

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 initiieren (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

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

✉ e-mail: hien.nguyen@uk-koeln.de; michael.hallek@uni-koeln.de

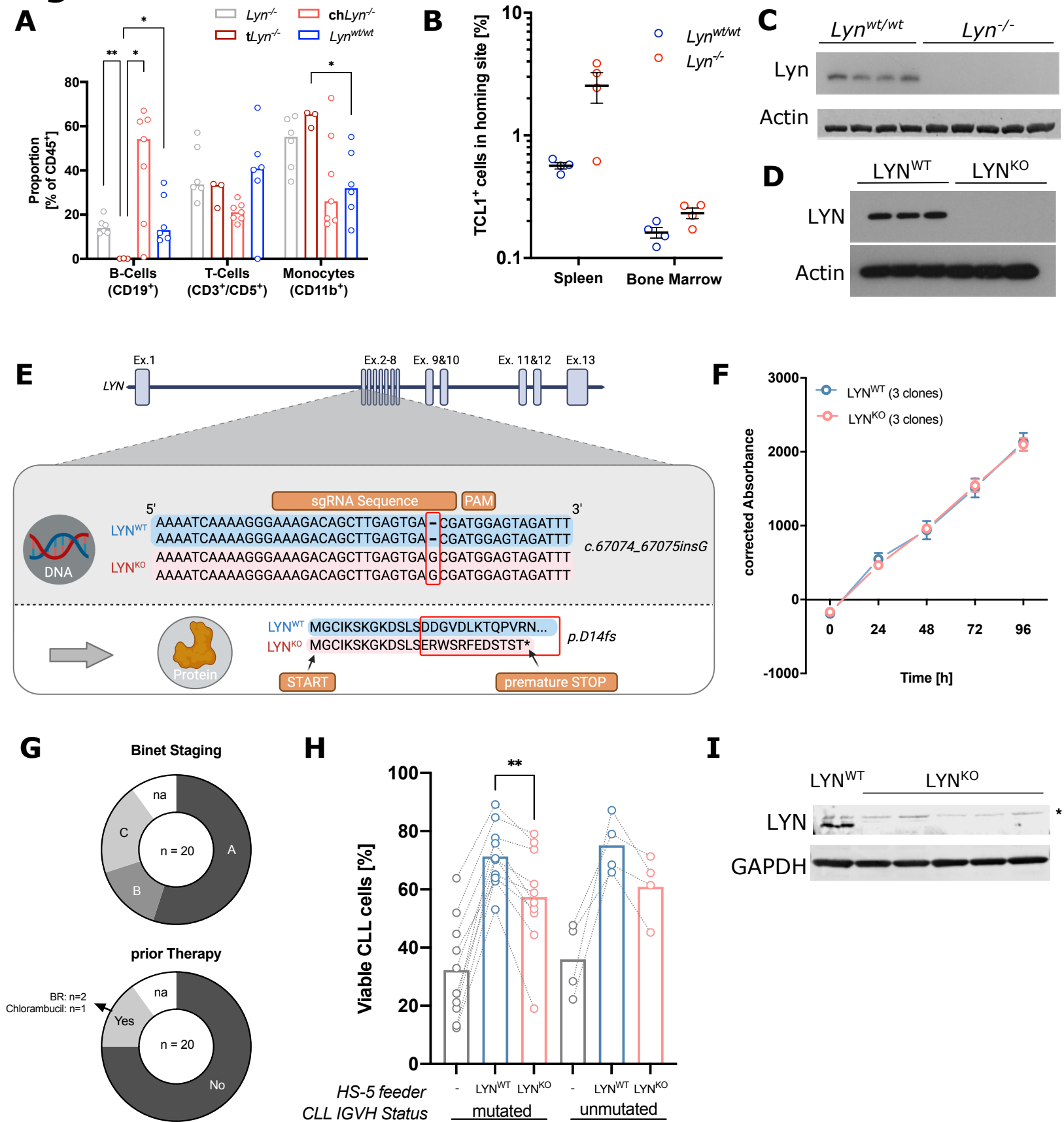
Fig. S1

Fig. S2**A**

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

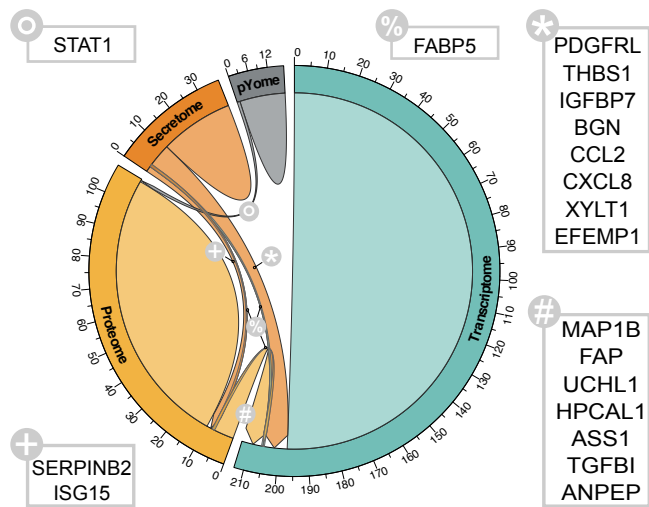
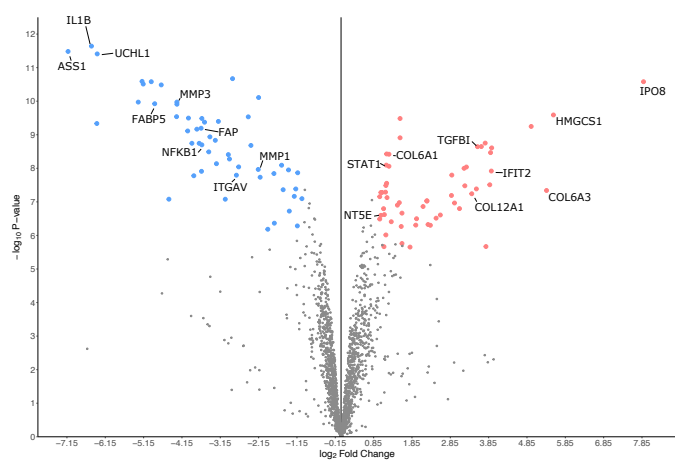
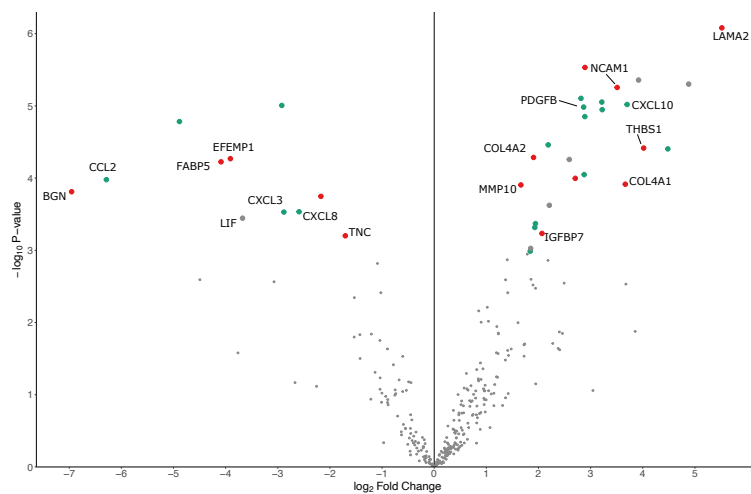
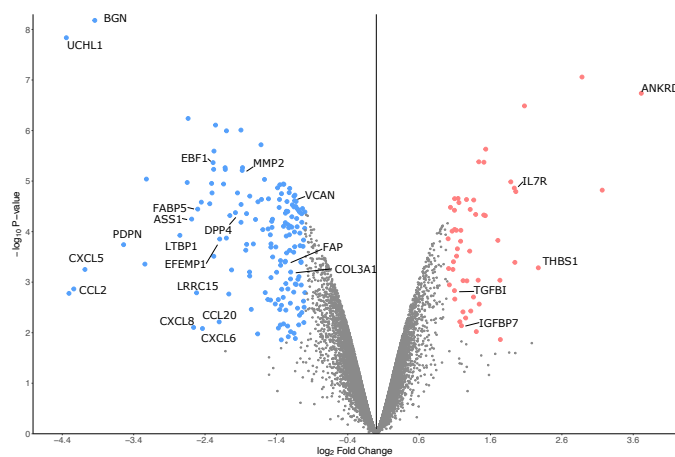
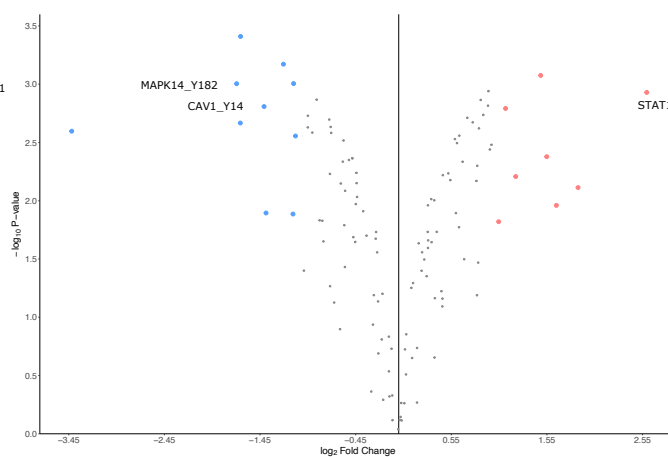
B**C****Proteome****D****Secretome****E****Transcriptome****F****pYome**

Fig. S3

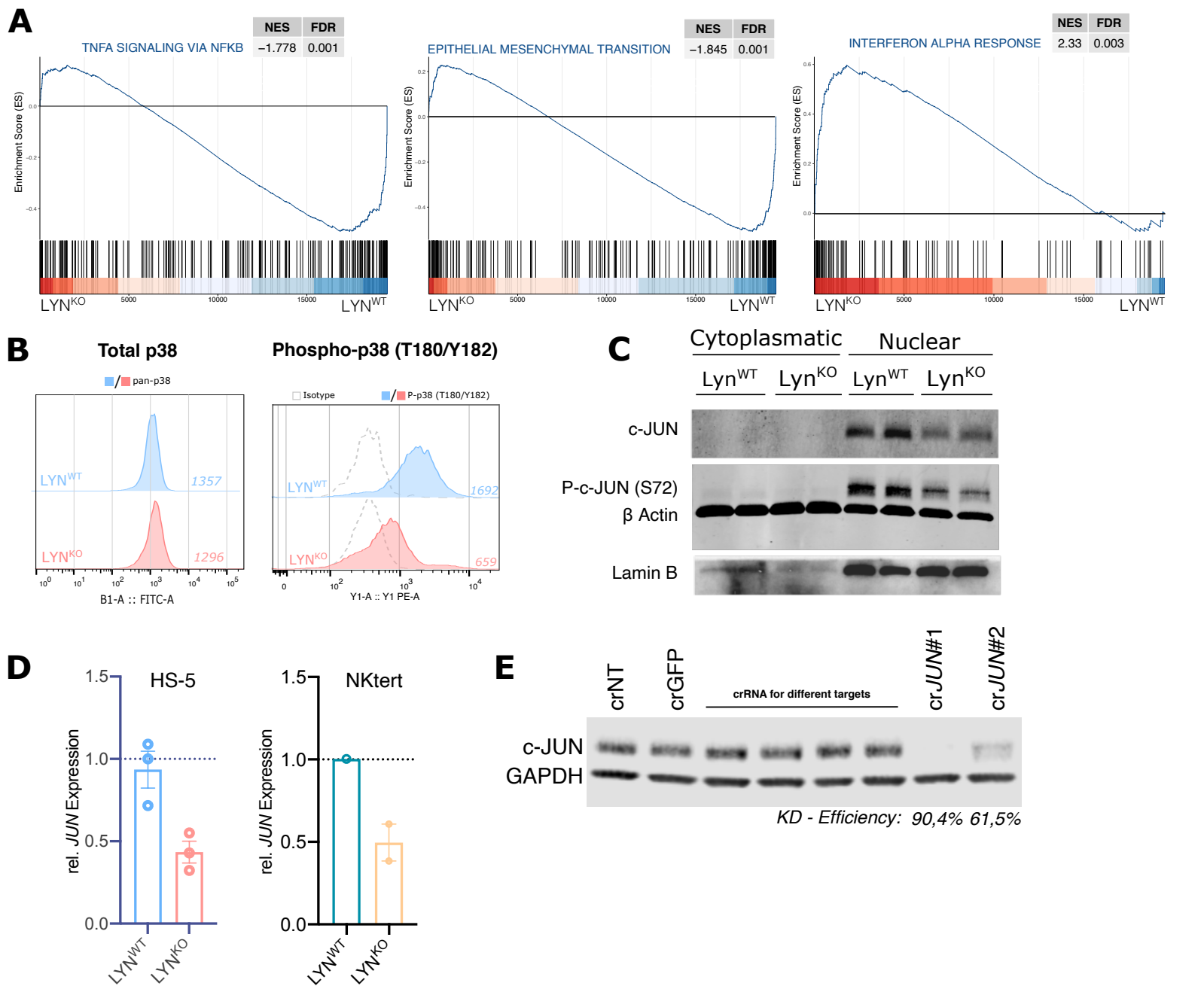


Fig. S4

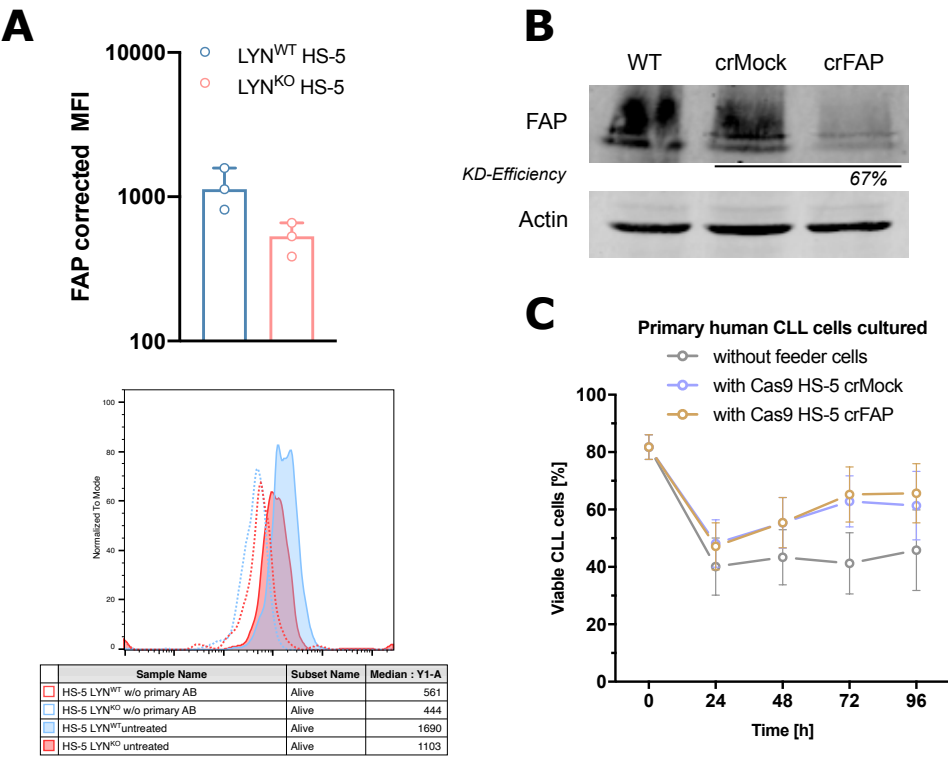
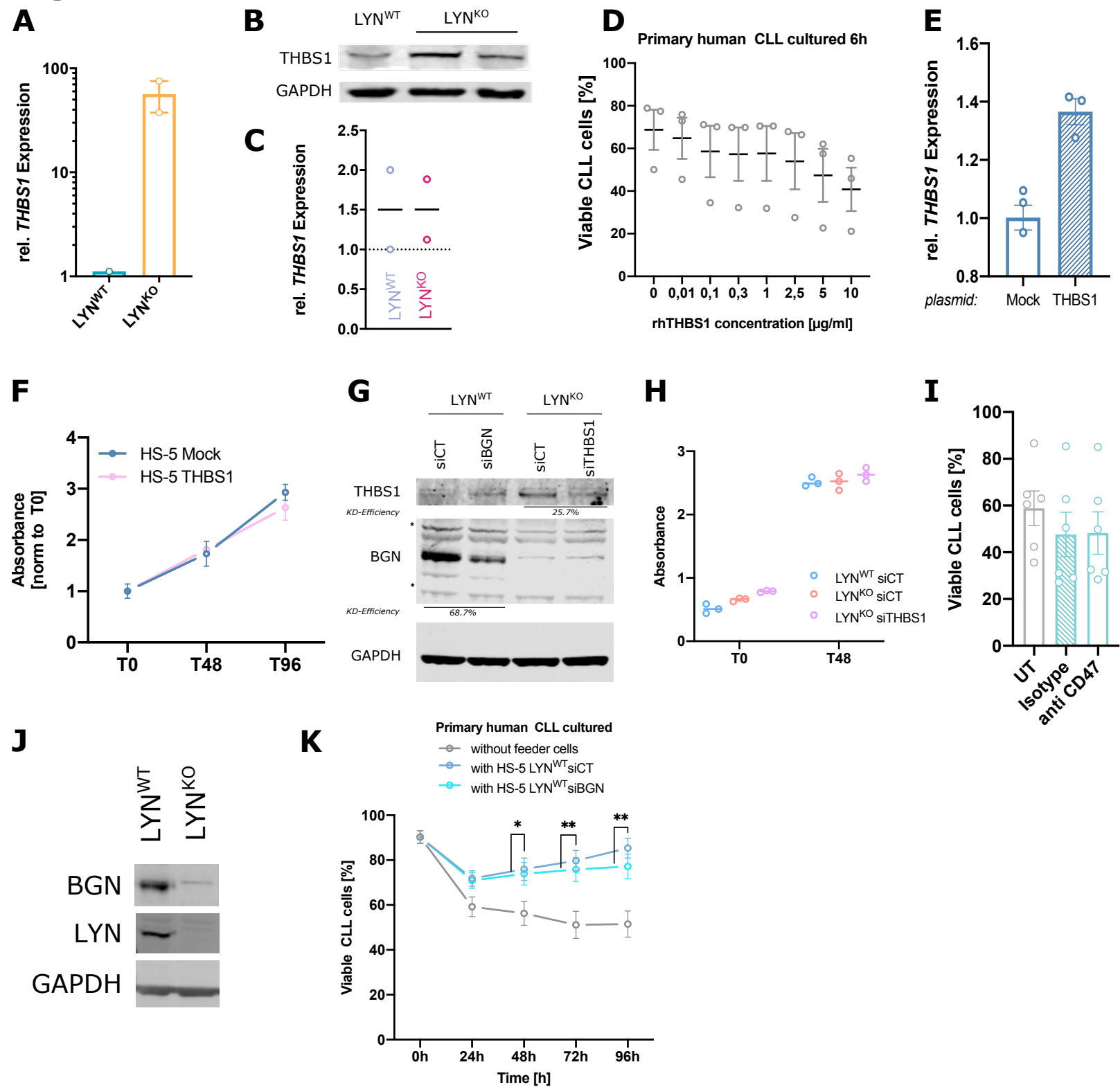


Fig. S5

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 verminderten 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 humaner 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 verminderten 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^{KO} 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^{KO} 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.

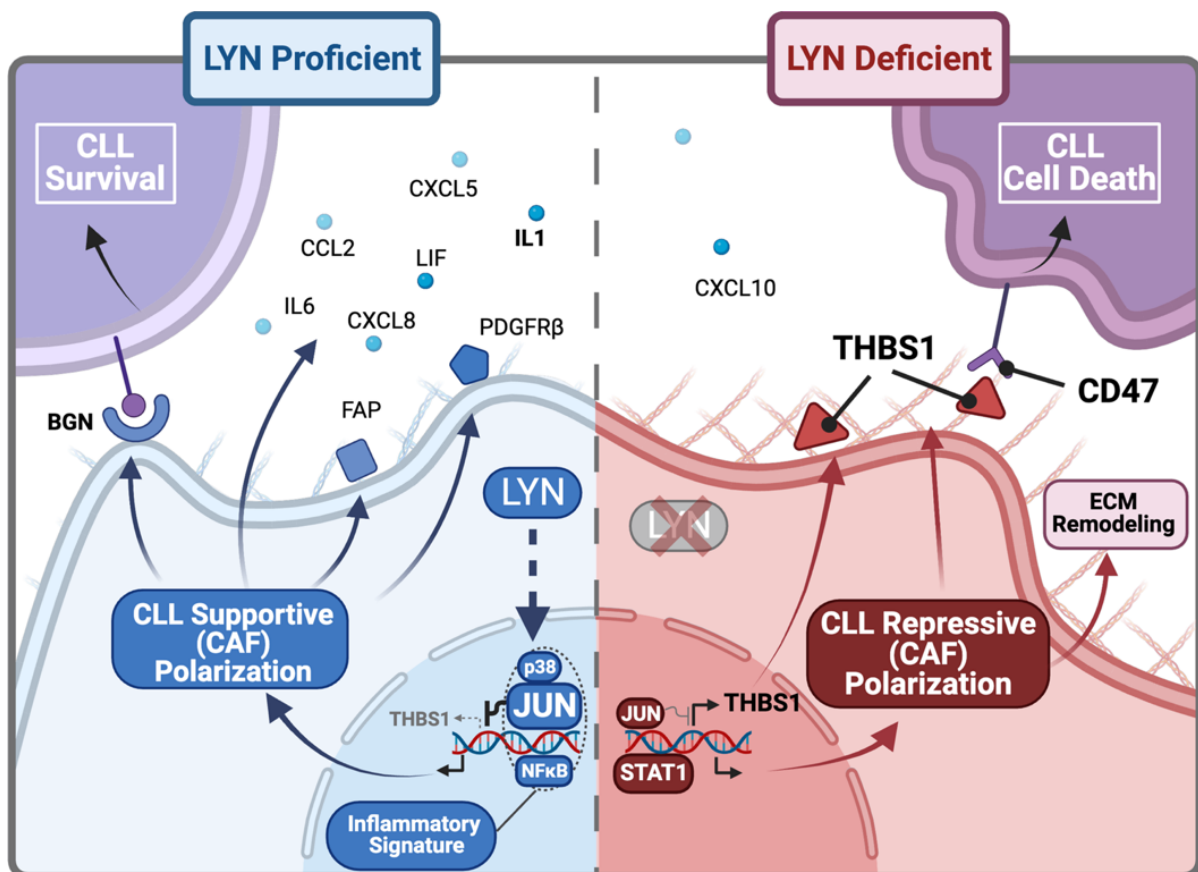


Abbildung 7: Zusammenfassung der LYN-vermittelten stromalen Repolarisation und veränderten CLL-Unterstützung.

Reproduziert aus vom Stein et al. 2023¹ 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 Eμ-TCL1 Modelles.^{164,210} 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^{-/-}“, 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^{-/-}, vergleiche Nguyen et al, 2016)²¹⁰. 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^{-/-}) 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 durchgeführten Experimente jedoch nicht möglich.

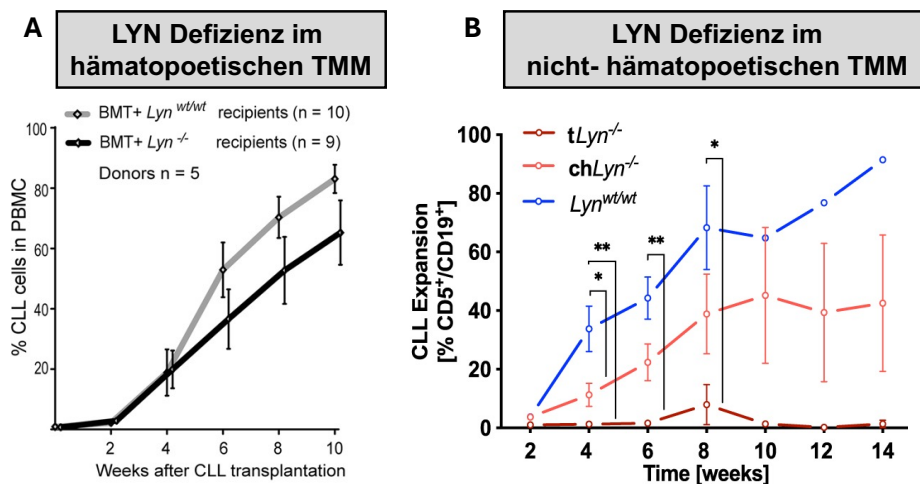


Abbildung 8: LYN-Defizienz in verschiedenen Kompartimenten des CLL-Mikromilieus im TCL1-Mausmodell.

Sowohl die chimäre LYN-Defizienz im hämatopoetischen Mikromilieu (**A**: BMT+Lyn^{-/-}) wie auch im nicht-hämatopoetischen Mikromilieu (**B**: chLyn^{-/-}) führt zu einem langsameren Anwachsen transplantierte TCL1⁺ Leukämie Zellen. A) Reproduziert und modifiziert nach Nguyen et al. 2016²¹⁰ mit Genehmigung von Elsevier. B) Reproduziert und modifiziert nach vom Stein et al. 2023¹ unter CC-Lizenz 4.0.

Diese Ergebnisse ähneln vorherigen Arbeiten, die andere Kinasen im CLL-Mikromilieu untersucht haben. Dort zeigte sich ein vermindertes Anwachsen von E μ -TCL1 leukämischen Zellen nach adaptivem Transfer in PI3K- oder PKC- β -defiziente Mäuse.^{94,215} Durch ein vergleichbares Transplantationsprotokoll wie in der vorliegenden Arbeit wurde nachfolgend die Bedeutung von PKC- β in hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen des TMM verglichen.⁶⁸ Es zeigte sich ein reduziertes Anwachsen der transplantierten TCL1-Leukämie-Zellen insbesondere in Mäusen, in denen das nicht-hämatopoetische TMM PKC- β defizient war. Somit scheinen Kinasen, insbesondere LYN und PKC- β , 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 μ -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.²¹⁶ 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 alloantigen Abstoßungsreaktionen beeinflusst sein.²¹⁰ Dabei könnte das LYN-defiziente Immunsystem das LYN-Antigen in den transplantierten TCL1-Zellen als fremd erkennen und eine Abstoßungsreaktion induzieren. In den Vorarbeiten zeigte die Gruppe um Prof. Seiffert jedoch auch, dass die Verwendung chimärer Mausmodelle nicht für diese Art der Abstoßungsreaktion anfällig sind.²¹⁶ 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 μ -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 NFκB“ und „INFLAMMATORY RESPONSE“ (*Figure 3f der Publikation*) sowie eine errechnete verminderte Aktivität inflammatorischer Regulatoren wie NFκB, IL-1 oder TNF (*Figure 7a der Publikation*). Diese reduzierte inflammatorische Aktivität resultierte in einer signifikanten Änderung Zytokin-assoziiierter GO-Terms sowie einer reduzierten Expression verschiedener Entzündungs-assoziiierter 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,^{174,175,180,217} 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.^{157,174,180,218} 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.^{174,180} Überraschenderweise zeigten sich diese proinflammatorischen Effekte in globalen *Lyn*^{-/-} Mäusen weniger stark ausgeprägt.¹⁸⁰ Aus dieser Beobachtung wurde bereits zuvor die Hypothese abgeleitet, dass Lyn-Defizienz in bestimmten, nicht-hämatopoetischen Zellen, die durch eine Lyn defiziente Hämatopoese ausgelöste Hyperinflammation begrenzen könnte.¹⁸⁰ 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 Zelltyp-spezifisch, 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-inflammatorischen 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^{fl/fl}*-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 Zelltyp-spezifische 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 NFκB Signalwegs, wurde im CLL-TMM bereits in verschiedenen Zelltypen gezeigt (zusammengefasst in:⁴⁵ 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.^{94,95,98} Dadurch werden inflammatorische Signalwege wie der NFκB- oder MAPK-Signalweg aktiviert, was neben metabolischen Anpassungen zu einem Leukämie-supportiven Phänotyp der Stromazellen führt.⁹⁷ Die durch Kontakt zu den Stromazellen vermittelte Therapieresistenz gegen Chemotherapie oder Venetoclax kann beispielsweise durch die Inhibition von PKC-β durchbrochen werden.⁶⁸ Dies zeigt die mögliche therapeutische Relevanz der Inhibition von stromaler Aktivierung, insbesondere in rezidierten, therapieresistenten 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 NFκB-Signalweg, dessen signifikant verminderte Aktivierung in den LYN^{KO} 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 NFκB- und AKT/MAPK-Signalwegen induzieren können, wobei sich ebenfalls eine verstärkte Phosphorylierung von LYN zeigte.⁹⁵

Somit scheint die Signalaktivität von LYN in Fibroblasten, nebst anderen Kinasen, zu einer Inflamationsreaktion beizusteuern, durch die die Stromazellen ihren Leukämie-supportiven Phänotyp erlangen. Wichtige nachgeschaltete Signalwege sind der NFκB und MAPK Signalweg, deren Relevanz sich übereinstimmend in verschiedenen Publikationen zeigt. Diese Kinasen und aktivierte Signalwege sind dadurch mögliche therapeutische Ziele für Mikromilieu-modulierende Therapien. Wie sich die Relevanz der verschiedenen Kinasen 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.^{45,66,95} Als Ausdruck einer reduzierten inflammatorischen Aktivität zeigen LYN^{KO}-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^{KO}-Fibroblasten ähnelt den bereits zuvor beschriebenen Veränderungen durch NFκB-Defizienz in Stromazellen, beispielsweise zeigte sich in beiden Untersuchungen eine verminderte IL-1 Sekretion (vergl.:⁹⁴ sowie *Figure 3b und 4b der Publikation*). Diese Überlappung der durch LYN- und NFκB-Defizienz ausgelösten Zytokin-Veränderungen unterstützt die Annahme einer durch LYN^{KO} reduzierten NFκB-Aktivität als beteiligter Mechanismus.

Die Sekretion inflammatorischer Zytokine ist auch ein wesentliches Merkmal von aktivierten Fibroblasten im CLL-TMM.^{45,95} 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.^{40,68,73,74} 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,⁷¹ VEGF,⁷² IL-15 oder metabolische Effekte zeigten.²¹⁹ 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.²²⁰ Unter Verwendung von NKtert-Zellen und aufgereinigten CLL-Zellen konnte der Effekt von konditioniertem Medium in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht reproduziert werden (*Figure 5b der Publikation*). Es zeigte sich zwar eine reduzierte Expression und Sekretion von CCL2 in LYN^{KO} 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.⁹⁰ 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 al²²⁰) 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^{KO} 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^{KO}-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^{KO}- im Vergleich zu LYN^{WT}-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).^{166,190} In einem murinen Modell chronischer Pankreatitis zeigte sich, dass Lyn-Inhibition die typische Entwicklung einer Fibrose signifikant reduzieren konnte,¹⁹¹ und in einem Modell einer toxischen Leberfibrose konnte ein gleichartiger pro-fibrotischer Lyn-Effekt gezeigt werden.²²¹ 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.¹⁶⁷

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 epitheliale-mesenchymale 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.^{184,185,189} In den Brustkrebszellen ist mechanistisch eine Phosphorylierung und dadurch Freisetzung des EMT-Transkriptionsfaktor TWIST, einem Haupt-Mediator des TGF- β -Signalweges, durch LYN beschrieben.¹⁸⁹ Außerdem reguliert LYN die Aktivität des funktionell vergleichbaren EMT-Transkriptionsfaktors Snail.²²²

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^{KO} HS-5 Fibroblasten (*Figure 3f der Publikation*).

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

Neben dem TGF- β 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.^{175,178,179} Mechanistisch ist dies durch eine reduzierte Aktivität der SHP-1 Phosphatase als Folge einer verminderten Phosphorylierung der ITIM von SIRP1- α durch LYN erklärt worden.¹⁷⁸ LYN^{KO} HS-5 Zellen zeigten ebenfalls eine verstärkte Adhäsion, sodass beispielsweise primäre CLL-Zellen signifikant mehr an LYN^{KO} HS-5 Zellen im Vergleich zu LYN^{WT} HS-5 Zellen anhafteten (*Figure 5d der Publikation*), und auch in der allgemeinen Handhabung fiel eine verstärkte Adhäsion der LYN^{KO} 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^{KO} 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,^{45,64,68,69} 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^{KO} 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,²²⁶ während die Aktivierung des EZM-Rezeptors CD44 oder von Integrinen auf leukämischen Zellen eine anti-apoptotische und somit leukämie-unterstützende Funktion vermitteln.^{227,228} Grundsätzlich spielt die extrazelluläre Matrix im TMM hämatologischer und lymphoider Neoplasien eine wichtige Rolle und ist an der Bildung verschiedener Tumorökosysteme beteiligt.^{140–142,229} 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^{KO} 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 der 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.^{230–232} Während die Stimulierung einer hepatozellulären Karzinom-Zelllinie mit Phorbol-12-myristat 13-acetat (PMA) durch Induktion von AP-1 die Expression von THBS-1 induzierte,²³¹ bewirkte die gleiche Stimulation an endothelialen Zellen eine Reduktion der THBS-1 Expression.²³² 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^{KO} 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.^{233–235} Auf molekularem Level scheinen eine Immobilisation des CD47-Rezeptors, Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts sowie die Deregulation des intrazellulären Ca^{2+} -Signals und Aktivierung von PKA und PLC γ an der Apoptose beteiligt zu sein.^{233,235} Die Induktion des Zelltodes scheint spezifisch für B-CLL und T-ALL zu sein,²³⁶ und die Verwendung entsprechender THBS-1-ähnlicher Peptide zeigte keine Wirkung auf gesunde Leukozyten.^{233,235} 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.^{233,235} In klinischen Studien ist die CD47-Achse darüber hinaus insbesondere aufgrund der „Don't eat me“ Checkpoint Funktion durch Interaktion mit SIRP- α auf Makrophagen Gegenstand aktueller Forschung. Dabei zeigte sich, dass auch ein Teil der hierzu genutzten anti-CD47 Antikörper den CLL-Zelltod induzieren können.²³⁷ 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,²¹⁰ 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.^{207,208,238} 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- β 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.³³

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.³³ 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-assoziiierter 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 humaner 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- β 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 NF κ B- und MAPK-Signalwege zu sein scheinen. Da diese Signalwege auch eine Funktion in der Aktivierung von iKAF spielen,²³⁹ 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- β -Signalweges. In Abschnitt 4.3. wurden bereits die LYN-abhängigen Veränderungen matrizellulärer Signalwege und insbesondere des TGF- β Signalweges in den LYN^{KO} 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*).¹⁰⁷

Interessanterweise resultierte in anderen Arbeiten die Inhibition des TGF- β -Signalweg in primären KAF in einer Repolarisierung von Fibroblasten zu einem Phänotyp mit gesteigerter Interferon-Signatur.¹²⁴ 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,²⁴⁰ 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.).¹¹⁹ Da Versuche der Depletion von KAF im TMM ernüchternde Ergebnisse zeigten,^{120,121} 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*.^{118,124} 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, Stadtmayer 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 α . *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, Contremoulins 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 μ -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 Krishnamurty 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- κ 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- β 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- κ 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, Ummanni 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- κ 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 α 4 β 1 but not β 2 α 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 pseudoemperipolesis 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- β -dependent activation of NF- κ 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- β -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 β 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- α 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 β 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.ccell.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 β -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- β 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 Roeder 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.ccell.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.ccell.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.* Fcgamma 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 Lerosey 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 Kinase Accentuating 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 γ 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, Heinzlmeir 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 γ 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, Fedorchenko 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 μ -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 δ 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 μ -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.aao3829.
- 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 Krishnamurthy 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- β 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 γ 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 Pramit 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 μ -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
---	----