<i>engl.: Transforming Growth Factor Beta</i>
THBS-1	Thrombospondin 1
TLR	<i>engl. Toll like Receptor</i>

TLR4.....	<i>engl.: Toll like Receptor 4</i>
TMM.....	Tumormikromilieu
TNF-α.....	<i>engl.: Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
uMRD .....	undektierbare minimale Resterkrankung ( <i>engl.: undetectable Minimal Residual Disease</i> )
VCAM-1 .....	<i>engl.: Vascular Cell Adhesion Molecule-1, engl.: Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VCAN .....	Versikan
VEGF.....	<i>engl.: Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VLA-4.....	<i>engl.: Very Late Antigen-4</i>
WNT .....	<i>engl.: Wingless-Related Integration Site</i>
YES.....	<i>engl.: Yes1 proto-oncogene</i> (benannt nach dem Yamaguchi Sarcoma Virus)
YRK .....	<i>engl.: Yes-Related Kinase</i>
ZAP70 .....	<i>engl.: Zeta-Chain-Associated Protein Kinase 70</i>
α-SMA .....	<i>engl.: Alpha Smooth Muscle Actin</i>
γδ-T-Zellen.....	Gamma delta T-Zellen

## **1. Zusammenfassung**

Die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) ist für ihre Progression auf ein supportives Mikromilieu angewiesen. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die LYN-Kinase im Tumormikromilieu (TMM) der CLL wichtig für die Leukämie-Unterstützung ist. Fibroblasten sind Bestandteil des Mikromilieus und induzieren eine gesteigerte Proliferation und reduzierte Apoptose der neoplastischen Zellen. In dieser Arbeit wird daher die Bedeutung und molekulare Funktion der LYN-Kinase in fibroblastischen Stromazellen des CLL-Mikromilieus untersucht. In einem chimären Mausmodell, das nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation eine spezifische Lyn-Deletion nur in nicht-hämatopoetischen Zellen trägt, zeigte sich eine verlangsamte TCL1-Leukämie-Progression. Dies demonstriert die funktionelle Relevanz von Lyn im nicht-hämatopoetischen TMM. In der Untersuchung humaner CLL-Lymphknoten verglichen zu gesundem Gewebe zeigte sich eine Überexpression von LYN in Fibroblasten, was eine Bedeutung der Kinase auch im humanen Mikromilieu impliziert.

Um diese Funktionen im Detail untersuchen zu können, wurden verschiedene *in vitro* Stroma-CLL Ko-Kultursysteme etabliert. Hier zeigten Fibroblasten mit Ablation von LYN eine verminderte Leukämie-unterstützende Funktion. Zur genauen Charakterisierung der durch LYN-Defizienz verursachten molekularen Alterationen erfolgte die multi-omische Charakterisierung von Proteom, Phosphoproteom, Sekretom, Transkriptom und Epigenom der LYN<sup>KO</sup> HS-5 Zellen. Es zeigte sich eine LYN-abhängige Reprogrammierung der Stromazellen, die einem veränderten Krebs-assoziierte-Fibroblasten (KAF) – Aktivierungsmuster mit veränderter inflammatorischer Zytokin-Sekretion und extrazellulärer Matrix Modellierung ähnelte. Ähnliche Änderungen konnten an isolierten primären KAF aus Pankreas-Karzinom reproduziert werden.

Für die verminderte Unterstützung der CLL-Zellen war insbesondere die Veränderung der extrazellulären Matrix relevant, speziell die Reduktion des Proteoglykans Biglykan, sowie die vermehrte Expression von Thrombospondin-1 (THBS-1). Letzteres kann über die Ligation an CD47 die Apoptose in CLL-Leukämie Zellen auslösen und findet sich im humanen CLL-Lymphknoten vermindert exprimiert.

Die Reprogrammierung durch LYN-Defizienz umfasst eine verminderte inflammatorische Signalaktivität. Insbesondere zeigte sich eine verminderte Aktivität des AP-1 Transkriptionsfaktors und eine verminderte Expression seines Komponenten c-JUN. Die Minderung von c-JUN führte mechanistisch zur Disinhibition von Thrombospondin-1 und somit zur CLL-Apoptose.

Diese Arbeit ergänzt das bisherige Wissen zur Funktion von LYN in nicht-hämatopoetischen Zellen und identifiziert die neue LYN/c-JUN/THBS-1 Achse. Die klinische Bedeutung von THBS-1 und LYN als mögliche therapeutische Ziele im CLL TMM müssen in folgenden Arbeiten weiter untersucht werden.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Die chronisch lymphatische Leukämie**

Die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) ist eine maligne B-Zell Neoplasie, die gleichzeitig als Nicht-Hodgkin Lymphom sowie aufgrund des leukämischen Verlaufes als chronische Leukämie klassifiziert wird. Mit einer Häufigkeit von 4 - 5 / 100.000 Einwohnern pro Jahr stellt sie die häufigste Leukämie des Erwachsenen in der westlichen Welt dar, und betrifft mit einem mittleren Erkrankungsalter bei Erstdiagnose von etwa 70 Jahren insbesondere ältere, etwas gehäuft männliche Patienten.<sup>2,3</sup>

#### **2.1.1. Klinische Aspekte der CLL**

##### **(1) Diagnosekriterien**

Die Diagnose der CLL ist definiert als eine über mindestens drei Monate anhaltende monoklonale B-Zell Lymphozytose mit > 5.000 / µl B-Zellen im peripheren Blut, die einen typischen aberranten Immunphänotyp aufweisen (aberrante Ko-Expression von CD5 mit den B-Zell Markern CD19 / CD20 / CD23).<sup>2,4</sup> Von der CLL abzugrenzende Sonderformen sind einerseits das kleinzellige lymphozytische Lymphom (eine nicht-leukämische Verlaufsform mit Lymphadenopathie vom CLL Immunphänotyp, jedoch < 5.000 / µl B-Zellen im peripheren Blut und keine Zytopenien) sowie die monoklonale B-Zell Lymphozytose (eine Präneoplasie mit monoklonalen B-Zellen vom CLL Immunphänotyp < 5.000 / µl B-Zellen ohne Hinweis auf eine Lymphadenopathie oder Zytopenien).<sup>5,6</sup>

##### **(2) Symptomatik**

Klinisch zeigt sich durch die Akkumulation von malignen, monoklonalen Zellen in den lymphatischen Organen sowie der Leber eine typische Lymphadenopathie und Hepatosplenomegalie. Durch die Infiltration des Knochenmarks und Verdrängung der normalen Hämatopoese entstehen Zytopenien der anderen Zellreihen mit Anämie, Neutro- und Thrombozytopenie. Sekundär kann es zu Infektionen und Autoimmun-Phänomenen kommen. Verschiedene Patienten können sehr unterschiedliche Krankheitsverläufe zeigen. Während circa ein Drittel der Patienten einen indolenten Verlauf hat und keine Therapie benötigt, kann die CLL auch aggressiver verlaufen. Bei etwa 5% (2 - 10%) kommt es zur sogenannten Richter-Transformation der CLL in ein aggressives Lymphom (meist diffus großzelliges B-Zell Lymphom (DLBCL), selten Hodgkin Lymphom (HL)), was mit einer schlechten Prognose einhergeht.<sup>7,8</sup> Die Ausbreitung und die klinische Manifestation der CLL werden nach der Binet Klassifikation eingeteilt (Tabelle 1), wobei das Binet Stadium C als Indikation zur Therapie gilt, während die Stadien A und B ohne weitere Symptome engmaschig verlaufskontrolliert werden können (sog. „watch-and-wait“ Strategie).

Tabelle 1: Binet-Klassifikation der CLL. a=cervikale / inguinale / axilläre Lymphknoten, Leber, Milz

Stadium	Hb	Thrombozyten		Betroffene Regionen <sup>a</sup>	
<b>A</b>	$\geq 10 \text{ g / dl}$	<i>und</i>	$\geq 100.000 / \mu\text{l}$	<i>und</i>	$\leq 2 \text{ Regionen}$
<b>B</b>	$\geq 10 \text{ g / dl}$	<i>und</i>	$\geq 100.000 / \mu\text{l}$	<i>und</i>	$\geq 3 \text{ Regionen}$
<b>C</b>	$< 10 \text{ g / dl}$	<i>oder</i>	$< 100.000 / \mu\text{l}$		

### (3) Prognostische Faktoren

Ein zentraler biologischer Risikofaktor der CLL ist der Mutationsstatus der schweren variablen Immunglobulinkette (IGHV).<sup>9–11</sup> IGHV-Mutationen entstehen physiologisch im Rahmen der B-Zell Maturierung im Lymphknoten-Keimzentrum. Dabei wird der Lokus der variablen Region des Immunglobulin-Gens durch die sog. somatische Hypermutation verändert, sodass neue Varianten mit potenziell gesteigerter Affinität zum Antigen generiert werden.<sup>12</sup> Ein mutierter IGHV-Status deutet auf eine fortgeschrittenere Reifung der CLL-Zelle im Keimzentrum und somit einen post-germinalen Ursprung der Neoplasie hin, während ein unmutierter IGHV-Status eine geringere germinale Reifung und somit eine unreifere Ausgangszelle impliziert. Neuere epigenetische Analysen bestätigen deutliche Unterschiede in der epigenetischen Konfiguration zwischen IGHV-mutierten und -unmutierten CLL Proben und bestätigen somit, dass die Einteilung in IGHV-mutierte und -unmutierte Fälle die Ausreifung und epigenetische Programmierung der CLL gut widerspiegelt.<sup>13–16</sup> Ein unmutierter IGHV-Status ist mit einer unreiferen Ausgangszelle und verschiedenen Hochrisiko-Merkmalen, sowie einem schlechteren Therapieansprechen assoziiert.<sup>5</sup>

Außerdem sind insbesondere die zytogenetischen und molekulargenetischen Aberrationen der malignen Zellen für die Prognose-Einteilung relevant. In einem Großteil (bis zu 70%) der Fälle zeigt sich eine zytogenetische Aberration (am häufigsten del13q14 (ca. 50%), del11q22 (ca. 15%), tri12 (ca. 15%) und del17p13 (ca. 7%)).<sup>17–20</sup> Während CLL-Patienten mit del13 eine vergleichsweise günstige Prognose haben, zeigen Fälle mit einer del11 einen rascheren Progress der Erkrankung, und insbesondere Fälle mit einer del17p als Hochrisiko-Alteration zeigen einen noch früheren Progress. Biologisch liegt letzterem eine Deletion des auf Chromosom 17p liegenden Tumorsuppressor-Gens *TP53* zugrunde. Entsprechend zeigen auch Patienten mit einer Mutation des *TP53* Gens (ca. 8%) einen schlechten Verlauf, wobei del17p und *TP53*-Mutationen häufig gemeinsam auftreten.<sup>19</sup> Andere rekurrente molekulargenetische Aberrationen sind Mutationen der Gene *SF3B1*, *NOTCH1* und *ATM* (auf Chromosom 11 liegend und daher mit del11q assoziiert),<sup>19</sup> obwohl diese routinemäßig nicht für die Risikoklassifizierung herangezogen werden.

Der IGHV-Status, *TP53*-Alterationen (17p-Deletion und/oder *TP53* Mutationen) zusammen mit dem klinischen Binet-Status,  $\beta$ 2-Mikroglobulin (als laborchemischer Marker für die Tumormasse) sowie das Alter konnten als unabhängige Prognose-Faktoren identifiziert und im CLL-International Prognostic Index (CLL-IPI) zusammengefasst werden.<sup>21</sup>

## 2.1.2. Therapie

Die Behandlung der CLL hat in den letzten Jahren enorme Fortschritte gemacht. Vor einigen Jahren bestand die Standardtherapie aus Immun-Chemotherapie (FCR-Schema (Fludarabin/Cyclophosphamid/Rituximab) oder BR-Schema (Bendamustin/Rituximab)), worunter sich bereits gute Therapieerfolge zeigten (z. B. in der CLL8-Studie für FCR ein PFS von 56,8 Monate und ein 5-Jahre-Überleben von 78,7%).<sup>22</sup> In Folge des Verständnisses onkogener Treibermechanismen der CLL wie des B-Zell-Rezeptor (BZR) Signalweges sowie der Überexpression anti-apoptotischer BCL-2 Moleküle, konnten zielgerichtete Therapien gegen diese einen verbesserten Therapieerfolg bei gleichzeitig verminderter Toxizität ermöglichen. Insbesondere BTK-Inhibitoren (BTKi: initial Ibrutinib und Nachfolgepräparate wie Acalabrutinib oder Zanubrutinib) und BCL-2-Inhibitoren (BCL2i: Venetoclax) in Kombination mit dem CD20-Antikörper (CD20-AK) Obinutuzumab stellen heute die Therapie der ersten Wahl der CLL dar (vergleiche Abbildung 1).<sup>4,23</sup> Durch diese Therapien zeigt sich im Großteil der Patienten eine gute Krankheitskontrolle über viele Jahre. Da BCL2i-haltige Therapien eine sehr tiefe Remission (mit undetektierbarer minimaler Resterkrankung (engl. uMRD)) ermöglichen, können diese in zeitlich begrenzten Therapieregimen eingesetzt werden, während BTK-Inhibitoren i. d. R. eine Dauertherapie erfordern. Aktuell werden außerdem zeitlich begrenzte Kombinationen aus BTKi und BCL2i als Erstlinientherapie intensiv in klinischen Studien untersucht.<sup>24–29</sup> Dabei haben diese Kombinationen eine sehr gute Wirksamkeit mit hohen uMRD-Raten bei guter Verträglichkeit. Ob sie eine statistisch signifikante Überlegenheit gegenüber anderen Schemata, insbesondere dem ebenfalls zeitlich begrenzten Venetoclax/Obinutuzumab-Schema haben, ist aktuell noch Gegenstand klinischer Studien. Die Kombination von Ibrutinib und Venetoclax ist seit 2022 in Deutschland zugelassen. Gemäß der deutschen Onkopedia- und europäischen ESMO-Leitlinie stellen sowohl die BTKi-Dauertherapie als auch die zeitlich begrenzte Kombination Venetoclax/Obinutuzumab oder Ibrutinib/Venetoclax empfohlene Optionen zur Erstlinientherapie der CLL dar (Abbildung 1).<sup>4,23</sup> Die Wahl der Therapie sollte patientenindividuell je nach Komorbidität, Komedikation und Patientenwunsch erfolgen. Generell sollten aufgrund eines längeren Ansprechens BTKi bei Vorliegen einer genetischen Hochrisikosituation (*TP53* Alteration oder komplex aberranter Karyotyp), ansonsten aufgrund der zeitlich begrenzten Therapiedauer Venetoclax/Obinutuzumab oder Ibrutinib/Venetoclax

bevorzugt werden. Ibrutinib/Venetoclax kann aufgrund der komplett oralen Applikation und eines verminderterem Tumorlyse-Risikos auch ausschließlich ambulant verabreicht werden.<sup>4,23</sup> Eine Dreifach-Therapie aus BTKi/BCL2i/CD20-AK wird aktuell nicht empfohlen, ihr Stellenwert insbesondere für Hochrisikopatienten ist aktuell Gegenstand klinischer Studien.<sup>30</sup>

Trotz guter Therapieoptionen ist eine Heilung der CLL durch zielgerichtete Substanzen nach gegenwärtigem Kenntnisstand jedoch nicht möglich. Obwohl potenziell kurativ, wird eine allogene Stammzelltransplantation aufgrund der hohen Toxizität, des meist hohen Alters der Patienten sowie der meist guten Kontrollierbarkeit der Erkrankung durch andere Therapien nur sehr selten angewendet.<sup>31,32</sup> Im Verlauf zeigen sich daher bei vielen Patienten Rezidive der Erkrankung. Zur Therapie dieser erfolgt in der Zweitlinie der Wechsel von BTKi-Dauertherapie auf BCL2i/CD20-AK und umgekehrt (Abbildung 1).<sup>4,23</sup> Außerdem können Patienten mit einem guten initialen Ansprechen auf eine zeitlich begrenzt Therapie (i. d. R. Ansprechen > 3 Jahren) erneut mit dieser behandelt werden.<sup>23</sup> Wie die Zweitlinientherapie nach Ibrutinib/Venetoclax aussieht ist in Anbetracht der Neuheit dieser Kombination aktuell noch nicht etabliert.

Während BTKi- und BCL2i-haltige Therapien somit gut wirksame Optionen der Erst- und Zweitlinie sind, ist die Versorgung von Patienten, die bereits mit beiden Substanzklassen vortherapiert und somit doppelt refraktär (sog. 2R-Patienten) sind, aktuell ungeklärt. Durch den zunehmenden Einsatz der zielgerichteten Substanzen und Kombination dieser in der Erstlinie, ist zukünftig mit einem vermehrten Auftreten dieser doppelt refraktären Patienten zu rechnen.<sup>33</sup> Ebenso ist die Therapie der Richter-Transformation gegenwärtig unzureichend, sodass insbesondere in diesen beiden Situationen ein großer Bedarf an neuen Therapieoptionen besteht.

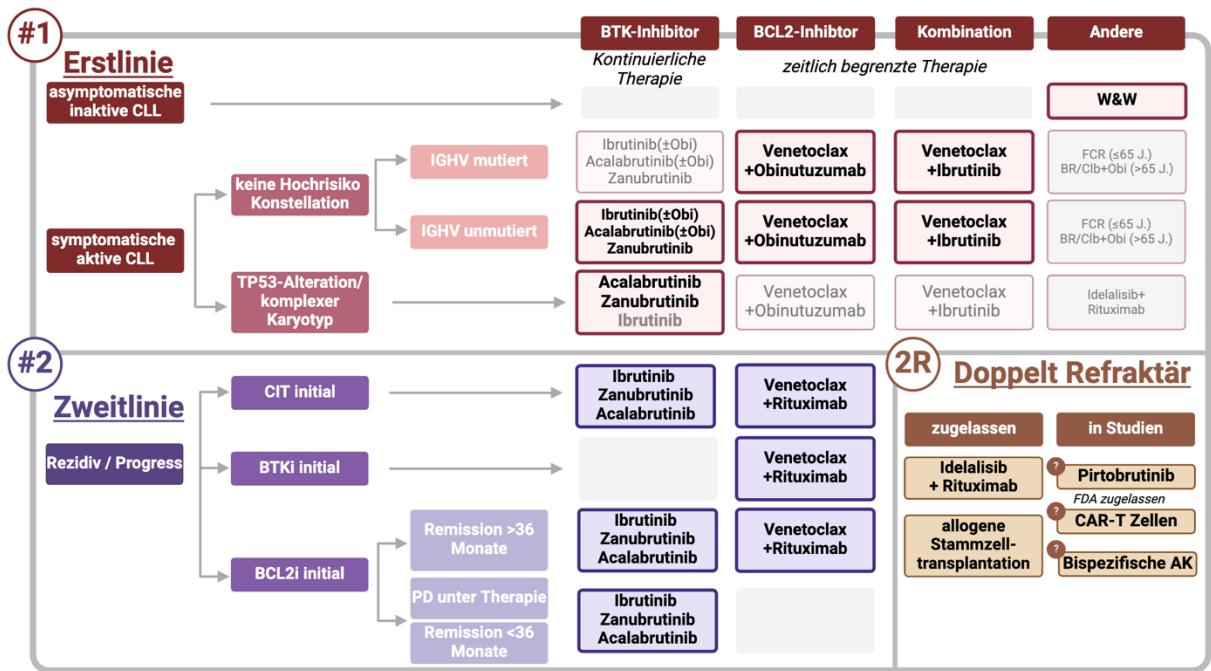


Abbildung 1: Übersicht über die CLL-Therapie.

Die Übersicht wurde Anhand der aktuellen Onkopolia-Leitlinie<sup>4</sup> erstellt (Stand März 2025). W&W: Watch & Wait; Obi: Obinutuzumab; CIT: Chemo-Immuntherapie; BTKi: BTK-Inhibitor; BCL2i: BCL-2-Inhibitor; AK: Antikörper. Erstellt mit Bioredner.com

## 2.2 Das Tumormikromilieu der CLL

Zentrale Aspekte der CLL-Pathogenese sind eine moderat gesteigerte Proliferation bei gleichzeitig ausgeprägter Apoptose-Resistenz.<sup>5</sup> Erstere wird in B-Zellen maßgeblich von einer Aktivierung des B-Zell-Rezeptor-Signalweges getrieben, in welchem sich jedoch in der untherapierten CLL im überraschenden Gegensatz zu anderen B-Zell Lymphomen kaum onkogene Treibermutationen finden.<sup>19,20</sup> Stattdessen scheint die Aktivierung des BZR und die Stimulation der Proliferation von Umgebungssignalen abzuhängen. Untersuchungen mit dem Wasserstoffisotop Deuterium zeigten, dass die Proliferation der malignen Zellen insbesondere in den Lymphknoten stattfindet.<sup>34</sup> Aktuelle Einzelzellanalysen bestätigen, dass sich proliferierende und aktivierte Zellen ausschließlich in den Lymphknoten befinden, während sich im peripheren Blut ruhende Zellpopulationen nachweisen lassen.<sup>35</sup> Die malignen Zellen teilen sich in den Lymphknoten und schwemmen anschließend ins periphere Blut aus, wo sie einen ruhenden Zustand einnehmen. Auch die Apoptose-Resistenz der CLL-Zellen wird in Teilen durch Signale in den Geweben gefördert. Neben einer CLL-intrinsischen epigenetischen und transkriptionellen Dysregulation anti-apoptotischer Proteine wie BCL-2,<sup>36–38</sup> induziert auch der Kontakt zu nicht malignen Umgebungszellen deren Überexpression, sodass Zellen die frisch aus dem Lymphknoten migriert sind verglichen mit solchen die länger im peripheren Blut waren, eine erhöhte Expression zeigen.<sup>35,39</sup>

Entsprechend ist die Interaktion leukämischer Zellen mit dem Tumormikromilieu (TMM) (engl. Tumor microenvironment (TME)) - der Gesamtheit nicht-maligner, zellulärer sowie azellulärer Komponenten in der lokalen Umgebung neoplastischer Zellen - ebenfalls kritischer Bestandteil der CLL-Pathogenese. Der Vergleich zwischen CLL-Zellen aus dem peripheren Blut und dem Lymphknoten zeigt, dass die Interaktion mit dem TMM verschiedene proleukämische Signalwege stimuliert, u. a. den BZR-Signalweg aber auch weitere inflammatorische Signalwege wie NFkB, TLR, NOTCH und MYC.<sup>35</sup> Die Abhängigkeit der CLL-Zellen von diesen supportiven TMM-Signalen zeigt sich auch beispielhaft an der *in vitro* Kultur leukämischer Zellen: Während isoliert kultivierte CLL-Zellen rasch absterben, kann das Hinzufügen supportiver Umgebungszellen (wie Monozyten, T-Zellen oder Fibroblasten) die Viabilität der CLL-Zellen über längere Zeit erhalten.<sup>40–42</sup> Die Proliferation der leukämischen Zellen *in vitro* lässt sich jedoch nur durch die Kombination verschiedener Stimuli (wie anti-IgM, CpG, CD40-L, IL-4 und IL-21) induzieren, während die Aktivierung einzelner Signalwege hierzu unzureichend ist.<sup>43</sup> Dabei scheint insbesondere die Ko-Stimulation durch den im TMM auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimierten CD40-Ligand (CD40-L) durch u. a. die Aktivierung des NFkB-Signalweg zentral für die Induktion der Proliferation von CLL-Zellen zu sein, ist jedoch isoliert ebenfalls unzureichend.<sup>44</sup> Dies verdeutlicht, dass die CLL-Zellen im TMM Teil eines komplexen

Netzwerk mit verschiedenen Interaktoren sind, das für das Überleben, die Proliferation aber auch die Migration der CLL Zellen nötig ist.<sup>45</sup>

### 2.2.1. Zelluläre Zusammensetzung des Tumormikromilieus

Im Tumormikromilieu der lymphatischen Organe interagieren die Leukämie-Zellen bidirektional mit verschiedenen umgebenden Zellen wie Makrophagen, T-Zellen, NK-Zellen oder mesenchymalen Stroma-Zellen (Abbildung 2). Der Austausch wird sowohl durch direkte Zell-Zell Interaktionen als auch durch sezernierte Faktoren wie Zytokine, extrazelluläre Vesikel (EV) und extrazelluläre Matrix (EZM) vermittelt. Hierdurch werden nicht nur die leukämischen Zellen stimuliert und entsprechende Signalwege aktiviert (s. o.), sondern es findet auch eine Anpassung der nicht-malignen Zellen statt.<sup>45</sup> Die leukämischen Zellen schaffen sich so durch die Modulation der Umgebungszellen eine unterstützende Nische, in der sie proliferieren und vor Therapie teilweise geschützt sind.

Beispielsweise zeigt sich durch Kontakt zu CLL-Zellen *in vitro* eine Polarisierung von Monozyten des peripheren Blutes zu unterstützenden „Nurse-like-cells“ - speziell konditionierten Tumor-assoziierten Makrophagen mit einer Leukämie-supportiven M2-Polarisation.<sup>41,46</sup> Makrophagen im CLL-TMM unterstützen die CLL-Viabilität und regulieren die Adhäsion und das Homing (die gezielte Migration der CLL in die supportiven Gewebe) der malignen Zellen durch pro-leukämische Faktoren wie BAFF, APRIL, CXCL12, CCL21 oder CD2.<sup>47–50</sup> Da durch die Ablation von Makrophagen im TMM *in vivo* die Progression der Leukämie ausbleibt,<sup>51,52</sup> sind diese Zellen unverzichtbare Bestandteile eines supportiven TMMs und ihre Modulation von therapeutischem Interesse.

Auch CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen im TMM haben wichtige CLL-unterstützenden Funktionen. Durch die Expression von CD40-L sowie die Sekretion verschiedener Zytokine (IL-2, IL-4, IL-15, IL-21) unterstützen sie die CLL Viabilität *in vitro*,<sup>53</sup> und sie sind gleichfalls eine unabdingbare Voraussetzung für das Anwachsen einer CLL-ähnlicher Neoplasie im Mausmodell,<sup>54</sup> auch wenn die genauen molekularen Interaktionen unzureichend verstanden sind. Im Gegensatz dazu führt die Ablation zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Mausmodell zu einem akzelerierten Verlauf.<sup>54</sup> CLL-Zellen können jedoch die Leukämie-restriktive Funktion dieser und anderer zytotoxischer Zellen wie NK-Zellen oder γδ-T-Zellen supprimieren bzw. sich dieser entziehen, was man als Immun-Evasion bezeichnet.<sup>55,56</sup> So kommen T-Zellen zwar vermehrt im peripheren Blut von CLL-Patienten vor, die vorhandenen Zellen zeigen jedoch eine Effektor-Zell Polarisierung, verminderte Zytotoxizität und verstärkte Exhaustion. Außerdem ist die Bildung einer Immun-Synapse, die für die T-zelluläre Zytotoxizität erforderlich ist, zwischen T-Zellen und CLL-Zellen gestört.<sup>57–59</sup> Auch NK-Zellen zeigen eine verminderte CLL-gerichtete

Zytotoxizität.<sup>60</sup> Diese Immun-Dysfunktion wird durch die Häufung weiterer immun-suppressiver Zelltypen wie regulatorische T-Zellen oder myeloide Suppressorzellen bestärkt.<sup>61,62</sup> Schlussendlich spielen auch nicht-hämatopoetische Zellen wie Fibroblasten und Endothelzellen, sowie die sezernierte extrazelluläre Matrix eine Leukämie-supportive Rolle im Tumormikromilieu, die im Folgenden näher beschrieben wird.

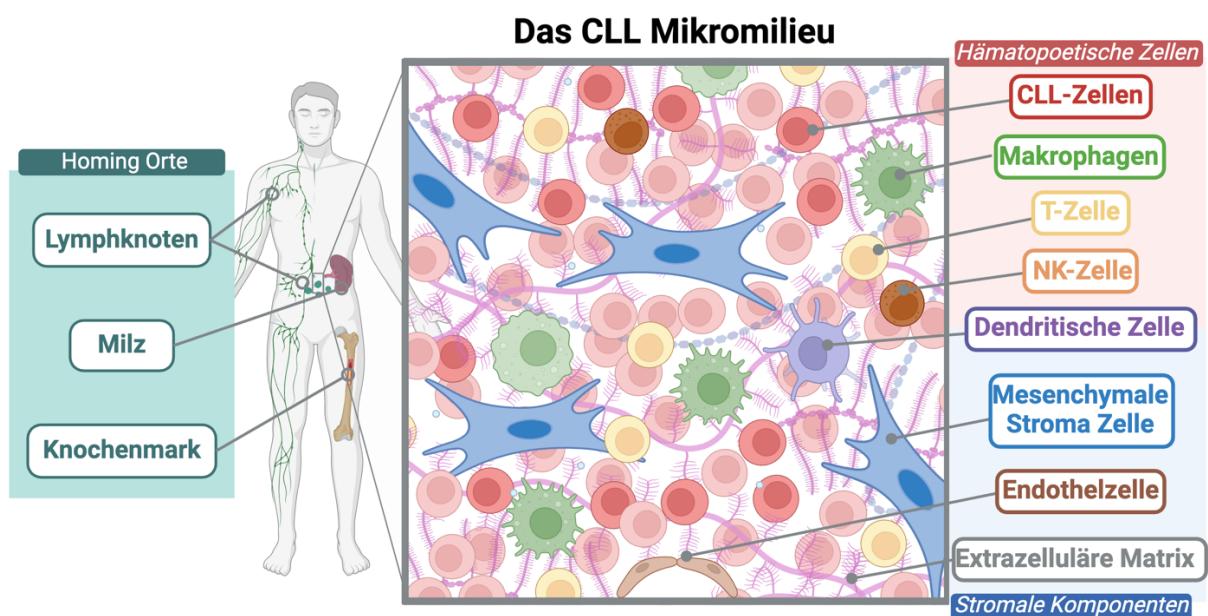


Abbildung 2: Das CLL-Tumormikromilieu.

Übersicht über die CLL-Homing Organe und die zelluläre Komposition des Mikromilieus in diesen Organen. Erstellt mit Bioredner.com

## 2.2.2. Mesenchymale Zellen im CLL-Tumormikromilieu

Mesenchymale Zellen tragen durch die Sekretion von EZM und Zytokinen einen bedeutenden physiologischen Beitrag zum strukturellen Aufbau, der Organisation und der Homöostase lymphatischen Gewebes bei.<sup>63</sup> Spezialisierte Populationen mesenchymaler Zellen (wie fibroblastische Retikulumzellen (FRZ) oder follikulär dendritische Zellen (FDZ)) zeigen eine spezifische Verteilung in gesunden Lymphknoten und der Milz mit distinkten, immunregulatorischen Funktionen. Obwohl diese Zellpopulationen in Folge der Infiltration durch neoplastische CLL-Zellen insgesamt selten zu finden sind, spielen sie dennoch eine wichtige Rolle im TMM der CLL.<sup>64</sup> Da der Phänotyp und der zelluläre Ursprung der mesenchymalen Zellen im CLL-TMM nur ungenau charakterisiert ist, werden sie häufig zusammenfassend als mesenchymale Stromazellen (MSZ) bezeichnet. Aufgrund ihrer relativen Rarität im TMM stammen die meisten Erkenntnisse zum Phänotyp und Funktion dieser MSZ aus *in vitro* Experimenten, während *in vivo* und humane *in situ* Daten äußerst selten sind. In der bidirekionalen MSZ-CLL Interaktion lassen sich „Effektormechanismen“,

durch die MSZ die CLL-Zellen beeinflussen, von „Induktionsmechanismen“, durch die CLL-Zellen die MSZ regulieren, unterscheiden. Beide werden im Folgenden detailliert dargestellt und sind in Abbildung 3 zusammengefasst.

### **(1) Effektormechanismen der CLL-Unterstützung durch Stroma Zellen**

Einer der zentralen Signalwege, der in aktivierten CLL-Zellen durch Kontakt zum TMM stimuliert wird, ist der NF<sub>k</sub>B Signalweg.<sup>35,65</sup> Die Aktivierung von NF<sub>k</sub>B kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden und bewirkt unter anderem die Überexpression anti-apoptotischer Proteine, wodurch das Überleben und die Therapieresistenz der neoplastischen Zellen gefördert wird.<sup>66,67</sup> *In vitro* zeigte die Interaktion zwischen verschiedenen Stroma-Zellen und CLL-Zellen einen deutlichen CLL-protectiven Effekt, der zumindest in Teilen durch die NF<sub>k</sub>B vermittelte Induktion anti-apoptotischer Proteine (insbesondere BCL-XL und MCL-1) bedingt war.<sup>40,68–70</sup> Zwar tragen auch von MSZ sezernierte Zytokine zur Aktivierung von NF<sub>k</sub>B bei (z. B. BAFF, APRIL oder VEGF),<sup>64,71,72</sup> dennoch ist das gesteigerte leukämische Überleben maßgeblich von direktem Zell-Zell Kontakt zu den Stroma-Zellen abhängig.<sup>40,73,74</sup> Neben der NF<sub>k</sub>B Aktivierung ist auch die Interaktion via VCAM-1 auf Stroma-Zellen und konsekutiver Aktivierung des Transkriptionsfaktors TFEB in CLL-Zellen an der Induktion der anti-apoptotischen Proteine beteiligt.<sup>68</sup> Somit kann der Kontakt zu Stroma-Zellen eine reduzierte Sensibilität gegenüber Chemotherapie oder BCL-2-Inhibitoren wie Venetoclax induzieren.<sup>68</sup> Die direkten Zell-Zell Interaktionen von CLL-Zellen und Stroma-Zellen führen außerdem zur Aktivierung weiterer Signalwege, wie dem NOTCH Signalweg, WNT-Signalweg und der BZR-Aktivierung.<sup>75</sup> Es konnte gezeigt werden, dass in einem Teil von CLL-Patienten die Aktivierung des BZR-Signalweges durch bestimmte stereotype B-Zell-Rezeptoren ausgelöst wird, welche die stromalen Autoantigene Vimentin und Calreticulin erkennen.<sup>76</sup>

Neben der Induktion anti-apoptotischer Signale beeinflussen Stromazellen auch die Migration und Adhäsion der CLL-Zellen und regulieren somit die Kompartimentalisierung und Komposition des Mikromilieus. Die stromale Sekretion von Zytokinen wie CXCL10, CXCL12, CXCL13, CCL19 oder CCL21 vermittelt das Homing der leukämischen Zellen in die lymphoiden Gewebe.<sup>77–81</sup> Dort adhärieren CLL-Zellen via der Integrin-Bindung von ITGB-1/ITGB-2/LFA-1/VLA-4 an stromale Proteine wie FN-1/VCAM-1/ICAM-1, was die Retention der leukämischen Zellen im Mikromilieu begünstigt.<sup>82–86</sup> Die Migration und Retention der CLL-Zellen ermöglicht die weiteren supportiven Interaktionen mit dem TMM. Die funktionelle Bedeutung dieser Kompartimentalisierung wird unter anderem durch die therapeutische Effektivität von BTK-Inhibitoren wie Ibrutinib gezeigt, die durch Inhibition der CXCL12 vermittelten Migration und VLA-4-vermittelten Adhäsion eine Umverteilung der CLL Zellen aus

den lymphatischen Geweben in das periphere Blut und das nachfolgende Absterben leukämischer Zellen bewirken.<sup>87–89</sup>

Neben diesen direkten Effekten auf die leukämischen Zellen beeinflussen die MSZ die CLL-Pathogenese auch indirekt über Effekte auf andere Umgebungszellen im TMM. Durch die Sekretion von Zytokinen wird die Rekrutierung von Immunzellen beeinflusst, beispielsweise die Rekrutierung von Monozyten durch CCL2.<sup>90</sup> Diese immunmodulatorischen Funktionen der Fibroblasten ist in der CLL - im Gegensatz zu gut beschriebenen Mechanismen in soliden Tumoren – jedoch bisher kaum untersucht.

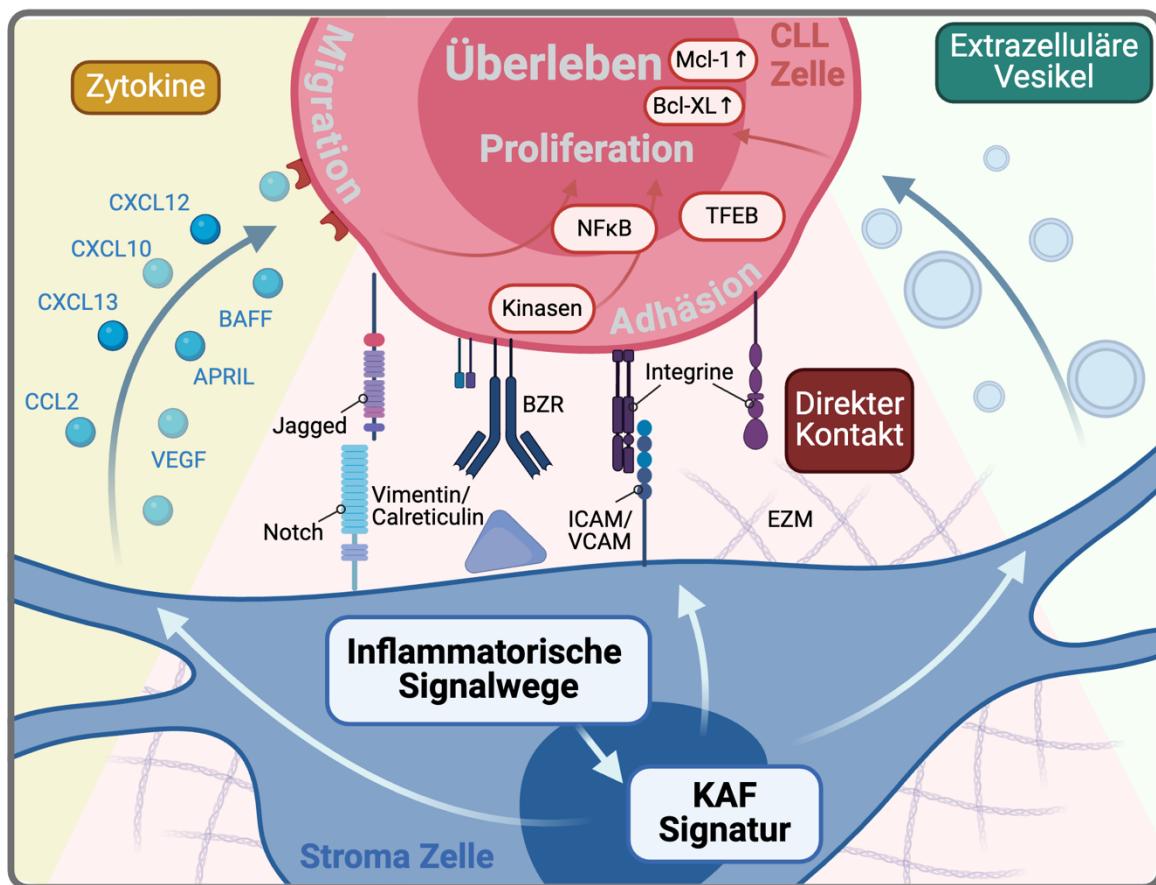


Abbildung 3: CLL-Stroma Interaktionen.

Übersicht über Mechanismen der Interaktion zwischen CLL- und Stroma-Zellen, die zu einem gesteigerten Überleben der CLL-Zellen führen. Adaptiert nach<sup>45,64</sup>. Erstellt mit Bioredner.com

## (2) Induktionsmechanismen in MSZ durch Kontakt zu CLL-Zellen

Umgekehrt aktiviert die Interaktion zwischen CLL-Zellen und Fibroblasten im TMM auch die stromalen Zellen, sodass diese eine phänotypische Adaptation zeigen, die der Aktivierung von Fibroblasten im TMM solider Tumore zu sog. Krebs assoziierten Fibroblasten (KAF) ähnelt (s. u.).<sup>91</sup> Dies zeigt sich *in situ* an einer Überexpression entsprechender KAF-Marker wie FAP und α-SMA im Vergleich zu gesundem Gewebe.<sup>92,93</sup> Diese Induktion von α-SMA und FAP in Fibroblasten lässt sich *in vitro* durch den Kontakt zu leukämischen Zellen reproduzieren.<sup>94–96</sup> Mechanistisch liegt dieser Aktivierung der MSZ durch den Kontakt zu CLL-Zellen die Stimulierung inflammatorischer Kinase-Signalwege, insbesondere des NFκB Signalweges, in den Stromazellen zugrunde (zusammengefasst in Abbildung 4). Beispielsweise zeigen Lutzny et al. die Phosphorylierung und Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase PKC-β in mesenchymalen Zellen durch den Kontakt zu CLL-Zellen, was durch die Aktivierung von NFκB und metabolischer Veränderungen zu einer CLL-supportiven Adaptation führte.<sup>94,97</sup> Außerdem aktivieren CLL-Zellen über den direkten Kontakt zu MSZ den NOTCH2 Signalweg in diesen,<sup>75</sup> und von CLL-Zellen sezernierte Zytokine wie PDGF stimulieren den PI3K/AKT Signalweg.<sup>98</sup> Im Eμ-TCL1-Mausmodell kann Lymphotoxin αβ über den Lymphotoxin-Rezeptor beta (LTβR) - ein bekannter Regulator des NFκB Signalweges -<sup>99</sup> stromale follikulär dendritische Zellen stimulieren und durch die induzierte Sekretion von CXCL13 die Migration der CLL-Zellen steuern.<sup>100</sup>

Außerdem scheinen extrazelluläre Vesikel an der Aktivierung von MSZ beteiligt zu sein.<sup>64,95,101,102</sup> Neben der Übertragung von miRNAs – kurzen RNA Fragmente mit regulatorischer Funktion der Gen-Expression - konnte die Übertragung verschiedener mRNAs durch EVs auf Stroma-Zellen gezeigt werden, was u. a. zur Transkription von Kinassen wie LYN und SYK führt.<sup>101</sup> Die EVs induzieren außerdem die Phosphorylierung dieser Kinassen wie AKT, ERK und LYN.<sup>95</sup>

Zusammenfassend aktiviert die Interaktion zwischen CLL-Zellen und MSZ verschiedene inflammatorische Signalwege mit der zentralen Aktivierung von NFκB, was zur Aktivierung einer KAF ähnlichen Signatur in den Stromazellen beiträgt. Diese fördert gleichsam die Produktion inflammatorischer Zytokine und somit die Entstehung eines inflammatorischen Mikromilieus, das die CLL Viabilität, Proliferation, Migration und Immuninteraktion beeinflusst.<sup>45</sup>

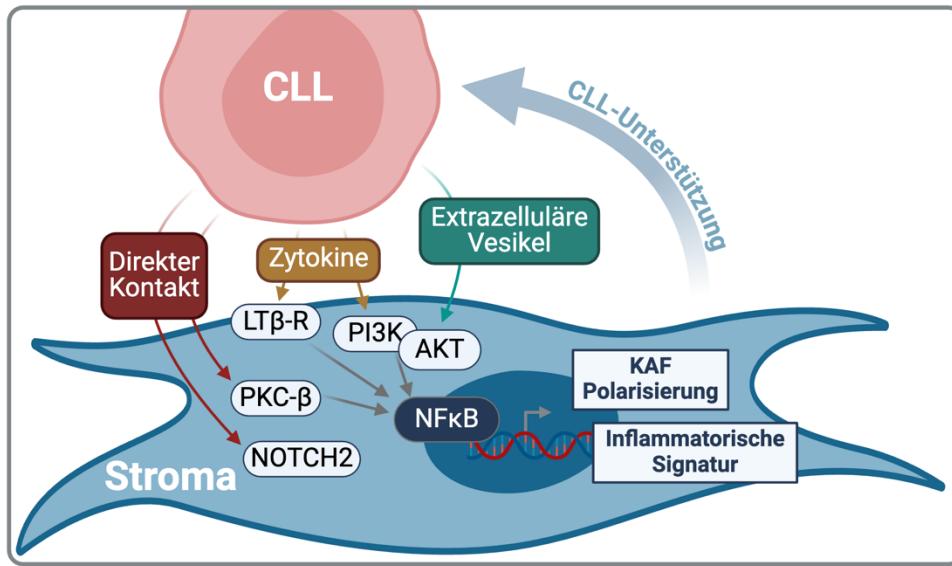


Abbildung 4: Reprogrammierung von Stroma-Zellen durch CLL-Kontakt.

Übersicht über die Mechanismen, durch die der Kontakt zu CLL-Zellen eine inflammatorische Signatur und KAF-Polarisierung in Stroma-Zellen induziert. Erstellt mit Bioredner.com

## 2.3 Krebs assoziierte Fibroblasten

Wie zuvor dargestellt ähneln mesenchymale Zellen im CLL-Mikromilieu in ihrem induzierten Phänotyp und ihrer Funktion den Krebs assoziierten Fibroblasten (KAF) (engl. Cancer associated fibroblast (CAF)) solider Tumore, dem häufigsten Bestandteil ihres TMMs. Diese Zellpopulation umfasst mesenchymale Zellen in der Umgebung maligner Zellen, die durch die Interaktion mit diesen aktiviert wurden und infolgedessen zentrale Aspekte der Tumobiologie sowie die Komposition und Regulation des TMMs beeinflussen.<sup>103</sup> Da KAF in soliden Entitäten deutlich umfassender charakterisiert sind als in hämatologischen Erkrankungen, werden diese Erkenntnisse hier zusammengestellt um den Vergleich mit den MSZ im CLL-TMM zu ermöglichen.

Physiologisch generieren Fibroblasten den Großteil des Bindegewebes und tragen maßgeblich zur Gewebe-Homöostase bei. Durch Sekretion von extrazellulärer Matrix regulieren sie die Gewebearchitektur und durch Zytokin-Sekretion die Migration verschiedener Zellpopulationen. Die Aktivierung von Fibroblasten hat eine wichtige Funktion in der Wundheilung und Koordinierung von Entzündungsreaktionen.<sup>103</sup> Während normale Fibroblasten und ihre EZM zunächst eine tumor-restriktive Funktion haben können,<sup>104,105</sup> werden die physiologischen Wundheilungs-Reaktionen durch neoplastische Zellen „ausgenutzt“, sodass die Fibroblasten im Verlauf der Erkrankung zunehmend zu einer Krebs-unterstützenden Zellpopulation umprogrammiert werden.<sup>106</sup> KAF unterstützen die Formierung und Progression von Tumoren und erleichtern deren Metastasierung durch verschiedene Mechanismen. Die grundlegenden Erkenntnisse zur Funktion und Pathophysiologie der KAF scheinen über verschiedene Tumorentitäten konstant zu sein.<sup>107,108</sup> Dies ist wahrscheinlich auf die Aktivierung physiologischer Signalwege in KAF zurückzuführen, da diese im Gegensatz zu den malignen Zellen keine genetischen Aberrationen aufweisen. Entsprechend kann angenommen werden, dass auch MSZ im TMM lymphatischer Erkrankungen einige Parallelen zu KAF solider Tumore aufweisen, auch wenn diese bisher nicht systematisch untersucht worden sind (siehe Abschnitt 2.3.2.).

Forschungsarbeiten der letzten Jahre konnten insbesondere die Heterogenität der KAF im Hinblick auf ihren zellulären Ursprung, ihren Phänotyp, ihre Adaptation sowie ihre Funktion aufzeigen.<sup>106</sup> Diese Heterogenität macht eine genaue Definition der KAF schwierig, sodass meistens alle fibroblastischen Zellen im TMM als KAF zusammengefasst werden. Entsprechend ist auch die phänotypische Identifizierung von KAF über einzelne Marker-Proteine/Gene kompliziert. Bisher lassen sich keine einzelnen Marker zur Identifizierung und Isolation spezifischer KAF Populationen definieren, außerdem sind viele der potenziellen Marker auch auf anderen Zellpopulationen exprimiert (z. B. FAP auf Makrophagen),<sup>109</sup> sodass

immer Signaturen verschiedener Marker zur Identifikation von KAF Populationen genutzt werden müssen.<sup>106</sup>

Heterogene Herkunft: Die KAF im TMM solider Tumore können verschiedenen Ursprungs sein. Ein Großteil der Zellen leitet sich aus Gewebe-residenten Fibroblasten ab, die bereits eine vorbestehende Organ-abhängige Heterogenität zeigen.<sup>110</sup> Diese werden durch die Zytokin-Sekretion maligner Zellen und infiltrierender Immunzellen (z. B. TGF-β, PDGF, IL-1, IL-6) sowie Änderungen der Gewebe-Eigenschaften (beispielweise gesteigerte Hypoxie, freie Radikale oder Gewebe-Stefheit) zu KAF rekrutiert. Gleichzeitig können die genannten Faktoren auch eine Transdifferenzierung lokaler, nicht-fibroblastischer Umgebungszellen, wie Adipozyten, Endothelzellen oder Perizyten, zu KAF bewirken.<sup>103</sup> Schließlich können auch nicht ortsständige Zellen, beispielsweise mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark in das TMM rekrutiert werden und tragen zum KAF-Pool bei.<sup>111</sup>

Heterogener Phänotyp: Die Analyse von KAF solider Tumore mit modernen Einzelzellmethoden konnten verschiedene KAF-Populationen mit unterschiedlichem Phänotyp definieren.<sup>108,112</sup> Erstmalig erfolgte die Unterscheidung verschiedener KAF-Subgruppen im Pankreas-Karzinom, wo myofibroblastische KAF (myKAF) und inflammatorische KAF (iKAF) differenziert werden konnten.<sup>113,114</sup> Diese unterschiedlichen Populationen konnten in ähnlicher Ausprägung in den meisten anderen Tumorentitäten ebenfalls identifiziert werden.<sup>103,106</sup> MyKAF sind EZM produzierend, zeichnen sich u. a. durch Expression des Zytoskelett-Proteins α-SMA aus und sind räumlich nah an den malignen Zellen lokalisiert. In etwas größerer Distanz zu den malignen Zellen liegt die Subpopulation der inflammatorischen KAF, die verschiedene Zytokine (u. a. IL-6 und CXCL12) sezerniert.

Drittens wurden in einigen Entitäten antigenpräsentierende KAF (apKAF) beschrieben, die sich am ehesten von mesothelialen Zellen ableiten und durch die Expression von antigenpräsentierenden MHC-II Molekülen bei gleichzeitigem Fehlen klassischer Ko-stimulatorischer Moleküle charakterisiert sind.<sup>115</sup> Funktionell sind sie mit immunmodulatorischen Eigenschaften assoziiert, können regulatorische T-Zellen induzieren und das Ansprechen auf Immuntherapien modulieren.<sup>116</sup>

Weitere Studien identifizieren in verschiedenen untersuchten Entitäten ein breites Spektrum an weiteren Subpopulationen (z. B. vaskuläre KAF, die mit Angiogenese assoziiert sind, cyclingKAF mit Expression von Zellzyklus Genen oder Subpopulationen, die die Ursprungs Zelle wiederspiegeln, wie adipogene KAF oder Endothel-zu-Mesenchym KAF)<sup>106,107,112,117</sup> oder differenzieren die zuvor genannten Populationen, wie iKAF und myKAF in weitere Untergruppen mit unterschiedlicher Aktivierung auf.<sup>118</sup> Eine abschließende

entitätsübergreifende Klassifizierung der KAF ist noch nicht etabliert, vieles deutet jedoch darauf hin, dass grundlegende Populationen, Funktionen und Reprogrammierungs-Wege über verschiedene Tumor-Entitäten gleich sind.

Heterogene Funktionen: Entsprechend ihrer divergenten Herkunft und unterschiedlichen Phänotypen ist auch die Funktion der KAF heterogen. Durch die Produktion verschiedener Zytokine (wie Wachstumsfaktoren, Interleukine und Chemokine) und extrazellulärer Matrix, aber auch durch metabolische Interaktionen, induzieren KAF einerseits die Proliferation und Expression anti-apoptotischer Proteine in malignen Zellen und wirken somit Tumor-supportiv. Außerdem können KAF die Angiogenese und Metastasierung von Tumoren unterstützen und somit zum Fortschreiten der malignen Erkrankung beitragen (ausführlich zusammengetragen in: <sup>106,119</sup>). Andererseits zeigte sich in Depletions-Experimenten jedoch auch eine tumor-restriktive Funktion bestimmter KAF-Populationen, da sich nach Depletion dieser Populationen das Tumorwachstum steigerte.<sup>120,121</sup>

Drittens haben KAF immunmodulierende Wirkung auf Umgebungszellen im TMM, die sich schlussendlich sowohl tumor-restriktiv wie tumor-supportiv auswirken können. Durch die Sekretion verschiedener Zytokine (z. B. TGF-β, IL-6, CXCL1 oder CXCL12) steuern sie die Rekrutierung und Aktivierung verschiedener hämatopoetischer Zellen und können beispielsweise T-Zellen durch chronische Entzündungssignale ermüden oder tumor-supportive monozytäre Zellen rekrutieren. Auch die Sekretion von EZM kann immunmodulatorisch wirken, indem beispielsweise die Infiltration von Leukozyten in den Tumor erschwert wird.<sup>122,123</sup>

Die pharmakologische Intervention an KAF zur Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen wird intensiv beforscht.<sup>119</sup> Neben Ansätzen zur Ablation/Unterdrückung tumor-supportiver KAF-Populationen, beispielsweise durch Antikörper gegen FAP oder KAF-gerichteter CAR-T Zellen, wird insbesondere die Inhibition der Aktivierung und Polarisierung der KAF erforscht. Ziel ist die Modulierung der aktiven Signalwege, um die KAF in einen Tumor-restriktiveren bzw. weniger supportiven Phänotyp zu überführen. Hierzu ist ein detaillierteres Verständnis der Signalkaskaden und beteiligter Signalkomponenten nötig, um mögliche therapeutische Ansätze identifizieren zu können. Diese werden im kommenden Abschnitt kurz zusammengefasst.

### **2.3.1. Signalwege der KAF-Aktivierung**

Grundsätzlich trägt die Kombination vielfältiger Faktoren zur Aktivierung von KAF bei: Oxidativer Stress, metabolische Veränderungen, Modifikationen der umgebenden EZM, (Tumor-)sezernierte Faktoren (z. B. TGF- $\beta$ , Wachstumsfaktoren, inflammatorische Mediatoren, Interleukine), direkter Zell-Zell Kontakt sowie (therapie-assoziierte) DNA-Schäden sind an der Aktivierung von Fibroblasten im TMM beteiligt. Als Folge der Aktivierung intrazellulärer Signalwege kommt es zu einer epigenetischen Anpassung und anhaltenden Reprogrammierung der Fibroblasten.<sup>119</sup> Während zentrale Signalkaskaden der KAF-Aktivierung hier kurz skizziert werden, soll auf die spezifischen Aktivierungssignale, die zur Polarisierung der verschiedenen KAF-Subpopulationen führen, an dieser Stelle jedoch nicht im Detail eingegangen werden. Es ist jedoch wichtig zu betonen, dass der KAF-Subtyp nach Aktivierung nicht zwangsläufig fixiert ist, sondern KAF eine Plastizität besitzen und eine Modulation des KAF-Subtypen unter entsprechenden Bedingungen und Signalen möglich ist.<sup>114,124</sup>

Ein zentraler Faktor der Aktivierung von Fibroblasten ist der pleiotrope Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  wird von unterschiedlichen Zellen im TMM sezerniert oder aus der EZM freigesetzt, bindet anschließend an membranöse TGF- $\beta$ -Rezeptoren, die daraufhin intrazelluläre SMAD-Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und aktivieren. Physiologisch führt die TGF- $\beta$  Aktivität insbesondere im Rahmen der Wundheilung zur Entstehung von Kollagen-produzierenden Myofibroblasten.<sup>125</sup> Im TMM zeigen entsprechend insbesondere myofibroblastische KAF-Populationen eine TGF- $\beta$  Signatur mit Überexpression von Zielgenen wie CTGF, COL1A1 oder ACTA2. Außerdem konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  die Signalwege und Ausbildung eines inflammatorischen Phänotypen inhibieren kann,<sup>114</sup> während umgekehrt die Inhibierung von TGF- $\beta$  im Maus-Modell eine Reduktion myofibroblastischer KAF zu Gunsten einer Expansion immunmodulatorischer KAF vermittelt.<sup>124</sup> Dies zeigt die Plastizität der KAF-Differenzierung und hebt die Bedeutung von TGF- $\beta$  für deren Regulation hervor.

Die inflammatorische Polarisierung von KAF wird insbesondere durch den IL-1/JAK/STAT Signalweg stimuliert. Neben IL-1 lösen weitere inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6 oder LIF ebenfalls über die Aktivierung von Januskinasen (JAK) und STAT-Proteinen die Stimulation der NF $\kappa$ B Signalkaskade aus, was im Resultat zur Ausprägung einer inflammatorischen Signatur führt. Diese zeichnet sich durch Expression inflammatorischer Marker wie IL-6, CXCL8, CXCL1, CXCL12 und CCL2 aus.<sup>113,114</sup>

Die Interdependenz und Kombination dieser und vieler weiterer Signalkaskaden trägt zur Heterogenität der KAF bei. Die Plastizität der KAF-Phänotypen durch Hemmung der entsprechenden Signalwege impliziert, dass eine therapeutische Reprogrammierung der KAF zur Suppression der tumor-supportiven Funktionen der KAF möglich ist.

### 2.3.2. KAF in hämatologischen Erkrankungen

Die Aktivierung von mesenchymalen Zellen zu KAF im Tumormikromilieu scheint grundsätzlich ein universeller Prozess, unabhängig von der Tumorentität zu sein. Entsprechend konnte auch für verschiedene hämatologische Entitäten eine KAF-artige Aktivierung von mesenchymalen Zellen gezeigt werden (zusammengefasst in<sup>126,127</sup>). Allerdings sind im Vergleich zu soliden Entitäten KAF in hämatologischen Erkrankungen deutlich weniger untersucht, was insbesondere auch durch ihre relative Rarität im hämatologischen TMM bedingt ist. Während sie in soliden Tumoren mitunter die zelluläre Hauptkomponente des TMMs sind, stellen sie in hämatologischen Entitäten eine Minderheit dar.<sup>128</sup> Dennoch zeigen sowohl MSZ im Knochenmark von Patienten mit akuter Leukämie,<sup>129–131</sup>, Lymphom-Infiltration,<sup>132,133</sup> als auch die MSZ in Lymphom-befallenen Lymphknoten<sup>128,134–136</sup> Eigenschaften von KAF. *In vitro* stimulieren die malignen B-/myeloiden-Zellen in mesenchymalen Zellen KAF-Merkmale, wie die Expression von α-SMA/FAP oder TGF-β und NFκB Signalweg.<sup>129,136</sup> Die KAF wiederum wirken sich auf maligne Zellen hämatologischer Neoplasien pro-proliferativ und chemoprotektiv aus,<sup>126</sup> und können dadurch einen wichtigen Beitrag zum Fortschreiten dieser Erkrankungen leisten. Wie zuvor im Abschnitt 2.2.2. ausführlich zusammengefasst, zeigen auch mesenchymale Zellen im TMM der CLL die zentralen Eigenschaften von KAF, inklusive der Expression einer durch den Kontakt zu malignen Zellen induzierten KAF-Signatur.

Aktuelle Untersuchungen konnten auf Basis von Einzelzellanalysen am follikulären Lymphom (FL) - einem indolenten Nicht-Hodgkin Lymphom - zeigen, dass die Lymphom-Infiltration die physiologische Architektur mesenchymaler Zellen im Lymphknoten aufhebt und sich eine Expansion von FRZ und CD49<sup>+</sup> Stromazellen zeigte.<sup>134,137,138</sup> Mit einer verstärkten TGF-β Signatur, EZM Remodellierung und Heterogenität verschiedener Stroma-Subtypen zeigten diese Zellen enge Parallelen zu den KAF solider Tumorentitäten. Darüber hinaus zeigten sich aber auch Unterschiede, beispielsweise die Überexpression der lymphoiden FRZ Marker CXCL12<sup>+</sup>/CCL19<sup>+</sup>/CCL21<sup>+</sup>,<sup>138</sup> oder die Subtyp-spezifische Interaktion via CD70-CD27 Ligation mit den neoplastischen B-Zellen.<sup>134</sup> Insgesamt konnte eine verstärkte Präsenz von Stromazellen im FL-TMM (z. B. die Menge des mesenchymalen Zytoskelettproteins Vimentin,<sup>139</sup> oder die Expansion von Desmin<sup>+</sup> FRZ<sup>137</sup>) mit einer höheren Progessions-/Transformationswahrscheinlichkeit assoziiert werden.

Im Gegensatz dazu zeigte sich im diffus großzelligen B-Zell Lymphom eine prognostisch günstige Assoziation zwischen stromalen Genen und dem Überleben der Patienten.<sup>140</sup> Weiterführende Analysen des DLBCL-TMM bestätigen, dass in dieser Entität das Vorkommen von Fibroblasten oder die von ihnen sezernierte EZM, insbesondere die Proteoglykane Biglykan und Decorin, mit einem besseren Outcome assoziiert sind.<sup>141,142</sup> Der Hintergrund dieser unterschiedlichen Funktion zwischen den verschiedenen B-Zell Lymphomen ist aktuell unbekannt, lässt jedoch vermuten, dass auch in hämatologischen Erkrankungen verschiedene KAF Populationen verschiedene Effekte auf die neoplastischen Zellen ausüben können.

## 2.4 Die LYN-Kinase

Die LYN Tyrosin Kinase ist eine Kinase der Src-Familie von Kinasen (SFKs), einer Gruppe von neun homologen, nicht-Rezeptor Tyrosin Kinasen, zu der neben LYN auch SRC, LCK, YES, HCK, FYN, FGR, BLK, und YRK gehören. LYN ist dabei die Abkürzung für „**Lck/Yes Novel Tyrosine Kinase**“ und deutet somit schon dem Namen nach auf die engen strukturellen Ähnlichkeiten der verschiedenen Gruppenmitglieder hin. Die Kinasen dieser Gruppe vermitteln pleiotrope und teilweise rekurrente Funktionen in verschiedensten zellulären Signalwegen und Zelltypen, indem sie unterschiedliche Oberflächenrezeptoren (z. B. Toll-like-Rezeptoren, Fc-Rezeptoren, Integrine, Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder Adhäsionsrezeptoren) mit nachgeschalteten, intrazytoplasmatischen Signalwegen (z. B. PI3K-/ MAPK- / STAT-Signalwege) koppeln.<sup>143–145</sup>

### 2.4.1. Struktur und Regulation

Wie alle SFKs besteht LYN aus fünf verschiedenen Domänen, vier sog. Src-Homologiedomänen 1-4 (SH) sowie einer zwischen den verschiedenen Mitgliedern der Familie unterschiedlichen „Unique“ Domäne (vergleiche Abbildung 5; A).<sup>144,146</sup> Die SH1 Domäne sitzt vor dem C-Terminus des Proteins, enthält das katalytische Zentrum zur Phosphorylierung von Tyrosin-Resten und vermittelt somit die Kinase-Funktion.<sup>146</sup> Die kurze N-terminale SH4 Domäne ist an der Membran-Verankerung der Kinase beteiligt.<sup>146</sup> Die Myristoylierung und Palmitoylierung der N-terminalen Region beeinflusst die Verankerung der Kinase in der Zellmembran und somit ihre Signaltransduktion, da LYN in sog. „Lipid Rafts“ - Mikrodomänen in der Zellmembran die durch Anreicherung von Oberflächenrezeptoren und Signaltransduktionsproteinen Signalkaskaden erleichtern – akkumuliert.<sup>147</sup> SH3 und SH2 Domänen vermitteln die Interaktion zwischen LYN und anderen Proteinen. Insbesondere kann die SH2 Domäne auch autolog an die phosphorylierte Position Tyr508 im Bereich des C-Terminus binden und somit eine internen Schleifenbildung verursachen, die die Kinase-Aktivität konformitätsbedingt hemmt (vergleiche Abbildung 5; A). Die Phosphorylierung von Tyr508 durch vorgeschaltete Mediatoren wie CSK und CHK kann somit diese Schleifenbildung auslösen und die Kinaseaktivität inhibieren. (Membrangebundene) Phosphatasen wie CD45 oder CD148 können diese Stelle dephosphorylieren und somit wiederum zur Aktivierung der Kinase beitragen.<sup>148,149</sup> Zusätzlich gibt es einen aktivierenden Tyrosin-Rest, Tyr397. Dieser wird insbesondere durch die LYN SH1 Kinase-Domäne autophosphoryliert und verhindert nachfolgend die Inaktivierung durch Phosphorylierung an Tyr508. Phosphatasen wie PTPB1 dephosphorylieren Tyr397. Die Aktivierung der LYN-Kinase ist somit in einem mehrschrittigen Prozess durch die Phosphorylierung und Dephosphorylierung dieser beiden Seitenketten und dadurch ausgelöste Konformitätsänderungen reguliert.

## 2.4.2. Molekulare Funktion

In seiner aktivierte Konformation kann die LYN-Kinase Tyrosin-Reste an Substraten phosphorylieren und spielt hierdurch eine wichtige Funktion in verschiedenen, insbesondere Immunrezeptor-Signalwegen, wie dem BZR-, Fc-Rezeptor- oder verschiedenen Zytokin-Rezeptor-Signalwegen.<sup>146</sup> Dabei wurde ausgehend von der Beobachtung hyperreaktiver B-Zellen in *Lyn*-defizienten Mäusen,<sup>150</sup> für die LYN-Kinase als erstem Vertreter der SFK Gruppe neben einem aktivierenden auch ein inhibitorischer Einfluss auf die zelluläre Signalaktivität beschrieben.<sup>151</sup> Durch Phosphorylierung von sowohl aktivierenden wie auch inhibierenden Domänen – sog. **Immunrezeptor-Tyrosin-basierten-Aktivator/Inhibitor-Motiven (ITAM/ITIM)** – können sowohl aktivierende wie auch inhibierende Signale vermittelt werden, und LYN nimmt eine vom zellulären Kontext abhängige, duale und regulatorische Funktion ein.<sup>152</sup> Durch die LYN vermittelte Phosphorylierung von aktivierenden ITAM in Immunrezeptoren wie Fc-Rezeptoren,<sup>153–155</sup> oder dem BZR,<sup>156</sup> können nachgeschaltete Kinasen wie beispielsweise ZAP70 und SYK binden und die weitere Signalkaskade aktivieren. Durch die Phosphorylierung von inhibitorischen ITIMs in Immunrezeptoren wie Fcy-Rezeptor-2b, CD22 oder SIRP- $\alpha$  können hingegen bestimmte Phosphatasen mit einer SH2 Domäne (SHP1/2, SHIP1/2) an den Signal-Komplex binden, und diese inaktivieren durch Dephosphorylierung ihrer Substrate die weitere Signalkaskade.<sup>146</sup> Somit kann LYN sowohl aktivierende wie inhibierende Signalkaskaden anstoßen und leistet einen wichtigen Beitrag an der Regulation zellulärer Signalaktivität.

Darüber hinaus konnte die Beteiligung von LYN auch an Signalwegen ohne ITAM/ITIM Motiven gezeigt werden, beispielsweise verschiedene Rezeptor-vermittelte Signalwege wie Epo-R, G-CSF-R, CD14, CD36, IL2R, CD40 oder FLT3. Zuletzt wurde insbesondere auch die Hemmung des TLR-Signalwegen durch LYN beschrieben. Hier zeigt LYN eine, in Teilen Kinase-unabhängige, Inhibition von Interferon-regulierenden Faktoren (IRF), die Signale des TLR/MyD88 Signalkomplexes übertragen.<sup>157,158</sup> Außerdem supprimiert LYN die Aktivität des NLRP3-Inflammasoms, eines Protein-Komplexes, der im Rahmen der angeborenen Immunabwehr durch die Erkennung verschiedener Signalmoleküle aktiviert wird.<sup>159</sup>

## 2.4.3. Expression

Die LYN-Kinase wird in einer Vielzahl von Zelltypen und Geweben exprimiert. Insbesondere kommt sie in hämatopoetischen Geweben und Zellen vor. Die RNA-Sequenzierung von unterschiedlichen aufgereinigten Zelltypen aus Mäusen zeigt die Transkription von *Lyn* insbesondere in B-Zellen, myeloiden und dendritischen Zellen. In T-Zellen zeigt sich dagegen

gar keine *Lyn*-Transkription.<sup>155</sup> Entsprechend zeigt eine Modulationen der *LYN*-Expression auch einen starken Einfluss auf das Immunsystem (siehe Abschnitt 2.4.4.)

Darüber hinaus ist *LYN* auch in verschiedenen nicht-hämatopoetischen Geweben (in geringerem Ausmaß) exprimiert. Daten des human Protein Atlas (Human Protein Atlas [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)) zeigen eine Expression u. a. in Plazenta, Lunge, Pankreas, gastrointestinalen Organen, Gehirn und Epithelien.<sup>160,161</sup> Vermehrte Expression von *LYN* in kolorektalem Karzinom,<sup>162</sup> Mamma-Karzinom und Prostatakarzinom bestätigen die Expression der Kinase in nicht-hämatopoetischen Geweben.<sup>163</sup>

#### 2.4.4. Zelluläre Funktion

Durch die kontinuierliche, globale Aktivierung von Lyn im Mausmodell (sog. *Lyn*<sup>up/up</sup> Mäuse, generiert durch Mutation der regulatorischen Tyrosin508 Stelle), zeigt sich ein generell inflammatorischer Phänotyp mit hyperaktivierten B-Zellen.<sup>164</sup> Diese Mäuse zeigen autoimmune Effekte mit Glomerulonephritis und COPD-ähnlicher Erkrankung.<sup>165,166</sup> Bei vier bekannten Patienten mit *LYN*-Überaktivierungsmutation zeigten sich analog schwere Entzündungsprozesse, eine erhöhte Gefäßpermeabilität und teilweise Formierung von Autoantikörpern.<sup>167,168</sup>

Mäuse, die im Gegensatz eine globale Lyn-Defizienz durch ein genetisches Knockout-Modell tragen, zeigten ebenfalls inflammatorische Veränderungen des Immunsystems. Da sowohl die Überaktivierung wie der Verlust von Lyn die Entzündungsaktivität erhöhen, betont dies die Homöostase-erhaltende Funktion von Lyn. Das *Lyn*<sup>KO</sup> Mausmodell ist als präklinisches Modell zur Untersuchung von Lupus-Erkrankungen etabliert und durch entsprechende Autoimmunprozesse gekennzeichnet.<sup>150,169</sup> Durch die Überaktivierung von B-Zellen kommt es zur Bildung von Autoantikörpern, außerdem zeigt sich ein grundsätzlich entzündliches Milieu mit insbesondere inflammatorischer Reaktion myeloider Zellen und einer Expansion des myeloiden Kompartimentes.<sup>170</sup> Daher muss die genauere Betrachtung der Funktion der *LYN*-Kinase Zelltyp-spezifisch erfolgen:

## (1) Zelluläre Funktion von LYN in hämatopoetischen Zellen

Die systemischen Auswirkungen der Lyn-Kinase im Mausmodell wurden genauer auf die Effekte der Kinase in einzelnen Zelltypen aufgeschlüsselt:

In B-Zellen ist LYN insbesondere am B-Zell-Rezeptor Signalweg beteiligt. Nach Antigenerkennung durch den B-Zell-Rezeptor kommt es zur Aktivierung der LYN-Kinase durch CD45 vermittelte Dephosphorylierung des Tyrosin508 sowie der konformativen Entfaltung der Kinase aus dem inaktiven Zustand. LYN phosphoryliert daraufhin die ITAMs der B-Zell-Rezeptor assoziierten Transmembranproteine CD79A und CD79B, sodass diese als Bindungsstelle für weitere Kinasen wie insbesondere SYK dienen können. Dies führt zur Formierung des B-Zell-Rezeptor-Signalosoms. LYN und SYK vermittelten die weitere Aktivierung von BTK und nachgeschaltet die Stimulierung der PI3K und PLC $\gamma$ 2/NF $\kappa$ B Signalkaskaden.<sup>171</sup> Gleichzeitig zeigen sich die negativ regulierenden Effekte von LYN aber auch an der Phosphorylierung der ITIMs von CD22 nach BZR-Aktivierung. Dies führt zur Rekrutierung der SHP-1 Phosphatase und nachfolgend Begrenzung der BZR Aktivität.<sup>172</sup> Diese differentiell regulierend, sowohl aktivierende wie inhibierende LYN-Funktion erklärt die scheinbar gegensätzlichen Effekte von LYN-Veränderungen auf B-Zellen. In global *Lyn*-defizienten Mäusen zeigen B-Zellen eine Maturierungsstörung, die sich durch Vorhandensein weniger B-Zellen in der Peripherie sowie verzögerter Reifung im lymphatischen Gewebe äußert. Gleichzeitig zeigen sich in älteren Mäusen Autoimmunreaktionen. Zwar läuft die B-Zell-Rezeptor Aktivierung verlangsamt ab, es zeigte sich jedoch eine verstärkte Aktivierung des MAPK-Signalweges sowie eine vermehrte Proliferation nach anti-IgM Stimulation der B-Zellen.<sup>173</sup> Dass diese Autoimmunität Folge einer veränderten Signaltransduktion innerhalb der B-Zellen ist, und nicht durch ein inflammatorisches Milieu von außen getriggert wird, belegen gleichartige Effekte in Mäusen mit B-Zell-selektiver *Lyn*-Ablation. Umgekehrt ist der B-Zell-spezifische *Lyn*-Knockout ausreichend, um die Myeloexpansion (s. u.) der globalen *Lyn*-defizienten Mäuse zu rekapitulieren, sodass diese als sekundäre Reaktion auf die Autoimmunprozesse interpretiert werden kann.<sup>174</sup> Die Ko-Deletion des Adaptorproteins MyD88, das an der Verknüpfung von TLR und NF $\kappa$ B Signalweg beteiligt ist, führt zu einem Ausbleiben des *Lyn*-Knockout induzierten Phänotypen in murinen B-Zellen und impliziert die zusätzliche Beteiligung der entsprechenden Signalwege.<sup>174</sup> Eine B-Zell spezifische Überaktivierung von LYN resultierte in einer erhöhte Stimulierbarkeit des BZR nach anti-IgM Stimulation.<sup>164</sup>

Mäuse mit globaler *Lyn*-Defizienz zeigen eine ausgeprägte Expansion myeloider Zellen. Diese führt zu einer Splenomegalie und durch Infiltration des Knochenmarks zur Verdrängung der normalen Hämatopoiese sowie konsekutiver extramedullärer Blutbildung.<sup>175</sup> Es zeigen sich jedoch i. d. R. keine Anzeichen einer malignen Transformation, mit Ausnahme des Auftretens

vereinzelter myelomonozytärer Tumoren. Dieser myeloïden Expansion liegt eine vermehrte Sekretion inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IFN- $\gamma$ ,<sup>176,177</sup> sowie die Überreaktion auf verschiedene Wachstumsfaktoren durch das ausbleibende negative Lyn-Signal zugrunde. Entsprechend zeigt sich auch besagte myeloide Expansion trotz B-Zell-spezifischem Lyn-Knockout.<sup>174</sup> In differenzierten Makrophagen hat Lyn eine überwiegend negativ regulatorische Funktion via Phosphorylierung der ITIMs PIR-B und SIRP- $\alpha$ , inhibitorischer myeloider Rezeptoren. Außerdem bewirkt die Inhibierung von Integrin Signalwegen eine gesteigerten Zelladhäsion an Lyn-defizienten Makrophagen.<sup>178,179</sup>

In dendritischen Zellen mit myeloïdem Ursprung verursacht der Zelltyp-spezifische Knockout von *Lyn* eine starke Entzündungsreaktion. Hier zeigte sich insbesondere eine Überaktivierung des TLR-Signalweges in einer MyD88 abhängigen Art und Weise.<sup>180</sup> Andererseits führt der Knockout von LYN in Mastzellen zu einer verminderten inflammatorischen Reaktion auf LPS Stimulation, was durch eine LYN vermittelte Aktivierung des TLR4-Signalweges geschieht.<sup>181</sup> Dieser zelltyp-spezifische Effekt auf den TLR-Signalweg unterstreicht, dass die regulatorische Funktion der LYN-Kinase je nach Situation und Zelltyp sehr unterschiedlich sein kann.

## **(2) Zelluläre Funktion von LYN in nicht-hämatopoetischen Zellen**

SFKs spielen auch in nicht-hämatopoetischen Zellen eine wichtige Rolle. Während die Funktion anderer SFKs, insbesondere von Src ausführlich untersucht und onkogene, Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT)-fördernde, entzündungsfördernde und profibrotische Funktionen gut etabliert sind,<sup>182,183</sup> ist die Rolle von LYN in nicht-hämatopoetischen Zellen weniger eindeutig.

Eine wichtige, wiederkehrende Funktion von LYN in nicht-hämatopoetischen Zellen ist die Förderung von zellulärer Migration und Plastizität. In Brustkrebszellen konnte eine Überexpression von LYN gezeigt werden, die insbesondere die Migration und Invasivität/Metastasierung der malignen Zellen auslöst.<sup>184,185</sup> Auch in anderen malignen Entitäten wie dem Prostata-Karzinom,<sup>186,187</sup> oder dem Glioblastom war LYN mit Wachstum, Invasion und Metastasierung assoziiert.<sup>188</sup> Durch die Regulation von EMT erleichtert LYN die Invasivität der Krebszellen. Über den EPHA2 Rezeptor, ein Bestandteil der Mechanotransduktion, wird LYN bei steiferer EZM aktiviert. Es kommt zur Phosphorylierung und Aktivierung von Twist1, einem der Haupt-Transkriptionsfaktoren der EMT, was die mesenchymale Transition maligner Zellen und in Folge ihre Invasion in das umliegende Gewebe begünstigt.<sup>189</sup> Auch in einem murinen COPD Modell zeigte sich eine Regulation der EMT via Lyn durch Einfluss auf SMAD-Signalwege.<sup>190</sup> Entsprechend zeigte sich durch die Hemmung von LYN mittels Dasatinib eine Reduktion der EMT und malignen Invasion.<sup>185</sup>

Außerdem hat LYN Einfluss auf die Kollagen- und Fibrose-Bildung. So konnte eine Überexpression von LYN in mesenchymalen Myofibroblasten bei chronischer Pankreatitis festgestellt werden. LYN trägt neben Migration und Proliferation auch zur Kollagenproduktion und somit zur Fibrose-Bildung bei.<sup>191</sup> Entsprechend entwickelten Patienten mit Überaktivitätmutation von LYN auch in 2 von 3 Fällen eine Leberfibrose.<sup>167</sup>

In Endothelzellen stabilisiert LYN die endothelialen Funktionen via FAK Phosphorylierung.<sup>192</sup> Diese Eigenschaft könnte erklären, warum es als Folge einer LYN-Inhibition mittels Dasatinib häufig zu Pleuraergüssen kommt.

Schlussendlich zeigt sich eine zunehmende Rolle der LYN-Kinase im zentralen Nervensystem. Hier ist die Kinase in Neuronen exprimiert und eine LYN-Defizienz ist mit Neurodegeneration assoziiert, insbesondere Alzheimer.<sup>146</sup>

**Zusammengefasst hat die LYN-Kinase eine Palette sehr heterogener, teilweise gegensätzlicher Funktionen, die maßgeblich durch die zelluläre Umgebung geprägt werden.**

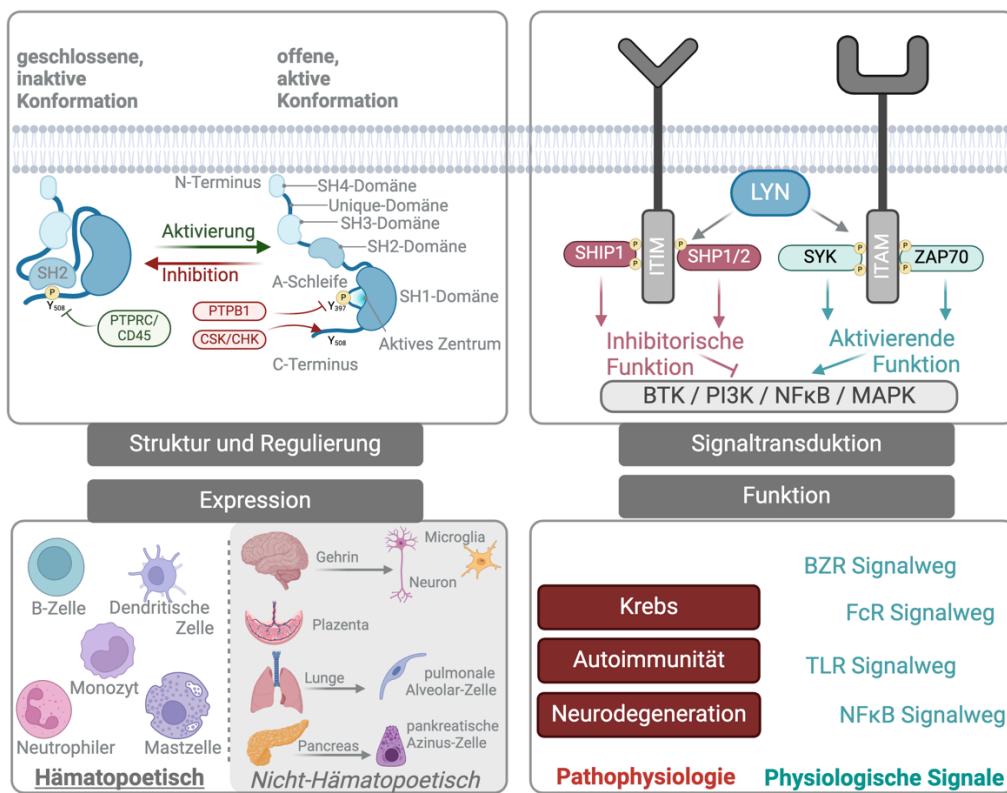


Abbildung 5: Die LYN-Kinase.

Übersicht über die Struktur, Regulation, Signaltransduktion, Expression sowie die Funktion der LYN-Kinase. Erstellt mit Bioredner.com

## 2.5 Die LYN-Kinase in CLL

### 2.5.1. Molekulare Funktion

Wie zuvor dargestellt ist der B-Zell-Rezeptor Signalweg ein Treiber der CLL-Pathogenese, sodass auch die Bedeutung seiner frühen Signalkomponente LYN auf die Entstehung von CLL ausführlich untersucht worden ist. In primären CLL-Zellen konnte eine Überexpression von LYN auf Protein-Ebene im Vergleich zu normalen B-Zellen gezeigt werden,<sup>193</sup> sowie eine Überexpression von LYN-mRNA, welche in einer nicht-korrigierten, univariante Analyse eine mögliche Assoziation mit dem Therapie-freien Überleben unbehandelter CLL-Patienten zeigte.<sup>194,195</sup>

In präklinischen Arbeiten konnte die konstitutive LYN-Aktivität in CLL-Zellen mit verschiedenen biologischen Funktionen verknüpft werden. Insbesondere wurde ein anti-apoptotischer Effekt von LYN gezeigt, an dem verschiedene molekulare Signalwege beteiligt sind: Durch Phosphorylierung trägt LYN zur Inaktivierung der Protein Phosphatase 2A (PP2A) bei, was allgemein die Aktivierung anti-apoptotischer Signalwege ermöglichte.<sup>196</sup> Außerdem mediert LYN direkt weitere anti-apoptotische Wirkungen durch die Phosphorylierung und konsekutive Inaktivierung von Procaspsase 8,<sup>197</sup> sowie indirekt über die Phosphorylierung von CD5. Letzteres führt zur nachgeschalteten Rekrutierung der Phosphatase SHP-1 und dadurch zu einer Hemmung Caspase-unabhängiger Apoptose.<sup>198</sup>

Zusätzlich vermittelt LYN durch die Phosphorylierung des Transmembranrezeptors ROR1 die Interaktion zwischen BZR und ROR1-Signalweg,<sup>199</sup> und moduliert so nachgeschaltete Zytoskelett-Regulatoren wie HS1 und Cortactin.<sup>200,201</sup> Dadurch trägt LYN zur Regulation von CXCL12 und CCL19 induzierter Migration, Zytoskelett Reorganisation und Zelladhäsion von CLL an Stromazellen bei.<sup>199,200</sup>

### 2.5.2. Inhibition der LYN-Kinase

Entsprechend wurde die Hemmung von LYN auch als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt der CLL exploriert. Die Aktivität der LYN-Kinase lässt sich durch den BCR-ABL Kinase Inhibitor Dasatinib, der zur Therapie der CML zugelassen ist, sowie die Inhibitoren Bosutinib und Bafetinib effektiv hemmen. Diese Kinase-Inhibitoren sind jedoch nicht spezifisch für LYN und inhibieren auch eine Reihe anderer Kinasen.<sup>202</sup>

Präklinisch zeigte die Behandlung von CLL-Zellen mit Dasatinib eine Reduktion von Migration und Adhäsion.<sup>199,200</sup> Außerdem zeigte sich eine reduzierte Phosphorylierung der Signalproteine AKT, ERK oder p38, und erhöhte Apoptoseraten aufgrund einer verminderten Expression anti-apoptotischer Proteine wie MCL-1 und BCL-XL.<sup>200,203,204</sup> Dabei konnte Dasatinib insbesondere die anti-apoptotische und chemoprotektive Stimulation durch CD40-L rückgängig machen und die neoplastischen Zellen wieder gegen verschiedene zytotoxische

Substanzen sensitivieren.<sup>204</sup> Teilweise fiel das apoptotische Potential von Dasatinib zwischen verschiedenen Patientenproben jedoch sehr unterschiedlich aus und Dasatinib könnte insbesondere in IGHV-unmutierten Proben effektiver sein.<sup>203,205,206</sup>

Im E $\mu$ -TCL1-Mausmodell konnte die Behandlung mit Dasatinib die Leukämielast im peripheren Blut sowie die CLL-Infiltration von Milz und Knochenmark signifikant und effektiv reduzieren.<sup>200</sup>

Im Rahmen klinischer Studien zeigte sich eine grundsätzliche Wirksamkeit einer Therapie mit Dasatinib. Dabei wurde Dasatinib in Chemotherapie-vorbehandelten Patienten getestet. Während nur eine Minderheit (3 von 15 Patienten bzw. 3 von 18 Patienten) eine formelle partielle Remission (im peripheren Blut) zeigte, wurde die Lymphadenopathie in einem deutlich größeren Anteil der Patienten reduziert (9 von 15 Patienten bzw. 20% mediane Reduktion der Lymphadenopathie bei 18 Patienten).<sup>207,208</sup> Ähnlich zeigte eine Phase 2 Studie mit Bafetinib - einem anderen LYN-Inhibitor - an 17 rezidivierten/refraktären CLL Patienten kein formelles Ansprechen, jedoch eine partielle Lymphknoten Reduktion in 7 von 11 Patienten.<sup>209</sup> Diese präferentielle Aktivität von Dasatinib in den Lymphknoten impliziert eine mögliche Aktivität auf das CLL-Tumormikromilieu. Die weitere klinische Erprobung der LYN-Inhibition zur CLL-Therapie wurde nicht weiterverfolgt, insbesondere da die gezeigten Ergebnisse im Vergleich zu zeitgleich entwickelten Inhibitoren anderer Bestandteile des BZR (BTK-Inhibitoren und PI3K-Inhibitoren) enttäuschend waren.

### 2.5.3. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe an der Rolle der Lyn-Kinase im murinen E $\mu$ -TCL1 CLL Modell konnten eine neue CLL-supportive Funktion von Lyn im leukämischen Tumormikromilieu aufzeigen.<sup>210</sup>

Im E $\mu$ -TCL1 Mausmodell entsteht durch die Expression des onkogenen humanen Transgens TCL1 in B-Zellen unter Kontrolle des V<sub>H</sub> Promoters und Ig<sub>H</sub>-E $\mu$ -Enhancers eine CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> doppelt positive, leukämische Population mit 100%-iger Penetranz.<sup>211</sup>

Diese mono-/oligoklonale Population ähnelt einer aggressiven Variante der humanen B-CLL Erkrankung.<sup>212</sup> Außerdem sind die malignen Zellen durch den adaptiven Transfer von Splenozyten durch intravenöse oder intraperitoneale Injektion auf Wildtyp-Mäuse mit gleichem genetischen Hintergrund transplantabel. Dies ermöglicht die schnellere Entwicklung eines leukämischen Klones.<sup>213</sup> Das TCL1-Modell wurde lange Zeit als Standard-Modell zur Erforschung der CLL eingesetzt und ermöglichte viele Erkenntnisse, teilweise mit translationaler Relevanz.<sup>214</sup>

In TCL1-Mäusen mit einem globalen Lyn-Knockout (TCL1<sup>tg/wt</sup>Lyn<sup>-/-</sup>) zeigte sich ein signifikant verlangsamtes Wachstums der Leukämie im peripheren Blut und eine verminderter Infiltration

im Knochenmark im Vergleich zur *Lyn*-Wildtyp Kontrollgruppe ( $TCL1^{tg/wt}Lyn^{wt/wt}$ ) (siehe Abbildung 6, A). Zwar zeigten die *Lyn*-defizienten Tiere auch eine deutliche Splenomegalie, diese bestand im Gegensatz zu den *Lyn*-profizienten Tieren jedoch nur zu geringem Anteil aus  $CD5^+CD19^+$  Leukämie-Zellen, sondern aus der für den globalen *Lyn*-Knockout vorbekannten Expansion  $CD11b^+$  myeloider Zellen.<sup>175,210</sup> Der unabhängig von der Leukämie bereits ausgeprägte Phänotyp *Lyn*-defizienter Mäuse mit verkürztem Überleben und Entwicklung einer Glomerulonephritis-artigen Autoimmunerkrankung, machte die weiteren Beschreibung *Lyn*-abhängiger Effekte in diesem Modell jedoch schwierig. Daher wurden die malignen CLL-Zellen isoliert und in Wildtyp-Mäuse transplantiert. Hier zeigte sich überraschenderweise, dass die *Lyn*-defizienten malignen Zellen genauso anwuchsen, wie die *Lyn*-profizienten CLL-Zellen und die *Lyn*-Aktivität in malignen Zellen somit keinen Effekt auf die Leukämie-Progression hatte (Abbildung 6, B). Unterstützt wurde diese Beobachtung durch ein zweites Mausmodell, in dem eine B-Zell spezifische *Lyn*-Überaktivität generiert wurde ( $Lyn^{up-B}$ -Mäuse, Überaktivität durch Mutation Y508F des inaktivierenden Tyrosin-Restes, durch CD19-Cre System nur in B-Zellen), das insgesamt nur einen milden Phänotyp zeigte.<sup>164</sup> Die Kreuzung mit dem  $E\mu$ -TCL1 Modell zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Leukämie-Progression und Infiltration (Abbildung 6, C).<sup>164</sup> Diese Daten implizieren, dass die Entwicklung der CLL - zumindest im durch die transgene Expression des TCL1 Onkogens getriebenen Mausmodell - unabhängig von der Expression der *Lyn*-Kinase in leukämischen B-Zellen ist.

Darüber hinaus zeigte aber die Expression von *Lyn* im Tumormikromilieu einen profunden Einfluss auf die Entwicklung von CLL. Die Transplantation der gleichartigen leukämischen  $E\mu$ -TCL1 Zellen in globale *Lyn*-Wildtyp ( $Lyn^{wt/wt}$ ) und *Lyn*-Knockout ( $Lyn^{-/-}$ ) Mäuse zeigte ein signifikant verlangsamtes Anwachsen der Leukämie in einem *Lyn*-defizientem Tumormikromilieu (Abbildung 6, D). Dazu zeigte sich auch eine verminderte Infiltration in die Milz und ein verlängertes Überleben der *Lyn*-Knockout Tiere im Vergleich zu den Kontrollgruppen.<sup>210</sup>

Entsprechend scheint die *Lyn*-Kinase Aktivität im Mikromilieu die Progression der CLL zu begünstigen. In chimären Mäusen, in denen nach entsprechender Bestrahlung und Knochenmarktransplantation *Lyn* nur in hämatopoetischen Zellen des Mikromilieu fehlte, zeigte sich ein etwas verlangsamtes Anwachsen von transplantierten TCL1-Leukämie Zellen. Passend dazu zeigte sich im *in vitro* Ko-Kultur Modell ein vermindertes Überleben primärer humaner CLL Zellen, wenn die murinen Feeder Makrophagen *Lyn* defizient waren.<sup>210</sup> Dies impliziert, dass *Lyn* in myeloischen Zellen zur CLL-supportiven Unterstützung dieses Zelltypen im Mikromilieu beiträgt. Offen jedoch bleibt der Beitrag von *Lyn* in anderen Zellen im CLL-Mikromilieu.

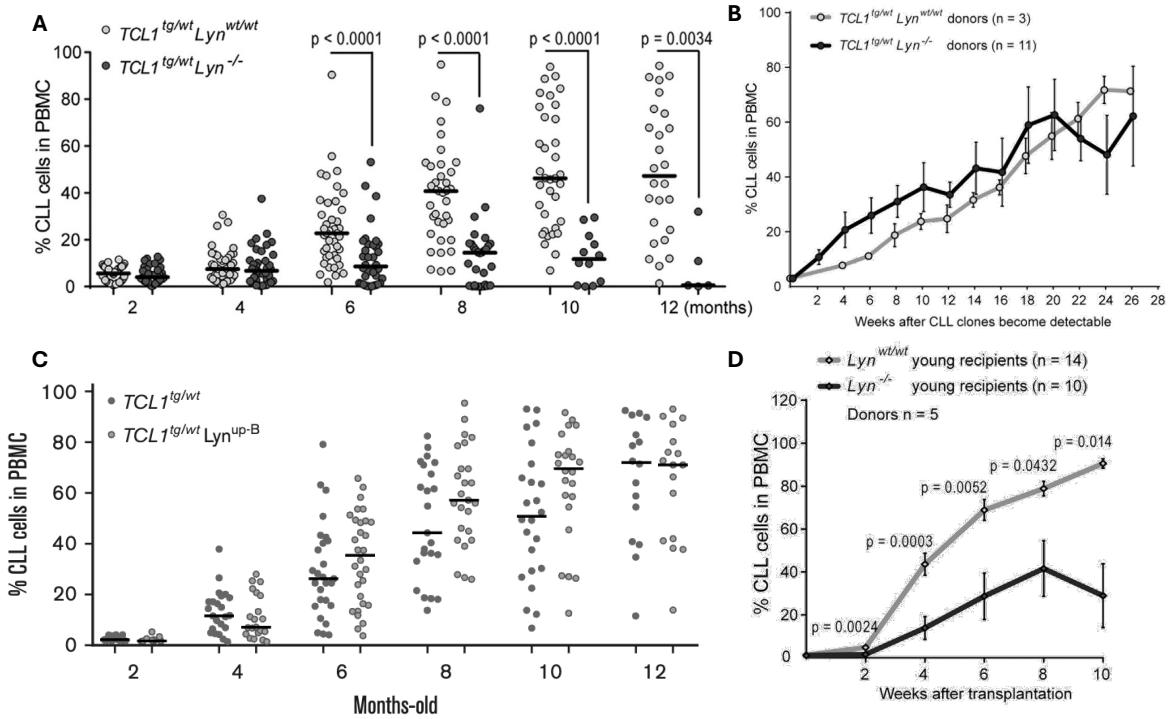


Abbildung 6: Zusammenstellung vorheriger Ergebnisse der Arbeitsgruppe zur Rolle von Lyn im E-TCL1-Mausmodell: Lyn-Kinase im Mikromilieu, aber nicht in B-Zellen, unterstützt die leukämische Progression.

**A)** Verminderte Progression der leukämischen Last in global Lyn-defizienten Mäusen ( $TCL1^{tg/wt}Lyn^{-/-}$ ) im Vergleich zu Lyn-profizienten Mäusen ( $TCL1^{tg/wt}Lyn^{wt/wt}$ ). **B)** Gleichartige leukämische Progression nach Transfer von Lyn-profizienten und Lyn-defizienten  $TCL1^+$ -Splenozyten in Wildtyp-Mäuse. **C)** Gleichartige Progression der leukämischen Last in Mäusen mit B-Zell spezifischer Lyn-Überaktivität ( $TCL1^{tg/wt}Lyn^{up-B}$ ) im Vergleich zu normalen  $TCL1$ -Mäusen ( $TCL1^{tg/wt}$ ). **D)** Verlangsame Progression der leukämischen Last nach Transfer von  $TCL1^+$ -Splenozyten in global Lyn-defizierte Mäuse ( $Lyn^{-/-}$  young recipients) im Vergleich zu Lyn-profizienten Mäusen ( $Lyn^{wt/wt}$  young recipients). Reproduziert und modifiziert mit Genehmigung von Elsevier nach: Panel A,B,D Nguyen et al.<sup>210</sup> und Panel C Kohlhas et al.<sup>164</sup>

## **2.6 Fragestellungen und Ziel der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die weitere Beschreibung der Funktion der LYN-Kinase im CLL-Tumormikromilieu. Wie dargestellt konnte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass im murinen CLL-Modell die Expression von Lyn-Kinase in Zellen des Tumormikromilieu die Progression der Erkrankung maßgeblich begünstigt. Der Effekt ließ sich in Teilen auf die Funktionen von Lyn in Makrophagen zurückführen, der Beitrag anderer Zellen sowie die zugrunde liegenden mechanistischen Funktionen sind jedoch unklar.

Ziel der Arbeit ist daher die weitere Aufschlüsselung der LYN-Funktion im CLL-Mikromilieu. Die Arbeit untersucht insbesondere die Rolle der LYN-Kinase in nicht-hämatopoetischen Zellen des CLL-Tumormikromilieu. Ein murines Transplantationsmodell sowie die bildgebende Massenzytometrie humaner Lymphknoten weisen die Relevanz von LYN in nicht-hämatopoetischen Zellen des TMM nach. Nachfolgend wird durch die Kombination verschiedener, genetisch modifizierter *in vitro* Systeme mit Multi-Omischer Analyse und molekularbiologischer Validierungsassays die mechanistische Rolle der LYN-Kinase in nicht-hämatopoetischen Zellen untersucht.

### 3. Publikation

**Vom Stein AF**, Rebollido-Rios R, Lukas A, Koch M, von Lom A, Reinartz S, Bachurski D, Rose F, Bozek K, Abdallah AT, Kohlhas V, Saggau J, Zölzer R, Zhao Y, Bruns C, Bröckelmann PJ, Lohneis P, Büttner R, Häupl B, Oellerich T, Nguyen PH, Hallek M. **LYN-Kinase programs stromal fibroblasts to facilitate leukemic survival via regulation of c-JUN and THBS-1.** Nat Commun. 2023 Mar 10;14(1):1330. doi: 10.1038/s41467-023-36824-2. PMID: 36899005; PMCID: PMC10006233.



# LYN kinase programs stromal fibroblasts to facilitate leukemic survival via regulation of c-JUN and THBS1

Received: 14 March 2022

Accepted: 14 February 2023

Published online: 10 March 2023

Check for updates

Alexander F. vom Stein 1,2,3, Rocio Rebollido-Rios 1,2,3, Anna Lukas<sup>1,2,3</sup>, Maximilian Koch<sup>1,2,3</sup>, Anton von Lom<sup>1,2,3,4</sup>, Sebastian Reinartz<sup>1,2,3</sup>, Daniel Bachurski<sup>1,2,3,4</sup>, France Rose<sup>2,5</sup>, Katarzyna Bozek 2,3,5, Ali T. Abdallah<sup>3</sup>, Viktoria Kohlhas<sup>1,2,3</sup>, Julia Saggau<sup>1,2,3</sup>, Rebekka Zölzer<sup>1,2,3</sup>, Yue Zhao<sup>6</sup>, Christiane Bruns<sup>6</sup>, Paul J. Bröckelmann 1,4,7, Philipp Lohneis<sup>8,9</sup>, Reinhard Büttner 9, Björn Häupl<sup>10,11,12,13</sup>, Thomas Oellerich 10,11,12,13, Phuong-Hien Nguyen 1,2,3,14 & Michael Hallek 1,2,3,14

Microenvironmental bystander cells are essential for the progression of chronic lymphocytic leukemia (CLL). We have discovered previously that LYN kinase promotes the formation of a microenvironmental niche for CLL. Here we provide mechanistic evidence that LYN regulates the polarization of stromal fibroblasts to support leukemic progression. LYN is overexpressed in fibroblasts of lymph nodes of CLL patients. LYN-deficient stromal cells reduce CLL growth *in vivo*. LYN-deficient fibroblasts show markedly reduced leukemia feeding capacity *in vitro*. Multi-omics profiling reveals that LYN regulates the polarization of fibroblasts towards an inflammatory cancer-associated phenotype through modulation of cytokine secretion and extracellular matrix composition. Mechanistically, LYN deletion reduces inflammatory signaling including reduction of c-JUN expression, which in turn augments the expression of Thrombospondin-1, which binds to CD47 thereby impairing CLL viability. Together, our findings suggest that LYN is essential for rewiring fibroblasts towards a leukemia-supportive phenotype.

The pathobiology of chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the accumulation of long-lived malignant B cells in the peripheral blood and hemato-lymphoid tissues, where leukemic cells interact reciprocally with various cells of the microenvironment<sup>1</sup>. The efficient dialog with diverse microenvironmental factors is crucial for CLL cell survival and expansion<sup>2,3</sup>. In this context, bone marrow stromal cells (BMSC) contribute to the interdependent generation of a nurturing niche and promote leukemic cell migration, proliferation and chemoresistance via various signaling pathways<sup>4</sup>. Leukemic cells activate inflammatory pathways in BMSC, including AKT, ERK, PKC $\beta$ II and NF $\kappa$ B pathways, which trigger an increased expression of inflammatory and wound healing associated proteins, ultimately resulting in

an increased leukemia support<sup>5,6</sup>. The molecular signature and phenotype of CLL-induced BMSC resemble those of cancer-associated fibroblasts (CAF), a diverse group of activated fibroblasts, primarily observed in association with many solid cancers<sup>7,8</sup>.

CAF are heterogenous in regard to their cellular origin, activation, phenotype and function and may diverge within and between entities<sup>7</sup>. Therefore, the precise characterization of CAF via cellular markers remains a challenge. Single-cell analyses have consistently identified an IL1-JAK-STAT induced inflammatory “iCAF” subtype that supports tumor growth via secretion of variable cytokines, and a TGF $\beta$ -induced myofibroblastic “myCAF” subtype with potential tumor-restraining functions via the extracellular matrix (ECM)<sup>9</sup>. In addition, other

A full list of affiliations appears at the end of the paper. e-mail: [hien.nguyen@uk-koeln.de](mailto:hien.nguyen@uk-koeln.de); [michael.hallek@uni-koeln.de](mailto:michael.hallek@uni-koeln.de)

subtypes like immunomodulatory CAF showing an increased interferon signature and MHC expression linked with antigen presenting functions<sup>10,11</sup> highlight the capacity of CAF to shape non-malignant components of the tumor-microenvironment.

The existence and functional relevance of stromal cells that partially reflect a CAF phenotype has been described in various hematological malignancies<sup>12–18</sup>, suggesting a generic importance of leukemia/lymphoma associated fibroblasts for disease development. In CLL, the upregulation of the standard CAF marker  $\alpha$ SMA was observed in the lymph node microenvironment *in vivo* and *in vitro*<sup>5,6</sup>.

We previously showed that the expression of the SRC family kinase (SFK) LYN was an essential factor for CLL progression *in vivo* as demonstrated by adoptive transfer experiments in the *E $\mu$ -TCL1* transgenic mouse model for CLL<sup>19</sup>, which could be partially attributed to the failure of LYN-deficient macrophages to fully support CLL cell survival<sup>20</sup>. Although LYN is well-known to balance the B cell receptor (BCR) response, activation of this kinase seemed to play only a minor role in B-CLL development, as loss- and gain-of-function mutants of LYN in B cells did not significantly alter CLL progression in murine models<sup>20,21</sup>. In contrast, LYN expression in the microenvironment was essential for leukemic cell growth, which could be partially attributed to the failure of LYN-deficient macrophages to fully support CLL cell survival<sup>20</sup>. Interestingly, the specific loss of LYN in the hematopoietic system did not allow to fully explain the impaired CLL development observed in the global absence of microenvironmental LYN. Therefore, we hypothesized that the presence of LYN kinase in non-hematopoietic compartments of the leukemic stroma may substantially contribute to leukemic progression.

In this work, we demonstrate that stromal LYN kinase modulates the plasticity of stromal fibroblasts and their capacity to support the survival of malignant B cells. Furthermore, we identify the LYN-cJUN-THBS1 axis as a key mediator in this process. This finding underscores the specific importance of LYN kinase as a central regulator in the tumor microenvironment.

## Results

### LYN kinase in non-hematopoietic microenvironmental cells promoted CLL expansion and survival

To assess the potential relevance of LYN kinase in the stromal compartment *in vivo*, we generated chimeric mice lacking LYN specifically in non-hematopoietic cells via bone marrow transplantation (BMT) of *Lyn<sup>-/-</sup>* host mice. After receiving a lethal dose of whole-body irradiation, the hematopoietic system of irradiated mice was reconstituted using hematopoietic stem cells (HSC) from either wild type (WT) or *Lyn<sup>-/-</sup>* donors, yielding either totally deficient *Lyn* mice (*tLyn<sup>-/-</sup>*) or chimeric mice lacking *Lyn* only in the radioresistant, non-hematopoietic microenvironment (*chLyn<sup>-/-</sup>*), respectively (Fig. 1a). After successful immune-reconstitution, *tLyn<sup>-/-</sup>* mice showed an expanded myeloid fraction and a complete loss of B cells—a phenotype typically observed in aged *Lyn<sup>-/-</sup>* mice, whereas *chLyn<sup>-/-</sup>* mice acquired an increased fraction of B cells and normalized myeloid compartment (Supplementary Fig. 1a). Murine CLL cells purified from spleens of *E $\mu$ -TCL1* transgenic mice (*TCL1<sup>+</sup>*)<sup>19</sup> were subsequently transferred onto the chimeras (Fig. 1a). Expansion of CD5 $^+$ /CD19 $^+$  CLL cells could be detected in the peripheral blood after 4 weeks in *Lyn<sup>wt/wt</sup>* and *chLyn<sup>-/-</sup>* mice, but not in *tLyn<sup>-/-</sup>* mice (Fig. 1b), reproducing the failure of leukemic engraftment observed before in aged global *Lyn<sup>-/-</sup>* mice<sup>20</sup>. Notably, the leukemic burden was significantly lower in *chLyn<sup>-/-</sup>* mice in comparison to *Lyn<sup>wt/wt</sup>* mice in week 4 and remained consistently lower until week 14 (Fig. 1b), indicating that LYN-dependent functions within the non-hematopoietic microenvironment contributed to the generation of a fully leukemia supporting niche. The failure of CLL cell migration into the lymphoid tissues in *Lyn<sup>-/-</sup>* recipients could be excluded, because CLL cells could efficiently home to the spleen and bone marrow of both *Lyn<sup>wt/wt</sup>* and *Lyn<sup>-/-</sup>* recipients in an

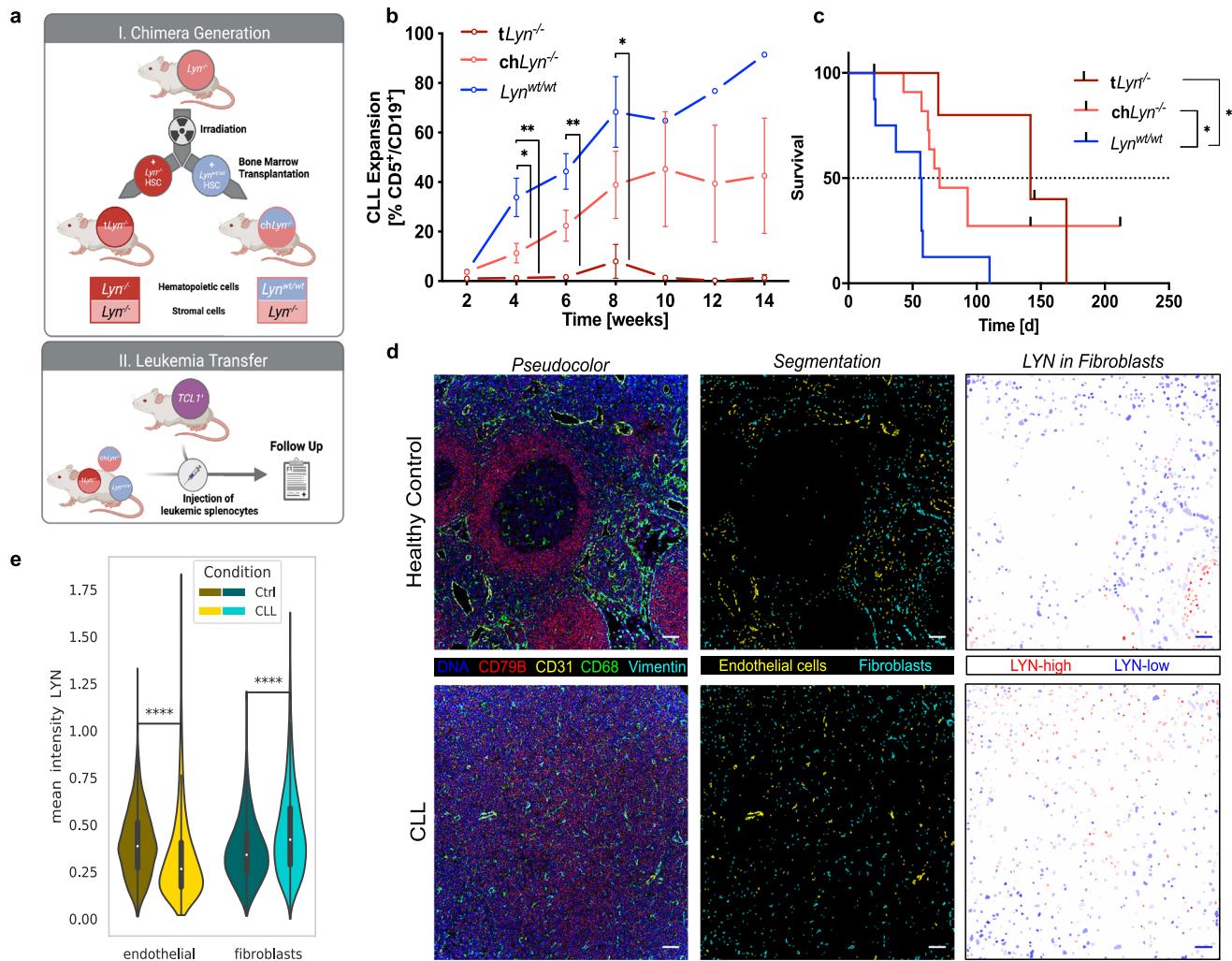
*in vivo* short-term homing assay (Supplementary Fig. 1b). In concordance, the reduced leukemic burden in *chLyn<sup>-/-</sup>* mice resulted in a significantly prolonged median overall survival of 71 days versus 56 days in *Lyn<sup>wt/wt</sup>* mice ( $p = 0.002$ ) (Fig. 1c), collectively demonstrating a relevant, leukemia promoting function of LYN kinase in the non-hematopoietic microenvironment.

To investigate the expression of LYN kinase in the non-hematopoietic microenvironment of CLL patients, we used imaging mass cytometry to compare lymph node sections of 12 CLL patients (CLL-LN) and 9 healthy controls (HC-LN). Representative CLL-LN showed the typical disappearance of the LN architecture compared to HC-LN, with CLL-LN follicles being disrupted by the densely infiltrating leukemic B cells, accompanied by a widely scattered distribution of different bystander cells (Fig. 1d left). Single cells were segmented and stromal cells assigned into endothelial cells (CD31 $^+$ ) and fibroblasts (CD31 $^-$  Vimentin $^+$ ) (Fig. 1d middle). Strikingly, CLL-LN fibroblasts exhibited significantly increased LYN levels compared to HC-LN fibroblasts, whereas CLL-LN endothelial cells showed markedly lower LYN expression than HC-LN endothelial cells (Fig. 1e). These findings point to a cell-type specific modulation of LYN expression in CLL lymph nodes and to a pathophysiological relevance of LYN in CLL-associated fibroblasts.

As fibroblasts represent one of the most potent non-immune supporter cell types for cancer growth<sup>7,8</sup> and can prevent spontaneous apoptosis of CLL cells<sup>4</sup>, we used murine embryonic fibroblasts (MEF) in a xenogeneic co-culture system with human CLL cells (Fig. 2a). We observed a strongly reduced feeding capacity of *Lyn<sup>-/-</sup>* MEF to maintain CLL cell survival compared to *Lyn<sup>wt/wt</sup>* cells (Fig. 2b, Supplementary Fig. 1c), further underscoring the functional relevance of LYN kinase in the stromal microenvironment. To recapitulate the murine results in a fully human co-culture setting *in vitro*, we generated LYN-knockout (LYN<sup>KO</sup>) single-cell clones of the human bone marrow derived stromal cell line HS-5 (Supplementary Fig. 1d, 1j i) by CRISPR/Cas9-induced frameshift mutation (Fig. S1e), which did not affect HS-5 cell growth (Supplementary Fig. 1f). Similar to MEF, LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells could not support CLL cell survival as potently as LYN<sup>WT</sup> control cells in co-culture, revealed by a significantly reduced CLL viability after 72 h and 96 h (Fig. 2c). We predominantly used low-risk, treatment naïve patient samples (Supplementary Fig. 1g) with a strongly variable rate of spontaneous cell death, ranging from 12% to 60% viability after 72 h of culture. Still, intra-patient pairwise comparison demonstrated a highly consistent reduction of HS-5 feeder support in the absence of LYN (Fig. 2d) and independently of the IGVH status of CLL samples (Supplementary Fig. 1h). In addition, LYN<sup>KO</sup> clones were generated in a second stromal cell line NKtert (Supplementary Fig. 1i, j ii). Like the HS-5 co-culture, LYN<sup>KO</sup> NKtert cells also exhibited impaired leukemic feeder function compared to LYN<sup>WT</sup> counterparts, revealed by a consistent reduction of CLL cell viability in co-culture (Fig. 2e, f). In marked contrast to fibroblasts, knockdown of LYN kinase in the HUVEC endothelial cell line did not influence their CLL supportive capacity (Supplementary Fig. 1k, l). Taken together, *in vivo* and *in vitro* results strongly indicate a functional role of LYN in stromal fibroblasts contributing to microenvironmental CLL support.

### Integrative multi-omics analysis identified a transcriptionally altered fibroblast polarization in LYN-deficient cells perturbing predominantly cytokine- and extracellular matrix related pathways

To characterize the molecular consequences caused by LYN deficiency in stromal fibroblasts, we subjected LYN<sup>WT</sup> and LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells to multi-omics profiling comprising four layers: transcriptome (T), label-free quantitative proteome (P) and secretome (S), and SILAC-labeled phosphoproteome (phospho-tyrosine (pYome) (Y)). Additionally, we profiled LYN<sup>WT</sup> and LYN<sup>KO</sup> HS-5 transcriptome after



**Fig. 1 | LYN kinase in non-hematopoietic microenvironmental cells promoted CLL expansion.** **a** Graphical illustration of the *in vivo* experimental setup. I. *Lyn<sup>-/-</sup>* mice were lethally irradiated and the hematopoietic system was reconstituted using *Lyn<sup>-/-</sup>* or *Lyn<sup>w/wt</sup>* bone marrow transplantation (BMT), resulting in chimeric mice lacking LYN globally (*tLyn<sup>-/-</sup>*) or specifically in the radioresistant stromal compartment (*chLyn<sup>-/-</sup>*). II. The hematopoietic system was successfully reconstituted after 8 weeks and chimeric mice were subsequently transplanted with  $10^7$  murine *TCL1<sup>g/g</sup>* CLL cells (4 biological replicates). Illustration was created with BioRender.com.

**b** Leukemic expansion in the peripheral blood was monitored every 14 days via flow cytometry and is displayed as fraction of CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> CLL cells in all CD45<sup>+</sup> leukocytes (*tLyn<sup>-/-</sup>* n = 7; *chLyn<sup>-/-</sup>* n = 10; *Lyn<sup>w/wt</sup>* n = 8; mean  $\pm$  SEM; two-sided Mann-Whitney test: Week 4 *Lyn<sup>w/wt</sup>* vs. *chLyn<sup>-/-</sup>* p = 0.02499, Week 4 *Lyn<sup>w/wt</sup>* vs. *tLyn<sup>-/-</sup>* p = 0.001166, Week 6 *Lyn<sup>w/wt</sup>* vs. *tLyn<sup>-/-</sup>* p = 0.002165, Week 8 *Lyn<sup>w/wt</sup>* vs. *tLyn<sup>-/-</sup>* p = 0.035714).

**c** Kaplan-Meier curve illustrating the survival of chimeric recipient mice after CLL

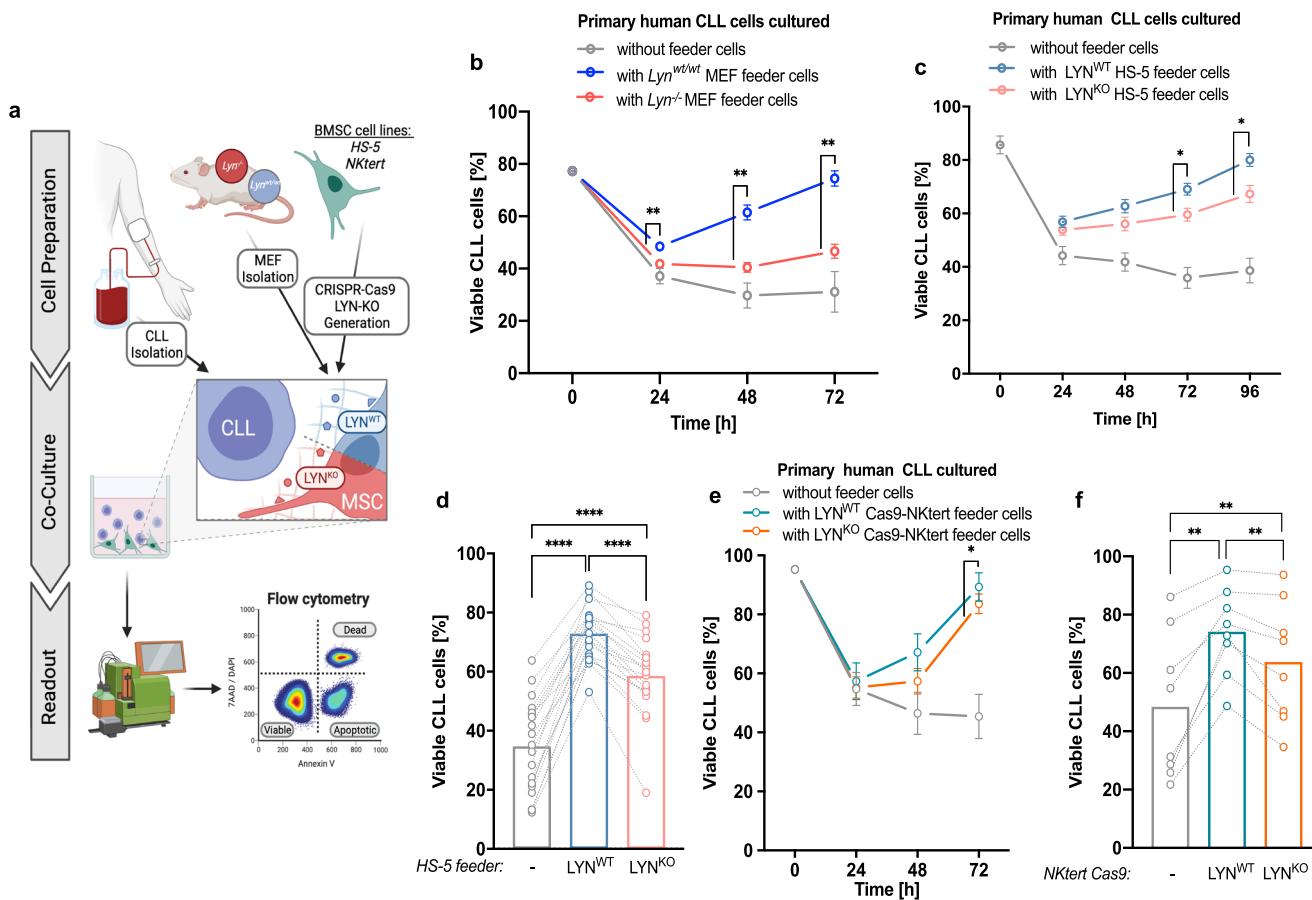
adoptive transfer (*tLyn<sup>-/-</sup>* n = 6; *chLyn<sup>-/-</sup>* n = 11; *Lyn<sup>w/wt</sup>* n = 8; Mantel-Cox log-rank test: *Lyn<sup>w/wt</sup>* vs. *chLyn<sup>-/-</sup>* p = 0.0119, *Lyn<sup>w/wt</sup>* vs. *tLyn<sup>-/-</sup>* p = 0.0021, *chLyn<sup>-/-</sup>* vs. *tLyn<sup>-/-</sup>* p = 0.4707). **d** Representative images of Hyperion Imaging Mass Cytometry of a healthy control lymph node (HC-LN) (top) and a CLL-LN (bottom). (Left) False color image (middle) result of cell-type segmentation (right) segmented fibroblasts color-coded by mean LYN intensity (bars represent 50  $\mu$ m, representative of total n = 9 HC-LN and n = 12 CLL-LN). **e** Violin plot for mean LYN expression per segmented single cell (Healthy controls: n = 9 HC-LN (3272 endothelial cells; 6466 fibroblasts); CLL: n = 12 CLL-LN (1817 endothelial cells; 7543 fibroblasts); boxplots represent median with the interquartile range, whiskers indicate adjacent values, violin represents kernel density estimation, independent two-sided t-tests: endothelial p = 7.380e-41, fibroblasts p = 2.942e-170). See also Fig. S1. Source data are provided as a Source Data file.

CLL co-culture (T<sub>c</sub>). All “omics” layers were combined in a multi-step integrative analysis (Fig. 3a). The profiling layers covered 19,511 and 20,193 transcripts (T and T<sub>c</sub>), 1,836 and 314 proteins (P and S), and 122 phospho-tyrosine sites (Y). Altogether, 213 (T), 810 (T<sub>c</sub>), 109 (P), 37 (S) and 18 (Y) were differentially expressed (LYN<sup>KO</sup>/LYN<sup>WT</sup> HS-5 cells) (Supplementary Fig. 2a). Results of independent analyses are listed in Supplementary Data 1, 2 and Supplementary Fig. 2a, b. Differentially expressed genes/proteins (DEG/P) are depicted in Supplementary Fig. 2c-g, and data are deposited in different EMBL-EBI databases (see Data availability statement).

Overall, results of the transcriptomic and proteomic analyses were highly similar regarding individual DEG/Ps and enriched functional pathways, implying that numerous changes of protein expression resulted from transcriptional alterations. We tested the

strength of the relationship between DEG/Ps of the (T), (P) and (S) “omics” layers using a Spearman correlation analysis, and found a strong dependence ( $\rho = 0.87$ ) (Fig. 3b), indicating that LYN-deletion perturbed the transcriptional regulation of stromal cells.

Accordingly, integrative interpretation of independent Pathway (Reactome) (Fig. 3c) and Gene Ontology (GO) (Fig. 3d) term enrichment analyses consistently identified two major transformations under LYN<sup>KO</sup>/LYN<sup>WT</sup> condition: the most striking alterations were extracellular matrix (ECM)-related processes followed by cytokine-related ones. Network visualization highlights clustering of top enriched Reactome-Terms into these two domains (Fig. 3e), which could be exemplified by the consistent deregulation of extracellular matrix proteins (BGN, TGFBI, EFEMP1, THBS1) along with cytokines (CCL2, CXCL8) in mono-culture (Supplementary Fig. 2b).



**Fig. 2 | LYN kinase in fibroblasts supported primary CLL cell survival in vitro.** **a**, Illustration of the different in vitro co-culture systems: Primary human CLL samples were isolated from the peripheral blood of CLL patients. LYN proficient and deficient stromal feeder cells were either isolated from MEF of *Lyn*<sup>wt/wt</sup> and *Lyn*<sup>-/-</sup> mice or generated in human BMSC lines via CRISPR/Cas9. Leukemic and stromal cells were co-cultured, and CLL viability (defined as proportion of Annexin V/7AAD<sup>-</sup> cells of all CD45<sup>+</sup> cells) was measured over time by flow cytometry. Illustration was created with BioRender.com. **b** *Lyn*<sup>wt/wt</sup> and *Lyn*<sup>-/-</sup> MEF ( $n = 2$  clones per genotype) were used in co-culture with primary human CLL samples ( $n = 3$ ). Depicted is the CLL viability over time (mean  $\pm$  SEM; two-sided Mann-Whitney test for *Lyn*<sup>wt/wt</sup> vs. *Lyn*<sup>-/-</sup> at each time point: 24 h–72 h  $p = 0.002165$ ). **c, d** LYN<sup>WT</sup> and LYN<sup>KO</sup> HS-5 single-cell clones (SCC) were used in co-culture with CLL cells. (CLL

$n = 19$ ; 2 clones per HS-5 genotype). **c** illustrates CLL viability over time (mean  $\pm$  SEM; two-sided Mann-Whitney test for LYN<sup>WT</sup> vs. LYN<sup>KO</sup> at each time point: 72 h  $p = 0.003056$ ; 96 h  $p = 0.013878$ ) and **(d)** highlights individual sample viability after 72 h of co-culture (single representative HS-5 clone per genotype; bars represent mean viability; two-tailed Wilcoxon rank test: in all tests  $p < 0.0001$ ). **e, f** LYN<sup>WT</sup> and LYN<sup>KO</sup> NKtert Cas9-SCCs were used for co-culture assays with CLL cells. (CLL  $n = 10$ ; LYN<sup>WT</sup> 1 clone, LYN<sup>KO</sup> 5 clones). **e** illustrates CLL viability over time (mean  $\pm$  SEM; two-sided Mann-Whitney test for LYN<sup>WT</sup> vs. LYN<sup>KO</sup> at each time point: 72 h  $p = 0.049609$ ) and **(f)** highlights individual sample viability after 48 h of co-culture (from 8 CLL patients; LYN<sup>WT</sup>: 1 clone; LYN<sup>KO</sup>: every circle represents mean viability on 5 distinct LYN<sup>KO</sup> clones; bars represent mean viability; Wilcoxon rank test: in all tests  $p = 0.0078$ ). See also Fig. S1. Source data are provided as a Source Data file.

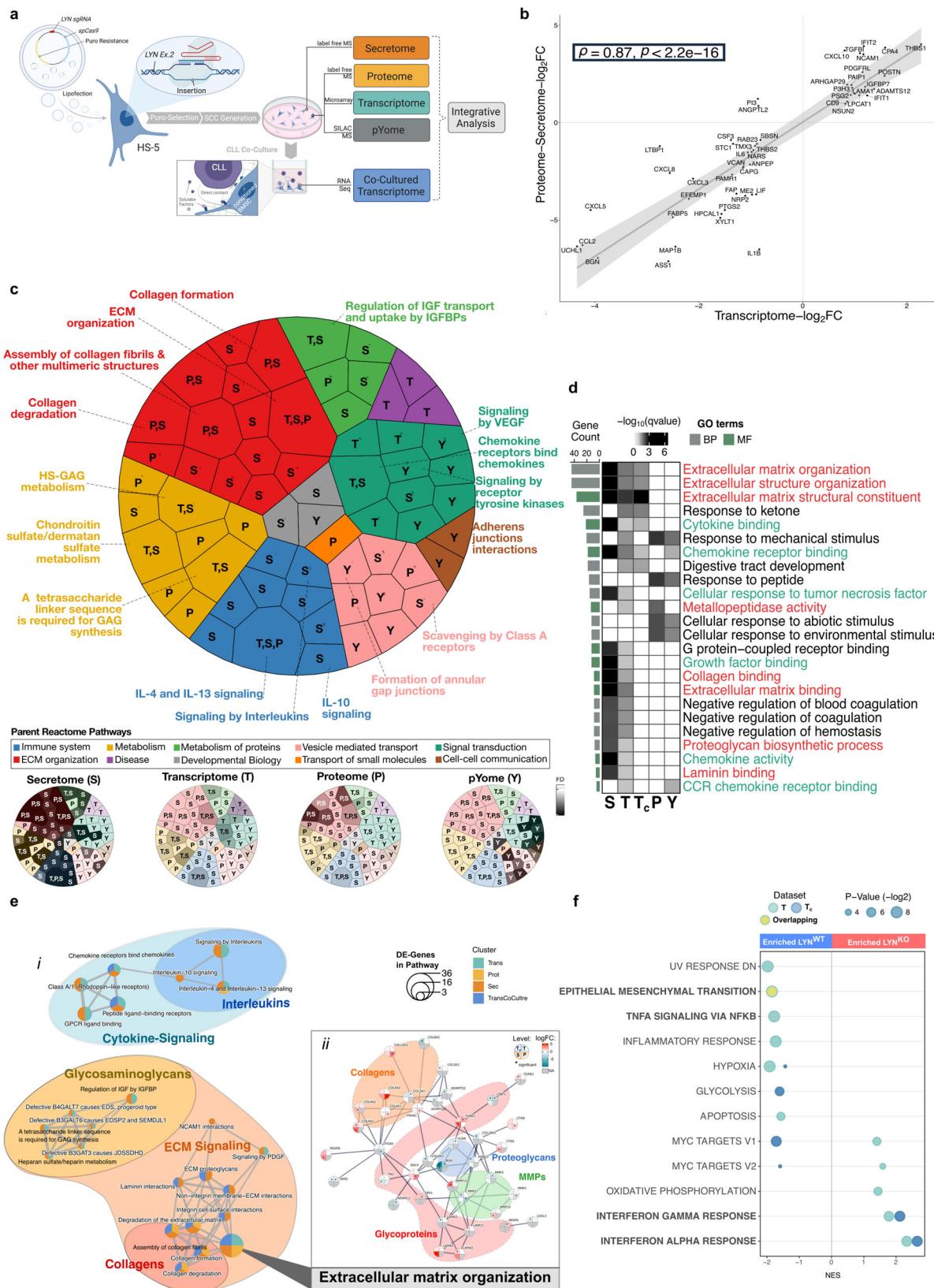
ECM alterations globally integrated the highest number of target genes (Fig. 3c red, 3d, Supplementary Fig. 2i) and additionally changes in metabolic functions could be linked to ECM organization (Fig. 3c yellow and light green), indicating a widespread ECM remodeling affecting the biogenesis and composition of LYN<sup>KO</sup> ECM. More specifically, network visualization revealed clustering of enriched ECM terms related to collagens, ECM signaling and glycosaminoglycan metabolism (Fig. 3ei). The consistently enriched central pathway “ECM organization” showed a predominant differential expression of collagens and metallopeptidases (Fig. 3eii), in agreement with results from GO-Term analyses (Fig. 3d).

Cytokine related alterations were represented by differential expression of CCL2, CXCL5, CXCL8, CXCL10, IL1 or IL6 on the molecular level (Fig. 3b, Supplementary Fig. 2c–e, g) and enriched terms such as “Cytokine binding” and “Chemokine receptor binding” in GO-Term analyses (Fig. 3d), and “Signaling by Interleukins” in Reactome-Pathway analyses (Fig. 3c blue, ei). In co-cultured HS-5 cells ( $T_c$ ), alterations in “Senescence-Associated Secretory Phenotype” pathway also indicated the perturbation of cytokine secretion (Supplementary Fig. 2i). Moreover, several cytokine-signaling associated pathways

(Fig. 3c green) as well as processes related with “Cellular responses” to different stimuli were prominently altered in Proteome and pYome, but not in Transcriptome and Secretome layers (Fig. 3c, d). This might reflect the impaired intracellular signaling cascades generated by LYN depletion as well as putatively point to a shifted autocrine response as secondary effect following the altered cytokine profile.

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), a different enrichment algorithm, taking into account also changes in gene expression below the significance threshold, validated the previous enrichment of the transcriptomic data and identified a downregulation of the “epithelial-mesenchymal-transition” signature, which is known to overlap with ECM organization changes<sup>22</sup>, and of inflammatory pathways including “TNF $\alpha$  Signaling via NF $\kappa$ B” and “Inflammatory response” in LYN<sup>KO</sup> fibroblasts (Fig. 3f, Supplementary Fig. 2j).

Together, LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells exhibit a uniformly altered profile on both protein and transcription levels which points to a transcriptional reprogramming function of LYN in BMSC. This rewiring of fibroblasts towards a leukemia-supportive phenotype seems to involve a profound remodeling of the ECM and of cytokine production.



To further validate these observations *in vivo*, primary murine fibroblasts ( $CD45^- CD31^- CD71^- CD29^+ CD54^+$ ) from spleens of  $Lyn^{wt/wt}$  and  $Lyn^{-/-}$  mice were isolated and analyzed by bulk RNA-sequencing (Supplementary Fig. 2k). The sorting strategy successfully depleted immune-related genes and enriched stromal genes (Supplementary Fig. 2l, m). GO-Term enrichment analysis demonstrated a prominent

deregulation of ECM-related molecular functions in murine splenic fibroblasts upon LYN deficiency (Supplementary Fig. 2n), mirroring our observation in HS-5 cells. However, splenic fibroblasts occurred at low abundance, and the analyzed cell populations still contained residual immune cells that might partially account for the changes in DEGs and deregulated pathways.

**Fig. 3 | Integrative multi-omics analysis identified a transcriptionally altered fibroblast polarization in LYN-deficient cells perturbing predominantly cytokine- and matrix related pathways.** **a** Multi-omics profiling. Illustration was created with BioRender.com. **b** Spearman rank correlation analysis between T and S/P. Commonly expressed genes/proteins (52 in total) with absolute  $\log_2\text{FC} > 0.8$  were selected. **c** Integrative Reactome-Pathway Enrichment analysis. Weighted Voronoi Treemap (*top*) represents a hierarchical visualization of enriched top-level pathways (defined by single colors) enclosing sub-level pathways with the annotation of each enriched “omics”-layer. The proportional area matches the frequency and weight of this region per total. Grayscale plots (*bottom*) show statistical significance (FDR calculated by *clusterProfiler*<sup>80</sup>) for each sub-level pathway per “omics”-layer. **d** Heatmap of enriched GO-Terms independently performed per “omics”-layer, common terms displaying statistical significance ( $-\log_{10} q$  value calculated by *clusterProfiler*<sup>80</sup>) are depicted. GO-terms are colored according to top-level pathways in (c). Bar plots represent total number of genes contributing to the enriched term (green: Molecular Function; gray: Biological Process). **e** Network visualization of Reactome-enrichment results: (i) Enrichment map of the top

deregulated pathways in T, T<sub>c</sub>, P, S. Each node represents one Reactome-Term, the circle colors indicate “omics”-layers in which the pathway was deregulated, circle size represents DEG number within this term. Edges represent shared genes between nodes, generated by *clusterProfiler*<sup>80</sup>. Domain annotation was added manually. (ii) STRING protein association network contributing to “ECM organization” Reactome-Pathway. Every node is divided in four segments (representing T, T<sub>c</sub>, P, S) colored by the gene/protein  $\log_2\text{FC}$  value. Gray color indicates missing values, asterisks indicate significant differentially expression in the respective layer (specified in Methods). Well-defined clusters of different ECM protein families were manually annotated. Only proteins with interaction score  $\geq 0.9$  are shown. **f** Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) in T and T<sub>c</sub>. Normalized enrichment scores (NES) of enriched genesets from the Hallmark Molecular Signatures Database are depicted. Colors represent “omics”-layers, dot size represents statistical significance as  $-\log_2$  of adjusted *p* value (specified in Methods) of enriched terms. Genesets with negative NES were enriched in LYN<sup>WT</sup>, positive NES enriched in LYN<sup>KO</sup> clones. See also Fig. S2. Source data are provided as a Source Data file.

### LYN deletion disturbed the CAF-like phenotype in bone marrow stromal cells and primary CAF

Stromal cells in the malignant microenvironment acquire an adapted secretion of soluble factors and remodeling of the ECM, through which they influence cancer cell biology and disease progression<sup>7</sup>, altogether summarized as a cancer-associated fibroblast (CAF) phenotype. Similarly, stromal cells in the CLL-TME acquire a CAF-like phenotype contributing to leukemia progression<sup>4,6</sup>. As LYN<sup>KO</sup> in stromal cells particularly affected cytokine- and ECM-related pathways and resulted in a reduced tumor support, we postulate that LYN expression in stromal cells may modulate CAF features.

GSEA enrichment of experimentally defined genes upregulated in CAF from bone marrow derived mesenchymal stem cells published before<sup>23</sup> indicated a significant deregulation of those in LYN<sup>KO</sup> stroma cells (Supplementary Fig. 3a). Correspondingly, a manually curated set of “CAF related markers” identified numerous markers that were significantly altered in HS-5 LYN<sup>KO</sup> cells (Fig. 4a), corroborating a role of LYN in the CAF differentiation.

To further validate changes in the CAF signature upon LYN deletion, we examined an array of typical CAF markers as previously defined in pancreatic cancer<sup>24</sup> in four cell lines. Besides the two BMSC lines HS-5 and NKtert, we established two immortalized CAF (imCAF) cell lines from two patient-derived pancreatic cancer specimens and generated two polyclonal, partial LYN<sup>KO</sup> clones using CRISPR/Cas9 in each imCAF line (Supplementary Fig. 3b). Strikingly, mRNA expression of various general CAF markers was consistently reduced upon LYN knockout (Fig. 4b): *PDGFRB* was clearly down-regulated in all cell lines, and *FAP* and *ITGB1* mRNA levels showed a trend towards reduced expression. However, the levels of *PDGFRA* and *CAV1* were altered inconsistently. *PDPN* expression was completely absent in LYN<sup>KO</sup> HS-5 and imCAF#2 cells, but exhibited variable levels in different NKtert and imCAF#1 clones. At the protein level, LYN expression was reduced by 78–91% in LYN<sup>KO</sup> imCAF clones, which resulted in visible reduction of PDGFR $\beta$  and  $\alpha$ SMA (Fig. 4c).

### LYN deficiency altered CAF-associated polarization by diminishing inflammatory features and enhancing typical myofibroblastic functions

CAF display very heterogenous polarization states and can be segregated into two most abundant subtypes with distinct phenotypes and functions: inflammatory (iCAF) and myofibroblastic (myCAF), with iCAF being largely responsible for cytokine secretion and myCAF for ECM remodeling<sup>8,9</sup>. We also assessed mRNA expression of markers associated with these subtypes<sup>24</sup> and observed a consistent reduction in various inflammatory molecules, including *IL6*, *IL1A*, *LIF*, *CSF3* and *CXCL1* (Fig. 4b), strongly corroborating the described perturbation of

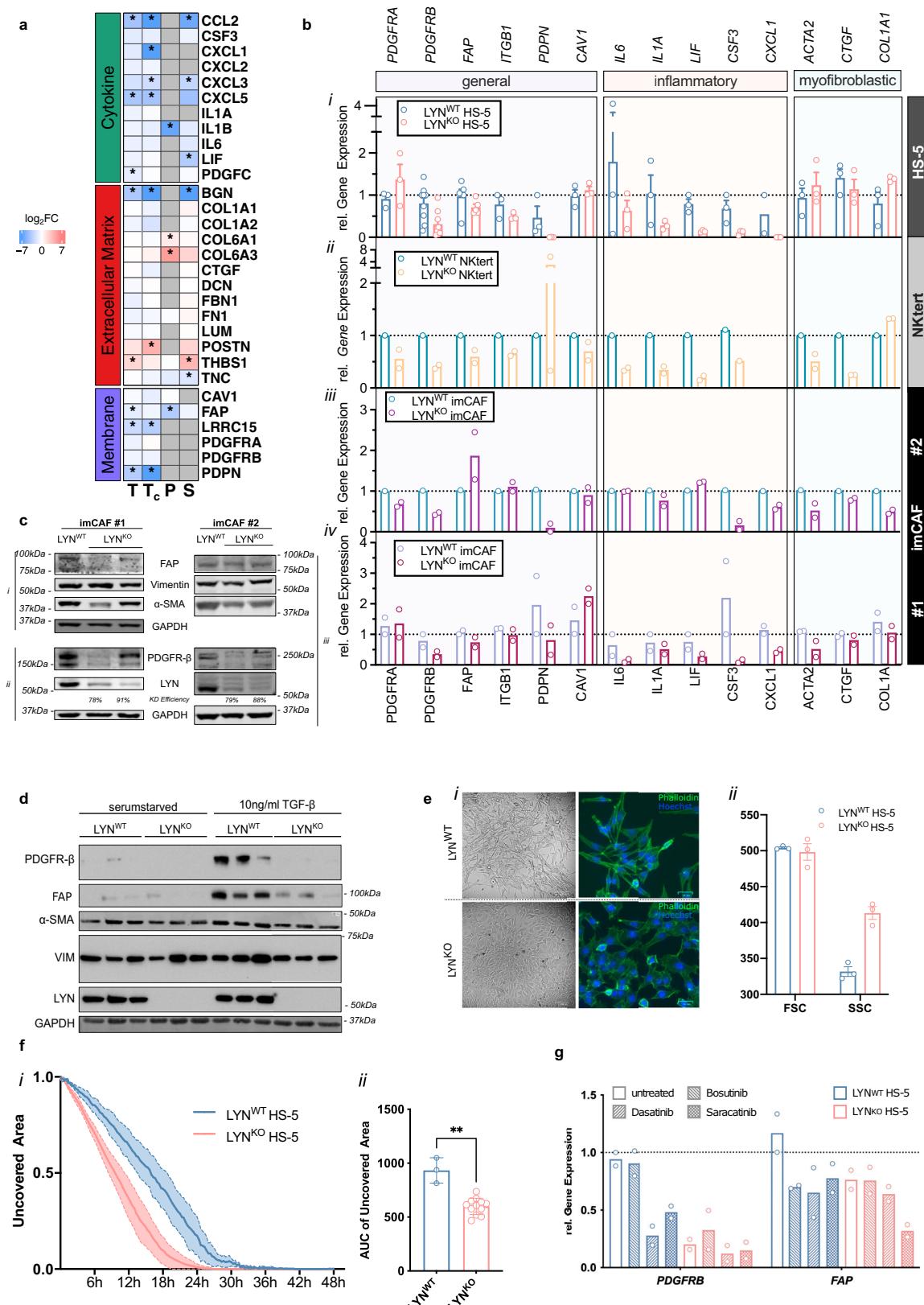
cytokine-related pathways in HS-5 cells (Fig. 3c, d, f) and further implying an inhibition of inflammatory iCAF promoting pathways in the LYN<sup>KO</sup> cells.

The transcriptional differences in myofibroblastic markers such as *ACTA2*, *CTGF* and *COL1A1* were less consistent than iCAF markers across the four cell lines (Fig. 4b). PDAC-derived CAF featured a myofibroblastic polarization with high  $\alpha$ SMA expression, which was apparently decreased in LYN-deficient imCAF lines (Fig. 4c). Stimulation of LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells with the major myofibroblast promoting cytokine TGF $\beta$  completely failed to induce PDGFR $\beta$  and FAP expression in comparison to LYN<sup>WT</sup> cells (Fig. 4d). Moreover, LYN<sup>KO</sup> cells exhibited a more bulbous, rounded morphology distinct from the classical elongated, spindle-shaped LYN<sup>WT</sup> cells (Fig. 4e) accompanied by an increase in flow-cytometric side-scatter which implies further changes of the intracellular structure in LYN<sup>KO</sup> cells. Also, migration in a wound healing scratch assay was significantly enhanced in LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells (Fig. 4f). Altogether, this implies that LYN deficiency also impacts on the myofibroblast-related phenotype and function of stromal cells, closely related to the changes in ECM remodeling described in the multi-omics analysis.

Treatment of LYN<sup>WT</sup> HS-5 cells with the different LYN/SFK inhibitors dasatinib, bosutinib and saracatinib exerted similar transcriptional changes as genetic LYN knockout: All inhibitors impaired *FAP*; dasatinib and saracatinib also impaired *PDGFRB* expression (Fig. 4g). The effects induced by these inhibitors appeared to be mainly mediated by LYN because *PDGFRB* and *FAP* expression were not additionally compromised by dasatinib and bosutinib in LYN<sup>KO</sup> cells (Fig. 4g); only saracatinib further reduced the already decreased mRNA levels of *FAP* in LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells.

Although FAP and PDGFR $\beta$  expression was strongly diminished in LYN<sup>KO</sup> BMSC (Fig. 4a–d, Supplementary Fig. 3c) and both molecules were associated with the leukemia protective function of stromal cells<sup>25–27</sup>, both FAP- and PDGFR $\beta$ -knockdown (Supplementary Fig. 3d) did not impair stromal feeding capacity in CLL co-culture (Supplementary Fig. 3e, f). This demonstrates that FAP and PDGFR $\beta$  are not the main effectors of LYN function in BMSC, and the perturbed CAF-program might rather be of collective relevance.

Altogether, these results show that LYN<sup>KO</sup> fibroblasts resemble a disturbed CAF-like phenotype in different cell lines, impacting on the inflammatory differentiation and associated cytokine secretion as well as on the ECM-related myofibroblastic differentiation. Treatment with available SFK inhibitors further indicated the relevance of LYN in this reprogramming, as effectiveness of reducing FAP and PDGFR $\beta$  expression by kinase inhibition was impaired in LYN<sup>KO</sup> stromal cells.



### Diminished CLL support upon LYN deletion is not related to changes in cytokine secretion

Despite the profound changes in secreted cytokines of LYN<sup>KO</sup> cells, the reduction of these soluble factors was insufficient to explain the altered feeder effect of LYN<sup>KO</sup> cells on leukemic cells, particularly because direct contact is needed for CLL support<sup>28</sup>. Indirect co-culture

separating feeder and leukemic cells via transwell membranes in HS-5 and MEF was incapable to increase CLL viability (Fig. 5a). Although HS-5 or NKtert conditioned medium could slightly enhance leukemic viability, this effect was negligible compared to direct co-culture and independent of stromal LYN-expression (Fig. 5b), indicating that stromal LYN supports CLL viability upon direct contact.

**Fig. 4 | LYN deletion disturbed the CAF-like phenotype and associated polarization in stromal cells by diminishing inflammatory features and enhancing typical myofibroblastic functions.** **a** Heatmap of a curated list of genes associated with CAF phenotype. Fold changes (log<sub>2</sub>-FC) from “omics”-layers are depicted. Red and blue color represent log<sub>2</sub>-FC of genes in LYN<sup>WT</sup> and LYN<sup>KO</sup> clones, respectively. Individual layers, where a gene was not detected, are gray. Genes were grouped by their cellular compartment and asterisks indicate “omics”-layers where genes were significantly differentially expressed (specified in Methods). **b** Transcriptional levels of CAF markers according to Biffi et al.<sup>24</sup> in different LYN<sup>WT</sup> and LYN<sup>KO</sup> cells (*i*: HS-5; *ii*: NKtert; *iii/iv*: two imCAF lines) determined by qRT-PCR. (HS-5: 3 SCC per genotype; NKtert: 1 LYN<sup>WT</sup> SCC vs. 2 LYN<sup>KO</sup> SCC; imCAF#1: 2 polyclones per genotype, imCAF#2: 1 LYN<sup>WT</sup> vs. 2 LYN<sup>KO</sup> polyclones). **c** Immunoblot of LYN<sup>WT</sup> or LYN<sup>KO</sup> imCAF#1 and imCAF#2 for selected CAF markers. (*i*) and (*ii*) were prepared from the same lysates. **d** Immunoblot of LYN<sup>WT</sup> or LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells (3 clones per genotype,

untreated or stimulated with 10 ng/ml TGF $\beta$  for 24 h) for selected CAF markers. **e** (*i*) Bright field (left) and immunofluorescence microscopy (right) for phalloidin and Hoechst showing morphology of LYN<sup>KO</sup> cells under normal culture conditions. (*ii*) Quantification of FSC and SSC of HS-5 LYN<sup>WT</sup> and LYN<sup>KO</sup> (mean  $\pm$  SEM, 3 clones per genotype). **f** Migration of HS-5 cells in a scratch assay. The scratch area relative to the maximal value was measured every 20 min by live cell microscopy for HS-5 LYN<sup>WT</sup> (1 clone) and LYN<sup>KO</sup> (3 clones) in independent triplicates (mean  $\pm$  SD) (*i*). Area Under the Curve (mean  $\pm$  SD; Mann-Whitney test  $p = 0.0044$ ) (*ii*). **g** LYN<sup>WT</sup> and LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells were treated for 24 h with kinase inhibitors (1  $\mu$ M dasatinib, 5  $\mu$ M bosutinib, 5  $\mu$ M saracatinib), mRNA levels of PDGFRB and FAP were assessed by qRT-PCR (2 SCC per genotype). In all qRT-PCR gene expression was normalized to PPIA. Depicted are means ( $\pm$  SEM where applicable) from the indicated number of clones per genotype. See also Fig. S3. Source data are provided as a Source Data file.

To investigate if the perturbed cytokine secretion upon LYN deficiency had other functional relevance because it has been increasingly acknowledged that CAF secretome can strongly modulate immunity via interaction with immune cells<sup>11,29</sup>, we assessed stromal LYN effect on T-cell activation. Culturing PBMC directly on HS-5 stroma cells or indirectly with HS-5 conditioned medium induced an increase in surface expression of CD25 and CD69 activation markers on CD4 and CD8 T cells, whereas this activation was significantly reduced upon culture with LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells (Fig. 5c). This suggests a potential impact of stromal LYN on T-cell-mediated immune response towards leukemia, driven by changes in cytokine secretion.

Despite the dependency of leukemic feeding capacity on direct contact, the reduced leukemic survival observed on LYN<sup>KO</sup> cells was not caused by impaired adhesion because CLL cells could adhere 3-fold better to LYN<sup>KO</sup> than to LYN<sup>WT</sup> HS-5 cells after co-culture (Fig. 5d). The increased adhesion may relate to the elevated transcript and protein levels of several adhesion molecules such as LFA1, ICAM1 and VCAM1 on LYN<sup>KO</sup> cells (Fig. 5e–h). Although adhesion of CLL cells to stroma via VLA4-VCAM1 and LFA1-ICAM1 signaling axes can facilitate leukemic cell survival<sup>4,30,31</sup>, their increased levels could not compensate for the loss of stromal LYN in this setting.

#### LYN-dependent regulation of ECM proteins like Thrombospondin-1 (THBS1) in stromal cells governed the viability of CLL cells

As ECM generally shapes lymphomagenesis<sup>12,32</sup> and can promote viability and chemoresistance of CLL via molecules such as CD44<sup>33</sup> or integrins<sup>4</sup>, we hypothesized that LYN effects were mediated by CLL contact to the ECM. Indeed, CLL cells cultured on decellularized fibroblast derived matrices (FDM) from LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells showed a significantly reduced viability compared to LYN<sup>WT</sup> FDM co-culture (Fig. 6a). Notably, while LYN<sup>WT</sup> FDM did not clearly influence CLL viability when compared to mono-culture, LYN<sup>KO</sup> FDM surprisingly reduced CLL viability to lower levels than CLL mono-culture, suggesting that LYN<sup>KO</sup> ECM may eventually exhibit leukemia-suppressive functions. In conclusion, the changes in the ECM seem to be highly relevant in attenuating CLL cell viability upon direct stromal contact.

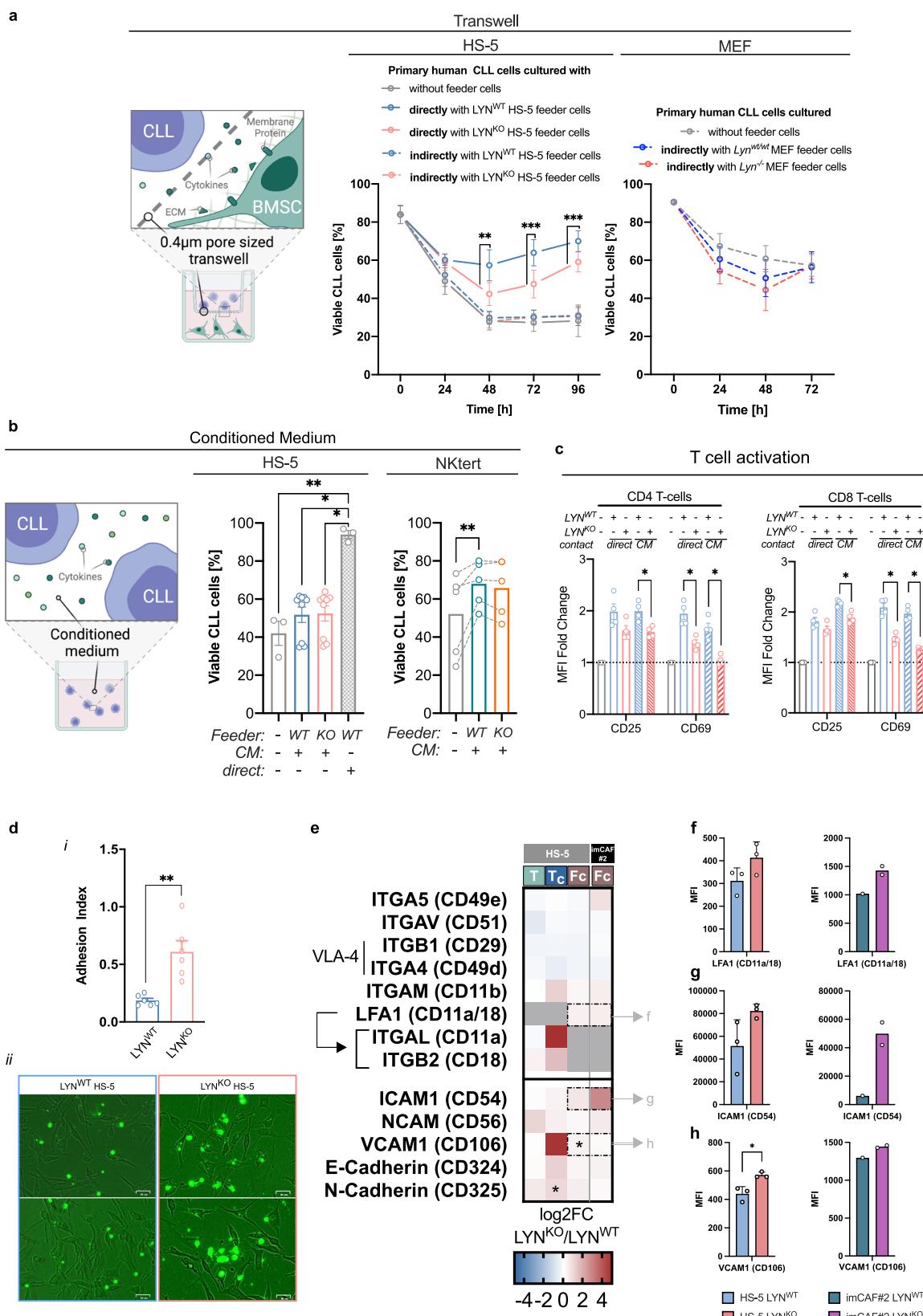
To dissect the functional relevance of additional, specific ECM components, we investigated the ECM protein Biglycan (BGN), which was found almost absent on protein and transcript levels in LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells in multi-omics analyses (Fig. 3b, Supplementary Fig. 2d, e, g). Immunoblotting validated the strongly reduced protein expression upon LYN deficiency (Fig. 6b) and importantly, siRNA-mediated knockdown of BGN in HS-5 cells resulted in a significant reduction of CLL cell survival in co-culture experiments (Fig. 6c). This suggested a leukemia-supportive function of BGN that is lost after ECM remodeling in LYN<sup>KO</sup> stromal cells.

However, loss of leukemia-supportive BGN alone does not explain the leukemia-restrictive effect of LYN<sup>KO</sup> FDM. Tumor-

suppressive functions have been described for several ECM proteins in solid cancers<sup>8</sup> and some hematological malignancies<sup>12–14</sup>. In CLL, the matrix glycoprotein Thrombospondin-1 (THBS1), a versatile player of the microenvironment, is capable of inducing caspase independent apoptosis of leukemic cells via CD47 ligation<sup>34–36</sup>, and increased THBS1 levels are associated with better survival of CLL patients<sup>13</sup>. Interestingly, increased levels of the CLL-restrictive matrix protein THBS1 were detected in the transcriptome and secretome of LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells (Fig. 3b, Supplementary Fig. 2d, e), potentially explaining this leukemia-restrictive ECM in LYN<sup>KO</sup> BMSC. Validating the multi-omics results, mRNA expression of THBS1 was increased 6-fold in LYN<sup>KO</sup> HS-5 and 50-fold in NKtert cells, respectively (Fig. 6d, Supplementary Fig. 4a). The THBS1 protein was strongly enriched in LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells and culture media compared to LYN<sup>WT</sup> counterparts (Fig. 6e, f). In imCAF cells, THBS1 protein was also overexpressed in LYN<sup>KO</sup> clones, but showed variable mRNA levels (Supplementary Fig. 4b, c).

In agreement with a previous report<sup>35</sup>, recombinant human THBS1 reduced CLL cell viability in a time and dose dependent manner after 6 h and 24 h *in vitro* (Fig. 6g, Supplementary Fig. 4d). Additionally, the co-culture of CLL cells with THBS1-overexpressing HS-5 cells similarly decreased CLL viability compared to controls (Fig. 6h, Supplementary Fig. 4e) as early as 24 h after co-culture. THBS1 overexpression had no effect on feeder cell proliferation or viability (Supplementary Fig. 4f). Reversely, siRNA-mediated knockdown of the overexpressed THBS1 in LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells (Supplementary Fig. 4g) increased the feeding capacity of LYN<sup>KO</sup> cells in co-culture, thereby partially reversing the effects of the LYN knockout (Fig. 6i) without affecting feeder cell proliferation (Supplementary Fig. 4h). Moreover, pretreatment of CLL cells with a blocking anti-CD47 antibody induced a significant increase of CLL cell viability in co-culture with LYN<sup>KO</sup> HS-5 but had no effect on viability in LYN<sup>WT</sup> co-culture (Fig. 6j), mechanistically confirming that THBS1 induced CLL cell death via CD47 ligation. Notably, the used anti-CD47 antibody acted as a blocking antibody, and did not impair CLL cell viability (Supplementary Fig. 4i). The distinctive efficacy of CLL-specific CD47 blockade in co-culture between LYN<sup>WT</sup> and LYN<sup>KO</sup> BMSC strongly supports the notion that LYN regulates THBS1 expression in stromal fibroblasts and acts—at least in part—via CD47 ligation on CLL cells. In accordance with the inhibitory effect of LYN on THBS1 expression in cell lines, we observed significantly lower levels of fibroblastic THBS1 in CLL-LN compared to HC-LN in imaging mass cytometry analysis (Fig. 6k, Supplementary Fig. 4j).

Collectively, LYN<sup>KO</sup> stromal cells displayed a leukemia-restrictive ECM composition, exemplified by the significant modulation of THBS1 and BGN. As expected, modulation of either THBS or BGN alone could not fully recapitulate stromal LYN<sup>KO</sup> effect on CLL cell survival, suggesting that LYN kinase orchestrates additional regulators.



### A perturbed inflammatory signaling and a reduced cJUN expression disinhibit THBS1 expression and suppress leukemia support in LYN<sup>KO</sup> BMSC

To elucidate the regulatory mechanism underlying LYN-induced effects and predict the involved upstream regulators, Ingenuity Pathway Analysis (IPA) was performed (Fig. 7a). Corresponding to changes

in iCAF signature (Fig. 4b) and reduced inflammatory signatures in GSEA (Fig. 3f) we found a striking reduction of an inflammatory regulatory network, including the NF $\kappa$ B complex, TNF, IL1 and JUN in LYN<sup>KO</sup> cells (Fig. 7ai), which was mainly driven by differential expression of cytokines such as CCL2, IL1, CXCL8, CXCL5 and CCL20, and of ECM components like ITGAV, MMP1 and MMP3 (Fig. 7aii).

**Fig. 5 | Diminished CLL support upon LYN deletion is not related to changes in cytokine secretion.** **a** CLL cells ( $n = 5$ ) were cultured with HS-5 (1 clone per genotype) (*middle*) or MEF (CLL:  $n = 4$ ; MEF: 1 clone per genotype) (*right*) in direct contact or separated by a 0.4  $\mu\text{m}$  pore-sized transwell membrane. (mean  $\pm$  SEM; Uncorrected Fisher's LSD test for LYN<sup>WT</sup> vs. LYN<sup>KO</sup>: 48 h direct  $p = 0.0028$ ; 72 h direct  $p = 0.0004$ ; 96 h direct  $p = 0.0003$ ). **b** CLL ( $n = 3$ ) were cultured for 72 h in HS-5 cell conditioned medium (3 clones per genotype) (*middle*); without feeder cells vs. direct contact to LYN<sup>WT</sup>  $p = 0.0032$ , with CM from LYN<sup>WT</sup> vs. direct contact to LYN<sup>WT</sup>  $p = 0.0156$ , with CM from LYN<sup>KO</sup> vs. direct contact to LYN<sup>WT</sup>  $p = 0.0201$ ) or 48 h in NKtert cell conditioned medium (*right*) (CLL:  $n = 5$ , NKtert: 1 clone per genotype, without feeder cells vs. CM from LYN<sup>WT</sup>  $p = 0.0044$ ), (mean  $\pm$  SEM; two-sided Uncorrected Dunn's test). **c**, Healthy PBMC ( $n = 4$ ) were cultured for 72 h alone, in direct contact or with conditioned medium from LYN<sup>WT</sup>/LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells.

MFI of activation markers on CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells were normalized to cells cultured alone (mean  $\pm$  SEM; two-sided Mann-Whitney test against LYN<sup>WT</sup> conditions: for all tests  $p = 0.028571$ ). **d** CFSE-labeled CLL cells ( $n = 2$ ) were co-cultured with LYN<sup>WT</sup> or LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells for 48 h, images were taken after rigorous washing (*i*). Adhesion Index depicts CFSE<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> CLL cells per CFSE HS-5 cells (*ii*) (3 clones per genotype, mean  $\pm$  SEM, two-sided Mann-Whitney test  $p = 0.0022$ ). **e** Heatmap depicting expression fold change from HS-5 T and T<sub>c</sub> data, and flow cytometry (Fc) of HS-5 and imCAF#2 cells. Color depicts log<sub>2</sub>-FC (LYN<sup>KO</sup>/LYN<sup>WT</sup>) of gene expression/MFI respectively, asterisks indicate statistical significance specified for each dataset. **f-h** MFI for (**f**) LFA1, (**g**) ICAM1 and (**h**) VCAM1 in HS-5 (*left*, 3 clones per genotype) and imCAF#2 (*right*, 1 LYN<sup>WT</sup> clone vs. 2 LYN<sup>KO</sup> clones) cells (mean  $\pm$  SD, two-sided Welch's t-test  $p = 0.0308$ ). Illustration was created with BioRender.com. Source data are provided as a Source Data file.

Interestingly, IPA revealed that inflammatory pathways were affected differentially by LYN depletion, highlighting an upregulated Interferon alpha (IFNA2) signaling in LYN<sup>KO</sup> cells. This reflected the enrichment of Interferon alpha and Interferon gamma signatures in GSEA analysis (Fig. 3f, Supplementary Fig. 2j), upregulation of STAT1 and the Interferon response genes IFIT1 and IFIT2 on mRNA and protein level (Fig. 3b, Supplementary Fig. 2c) and an increased phosphorylation of STAT1-Y701 in pYome (Supplementary Fig. 2f).

The identified upstream regulators implied deregulation of MAPK signaling pathway, integrating extracellular ligands such as IL1, IL17 and TNF, MAPK1 (ERK2) kinase and the transcriptional factors JUN and JUNB. X2K analysis on DEGs/Ps from P and T, which performs transcription factor enrichment and subsequent upstream kinase enrichment analysis<sup>37</sup>, similarly indicated deregulation of kinases related to MAPK signaling, in particular MAPK14 (p38 Kinase) (Supplementary Fig. 5a). Moreover, a reduced phosphorylation at the activating MAPK14-Y182 site was amongst the strongest alterations detected in pYome data (Supplementary Fig. 2f) and was validated by flow cytometry (Fig. 7b), strongly endorsing changes in MAPK signaling induced by the LYN knockout in fibroblasts.

To further dissect the downstream transcriptional regulation, ATAC-sequencing of LYN<sup>WT</sup> and LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells demonstrated profound changes in accessible chromatin with a generally more open state in LYN<sup>WT</sup> cells (Supplementary Fig. 5b, c). Genes with the most reduced transcripts in LYN<sup>KO</sup> cells (*CCL2*, *BGN*, *PDPN*) also showed significantly reduced chromatin accessibility in multiple gene intervals, including significant deregulation in promoter accessibility (Fig. 7c). Likewise, genes with the highest increase of transcripts showed increased chromatin accessibility in LYN<sup>KO</sup> cells (*ADGRG6*, *THBS1*, *IL7R*), verifying that LYN<sup>KO</sup>-mediated stromal reprogramming occurs largely at the transcriptional level. Footprinting analysis, which characterizes the underlying changes in transcription factor (TF) activity, identified several TF with higher DNA binding in LYN<sup>WT</sup> cells like SP and CREB. In LYN<sup>KO</sup> cells, AP-1 complex dimers showed a particularly reduced activity compared to LYN<sup>WT</sup> cells (Fig. 7d), which could be recapitulated in TF-motif enrichment of differentially accessible intervals (Fig. 7e). These data supported the IPA upstream regulator predictions pointing towards deregulated MAPK signaling that affected AP-1/JUN activity. On the other hand, only a few pathways were more active in LYN<sup>KO</sup> cells, with IRF1 pathway showing the most prominent increase, which parallels the increased expression of interferon signatures observed in the LYN<sup>KO</sup> cells in multi-omics analysis.

Accordingly, reduced protein levels of nuclear c-JUN by approximately 50% were confirmed in HS-5 LYN<sup>KO</sup> cells (Fig. 8a, Supplementary Fig. 5d), and both BMSC lines HS-5 and NKtert (Fig. 8b) as well as imCAF#2 (Supplementary Fig. 5e) exhibited diminished JUN-mRNA levels upon LYN deficiency. We explored the functional relevance of JUN in stromal cells by generating polyclonal, partial JUN knockout clones in HS-5 and NKtert stroma cells using two different gRNAs (Supplementary Fig. 5f, g). Upon co-culture with primary human CLL cells, both gRNA generated JUN<sup>KO</sup> clones in the BMSC cell lines showed

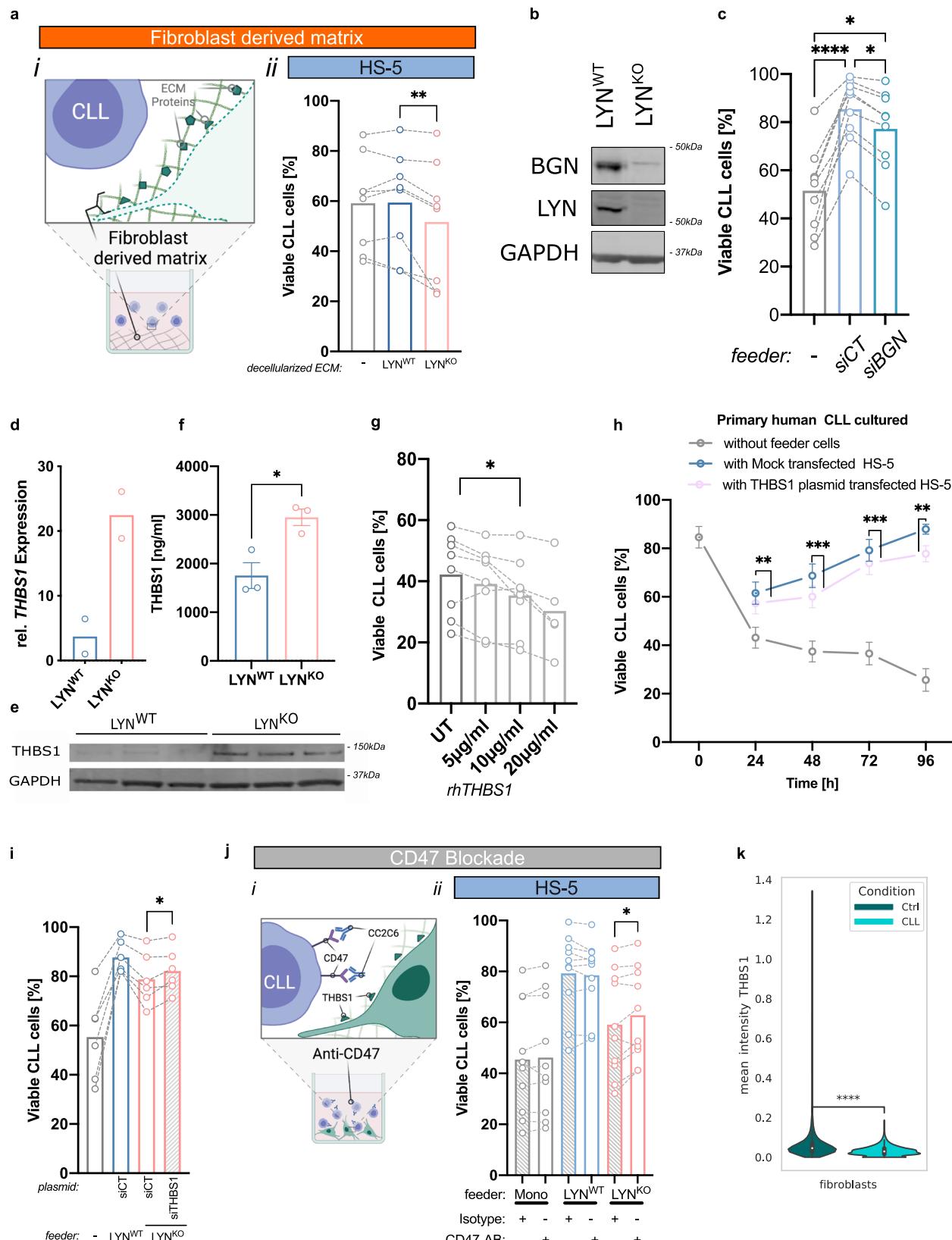
a reduced support of CLL growth compared to JUN<sup>WT</sup> control cells (Fig. 8c, d). This illustrated that the leukemia-supportive LYN effects in BMSC were at least partially mediated by c-JUN.

Moreover, THBS1 transcription can be regulated by transcriptional factors downstream of the MAPK pathway such as c-JUN<sup>38,39</sup>. JUN<sup>KO</sup> cells demonstrated an enhanced THBS1 expression on protein level (Fig. 8e) and a strong increase in mRNA level (Fig. 8f). To validate the regulatory function of c-JUN on THBS1 expression, c-JUN expression was reinduced in LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells, which reverted the increased THBS1 expression in LYN<sup>KO</sup> cells (Fig. 8g, Supplementary Fig. 5h). This strongly suggested that overexpression of THBS1 upon LYN deficiency was mediated via a reduced expression of inhibitory c-JUN. Collectively, these results strongly indicate that a perturbation of inflammatory signaling contributes to the reprogramming of stromal cell following LYN deficiency and mechanistically, a decreased MAPK activity and diminished c-JUN expression is primarily responsible for the induction of THBS1 expression in LYN<sup>KO</sup> stromal cells.

## Discussion

In this study, we report that the presence of LYN kinase in the stromal microenvironment supports leukemic cell survival by shaping the CAF-like polarization of stromal cells and maintaining a tumor supportive ECM composition, providing strong evidence for an eminent function of LYN in the tumor microenvironment. In an *in vivo* model, expansion of leukemia was delayed, and survival of mice significantly increased by selective ablation of LYN kinase within the non-hematopoietic microenvironment. In line with this, deletion of LYN in stromal cells *in vitro* consistently decreased the capacity of stromal cells to support leukemic cell survival, which was dependent on the direct contact of these cell types. Moreover, we showed that the loss of LYN attenuated inflammatory signatures including c-JUN expression, and induced profound alterations of cytokines and ECM proteins, particularly the upregulation of THBS1, which induces CLL cell death via CD47 ligation (Fig. 9). These findings were strongly supported by the observation that LYN expression was significantly enhanced in lymph node fibroblasts of CLL patients compared to healthy controls, accompanied by lower levels of fibroblastic THBS1 in CLL than healthy controls.

This study extends our previous observations regarding the regulatory role of LYN in the tumor microenvironment<sup>2,20</sup>. Previous studies in hematopoietic cells have shown that LYN is critical for regulating cellular homeostasis in a cell type- and context dependent manner<sup>40</sup>. LYN regulates the equilibrium of the BCR response<sup>41</sup>, and maintains a balanced response of myeloid cells by regulation of the Toll-like-receptor/MyD88 signaling<sup>42-45</sup> and NLRP3 inflammasome<sup>46</sup>. Global- as well as B cell- and dendritic cell-specific *Lyn*-knockout in mice promotes hyperinflammation<sup>41,42,46,47</sup>, with global *Lyn*<sup>-/-</sup> mice having a milder phenotype than mice with LYN-defective hematopoietic cells. Our results corroborate the hypothesis that the absence of LYN in non-hematopoietic cells may restrain hematopoiesis-induced inflammation<sup>42</sup>, by demonstrating a consistent downregulation of inflammatory gene signatures and regulators in LYN<sup>KO</sup>



stromal cells. This would suggest that LYN exerts different functions in stromal cells than in hematopoietic cells: predominant activation of inflammatory responses in the former and attenuation of inflammatory responses in the latter, which cooperatively results in a balanced intercellular homeostasis in the physiological and leukemic microenvironment<sup>48</sup>.

To date, studies about LYN in non-hematopoietic cells mostly focused on intrinsic functions of LYN in malignant cells<sup>40,49-51</sup>. Our findings provide evidence that LYN is shaping the cellular polarization of different cell types to support the development of CLL and presumably of other malignancies. We and others previously showed that LYN-deletion shifts the polarization of monocytes and macrophages

**Fig. 6 | LYN-dependent regulation of the ECM proteins like Thrombospondin-1 (THBS1) in stromal cells supported the viability of CLL cells.** **a** CLL cells ( $n=8$ ) were cultured on decellularized ECM from LYN<sup>WT</sup> and LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells for 48 h. (i) illustration, (ii) CLL viability as Annexin V-/7AAD<sup>-</sup> per CD45<sup>+</sup> cells. (mean, two-sided Wilcoxon test,  $p=0.0078$ ). **b** Immunoblot of BGN in LYN<sup>WT</sup> and LYN<sup>KO</sup> HS-5 cells (1 sample each). **c** HS-5 cells were transfected with siBGN or control siRNA (15 nM), CLL ( $n=9$ ) were co-cultured for 96 h (mean, two-sided Uncorrected Dunn's test: without feeder vs. siCT  $p<0.0001$ ; without feeder vs. siBGN  $p=0.0339$ ; siCT vs. siBGN  $p=0.0339$ ). **d-f** THBS1 expression in HS-5 cells. **d** qRT-PCR analysis normalized to *PPIA*. **e** Immunoblot for THBS1. **f** Soluble THBS1 measured by ELISA (**d**: 2 clones per genotype, **e**, **f**: 3 clones per genotype; mean  $\pm$  SEM; unpaired two-sided t-test:  $p=0.256$ ). **g** CLL cells ( $n=8$ ) were cultured with recombinant human THBS1 and viability was assessed after 24 h (mean, two-sided Wilcoxon test compared to untreated,  $p=0.0391$ ). **h** THBS1-overexpressing and Mock HS-5 cells were cultured

with CLL cells ( $n=15$ , 1 clone per condition), (mean  $\pm$  SEM; two-sided Wilcoxon test for Mock- vs. THBS1-overexpressing: 24 h  $p=0.005371$ , 48 h  $p=0.000366$ , 72 h  $p=0.000427$ , 96 h  $p=0.003906$ ). **i** CLL cells ( $n=6$ ) were co-cultured with THBS1 knockdown-LYN<sup>KO</sup> or control HS-5 cells for 72 h (mean, two-sided Wilcoxon test  $p=0.0312$ ). **j** CLL cells ( $n=10$ ) were co-cultured with antibody-pretreated HS-5 cells for 48 h. (i) illustration, (ii) CLL cell viability was quantified by flow cytometry (mean, two-sided Wilcoxon test  $p=0.0469$ ). **k** Violin plot for mean THBS1 expression per segmented single cell in Imaging Mass Cytometry (Fig. 1d). HC-LN:  $n=9$  (6466 fibroblasts), CLL-LN:  $n=12$  (7543 fibroblasts). Boxplots represent median with the interquartile range, whiskers indicate adjacent values, violin represents kernel density estimation, independent two-sided t-tests ( $p=1.522e-257$ ). See also Fig. S4. Illustration was created with BioRender.com. Source data are provided as a Source Data file.

towards an M2 phenotype<sup>20,52</sup>. This parallels our observation here of an even more pronounced shift in cellular plasticity upon LYN-deletion in stromal cells, strongly suggesting a role of this kinase in regulating cellular differentiation.

Stromal cells adapt to the leukemic microenvironment by acquiring a CAF-like polarization<sup>53</sup>, exemplarily shown in murine MSC upon CLL co-culture<sup>6</sup>. CLL-derived extracellular vesicles also induced this CAF-like phenotype in stromal cells, mainly by promoting inflammatory signaling via AKT and ERK, but interestingly also included LYN phosphorylation<sup>5</sup>. It was shown that CLL-EV can increase LYN expression in fibroblasts<sup>54</sup>. Based on our integrative multi-omics analysis, we argue that LYN in fibroblasts orchestrates in general inflammatory signaling events and in particular the CAF-like polarization of stromal cells, inducing widespread changes in gene signatures, marker expressions and tumor-promoting functions.

Our data corroborate that modulating protein kinases, especially those regulating pro-inflammatory pathways like NFκB or MAPK-JUN, alters stromal cell functions that are critical for the contact-mediated support of leukemia growth. In CLL, protein kinases in the stroma such as PKC $\beta$  promote disease progression and influence therapy response<sup>6</sup>. Besides inducing metabolic changes, PKC $\beta$  activates NFκB and TFEB in stromal cells, thereby regulating proteins involved in CLL contact like VCAMI<sup>30,55</sup>. We similarly demonstrated that stromal LYN stimulated comparable inflammatory signaling pathways and sustained CLL survival in a contact-dependent manner, agreeing with previous studies that direct cell contact was required for the feeding of CLL cells<sup>30,56-58</sup>. Moreover, we observed an increased adhesion of LYN<sup>KO</sup> BMSC to CLL cells without providing sufficient survival support, suggesting that not only the strength of the adhesion signals but also the presence of appropriate survival signals or absence of restrictive signals from stromal cells is needed to ensure CLL growth. Considering the elevated levels of THBS1 upon LYN deletion, increased adhesion might even reinforce THBS1-CD47 crosslinking to drive CLL cell death.

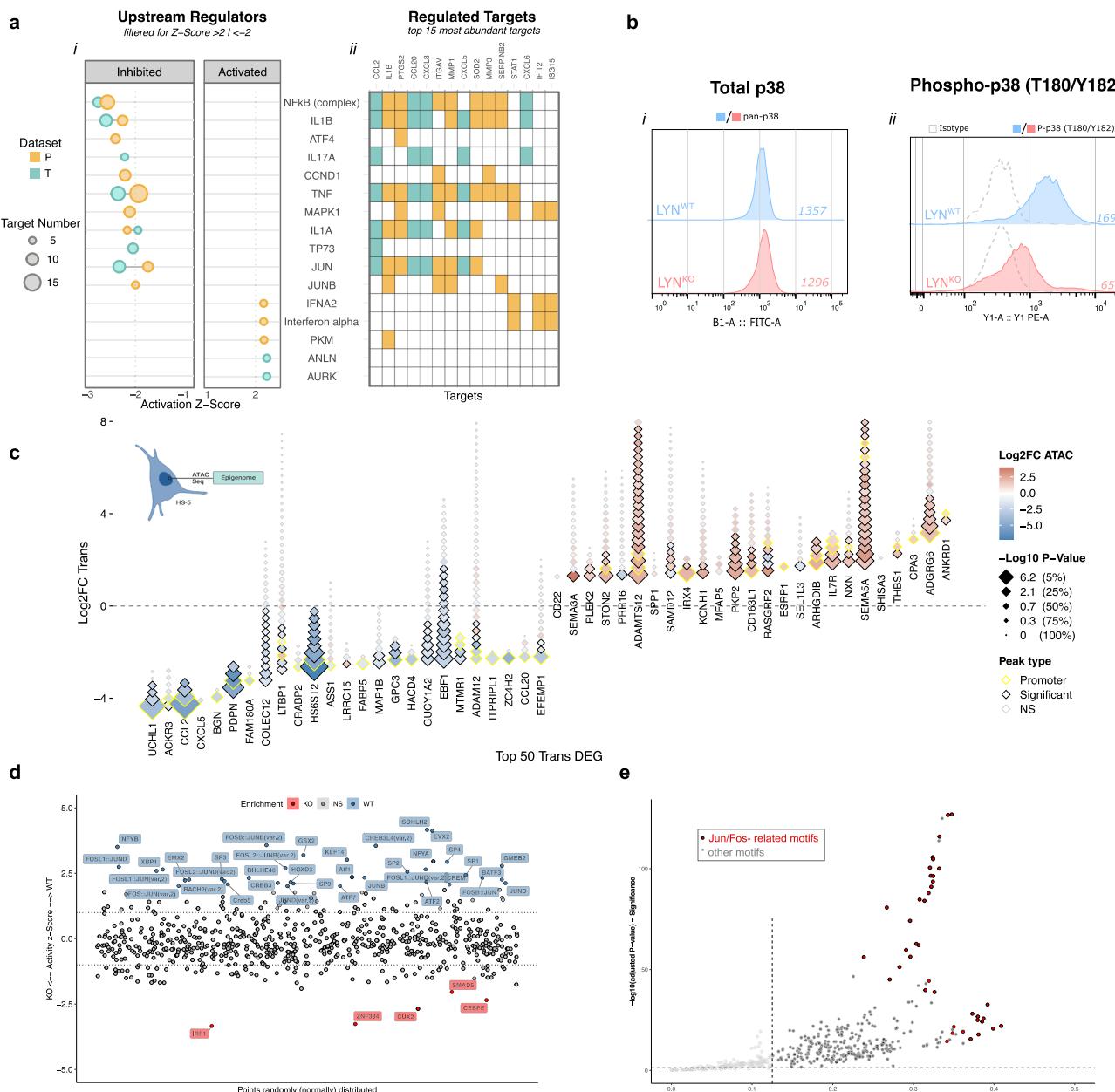
THBS1, a relevant ECM component in many cancers<sup>59</sup> was shown to induce apoptosis by ligation to CD47<sup>34-36</sup>. Therefore, THBS1 upregulation through LYN-deficiency in fibroblasts reduced CLL survival in co-culture. As we demonstrated that LYN had a broad range of effects on the phenotype of stromal fibroblasts, it was not surprising that THBS1 overexpression in BMSC did not fully recapitulate the effects of LYN-knockout on CLL viability. Also, blocking the THBS1/CD47 signaling axis did not fully restore the feeder capacity in LYN-defective fibroblasts. Instead, LYN is regulating a group of ECM proteins such as Thrombospondin-1 or Biglycan, all contributing to the cumulative effects observed in LYN-defective cells. The identified LYN-dependent function illustrates how kinases can affect the overall ECM composition and the balance of pro- and anti-leukemic molecules of the CLL microenvironment. The reported connections between LYN and myofibroblast/fibrosis formation in organ fibrosis models<sup>60</sup>, as well as regulation of EMT<sup>50,51</sup> are in line with our observation of a diminished EMT-signature and reduced responsiveness of CAF markers to TGF $\beta$

stimulation in LYN-deficient cells and further reflect the potential of LYN kinase to regulate the ECM composition. Moreover, as deletion of LYN partially mimics the inhibition of TGF $\beta$  (reduced EMT signature and TGF $\beta$  target genes like *MMPs*, *VCAN*, *BGN* and *LRRC15*, increased IFN-signatures)<sup>61,62</sup>, it is tempting to speculate that stromal LYN might be involved in TGF $\beta$  signaling. This notion may be supported by the reduced activation of p38 kinase, a downstream component of the non-canonical TGF $\beta$  signaling<sup>63</sup>. Moreover, interactions of LYN with involved upstream kinases of the SMAD-independent TGF $\beta$  signaling such as TRAF6 and TAK1 have been reported in mast cells<sup>64,65</sup>.

ECM seems to play an important role in hematological malignancies. For example, a mesenchymal gene signature was identified as a marker for a favorable prognostic outcome, and CAF-derived ECM molecules were linked to lymphoma-suppressive functions<sup>12,14,18</sup>. Moreover, ECM-related proteins (Col1A, Integrin $\alpha$ -V, Versican, THBS1) were associated with tumor suppression and better outcome in CLL<sup>13</sup>. Therefore, fibroblastic stromal cells may also have anti-leukemic functions, as demonstrated here for THBS1, similar to some of the tumor-suppressive functions of myCAF in solid cancers<sup>8</sup>. This highlights that a fine-tuned regulation of stromal cells and the ECM is important for optimizing their leukemic feeder capacity. The significantly lower level of THBS1 in CLL-LN fibroblastic cells suggests that suppression of leukemia-inhibitory factors in the stroma may represent a mechanism to promote tumor progression.

Kinase inhibitors are now routinely used for treating hematological malignancies. The modulation of non-malignant bystander cells is not only an apparent off-target effect of these inhibitors, but also contributes importantly to the mechanisms of action of kinase inhibitors in CLL<sup>2</sup>. A growing body of evidence points to functional roles of several protein kinases including LYN to modulate the phenotype of CLL bystander cells<sup>6,20,66</sup>, shaping the CLL niche. In solid cancers, researchers currently start to exploit the therapeutic potential of kinase inhibitors that modulate CAF plasticity<sup>26</sup>. A potential strategy to make some progress in this direction might be antibodies targeting CD47, which are emerging for the treatment of hematologic malignancies<sup>67,68</sup>. Besides enhancing the phagocytosis of malignant cells by macrophages, some antibodies might induce CD47 signaling and subsequent cell death of leukemic cells, similarly to stromal THBS1. Our study calls for further investigations on the role of kinases and their effectors in the CLL stroma. The increased use of single-cell RNA sequencing as well as murine models with lineage-specific kinase modifications will be beneficial for an improved mechanistic understanding of these interactions and their clinical use.

Together the results reported here support the concept that LYN modulates the polarization of stromal fibroblasts and induces an inflammatory CAF phenotype, thus rewiring essential components of a supportive microenvironment niche for leukemia cells. LYN-defective fibroblasts acquire leukemia-suppressive properties, mediated—at least in part—by a remodeled matrix and the increased expression of THBS1, which induces CLL cell death.



**Fig. 7 | Inflammatory signaling involving p38 phosphorylation and c-JUN transcriptional activity was perturbed upon LYN deficiency.** **a** Ingenuity Pathway Analysis (IPA) of Transcriptome (T) and Proteome (P). (i) Predicted upstream regulators with an absolute mean activation Z-score >2 are depicted. Individual T and P “omics”-layers are colored respectively and the circle size determines the number of associated target genes. (ii) Heatmap of the 15 most abundant target genes of the selected upstream regulators, showing gene-regulator associations. **b** Histogram of flow-cytometric assessment of total (i) and Phospho-T180/Y182 (ii) p38 MAPK expression in unstimulated HS-5 LYN<sup>WT</sup> and LYN<sup>KO</sup> cells (1 representative clone per genotype of 3 clones). Dashed curves represent isotype controls, numbers indicate uncorrected MFI. **c** Diamond plot illustrating homogenous relation between Epigenomic and Transcriptomic changes in HS-5 cells. For the top 50 DEGs (25 genes each with biggest/smallest log<sub>2</sub>-FC) from HS-5 Transcriptome (T), each diamond represents one related accessible-interval measured in HS-5 ATAC-sequencing data. Y-Axis position of the lowest

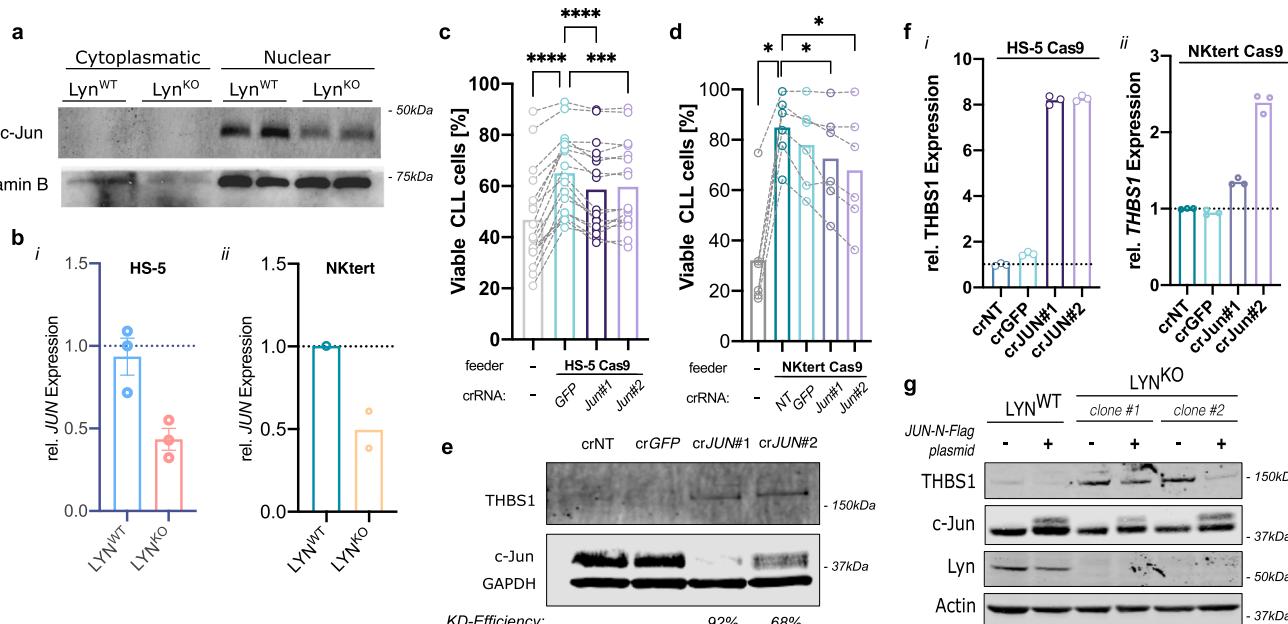
diamond illustrates log<sub>2</sub>-FC of the representative gene in HS-5 Transcriptome. Color of each diamond represents log<sub>2</sub>-FC and size -log<sub>10</sub> P value of the respective interval in HS-5 ATAC-Seq data (analysis specified in Methods). Black margin highlights differentially accessible (DA) intervals, yellow margins DA-promoter intervals. Graphical illustration was created with BioRender.com. **d** Transcription factor footprinting analysis of HS-5 Epigenome. Activity plot showing the distribution of z-transformed activity scores of the underlying motifs (y-axis). On the x-axis the points are distributed randomly. Motifs with differential footprinting ( $p$  value  $\leq 0.05$  and  $|z\text{-Score}| \geq 1$ , analysis specified in Methods) are highlighted in red (enriched in LYN<sup>KO</sup>) or in blue (enriched in LYN<sup>WT</sup>). **e**, One-sided Volcano plot of HS-5 Epigenome motif enrichment analysis. X-Axis shows the ratio of foreground (in DA-intervals) vs. background (in all intervals) motif frequency as log<sub>2</sub>-FC, y-Axis shows the respective adjusted  $p$  value (analysis specified in Methods). JUN/FOS-related motifs are highlighted in red. See also Fig. S5. Source data are provided as a Source Data file.

## Methods

### CLL samples

Primary CLL cells isolated from the peripheral blood of CLL patients, formalin-fixed paraffin-embedded primary CLL lymph nodes and

lymphoid tissues from healthy donors were collected at the University Hospital of Cologne after written and informed consent according to the Declaration of Helsinki and with Institutional Review Board approvals at the University of Cologne no. 11-319, no. 13-091



**Fig. 8 | Reduced c-JUN expression disinhibited THBS1 expression and suppressed leukemia support in BMSC.** **a** Immunoblot of total c-JUN protein expression in cytoplasmatic and nuclear fractions of *LYN*<sup>WT</sup> and *LYN*<sup>KO</sup> HS-5 cells (2 clones per genotype). **b** Transcriptional expression of *JUN* in (i) HS-5 (3 clones per genotype), (ii) and NKtert (*LYN*<sup>WT</sup> 1 clone, *LYN*<sup>KO</sup> 2 clones). Expression was measured by qRT-PCR and normalized to *PPIA* housekeeping gene expression (mean  $\pm$  SEM). **c** HS-5 Cas9 cells were transfected with different crRNA sequences targeting *GFP* or *JUN* 5 days before they were co-cultured with primary human CLL cells for additional 48 h. CLL cell viability in co-culture was quantified by flow cytometry as Annexin V/DAPI of all CD45<sup>+</sup> cells (CLL  $n = 17$ ; mean; Wilcoxon rank test compared to crGFP: without feeder and crJUN#1  $p < 0.0001$ ; crJUN#2  $p = 0.0004$ ). **d** NKtert Cas9 cells were transfected with different crRNA sequences targeting *GFP*, *JUN* or non-targeting (NT) 3 days before they were co-cultured with

primary human CLL cells for additional 72 h. CLL cell viability in co-culture was quantified by flow cytometry as Annexin V/DAPI of all CD45<sup>+</sup> cells (CLL  $n = 6$ ; mean; two-sided Wilcoxon rank test compared to crNT: in all tests  $p = 0.0312$ ). **e** Immunoblot of *JUN*<sup>KO</sup> (2 samples with different gRNAs) and control HS-5 (2 independent samples) Cas9 cells showing THBS1 and c-JUN protein expression. JUN knockout-efficiency was calculated to crNT control. **f** qRT-PCR analysis of relative *THBS1* mRNA expression normalized to *PPIA* housekeeper gene expression of HS-5 Cas9 cells (i) and NKtert Cas9 cells (ii) following CRISPR-mediated JUN knockout (mean, 3 technical replicates). **g** Immunoblot of *LYN*<sup>WT</sup> (one SCC) and *LYN*<sup>KO</sup> (2 SCCs) HS-5 cells showing THBS1 and c-JUN protein expression 72 h after transduction with cJUN-N-Flag expressing plasmid or Mock control. See also Fig. S5. Source data are provided as a Source Data file.

(BioMaSOTA), no. 19-1559 (Buffy Coats), no 21-1317 (SFB 1530), no. 19-1438, no. 19-1438\_1, and no. 21-1472. PBMC isolation and CLL cell purification procedures were previous described in ref.<sup>20</sup>. CLL cells were stored frozen at  $-150^{\circ}\text{C}$  and thawed freshly for every assay.

## Mouse experiments

In vivo studies were approved by the state authorities of North Rhine-Westphalia, Germany (Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV), approval no. 84-02.04.2016.A058). Only mice of C57BL/6-J background were used and maintained in a specific and opportunistic pathogen free (SOPF) animal facility under in-house standard housing conditions.

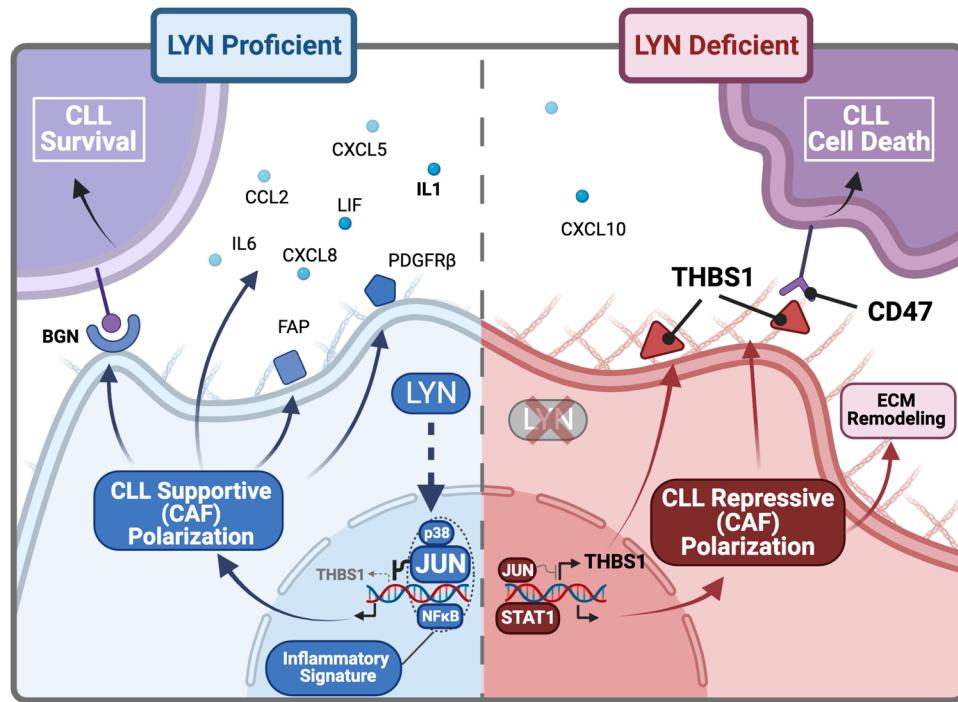
**Bone marrow transplantation (BMT).** BMT, adoptive transfer of murine CLL cells and all procedures for blood sampling were described before<sup>20</sup>. In brief, 8 to 10 weeks old *Lyn*<sup>-/-</sup> recipient mice were whole-body irradiated in the rodent gamma irradiation device Biobeam GM 8000 (Gamma-Service Medical, Leipzig, Germany) with a total dose of 11 Gy in 2 fragments. Four hours after the last irradiation,  $10^7$  T-cell-depleted bone marrow cells from *Lyn*<sup>wt/wt</sup> or *Lyn*<sup>-/-</sup> donor mice were injected intravenously into the irradiated hosts. Successful reconstitution of the immune system after 8 weeks was assessed by peripheral blood sampling and flow-cytometric analysis. Chimeric mice were subsequently injected intraperitoneally with  $10^7$  lymphocytes containing  $>90\%$  CLL cells from *TCLI*<sup>tg/tg</sup> mice, and leukemia burden was monitored by flow cytometry of peripheral blood samples every 14 days (all antibodies are listed in Supplementary Table 1). Maximal CLL burden was defined in the ethics approval as leukocyte number/ $\mu\text{l}$

mouse blood  $>100,000$  cells. This maximal burden was not exceeded in any of the mouse experiments.

**Short-term in vivo homing assay.** Splenic cells of moribund *TCLI*<sup>tg/tg</sup> mice were labeled with 5  $\mu\text{M}$  CFSE (Abcam) and  $10^7$  cells were injected intravenously into 8–12-week-old *Lyn*<sup>wt/wt</sup> or *Lyn*<sup>-/-</sup> mice. Recipient animals were sacrificed 4 h later to harvest cells from spleens and bone marrow (femur and tibiae). Cavities of the bones were flushed with PBS to access bone marrow cells. Flow-through marrow cells and splenocytes were passed through 100  $\mu\text{m}$  strainers and cells were washed, incubated with FC-blocking solution (Miltenyi), fixed and permeabilized by the IntraPrep kit (BD Pharmingen) according to the manufacturer's instructions. Cells were stained with fluorochrome labeled antibodies (see Supplementary Table 1) and measured by flow cytometry. Migrated CLL cells were identified as CFSE<sup>+</sup>/*TCLI*<sup>+</sup> and normalized to the total cell count.

## Cell culture

HS-5 bone marrow stroma cells (RRID:CVCL\_3720)<sup>69</sup> were cultured in RPMI (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) and 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) (Gibco). For TGF $\beta$  stimulation, cell layers were washed and incubated with 10 ng/ml TGF- $\beta$  (Cell Signaling) in serum-free RPMI medium for 24 h. NKtert cells (RRID:CVCL\_4667)<sup>70</sup> were cultured in DMEM/F12 (Gibco) supplemented with 10% FBS, 10% human serum (Sigma), 1% P/S, 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\beta$ -Mercapto-Ethanol (Gibco) and 0.45  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hydrocortisone (Sigma). HUVEC cells (RRID:CVCL\_9Q53) were cultured in EGM-2 endothelial cell growth medium-2 (Lonza) supplemented with 1% P/S. Human CAFs were isolated and purified from human pancreatic cancer tissue



**Fig. 9 | Graphical summary.** Summary of LYN governing stromal polarization and regulating CLL support. **Left:** LYN induces transcriptional programming of BMSC via inflammatory regulators (p38, JUN, NF $\kappa$ B), promoting an iCAF-like polarization and suppressing THBS1 transcription. Subsequently, related cytokines (IL1, IL6, CCL2, CXCL5, CXCL8, LIF) and surface proteins (FAP, PDGFR $\beta$ ) are highly expressed and CLL survival is fostered via direct cell contact, exemplarily via the ECM protein BGN. **Right:** In the absence of LYN, BMSC polarization is transcriptionally

reprogrammed (reduced JUN, increased STAT1 expression), resulting in a reduced inflammatory cytokine secretion and diminished expression of iCAF markers. The ECM is remodeled with increased collagen production, and THBS1 expression is disinhibited by the reduced JUN expression. Direct contact to the remodeled ECM restrains CLL survival via enhanced THBS1-CD47 axis. Illustration was created with BioRender.com.

by a modified outgrowth method as first described by Bachem et al<sup>71</sup>. Freshly resected pancreatic tumor tissues were cut into small pieces and cultured in DMEM/F12 (Gibco) supplemented with 10% FBS (Gibco) and 1% P/S (Gibco) in a 6-well plate pre-coated with Collagen type I. Fibroblasts were let to migrate out the tissue fragments for 1–2 weeks and then cells were harvested with trypsin-EDTA and transferred to T75 flasks or 10 cm petri dishes for further purification and expansion. CAFs were immortalized with Lenti-virus induced SV40 small + Large T<sup>72</sup>. MEF cells were isolated from 13-day old embryos of *Lyn*<sup>w/w</sup> and *Lyn*<sup>-/-</sup> mice as described before<sup>73</sup> and cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% P/S. All cell cultures were maintained in a fully humidified atmosphere with 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

**Co-culture and viability measurement of CLL cells.** Before co-culture,  $2.5 \times 10^4$  (HS-5 and NKtert),  $5 \times 10^4$  (HUVEC) or  $1 \times 10^5$  (MEF) feeder cells were seeded into wells of 24-well plates and let adhere overnight. The next day, medium was replaced with 500  $\mu$ l of complete growth medium, and  $5 \times 10^5$  primary human CLL cells were added per well. For indirect co-culture, transwell inserts with 0.4  $\mu$ m pore size (Corning) were used and CLL cells were seeded into the upper chamber in 200  $\mu$ l additional medium. Conditioned medium was generated by culturing cells in serum-free (HS-5) or supplemented (NKtert) RPMI medium for 48 h before medium collection; potential contaminating cell components were removed by centrifugation and sterile filtration through a 0.2  $\mu$ m filter. To generate decellularized fibroblast derived matrices (FDM),  $5 \times 10^4$  HS-5 cells were seeded into each well of the 24-well plates and decellularization was performed after 96 h of culture. In brief, HS-5 cells were carefully washed with 37 °C PBS, incubated for 15 min at 37 °C in decellularization solution consisting of 1% Triton X in sterile H<sub>2</sub>O, before wells were very carefully washed 3 times with PBS and ECM integrity was confirmed with microscopy. For CD47 antibody treatments, CLL cells were pretreated for 1 h at 37 °C with 10  $\mu$ g/ml

purified antibodies (Supplementary Table 5), before cells were washed and used in co-culture assays. CLL viability in all assays was measured at the indicated time points by taking a 30  $\mu$ l suspension sample after careful mixing without disturbing the feeder layer. For viability staining, cells were labeled in Annexin V binding buffer (BD Pharmingen) with indicated antibodies (Supplementary Table 1) for 15 min in the dark. Flow cytometry was performed using a MACSQuant VYB or a MACSQuant X flow cytometer (Miltenyi Biotec), and data was analyzed using FlowJo™ Analysis Software (BD Pharmingen) or Kaluza 2.0 Flow Analysis Software (Beckman Coulter).

**PBMC-stromal cell co-culture.** PBMCs were isolated from peripheral blood samples of healthy donors after informed consent using Sep-Mate tubes (StemCell Technologies) according to the manufacturers protocol. Conditioned medium was obtained from  $2 \times 10^5$  LYN<sup>w/w</sup>/LYN<sup>-/-</sup> cells after 24 h of culture and prepared for further use by centrifugation and sterile filtration. For the co-culture,  $1.5 \times 10^6$  PBMCs were seeded with  $2 \times 10^5$  HS-5 stroma cells in fresh medium or with conditioned medium only. Flow-cytometric analysis was performed on MACSQuant X (Miltenyi Biotec) after 72 h of culture, using the indicated antibodies (Supplementary Table 1). Using FlowJo™ Analysis Software (BD Pharmingen), T-cell subsets were identified by gating on DAPI<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> single cells, further subdivided according to CD4/CD8 expression and CD25/CD69 MFI was normalized to control PBMCs cultured 72 h in fresh medium.

**Genetic engineering of cell lines.** HS-5 cells were transiently transfected with a DNA-plasmid coding for pCas9 and LYN/scramble sgRNA (Origene) using Lipofectamine 2000 (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. After 3 days, successfully transfected cells were selected with 1  $\mu$ g/ml Puromycin for 4 days before single-cell clones (SCC) were generated by serial dilution. LYN knockout was

validated using Immunoblot analysis and Sanger Sequencing. NKtert and HS-5 cells were transduced with *Cas9-EGFP* expressing Lenti-virus (Addgene), selected with 1 µg/ml Puromycin and SCCs were generated and stored at -150 °C until further use. Successful transduction was validated for EGFP by flow cytometry and by immunoblot for Cas9. In a second step, Cas9-EGFP expressing cells were transfected by Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific) with different target-specific sgRNAs, made up of crRNA:tracrRNA complexes (Dharmacon), according to the manufacturer's instructions. Where indicated, single-cell clones were generated by dilution and successful knockout SCCs were validated by immunoblotting. Transfection of Cas9 and sgRNA in imCAF cells were combined into a one-step protocol using a Lentiviral vector (Vectorbuilder) combining Cas9 and *LYN* sgRNA or scramble sgRNA expression. Transfected, polyclonal imCAF cells were selected with 1 µg/ml Puromycin for 4 days before experiments. For transient knockdown, HS-5 cells were transfected with siRNA sequences against *BGN* and *THBS1* (Dharmacon) in the indicated concentrations using Lipofectamine 3000. HUVEC cells were transfected with siRNA targeting *LYN* or Control (Dharmacon) in the indicated concentrations using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific). Similarly, transient *THBS1* and c-Jun over-expression was generated by transfecting cells with 1 µg *THBS1*(Addgene) or *JUN*(Sino Biological) coding plasmid DNA in 6-well plates with  $5 \times 10^3$  cells/well. *THBS1*-transfected cells were maintained in culture for 48 h before experiments. *JUN*-transfected cells were lysed after 72 h to investigate protein expression. Used plasmids and guide-sequences are further specified in Supplementary Table 4.

### Sanger sequencing

Genomic DNA of HS-5 cells from normal cell culture was isolated with the DNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and *LYN* primer (see Supplementary Table 3) were used for PCR amplification. For sequencing, purified PCR product was mixed with the same primers to a concentration of 2.5 µM and sent to GATC for LightRun sequencing.

### Multi-omics profiling

Omics data integration (four "omics" layers) was performed by applying a multi-step approach, where each "omics layer" was analyzed individually and further results were combined. An in-house script merging several R packages was written and followed, including preprocessing steps, normalization, logarithmic transformation and subsequently, differentially expressed genes/proteins were identified. Individual results of all analyses can be found in Supplementary Data 1 and 2, raw data is shared in different databases (see "Data availability statement" for individual accession numbers).

**Gene expression (T).** mRNA was isolated from mono-cultured HS-5 *LYN<sup>WT</sup>* and *LYN<sup>KO</sup>* cells (2 clones per genotype) cultured in complete growth medium (RNeasy plus kit, Qiagen) according to the manufacturer's instructions and RNA quantity and quality was checked by NanoDrop1000 (Thermo Scientific) spectrometric measurement. Samples of 500 ng were then processed and analyzed using an Affymetrix Clariom S human Microarray Platform (Applied Biosystems) according to the manufacturer's guidelines at the Cologne Center for Genomics. Genes with low expression values were filtered out and only those which had sufficiently large counts were retained for a further statistical analysis. Normalization was performed using variance stabilizing transformation (vsn)<sup>74</sup> and differentially expressed genes were identified using limma<sup>75</sup> R package under the following condition (p-adjusted ≤ 0.15;  $1 \leq \log_2\text{FC} \leq -1$ ). IPA (QIAGEN) was run using p value ≤ 0.01 and  $1 \leq \log_2\text{FC} \leq -1$  as input filters and Ingenuity Knowledge Base as reference set.

**Co-cultured HS-5 gene expression ( $T_c$ ).** For co-cultured HS-5 cells, *LYN<sup>WT</sup>* and *LYN<sup>KO</sup>* cells (2 clones per genotype) were cultured with primary CLL patient samples (3 different patients) for 72 h. CLL cells were removed, feeder layers washed carefully before trypsinization and subsequently contaminating CLL cells were removed by magnetic depletion of CD45<sup>+</sup> cells using human CD45 MojoSort reagents (Biolegend) according to the manufacturer's instructions. mRNA was isolated HS-5 cells using the RNeasy plus kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and RNA quantity and quality was examined by NanoDrop1000 (Thermo Scientific) spectrometric measurement. Samples were processed and sequenced PE100, 50 M reads per sample at the Cologne Center for Genomics according to in-house standards. Raw data files were used to map reads (sequences) to a reference genome (GRCh38.p13, GENCODE release 41) using STAR program (v 2.7.10a)<sup>76</sup> processed as paired-end reads; followed by a quality control analysis. Next, read summarization was performed using featureCounts program (v 2.0.3)<sup>77</sup> and as output a count matrix was generated. Genes with low expression values were filtered out and only those which had sufficiently large counts were retained for a further statistical analysis. Normalization factors were calculated to scale the raw library sizes applying the trimmed mean of M-values (TMM) method. Then,  $\log_2$  count per million (CPM) values were calculated as a measure for the expression level of a gene. Differentially expressed genes were identified using "voom" with sample quality weights (voomWithQualityWeights function<sup>75</sup> from limma R package) based on the following condition: *q* value ≤ 0.05 and  $1.2 \leq \log_2\text{FC} \leq -1.2$ .

Afterwards, for both (*T*) and ( $T_c$ ), Gene Ontology (GO) term and Reactome-enrichment analyses of differentially expressed genes (DEG) were performed using clusterProfiler<sup>8</sup> and ReactomePA<sup>78</sup> R packages, respectively (GO-term with FDR = 10% and Reactome with FDR = 10%). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)<sup>79</sup> of pre-ranked gene lists was performed through the clusterProfiler<sup>80</sup> R package with the implementation of the GSEA algorithm<sup>81</sup> and the later fast GSEA (fgsea R package<sup>82</sup>) Hallmark collection from the Molecular Signatures Database (MsigDB v7.0)<sup>79</sup> was used.

**Global protein expression (P) and secretome (S).** (*P*):  $2.5 \times 10^6$  label-free HS-5 cells (2 clones per genotype) were lysed at 4 °C in RIPA buffer (CellSignaling) + PhosStop phosphatase Inhibitor (Roche) + cComplete protease inhibitor (Roche) for 1 h. Samples were further processed and analyzed in technical triplicates as previously described<sup>83,84</sup>, but performing in-solution protein digestion and label-free protein quantitation. Briefly, the protein samples were reduced with DTT and alkylated with iodoacetamide, followed by proteolytic cleavage with trypsin. The peptide mixtures were analyzed by liquid chromatography/tandem mass-spectrometry (LC-MS/MS) on a Q Exactive HF Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) coupled to an Ultimate 3000 RSLCnano HPLC system (Dionex). The mass spectrometric raw data was processed using the MaxQuant software (version 1.6, MPI for Biochemistry)<sup>85</sup> by searching the MS/MS spectra against the Uniprot human reference proteome. Peptide and protein quantitation was conducted using the label-free quantitation module of MaxQuant (MaxLFQ) with the default software settings. A minimum ratio count of 2 peptides was required for protein quantitation and the "re-quantify" option was enabled. (*S*):  $8 \times 10^6$  HS-5 *LYN<sup>WT</sup>* and *LYN<sup>KO</sup>* label-free cells (3 clones per genotype) were seeded in 15 cm dishes in complete growth medium and left overnight to adhere. The next day, cells were carefully washed, and medium was changed to serum- and Phenol-red free RPMI (Gibco). Cells were cultivated 24 h under these conditions, then supernatant was harvested. Further processing included removal of cell debris by centrifugation, concentration of proteins on a 3k Amicon centrifugal filter (Merck) according to manufacturer's protocol 5000 rpm 1 h and resuspension in 6 M Urea buffer + protease inhibitor cocktail (Roche). 50 µg of protein lysates were reduced with DTT and digested with trypsin overnight. Mass-spectrometry protein

quantification was performed at CECAD Proteomics Facility following in-house standards.

For both **P** and **S**, different R packages were used to perform the analyses (e.g., DEP<sup>86</sup>, limma<sup>75</sup>, vsn<sup>74</sup>). Potential contaminants and reverse protein sequences were removed along with proteins with too many missing values (only proteins with intensities quantified in 3 replicates of at least one condition were kept). Normalization was performed using vsn and remaining missing values were classified in two categories as described in the MSnbase<sup>87</sup> R package for further imputation. The ones resulting from the absence of detection of a feature, despite being present at detectable concentrations were handled as missing at random (MAR) and imputed with maximum likelihood-based method (MLE) using the expectation-maximization algorithm. However, biologically relevant missing values resulting from the absence of low abundant ions (below the instrument detection limit) were classified as missing not at random (MNAR) and imputed with a left-censored approach using a deterministic minimal value (MinDet). Differentially expressed proteins were identified using limma R package under the following condition (**P**: p-adjusted  $\leq 0.1$ ;  $1 \leq \log_2\text{FC} \leq -1$  and **S**: p-adjusted  $\leq 0.05$ ;  $1 \leq \log_2\text{FC} \leq -1$ ). In the particular case of **S**, only proteins reported/predicted as secreted were considered for further analysis (protein cellular locations from Uniprot<sup>88</sup> and the Human Protein Atlas<sup>89</sup> were extracted to accomplish this purpose). Afterwards, Gene Ontology (GO) and Reactome-enrichment analyses of differentially expressed proteins (DEP) were carried out using clusterProfiler<sup>80</sup> and ReactomePA<sup>78</sup> R packages respectively. GO term (**P**: BP with FDR = 1%, MF with FDR = 5%; **S**: BP and MF with FDR = 1%) and Reactome (**P**: FDR = 10% and **S**: FDR = 5%). IPA (QIAGEN) for **P** was run using  $p$  value  $\leq 0.05$  and  $1 \leq \log_2\text{FC} \leq -1$  as input filters and Ingenuity Knowledge Base as reference set.

**Tyrosine-specific phosphoproteome (pYome).** HS-5 LYN<sup>WT</sup> and LYN<sup>KO</sup> cells (3 clones per genotype) were individually isotope-labeled by maintaining the cells for 6 passages in SILAC medium (LYN<sup>KO</sup> *heavy-labeled* and LYN<sup>WT</sup> *light-labeled*). Subsequently, cells were harvested, resuspended in Urea lysis buffer, mixed in a 1:1 ratio and immediately frozen in liquid nitrogen. Further sample processing and measurement were basically performed as for the global proteome analysis (P) described above. Tyrosine-phosphorylated peptides were enriched by immuno-precipitation using the PTMscan Phospho-Tyrosine Rabbit mAb (P-Tyr-1000) kit and following the instructions of the manufacturer (Cell-Signaling Technology). For the pYome database searches phosphorylation on serine, threonine and tyrosine were set as variable peptide modifications. The mass spectrometric raw data was processed using the MaxQuant software (version 1.6, MPI for Biochemistry)<sup>85</sup> by searching the MS/MS spectra against the Uniprot human reference proteome and phosphorylation on serine, threonine and tyrosine were set as variable peptide modifications. Peptide and protein quantitation for the global proteome data was conducted using the label-free quantitation module of MaxQuant (MaxLFQ) with the default software settings. For peptide and protein quantitation, SILAC-based quantitation was applied in MaxQuant (MaxLFQ), setting the multiplicity to 2 for double labeling (Lys + 0/Arg + 0 and Lys + 8/Arg + 10). As a first step, potential contaminants and reverse hits were filtered out. A localization probability filter of at least 75% was applied and proteins with too many missing values (SILAC ratios) were removed. Normalization factor of SILAC ratios was calculated using the median of total light and heavy intensities in each sample (less sensitive to noise). Differentially expressed proteins were identified using limma<sup>75</sup> R package under the following condition (p-adjusted  $\leq 0.05$ ;  $1 \leq \log_2\text{FC} \leq -1$ ). Afterwards, Gene Ontology (GO) and Reactome-enrichment analyses of differentially expressed genes were carried out using clusterProfiler<sup>80</sup> and ReactomePA<sup>78</sup> R packages respectively. GO term (BP: FDR = 5%, MF and CC: FDR = 1%) and Reactome with FDR = 5%. Additionally, in order to check whether phosphorylation

sites were already reported or not three different databases (dbPAF<sup>90</sup>, qPhos<sup>91</sup> and PhosphoSitePlus<sup>92</sup>) were inspected.

Visualization of results was conducted using ggplot2<sup>93</sup>, GGally, complexHeatmap<sup>94</sup>, clusterProfiler and VoronoiTreemap<sup>95</sup> R packages. The Enrichment map was generated based on results of comparative Reactome-enrichment analysis for **T**, **S** and **P** data with clusterProfiler<sup>80</sup>, using top 10 terms of each “ome”. Unrelated pathways were removed and remaining clusters annotated manually. STRING network was calculated based on enriched genes from the REACTOME-term R-HSA-1474244 “Extracellular matrix organization” in **T**, **S** and **P**, using the online tool (<https://string-db.org/>, Version 11.0). Interactions were filtered for highest confidence and disconnected nodes were removed. Visualization of log<sub>2</sub>FC was added manually. For prediction of involved upstream kinases from changes in expression, identified DEG/Ps from **T** and **P** were separately used as input for X2Kweb (<https://maayanlab.cloud/X2K/>) enrichment analysis with optimized default parameters<sup>37,96</sup>.

### ATAC-sequencing

**Experimental procedures.** HS-5 LYN<sup>WT</sup> and LYN<sup>KO</sup> cells were cultured under normal growth conditions. Cells were used to perform tagmentation and preparations for ATAC-sequencing according to the manufacturer’s instructions of the used ATAC-kit (Active Motif). DNA was isolated respectively and processed and sequenced with 50 M reads, PE100 per sample in the Cologne Center for Genomics following in-house standards.

**Primary analysis.** The ATAC-seq dataset was analysed on the CHEOPS HPC cluster of the University of Cologne using nf-core’s (v1.2.1)<sup>97</sup> atac-seq pipeline<sup>98</sup> (nf-core/atac-seq pipeline) in a Singularity<sup>99</sup> environment and the corresponding workflow management software Nextflow (v21.04.1)<sup>100</sup>. Peaks were called using MACS2 (v2.2.7.1)<sup>101</sup> with standard parameters (narrowPeak mode). Consensus peaks generated by the nf-core/atac-seq pipeline were used for downstream analysis. Counts file of consensus peaks was generated using featureCounts (v2.0.1)<sup>77</sup> with standard parameters of by nf-core/atac-seq.

**Differential accessibility analysis.** Peak annotation was performed using the annotatePeak function of ChIPseeker (v1.30.3)<sup>102</sup> with overlap = “all”, Homo Sapiens ensembl database version 104, and otherwise standard parameters. Differential accessibility analysis was performed using DESeq2 (v1.34.0)<sup>103</sup> with standard parameters. Normalization of counts for visualization was performed using DESeq2 built-in variance stabilization transformation (vst method) with standard parameters. Intervals with  $\log_2\text{FC} \geq 0.56$  (Fold Change  $\geq 1.5$ ) and adjusted  $p$  value  $\leq 0.05$  were considered as significant for downstream analyses.

The motif enrichment was performed using the motif analysis tool of the python package Regulatory Analysis Toolbox (RGT) (v0.13.2). In short, the tool implements a simple Fischer’s exact test for each known human transcription factor from known databases like Hocomoco<sup>104</sup> and JASPAR<sup>105</sup>. Input region provided are all intervals generated by ATAC-Seq primary analysis with  $\log_2\text{FC} \geq 0.56$  (Fold Change  $\geq 1.5$ ) and adjusted  $p$  value  $\leq 0.05$  as computed by the differential accessibility analysis. Background regions used are the universe of all called peaks. The fold change is computed as ratio of foreground and background relative frequency, where a relative frequency is defined as number of peaks with a motif match relative to number of peaks without motif match. Motifs with 15% positive fold change and adjusted  $p$  value  $\leq 0.05$  were considered as top significantly enriched motifs in LYN<sup>KO</sup> versus LYN<sup>WT</sup>.

The footprinting analysis was performed using the footprinting tool from RGT (v0.13.2) in the atac-seq mode (See HINT-ATAC<sup>106</sup>). As input, we have used the sorted and filtered bam files of merged replicates and corresponding narrowPeak files generated by the nf-core/atac-seq pipeline (internally using macs2). We followed the

standard footprinting procedure to generate tracks as well as lists of motif-predicted binding sites (mpbs) in bed format for both LYN<sup>KO</sup> and LYN<sup>WT</sup> conditions. Finally, we ran the differential footprinting command of RGT to generate differential activity scores and corresponding adjusted *p* values for each motif.

### RNA sequencing of murine fibroblasts

Spleens were isolated from *Lyn*<sup>WT/WT</sup> and *Lyn*<sup>-/-</sup> mice and digested according to a modified established protocol<sup>107</sup>. In brief, 1 ml of digestion cocktail (0.4 mg/ml Collagenase P, 1.2 U/ml Dispase and 50 µg DNase I in 1640 RPMI with 1% P/S and 10% FBS) was injected per spleen and incubated for 5 min at RT. Then, spleens were mechanically minced and incubated for 30 min in additional 2 ml of digestion cocktail at 37 °C under repeated mixing. Cells were filtered through an 100 µm filter, erythrocytes were lysed in ACK-buffer and subsequently washed in PBS. Resulting single-cell suspension was labeled with 7AAD and fluorescent antibodies as indicated in Supplementary Table 1. Splenic fibroblasts were sorted via FACS as 7AAD<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> CD71<sup>-</sup> CD31<sup>-</sup> CD29<sup>+</sup> CD54<sup>+</sup> cells at the FACS & Imaging Core Facility, Max-Planck Institute for Biology of Aging. mRNA was isolated using the RNeasy plus kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and RNA quantity and quality was checked by NanoDrop1000 (Thermo Scientific) spectrometric measurement. Samples were processed and sequenced PE100, 35 M reads per sample in the Cologne Center for Genomics according to in-house standards. Raw data files were used to map reads (sequences) to a reference genome (GRCm39, GENCODE release M30) using STAR program (v 2.7.10a)<sup>76</sup> processed as paired-end reads; followed by a quality control analysis. Next, read summarization was performed using featureCounts program (v 2.0.3)<sup>77</sup> and as output a count matrix was generated. Genes with low expression values were filtered out and only those which had sufficiently large counts were retained for a further statistical analysis. Normalization factors were calculated to scale the raw library sizes applying the trimmed mean of M-values (TMM) method. Then, log<sub>2</sub> count per million (CPM) values were calculated as a measure for the expression level of a gene. Differentially expressed genes were identified using "voom" with sample quality weights (voomWithQualityWeights function<sup>75</sup> from limma R package) based on the following condition: *q* value ≤ 0.05 and 1.2 ≤ log<sub>2</sub>-FC ≤ -1.2.

### Imaging mass cytometric analysis of tissue microarrays

Representative regions of interest (ROIs) from FFPE primary CLL-LN and HC-LN were selected by an experienced hematopathologist. Two tissue microarrays (TMA) were generated with ≥2 cores of 1.0 mm diameter per sample. Fresh-cut tissue sections of 3 µm were used for further steps. Imaging mass cytometry (IMC) was performed by a Hyperion Imaging System (Standard BioTools, SBT), following a modified manufacturer's protocol (SBT, PN4000322-04). The used reagents are listed in Supplementary Table 5. The slides were incubated with the antibody cocktail in a hydration chamber at 4 °C overnight, covered with parafilm. DNA was stained by 1:800 500 µM Intercalator-Ir solution (SBT #201192B) in TBS for 30 min at RT in a hydration chamber. ROIs of 0.5625 mm<sup>2</sup> (750 µm × 750 µm) were laser-ablated (frequency 200 Hz, laser power 3 a.u.). Preprocessing was automatically performed on Ventana BenchMark Ultra (Roche Diagnostics). IMC files were converted to tiff images and hot pixels were removed as described<sup>108</sup>. Segmentation was performed of the Vimentin, CD31, CD68 images with the DBSCAN algorithm (Density-based spatial clustering of applications with noise)<sup>109</sup>. The uneven intensities were first smoothed by subtracting the result of a Gaussian blur with a kernel of sigma 40 pixels. Then pixel intensities were modified to transform them into weights for the DBSCAN algorithm: namely, pixels below the 30<sup>th</sup> percentile were set to 0, high pixel values were clipped to the 99.5<sup>th</sup> percentile of all pixel intensities. The modified intensities were divided by the new maximum to put the maximum weights to 1.

Only pixels with non-null modified intensity were input to the DBSCAN algorithm in the form (x coordinate, y coordinate, weight = modified pixel intensity). The implementation of DBSCAN from scikit-learn<sup>110</sup> was used. The DBSCAN parameters were optimized manually to epsilon = 2, min\_samples = 4, leaf\_size = 3, metric = manhattan. Additionally, local maxima on the background corrected image were detected and if more than one maximum was found inside a cluster, the cluster was split into as many clusters as there were maxima and the pixels were attributed to the new clusters based on their distance to the maxima. The clusters found by the combination of DBSCAN and local maxima defined positive regions for the given marker. CD31-positive regions were considered as endothelial cells. For fibroblasts identification, Vimentin and CD31 segmentations were combined. Vimentin-positive regions that overlapped with CD31-positive regions by more than 30% of their area were discarded. The remaining regions were considered as fibroblasts. The cell areas were further shrunk with binary erosion of a factor of 3 pixels to avoid signal contamination from neighboring cells. Cell areas smaller than 10 squared pixels or bigger than 800 squared pixels were discarded, as they were most probably false detections. For each detected cell, we computed the mean intensity per cell of the LYN kinase and THBS1 markers, then transformed these values with arcsinh using a cofactor value of 5.

### Wound healing assay

Wound healing assay was performed using a culture-insert in a 24-well plate (Ibidi) according to the manufacturers' instructions. In brief, 70 µl of a 4 × 10<sup>5</sup>/ml HS-5 cell suspension was added to each silicone well and cells were incubated for 48 h. Afterwards, the insert was carefully removed, cell layers were washed once and then live cell imaging over 48 h was performed in CECAD Imaging Core Facility, Cologne. Data was analyzed in ImageJ (RRID:SCR\_002285), quantifying the uncovered area and result was normalized on the maximal gap size.

### Adhesion assay

HS-5 cells were seeded 5 × 10<sup>4</sup>/well in 24-well plates and let adhere overnight in serum-free RPMI. The next day, primary human CLL cells were labeled in 10 µM CFSE (Abcam). After washing, 5 × 10<sup>5</sup> CLL cells/well were seeded on HS-5 feeder layers. After 48 h of co-culture, all non-adhering cells in suspension were removed, and cells adhering to the well were washed 3 times with PBS. Images of adherent CLL cells were taken with a ZOE Fluorescent Cell Imager inverted microscope (BioRad), then HS-5 and adhering CLL cells were trypsinized, washed and stained with CD45 antibody (see Supplementary Table 1). CFSE<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> CLL and CSFE/CD45<sup>+</sup> HS-5 cells were counted by flow cytometry and adherent CLL number was normalized to HS-5 cells.

### XTT proliferation assay

XTT assays (ITW Reagents) were performed according to the manufacturer's instructions. In brief, 2 × 10<sup>4</sup> adherent cells were grown in wells of a 96-well plate in 100 µl medium. At the indicated time points, 50 µl staining solution was added, incubated at 37 °C for 90 min and 100 µl supernatant was transferred to a new 96-well plate. Specific absorbance was measured at 450 nm, unspecific absorbance at 620 nm using a FLUOStar Optima plate reader. Absorbance-signal was calculated as A<sub>450 nm</sub> - A<sub>620 nm</sub> and corrected for blank control.

### Immunological methods

**Western blot.** Cultured cells were washed once with cold PBS on ice. RIPA + 1 mM PMSF protease inhibitor (Cell-Signaling) was added and cells were carefully scraped within lysis buffer to extract extracellular matrix as well. Lysates were incubated at least 1 h on ice before remaining cell debris was removed by centrifugation and clear supernatant was stored at -80 °C. Nuclear and cytoplasmatic fractions were separated using the NE-PER extraction kit (Thermo Fischer) according to the manufacturer's instructions. Immunoblot analysis was performed

according to the manufacturer's instructions, using NuPAGE 4–12% Bis-Tris Mini gels (Thermo Scientific) and semidry transfer on Nitrocellulose (GE Healthcare) membrane. Signal was detected via immunofluorescence using a LiCor Odyssey CXI or chemo-luminescence using ECL solution (Advansta) and photo films. All used primary and secondary antibodies are listed in Supplementary Table 2.

**Flow cytometric analysis.** Cultured stromal cells were detached by Accutase (Innovative Cell Technologies) to conserve surface epitopes. CLL cells were used directly. For intracellular staining, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (BioLegend) before permeabilization for 10 min in ice cold 90% Methanol. All used antibodies and reagents are listed in the Supplementary Table 1. Mean fluorescent intensity (MFI) was corrected by subtraction of unspecific signal measured in control samples stained without primary antibody (for unconjugated primary antibody) or isotype control (for conjugated primary antibody) where indicated.

**Immunofluorescence.** HS-5 cells were fixed and permeabilized within cell culture plates (IntraPrep kit, Beckman Coulter) before ready-to-use Phalloidin and Hoechst staining solutions (Invitrogen) were added and incubated for 30 min. Cells were washed, and images were taken with a ZOE Fluorescent Cell Imager inverted microscope (BioRad).

**ELISA.** HS-5 cells (3 clones per genotype) were seeded at a density of  $5 \times 10^5$  per well in 6-well plates in complete growth medium. An 1 ml sample aliquot was obtained after 36 h and proceeded for thrombospondin-1-ELISA (Sigma, Cat #RAB0740) quantification according to the manufacturer's instructions.

### Quantitative qRT-PCR analysis

HS-5 and imCAF cells were grown in regular growth medium and NKtert cells in 5% FBS supplemented MEM $\alpha$  medium for 72 h before mRNA isolation. In assays using kinase inhibitors, HS-5 cells were treated with kinase inhibitors or DMSO control for 24 h in the indicated concentrations before. Subsequent isolation of cellular mRNA (RNeasy Plus Mini kit, Qiagen), cDNA generation (First strand cDNA Synthesis kit, Thermo Scientific) and setup of TaqMan assays (Thermo Scientific) were performed according to the respective manufacturers' instructions. qRT-PCR was run on a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). All primers and reagents are listed in the Supplementary Table 3.

### Statistics and reproducibility

All statistical differences were calculated in Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), statistical tests are indicated in the corresponding figure legends. *P* values are shown only in statistically significantly different cases. *P* values and N numbers are specified in the figure legends. All western blot analyses were repeated at least twice and showed consistent results. Lines in dot plots represent means, bar graphs with error bars represent mean  $\pm$  SEM, if not otherwise indicated.

### Graphical illustrations

Graphical artworks in Figs. 1a, 2a, 3a, 5a, 5b, 6a, 6j, 7c, 9 and Supplementary Fig. 1e, 2k were created with BioRender.com.

### Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Portfolio Reporting Summary linked to this article.

### Data availability

The raw data from Multi-Omics analyses generated in this study have been deposited in different EMBL-EBI databases: the sequencing data generated in this study have been deposited in the ArrayExpress database under accession code E-MTAB-10980 for Transcriptome (T), E-MTAB-12629 for co-cultured Transcriptome (Tc), E-MTAB-12531 for

ATAC-Sequencing and E-MTAB-12630 for isolated murine fibroblasts. Mass-spectrometry data generated in this study have been deposited in the PRIDE database under accession code PXD030582 for Proteome (P)/pYome (Y) and PXD028855 for Secretome (S). Complete analysis results are published in Supplementary Data 1 (differentially expressed/accessible targets) and Supplementary Data 2 (Results of enrichment analyses) of this paper. The Hallmark collection from the Molecular Signatures Database (MsigDB v7.0) used in this study is available under [<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/genesets.jsp?collection=H>]. The remaining data are available within the Article, Supplementary Information. Source data are provided with this paper.

### Code availability

The repository of the code related to the analysis of the ATAC-Seq dataset can be found at [https://github.com/ATA82/ATAC\\_Reprogramming\\_of\\_Fibroblasts](https://github.com/ATA82/ATAC_Reprogramming_of_Fibroblasts). All other scripts for computational analyses of the multi-omics data are available at [https://github.com/roc-rr/omics\\_lyn\\_fibroblasts\\_CLL](https://github.com/roc-rr/omics_lyn_fibroblasts_CLL).

### References

1. Hallek, M., Shanafelt, T. D. & Eichhorst, B. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* **391**, 1524–1537 (2018).
2. Nguyen, P.-H., Niesen, E. & Hallek, M. New roles for B cell receptor associated kinases: when the B cell is not the target. *Leukemia* **33**, 576–587 (2019).
3. Ten Hacken, E. & Burger, J. A. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 401–413 (2016).
4. Dubois, N. et al. Importance of Crosstalk Between Chronic Lymphocytic Leukemia Cells and the Stromal Microenvironment: Direct Contact, Soluble Factors, and Extracellular Vesicles. *Front. Oncol.* **10**, 1422 (2020).
5. Paggetti, J. et al. Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *Blood* **126**, 1106–1117 (2015).
6. Lutzny, G. et al. Protein kinase c- $\beta$ -dependent activation of NF- $\kappa$ B in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vivo. *Cancer Cell* **23**, 77–92 (2013).
7. Sahai, E. et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Cancer* **20**, 174–186 (2020).
8. Biffi, G. & Tuveson, D. A. Diversity and Biology of Cancer-Associated Fibroblasts. *Physiol. Rev.* **101**, 147–176 (2021).
9. Öhlund, D. et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* **214**, 579–596 (2017).
10. Elyada, E. et al. Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Discov.* **9**, 1102–1123 (2019).
11. Costa, A. et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell* **33**, 463–479.e10 (2018).
12. Kotlov, N. et al. Clinical and Biological Subtypes of B-cell Lymphoma Revealed by Microenvironmental Signatures. *Cancer Discov.* **11**, 1468–1489 (2021).
13. Haro, M. & Orsulic, S. A Paradoxical Correlation of Cancer-Associated Fibroblasts With Survival Outcomes in B-Cell Lymphomas and Carcinomas. *Front. Cell Dev. Biol.* **6**, 98 (2018).
14. Lenz, G. et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2313–2323 (2008).
15. Amé-Thomas, P. et al. Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell

- growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood* **109**, 693–702 (2007).
16. Baryawno, N. et al. A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia. *Cell* **177**, 1915–1932.e16 (2019).
17. Mourcin, F. et al. Follicular lymphoma triggers phenotypic and functional remodeling of the human lymphoid stromal cell landscape. *Immunity* **54**, 1788–1806.e7 (2021).
18. Steen, C. B. et al. The landscape of tumor cell states and ecosystems in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.08.011> (2021).
19. Bichi, R. et al. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 6955–6960 (2002).
20. Nguyen, P.-H. et al. LYN Kinase in the Tumor Microenvironment Is Essential for the Progression of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell* **30**, 610–622 (2016).
21. Kohlhas, V., Hallek, M. & Nguyen, P.-H. Constitutive activation of Lyn kinase enhances BCR responsiveness, but not the development of CLL in Eμ-TCL1 mice. *Blood Adv.* **4**, 6106–6116 (2020).
22. Peixoto, P. et al. EMT is associated with an epigenetic signature of ECM remodeling genes. *Cell Death Dis.* **10**, 205 (2019).
23. Mishra, P. J. et al. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* **68**, 4331–4339 (2008).
24. Biffi, G. et al. IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGF $\beta$  to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Discov.* **9**, 282–301 (2019).
25. Mei, S., Zhang, Y., Yu, L., Chen, G. & Zi, F. Expression and role of fibroblast activation protein  $\alpha$  in acute myeloid leukemia. *Oncol. Rep.* **45**, 641–651 (2021).
26. Chen, X. & Song, E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 99–115 (2019).
27. Ding, W. et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-PDGF receptor interaction activates bone marrow-derived mesenchymal stromal cells derived from chronic lymphocytic leukemia: implications for an angiogenic switch. *Blood* **116**, 2984–2993 (2010).
28. Panayiotidis, P., Jones, D., Ganeshaguru, K., Foroni, L. & Hoffbrand, A. V. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br. J. Haematol.* **92**, 97–103 (1996).
29. Baker, A. T., Abuwarwar, M. H., Poly, L., Wilkins, S. & Fletcher, A. L. Cancer-Associated Fibroblasts and T Cells: From Mechanisms to Outcomes. *J. Immunol.* **206**, 310–320 (2021).
30. Park, E. et al. Stromal cell protein kinase C- $\beta$  inhibition enhances chemosensitivity in B cell malignancies and overcomes drug resistance. *Sci. Transl. Med.* **12**, eaax9340 (2020).
31. Pedersen, I. M. et al. Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood* **100**, 1795–1801 (2002).
32. Sidhu, I., Barwe, S. P. & Gopalakrishnapillai, A. The extracellular matrix: A key player in the pathogenesis of hematologic malignancies. *Blood Rev.* **48**, 100787 (2021).
33. Herishanu, Y. et al. Activation of CD44, a receptor for extracellular matrix components, protects chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug induced apoptosis through MCL-1. *Leuk. Lymphoma* **52**, 1758–1769 (2011).
34. Martinez-Torres, A.-C. et al. CD47 agonist peptides induce programmed cell death in refractory chronic lymphocytic leukemia B cells via PLC $\gamma$ 1 activation: evidence from mice and humans. *PLoS Med.* **12**, e1001796 (2015).
35. Mateo, V. et al. CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Med.* **5**, 1277–1284 (1999).
36. Pramil, E. et al. Targeting chronic lymphocytic leukemia with N-methylated thrombospondin-1-derived peptides overcomes drug resistance. *Blood Adv.* **3**, 2920–2933 (2019).
37. Clarke, D. J. B. et al. eXpression2Kinases (X2K) Web: linking expression signatures to upstream cell signaling networks. *Nucleic Acids Res.* **46**, W171–W179 (2018).
38. Kang, J.-H. et al. Weakening of the repressive YY-1 site on the thrombospondin-1 promoter via c-Jun/YY-1 interaction. *Exp. Mol. Med.* **36**, 300–310 (2004).
39. Kim, S. A., Um, S. J., Kang, J. H. & Hong, K. J. Expression of thrombospondin-1 in human hepatocarcinoma cell lines and its regulation by transcription factor Jun/AP-1. *Mol. Cell. Biochem.* **216**, 21–29 (2001).
40. Ingle, E. Functions of the Lyn tyrosine kinase in health and disease. *Cell Commun. Signal.* **10**, 21 (2012).
41. Hibbs, M. L. et al. Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell* **83**, 301–311 (1995).
42. Lamagna, C., Scapini, P., van Ziffle, J. A., DeFranco, A. L. & Lowell, C. A. Hyperactivated MyD88 signaling in dendritic cells, through specific deletion of Lyn kinase, causes severe autoimmunity and inflammation. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **110**, E3311–20 (2013).
43. Ma, J., Abram, C. L., Hu, Y. & Lowell, C. A. CARD9 mediates dendritic cell-induced development of Lyn deficiency-associated autoimmune and inflammatory diseases. *Sci. Signal.* **12**, eaao3829 (2019).
44. Ban, T. et al. Lyn Kinase Suppresses the Transcriptional Activity of IRF5 in the TLR-MyD88 Pathway to Restrain the Development of Autoimmunity. *Immunity* **45**, 319–332 (2016).
45. Keck, S., Freudenberg, M. & Huber, M. Activation of murine macrophages via TLR2 and TLR4 is negatively regulated by a Lyn/PI3K module and promoted by SHIP1. *J. Immunol.* **184**, 5809–5818 (2010).
46. Tang, J. et al. Tyrosine phosphorylation of NLRP3 by the Src family kinase Lyn suppresses the activity of the NLRP3 inflammasome. *Sci. Signal.* **14**, eabe3410 (2021).
47. Lamagna, C., Hu, Y., DeFranco, A. L. & Lowell, C. A. B cell-specific loss of Lyn kinase leads to autoimmunity. *J. Immunol.* **192**, 919–928 (2014).
48. Davidson, S. et al. Fibroblasts as immune regulators in infection, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **21**, 704–717 (2021).
49. Tornillo, G. et al. Dual Mechanisms of LYN Kinase Dysregulation Drive Aggressive Behavior in Breast Cancer Cells. *Cell Rep.* **25**, 3674–3692.e10 (2018).
50. Fattet, L. et al. Matrix Rigidity Controls Epithelial-Mesenchymal Plasticity and Tumor Metastasis via a Mechanoresponsive EPHA2/LYN Complex. *Dev. Cell* **54**, 302–316.e7 (2020).
51. Choi, Y.-L. et al. LYN is a mediator of epithelial-mesenchymal transition and a target of dasatinib in breast cancer. *Cancer Res.* **70**, 2296–2306 (2010).
52. Xiao, W., Hong, H., Kawakami, Y., Lowell, C. A. & Kawakami, T. Regulation of myeloproliferation and M2 macrophage programming in mice by Lyn/Hck, SHIP, and Stat5. *J. Clin. Investig.* **118**, 924–934 (2008).
53. Mangolini, M. & Ringshausen, I. Bone Marrow Stromal Cells Drive Key Hallmarks of B Cell Malignancies. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1466 (2020).
54. Reiners, K. S. et al. Extracellular vesicles released from chronic lymphocytic leukemia cells exhibit a disease relevant mRNA signature and transfer mRNA to bystander cells. *Haematologica* **102**, e100–e103 (2017).
55. von Heydebrand, F. et al. Protein kinase C- $\beta$ -dependent changes in the glucose metabolism of bone marrow stromal cells of chronic lymphocytic leukemia. *Stem Cells* **39**, 819–830 (2021).

56. Kurtova, A. V. et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood* **114**, 4441–4450 (2009).
57. Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., De Bruyn, C. & Stryckmans, P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* **91**, 2387–2396 (1998).
58. Simon-Gabriel, C. P. et al. Microenvironmental stromal cells abrogate NF- $\kappa$ B inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **103**, 136–147 (2018).
59. Huang, T., Sun, L., Yuan, X. & Qiu, H. Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression. *Oncotarget* **8**, 84546–84558 (2017).
60. Pham, H. et al. Essential Role of Lyn in Fibrosis. *Front. Physiol.* **7**, 387 (2016).
61. Grauel, A. L. et al. TGF $\beta$ -blockade uncovers stromal plasticity in tumors by revealing the existence of a subset of interferon-licensed fibroblasts. *Nat. Commun.* **11**, 6315 (2020).
62. Krishnamurty, A. T. et al. LRRC15+ myofibroblasts dictate the stromal setpoint to suppress tumour immunity. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05272-1> (2022).
63. Tzavlaki, K. & Moustakas, A. TGF- $\beta$  Signaling. *Biomolecules* **10**, 487 (2020).
64. Drube, S. et al. TAK1 and IKK2, novel mediators of SCF-induced signaling and potential targets for c-Kit-driven diseases. *Oncotarget* **6**, 28833–28850 (2015).
65. Avila, M., Martinez-Juarez, A., Ibarra-Sanchez, A. & Gonzalez-Espinosa, C. Lyn kinase controls TLR4-dependent IKK and MAPK activation modulating the activity of TRAF-6/TAK-1 protein complex in mast cells. *Innate Immun.* **18**, 648–660 (2012).
66. Dong, S. et al. PI3K p110 $\delta$  inactivation antagonizes chronic lymphocytic leukemia and reverses T cell immune suppression. *J. Clin. Investig.* **129**, 122–136 (2019).
67. Valentin, R. et al. The fully human anti-CD47 antibody SRF231 has dual-mechanism antitumor activity against chronic Lymphocytic leukemia (CLL) cells and increases the activity of both rituximab and venetoclax. *Blood* **132**, 4393–4393 (2018).
68. Leclair, P. et al. CD47-ligation induced cell death in T-acute lymphoblastic leukemia. *Cell Death Dis.* **9**, 544 (2018).
69. Roecklein, B. A. & Torok-Storb, B. Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. *Blood* **85**, 997–1005 (1995).
70. Kawano, Y. et al. Ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitor cells using a coculture system with human telomerase catalytic subunit (hTERT)-transfected human stromal cells. *Blood* **101**, 532–540 (2003).
71. Bachem, M. G. et al. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* **115**, 421–432 (1998).
72. Jesnowski, R. et al. Immortalization of pancreatic stellate cells as an in vitro model of pancreatic fibrosis: deactivation is induced by matrigel and N-acetylcysteine. *Lab. Investig.* **85**, 1276–1291 (2005).
73. Durkin, M. E., Qian, X., Popescu, N. C. & Lowy, D. R. Isolation of Mouse Embryo Fibroblasts. *Bio Protoc.* **3**, e908 (2013).
74. Huber, W., von Heydebreck, A., Sültmann, H., Poustka, A. & Vingron, M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* **18**, S96–104 (2002).
75. Ritchie, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47 (2015).
76. Dobin, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
77. Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923–930 (2014).
78. Yu, G. & He, Q.-Y. ReactomePA: an R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization. *Mol. Biosyst.* **12**, 477–479 (2016).
79. Liberzon, A. et al. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst.* **1**, 417–425 (2015).
80. Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y. & He, Q.-Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* **16**, 284–287 (2012).
81. Subramanian, A. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 15545–15550 (2005).
82. Korotkevich, G. et al. Fast gene set enrichment analysis. *bioRxiv* 060012 <https://doi.org/10.1101/060012> (2021).
83. Fish, K. et al. Rewiring of B cell receptor signaling by Epstein-Barr virus LMP2A. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **117**, 26318–26327 (2020).
84. Cremer, A. et al. Resistance mechanisms to SYK inhibition in acute myeloid leukemia. *Cancer Discov.* **10**, 214–231 (2020).
85. Tyanova, S., Temu, T. & Cox, J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat. Protoc.* **11**, 2301–2319 (2016).
86. Zhang, X. et al. Proteome-wide identification of ubiquitin interactions using UbIA-MS. *Nat. Protoc.* **13**, 530–550 (2018).
87. Gatto, L. & Lilley, K. S. MSnbase—an R/Bioconductor package for isobaric tagged mass spectrometry data visualization, processing and quantitation. *Bioinformatics* **28**, 288–289 (2012).
88. UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledge-base in 2021. *Nucleic Acids Res.* **49**, D480–D489 (2021).
89. Thul, P. J. et al. A subcellular map of the human proteome. *Science* **356**, eaal3321 (2017).
90. Ullah, S. et al. dbPAF: an integrative database of protein phosphorylation in animals and fungi. *Sci. Rep.* **6**, 1–9 (2016).
91. Yu, K. et al. qPhos: a database of protein phosphorylation dynamics in humans. *Nucleic Acids Res.* **47**, D451–D458 (2019).
92. Hornbeck, P. V. et al. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* **43**, D512–20 (2015).
93. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. (Springer, Cham, 2016).
94. Gu, Z., Eils, R. & Schlesner, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* **32**, 2847–2849 (2016).
95. Nocaj, A. & Brandes, U. Computing Voronoi treemaps: Faster, simpler, and resolution-independent. *Comput. Graph. Forum* **31**, 855–864 (2012).
96. Chen, E. Y. et al. Expression2Kinases: mRNA profiling linked to multiple upstream regulatory layers. *Bioinformatics* **28**, 105–111 (2012).
97. Ewels, P. A. et al. The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. *Nat. Biotechnol.* **38**, 276–278 (2020).
98. Patel, H. et al. nf-core/atacseq: nf-core/atacseq v1.2.2—Iron Ossifrage. (Zenodo, 2022) <https://doi.org/10.5281/ZENODO.2634132>.
99. Kurtzer, G. M., Sochat, V. & Bauer, M. W. Singularity: Scientific containers for mobility of compute. *PLoS ONE* **12**, e0177459 (2017).
100. Di Tommaso, P. et al. Nextflow enables reproducible computational workflows. *Nat. Biotechnol.* **35**, 316–319 (2017).
101. Zhang, Y. et al. Model-based analysis of ChIP-seq (MACS). *Genome Biol.* **9**, R137 (2008).
102. Yu, G., Wang, L.-G. & He, Q.-Y. ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization. *Bioinformatics* **31**, 2382–2383 (2015).
103. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).

104. Kulakovskiy, I. V. et al. HOCOMOCO: a comprehensive collection of human transcription factor binding sites models. *Nucleic Acids Res.* **41**, D195–D202 (2013).
105. Fornes, O. et al. JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1001> (2019).
106. Li, Z. et al. Identification of transcription factor binding sites using ATAC-seq. *Genome Biol.* **20**, 45 (2019).
107. Pezoldt, J. et al. Single-cell transcriptional profiling of splenic fibroblasts reveals subset-specific innate immune signatures in homeostasis and during viral infection. *Commun. Biol.* **4**, 1355 (2021).
108. Xiao, X. et al. Dice-XMBD: Deep learning-based Cell segmentation for imaging mass cytometry. *Front. Genet.* **12**, 721229 (2021).
109. Ester, M., Kriegel, H. P., Sander, J. & Xu, X. A Density-Based Algorithm for Discovering Clusters in Large Spatial Databases with Noise". In *Proceedings of the 2nd International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining* 226–231 (AAAI Press, 1996).
110. Pedregosa, F. et al. Scikit-learn: Machine Learning in Python. *arXiv* <https://doi.org/10.48550/arXiv.1201.0490> 2825–2830 (2012).

## Acknowledgements

This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) grant KFO-286 to M.H., grant HA1680/18-1 to M.H., grant NG182/1-1 to P.H.N., grant SFB1530-455784452 to M.H. (sub-projects Z01, B01), P.H.N. (sub-project B01), R.B. (sub-projects C03, Z02) and T.O. (sub-projects A02, C03, Z02); by the Fritz-Thyssen Foundation grants 10.20.1.008MN and 10.20.1.014MN to P.H.N.; by the CLL-CLUE project ERA PerMed program 01KU2108; by the research network CANTAR (CANCer TARgeting) funded by the Ministry of Culture and Science of the State of North Rhine-Westphalia (MKW NRW); by the Exzellenz initiiieren (E.I.) - Stiftung Kölner Krebsforschung to R.R.R and to D.B.; and by the Deutsche Krebshilfe (DKH, German Cancer Aid) Mildred-Scheel fellowship no. 70113395 to A.v.S and M.H. We acknowledge support for the Article Processing Charge from the DFG (German Research Foundation, 491454339).

## Author contributions

A.v.S. designed and performed experiments, analyzed data and wrote the manuscript; R.R.R., F.R., K.B. and A.T.A. performed computational analyses; A.L., M.K., A.V.L., S.R., D.B., V.K., J.S., R.Z., and B.H. performed experiments and analyzed data; Y.Z. and C.B. collected specimens, generated and provided imCAF cell lines; P.J.B., P.L. and R.B. collected, processed and provided lymph node tissue samples. T.O. designed experiments and analyzed data; P.H.N. and M.H. initiated and supervised

the study and wrote the paper. All authors read, revised and approved the paper.

## Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

## Competing interests

This study was partially supported with a research funding by Gilead Sciences to M.H. T.O. received research funding from Gilead and Merck KGaA (not related to this work). T.O. is consultant for Roche and Merck KGaA (both not related to this work). The remaining authors declare no other competing interests.

## Additional information

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36824-2>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to Phuong-Hien Nguyen or Michael Hallek.

**Peer review information** *Nature Communications* thanks Clifford Lowell, Charles Mullighan and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

**Reprints and permissions information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

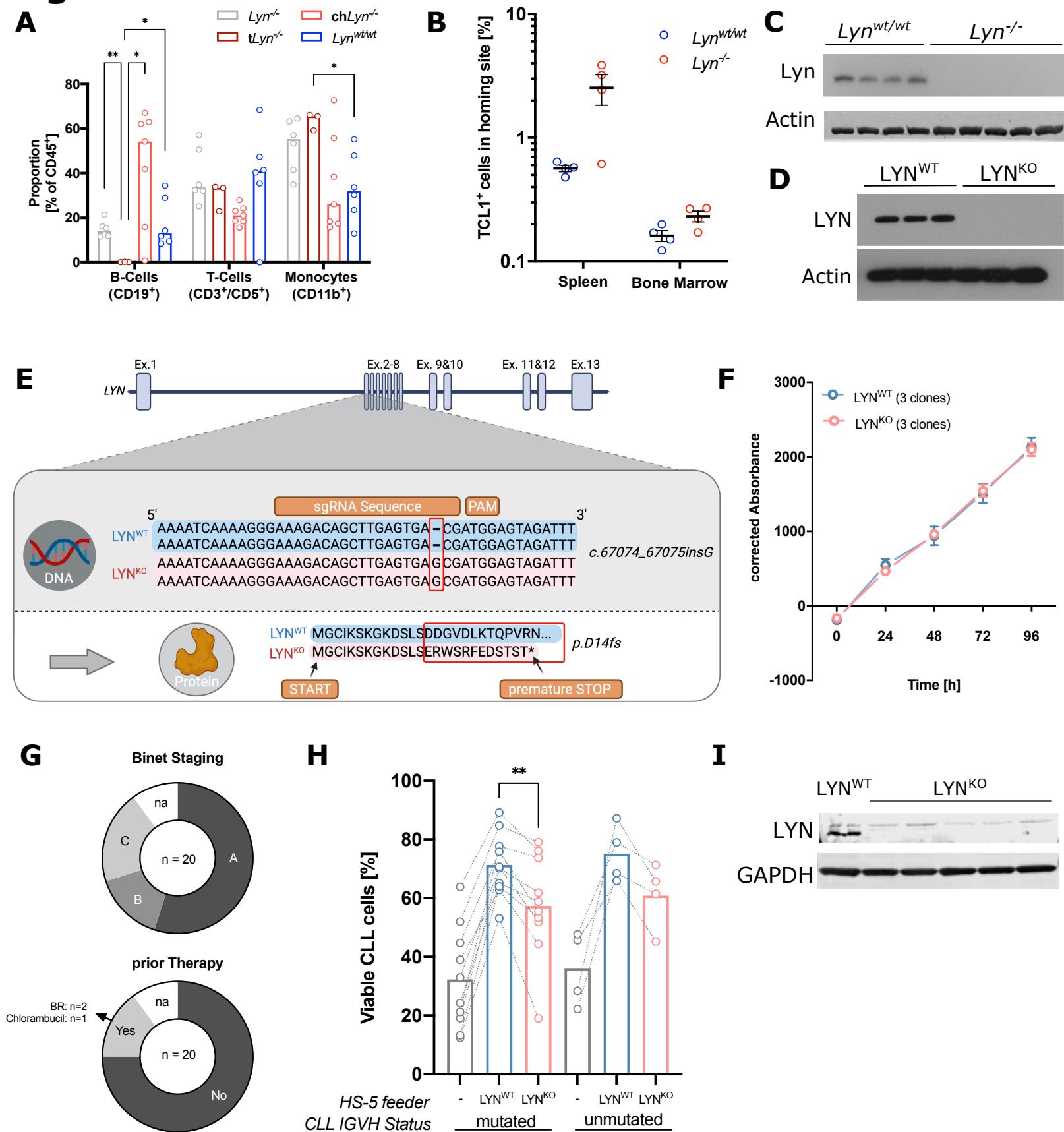
**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

<sup>1</sup>University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Department I of Internal Medicine, Center for Integrated Oncology Aachen Bonn Cologne Duesseldorf, Cologne, Germany. <sup>2</sup>Center for Molecular Medicine Cologne, University of Cologne, Cologne, Germany. <sup>3</sup>CECAD Center of Excellence on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases, University of Cologne, Cologne, Germany. <sup>4</sup>Mildred Scheel School of Oncology Aachen Bonn Cologne Düsseldorf, Faculty of Medicine and University Hospital of Cologne, Cologne, Germany. <sup>5</sup>University of Cologne, Institute for Biomedical Informatics, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Cologne, Germany. <sup>6</sup>Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Department of General, Visceral and Cancer Surgery, University of Cologne, Cologne, Germany. <sup>7</sup>Max-Planck Institute for the Biology of Ageing, Cologne, Germany. <sup>8</sup>Reference Centre for Lymph Node Pathology and Hematopathology, Hämatopathologie Lübeck, Lübeck, Germany. <sup>9</sup>Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Department of Pathology, University of Cologne, Cologne, Germany. <sup>10</sup>Department of Hematology/Oncology, Johann Wolfgang Goethe University, Frankfurt, Germany. <sup>11</sup>German Cancer Consortium (DKTK), Heidelberg, Germany. <sup>12</sup>German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany. <sup>13</sup>Frankfurt Cancer Institute, Goethe University Frankfurt, Frankfurt, Germany. <sup>14</sup>These authors contributed equally: Phuong-Hien Nguyen, Michael Hallek.

✉ e-mail: [hien.nguyen@uk-koeln.de](mailto:hien.nguyen@uk-koeln.de); [michael.hallek@uni-koeln.de](mailto:michael.hallek@uni-koeln.de)

# Fig. S1

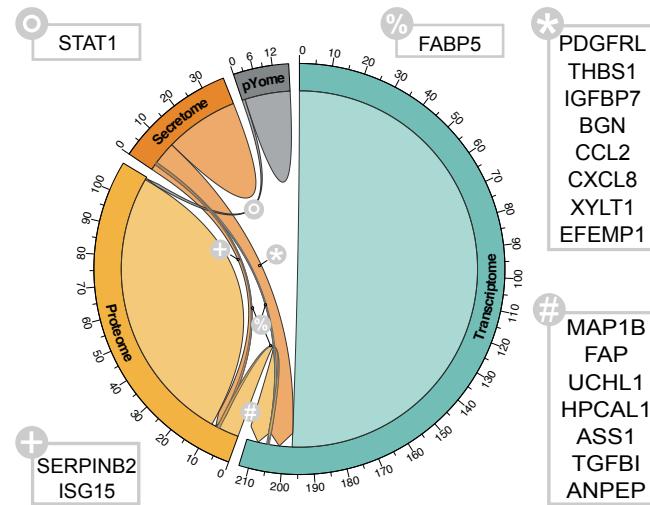


# Fig. S2

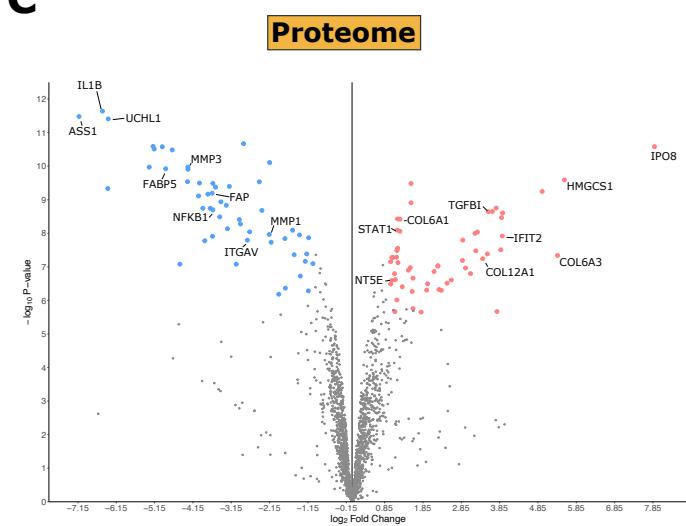
**A**

	Coverage	Up	Down
Transcriptome	19511	52	161
Proteome	1836	56	53
Secretome	314	26	11
pYome	122	8	10

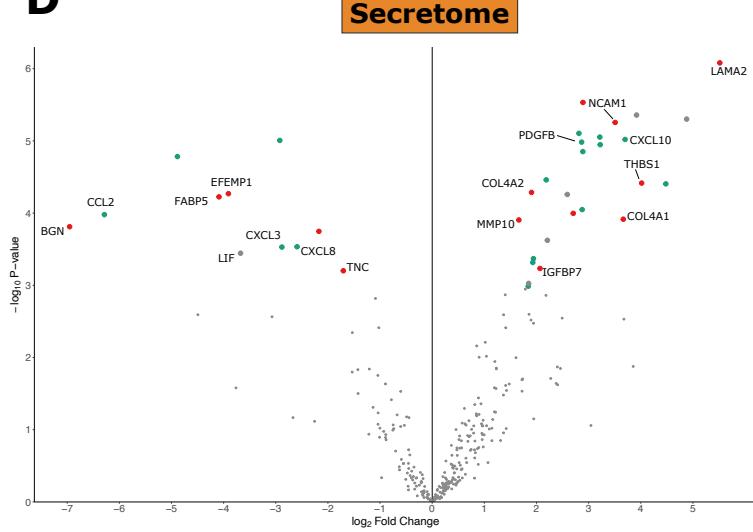
**B**



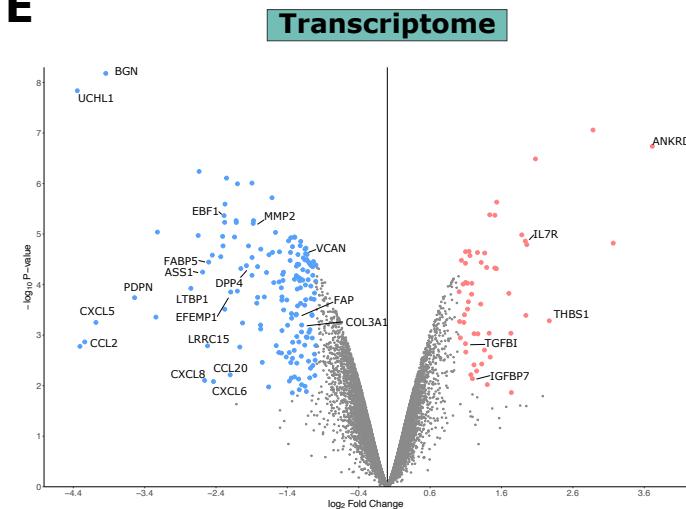
**C**



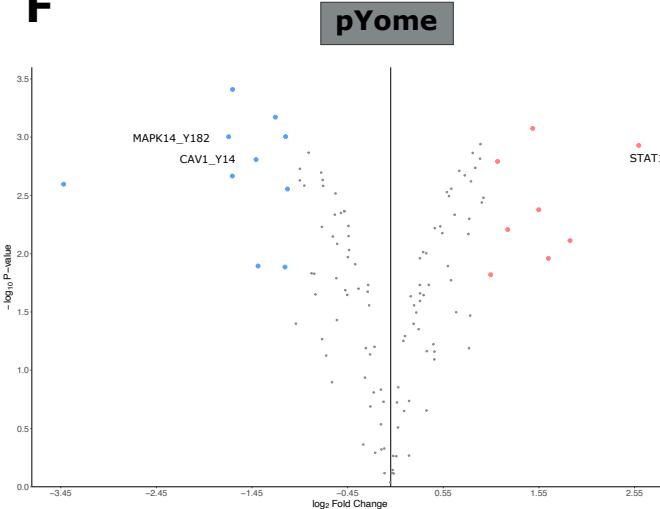
**D**



**E**

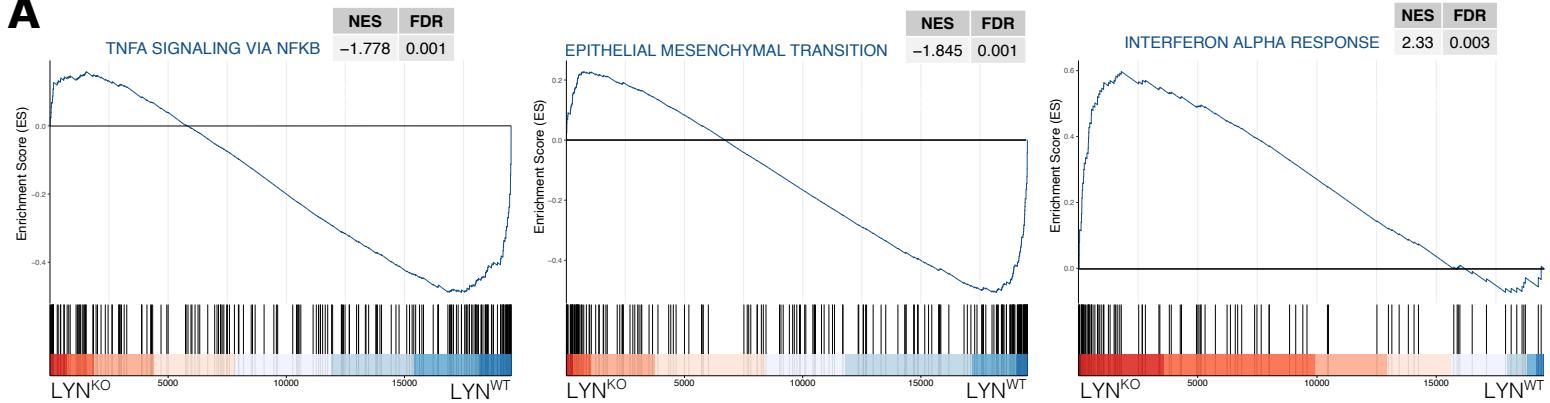


**F**

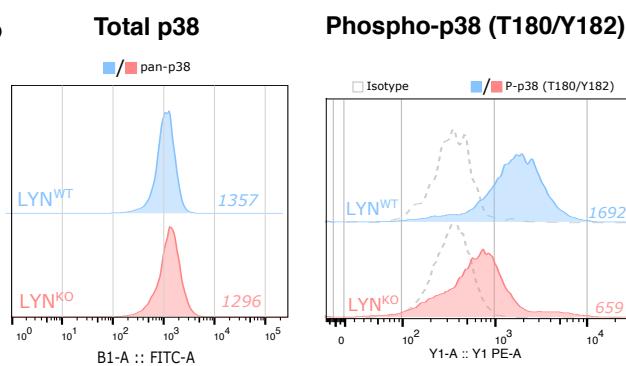


# Fig. S3

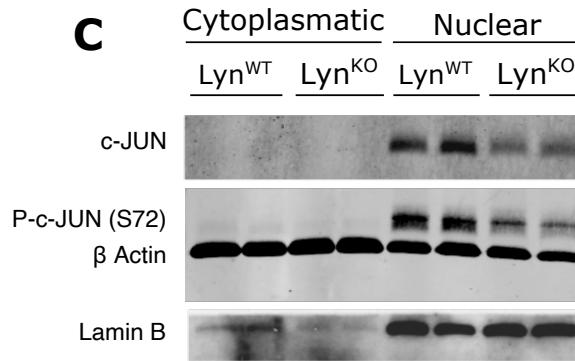
**A**



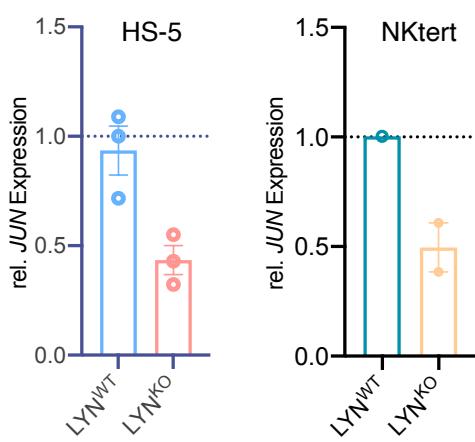
**B**



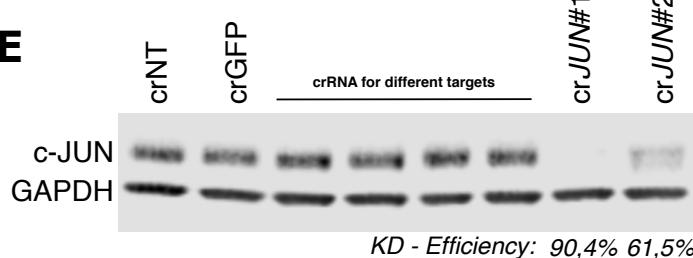
**C**



**D**

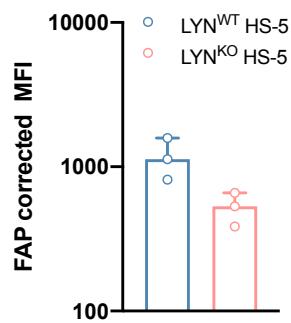


**E**

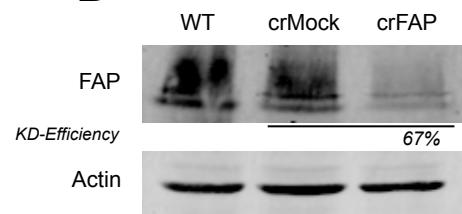


# Fig. S4

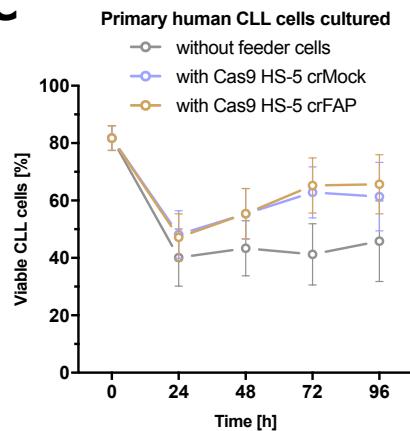
**A**



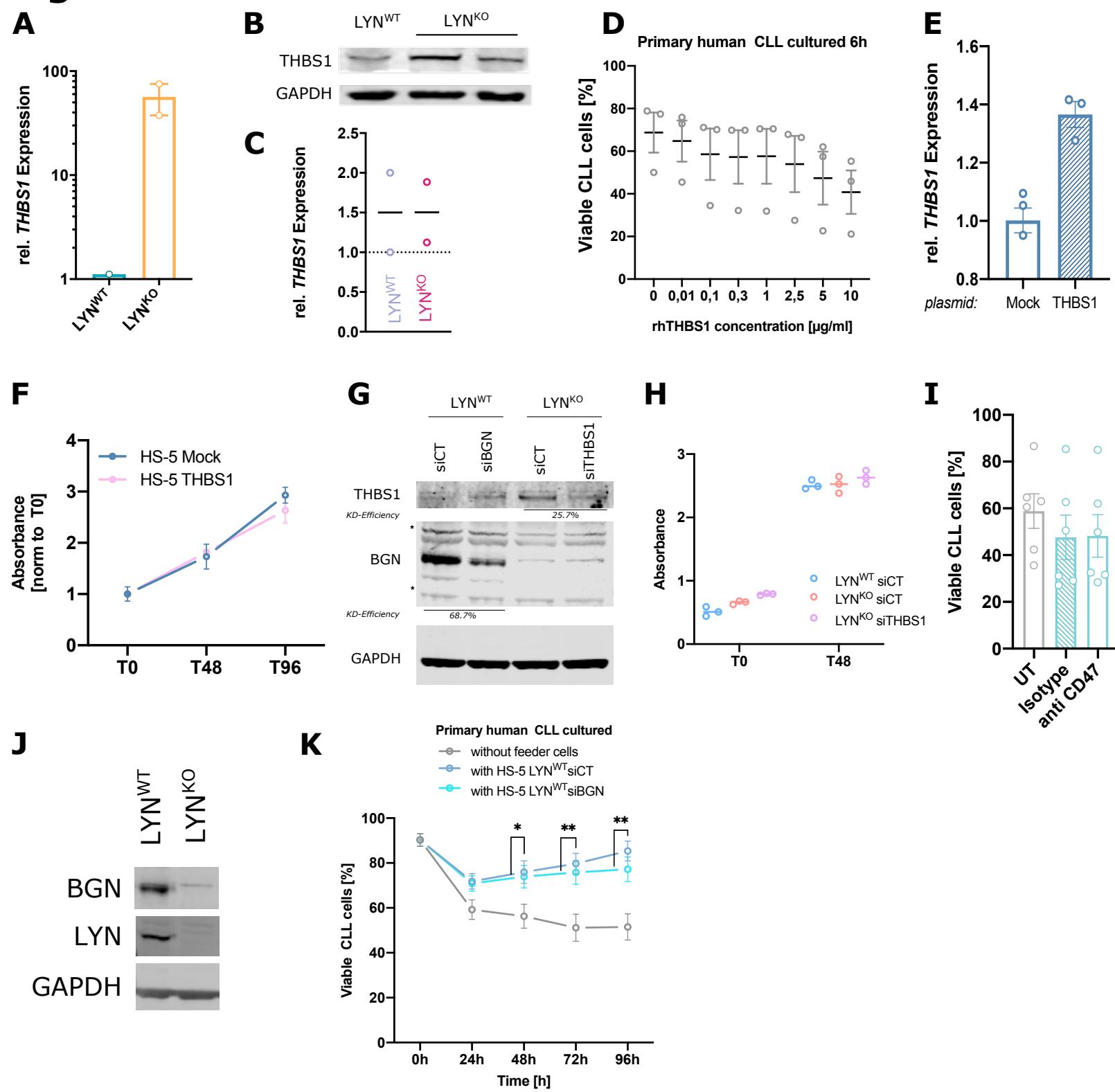
**B**



**C**



Sample Name	Subset Name	Median : Y1-A
HS-5 $\text{LYN}^{\text{WT}}$ w/o primary AB	Alive	561
HS-5 $\text{LYN}^{\text{KO}}$ w/o primary AB	Alive	444
HS-5 $\text{LYN}^{\text{WT}}$ untreated	Alive	1690
HS-5 $\text{LYN}^{\text{KO}}$ untreated	Alive	1103

**Fig. S5**

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle der LYN-Kinase in nicht-hämatopoetischen Stroma-Zellen des CLL-Tumormikromilieus untersucht. Dabei zeigte sich eine LYN vermittelte Polarisierung von Fibroblasten in einen KAF-ähnlichen Phänotypen, welche vor allem durch eine adaptierte Zytokin- und EZM-Expression charakterisiert ist (zusammengefasst in Abbildung 7). Als Folge dieser Repolarisierung zeigten verschiedene LYN-defiziente Fibroblasten-Zell-Linien einen verminderter CLL-unterstützenden Effekt im Vergleich zu LYN-profizienten Zellen. Diese verminderte Leukämie-Unterstützung ließ sich mechanistisch teilweise auf die LYN/c-JUN/THBS-1 Achse zurückführen, die in dieser Arbeit erstmalig beschrieben wird: In LYN-Knockout Zellen führte eine verminderte Aktivität des Transkriptionsfaktors c-JUN zur Disinhibition der Expression des Matrixproteins Thrombospondin-1 (THBS-1), welches durch Bindung an den Oberflächenrezeptor CD47 auf leukämischen Zellen eine gesteigerte CLL-Apoptose auslösen konnte.

Im TCL1-Mausmodell zeigte die selektive Ablation von LYN im nicht-hämatopoetischen Mikromilieu eine verlangsamte Progression der TCL1-Leukämie und ein signifikant verlängertes Überleben der entsprechenden Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (*Figure 1a-c der Publikation*). *In vitro* unterstützte die Expression von LYN-Kinase in verschiedenen Fibroblasten-Zellen (murine Fibroblasten sowie humane Stroma Zell-Linien aus dem Knochenmark) die Viabilität von ko-kultivierten primär humanen CLL-Zellen (*Figure 2 der Publikation*). Passend fand sich durch die Untersuchung von CLL- und gesundem Lymphknotengewebe mittels bildgebender Massenzytometrie eine Überexpression der LYN-Kinase in Fibroblasten humarer CLL-Lymphknoten (*Figure 1d-e der Publikation*). Durch die detaillierte, multi-omische Charakterisierung von LYN-defizienten HS-5 Fibroblasten zeigte sich eine LYN vermittelte Reprogrammierung einer KAF-ähnlichen Polarisierung: Die Deletion von LYN führte zu einer Reduktion inflammatorischer Signaturen und nachfolgend einer veränderten Sekretion von Zytokinen und Extrazellulärmatrix (*Figure 3 der Publikation*). Diese Repolarisierung nach LYN-Deletion konnte in anderen Fibroblasten, insbesondere auch primären KAF aus Pankreas-Karzinomen, reproduziert werden (*Figure 4b/c der Publikation*). Insbesondere die veränderte EZM-Expression zeigte eine funktionelle Relevanz für die Unterstützung der CLL-Viabilität im Ko-Kulturmodell, während die veränderte Zytokin-Sekretion zu einer verminderter Aktivierung von T-Zellen beitrug (*Figure 5a-c und Figure 6 der Publikation*). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Achse LYN/c-JUN/THBS-1 einen Teil des LYN vermittelten Effektes begründet. Durch bioinformatische Analysen zur Aktivität von Signalwegen sowie durch Untersuchung der Transkriptionsfaktor-Aktivität mittels ATAC-Sequenzierung konnte eine reduzierte Aktivität der p38 Kinase und eine verminderte Expression und Aktivität des c-JUN/AP-1 Transkriptionsfaktors gezeigt und mittels

molekularbiologischer Methoden bestätigt werden (*Figure 7 und Figure 8a/b der Publikation*). LYN<sup>KO</sup> Zellen zeigten eine Reduktion der c-JUN-Expression auf Transkript und Protein-Ebene, und die Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors für die verminderte CLL supportive Funktion der Fibroblasten konnte durch den Knockdown von c-JUN validiert werden. Der Mangel an c-JUN bewirkte mechanistisch eine Disinhibition des Matrixproteins Thrombospondin-1. Dieses zeigte sich in LYN- und c-JUN-defizienten Fibroblasten *in vitro* überexprimiert, während die Wiederherstellung der c-Jun Expression in LYN<sup>KO</sup> Zellen die THBS-1 Expression reduzierte (*Figure 8c-g der Publikation*). Durch Ligation an den CD47-Oberflächenrezeptor auf CLL-Zellen konnte THBS-1 die Apoptose der leukämischen Zellen induzieren. Im CLL-Lymphknoten *in situ* zeigte sich - entsprechend der *in vitro* gezeigten Regulation - durch die verstärkt LYN-Expression der Fibroblasten eine verminderte Expression von THBS-1 (*Figure 6d-k der Publikation*), was eine pro-leukämische Anpassung der CLL-Nische darstellt.

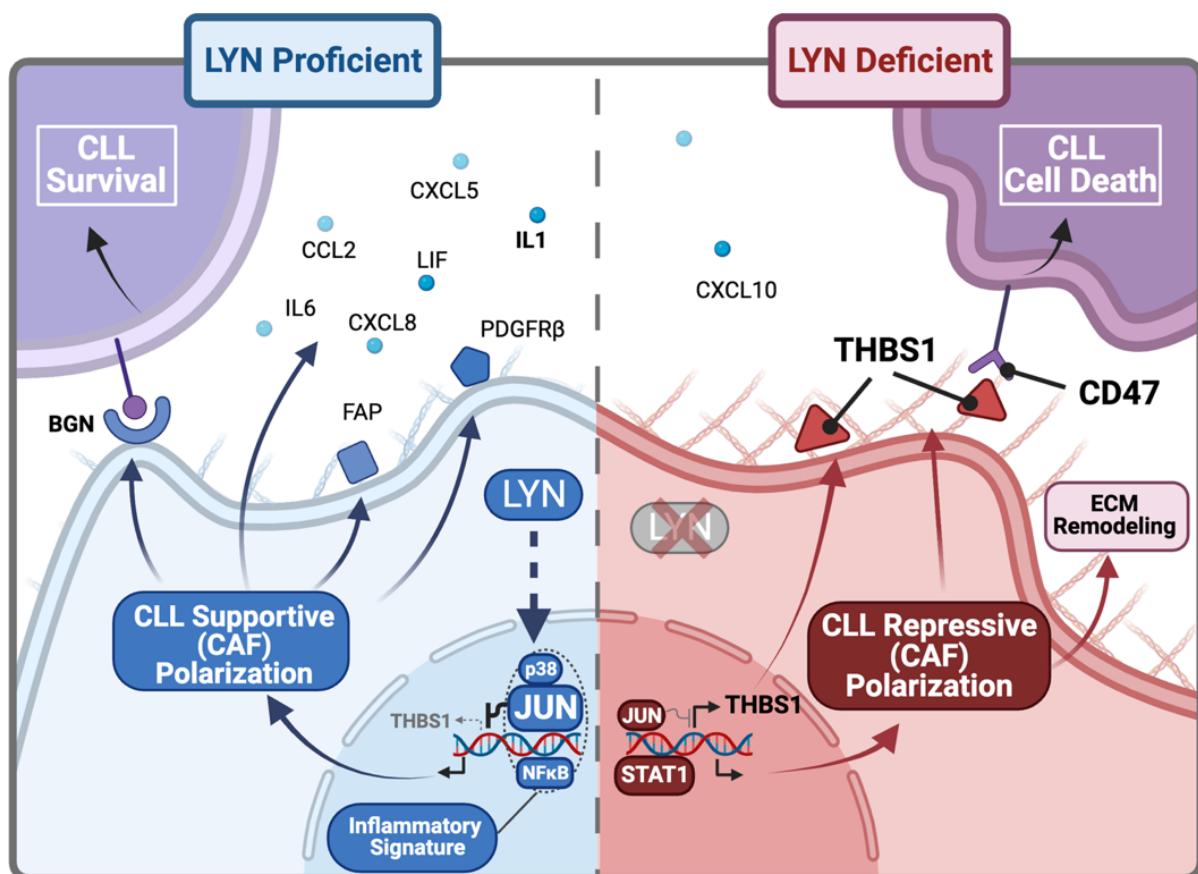


Abbildung 7: Zusammenfassung der LYN-vermittelten stromalen Repolarisation und veränderten CLL-Unterstützung.

Reproduziert aus vom Stein et al. 2023<sup>1</sup> unter CC-Lizenz 4.0.

## 4.1. Einordnung der murinen Daten

### 4.1.1. Vergleich mit vorherigen Ergebnissen des TCL1- Mausmodells

Die hier dargestellten Ergebnisse zur Funktion der LYN-Kinase in Fibroblasten des CLL Tumormikromilieus ergänzen die vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe zur Rolle von LYN im TMM des E $\mu$ -TCL1 Modelles.<sup>164,210</sup> Dabei stellt die Generierung von chimären Mäusen mit einer selektiven Ablation von LYN in nicht-hämatopoetischen Zellen durch die Transplantation LYN-profizienter hämatopoetischer Stammzellen in bestrahlte LYN-defiziente Mäuse („tLyn<sup>-/-</sup>“, vergleiche *Figure 1a/b der Publikation*) die Fortführung eines bereits 2016 publizierten Experimentes dar. In diesem wurde umgekehrt, durch die Transplantation von LYN-defizienten hämatopoetischen Stammzellen in bestrahlte, LYN-profiziente Mäuse eine selektive Ablation von LYN im hämatopoetischen TMM generiert (BMT+ Lyn<sup>-/-</sup>, vergleiche Nguyen et al, 2016)<sup>210</sup>. Aus der Zusammenschau der Ergebnisse dieser beiden Experimente (siehe Abbildung 8) zeigt sich, dass die Leukämie-Progression nach adoptivem Transfer von TCL1-Leukämie-Zellen in beiden Modellen durch das selektive Fehlen von LYN im TMM verlangsamt wurde, jedoch kein Modell die Effektstärke des kompletten LYN-Knockouts im TMM (chLyn<sup>-/-</sup>) erreichen konnte. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die LYN-Expression sowohl in hämatopoetischen Zellen (wie z. B. Makrophagen), als auch in nicht-hämatopoetischen Zellen zur CLL-unterstützenden Funktion beiträgt. Ein direkter Vergleich der Effektstärke zwischen dem Fehlen von LYN im hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen TMM ist aufgrund der unabhängig voneinander durchgeföhrten Experimente jedoch nicht möglich.

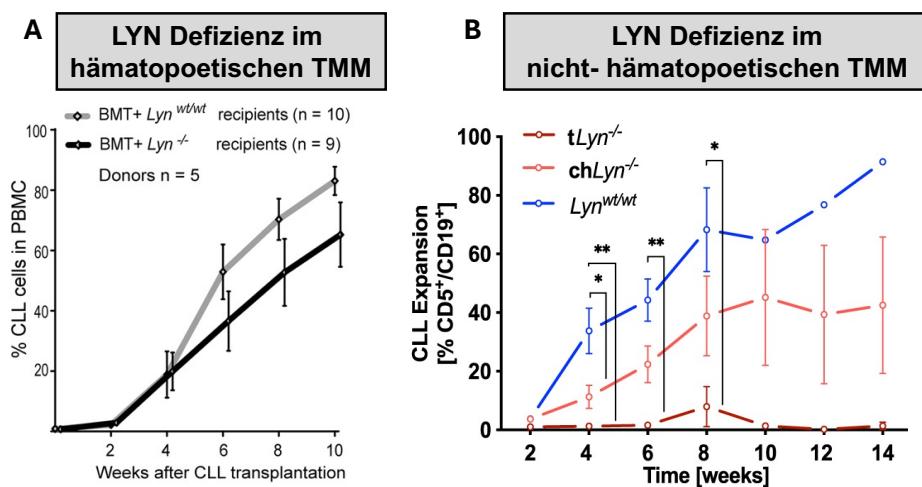


Abbildung 8: LYN-Defizienz in verschiedenen Kompartimenten des CLL-Mikromilieus im TCL1-Mausmodell.

Sowohl die chimäre LYN-Defizienz im hämatopoetischen Mikromilieu (**A**: BMT+Lyn<sup>-/-</sup>) wie auch im nicht-hämatopoetischen Mikromilieu (**B**: chLyn<sup>-/-</sup>) führt zu einem langsameren Anwachsen transplantierter TCL1<sup>+</sup> Leukämie Zellen. A) Reproduziert und modifiziert nach Nguyen et al. 2016<sup>210</sup> mit Genehmigung von Elsevier. B) Reproduziert und modifiziert nach vom Stein et al. 2023<sup>1</sup> unter CC-Lizenz 4.0.

Diese Ergebnisse ähneln vorherigen Arbeiten, die andere Kinasen im CLL-Mikromilieu untersucht haben. Dort zeigte sich ein verminderter Anwachsen von E $\mu$ -TCL1 leukämischen Zellen nach adaptivem Transfer in PI3K- oder PKC- $\beta$ -defiziente Mäuse.<sup>94,215</sup> Durch ein vergleichbares Transplantationsprotokoll wie in der vorliegenden Arbeit wurde nachfolgend die Bedeutung von PKC- $\beta$  in hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen des TMM verglichen.<sup>68</sup> Es zeigte sich ein reduziertes Anwachsen der transplantierten TCL1-Leukämie-Zellen insbesondere in Mäusen, in denen das nicht-hämatopoetische TMM PKC- $\beta$  defizient war. Somit scheinen Kinasen, insbesondere LYN und PKC- $\beta$ , im nicht hämatopoetischen Mikromilieu entscheidend an der Generierung einer CLL-supportiven Nische beteiligt zu sein und potenziell einen Ansatzpunkt für neuen Therapien darzustellen.

#### **4.1.2. Abstoßungsreaktionen als möglicher Konfounder im TCL1-Modell**

Ein wichtiger Störfaktor in der Interpretation solcher Transplantationsmodelle kann die allogene Abstoßung der transplantierten E $\mu$ -TCL1 Leukämiezellen durch das Immunsystem des Empfängertieres sein. Die Gruppe um Prof. Seiffert publizierte zuvor, dass das TCL1-Mausmodell anfällig für solche Abstoßungseffekte ist und daher insbesondere Ergebnisse aus Experimenten mit Gen-Knockouts entsprechend mit Vorsicht betrachtet werden müssen:<sup>216</sup> Der adoptive Transfer von TCL1 $^+$  neoplastischen Zellen, die ein Antigen tragen, welches im Host nicht exprimiert ist, kann zur alloantigenen T-Zell vermittelten Abstoßungsreaktion gegen dieses Antigen und somit zu Abstoßung des TCL1 $^+$  Graftes führen. Entsprechend könnte das verminderte Anwachsen der LYN exprimierenden TCL1-Zellen in globalen *Lyn* $^{-/-}$  Mäusen durch solche alloantigenen Abstoßungsreaktionen beeinflusst sein.<sup>210</sup> Dabei könnte das LYN-defiziente Immunsystem das LYN-Antigen in den transplantierten TCL1-Zellen als fremd erkennen und eine Abstoßungsreaktion induzieren. In den Vorabreiten zeigte die Gruppe um Prof. Seiffert jedoch auch, dass die Verwendung chimärer Mausmodelle nicht für diese Art der Abstoßungsreaktion anfällig sind.<sup>216</sup> Entsprechend ist auch im hier verwendeten chimären Modell, in dem die chimären hämatopoetischen Zellen das LYN-Antigen selbst tragen, nicht mit einer Abstoßungsreaktion des Graftes zu rechnen. Die Ergebnisse der beiden chimären Mausmodelle unterstreichen daher die Relevanz von LYN im CLL-TMM und implizieren, dass es sich bei der initialen Beobachtung eines verminderten Anwachsens von E $\mu$ -TCL1 in global *Lyn* $^{-/-}$  Tieren nicht ausschließlich um ein abstoßungsbedingtes Artefakt handelt.

## 4.2. LYN in der Regulation inflammatorischer Signalwege

In der bioinformatischen Analyse der proteomischen und transkriptomischen Charakterisierung LYN-defizienter HS-5 Fibroblasten zeigte sich eine erniedrigte Expression inflammatorischer Signaturen wie „TNFA SIGNALING VIA NFkB“ und „INFLAMMATORY RESPONSE“ (*Figure 3f der Publikation*) sowie eine errechnete verminderte Aktivität inflammatorischer Regulatoren wie NFkB, IL-1 oder TNF (*Figure 7a der Publikation*). Diese reduzierte inflammatorische Aktivität resultierte in einer signifikanten Änderung Zytokin-assozierter GO-Terms sowie einer reduzierten Expression verschiedener Entzündungs-assozierter Chemokine, wie z. B. CCL2, CXCL5, CXCL8 oder CXCL3 in der proteomischen und transkriptomischen Analyse (*Figure 3b/d der Publikation*). Zusammengefasst zeigen die Daten der Arbeit, dass inflammatorische Signalwege durch LYN-Knockout in den Fibroblasten gehemmt werden und somit LYN per se einen positiv inflammatorischen Effekt auf diese Zellpopulation hat.

### 4.2.1. Der Zelltyp-spezifische Einfluss von LYN auf Inflammationsprozesse

LYN ist aufgrund der Fähigkeit, sowohl aktivierende wie inhibitorische Signale zu vermitteln, für seine balancierende Signalweg-Funktion in hämatopoetischen Zellen bekannt. Der Knockout von LYN in Monozyten, dendritischen Zellen und B-Zellen führt zu einem überaktivierten/inflammatorischen Phänotyp,<sup>174,175,180,217</sup> was die überwiegend anti-inflammatorische Funktion von LYN in diesen Zelltypen zeigt. Mechanistisch scheint hierzu insbesondere die Hemmung des Toll-Like Rezeptor Signalweges durch Effekte auf MyD88, CARD9 und IRF5 relevant zu sein.<sup>157,174,180,218</sup> Jedoch ist die Funktion von LYN Zelltyp-spezifisch. Die hier vorgestellten Daten zur Rolle von LYN in Stromazellen implizieren eine überwiegend proinflammatorische Funktion von LYN in diesem Zelltyp. Damit unterscheidet sich der Effekt von LYN auf inflammatorische Signalwege zwischen den hämatopoetischen Zellen und den untersuchten Fibroblasten, was auf die unterschiedliche Ausprägung von Signalwegen im jeweiligen Zelltyp zurückzuführen sein könnte.

*In vivo* führt der spezifische Knockout von LYN in dendritischen Zellen und B-Zellen im Mausmodell zu Hyperinflammation, Expansion myeloider Zellen und Autoimmun-Effekten.<sup>174,180</sup> Überraschenderweise zeigten sich diese proinflammatorischen Effekte in globalen *Lyn*<sup>-/-</sup> Mäusen weniger stark ausgeprägt.<sup>180</sup> Aus dieser Beobachtung wurde bereits zuvor die Hypothese abgeleitet, dass Lyn-Defizienz in bestimmten, nicht-hämatopoetischen Zellen, die durch eine Lyn defizierte Hämatopoiese ausgelöste Hyperinflammation begrenzen könnte.<sup>180</sup> Die hier gezeigten Daten zur Reduktion inflammatorischer Signalwege in LYN defizienten Fibroblasten scheint diese Hypothese zu stützen. Neben der balancierenden

Funktion von LYN auf die Signaltransduktion einzelner Zellen zeigt sich somit auch eine hämostatische Funktion der Kinase im multizellulären Gesamtorganismus.

In dem hier genutzten chimären Mausmodell ist die Lyn-Defizienz allerdings nicht Zelltypspezifisch, denn durch die Transplantation Lyn-profizienter Zellen verbleiben alle nicht hämatopoetischen-Zellen, wie Fibroblasten, aber auch Endothelzellen, Epithelien etc. Lyn-defizient. Um spezifisch den anti-inflammatoryischen Effekt eines Knockouts von *Lyn* in Fibroblasten im Organismus *in vivo* zu untersuchen, wäre ein Zelltyp-spezifischer Knockout der Kinase in diesen Zelltypen nötig. Ein solcher Zelltyp-spezifischer Knockout ließe sich mittels Cre/loxP-System durch Kombination des etablierten *Lyn<sup>f/f</sup>*-Konstrukts mit der Cre-Rekombinase unter einem Fibroblasten-spezifischen Promoter generieren. So könnte die Funktion von Lyn in Fibroblasten von der in Perizyten, Endothelzellen oder sonstigen nicht-hämatopoetischen Zellen wie den Epithelien der Organe differenziert, und der Zelltypspezifische Effekt auf den Gesamtorganismus *in vivo* weiter untersucht werden. Aufgrund der zuvor skizzierten großen Heterogenität verschiedener Fibroblasten ist die Auswahl eines geeigneten Promoters für ein solches Modell jedoch schwierig.

#### **4.2.2. Proinflammatorische Signale als zentrale Mechanismen eines supportiven CLL-TMM**

Die Bedeutung von inflammatorischen Signalwegen, wie insbesondere einer Aktivierung des NFkB Signalwegs, wurde im CLL-TMM bereits in verschiedenen Zelltypen gezeigt (zusammengefasst in:<sup>45</sup> und in Abschnitt 2.2. wiedergegeben). Durch die Aktivierung solcher Kinase-abhängigen Signalkaskaden kommt es zu einer Leukämie-supportiven Umgestaltung der CLL-Nische.

Die direkte und indirekte Interaktion zwischen CLL-Zellen und fibroblastischen Stromazellen aktiviert in letzteren verschiedene Kinasen, wie die PKC-β, PI3K oder die AKT/ERK Kinasen.<sup>94,95,98</sup> Dadurch werden inflammatorische Signalwege wie der NFkB- oder MAPK-Signalweg aktiviert, was neben metabolischen Anpassungen zu einem Leukämie-supportiven Phänotyp der Stromazellen führt.<sup>97</sup> Die durch Kontakt zu den Stromazellen vermittelte Therapieresistenz gegen Chemotherapie oder Venetoclax kann beispielsweise durch die Inhibition von PKC-β durchbrochen werden.<sup>68</sup> Dies zeigt die mögliche therapeutische Relevanz der Inhibition von stromaler Aktivierung, insbesondere in rezidivierten, therapierefraktären Patienten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit schließen an diese Ergebnisse zum Beitrag von Kinasen in Stromazellen des CLL-TMM an, und zeigen eine ähnliche Funktion für die LYN-Kinase. Da auch LYN in Fibroblasten inflammatorische Signalwege reguliert, kommt es zu einer ähnlichen pro-leukämischen Reprogrammierung der Stromazellen mit u. a. Expression

inflammatorischer Zytokine. Neben dem NF<sub>κ</sub>B-Signalweg, dessen signifikant verminderte Aktivierung in den LYN<sup>KO</sup> Fibroblasten in der Upstream Enrichment Analyse (*Figure 7a der Publikation*) dargestellt werden konnte, zeigte sich insbesondere auch eine Rolle des MAPK-Signalwegs. Neben einer in der Upstream Enrichment Analyse errechneten Inhibition von MAPK-Signalwegkomponenten wie MAPK1, JUN und JUNB (*Figure 7a der Publikation*), konnte eine verminderte Phosphorylierung von p38 (Kinasegruppe der MAPK-Signalkaskade mit 4 Isoformen: MAPK11-14) (*Figure 7b der Publikation*) und eine verminderte Expression und Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1/c-JUN (*Figure 7d/e und Figure 8a/b der Publikation*) gezeigt werden. Die Bedeutung von c-JUN für die pro-leukämische Funktion der Fibroblasten konnte experimentell ebenfalls im Ko-Kultur-Modell gezeigt werden (*Figure 8 der Publikation*). Diese Erkenntnisse decken sich mit der Beobachtung, dass von CLL-Zellen sezernierte EVs eine stromale KAF-Reprogrammierung durch die Aktivierung von NF<sub>κ</sub>B- und AKT/MAPK-Signalwegen induzieren können, wobei sich ebenfalls eine verstärkte Phosphorylierung von LYN zeigte.<sup>95</sup>

Somit scheint die Signalaktivität von LYN in Fibroblasten, nebst anderen Kinassen, zu einer Inflammationsreaktion beizusteuern, durch die die Stromazellen ihren Leukämie-supportiven Phänotyp erlangen. Wichtige nachgeschaltete Signalwege sind der NF<sub>κ</sub>B und MAPK Signalweg, deren Relevanz sich übereinstimmend in verschiedenen Publikationen zeigt. Diese Kinassen und aktivierte Signalwege sind dadurch mögliche therapeutische Ziele für Mikromilieu-modulierende Therapien. Wie sich die Relevanz der verschiedenen Kinassen jedoch im Vergleich zueinander verhält, ist aktuell nicht bekannt.

#### **4.2.3. Zytokine und multizelluläre Interaktionen im CLL-TMM**

Die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen ist eine bekannte Folge der Aktivierung inflammatorischer Signalwege in Stromazellen.<sup>45,66,95</sup> Als Ausdruck einer reduzierten inflammatorischen Aktivität zeigen LYN<sup>KO</sup>-Fibroblasten gegenüber Wildtyp-Fibroblasten entsprechend ein signifikant verändertes Profil sezernierter Zytokine, welches sich insbesondere an den Sekretom-Daten der HS-5 Zellen (*Supplementary Figure S2 der Publikation*) sowie auf transkriptioneller Ebene in weiteren Fibroblasten-Zelllinien zeigte (*Figure 3b/c und Figure 4 der Publikation*). Die Veränderungen in der Zytokin-Sekretion von LYN<sup>KO</sup>-Fibroblasten ähnelt den bereits zuvor beschriebenen Veränderungen durch NF<sub>κ</sub>B-Defizienz in Stromazellen, beispielsweise zeigte sich in beiden Untersuchungen eine verminderte IL-1 Sekretion (vergl.:<sup>94</sup> sowie *Figure 3b und 4b der Publikation*). Diese Überlappung der durch LYN- und NF<sub>κ</sub>B-Defizienz ausgelösten Zytokin-Veränderungen unterstützt die Annahme einer durch LYN<sup>KO</sup> reduzierten NF<sub>κ</sub>B-Aktivität als beteiligter Mechanismus.

Die Sekretion inflammatorischer Zytokine ist auch ein wesentliches Merkmal von aktivierte Fibroblasten im CLL-TMM.<sup>45,95</sup> Dennoch zeigte sich im Ko-Kultur Modell, dass der direkte Zell-Zell Kontakt zur Unterstützung der CLL-Viabilität nötig war, und sezernierte Zytokine alleine keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität von CLL-Zellen hatten (*Figure 5a/b der Publikation*). Diese Beobachtung deckt sich mit einigen zuvor publizierten Arbeiten, in denen ebenfalls ein direkter Kontakt zur Vermittlung von anti-apoptotischen Effekten in CLL-Zellen nötig war.<sup>40,68,73,74</sup> Insgesamt wird die Abhängigkeit des pro-leukämischen Effektes vom direkten Zell-Zell Kontakt in der Literatur aber kontrovers diskutiert, da andere Studien einen deutlichen Effekt von konditioniertem Medium auf CLL-Zellen, durch Zytokine wie beispielsweise BAFF, APRIL,<sup>71</sup> VEGF,<sup>72</sup> IL-15 oder metabolische Effekte zeigten.<sup>219</sup> Insbesondere zeigte sich in einer aktuellen Arbeit die Reduktion der spontanen CLL-Apoptose durch Hinzugabe von durch NKtert-Stromazellen konditioniertem Medium, was sich auf die anti-apoptotische Wirkung des von den Stromazellen sezernierte Chemokin CCL2 zurückführen ließ.<sup>220</sup> Unter Verwendung von NKtert-Zellen und aufgereinigten CLL-Zellen konnte der Effekt von konditioniertem Medium in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht reproduzieren werden (*Figure 5b der Publikation*). Es zeigte sich zwar eine reduzierte Expression und Sekretion von CCL2 in LYN<sup>KO</sup> HS-5 Stromazellen (*Figure 3b und 4a der Publikation*), durch deren konditionierten Medium zeigte sich jedoch ebenfalls kein Effekt auf die CLL-Zell Viabilität (*Figure 5b der Publikation*). Zuvor wurde in einer anderen Publikation die Sekretion von CCL2 durch HS-5 Zellen beschrieben, es zeigte sich jedoch ebenfalls kein direkter Effekt auf die CLL Zellen, sondern lediglich ein indirekter Effekt über Beeinflussung von Monozyten.<sup>90</sup> Dieser könnte die unterschiedlichen Effekte des konditionierten Mediums durch unterschiedliche Kultur-Bedingungen im Allgemeinen und die Verwendung aufgereinigter B-Zellen ohne Monozyten (wie in der vorliegenden Arbeit) oder die Verwendung von PBMCs mit verbleibenden Monozyten (wie bei Parvin et al<sup>220</sup>) im Speziellen erklären. Dies hebt die Bedeutung der Interaktion zwischen Stromazellen, CLL-Zellen und weiteren Zellen des TMMs hervor, und macht deutlich, dass das TMM als multizelluläres Netzwerk zu erforschen ist.

Dies zeigte sich auch an dem deutlich differentiellen Effekt von LYN<sup>KO</sup> konditioniertem Medium auf die Aktivierung von T-Zellen. Sowohl der direkte Kontakt zu HS-5 Zellen wie auch konditioniertes Medium von HS-5 Zellen konnte eine unspezifische Aktivierung von T-Zellen gesunder Spender auslösen. Diese Aktivierung zeigte sich bei Verwendung von LYN<sup>KO</sup>-HS-5 Zellen sowohl im direkten Kontakt, wie auch durch konditioniertes Medium vermindert (*Figure 5c der Publikation*). Die veränderte Zytokin-Sekretion scheint somit eine veränderte T-Zell Aktivierung zu bewirken, ein weiterer Ausdruck der Bedeutung multi-zellulärer Interaktionen

im TMM. Wie sich diese veränderte T-Zell Aktivierung auf die Interaktion zwischen CLL und T-Zellen auswirkt und wie sich LYN in Stroma-Zellen somit auch indirekt auf die CLL auswirken könnte, übersteigt jedoch den Ansatz der vorliegenden Arbeit und ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten.

### 4.3. LYN als Regulator in matrizellulären Signalwegen

Neben einer Adaptation inflammatorischer Signalkaskaden zeigten LYN<sup>KO</sup>- im Vergleich zu LYN<sup>WT</sup>-Fibroblasten insbesondere eine signifikante Veränderung der Expression von EZM-Komponenten sowie der Aktivität matrizellulärer Signalwege (wie Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) oder TGF-β Signalweg). Im Folgenden wird daher die Rolle der LYN-Kinase in matrizellulären Signalkaskaden näher diskutiert:

#### 4.3.1. Veränderungen der extrazellulären Matrix

Vorherige Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen der LYN-Funktion und der exzessiven Produktion extrazellulärer Matrix in verschiedenen Fibrose-Modellen. In einem murinen COPD Modell zeigte sich eine Lyn-vermittelte Aktivierung von EZM-Programmen, die einen bindegewebigen Umbau der Lunge förderten (u. a. α-SMA- und Vimentin-Expression sowie EMT-Signatur).<sup>166,190</sup> In einem murinen Modell chronischer Pankreatitis zeigte sich, dass Lyn-Inhibition die typische Entwicklung einer Fibrose signifikant reduzieren konnte,<sup>191</sup> und in einem Modell einer toxischen Leberfibrose konnte ein gleichartiger pro-fibrotischer Lyn-Effekt gezeigt werden.<sup>221</sup> Zusätzlich zu diesen direkten pro-fibrotischen Effekten wirkt auch die Inflammations-balancierende Funktion von LYN in hämatopoetischen Zellen regulierend auf eine durch chronische Entzündung bestärkte Fibrosierung.<sup>167</sup>

Die hier vorgestellten Daten sind kongruent zu diesen Arbeiten und zeigen einen deutlichen Effekt von LYN auf die EZM-Produktion von Fibroblasten: Der Knockout der LYN-Kinase in den verschiedenen untersuchten Fibroblasten *in vitro* zeigte eine veränderte Sekretion und Transkription verschiedener EZM-Proteine (wie BGN, THBS-1 oder Kollagen 4 und 6) (*Figure 3e und Supplementary Figure S2c-e der Publikation*) und auch aus Mäusen isolierte Fibroblasten zeigten eine veränderte Transkription von EZM Genen durch Lyn-Defizienz (*Supplementary Figure S2n der Publikation*). Neben der pro-inflammatorischen Funktion der LYN-Kinase belegen daher die vorherigen und die vorliegende Studie übereinstimmend, dass LYN auch an der Regulation der EZM-Produktion in nicht-hämatopoetischen Zellen beteiligt ist.

Neben der EZM-Produktion zeigte auch die epithelial-mesenchymal Transition - die im Rahmen der Wundheilung physiologische Reprogrammierung epithelialer Zellen zu mesenchymalen Zellen mit gesteigerter Migration und adaptierter Interaktion mit der EZM -

eine LYN-vermittelte Regulation. In Brustkrebszellen ist LYN u. a. an der Mechanosensation und nachfolgend der Regulation der mesenchymalen Repolarisation involviert. Eine steifere EZM führt über Ephrin-Rezeptoren zur LYN-Phosphorylierung, was nachfolgend die Migration und Invasion der Tumorzellen fördert.<sup>184,185,189</sup> In den Brustkrebszellen ist mechanistisch eine Phosphorylierung und dadurch Freisetzung des EMT-Transkriptionsfaktor TWIST, einem Haupt-Mediator des TGF- $\beta$ -Signalweges, durch LYN beschrieben.<sup>189</sup> Außerdem reguliert LYN die Aktivität des funktionell vergleichbaren EMT-Transkriptionsfaktors Snail.<sup>222</sup>

Entsprechend dieser EMT-stimulierenden Funktion von LYN zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine signifikant verminderte Expression des Gensets „Epithelial Mesenchymal Transition“ in den Transkriptom-Daten der LYN<sup>KO</sup> HS-5 Fibroblasten (*Figure 3f der Publikation*).

Mechanistisch lassen sich sowohl die Induktion von Fibrose als auch von EMT als Effekte des TGF- $\beta$  Signalwegs ableiten, ein zentraler matrizzellulärer Signalweg. Insgesamt ähnelte der Phänotyp LYN-defizienter HS-5 Zellen in Teilen den zuvor beschriebenen Effekten von TGF- $\beta$  Inhibition auf Fibroblasten, zum Beispiel in einer reduzierten EMT-Signatur, einer verminderten Expression von TGF- $\beta$  Zielgenen wie MMPs, VCAN, BGN und LRRC15 sowie einer gesteigerten Interferon-Signatur.<sup>124,223</sup> Die Beobachtung, dass LYN<sup>KO</sup> HS-5 Zellen eine verminderte Stimulierbarkeit durch TGF- $\beta$  mit ausbleibender Überexpression der TGF- $\beta$  Zielgene PDGFR- $\beta$  und FAP zeigten (*Figure 4d der Publikation*), ist ein weiterer Hinweis auf eine Regulation des TGF- $\beta$ -Signalweges durch LYN. Diesem Effekt könnte die Reduktion der vorbeschriebenen, LYN-vermittelten Aktivierung der entsprechenden TGF- $\beta$ -Transkriptionsfaktoren (TWIST/Snail) zugrunde liegen,<sup>189,222</sup> ihre Aktivität wurde in den LYN<sup>KO</sup> HS-5 Zellen jedoch nicht untersucht. Außerdem ist die im LYN<sup>KO</sup> Modell vermindert aktive p38 Kinase (*Figure 7a/b der Publikation*) ein Bestandteil des nicht-kanonischen TGF- $\beta$  Signalweges.<sup>224</sup> Dieser Teil des TGF- $\beta$  Signalweges vermittelt seine Aktivität unabhängig von den SMAD-Proteinen des kanonischen Signalweges und führt zur Aktivierung verschiedener nachgeschalteter Signalwege wie dem MAPK-, PI3K- oder NF $\kappa$ B-Signalweg. Insbesondere TAK1 (TGF- $\beta$ -aktivierte Kinase 1) ist eine frühe Kinase im nicht-kanonischen TGF- $\beta$  Signalweg, die p38 und NF $\kappa$ B Aktivität stimulieren kann. In Mastzellen konnte die Regulation der TAK1 Aktivität durch die LYN-Kinase gezeigt werden,<sup>181,225</sup> was einen ähnlichen Einfluss von LYN auf den (nicht-kanonischen) TGF- $\beta$  Signalweg in Fibroblasten plausibel erscheinen lässt. Weitere Untersuchungen zur Validierung einer veränderten TGF- $\beta$  Signalwegs-Aktivität sowie der Aktivität von TAK1 in Fibroblasten sind jedoch nötig, um die mechanistische Rolle von LYN im TGF- $\beta$ -Signalweg in Fibroblasten aufzuschlüsseln.

Neben dem TGF- $\beta$  Signalweg ist ein weiterer bedeutsamer Mechanismus zur Regulation der Interaktion mit der extrazellulären Matrix die Integrin-Aktivität, die ebenfalls LYN abhängige

Effekte zeigt. In Monozyten und Neutrophilen Granulozyten hat LYN eine inhibitorische Funktion auf Integrine, was sich insbesondere durch die gesteigerte Adhäsion von LYN-defizienten Monozyten an Oberflächen oder auch endothelialen Zellen zeigt.<sup>175,178,179</sup> Mechanistisch ist dies durch eine reduzierte Aktivität der SHP-1 Phosphatase als Folge einer verminderten Phosphorylierung der ITIM von SIRP1- $\alpha$  durch LYN erklärt worden.<sup>178</sup> LYN<sup>KO</sup> HS-5 Zellen zeigten ebenfalls eine verstärkte Adhäsion, sodass beispielsweise primäre CLL-Zellen signifikant mehr an LYN<sup>KO</sup> HS-5 Zellen im Vergleich zu LYN<sup>WT</sup> HS-5 Zellen anhafteten (*Figure 5d der Publikation*), und auch in der allgemeinen Handhabung fiel eine verstärkte Adhäsion der LYN<sup>KO</sup> Zellen an das Zellkulturplastik auf (nicht quantifiziert). Es zeigte sich eine leicht gesteigerte Expression von Adhäsions-Molekülen wie LFA-1, ICAM-1 und VCAM-1 in LYN<sup>KO</sup> Zellen (*Fig 5 e-h der Publikation*), die eine gesteigerte Adhäsion möglicherweise erklären könnten. Entgegen vorherigen Beobachtungen, in denen die Adhäsion von CLL-Zellen an Stromazellen generell sowie die Aktivität der Signalachsen LFA-1/ICAM-1 sowie VLA-4/VCAM-1 im Speziellen die CLL-Viabilität unterstützt,<sup>45,64,68,69</sup> zeigte sich in den LYN-defizienten Fibroblasten trotz erhöhter Adhäsion ein verminderter Support, während die Blockade dieser Adhäsions-Proteine den leukämischen Support nicht reduzierte (unveröffentlichte Daten).

#### 4.3.2. Modulation der THBS-1 und BGN Expression

Die veränderte Sekretion von EZM-Proteinen durch LYN hat einen direkten Einfluss auf die Viabilität der CLL-Zellen, wie anhand eines verminderten Überlebens primärer CLL-Zellen in Ko-Kultur mit der isolierten extrazellulären Matrix LYN-defizienter Fibroblasten im Vergleich zu WT-Fibroblasten gezeigt werden konnte (*Figure 6a der Publikation*). Die Bedeutung der EZM konnte exemplarisch an den beiden EZM Proteinen Biglykan (BGN) und Thrombospondin-1 (THBS-1) näher untersucht werden. Obwohl die beiden Matrix-Proteine unterschiedliche Wirkungen auf die leukämischen Zellen vermitteln - BGN wirkt leukämie-supportiv (*Figure 6c der Publikation*), während THBS-1 CLL-restriktiv wirkt (*Figure 6g/h der Publikation*) - werden sie durch LYN auf eine Leukämie-unterstützende Weise reguliert. Entsprechend zeigten LYN<sup>KO</sup> Fibroblasten eine verminderte Expression von BGN (*Figure 3 und Figure 6b der Publikation*), während sich eine Überexpression von THBS-1 zeigte (*Figure 3 und Figure 6e-f*). Somit führte der Mangel an LYN-Kinase in den Fibroblasten über das Remodelling der EZM und die Anpassung verschiedener EZM-Proteine zu einer verminderten Leukämie-Unterstützung. Dies betont die generelle Bedeutung der EZM und ihrer Zusammensetzung an der Pathogenese der CLL und der Schaffung eines supportiven TMM. Dennoch ist der allgemeine Beitrag der EZM an der Pathogenese und Progression der CLL nur wenig erforscht. Einige EZM-assoziierte Proteine scheinen mit einem besseren klinischen Outcome assoziiert

zu sein,<sup>226</sup> während die Aktivierung des EZM-Rezeptors CD44 oder von Integrinen auf leukämischen Zellen eine anti-apoptotische und somit leukämie-unterstützende Funktion vermitteln.<sup>227,228</sup> Grundsätzlich spielt die extrazelluläre Matrix im TMM hämatologischer und lymphoider Neoplasien eine wichtige Rolle und ist an der Bildung verschiedener Tumörkosysteme beteiligt.<sup>140–142,229</sup> Die *in vitro* Daten dieser Arbeit implizieren, dass die Gesamtheit der EZM-Zusammensetzung und das Gleichgewicht pro- und anti-leukämischer Moleküle die CLL-Mikroumgebung prägen können. Eine tiefgreifendere Beschreibung der EZM im CLL-Mikromilieu ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten.

#### 4.3.3. Transkriptionelle Regulation von THBS-1

Im Speziellen beschreibt diese Arbeit eine Disinhibition des Matrix-Proteins THBS-1 durch LYN-Ablation und die konsekutiv reduzierte Aktivität des AP-1 Transkriptionsfaktors (*Figure 6-8 der Publikation*).

AP-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der sich als Heterodimer aus Proteinen der ATF/Fos/Jun Familie zusammensetzt. In der Arbeit zeigte sich in der auf einer ATAC-Sequenzierung basierten Transkriptionsfaktor-Footprinting-Analyse eine reduzierte Expression von AP-1 Signaturen (*Figure 7d/e der Publikation*). Übereinstimmend zeigte sich eine reduzierte (nukleäre) Proteinexpression und Transkription der AP-1 Komponente c-JUN in LYN<sup>KO</sup> Fibroblasten (*Figure 8a/b der Publikation*). Soweit bekannt, ist dies die erste Publikation, die eine Reduktion der AP-1/c-JUN Aktivität durch LYN-Defizienz beschreibt. Da die AP-1/c-JUN Aktivierung die Endstrecke des MAPK/p38 Signalweges ist, passt dies zu den zuvor beschriebenen und teilweise in der Literatur bekannten, reduzierten Aktivität der p38 Kinase und inflammatorischer Signalwege sowie des nicht-kanonischen TGF-β Signalweges.

AP-1 ist ein bekannter Transkriptionsfaktor von THBS-1, für den bereits in vorherigen Arbeiten ein Zelltyp-spezifischer Einfluss auf die Transkription von THBS-1 beschrieben wurde.<sup>230–232</sup> Während die Stimulierung einer hepatzellulären Karzinom-Zelllinie mit Phorbol-12-myristat 13-acetat (PMA) durch Induktion von AP-1 die Expression von THBS-1 induzierte,<sup>231</sup> bewirkte die gleiche Stimulation an endothelialen Zellen eine Reduktion der THBS-1 Expression.<sup>232</sup> In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von c-JUN die Expression von THBS-1 in HS-5 und NKtert Fibroblasten disinhibiert (*Figure 8e/f der Publikation*), und dass die Wiederherstellung von c-JUN in LYN<sup>KO</sup> HS-5 Fibroblasten die THBS-1 Expression erneut supprimierte (*Figure 8g der Publikation*).

##### (1) THBS-1 im CLL-Mikromilieu

Vorherige Arbeiten konnten zeigen, dass die Bindung von THBS-1 an den CD47-Oberflächenrezeptor auf CLL-Zellen eine Caspase-unabhängige Form des Zelltodes auslösen

kann.<sup>233–235</sup> Auf molekularem Level scheinen eine Immobilisation des CD47-Rezeptors, Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts sowie die Deregulation des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Signals und Aktivierung von PKA und PLC $\gamma$  an der Apoptose beteiligt zu sein.<sup>233,235</sup> Die Induktion des Zelltodes scheint spezifisch für B-CLL und T-ALL zu sein,<sup>236</sup> und die Verwendung entsprechender THBS-1-ähnlicher Peptide zeigte keine Wirkung auf gesunde Leukozyten.<sup>233,235</sup> Entsprechend passend zeigten sich in dieser Arbeit eine durch rekombinantes THBS-1 sowie THBS-1-Überexpression induzierte, reduzierte CLL-Viabilität (*Figure 6g/h der Publikation*), sowie eine teilweise Wiederherstellung der CLL-Viabilität durch Knockdown von THBS-1 sowie Blockade der CD47-Achse (*Figure 6i/j der Publikation*). Verglichen mit dem durch LYN-Knockout induzierten Effekt, beeinflusst die Modulation der THBS-1/CD47 Achse die CLL-Viabilität jedoch nur geringfügig, was impliziert, dass THBS-1/CD47 nicht die einzige durch LYN regulierte Effektor-Funktion der Stromazellen ist. Vielmehr scheint die LYN vermittelte Reprogrammierung über verschiedene Effekte einen Einfluss auf die CLL-Zellen zu haben.

Die translationale Beobachtung einer im CLL-Lymphknoten reduzierten Expression von THBS-1 (*Figure 6k und Supplementary Figure S4j der Publikation*) suggeriert, dass eine Rekonstitution von THBS-1 eine potenzielle Therapiemöglichkeit der CLL darstellt. Die therapeutische Nutzung THBS-1-imitierender Peptide wird in den zuvor erwähnten Studien bereits *in vitro* und *in vivo* getestet.<sup>233,235</sup> In klinischen Studien ist die CD47-Achse darüber hinaus insbesondere aufgrund der „Don't eat me“ Checkpoint Funktion durch Interaktion mit SIRP- $\alpha$  auf Makrophagen Gegenstand aktueller Forschung. Dabei zeigte sich, dass auch ein Teil der hierzu genutzten anti-CD47 Antikörper den CLL-Zelltod induzieren können.<sup>237</sup> Entsprechend der hier gezeigten Daten könnte auch eine Beeinflussung des TMMs, z. B. durch LYN-Kinase-Inhibition die THBS-1/CD47 Achse beeinflussen und möglicherweise in Kombinationstherapien eine hilfreiche Synergie mit anti-CD47 Antikörpern bewirken.

## **4.4. Translationale Relevanz der Arbeit**

### **4.4.1. LYN-Inhibition in der CLL-Therapie**

Die Beobachtung, dass das Fehlen von LYN-Kinase in Fibroblasten des CLL TMM das leukämische Überleben *in vitro*, sowie das Fehlen der Kinase im nicht-hämatopoetischen Mikromilieu die Krankheitsprogression im Mausmodell verlangsamt, impliziert, dass die Inhibition der Kinase potenziell einen therapeutischen Effekt in CLL-Patienten haben könnte. Die Tatsache, dass LYN in Makrophagen sowie im hämatopoetischen Mikromilieu einen vergleichbaren Effekt hat,<sup>210</sup> macht die Kinase als therapeutisches Ziel zusätzlich interessant. Die gezeigte erhöhte Expression von LYN in Fibroblasten (*Figure 1d/e der Publikation*) und Makrophagen (noch nicht veröffentlichte Studie) im TMM humaner CLL-Patienten im Vergleich zu gesunden Lymphknoten ist ein weiterer translationaler Hinweis auf die Relevanz der beschriebenen Mechanismen in CLL-Patienten.

Der Multi-Tyrosinkinase Inhibitor Dasatinib ist ein potenter Inhibitor der LYN-Kinase und außerdem zur Behandlung der CML und Philadelphia-Chromosom-positiven B-ALL zugelassen. Weitere Src-Familien-Kinase-Inhibitoren, wie beispielsweise Bafetinib, Bosutinib, Saracatinib oder weitere experimentelle Substanzen, haben ebenfalls LYN als eines ihrer verschiedenen Ziele, diese Inhibitoren sind jedoch klinisch aktuell nicht zugelassen.

Dasatinib wurde in klinischen Studien bereits zur Therapie refraktärer CLL Patienten untersucht und zeigte eine biologische Aktivität mit insbesondere Reduktion der Lymphadenopathie.<sup>207,208,238</sup> Aufgrund geringer zytotoxischer Aktivität und geringer Gesamtansprechen-Raten im Vergleich zu BTK-Inhibitoren wurde die Nutzung jedoch anschließend klinisch nicht weiter untersucht.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass *in vitro* die Behandlung von Fibroblasten mit Dasatinib ähnlich dem genetischen LYN-Knockout zu einer Reduktion der KAF Marker FAP und PDGFR- $\beta$  führte (*Figure 4g der Publikation*). Damit könnte Dasatinib die Unterstützung der CLL-Zellen durch das TMM und insbesondere stromaler Zellen im TMM reduzieren, was unter Umständen die in klinischen Studien beobachtete präferentielle Wirksamkeit von Dasatinib auf die Lymphadenopathie erklären könnte.

Die Unterstützung von CLL-Zellen durch ihr Mikromilieu zu unterbrechen und sie somit empfindlicher für andere Therapien - wie beispielsweise Immuntherapien - zu machen, könnte eine zukünftige Strategie zur Therapie refraktärer Patienten sein, für die es aktuell nur unzureichende Therapie-Optionen gibt.<sup>33</sup>

Die Arbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, dass Dasatinib durch die Inhibition von LYN-Kinase als Modulator des CLL TMMs ein potenzieller Kombinationspartner in neuen Therapiestrategien sein könnte. Die zuvor in klinischen Studien gezeigte biologische-Aktivität in der CLL sowie die beschriebene immun-modulatorischen Eigenschaften machen

insbesondere eine Kombination mit Immuntherapie vielversprechend.<sup>33</sup> Eine derartige Anwendung von Dasatinib ist Gegenstand geplanter klinischer Studien.

#### 4.4.2. LYN-Inhibition zur KAF Reprogrammierung

Die vorliegende Arbeit zeigt auch, dass die LYN-Defizienz die Reprogrammierung und Adaptation KAF-assozierter Funktionen wie Zytokin- und EZM-Sekretion in HS-5 Fibroblasten bewirkt. Zwar sind HS-5 Fibroblasten kein etabliertes System zur Untersuchung der KAF-Aktivierung, allerdings deutet eine ähnliche Veränderung in der Expression von KAF-Markern in NKtert Zellen und zweier immortalisierter, primär humarer KAF-Zellen aus Pankreas-Karzinomen auf eine mögliche Verallgemeinerung dieser Ergebnisse hin (*Figure 4d der Publikation*). Diese könnten somit eine Funktion der LYN-Kinase in der Aktivierung von KAF im Tumormikromilieu implizieren und LYN als mögliches therapeutisches Ziel zur Modulation der KAF-Programmierung suggerieren. Entsprechend zeigten LYN-defiziente HS-5 Zellen eine signifikant verminderte Expression einer KAF-Signatur (*Supplementary Figure S3a der Publikation*).

Wie in Abschnitt 2.3. dargestellt, sind an der KAF-Aktivierung je nach Subtyp verschiedene Signalwege beteiligt: während in myKAF insbesondere eine TGF- $\beta$  Signalaktivität vorherrscht, zeigen sich in iKAF inflammatorische Signalwege.

In LYN defizienten Fibroblasten zeigte sich einerseits eine Reduktion inflammatorischer Signaturen, die insbesondere Folge einer Reduktion der NFkB- und MAPK-Signalwege zu sein scheinen. Da diese Signalwege auch eine Funktion in der Aktivierung von iKAF spielen,<sup>239</sup> konnte entsprechend eine Reduktion von typischen iKAF-Markern in HS-5, NKtert und imCAF gezeigt werden (*Figure 4b der Publikation*).

MyKAF dagegen zeigen eine Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalweges. In Abschnitt 4.3. wurden bereits die LYN-abhängigen Veränderungen matrizellulärer Signalwege und insbesondere des TGF- $\beta$  Signalweges in den LYN<sup>KO</sup> HS-5 Fibroblasten diskutiert. Passend zeigten LYN-defiziente HS-5 Zellen auch eine Dysregulation typischer myKAF Marker, wie beispielsweise Kollagenen, LRRC15, POSTN oder VCAN (*Supplementary Figure S2 der Publikation*).<sup>107</sup> Interessanterweise resultierte in anderen Arbeiten die Inhibition des TGF- $\beta$ -Signalweg in primären KAF in einer Repolarisierung von Fibroblasten zu einem Phänotyp mit gesteigerter Interferon-Signatur.<sup>124</sup> Ähnlich zeigte sich in den LYN-defizienten HS-5 Zellen ebenfalls eine vermehrte Expression von Interferon-Signaturen (*Figure 3f und Supplementary Figure S2j der Publikation*) sowie eine verstärkte Aktivität von Interferon als Upstream Regulator (*Figure 7a der Publikation*). Dies hebt Ähnlichkeiten zwischen einer Inhibition der KAF-Programmierung in myKAF und der beobachteten LYN-Effekte hervor.

Dementsprechend zeigte sich in einer Studie auch eine partielle Reversibilität des KAF Phänotypen in Lungenkrebs durch die *in vitro* Behandlung mit Dasatinib,<sup>240</sup> was sich auf Basis dieser Daten durch die Inhibition der LYN-Kinase durch Dasatinib erklären ließe.

Die Modulation der KAF-Aktivierung in soliden Entitäten ist von großer therapeutischer Relevanz, da KAF in diesen Entitäten einen wichtigen Beitrag im TMM zur Progression der Erkrankung leisten (s. Abschnitt 2.3.).<sup>119</sup> Da Versuche der Depletion von KAF im TMM ernüchternde Ergebnisse zeigten,<sup>120,121</sup> könnte insbesondere die Reprogrammierung von KAF-Phänotypen ein wichtiger Bestandteil neuer Therapiestrategien sein. Beispielsweise tragen myKAF zur Resistenz gegen Immuntherapien bei und die Reprogrammierung von myKAF durch Inhibition von TGF-β ermöglicht ein besseres Ansprechen auf diese Therapien *in vivo*.<sup>118,124</sup> Es wäre denkbar zu spekulieren, dass die Inhibition der LYN-Kinase eine neue Möglichkeit der KAF-Inhibition und Reprogrammierung darstellen könnte, die in soliden Entitäten erprobt werden sollte. Zuvor muss jedoch die Relevanz von LYN für den KAF-Phänotypen in soliden Tumoren bestätigt werden. Dazu könnte der Einfluss einer LYN-Deletion oder Inhibition in etablierten KAF-Modellen wie der Co-Kultur von Fibroblasten mit Zellen solider Tumorentitäten oder deren Überstand erfolgen. Außerdem könnten Maus-Modelle von Tumorentitäten mit gut etablierten KAF-Phänotypen wie Pankreas-/Mamma- oder Kolon-Karzinom genutzt werden, um die Funktion von Lyn *in vivo* in diesen Entitäten zu untersuchen.

## 5. Literaturverzeichnis

- 1 Vom Stein AF, Rebollido-Rios R, Lukas A, et al. LYN kinase programs stromal fibroblasts to facilitate leukemic survival via regulation of c-JUN and THBS1. *Nat Commun* 2023; **14**: 1330.
- 2 Hallek M, Al-Sawaf O. Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *Am J Hematol* 2021; **96**: 1679–705.
- 3 Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2018; **391**: 1524–37.
- 4 Wendtner CM, Al-Sawaf O, Binder M, et al. Chronische Lymphatische Leukämie (CLL). Onkopedia. 2024; published online Jan 8. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-lymphatische-leukaemie-cll/@/guideline/html/index.html> (letzter Zugriff 10.03.2025).
- 5 Shadman M. Diagnosis and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: A Review. *JAMA* 2023; **329**: 918–32.
- 6 Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* 2018; **131**: 2745–60.
- 7 Tadmor T, Levy I. Richter Transformation in Chronic Lymphocytic Leukemia: Update in the Era of Novel Agents. *Cancers* 2021; **13**. DOI:10.3390/cancers13205141.
- 8 Al-Sawaf O, Robrecht S, Bahlo J, et al. Richter transformation in chronic lymphocytic leukemia (CLL)—a pooled analysis of German CLL Study Group (GCLLSG) front line treatment trials. *Leukemia* 2021; **35**: 169–76.
- 9 Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic Lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**: 1848–54.
- 10 Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic Lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**: 1840–7.
- 11 Agathangelidis A, Chatzidimitriou A, Chatzikonstantinou T, et al. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: the 2022 update of the recommendations by ERIC, the European Research Initiative on CLL. *Leukemia* 2022; **36**: 1961–8.
- 12 Papavasiliou FN, Schatz DG. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Cell* 2002; **109**: S35–44.
- 13 Beekman R, Chapaprieta V, Russiñol N, et al. The reference epigenome and regulatory chromatin landscape of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med* 2018; **24**: 868–80.
- 14 Kulis M, Heath S, Bibikova M, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2012; **44**: 1236–42.
- 15 Oakes CC, Seifert M, Assenov Y, et al. DNA methylation dynamics during B cell maturation underlie a continuum of disease phenotypes in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2016; **48**: 253–64.
- 16 Maiques-Diaz A, Martin-Subero JI. Biological, prognostic, and therapeutic impact of the epigenome in CLL. *Semin Hematol* 2023; published online Dec 1. DOI:10.1053/j.seminhematol.2023.11.005.
- 17 Baliakas P, Espinet B, Mellink C, et al. Cytogenetics in chronic Lymphocytic leukemia: ERIC perspectives and recommendations. *HemaSphere* 2022; **6**: e707.
- 18 Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic Lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1910–6.
- 19 Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* 2015; **526**: 525–30.
- 20 Knisbacher BA, Lin Z, Hahn CK, et al. Molecular map of chronic lymphocytic leukemia and its impact on outcome. *Nat Genet* 2022; **54**: 1664–74.

- 21 International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2016; **17**: 779–90.
- 22 Fischer K, Bahlo J, Fink AM, et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood* 2016; **127**: 208–15.
- 23 Eichhorst B, Ghia P, Niemann CU, et al. ESMO Clinical Practice Guideline interim update on new targeted therapies in the first-line and at relapse of chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol* 2024; published online July 1. DOI:10.1016/j.annonc.2024.06.016.
- 24 Eichhorst B, Niemann CU, Kater AP, et al. First-Line Venetoclax Combinations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2023; **388**: 1739–54.
- 25 Kater Arnon P., Owen Carolyn, Moreno Carol, et al. Fixed-Duration Ibrutinib-Venetoclax in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia and Comorbidities. *NEJM Evidence* 2022; **1**: EVIDoa2200006.
- 26 Munir T, Cairns DA, Bloor A, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia Therapy Guided by Measurable Residual Disease. *N Engl J Med* 2024; **390**: 326–37.
- 27 Tam CS, Allan JN, Siddiqi T, et al. Fixed-duration ibrutinib plus venetoclax for first-line treatment of CLL: primary analysis of the CAPTIVATE FD cohort. *Blood* 2022; **139**: 3278–89.
- 28 Jain N, Keating M, Thompson P, et al. Ibrutinib and Venetoclax for First-Line Treatment of CLL. *N Engl J Med* 2019; **380**: 2095–103.
- 29 Brown JR, Seymour JF, Jurczak W, et al. Fixed-duration acalabrutinib combinations in untreated chronic Lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2025; **392**: 748–62.
- 30 Davids MS, Ryan CE, Lampson BL, et al. Phase II study of acalabrutinib, venetoclax, and obinutuzumab in a treatment-naïve chronic Lymphocytic leukemia population enriched for high-risk disease. *J Clin Oncol* 2025; **43**: 788–99.
- 31 Krämer I, Stilgenbauer S, Dietrich S, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for high-risk CLL: 10-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood* 2017; **130**: 1477–80.
- 32 Dreger P. Is there a role for cellular therapy in chronic Lymphocytic leukemia? *Cancer J* 2021; **27**: 297–305.
- 33 Lewis RI, Vom Stein AF, Hallek M. Targeting the tumor microenvironment for treating double-refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2024; **144**: 601–14.
- 34 Messmer BT, Messmer D, Allen SL, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 2005; **115**: 755–64.
- 35 Sun C, Chen Y-C, Martinez Zurita A, et al. The immune microenvironment shapes transcriptional and genetic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Adv* 2023; **7**: 145–58.
- 36 Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993; **82**: 1820–8.
- 37 Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 13944–9.
- 38 Ahn IE, Davids MS. Therapeutic targeting of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 2024; published online Feb 7. DOI:10.1053/j.seminhematol.2024.01.015.
- 39 Jayappa KD, Gordon VL, Morris CG, et al. Extrinsic interactions in the microenvironment in vivo activate an antiapoptotic multidrug-resistant phenotype in CLL. *Blood Adv* 2021; **5**: 3497–510.
- 40 Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood* 2009; **114**: 4441–50.
- 41 Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 2000; **96**: 2655–63.

- 42 Tretter T, Schuler M, Schneller F, et al. Direct cellular interaction with activated CD4(+) T cells overcomes hyporesponsiveness of B-cell chronic lymphocytic leukemia in vitro. *Cell Immunol* 1998; **189**: 41–50.
- 43 Schleiss C, Ilias W, Tahar O, et al. BCR-associated factors driving chronic lymphocytic leukemia cells proliferation ex vivo. *Sci Rep* 2019; **9**: 701.
- 44 Hoferkova E, Kadakova S, Mraz M. In Vitro and In Vivo Models of CLL-T Cell Interactions: Implications for Drug Testing. *Cancers* 2022; **14**. DOI:10.3390/cancers14133087.
- 45 Vom Stein AF, Hallek M, Nguyen P-H. Role of the tumor microenvironment in CLL pathogenesis. *Semin Hematol* 2023; published online Dec 26. DOI:10.1053/j.seminhematol.2023.12.004.
- 46 Ysebaert L, Fournié J-J. Genomic and phenotypic characterization of nurse-like cells that promote drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2011; **52**: 1404–6.
- 47 Nishio M, Endo T, Tsukada N, et al. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 $\alpha$ . *Blood* 2005; **106**: 1012–20.
- 48 Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell–derived factor-1. *Blood* 2000; **96**: 2655–63.
- 49 Alsadhan A, Chen J, Gaglione EM, et al. CD49d expression identifies a biologically distinct subtype of chronic Lymphocytic leukemia with inferior progression-free survival on BTK inhibitor therapy. *Clin Cancer Res* 2023; **29**: 3612–21.
- 50 Zaaboub R, Vimeux L, Contremoulin V, et al. Nurselike cells sequester B cells in disorganized lymph nodes in chronic lymphocytic leukemia via alternative production of CCL21. *Blood Adv* 2022; **6**: 4691–704.
- 51 Hanna BS, McClanahan F, Yazdanparast H, et al. Depletion of CLL-associated patrolling monocytes and macrophages controls disease development and repairs immune dysfunction in vivo. *Leukemia* 2016; **30**: 570–9.
- 52 Martines C, Chakraborty S, Vujovikj M, et al. Macrophage- and BCR-derived but not TLR-derived signals support the growth of CLL and Richter syndrome murine models in vivo. *Blood* 2022; **140**: 2335–47.
- 53 Pascutti MF, Jak M, Tromp JM, et al. IL-21 and CD40L signals from autologous T cells can induce antigen-independent proliferation of CLL cells. *Blood* 2013; **122**: 3010–9.
- 54 Grioni M, Brevi A, Cattaneo E, et al. CD4+ T cells sustain aggressive chronic lymphocytic leukemia in E $\mu$ -TCL1 mice through a CD40L-independent mechanism. *Blood Adv* 2021; **5**: 2817–28.
- 55 Arruga F, Gyau BB, Iannello A, Vitale N, Vaisitti T, Deaglio S. Immune response dysfunction in chronic Lymphocytic leukemia: Dissecting molecular mechanisms and microenvironmental conditions. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 1825.
- 56 Zarobkiewicz MK, Bojarska-Junak AA. The mysterious actor— $\gamma\delta$  T lymphocytes in chronic Lymphocytic leukaemia (CLL). *Cells* 2022; **11**: 661.
- 57 Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest* 2008; published online June 1. DOI:10.1172/jci35017.
- 58 Taghiloo S, Allahmoradi E, Tehrani M, et al. Frequency and functional characterization of exhausted CD8 $^{+}$ T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 2017; **98**: 622–31.
- 59 Vlachonikola E, Stamatopoulos K, Chatzidimitriou A. T Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Two-Edged Sword. *Front Immunol* 2020; **11**: 612244.
- 60 Reiners KS, Topolar D, Henke A, et al. Soluble ligands for NK cell receptors promote evasion of chronic lymphocytic leukemia cells from NK cell anti-tumor activity. *Blood* 2013; **121**: 3658–65.

- 61 Ferrer G, Jung B, Chiu PY, et al. Myeloid-derived suppressor cell subtypes differentially influence T-cell function, T-helper subset differentiation, and clinical course in CLL. *Leukemia* 2021; **35**: 3163–75.
- 62 Roessner PM, Seiffert M. T-cells in chronic lymphocytic leukemia: Guardians or drivers of disease? *Leukemia* 2020; **34**: 2012–24.
- 63 Krishnamurti AT, Turley SJ. Lymph node stromal cells: cartographers of the immune system. *Nat Immunol* 2020; **21**: 369–80.
- 64 Dubois N, Crompton E, Meuleman N, Bron D, Lagneaux L, Stamatopoulos B. Importance of Crosstalk Between Chronic Lymphocytic Leukemia Cells and the Stromal Microenvironment: Direct Contact, Soluble Factors, and Extracellular Vesicles. *Front Oncol* 2020; **10**: 1422.
- 65 Jayappa KD, Portell CA, Gordon VL, et al. Microenvironmental agonists generate de novo phenotypic resistance to combined ibrutinib plus venetoclax in CLL and MCL. *Blood Adv* 2017; **1**: 933–46.
- 66 O'Donnell A, Pepper C, Mitchell S, Pepper A. NF- $\kappa$ B and the CLL microenvironment. *Front Oncol* 2023; **13**: 1169397.
- 67 Thijssen R, Tian L, Anderson MA, et al. Single-cell multiomics reveal the scale of multilayered adaptations enabling CLL relapse during venetoclax therapy. *Blood* 2022; **140**: 2127–41.
- 68 Park E, Chen J, Moore A, et al. Stromal cell protein kinase C- $\beta$  inhibition enhances chemosensitivity in B cell malignancies and overcomes drug resistance. *Sci Transl Med* 2020; **12**: eaax9340.
- 69 Pedersen IM, Kitada S, Leoni LM, et al. Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood* 2002; **100**: 1795–801.
- 70 Patel V, Chen LS, Wierda WG, Balakrishnan K, Gandhi V. Impact of bone marrow stromal cells on Bcl-2 family members in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2014; **55**: 899–910.
- 71 Cols M, Barra CM, He B, et al. Stromal endothelial cells establish a bidirectional crosstalk with Chronic Lymphocytic leukemia cells through the TNF-related factors BAFF, APRIL, and CD40L. *J Immunol* 2012; **188**: 6071–83.
- 72 Gehrke I, Gandhirajan RK, Poll-Wolbeck SJ, Hallek M, Kreuzer K-A. Bone marrow stromal cell-derived vascular endothelial growth factor (VEGF) rather than chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell-derived VEGF is essential for the apoptotic resistance of cultured CLL cells. *Mol Med* 2011; **17**: 619–27.
- 73 Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* 1998; **91**: 2387–96.
- 74 Simon-Gabriel CP, Foerster K, Saleem S, et al. Microenvironmental stromal cells abrogate NF- $\kappa$ B inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2018; **103**: 136–47.
- 75 Mangolini M, Götte F, Moore A, et al. Notch2 controls non-autonomous Wnt-signalling in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun* 2018; **9**: 3839.
- 76 Binder M, Léchenne B, Umanni R, et al. Stereotypical chronic Lymphocytic leukemia B-cell receptors recognize survival promoting antigens on stromal cells. *PLoS One* 2010; **5**: e15992.
- 77 Pontikoglou C, Kastrinaki M-C, Klaus M, et al. Study of the quantitative, functional, cytogenetic, and immunoregulatory properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with B-cell chronic Lymphocytic leukemia. *Stem Cells Dev* 2013; **22**: 1329–41.
- 78 Manukyan G, Papajik T, Mikulkova Z, et al. High CXCR3 on leukemic cells distinguishes IgHV mut from IgHV unmut in chronic Lymphocytic leukemia: Evidence from CD5high and CD5low clones. *J Immunol Res* 2020; **2020**: 7084268.
- 79 Bürkle A, Niedermeier M, Schmitt-Gräff A, Wierda WG, Keating MJ, Burger JA. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; **110**: 3316–25.

- 80 Till KJ, Lin K, Zuzel M, Cawley JC. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood* 2002; **99**: 2977–84.
- 81 Trimarco V, Ave E, Facco M, et al. Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia (CLL) tumor B cells and mesenchymal stromal cells (MSCs): implications for neoplastic cell survival. *Oncotarget* 2015; **6**: 42130–49.
- 82 Jacamo R, Chen Y, Wang Z, et al. Reciprocal leukemia-stroma VCAM-1/VLA-4-dependent activation of NF- $\kappa$ B mediates chemoresistance. *Blood* 2014; **123**: 2691–702.
- 83 Lagneaux L, Delforge A, De Bruyn C, Bernier M, Bron D. Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 1999; **35**: 445–53.
- 84 Lee S, Van NT, Vachhani NB, Uthman M, Keating MJ, Juneja HS. Adhesion of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells to Marrow Stromal Cells is Mediated by  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 but not  $\beta$ 2 $\alpha$ L Integrin: MSC also Prevent Apoptosis of B-CLL Cells. *Hematology* 2001; **5**: 463–73.
- 85 Burger JA, Zvaifler NJ, Tsukada N, Firestein GS, Kipps TJ. Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipoleisis via a stromal cell-derived factor-1- and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2001; **107**: 305–15.
- 86 Hartmann TN, Grabovsky V, Wang W, et al. Circulating B-cell chronic Lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow. *Cancer Res* 2009; **69**: 3121–30.
- 87 Ponader S, Chen S-S, Buggy JJ, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood* 2012; **119**: 1182–9.
- 88 de Rooij MFM, Kuil A, Geest CR, et al. The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; **119**: 2590–4.
- 89 Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic Lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013; **369**: 32–42.
- 90 Schulz A, Toedt G, Zenz T, Stilgenbauer S, Lichter P, Seiffert M. Inflammatory cytokines and signaling pathways are associated with survival of primary chronic lymphocytic leukemia cells in vitro: a dominant role of CCL2. *Haematologica* 2011; **96**: 408–16.
- 91 Mangolini M, Ringshausen I. Bone Marrow Stromal Cells Drive Key Hallmarks of B Cell Malignancies. *Int J Mol Sci* 2020; **21**. DOI:10.3390/ijms21041466.
- 92 Jin X, Wei M, Wang S, et al. Detecting Fibroblast Activation Proteins in Lymphoma Using 68Ga-FAPI PET/CT. *J Nucl Med* 2022; **63**: 212–7.
- 93 Ruan J, Hyjek E, Kermani P, et al. Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 5622–31.
- 94 Lutzny G, Kocher T, Schmidt-Suprian M, et al. Protein kinase c- $\beta$ -dependent activation of NF- $\kappa$ B in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vivo. *Cancer Cell* 2013; **23**: 77–92.
- 95 Paggetti J, Haderk F, Seiffert M, et al. Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *Blood* 2015; **126**: 1106–17.
- 96 Yang Y, Li J, Geng Y. Exosomes derived from chronic lymphocytic leukaemia cells transfer miR-146a to induce the transition of mesenchymal stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *J Biochem* 2020; **168**: 491–8.
- 97 von Heydebrand F, Fuchs M, Kunz M, et al. Protein kinase C- $\beta$ -dependent changes in the glucose metabolism of bone marrow stromal cells of chronic lymphocytic leukemia. *Stem Cells* 2021; **39**: 819–30.
- 98 Ding W, Knox TR, Tschumper RC, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-PDGF receptor interaction activates bone marrow-derived mesenchymal stromal cells derived from chronic lymphocytic leukemia: implications for an angiogenic switch. *Blood* 2010; **116**: 2984–93.

- 99 Norris PS, Ware CF. The LT $\beta$ R signaling pathway. Philadelphia, PA: Landes Bioscience, 2013.
- 100 Heinig K, Gätjen M, Grau M, et al. Access to follicular dendritic cells is a pivotal step in murine chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and proliferation. *Cancer Discov* 2014; **4**: 1448–65.
- 101 Reiners KS, Shatnyeva O, Vasyutina E, et al. Extracellular vesicles released from chronic lymphocytic leukemia cells exhibit a disease relevant mRNA signature and transfer mRNA to bystander cells. *Haematologica* 2017; **102**: e100–3.
- 102 Ghosh AK, Secreto CR, Knox TR, Ding W, Mukhopadhyay D, Kay NE. Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. *Blood* 2010; **115**: 1755–64.
- 103 Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer* 2020; **20**: 174–86.
- 104 Alkasalias T, Flaberg E, Kashuba V, et al. Inhibition of tumor cell proliferation and motility by fibroblasts is both contact and soluble factor dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**: 17188–93.
- 105 Kaukonen R, Mai A, Georgiadou M, et al. Normal stroma suppresses cancer cell proliferation via mechanosensitive regulation of JMJD1a-mediated transcription. *Nat Commun* 2016; **7**: 1–15.
- 106 Chhabra Y, Weeraratna AT. Fibroblasts in cancer: Unity in heterogeneity. *Cell* 2023; **186**: 1580–609.
- 107 Cords L, Tietscher S, Anzeneder T, et al. Cancer-associated fibroblast classification in single-cell and spatial proteomics data. *Nat Commun* 2023; **14**: 4294.
- 108 Lavie D, Ben-Shmuel A, Erez N, Scherz-Shouval R. Cancer-associated fibroblasts in the single-cell era. *Nature Cancer* 2022; **3**: 793–807.
- 109 Arnold JN, Magiera L, Kraman M, Fearon DT. Tumoral immune suppression by macrophages expressing fibroblast activation protein-alpha and heme oxygenase-1. *Cancer Immunol Res* 2014; **2**: 121–6.
- 110 Buechler MB, Pradhan RN, Krishnamurty AT, et al. Cross-tissue organization of the fibroblast lineage. *Nature* 2021; published online May 12. DOI:10.1038/s41586-021-03549-5.
- 111 Raz Y, Cohen N, Shani O, et al. Bone marrow-derived fibroblasts are a functionally distinct stromal cell population in breast cancer. *J Exp Med* 2018; **215**: 3075–93.
- 112 Luo H, Xia X, Huang L-B, et al. Pan-cancer single-cell analysis reveals the heterogeneity and plasticity of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Nat Commun* 2022; **13**: 6619.
- 113 Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med* 2017; **214**: 579–96.
- 114 Biffi G, Oni TE, Spielman B, et al. IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGF $\beta$  to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Discov* 2019; **9**: 282–301.
- 115 Elyada E, Bolisetty M, Laise P, et al. Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Discov* 2019; **9**: 1102–23.
- 116 Huang H, Wang Z, Zhang Y, et al. Mesothelial cell-derived antigen-presenting cancer-associated fibroblasts induce expansion of regulatory T cells in pancreatic cancer. *Cancer Cell* 2022; published online April 26. DOI:10.1016/j.ccr.2022.04.011.
- 117 Bartoschek M, Oskolkov N, Bocci M, et al. Spatially and functionally distinct subclasses of breast cancer-associated fibroblasts revealed by single cell RNA sequencing. *Nat Commun* 2018; **9**: 5150.
- 118 Kieffer Y, Hocine HR, Gentric G, et al. Single-Cell Analysis Reveals Fibroblast Clusters Linked to Immunotherapy Resistance in Cancer. *Cancer Discov* 2020; **10**: 1330–51.

- 119 Chen Y, McAndrews KM, Kalluri R. Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Clin Oncol* 2021; published online Sept 6. DOI:10.1038/s41571-021-00546-5.
- 120 Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, et al. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2014; **25**: 735–47.
- 121 Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* 2014; **25**: 719–34.
- 122 Caligiuri G, Tuveson DA. Activated fibroblasts in cancer: Perspectives and challenges. *Cancer Cell* 2023; **41**: 434–49.
- 123 Tsoumakidou M. The advent of immune stimulating CAFs in cancer. *Nat Rev Cancer* 2023; : 1–12.
- 124 Grauel AL, Nguyen B, Ruddy D, et al. TGF $\beta$ -blockade uncovers stromal plasticity in tumors by revealing the existence of a subset of interferon-licensed fibroblasts. *Nat Commun* 2020; **11**: 6315.
- 125 Massagué J, Sheppard D. TGF- $\beta$  signaling in health and disease. *Cell* 2023; **186**: 4007–37.
- 126 Ding Z, Shi R, Hu W, et al. Cancer-associated fibroblasts in hematologic malignancies: elucidating roles and spotlighting therapeutic targets. *Front Oncol* 2023; **13**: 1193978.
- 127 Mukherjee P, Ansell SM, Mondello P. Unraveling the role of cancer-associated fibroblasts in B cell lymphoma. *Front Immunol* 2024; **15**: 1451791.
- 128 Roider T, Baertsch MA, Fitzgerald D, et al. Multimodal and spatially resolved profiling identifies distinct patterns of T cell infiltration in nodal B cell lymphoma entities. *Nat Cell Biol* 2024; : 1–12.
- 129 Pan C, Liu P, Ma D, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells in microenvironment transform into cancer-associated fibroblasts to promote the progression of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Biomed Pharmacother* 2020; **130**: 110610.
- 130 Zhai Y, Zhang J, Wang H, et al. Growth differentiation factor 15 contributes to cancer-associated fibroblasts-mediated chemo-protection of AML cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2016; **35**: 147.
- 131 Gu L, Liao P, Liu H. Cancer-associated fibroblasts in acute leukemia. *Front Oncol* 2022; **12**: 1022979.
- 132 Pandey S, Mourcin F, Marchand T, et al. IL-4/CXCL12 loop is a key regulator of lymphoid stroma function in follicular lymphoma. *Blood* 2017; **129**: 2507–18.
- 133 Dumontet E, Mancini SJC, Tarte K. Bone Marrow Lymphoid Niche Adaptation to Mature B Cell Neoplasms. *Front Immunol* 2021; **12**: 784691.
- 134 Abe Y, Sakata-Yanagimoto M, Fujisawa M, et al. A single-cell atlas of non-haematopoietic cells in human lymph nodes and lymphoma reveals a landscape of stromal remodelling. *Nat Cell Biol* 2022; **24**: 565–78.
- 135 Laurent C, Dietrich S, Tarte K. Cell cross talk within the lymphoma tumor microenvironment: follicular lymphoma as a paradigm. *Blood* 2024; **143**: 1080–90.
- 136 Apollonio B, Spada F, Petrov N, et al. Tumor-activated lymph node fibroblasts suppress T cell function in diffuse large B cell lymphoma. *J Clin Invest* 2023; published online May 23. DOI:10.1172/JCI166070.
- 137 Radtke AJ, Postovalova E, Varlamova A, et al. Multi-omic profiling of follicular lymphoma reveals changes in tissue architecture and enhanced stromal remodeling in high-risk patients. *Cancer Cell* 2024; published online Feb 29. DOI:10.1016/j.ccr.2024.02.001.
- 138 Mourcin F, Verdière L, Roulois D, et al. Follicular lymphoma triggers phenotypic and functional remodeling of the human lymphoid stromal cell landscape. *Immunity* 2021; **54**: 1788–1806.e7.
- 139 Madsen C, Lauridsen KL, Plesner TL, et al. High intratumoral expression of vimentin predicts histological transformation in patients with follicular lymphoma. *Blood Cancer J* 2019; **9**: 35.

- 140 Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2008; **359**: 2313–23.
- 141 Steen CB, Luca BA, Esfahani MS, et al. The landscape of tumor cell states and ecosystems in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 2021; published online Sept 14. DOI:10.1016/j.ccr.2021.08.011.
- 142 Kotlov N, Bagaev A, Revuelta MV, et al. Clinical and Biological Subtypes of B-cell Lymphoma Revealed by Microenvironmental Signatures. *Cancer Discov*. 2021; **11**: 1468–89.
- 143 Brodie EJ, Infantino S, Low MSY, Tarlinton DM. Lyn, Lupus, and (B) Lymphocytes, a Lesson on the Critical Balance of Kinase Signaling in Immunity. *Front Immunol* 2018; **9**: 401.
- 144 Boggon TJ, Eck MJ. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 2004; **23**: 7918–27.
- 145 Parsons SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 2004; **23**: 7906–9.
- 146 Weerawarna PM, Richardson TI. Lyn Kinase Structure, Regulation, and Involvement in Neurodegenerative Diseases: A Mini Review. *Kinases and Phosphatases* 2023; **1**: 23–38.
- 147 Kovářová M, Tolar P, Arudchandran R, Dráberová L, Rivera J, Dráber P. Structure-function analysis of Lyn kinase association with lipid rafts and initiation of early signaling events after fce receptor I aggregation. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 8318–28.
- 148 Skrzypczynska KM, Zhu JW, Weiss A. Positive Regulation of Lyn Kinase by CD148 Is Required for B Cell Receptor Signaling in B1 but Not B2 B Cells. *Immunity* 2016; **45**: 1232–44.
- 149 Zikherman J, Doan K, Parameswaran R, Raschke W, Weiss A. Quantitative differences in CD45 expression unmask functions for CD45 in B-cell development, tolerance, and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**: E3.
- 150 Hibbs ML, Tarlinton DM, Armes J, et al. Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell* 1995; **83**: 301–11.
- 151 Lowell CA. Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. *Mol Immunol* 2004; **41**: 631–43.
- 152 Xu Y, Harder KW, Huntington ND, Hibbs ML, Tarlinton DM. Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative. *Immunity* 2005; **22**: 9–18.
- 153 Eiseman E, Bolen JB. Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. *Nature* 1992; **355**: 78–80.
- 154 Fitzer-Attas CJ, Lowry M, Crowley MT, et al. Fc gamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med* 2000; **191**: 669–82.
- 155 L'Estrange-Stranieri E, Gottschalk TA, Wright MD, Hibbs ML. The dualistic role of Lyn tyrosine kinase in immune cell signaling: implications for systemic lupus erythematosus. *Front Immunol* 2024; **15**: 1395427.
- 156 Yamanashi Y, Kakiuchi T, Mizuguchi J, Yamamoto T, Toyoshima K. Association of B cell antigen receptor with protein tyrosine kinase Lyn. *Science* 1991; **251**: 192–4.
- 157 Ban T, Sato GR, Nishiyama A, et al. Lyn Kinase Suppresses the Transcriptional Activity of IRF5 in the TLR-MyD88 Pathway to Restrain the Development of Autoimmunity. *Immunity* 2016; **45**: 319–32.
- 158 Tawaratsumida K, Redecke V, Wu R, et al. A phospho-tyrosine-based signaling module using SPOP, CSK, and LYN controls TLR-induced IRF activity. *Sci Adv* 2022; **8**: eabq0084.
- 159 Tang J, Xiao Y, Lin G, et al. Tyrosine phosphorylation of NLRP3 by the Src family kinase Lyn suppresses the activity of the NLRP3 inflammasome. *Sci Signal* 2021; **14**: eabe3410.
- 160 Brian BF, Freedman TS. The Src-family Kinase Lyn in Immunoreceptor Signaling. *Endocrinology* 2021; **162**. DOI:10.1210/endocr/bqab152.
- 161 Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015; **347**: 1260419.

- 162 Chen W-S, Kung H-J, Yang W-K, Lin W-C. Comparative tyrosine-kinase profiles in colorectal cancers: Enhanced arg expression in carcinoma as compared with adenoma and normal mucosa. *Int J Cancer* 1999; **83**: 579–84.
- 163 Zardan A, Nip KM, Thaper D, et al. Lyn tyrosine kinase regulates androgen receptor expression and activity in castrate-resistant prostate cancer. *Oncogenesis* 2014; **3**: e115.
- 164 Kohlhas V, Hallek M, Nguyen P-H. Constitutive activation of Lyn kinase enhances BCR responsiveness, but not the development of CLL in Eμ-TCL1 mice. *Blood Adv* 2020; **4**: 6106–16.
- 165 Hibbs ML, Harder KW, Armes J, et al. Sustained Activation of Lyn Tyrosine Kinase In Vivo Leads to Autoimmunity. *J Exp Med* 2002; **196**: 1593–604.
- 166 Tsantikos E, Gottschalk TA, L'Estrange-Stranieri E, et al. Enhanced Lyn activity causes severe, progressive emphysema and lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2023; **69**: 99–112.
- 167 de Jesus AA, Chen G, Yang D, et al. Constitutively active Lyn kinase causes a cutaneous small vessel vasculitis and liver fibrosis syndrome. *Nat Commun* 2023; **14**. DOI:10.1038/s41467-023-36941-y.
- 168 Louvrier C, El Khouri E, Grall Leroeay M, et al. De Novo gain-of-function variations in LYN associated with an early-onset systemic autoinflammatory disorder. *Arthritis Rheumatol* 2023; **75**: 468–74.
- 169 Yu CC, Yen TS, Lowell CA, DeFranco AL. Lupus-like kidney disease in mice deficient in the Src family tyrosine kinases Lyn and Fyn. *Curr Biol* 2001; **11**: 34–8.
- 170 Harder KW, Parsons LM, Armes J, et al. Gain- and loss-of-function Lyn mutant mice define a critical inhibitory role for Lyn in the myeloid lineage. *Immunity* 2001; **15**: 603–15.
- 171 de Groen RAL, Schrader AMR, Kersten MJ, Pals ST, Vermaat JSP. MYD88 in the driver's seat of B-cell lymphomagenesis: from molecular mechanisms to clinical implications. *Haematologica* 2019; **104**: 2337–48.
- 172 Xu Y, Harder K, Huntington N, Hibbs M, Tarlinton D. Lyn tyrosine KinaseAccentuating the positive and the negative. *Immunity* 2005; **22**: 9–18.
- 173 Chan VW, Meng F, Soriano P, DeFranco AL, Lowell CA. Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity* 1997; **7**: 69–81.
- 174 Lamagna C, Hu Y, DeFranco AL, Lowell CA. B cell-specific loss of Lyn kinase leads to autoimmunity. *J Immunol* 2014; **192**: 919–28.
- 175 Scapini P, Pereira S, Zhang H, Lowell CA. Multiple roles of Lyn kinase in myeloid cell signaling and function. *Immunol Rev* 2009; **228**: 23–40.
- 176 Tsantikos E, Oracki SA, Quilici C, Anderson GP, Tarlinton DM, Hibbs ML. Autoimmune disease in Lyn-deficient mice is dependent on an inflammatory environment established by IL-6. *J Immunol* 2010; **184**: 1348–60.
- 177 Scapini P, Hu Y, Chu C-L, et al. Myeloid cells, BAFF, and IFN-gamma establish an inflammatory loop that exacerbates autoimmunity in Lyn-deficient mice. *J Exp Med* 2010; **207**: 1757–73.
- 178 Pereira S, Lowell C. The Lyn tyrosine kinase negatively regulates neutrophil integrin signaling. *J Immunol* 2003; **171**: 1319–27.
- 179 Malik M, Chen Y-Y, Kienzle MF, Tomkowicz BE, Collman RG, Ptasznik A. Monocyte migration and LFA-1-mediated attachment to brain microvascular endothelia is regulated by SDF-1 alpha through Lyn kinase. *J Immunol* 2008; **181**: 4632–7.
- 180 Lamagna C, Scapini P, van Ziffle JA, DeFranco AL, Lowell CA. Hyperactivated MyD88 signaling in dendritic cells, through specific deletion of Lyn kinase, causes severe autoimmunity and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**: E3311-20.
- 181 Avila M, Martinez-Juarez A, Ibarra-Sanchez A, Gonzalez-Espinosa C. Lyn kinase controls TLR4-dependent IKK and MAPK activation modulating the activity of TRAF-6/TAK-1 protein complex in mast cells. *Innate Immun* 2012; **18**: 648–60.
- 182 Li H, Zhao C, Tian Y, et al. Src family kinases and pulmonary fibrosis: A review. *Biomed Pharmacother* 2020; **127**: 110183.

- 183 Ortiz MA, Mikhailova T, Li X, Porter BA, Bah A, Kotula L. Src family kinases, adaptor proteins and the actin cytoskeleton in epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Commun Signal* 2021; **19**. DOI:10.1186/s12964-021-00750-x.
- 184 Tornillo G, Knowlson C, Kendrick H, et al. Dual Mechanisms of LYN Kinase Dysregulation Drive Aggressive Behavior in Breast Cancer Cells. *Cell Rep* 2018; **25**: 3674-3692.e10.
- 185 Choi Y-L, Bocanegra M, Kwon MJ, et al. LYN is a mediator of epithelial-mesenchymal transition and a target of dasatinib in breast cancer. *Cancer Res* 2010; **70**: 2296–306.
- 186 Goldenberg-Furmanov M, Stein I, Pikarsky E, et al. Lyn is a target gene for prostate cancer. *Cancer Res* 2004; **64**: 1058–66.
- 187 Park SI, Zhang J, Phillips KA, et al. Targeting Src family kinases inhibits growth and lymph node metastases of prostate cancer in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res* 2008; **68**: 3323–33.
- 188 Stettner MR, Wang W, Nabors LB, et al. Lyn kinase activity is the predominant Cellular Src kinase activity in glioblastoma tumor cells. *Cancer Res* 2005; **65**: 5535–43.
- 189 Fattet L, Jung H-Y, Matsumoto MW, et al. Matrix Rigidity Controls Epithelial-Mesenchymal Plasticity and Tumor Metastasis via a Mechanoresponsive EPHA2/LYN Complex. *Dev Cell* 2020; **54**: 302-316.e7.
- 190 Liang X, He X, Li Y, et al. Lyn regulates epithelial-mesenchymal transition in CS-exposed model through Smad2/3 signaling. *Respir Res* 2019; **20**: 201.
- 191 Pham H, Birtolo C, Chheda C, et al. Essential Role of Lyn in Fibrosis. *Front Physiol* 2016; **7**: 387.
- 192 Han J, Zhang G, Welch EJ, et al. A critical role for Lyn kinase in strengthening endothelial integrity and barrier function. *Blood* 2013; **122**: 4140–9.
- 193 Contri A, Brunati AM, Trentin L, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest* 2005; **115**: 369–78.
- 194 Hussein K, von Neuhoff N, Büsche G, Buhr T, Kreipe H, Bock O. Opposite expression pattern of Src kinase Lyn in acute and chronic haematological malignancies. *Ann Hematol* 2009; **88**: 1059–67.
- 195 Wang Y-H, Fan L, Wang L, et al. Expression levels of Lyn, Syk, PLC $\gamma$ 2 and ERK in patients with chronic lymphocytic leukemia, and higher levels of Lyn are associated with a shorter treatment-free survival. *Leuk Lymphoma* 2013; **54**: 1165–70.
- 196 Zonta F, Pagano MA, Trentin L, et al. Lyn sustains oncogenic signaling in chronic lymphocytic leukemia by strengthening SET-mediated inhibition of PP2A. *Blood* 2015; **125**: 3747–55.
- 197 Zonta F, Pagano MA, Trentin L, et al. Lyn-mediated procaspase 8 dimerization blocks apoptotic signaling in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; **123**: 875–83.
- 198 Tibaldi E, Brunati AM, Zonta F, et al. Lyn-mediated SHP-1 recruitment to CD5 contributes to resistance to apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2011; **25**: 1768–81.
- 199 Dave Z, Vondálová Blanářová O, Čada Š, et al. Lyn Phosphorylates and Controls ROR1 Surface Dynamics During Chemotaxis of CLL Cells. *Front Cell Dev Biol* 2022; **10**. DOI:10.3389/fcell.2022.838871.
- 200 ten Hacken E, Scielzo C, Bertilaccio MTS, et al. Targeting the LYN/HS1 signaling axis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; **121**: 2264–73.
- 201 Martini V, Gattazzo C, Frezzato F, et al. Cortactin, a Lyn substrate, is a checkpoint molecule at the intersection of BCR and CXCR4 signalling pathway in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 2017; **178**: 81–93.
- 202 Klaeger S, Heinzelmeir S, Wilhelm M, et al. The target landscape of clinical kinase drugs. *Science* 2017; **358**. DOI:10.1126/science.aan4368.
- 203 Veldurthy A, Patz M, Hagist S, et al. The kinase inhibitor dasatinib induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro with preference for a subgroup of patients with unmutated IgVH genes. *Blood* 2008; **112**: 1443–52.

- 204 Hallaert DYH, Jaspers A, van Noesel CJ, van Oers MHJ, Kater AP, Eldering E. c-Abl kinase inhibitors overcome CD40-mediated drug resistance in CLL: implications for therapeutic targeting of chemoresistant niches. *Blood* 2008; **112**: 5141–9.
- 205 Song Z, Lu P, Furman RR, et al. Activities of SYK and PLC $\gamma$ 2 predict apoptotic response of CLL cells to SRC tyrosine kinase inhibitor dasatinib. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 587–99.
- 206 Amrein L, Hernandez TA, Ferrario C, et al. Dasatinib sensitizes primary chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to chlorambucil and fludarabine in vitro. *Br J Haematol* 2008; **143**: 698–706.
- 207 Amrein PC, Attar EC, Takvorian T, et al. Phase II study of dasatinib in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 2977–86.
- 208 Kater AP, Spiering M, Liu RD, et al. Dasatinib in combination with fludarabine in patients with refractory chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase 2 study. *Leuk Res* 2014; **38**: 34–41.
- 209 Kadia T, Delioukina ML, Kantarjian HM, et al. A pilot phase II study of the Lyn kinase inhibitor bafetinib in patients with relapsed or refractory B cell chronic Lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; **118**: 2858–2858.
- 210 Nguyen P-H, Fedorchenco O, Rosen N, et al. LYN Kinase in the Tumor Microenvironment Is Essential for the Progression of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell* 2016; **30**: 610–22.
- 211 Bichi R, Shinton SA, Martin ES, et al. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 6955–60.
- 212 Yan X-J, Albesiano E, Zanesi N, et al. B cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 11713–8.
- 213 Hofbauer JP, Heyder C, Denk U, et al. Development of CLL in the TCL1 transgenic mouse model is associated with severe skewing of the T-cell compartment homologous to human CLL. *Leukemia* 2011; **25**: 1452–8.
- 214 Floerchinger A, Seiffert M. Lessons learned from the E $\mu$ -TCL1 mouse model of CLL. *Semin Hematol* 2024; published online May 10. DOI:10.1053/j.seminhematol.2024.05.002.
- 215 Dong S, Harrington BK, Hu EY, et al. PI3K p110 $\delta$  inactivation antagonizes chronic lymphocytic leukemia and reverses T cell immune suppression. *J Clin Invest* 2019; **129**: 122–36.
- 216 Öztürk S, Roessner PM, Schulze-Edinghausen L, et al. Rejection of adoptively transferred E $\mu$ -TCL1 chronic lymphocytic leukemia cells in C57BL/6 substrains or knockout mouse lines. *Leukemia* 2019; **33**: 1514–39.
- 217 Keck S, Freudenberg M, Huber M. Activation of murine macrophages via TLR2 and TLR4 is negatively regulated by a Lyn/PI3K module and promoted by SHIP1. *J Immunol* 2010; **184**: 5809–18.
- 218 Ma J, Abram CL, Hu Y, Lowell CA. CARD9 mediates dendritic cell-induced development of Lyn deficiency-associated autoimmune and inflammatory diseases. *Sci Signal* 2019; **12**. DOI:10.1126/scisignal.aaq3829.
- 219 Zhang W, Trachootham D, Liu J, et al. Stromal control of cystine metabolism promotes cancer cell survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Cell Biol* 2012; **14**: 276–86.
- 220 Parvin S, Aryal A, Yin S, et al. Targeting conditioned media dependencies and FLT-3 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Adv* 2023; **7**: 5877–89.
- 221 Li Y, Xiong L, Gong J. Lyn kinase enhanced hepatic fibrosis by modulating the activation of hepatic stellate cells. *Am J Transl Res* 2017; **9**: 2865–77.
- 222 Thaper D, Vahid S, Nip KM, et al. Targeting Lyn regulates Snail family shuttling and inhibits metastasis. *Oncogene* 2017; **36**: 3964–75.
- 223 Krishnamurty AT, Shyer JA, Thai M, et al. LRRC15+ myofibroblasts dictate the stromal setpoint to suppress tumour immunity. *Nature* 2022; published online Sept 28. DOI:10.1038/s41586-022-05272-1.

- 224 Tzavlaki K, Moustakas A. TGF- $\beta$  Signaling. *Biomolecules* 2020; **10**. DOI:10.3390/biom10030487.
- 225 Drube S, Weber F, Göpfert C, et al. TAK1 and IKK2, novel mediators of SCF-induced signaling and potential targets for c-Kit-driven diseases. *Oncotarget* 2015; **6**: 28833–50.
- 226 Haro M, Orsulic S. A Paradoxical Correlation of Cancer-Associated Fibroblasts With Survival Outcomes in B-Cell Lymphomas and Carcinomas. *Front Cell Dev Biol* 2018; **6**: 98.
- 227 Herishanu Y, Gibellini F, Njuguna N, et al. Activation of CD44, a receptor for extracellular matrix components, protects chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug induced apoptosis through MCL-1. *Leuk Lymphoma* 2011; **52**: 1758–69.
- 228 de la Fuente MT, Casanova B, Moyano JV, et al. Engagement of  $\alpha 4\beta 1$  integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. *J Leukoc Biol* 2002; **71**: 495–502.
- 229 Zanetti C, Krause DS. “Caught in the net”: the extracellular matrix of the bone marrow in normal hematopoiesis and leukemia. *Exp Hematol* 2020; **89**: 13–25.
- 230 Stenina-Adognravi O. Invoking the power of thrombospondins: regulation of thrombospondins expression. *Matrix Biol* 2014; **37**: 69–82.
- 231 Kim SA, Um SJ, Kang JH, Hong KJ. Expression of thrombospondin-1 in human hepatocarcinoma cell lines and its regulation by transcription factor Jun/AP-1. *Mol Cell Biochem* 2001; **216**: 21–9.
- 232 Kim SA, Hong KJ. Responsive site on the thrombospondin-1 promotor to down-regulation by phorbol 12-myristate 13-acetate in porcine aortic endothelial cells. *Exp Mol Med* 2000; **32**: 135–40.
- 233 Martinez-Torres A-C, Quiney C, Attout T, et al. CD47 agonist peptides induce programmed cell death in refractory chronic lymphocytic leukemia B cells via PLC $\gamma$ 1 activation: evidence from mice and humans. *PLoS Med* 2015; **12**: e1001796.
- 234 Mateo V, Lagneaux L, Bron D, et al. CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med* 1999; **5**: 1277–84.
- 235 Pramil E, Herbi Bastian L, Denèfle T, et al. Targeting chronic lymphocytic leukemia with N-methylated thrombospondin-1-derived peptides overcomes drug resistance. *Blood Adv* 2019; **3**: 2920–33.
- 236 Leclair P, Liu C-C, Monajemi M, Reid GS, Sly LM, Lim CJ. CD47-ligation induced cell death in T-acute lymphoblastic leukemia. *Cell Death Dis* 2018; **9**: 544.
- 237 Peluso MO, Adam A, Armet CM, et al. The Fully human anti-CD47 antibody SRF231 exerts dual-mechanism antitumor activity via engagement of the activating receptor CD32a. *J Immunother Cancer* 2020; **8**. DOI:10.1136/jitc-2019-000413.
- 238 Garg RJ, Wierda W, Fayad L, Estrov Z, Bickel SM, O’Brien S. Phase II study of dasatinib in patients with relapsed CLL. *Blood* 2008; **112**: 4197–4197.
- 239 Wu F, Yang J, Liu J, et al. Signaling pathways in cancer-associated fibroblasts and targeted therapy for cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2021; **6**: 218.
- 240 Haubeiss S, Schmid JO, Mürdter TE, et al. Dasatinib reverses cancer-associated fibroblasts (CAFs) from primary lung carcinomas to a phenotype comparable to that of normal fibroblasts. *Mol Cancer* 2010; **9**: 168.

## **6. Anhang**

### **6.1. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Übersicht über die CLL-Therapie.....	17
Abbildung 2: Das CLL-Tumormikromilieu.....	20
Abbildung 3: CLL-Stroma Interaktionen.....	22
Abbildung 4: Reprogrammierung von Stroma-Zellen durch CLL-Kontakt.....	24
Abbildung 5: Die LYN-Kinase.....	36
Abbildung 6: Zusammenstellung vorheriger Ergebnisse der Arbeitsgruppe zur Rolle von Lyn im E $\mu$ -TCL1-Mausmodell: Lyn-Kinase im Mikromilieu, aber nicht in B-Zellen, unterstützt die leukämische Progression.....	40
Abbildung 7: Zusammenfassung der LYN-vermittelten stromalen Repolarisation und veränderten CLL-Unterstützung.....	44
Abbildung 8: LYN-Defizienz in verschiedenen Kompartimenten des CLL-Mikromilieus im TCL1-Mausmodell.....	45

### **6.2. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Binet-Klassifikation der CLL .....	14
---	----