



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

TESI DOCTORAL:

**“Paper de la via de senyalització del receptor de
cèl·lules B (BCR) en la interacció entre les cèl·lules de
leucèmia limfàtica crònica i el microambient tumoral”**

Tesi presentada per

Júlia Carabia Juberó

per optar al grau de

Doctor en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina

Directors

Dr Francesc Bosch Albareda

Dra Marta Crespo Maull

Tutor

Dr Joan Seoane Suárez

Barcelona, 2018

Al meu pare i a la meva mare

A les meves germanes

Al Raúl

RESUM

La leucèmia limfàtica crònica (LLC) és la leucèmia més freqüent en adults als països occidentals. El curs clínic de la malaltia és extremadament variable i la supervivència dels pacients oscil·la entre pocs mesos i vàries dècades. Aquesta neoplasia es caracteritza per la proliferació i l'acumulació progressiva de limfòcits B madurs i clonals amb un immunofenotip característic (CD5+, CD19+, CD20 dèbil, CD23+, Ig superfície dèbil) en sang perifèrica, medul·la òssia, ganglis limfàtics i melsa. Concretament és als ganglis limfàtics i a la medul·la òssia on les cèl·lules de LLC es troben amb un microambient favorable que afavoreix la seva supervivència, proliferació i quimioresistència. Una de les principals molècules involucrades en la interacció entre les cèl·lules de LLC i les cèl·lules accessòries del microambient és el BCR.

La proteïna Syk, una tirosina quinasa fosforilada immediatament després de l'activació del BCR, és essencial per la senyalització d'aquest receptor i per tant és una excel·lent diana terapèutica. En base a aquest context, el primer estudi es centra en l'estudi de l'eficàcia de la TAK-659, un nou inhibidor altament específic de Syk. Els resultats mostren que la TAK-659 és capaç de suprimir eficaçment la inducció de la supervivència, proliferació i migració de les cèl·lules de LLC per part del microambient contribuint així en el desenvolupament clínic d'aquesta teràpia en pacients amb LLC.

ZAP-70 és una tirosina quinasa homologa a Syk. La seva expressió en LLC està associada amb un increment de la capacitat de senyalització del BCR així com amb un increment de resposta als estímuls del microambient. A més, és un factor de mal pronòstic molt ben definit en la LLC. El microRNA-21 (miR-21), es troba sobreexpressat en mostres procedents de ganglis limfàtics de pacients amb LLC i es relaciona amb la resistència a la fludarabina, una menor supervivència global i una major probabilitat de progressió. Per això el segon estudi es basa en l'estudi del possible paper de ZAP-70 en la regulació del miR-21 i la possible influència del microambient. Els resultats mostren que el microambient tumoral és capaç de regular l'expressió del miR-21 i dels seus gens diana (PTEN, PIAS3 i PDCD4) a través de la via de senyalització que involucra les proteïnes ZAP-70 i MAPK i el factor de transcripció STAT3.

SUMMARY

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia found in adults in Western countries. The clinical course is heterogeneous and survival can vary from months to decades. This neoplasm is characterized by the proliferation and progressive accumulation of monoclonal mature B lymphocytes with a typical immunophenotype (CD5+, CD19+, CD20 low, CD23+, surface Ig low) in peripheral blood, bone marrow, lymph nodes and spleen. Microenvironment found in bone marrow and lymph nodes supports survival, proliferation and drug resistance. One of the key players involved in the crosstalk between CLL cells and the microenvironment is the BCR.

Syk protein, a tyrosine kinase immediately phosphorylated after BCR activation which is essential for this signaling pathway, is therefore a rational candidate for targeted therapy in CLL. Against this background, in the first study we tested the efficacy of the highly specific Syk inhibitor TAK-659. The results showed that TAK-659 is able to efficiently suppress the pro-survival, proliferative and chemoresistant effects promoted by the microenvironment providing a strong rationale for the clinical development of TAK-659 in CLL.

Expression of ZAP-70 in CLL is related to enhanced response to BCR stimulation, as well as to increased response to microenvironment stimuli. Moreover, high expression of ZAP-70 is associated with an adverse prognosis in CLL. MicroRNA-21 (miR-21) is overexpressed in lymph nodes from patients with CLL compared to peripheral blood and it is associated to refractoriness to fludarabine, shorter overall survival and higher probability of progression. The aim of the second study was to study the ZAP-70 involvement in miR-21 regulation and how it would be influenced by the microenvironment. The results showed that stimuli from the microenvironment regulate the expression of miR-21 and the tumor suppressor genes (PTEN, PDCD4 and PIAS3) via a signaling pathway involving ZAP-70, MAPK and STAT3 transcription factor.

ÍNDEXS

ÍNDEX

I. INTRODUCCIÓ	1
1. Hematopoesi i desenvolupament dels limfòcits B	1
1.1. Origen dels limfòcits B.....	1
1.2. Desenvolupament i maduració dels limfòcits B.....	1
2. Leucèmia limfàtica crònica	9
2.1. Generalitats	9
2.1.1. Definició.....	9
2.1.2. Incidència i prevalença	9
2.1.3. Curs clínic.....	9
2.2. Diagnòstic	10
2.2.1. Criteri diagnòstic.....	10
2.2.2. Presentació clínica.....	10
2.2.3. Morfologia.....	11
2.2.4. Immunofenotip.....	12
2.3. Pronòstic	12
2.3.1. Estat mutacional de les Ig.....	14
2.3.2. Expressió de ZAP-70.....	16
2.3.3. Expressió de CD38.....	17
2.3.4. Anomalies cromosòmiques amb valor pronòstic.....	18
2.3.5. Mutacions somàtiques amb valor pronòstic.....	21
2.4. Característiques biològiques i genètiques de la LLC	23
2.4.1. Origen de la cèl·lula de LLC.....	23
2.4.2. Anomalies cromosòmiques.....	26
2.4.3. Mutacions somàtiques	28
2.4.4. microRNAs.....	32
2.4.4.1. Biogènesi i funció dels microRNAs.....	32
2.4.4.2. MicroRNAs en LLC.....	34

2.4.4.3. MicroRNA miR-21.....	36
2.4.5. Microambient.....	37
2.4.5.1. Compartiments del microambient.....	38
2.4.5.2. Interaccions de les cèl·lules de LLC amb els components cel·lulars del microambient.....	39
2.4.6. Receptor de les cèl·lules B (BCR)	46
2.4.6.1. Senyalització del BCR.....	47
2.4.6.2. La proteïna Syk.....	49
2.4.6.3. La proteïna ZAP70.....	51
2.5. Tractament.....	56
2.5.1. Visió panoràmica del tractament de la LLC.....	56
2.5.2. Inhibidors del BCR.....	57
2.5.2.1. Inhibidors de Syk.....	58
2.5.2.2. Inhibidors de PI3K.....	59
2.5.2.3. Inhibidors de BTK.....	61
2.5.3. Antagonistes de BCL-2.....	64
2.5.3.1. Venetoclax.....	65
2.5.4. Anticossos monoclonals anti CD20.....	65
2.5.4.1. Obinutuzumab.....	66
2.5.5. Trasplantament de progenitors hematopoiètics.....	67
 II. HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	 71
 III. RESULTATS.....	 77
 IV. DISCUSSIÓ.....	 111
 V. CONCLUSIONS.....	 122
 VI. BIBLIOGRAFIA.....	 127

ÍNDEX DE FIGURES I TAULES

Figura 1	Esquema de l'estructura molecular d'una Ig.....	2
Figura 2	Representació esquemàtica de la recombinació i de l'expressió dels gens de les cadenes pesades i de la cadenes lleugeres de les Ig.....	5
Figura 3	Representació de l'estructura del centre germinal.....	8
Figura 4	Supervivència global dels pacients amb LLC en funció de l'estat mutacional dels gens de les IGHV.....	15
Figura 5	Supervivència global dels pacients amb LLC en funció de l'expressió de ZAP-70.....	16
Figura 6	Supervivència global dels pacients amb LLC en funció de l'expressió de CD38.....	18
Figura 7	Supervivència global dels pacients amb LLC en funció de les anomalies cromosòmiques.....	21
Figura 8	Respresentació esquemàtica de l'origen de la cèl·lula de LLC....	25
Figura 9	Components del microambient tumoral i principals interaccions moleculara amb la cèl·lula de LLC.....	45
Figura 10	Esquema de la senyalització intracel·lular derivada de l'activació del BCR en els limfòcits B.....	49
Figura 11	Estructura molecular de SYK.....	50
Figura 12	Estructura molecular de ZAP-70.....	53
Figura 13	Esquema del tractament recomanat pels pacients amb LLC....	68
Taula 1	Sistema d'estadiatge de Rai.....	13
Taula 2	Sistema d'estadiatge de Binet.....	13

ABREVIATURES

AID *Activation-induced deaminase*

Akt *Protein kinase B*

allo HSCT *Allogeneic stem cell transplantation*

APRIL *Proliferation-inducing ligand*

ATM *Ataxia-telangiectasia mutated*

BAFF *B-cell activating factor*

BAFF-R *BAFF-receptor*

BCAP *B-cell adaptor for phosphoinositide 3-kinase*

BCL2 *B-cell CLL/lymphoma 2*

BCL6 *B-cell lymphoma 6 protein*

BCMA *B cell maturation antigen*

BCR *B cell receptor*

BIRC3 *Baculoviral IAP repeat-containing protein 3*

BLNK *B cell linker protein*

BMSC *Bone marrow stromal cells*

BR *Bendamustina i rituximab*

Btk *Bruton's tyrosine kinase*

CBL *Casitas B-lineage lymphoma*

CDR *Complementarity determining regions*

CD40L *CD40 ligand*

Cèl·lules NK *Cèl·lules natural killer*

DAG *Diacylglycerol*

DGCR8 *DiGeorge syndrome critical region in gene 8*

DLEU2 *Deleted in lymphocytic leukemia 2*

DNA *Deoxyribonucleic acid*

EBF *Early B cell factor*

ETAR *Endothelin subtype A receptor*

E2A *Immunoglobulin enhancer building factors E2/E47*

FC *Fludarabina i ciclofosfamida*

FCR *Fludarabina, ciclofosfamida i rituximab*

FISH *Fluorescent in situ hybridization*

FLA-1 *Lymphocyte function-associated antigen 1*
Flt3-L *Fms-like tyrosine kinase 3 ligand*
G-B *Obinutuzumab i bendamustina*
G-FC *Obinutuzumab, fludarabina i ciclofosfamida*
GFP *Green fluorescent protein*
HSC *Hematopoietic stem cell*
ICAM-1 *Intercellular adhesion molecule 1*
IFN- γ *Interferon gamma*
Ig *Immunoglobulina*
IGHV *Immunoglobulin heavy chain variable*
IL *Interleuquina*
IP3 *Inositol triphosphate*
ITAM *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*
Itk *Interleukin-2 inducible kinase*
IWCLL *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*
JAK/STAT *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*
JNK *C-Jun N-terminal kinases*
LLC *Leucèmia limfàtica crònica*
MAPK *Mitogen-activated protein kinases*
MBL *Monoclonal B lymphocytosis*
MCL1 *Myeloid cell leukemia 1*
MDR *Minimal deleted region*
miRNAs *Micro-ribonucleic acid*
MSCs *Mesenchymal stromal cells*
mTOR *Mammalian target of rapamycin*
NF- $\kappa\beta$ *Nuclear factor kappa beta*
NLCs *Nurse-like cells*
LAT *Linker of activated T cells*
Lck *Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*
Lyn *Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase*
LT β R *Lymphotoxin beta receptor*
Pax-5 *Paired box gene 5*
PDCD4 *Programmed cell death protein 4*
PDGF *Platelet-derived growth factor*

PD1 *Programmed cell death protein 1*

PIAS3 *Protein inhibitor of activated STAT 3*

PIP2 *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*

PIP3 *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*

PI3K *Phosphoinositide 3-kinase*

PKC β II *Protein kinase C beta II*

PLCy2 *Phospholipase C gamma 2*

PRKRA *Protein-kinase, interferon-inducible double-stranded RNA-dependent activator*

PTEN *Phosphatase and tensin homolog*

qRT-PCR *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*

RAG1/2 *Recombination activating gene*

RB1 *Retinoblastoma susceptibility gene*

RISC *RNA-induced silencing complex*

RNA *Ribonucleic acid*

SH2 *Src homology 2*

SLP-76 *SH2 domain-containing leukocyte protein of 76KDa*

Syk *Spleen tyrosine kinase*

TAC1 *Transmembrane activator and CAML interactor*

TCR *T-cell receptor*

TdT *Terminal deoxynucleotidyl transferase)*

TLR *Toll-like receptors*

TNF α *Tumor necrosis factor alpha*

TRBP *Trans-activation response RNA-binding protein*

VCAM1 *Vascular cell adhesion molecule 1*

VEGF *Vascular endothelial growth factor*

VLA-4 *Very late antigen-4*

ZAP-70 *Zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70*

I. INTRODUCCIÓ

1. Hematopoesi i desenvolupament dels limfòcits B

1.1. Origen dels limfòcits B

Les cèl·lules sanguínies, s'originen a partir de les cèl·lules mare hematopoètiques o HSC (de l'anglès *hematopoietic stem cell*) que es troben al fetge durant la vida fetal i a la medul·la òssia durant la vida adulta. A la medul·la òssia, les HSC resideixen en nínxols (zones amb un microambient altament regulat) on interaccionen amb altres tipus cel·lulars, majoritàriament cèl·lules estromals o BMSC (de l'anglès *bone marrow stromal cells*), cèl·lules endotelials, osteoblasts i macròfags. La quimiocina CXCL12, secretada per les BMSC i les cèl·lules endotelials, és l'encarregada de regular aquestes interaccions i promoure el manteniment de les HSC(1).

El desenvolupament del llinatge limfoide depèn principalment de la interleuquina 7 (IL-7)(2) produïda per les BMSC i les cèl·lules estromals del tim. Aquesta interleuquina estimula la diferenciació de les HSC a progenitor limfoide comú i promou la supervivència i expansió d'aquests progenitors, els quals donaran lloc als limfòcits B, limfòcits T, cèl·lules NK (de l'anglès *natural killer*) i cèl·lules dendrítiques plasmocitoides(3). Concretament, la diferenciació cap a limfòcits del tipus B, està regulada per diferents senyals, com són la ja esmentada IL-7, la qual té un paper fonamental per mantenir el potencial de diferenciació cap a limfòcit B, el lligand Flt3-L (de l'anglès *Fms-like tyrosine kinase 3 ligand*) i varis factors de transcripció, com per exemple E2A (de l'anglès *immunoglobulin enhancer building factors E2/E47*), EBF (de l'anglès *early B cell factor*) i Pax-5 (de l'anglès *paired box gene 5*)(4).

1.2. Desenvolupament i maduració dels limfòcits B

El procés de diferenciació i desenvolupament des de les HSC originals fins al limfòcit B madur es pot dividir en varies etapes, segons el fenotip, l'estat del reordenament dels gens de les cadenes pesades i de les cadenes lleugeres kappa i lambda de les immunoglobulines (Ig) i les propietats funcionals que van adquirint els limfòcits B de manera progressiva. A més a més, durant el seu desenvolupament els limfòcits B passen una sèrie de punts de control que

INTRODUCCIÓ

permeten la identificació dels limfòcits B que expressen Ig de membrana funcionals i que poden continuar madurant (selecció positiva) o bé l'eliminació de limfòcits B autorreactius (selecció negativa)(5).

Les Ig son heterodímers formats per dues cadenes pesades idèntiques i dues cadenes lleugeres també idèntiques unides entre si de manera covalent per ponts disulfur. Tant les cadenes pesades com les lleugeres, estan formades per una regió constant i per una regió variable. La regió constant de la cadena pesada es troba ancorada a la membrana plasmàtica dels limfòcits B i interactua amb altres molècules, regulant les funcions efectores de les Ig. En canvi la regió variable participa en el reconeixement de l'antigen. Concretament l'antigen interacciona directament amb les regions CDR 1, 2 i 3 (de l'anglès *complementarity determining regions*) situades als extrems amino terminal de les regions variables de la cadena pesada i lleugera.

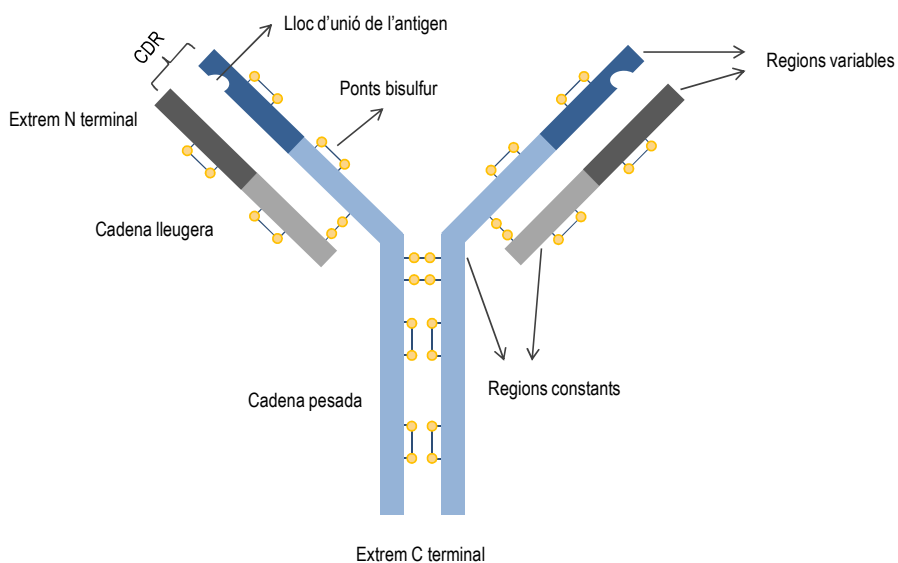


Figura 1. Esquema de l'estructura molecular d'una immunoglobulina (Ig)

Les Ig estan formades per dues cadenes lleugeres idèntiques i dues cadenes pesades també idèntiques, unides entre si per ponts disulfur. Cada cadena té una regió constant, situada a l'extrem C-terminal i una regió variable, situada a l'extrem N-terminal, on hi ha les regions CDR que son les que interaccionen directament amb l'antigen. Elaboració pròpia

INTRODUCCIÓ

El *locus* de la regió variable de la cadena lleugera esta format per varis segments gènics, el segment V (de l'anglès *variability*) i el segment J (de l'anglès *joining*). El *locus* de la regió variable de la cadena pesada conté també el segment D (de l'anglès *diversity*). Referent al *locus* de la regió constant, la cadena pesada conté els gens (C) col·locats en tàndem, que codificaran per les regions constants dels diferents isotips de les Ig (C_{μ} , C_{δ} , C_{γ} , C_{α} i C_{ϵ}), sent el gen C_{μ} , el que es troba a continuació del segment J, en direcció 3'. Pel que fa a les cadenes lleugeres kappa i lambda, tenen cadascuna un únic gen C (C_{κ} i C_{λ} respectivament) (6).

La primera cèl·lula compromesa en el llinatge dels limfòcits B és el limfòcit pro-B, que no expressa Ig de membrana, però sí que té marcadors de superfície típics dels limfòcits B, com són el CD19 i el CD10. Tant el progenitor limfoide dels limfòcits B com el limfòcit pro-B, tenen els *locus* dels gens de les Ig en configuració germinal. En aquesta etapa del desenvolupament, es produeix la primera recombinació dels gens de les Ig, que té lloc al *locus* de la regió variable de la cadena pesada, que uneix entre si un segment del gen D amb un segment del gen J, eliminant el DNA (de l'anglès *deoxyribonucleic acid*) intermedi no codificant. Seguidament, ja a la fase final del limfòcit pro-B, un dels gens del segment V s'uneix a la unitat DJ, donant lloc al gen VDJ reorganitzat. Aquest procés, està regulat per l'enzim TdT (de l'anglès *terminal deoxynucleotidyl transferase*) i el complex proteic RAG1/2 (de l'anglès *recombination activating gene 1/2*). Si aquest reordenament de la regió variable de la cadena pesada és productiu, es genera un transcrit primari que inclou el gen VDJ i el gen C_{μ} de la regió constant. El processament del RNA (de l'anglès *ribonucleic acid*) permet l'eliminació del DNA no codificant situat entre el gen VDJ i el gen C_{μ} , gràcies a l'adició de cues poli-adenina que indiquen el punt d'escisió. Finalment, la traducció del RNA missatger podrà codificar per la proteïna Ig_{μ} , que s'expressarà en superfície i la cèl·lula resultant serà un limfòcit pre-B(7).

Els limfòcits pre-B són cèl·lules que expressen en superfície la cadena Ig_{μ} però que encara no han reorganitzat el *locus* de la regió variable de la cadena lleugera. Degut a això, la cadena pesada μ està associada amb una cadena lleugera substituïda, homòloga estructuralment a les cadenes lleugeres kappa i lambda. El complex format per la cadena pesada μ , la cadena lleugera

INTRODUCCIÓ

substituta i les proteïnes transductores de senyals Ig α (CD79A) i Ig β (CD79B), donen lloc al pre-BCR (de l'anglès *pre-B cell receptor*). Aquest pre-receptor és l'encarregat de dirigir la transició del limfòcit pro-B al limfòcit pre-B i produeix les senyals necessàries per la maduració i expansió dels limfòcits B. La senyalització del pre-BCR regula la reorganització posterior dels gens de les Ig a partir de dos mecanismes; en primer lloc, el pre-BCR format després de la reorganització del *locus* de la cadena pesada d'un cromosoma, envia senyals per inhibir de manera irreversible la reorganització del *locus* de l'altre cromosoma, aquest fenomen s'anomena "exclusió al·lèlica" i garanteix que tots els limfòcits B expressin un únic receptor, mantenint així l'especificitat clonal(8). Sovint, cap dels al·lèls experimenten una recombinació productiva del gen de la cadena pesada, fet que provoca que no es pugui formar el pre-BCR, per tant no s'emetran senyals de supervivència i la cèl·lula morirà per apoptosi. D'aquesta manera el pre-BCR permet que només els limfòcits pre-B amb reordenacions productives de la cadena pesada puguin sobreviure i proliferar(9).

En segon lloc, després d'aquesta fase de proliferació en que els limfòcits pre-B pateixen entre dues i cinc divisions cel·lulars, el pre-BCR promou la recombinació dels *locus* de les regions variables de les cadenes lleugeres kappa i lambda(10). Com s'ha comentat anteriorment, aquests *locus* només tenen els segments V i J. El procés de recombinació uneix els segments V-J formant un gen VJ que està separat de la regió C per DNA no codificant. El processament del transcrit primari del RNA elimina aquest DNA no codificant i genera un RNA missatger que donarà lloc a la proteïna kappa o lambda. El primer *locus* que es reorganitza és el kappa. La producció de cadenes lleugeres kappa inhibeix la reorganització del *locus* lambda, per tant aquest últim només es reorganitzarà quan no es pugui produir una cadena kappa. Aquest fenomen, anomenat "exclusió d'isotip de la cadena lleugera" assegura que cada clon de limfòcits B només pugui produir un sol tipus de cadena lleugera. Si cap reorganització de les dues cadenes lleugeres és funcional, el limfòcit B en desenvolupament morirà per apoptosi(11).

INTRODUCCIÓ

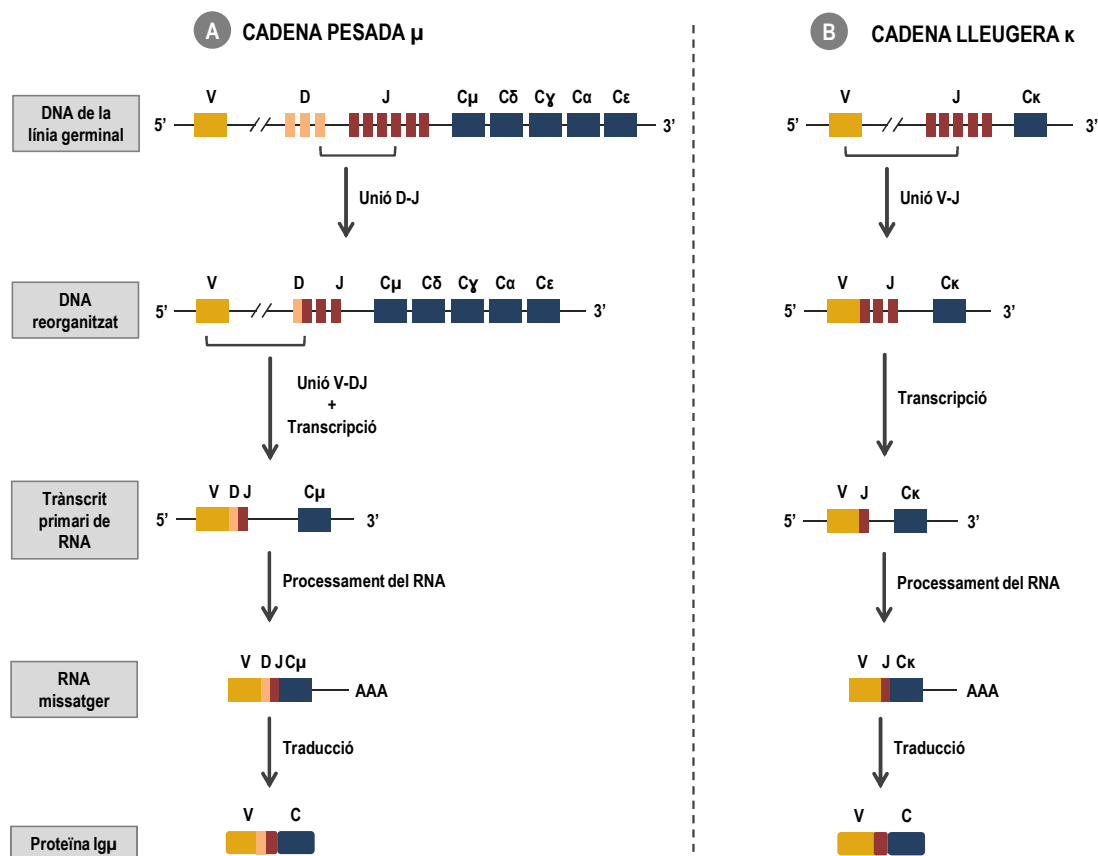


Figura 2. Representació esquemàtica de la recombinació i expressió dels gens de les cadenes pesades i de la cadenes lleugeres de les Ig. Es mostra la seqüència dels fenòmens de recombinació del DNA i de l'expressió gènica de la cadena pesada μ (A) i de la cadena lleugera κ (B). Elaboració pròpia.

La cadena lleugera generada s'expressa conjuntament amb la cadena μ sintetitzada prèviament, donant lloc a una nova IgM funcional que s'associa de manera no covalent amb dos heterodímers formats per les proteïnes Ig α i Ig β unides entre si per ponts disulfur. Aquest conjunt donarà lloc al complex del BCR (de l'anglès *B cell receptor*) que es troba a la superfície dels limfòcits B immadurs. L'IgM és l'encarregada del reconeixement antigènic mentre que l'heterodímer Ig α /Ig β s'encarrega de la transducció de la senyal.

Els limfòcits B immadurs no proliferen i es diferencien en resposta als antígens. De fet, els limfòcits B immadurs que són específics contra autoantígens presents a la medulla òssia, patiran l'edició del receptor, la mort cel·lular o l'absència de resposta funcional. Quan un limfòcit B immadur

INTRODUCCIÓ

reconeix un autoantigen amb alta afinitat, es produeix l'edició del receptor. Aquest procés permet el reordenament secundari de les cadenes lleugeres o també el de les cadenes pesades però de manera menys freqüent, gràcies a la reactivació dels gens Rag(12). En el cas que l'edició del receptor no sigui satisfactòria, els limfòcits B immadurs entraran en un estat irreversible d'anèrgia o bé moriran per apoptosi, fenomen conegut com a selecció negativa. Finalment, els limfòcits B immadurs que superen aquesta selecció negativa (representen només un 5%) podran sortir de la medul·la òssia i desplaçar-se fins a la melsa, on completaran la seva maduració(13).

Els limfòcits B immadurs que arriben a la melsa, s'anomenen limfòcits B en transició i es diferencien ràpidament a limfòcits B fol·liculars o limfòcits B de la zona germinal. La majoria dels limfòcits B madurs son del tipus fol·licular i coexpressen cadenes pesades μ i δ associades a la cadena lleugera kappa o lambda, per tant expressen tant IgM com IgD de superfície. Aquesta coexpressió d'IgM i d'IgD es produeix per un processament alternatiu d'un transcrit primari de RNA que conté el segment VDJ reorganitzat i els gens C_{μ} i C_{δ} , això permet que un mateix segment VDJ formi dos transcrits, un que inclou el gen C_{μ} i un altre que inclou el gen C_{δ} , que finalment donaran lloc a la proteïna de la cadena pesada μ o δ (6). Els limfòcits B madurs recirculen entre els fol·licles de la melsa, els ganglis limfàtics i la medul·la òssia fins que es troben amb un antigen que reconeixen i son activats. La unió de l'antigen al BCR provoca l'agrupament de les Ig de membrana permetent així l'activació de varis factors de transcripció que regulen la proliferació i la diferenciació dels limfòcits B i la seva migració cap a les zones extrafol·liculars on hi ha els limfòcits T activats. En aquestes zones els limfòcits B son estimulats per citoquines produïdes pels limfòcits T CD4+ i per la interacció entre el CD40L (de l'anglès *CD40 ligand*) expressat pels limfòcits T i el receptor CD40 expressat pels limfòcits B. A continuació, els limfòcits B activats migren un altre cop cap a les zones profundes dels fol·licles on comencen a proliferar ràpidament, formant el que es coneix com a centre germinal on els limfòcits B activats patiran hipermutació somàtica a les regions variables de la cadena pesada i lleugera i la conseqüent maduració de l'afinitat que permetrà la producció d'anticossos amb elevada afinitat. La reacció del centre germinal, pot conduir als limfòcits B activats a diferents destins, que son l'expansió, l'apoptosi

INTRODUCCIÓ

(quan no reconeixen l'antigen) o la diferenciació a cèl·lules B de memòria o cèl·lules B plasmàtiques(14). El centre germinal està format per una zona fosca on es troben els limfòcits B proliferants o centroblastes i una zona clara on hi ha els limfòcits B no proliferants o centròcits envoltats per cèl·lules dendrítiques fol·liculars i limfòcits T CD4+. Els centroblastes de la zona fosca experimenten hipermutació somàtica de la regió variable de les Ig, procés que permet la producció d'anticossos amb major afinitat per l'antigen. Seguidament, els centroblastes es desplacen a la zona clara i passen a anomenar-se centròcits. En aquesta zona els centròcits es troben amb els limfòcits T CD4+ i les cèl·lules dendrítiques fol·liculars que promouen el canvi d'isotip de la cadena pesada per un procés anomenat recombinació de canvi, en el qual el segment gènic VDJ ja reorganitzat es recombina amb un altre gen de la regió C, en direcció 3'. L'enzim que participa en aquest procés és l'AID (de l'anglès *activation-induced deaminase*) i permet la generació de limfòcits B amb diferents classes d'Ig (IgG, IgA o IgE) i per tant amb diferents funcions efectores, però amb la mateixa especificitat antigènica(15). Finalment, els centròcits es diferenciaran a cèl·lules B plasmàtiques o a cèl·lules B de memòria. Les cèl·lules B plasmàtiques són les encarregades de secretar anticossos durant la resposta immunitària humoral i es poden allotjar als òrgans limfàtics secundaris on tenen una vida curta o bé a la medul·la òssia, on poden continuar secretant anticossos durant mesos. Aquests anticossos podran generar una resposta immediata si posteriorment es posen en contacte amb l'antigen. En canvi les cèl·lules B de memòria són capaces de sobreviure durant llargs períodes de temps en estat quiescent i de generar una resposta immunitària ràpida i potent quan es tornin a posar en contacte amb l'antigen reconegut prèviament(14).

INTRODUCCIÓ

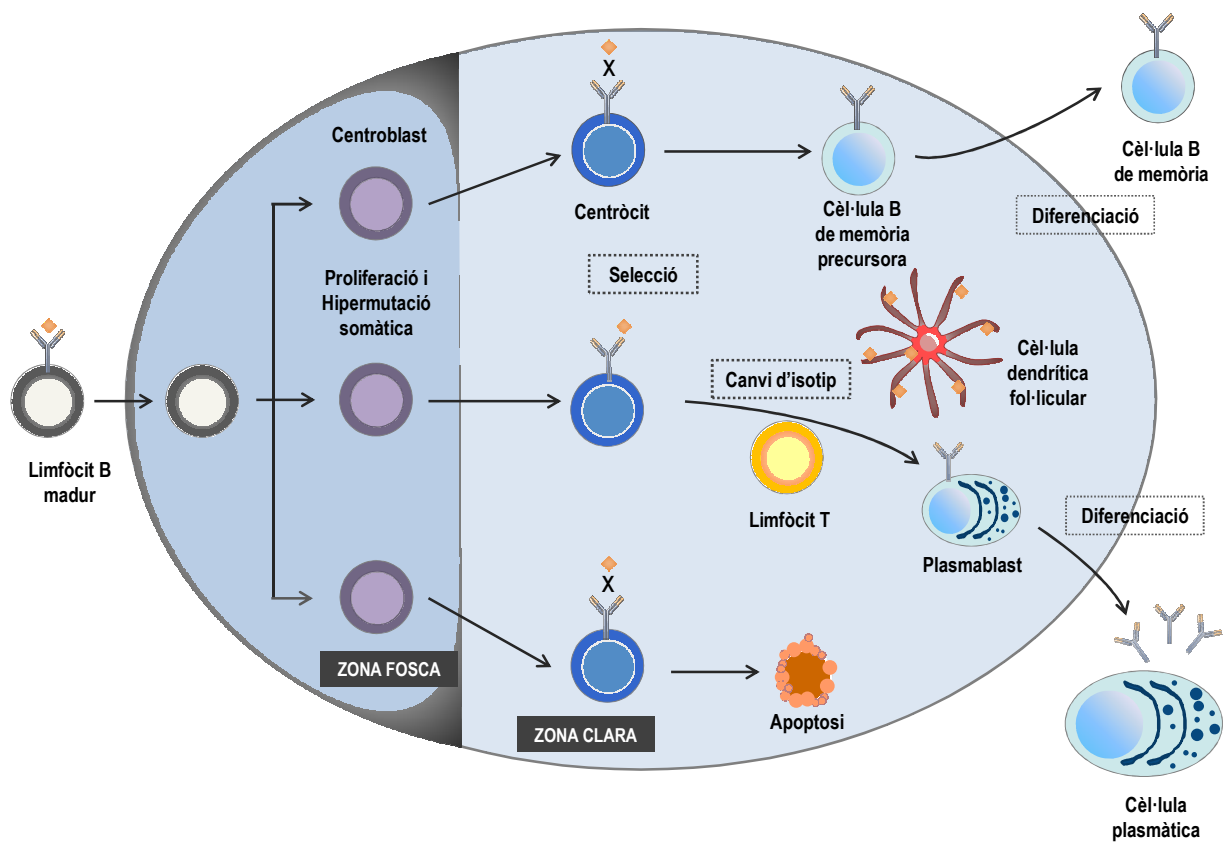


Figura 3. Representació de l'estructura del centre germinal. Elaboració pròpia

2. Leucèmia limfàtica crònica

2.1. Generalitats

2.1.1. Definició

La leucèmia limfàtica crònica o LLC és una síndrome limfoproliferativa que es caracteritza per la proliferació i l'acumulació progressiva de cèl·lules limfoides B madures i clonals amb un immunofenotip característic (CD5+, CD19+, CD20^{dèbil}, CD23+, Ig superfície^{dèbil}) en sang perifèrica, medul·la òssia, ganglis limfàtics i melsa(16).

2.1.2. Incidència i prevalença

La LLC és la leucèmia més freqüent en adults als països occidentals, representa entre el 20 i el 40% de totes les leucèmies en adults(17). Aquesta malaltia té una incidència anual de 4,2 casos per cada 100.000 habitants, que augmenta fins a 30 casos per cada 100.000 habitants a l'any, en la població major de 80 anys. Generalment, la LLC afecta a persones majors de 60 anys, sent l'edat mitjana de diagnòstic entre els 70 i 72 anys. Només al voltant del 10% de les persones afectades son menors de 55 anys(18).

2.1.3. Curs clínic

El curs clínic de la LLC és extremadament variable i la supervivència dels pacients oscil·la entre pocs mesos i varies dècades, sent la supervivència mitjana d'uns 10 anys. En aquest sentit, aproximadament la meitat dels pacients patiran una malaltia indolent amb una supervivència mitjana d'entre 10 i 20 anys, sense requerir tractament mentre que l'altra meitat patiran una malaltia molt més agressiva i que progressarà relativament ràpid. Aquest últim grup de pacients requerirà tractament, en el moment de presentar una malaltia simptomàtica o progressiva i la seva esperança de vida és curta (2-3 anys). A més alguns d'aquests pacients desenvoluparan resistència als tractaments, complicacions degudes a la malaltia i/o recaigudes freqüents(19).

INTRODUCCIÓ

2.2. Diagnòstic

2.2.1. Criteri diagnòstic

El diagnòstic de la LLC es basa en els criteris establerts al *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia* (IWCLL) del 2008 i recentment revisats i actualitzats en l'IWCLL de l'any 2017(16). Per diagnosticar una LLC es requereix un recompte d'almenys 5×10^9 limfòcits per litre de sang perifèrica (que persisteixi durant 3 mesos o més) amb una morfologia i un immunofenotip característics, tal i com s'explica de manera més detallada a continuació, als punts 2.2.3 i 2.2.4 respectivament(16).

Quan el recompte de limfòcits B no assoleix els valors establerts per l'IWCLL, és a dir que és inferior a 5×10^9 cèl·lules per litre de sang perifèrica i no es detecten limfadenopaties, organomegàlia, citopènies ni símptomes B (astènia, pèrdua de pes, sudoracions nocturnes), la malaltia es defineix com a limfocitosi monoclonal de cèl·lules B (MBL de l'anglès monoclonal B lymphocytosis). Les cèl·lules B presenten el fenotip característic de la LLC. S'ha descrit que anualment el 1-2% amb MBL progressaran i acabaran desenvolupant una LLC(20).

2.2.2. Presentació clínica

En el moment del diagnòstic, la majoria dels pacients son asimptomàtics. Normalment la malaltia es detecta a causa d'un augment del número de limfòcits al realitzar un anàlisi de sang rutinari. En alguns casos, també es detecta la presència de limfadenopaties palpables i/o esplenomegàlia.

De manera poc freqüent, els pacients presenten símptomes B, com son la presència de febre alta (superior a 38°C durant més de dues setmanes sense evidència d'infecció), la pèrdua de pes no intencionada (del 10% o superior durant els últims 6 mesos) o les sudoracions nocturnes freqüents. Els pacients d'estadis clínics avançats poden presentar fatiga i anèmia deguda a la infiltració de la medul·la òssia, en canvi és poc freqüent la presència d'hemorràgies, degudes al dèficit de plaquetes(21). Els pacients amb LLC son més vulnerables a patir infeccions degut als defectes que tenen en la immunitat

INTRODUCCIÓ

humoral i cel·lular i als efectes immunosupressors causats pels tractaments. De manera sovint durant el curs de la malaltia i de manera més pronunciada en estadis avançats, es detecta l'alteració del funcionament de neutròfils, monòcits i subgrups de limfòcits T juntament amb la presència d'hipogammaglobulinèmia(22). Una de les complicacions més greus de la LLC, observada en el 5-10% dels pacients, és la síndrome de Richter, que és la transformació de la LLC a un limfoma agressiu, resistent als tractament i amb un pronòstic molt desfavorable(23).

2.2.3. Morfologia

Com ja s'ha comentat anteriorment, les cèl·lules de LLC tenen una morfologia característica. Degut a això, una de les proves que es realitza en el moment del diagnòstic és l'extensió de sang perifèrica. La majoria de cèl·lules que s'hi observen són limfòcits petits (amb un diàmetre cel·lular d'entre 1-1.5 vegades el d'un eritròcit) amb un citoplasma escàs i amb contorn regular. Pel que fa al nucli, que també té un contorn regular, la cromatina es troba agrupada en àrees gruixudes separades per àrees més clares i el nuclèol és petit o no visible. Un altre fet remarcable de la morfologia de les cèl·lules de LLC, és la presència de les ombres de Gumprecht, les quals apareixen a causa del trencament dels limfòcits B quan es fa l'extensió de sang. Aquest fet mostra la fragilitat de la membrana de les cèl·lules de LLC(24).

De manera menys freqüent (menys del 10% del total de cèl·lules de LLC), també es poden observar unes cèl·lules més grans (unes dues vegades el diàmetre d'un eritròcit) i amb un nuclèol fàcilment visible. Aquestes cèl·lules s'anomenen prolimfòcits per la seva similitud amb les cèl·lules de la leucèmia prolimfocítica. L'increment del número de prolimfòcits (entre el 10% i el 55%) ja sigui en el moment del diagnòstic o adquirit durant la malaltia, està associat amb marcadors de mal pronòstic (com per exemple les mutacions al gen NOTCH1 o l'expressió de CD38), una menor supervivència lliure de progressió i una menor supervivència global. Cal tenir en compte que l'increment del número de prolimfòcits superior al 55% és un criteri de diagnòstic diferencial de la leucèmia prolimfocítica(25,26).

INTRODUCCIÓ

2.2.4. Immunofenotip

L'immunofenotipatge també és una prova necessària per confirmar el diagnòstic d'aquesta malaltia ja que les cèl·lules de LLC tenen un immunofenotip característic que les diferencia de les cèl·lules d'altres síndromes limfoproliferatius B. Les cèl·lules de LLC es caracteritzen per la baixa expressió d'Ig de superfície, normalment IgM i/o IgD, rarament expressen IgG o IgA. En alguns casos, aquesta expressió és tan dèbil que no es pot detectar per citometria de flux. Un altre tret característic de les cèl·lules de LLC, és que presenten restricció de la cadena lleugera de les Ig, és a dir que expressen cadenes lleugeres kappa o bé lambda. Aquest fet mostra que la població de cèl·lules B és clonal. A més a més, les cèl·lules de LLC expressen marcadors típics dels limfòcits B com són el CD19, el CD23, el CD20 i el CD79b, els dos últims de manera més dèbil en comparació amb els limfòcits B normals. També expressen el marcador dels limfòcits T, CD5. En canvi, són negatives per CD10, FMC7 i ciclina D1. Recentment, s'ha descrit que les cèl·lules de LLC expressen els marcadors CD200(27) i ROR1(28).

2.3. Pronòstic

Com ja s'ha explicat al punt 2.1.3 el curs clínic de la malaltia és altament heterogeni i la supervivència mitjana dels pacients oscil·la entre els pocs mesos i les varies dècades(19). Aquesta gran variabilitat entre pacients, genera la necessitat de definir factors pronòstics que ajudin a predir l'evolució clínica de la malaltia per poder detectar quins individus progressaran i per tant requeriran tractament.

Tradicionalment s'utilitzaven com a factors pronòstics paràmetres clínics i factors biològics que permetien diferenciar pacients de baix o d'alt risc, determinar la fase de la malaltia en la que es troben els pacients i predir el risc de mortalitat associat a la malaltia. Aquests factors pronòstics "tradicionals" són per exemple l'expressió de marcadors sèrics (com la β 2 microglobulina, la timidina quinasa, la lactat deshidrogenasa o el CD23 soluble), el patró d'infiltració de la medul·la òssia, els sistemes d'estadiatge de Rai i Binet i el temps de duplicació limfocitària.

INTRODUCCIÓ

Avui en dia en la pràctica clínica els sistemes d'estadiatge de Rai(29) i Binet(30) encara son rellevants per avaluar el pronòstic i predir la supervivència mitjana dels pacients amb LLC al moment del diagnòstic(16). El sistema de Rai (Taula 1) és el més utilitzat als Estats Units, mentre que el sistema de Binet (Taula 2) és el que s'utilitza de manera més freqüent a Europa. Aquests dos sistemes son fàcils de definir, ja que simplement es basen en el contactge de les cèl·lules sanguínies i en l'examen físic del pacient. Ambdós sistemes classifiquen als pacients de LLC en diferents grups segons l'evolució, la gravetat de la malaltia i la supervivència.

ESTADI	CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques	SUPERVIVÈNCIA MEDIANA (ANYS)
0	Limfocitosi en sang o medul·la òssia	10
I	Limfocitosi + adenopaties	7
II	Limfocitosi + esplenomegàlia i/o hepatomegàlia (amb o sense adenopaties)	7
III	Limfocitosi amb anèmia (Hb < 11g/dL) amb o sense adeno-, hepato- o esplenomegàlia	1,5-4
IV	Limfocitosi amb trombocitopènia (plaquetes < 100.000/ μ L) amb o sense adeno-, hepato- o esplenomegàlia o amb anèmia	1,5-4

Taula 1. Sistema d'estadiatge segons la classificació de Rai

ESTADI	CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques	SUPERVIVÈNCIA MEDIANA (ANYS)
A	Afectació de menys de 3 àrees, sense anèmia ni trombocitopènia	12
B	Afectació de 3 o més àrees, sense anèmia ni trombocitopènia	7
C	Presència d'anèmia (Hb < 10g/dL) o trombocitopènia (plaquetes < 100.000/ μ L)	2-4

Taula 2. Sistema d'estadiatge segons la classificació de Binet

INTRODUCCIÓ

Durant els últims 15 anys s'han identificat nous marcadors pronòstics gràcies al major coneixement de la genètica i biologia molecular de la LLC i al desenvolupament de les tècniques de seqüenciació massiva. Aquests nous marcadors tenen una major capacitat per predir la resposta al tractament, la durada de les respostes, el temps lliure de tractament i la supervivència global. Malgrat això, actualment encara no hi ha factors pronòstics que permetin discriminar aquells pacients que progressaran en algun moment, després de ser diagnosticats.

A continuació, s'expliquen amb detall, quins son aquests nous marcadors amb valor pronòstic.

2.3.1. Estat mutacional de les immunoglobulines

L'estat mutacional de la regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines (IGHV, de l'anglès *immunoglobulin heavy chain variable*) és un paràmetre biològic amb gran importància pronòstica en els pacients de LLC al moment del diagnòstic.

Com s'ha explicat anteriorment (punt 1.2) les regions variables de les cadenes pesades i de les cadenes lleugeres de les Ig es formen gràcies a la recombinació dels segments V, J i D (només present a la cadena pesada). Aquestes recombinacions permeten que cada limfòcit B expressi un BCR diferent que a més a més patirà hipermutació somàtica al centre germinal, procés pel qual incrementarà, encara més, la diversificació dels gens de les regions variables de la cadena pesada i lleugera.

En el moment del diagnòstic d'una LLC, normalment només s'analitza l'estat mutacional dels gens de les IGHV, per això s'utilitza sempre el terme IGHV. Tot i això, els gens de la regió variable de la cadena lleugera també poden tenir mutacions. Segons el grau d'hipermutació somàtica dels gens de les IGHV dels pacients amb LLC es poden classificar en dos grans grups amb característiques clíniques i biològiques clarament diferents: el grup de pacients amb LLC no mutada, que no tenen mutacions als gens de les IGHV i per tant la seqüència de les IGHV de les cèl·lules de LLC presenta una homologia mínima del 98% respecte a la seqüència germinal i el grup de pacients amb LLC mutada que si que presenten mutacions als gens de les IGHV i representen

INTRODUCCIÓ

entre el 50-70% dels casos amb LLC(31). El grup de pacients amb LLC no mutada té una malaltia més agressiva, amb un major risc de progressió i menor supervivència global comparat amb el grup de pacients amb LLC mutada(32,33). A més, estudis independents han mostrat que la resposta al tractament amb FCR (fludarabina, ciclofosfamida i rituximab) dels pacients amb LLC mutada és més prolongada i sovint sense malaltia mínima residual detectable en comparació amb els pacients amb LLC no mutada(34,35). En canvi, la resposta a l'ibrutinib no es veu influenciada per l'estat mutacional dels gens de les IGHV dels pacients, sinó que ambdós grups mostren respostes globals similars(36–38).

Avui en dia l'anàlisi de l'estat mutacional dels gens de les IGHV continua sent una tècnica laboriosa i cara per ser realitzada de manera rutinària en el moment del diagnòstic de la malaltia. Per solucionar aquesta dificultat s'han determinat marcadors substituïts, que es poden determinar fàcilment per citometria de flux, com són l'expressió de la proteïna ZAP-70 (de l'anglès *zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70*)(39) o l'expressió del marcador CD38(32), però cap d'ells ha reemplaçat la rellevància de l'estat mutacional dels gens de les IGHV.

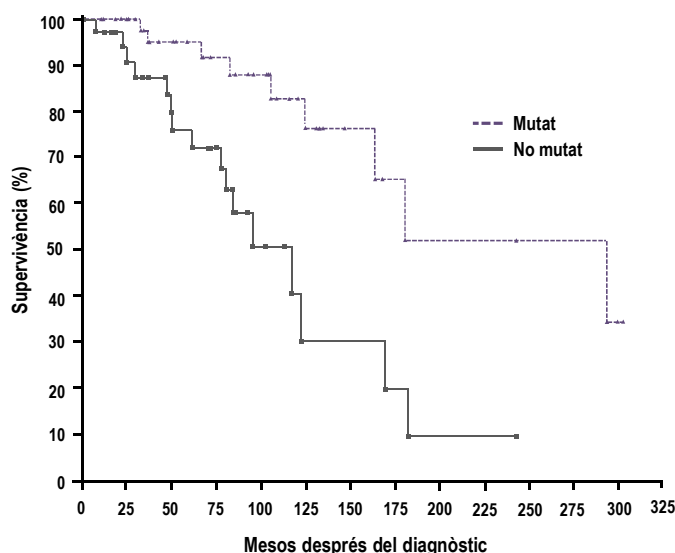


Figura 4. Supervivència global dels pacients amb LLC en funció del estat mutacional dels gens de les IGHV. Supervivència mediana pels pacients sense mutacions: 117 mesos; supervivència mediana pels pacients mutats: 293 mesos (P=0.001) Gràfic extret de l'article de Hamblin i col. Blood 1999(33)

INTRODUCCIÓ

2.3.2. Expressió de ZAP-70

La proteïna ZAP-70 s'expressa de manera normal en limfòcits T i cèl·lules NK. Però també s'ha detectat en les cèl·lules de LLC. Varis estudis, han demostrat que l'expressió de ZAP-70 es correlaciona amb l'estat mutacional dels gens de les IGHV, observant que la majoria de pacients que tenen una alta expressió de ZAP-70 no presenten mutacions als gens de les IGHV(40,41). L'expressió de ZAP-70 es pot mesurar per diferents mètodes, però el més utilitzat i més ben establert és la citometria de flux. Amb aquesta tècnica s'ha observat una molt bona correlació entre l'expressió de ZAP-70 i l'estat mutacional dels gens de les IGHV, demostrant que la proteïna ZAP-70 té un valor pronòstic equivalent a l'estat mutacional dels gens de les IGHV i que la seva expressió no canvia durant l'evolució de la malaltia, tot i això es considera un marcador pronòstic independent(39). L'expressió de ZAP-70 és positiva o alta, quan el 20% o més de les cèl·lules de LLC expressen aquesta proteïna i es correlaciona amb una major probabilitat de progressió i una menor supervivència global(39,42,43). L'elevada expressió de ZAP-70 també s'associa amb altres paràmetres de mal pronòstic, com l'elevada expressió de CD38, temps curts de duplicació leucocitària, infiltració de la medul·la òssia i estadis clínics avançats(42,43).

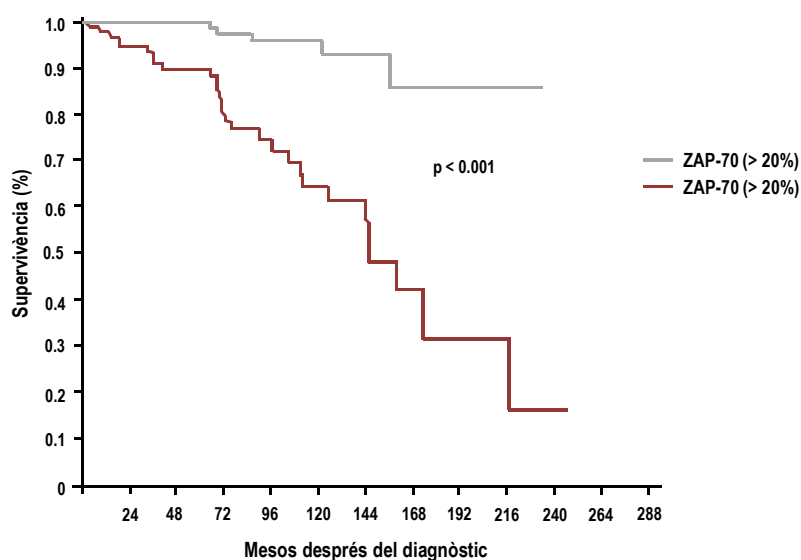


Figura 5. Supervivència global en funció de l'expressió de ZAP-70 en pacients amb LLC. Figura extreta de l'article de Principe i col. Blood 2006(42)

INTRODUCCIÓ

2.3.3. Expressió de CD38

CD38 es un proteïna transmembrana de tipus II que es troba a la superfície dels limfòcits pre-B, cèl·lules plasmàtiques, limfòcits T i cèl·lules NK(44). S'han descrit diverses funcions del CD38, una d'elles és l'actuació com a ectoenzim catalitzant la conversió del coenzim NAD⁺ a ADP-ribosa cíclica, reacció que regula el flux de calci intracel·lular(45). També indueix la fosforilació del CD19, després de l'activació dels limfòcits B als centres germinals, evitant així que morin per apoptosi(46). I per últim, actua com a molècula d'adhesió(47).

Inicialment, es va proposar que l'expressió de CD38 estava correlacionada amb l'estat mutacional dels gens de les IGHV(32), però més endavant es va observar que aquesta relació no era absoluta i que per tant, igual que la proteïna ZAP-70 l'expressió de CD38 era un factor pronòstic independent que es complementava amb la informació aportada per l'estat mutacional dels gens de les IGHV(48). En la LLC l'expressió de CD38 es considera alta quan més del 7, 20 o 30% de les cèl·lules leucèmiques son positives per aquest marcador (el punt de tall varia segons el treball)(49–51) i es correlaciona amb un curs clínic més agressiu, una menor supervivència lliure de progressió i global i també amb una pitjor resposta als tractaments(32,52). En la majoria dels casos l'expressió de CD38 és bastant constant, però varis estudis demostren que l'expressió pot variar durant l'evolució de la malaltia i que aquests canvis estan associats amb canvis en el comportament clínic del pacient(48,53).

INTRODUCCIÓ

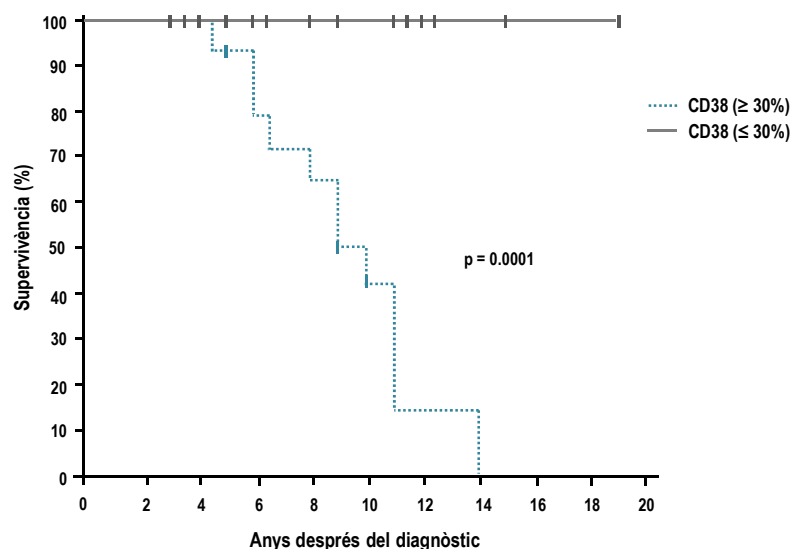


Figura 6. Supervivència global en funció de l'expressió de CD38 en pacients amb LLC. Supervivència mediana pels pacients amb alta expressió de CD38 ($\geq 30\%$): 10 anys; supervivència mediana pels pacients amb baixa expressió ($< 30\%$): no s'arriba a calcular ($P = 0.0001$) Gràfic extret de l'article de Damble i col. Blood 1999 (32)

2.3.4. Anomalies cromosòmiques amb valor pronòstic

Més del 80% dels pacients amb LLC presenten almenys una anomalia cromosòmica. Les alteracions detectades de manera més freqüent (amb la tècnica FISH, de l'anglès *fluorescent in situ hybridization*) i que també tenen valor pronòstic són la deleció 13q, la deleció 11q, la trisomia 12 i la deleció 17p(54).

La deleció 13q és l'alteració més freqüent, trobant-se en el 55% dels pacients al moment del diagnòstic(54) i s'associa amb bon pronòstic quan és la única alteració. De fet els pacients que tenen aquesta única lesió, mostren millor pronòstic que els pacients amb un cariotip normal(55). Malgrat això hi ha varis estudis que demostren que els pacients amb una alta proporció de cèl·lules amb aquesta deleció ($> 80\%$) presenten una supervivència global menor i un temps més curt al primer tractament en comparació amb els pacients amb una baixa proporció de cèl·lules amb la deleció ($< 80\%$)(56,57). El 20% dels pacients amb aquesta deleció poden tenir afectat el gen supressor tumoral RB1 (de l'anglès *retinoblastoma susceptibility gene*) fet que s'associa

INTRODUCCIÓ

amb un curs clínic més agressiu en comparació amb els pacients que no tenen la deleció 13q o amb els que tenen la deleció però sense afectació del gen RB1(58–60).

La següent alteració més freqüent és la deleció 11q, que es troba en el 20% dels pacients aproximadament, al moment del diagnòstic. La prevalença incrementa fins al 40% en pacients que progressen després d'un tractament quimioteràpic(54). Aquesta deleció provoca la pèrdua d'un dels al·lells del gen ATM (de l'anglès *ataxia-telangiectasia mutated*) i en el 36% dels casos es detecten també mutacions en l'al·lel remanent d'ATM(61). En el 83% dels pacients amb la deleció 11q es produeix també la pèrdua del gen BIRC3 (de l'anglès *baculoviral IAP repeat containing 3*) i a més a més l'al·lel remanent es troba mutat en el 5% dels pacients amb aquesta lesió (la pèrdua de BIRC3 coexisteix amb la pèrdua d'ATM)(62). Generalment la deleció 11q es troba en pacients joves, que pateixen afectació dels ganglis limfàtics, progressen més ràpidament, responen pitjor als tractaments quimioteràpics i tenen una menor supervivència global(63,64). La inactivació del segon al·lel d'ATM s'associa amb un pitjor pronòstic i una menor supervivència global(65) mentre que les mutacions en el segon al·lel de BIRC3 es relacionen amb una pitjor pronòstic i una pitjor resposta a la fludarabina(62).

La trisomia 12 es troba en el 16% dels pacients al moment del diagnòstic i s'ha relacionat històricament amb el grup de risc intermedi (supervivència global als 10 anys, del 30% aproximadament)(54). Però un estudi recent ha demostrat que quan aquesta alteració cromosòmica es troba en pacients amb LLC mutada, aquests tenen un temps lliure de tractament similar al dels pacients amb alteracions al gen TP53, en canvi quan la trisomia 12 es troba en pacients amb LLC no mutada s'associa a un curs clínic favorable(66). També s'ha observat que els pacients amb la trisomia 12 i mutacions al gen NOTCH1 tenen un pronòstic desfavorable i una menor supervivència(67). De manera general, aquesta alteració està associada amb una major incidència de tumors secundaris i de patir una transformació de Richter en comparació amb els pacients amb un cariotip normal(68,69).

INTRODUCCIÓ

Finalment, la deleció 17p es troba en un 7% dels pacients al moment del diagnòstic i en més del 30% dels pacients en estadis avançats o en recaiguda (54,70). Aquesta deleció provoca la pèrdua del gen TP53 i més del 80% dels casos tenen també mutacions al gen TP53 de l'al·lel remanent(54,71,72). La deleció 17p està associada amb un curs clínic molt agressiu, una supervivència lliure de progressió menor, un temps curt de resposta als tractaments, una major probabilitat de resistència als tractaments amb anàlegs de les purines (com la fludarabina), un major risc de recaiguda i també una menor supervivència global(54,73).

En l'estudi realitzat per Döhner i col·laboradors a l'any 2000(54), es va construir un model jeràrquic format per 5 subgrups genètics establerts a partir d'un anàlisi de regressió de les alteracions cromosòmiques trobades en 325 pacients diagnosticats de LLC. Aquests 5 subgrups, es poden ordenar segons la supervivència mediana (Figura 7) i el temps fins al primer tractament, sent el grup de pacients amb la deleció 17p el que té menor supervivència mediana (32 mesos) i menor temps abans del primer tractament (9 mesos), seguidament trobem el grup amb la deleció 11q que té una supervivència mediana de 79 mesos i temps abans del primer tractament de 13 mesos. Després el grup amb la trisomia 12, amb 114 mesos de supervivència mediana i 92 mesos abans de requerir el primer tractament i finalment el grup amb la deleció 13q com a única alteració, amb una mediana de supervivència de 133 mesos i un interval lliure de tractament de 92 mesos, temps superiors als del grup amb cariotip normal (111 mesos de supervivència mediana i 49 mesos de temps lliure de tractament).

INTRODUCCIÓ

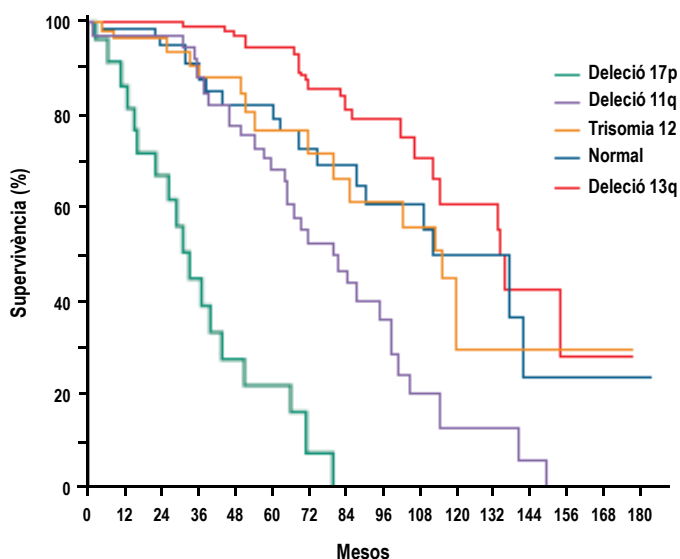


Figura 7. Supervivència global i anomalies cromosòmiques en els pacients amb LLC. Supervivències medianes en mesos: grup amb la deleció 17p (32), grup amb la deleció 11q (79), grup amb la trisomia 12 (114), grup amb cariotip normal (111) i grup amb la deleció 13q (133) Gràfic extret de l'article de Döhner i col. NEJM 2000 (54)

2.3.5. Mutacions somàtiques amb valor pronòstic

Actualment la presència de mutacions en alguns gens es pot associar amb un pitjor pronòstic o una pitjor resposta a un tractament concret. Les mutacions amb valor pronòstic són les que afecten als gens TP53, ATM, NOTCH1, SF3B1, BIRC3 i MYD88. La identificació d'aquestes mutacions al moment del diagnòstic permet classificar els pacients d'una manera més acurada, segons el pronòstic i la necessitat de tractament.

La presència de mutacions al gen TP53 (així com la seva pèrdua a causa de la deleció 17p) és un dels factors pronòstics més importants en la LLC. Les mutacions en aquest gen es troben en només un 5% dels pacients amb LLC al moment del diagnòstic. Però la freqüència augmenta fins al 10% en pacients que han rebut la primera línia de tractament, fins al 30% en pacients que han recaigut i fins al 50% en pacients refractaris(74–76). Les mutacions en TP53 estan associades amb una major probabilitat de progressió, una pitjor resposta a la quimioteràpia i una supervivència global menor. Es considera un factor pronòstic independent(77,78).

INTRODUCCIÓ

Les mutacions en ATM s'observen en el 10-15% dels pacients al moment del diagnòstic i en el 15% dels pacients que progressen i requereixen tractament per primer cop(79). Com ja s'ha comentat anteriorment, les mutacions en aquest gen també es troben en el 36% dels pacients que tenen la deleció 11q(61). La presència de mutacions en aquest gen identifica un grup de pacients amb un curs clínic més agressiu, una supervivència global menor i una major resistència a la quimioteràpia(80,81).

Les mutacions en NOTCH1 es detecten entre el 4% i l'11% dels pacients amb LLC i freqüentment estan associades amb la trisomia 12 i l'absència de mutacions als gens de les IGHV(74,82,83). Les mutacions en aquest gen tenen un impacte negatiu en la supervivència global i estan associades amb una major probabilitat de progressió i de patir una transformació de Richter(84).

Les mutacions al gen SF3B1 es detecten entre el 7 i el 10% dels pacients i s'associen amb l'absència de mutacions als gens de les IGHV(82,85). Els pacients amb mutacions en aquest gen tenen una supervivència lliure de progressió menor, una pitjor resposta als tractaments quimioteràpics i una major probabilitat de progressió en comparació amb els pacients que no presenten mutacions en aquest gen(74,86,87).

Les mutacions en BIRC3 es troben aproximadament en el 2% dels pacients al moment del diagnòstic i augmenten fins al 24% en els pacients refractaris a la fludarabina(62). Com s'ha comentat anteriorment, les mutacions en aquest gen es troben associades amb la deleció 11q i es relacionen amb mal pronòstic, amb un menor temps al primer tractament i amb la resistència a la fludarabina(62,74,88).

Les mutacions en MYD88 es troben en un 3% dels pacients amb LLC aproximadament. Majoritàriament es troben en pacients joves (edat mitjana 47 anys) i estan associades amb la presència de mutacions als gens de les IGHV, amb un curs clínic favorable i amb una supervivència mitjana similar a la esperada per la població normal de la mateixa edat(89).

2.4. Característiques biològiques i genètiques

2.4.1. Origen de la cèl·lula de LLC

Actualment l'origen cel·lular de la LLC encara no es coneix amb exactitud, malgrat que aquesta informació és crucial per poder entendre la patogènia d'aquesta malaltia. Tot i que avui en dia la LLC es considera una malaltia caracteritzada per l'acumulació i proliferació de limfòcits B madurs amb experiència antigènica, durant molt de temps va ser considerada una malaltia deguda a l'acumulació clonal de limfòcits B immadurs, principalment a causa d'una deficiència en l'apoptosi. Inicialment es pensava que les cèl·lules de LLC derivaven dels limfòcits B naïve CD5⁺(90). Més endavant però, el descobriment que entre el 50 i el 70% dels pacients amb LLC presentaven limfòcits B malignes amb mutacions somàtiques als gens de les IGHV(31) posava en dubte aquesta hipòtesi i suggeria que la majoria de cèl·lules de LLC havien estat estimulades prèviament i que per tant derivaven de limfòcits B amb experiència antigènica o cèl·lules B de memòria, és a dir de limfòcits B post germinals(91). Uns anys més tard, es va observar que el 30% dels pacients amb mutacions als gens de les IGHV presentaven també mutacions al gen BCL6 (de l'anglès *B-cell lymphoma 6 protein*), un dels principals gens que participen en la diferenciació dels limfòcits B als centres germinals. Aquesta coincidència va aportar més evidència a la hipòtesi d'un origen cel·lular post germinal(92). A més a més, estudis d'expressió gènica van demostrar que hi havia homologia entre el perfil d'expressió de les cèl·lules B de memòria CD27⁺ i de les cèl·lules de LLC independentment de l'estat mutacional dels gens de les IGHV, fet que mostrava que les cèl·lules de LLC havien tingut un contacte antigènic previ(40,93). Per tant totes aquestes observacions reforçaven la hipòtesi d'un origen post centre germinal.

A l'any 1999, grups independents van demostrar la importància pronostica de l'estat mutacional dels gens de les IGHV, mostrant que la presència o absència de mutacions distingia dos subgrups de pacients amb diferent evolució clínica i diferents característiques biològiques. Aquest descobriment va fer pensar que cada subgrup tenia un origen cel·lular diferent(32,33). Per això es va proposar que les cèl·lules dels pacients no

INTRODUCCIÓ

mutats, els quals presentaven un pitjor curs clínic, podrien derivar de les cèl·lules equivalents a les cèl·lules B1 murines (cèl·lules responsables de la producció d'IgM sense estimulació antigènica aparent) o bé dels limfòcits B de la zona marginal esplènica. En canvi, les cèl·lules dels pacients mutats derivarien de cèl·lules B de memòria post centre germinal o bé dels limfòcits B de la zona marginal esplènica amb estimulació antigènica(94).

De manera més recent, es va realitzar un estudi on es comparaven els perfils d'expressió gènica de les cèl·lules de LLC amb diferents poblacions de limfòcits B normals (que incloïen limfòcits B naïve, limfòcits B de la zona germinal esplènica, limfòcits B CD5+ madurs, cèl·lules B de memòria IgM i cèl·lules B de memòria amb canvi d'isotip). El que es va observar és que les cèl·lules de LLC tenien perfils d'expressió gènica semblants als limfòcits B CD5+ madurs. A més, es van identificar dues subpoblacions de limfòcits B CD5+ madurs normals de nova definició; una població post centre germinal, que havia estat en contacte amb els limfòcits T, que expressava CD27, tenia mutacions als gens de les IGHV (CD5+/CD27+) i s'assemblava a les cèl·lules de LLC mutades i una altra població pre centre germinal que no havia estat en contacte amb les cèl·lules T, que no expressava CD27, no tenia mutacions als gens de les IGHV (CD5+/CD27-) i s'assemblava a les cèl·lules de LLC no mutades(95). Per una altra banda, també es va observar que ambdós subgrups de pacients, tant els que tenien mutacions als gens de les IGHV com els que no, tenien un repertori de gens de les Ig molt restringit i esbiaixat, fet que suggeria que la selecció antigènica tenia un paper rellevant en la patogènia d'aquesta malaltia(96).

Fa uns anys, al 2011, un estudi publicat per Kikushige i col·laboradors, suggeria que la LLC s'originaria a partir de les HSC, les quals ja tindrien alteracions genètiques i epigenètiques que provocarien l'expansió policlonal de les cèl·lules de LLC. Experiments amb ratolins immunodeficients, van mostrar que les HSC de pacients amb LLC eren capaces proliferar i generar clones de cèl·lules amb un fenotip de LLC o MBL(97). Més endavant es va realitzar un altre estudi amb HSC de pacients amb LLC, que va permetre la identificació de mutacions en varis "*driver*" gens que en la LLC tenen un paper oncogènic, com per exemple NOTCH1, XPO1 i SF3B1(98).

INTRODUCCIÓ

En conjunt totes aquestes observacions, proposen que les HSC estarien involucrades en les primeres etapes de la patogènia de la LLC i que degut a l'adquisició d'alteracions genètiques i epigenètiques i a la selecció clonal conduïda per l'estimulació antigènica, acabarien originant els precursors de la LLC; per una banda les cèl·lules post centre germinal CD5+/CD27+ i per l'altre les cèl·lules pre centre germinal CD5+/CD27-, que primerament donarien lloc a una MBL que acabaria amb l'aparició de la LLC, a causa de les lesions genètiques i epigenètiques addicionals, l'estimulació del BCR i la influència del microambient.

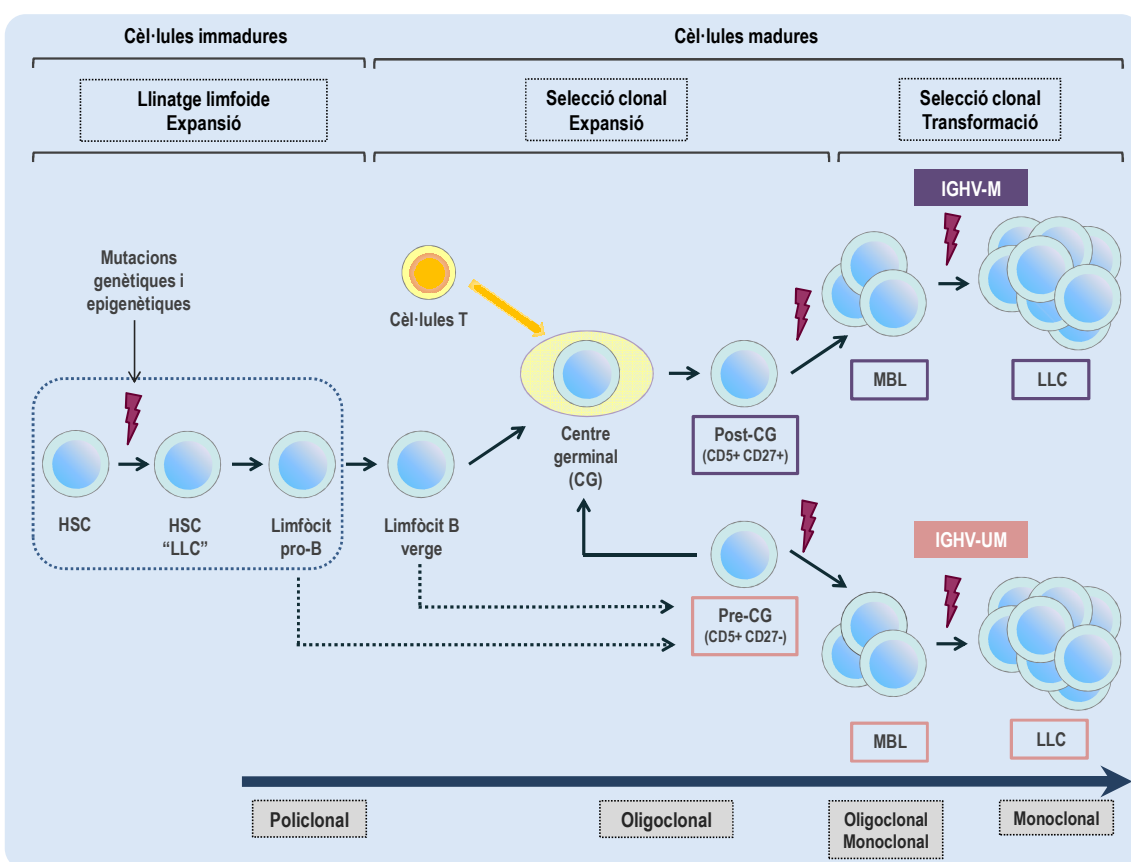


Figura 8. Representació esquemàtica de l'origen cel·lular de la cèl·lula de LLC.

L'esquema mostra l'evolució des de HSC; que donarà lloc a una MBL i finalment acabarà amb l'aparició d'una LLC. *IGHV-M*, mutacions als gens de les *IGHV*; *IGHV UM* no mutacions als gens de les *IGHV*. Elaboració pròpia

INTRODUCCIÓ

2.4.2. Anomalies cromosòmiques

Les anomalies cromosòmiques es troben de manera freqüent en els pacients amb LLC. Com ja s'ha comentat anteriorment, més del 80% dels pacients amb LLC presenten una o més anomalies cromosòmiques, les quals es detecten amb la tècnica FISH que té més resolució que la citogenètica convencional i no depèn de la capacitat de divisió de les cèl·lules. No hi ha una lesió cromosòmica concreta que sigui responsable del desenvolupament de la LLC, si no que varies alteracions estan relacionades amb aquesta malaltia. Les més freqüents són la deleció 13q, la deleció 11q, la trisomia 12, la deleció 17p i la deleció 6q(54).

La deleció del cromosoma 13 provoca la pèrdua de la regió 13q14 i és la lesió cromosòmica més freqüent en la LLC, trobant-se en el 55% dels pacients al moment del diagnòstic(54). En la majoria dels casos amb aquesta deleció (76%) la pèrdua es produeix de manera monoal·lèlica, però també pot ser bial·lèlica (24%). La MDR (de l'anglès *minimal deleted region*) conté el locus DLEU2 (de l'anglès *deleted in lymphocytic leukemia 2*) el qual codifica pel gen DLEU2, pels microRNAs (miRNAs de l'anglès *micro-ribonucleic acid*) miR-15a i miR16-1, pel gen DLEU1 i en alguns casos pel gen DLEU7(99–103). En un 20% dels pacients aproximadament, la regió afectada per aquesta deleció es major i afecta també al gen supressor tumoral RB1(58–60,101). Estudis amb models murins amb la deleció 13q14, mostren que la pèrdua dels miRNAs miR-15a i miR16-1 és suficient per originar una LLC en aquests ratolins i que la pèrdua addicional dels altres gens de la MDR contribueix a la patogènia de la malaltia(104,105). També s'ha observat que el gen DLEU2 i els miRNAs miR15a i miR16-1 actuen com a gens supressors tumorals controlant l'expansió dels limfòcits B madurs a través de la regulació negativa de gens involucrats en la progressió del cicle cel·lular(104).

La deleció 11q afecta concretament a la regió 11q22-23. És la segona alteració més freqüent, trobant-se aproximadament en el 20% dels casos de LLC al moment del diagnòstic, majoritàriament pacients joves. S'associa al subgrup de pacients que no presenten mutacions als gens de les IGHV(54). Els pacients afectats per aquesta lesió tenen la pèrdua d'un dels al·lels del gen

INTRODUCCIÓ

ATM(79) i més del 30% d'aquests pacients tenen també mutacions a l'altre al·lel d'ATM(106). En el 83% dels casos, la deleció 11q provoca la pèrdua del gen BIRC3, que sempre coexisteix amb la deleció d'ATM i l'al·lel remanent pot presentar mutacions en el 5% dels pacients. BIRC3 és un regulador negatiu de la via de senyalització NF- κ B (de l'anglès *nuclear factor kappa beta*)(65).

La trisomia 12 també es troba entre les lesions cromosòmiques més freqüents en la LLC. Concretament en el 16% dels pacients de manera independent de l'estat mutacional dels gens de les IGHV(54). S'ha observat que entre el 25% i el 30% dels pacients amb aquesta alteració també presenten mutacions al gen NOTCH1(67).

La deleció de la regió cromosòmica 17p13 es troba en el 7% dels casos de LLC al moment del diagnòstic i està associada al grup de pacients que no tenen mutacions als gens de les IGHV. La detecció d'aquesta lesió incrementa fins al 30% en pacients en estadis avançats i en recaiguda(54,70). La deleció 17p provoca la pèrdua de tot el braç curt del cromosoma 17 i afecta al gen supressor tumoral TP53 en tots els casos. A més, aproximadament el 80% dels pacients amb aquesta deleció tenen mutacions al gen TP53 de l'al·lel no deletat(54,71,72). La proteïna p53 té un paper essencial en la inducció d'apoptosis i aturada del cicle cel·lular quan es produeix dany al DNA, per tant els pacients amb la deleció 17p que també tenen mutacions al gen TP53 de l'al·lel remanent, tindran una mala resposta als tractaments que produeixen dany al DNA, com són la majoria de règims quimioteràpics(107).

La deleció 6q es troba en el 6% dels pacients al moment del diagnòstic(54) i s'associa amb l'absència de mutacions als gens de les IGHV, amb la sobreexpressió de CD38, amb una major limfocitosi i amb la presència de limfadenopaties de mida més gran(108). Aquesta alteració es considera de risc intermedi(109).

Altres anomalies detectades en els pacients amb LLC, són per exemple la translocació 14q32 i les trisomies 8q i 3q. La translocació 14q32 es troba en el 4% dels pacients al moment del diagnòstic(54) i afecta al locus de la cadena pesada de les Ig. Normalment aquesta translocació s'associa amb la trisomia 12 i amb la presència de mutacions als gens de les IGHV(110,111). Les trisomies

INTRODUCCIÓ

8q i 3q presents en el 5% i el 3% dels pacients al moment del diagnòstic respectivament, es troben en un grup heterogeni de pacients amb una alta probabilitat de supervivència(54).

2.4.3. Mutacions somàtiques

Les noves tècniques de seqüenciació massiva han permès ampliar el coneixement sobre la complexitat i heterogeneïtat genètica de la LLC al detectar mutacions en nous gens que fins al moment no havien estat relacionats amb aquesta malaltia i que estan involucrats en una gran varietat de processos cel·lulars. Per exemple gens que participen en el processament del RNA missatger (SF3B1 i XPO1), en la modificació de la cromatina (CHD2), en el manteniment dels telòmers (POT1), en la via de senyalització WNT (NOTCH1), en respostes inflamatòries (BIRC3, MYD88 i NFKBIE) o en la senyalització i transcripció relacionades amb les cèl·lules B (EGR2). Aquests estudis també han confirmant la presència de mutacions en gens amb una funció ja establerta en la LLC, com son TP53 i ATM(82,98,112).

El gen supressor tumoral TP53 està situat a la regió cromosòmica 17p13.1 i codifica per la proteïna p53 que està involucrada en la regulació del cicle cel·lular i la inducció de l'apoptosi quan es produeix dany al DNA(113). A banda de la pèrdua de p53 causada per la deleció 17p, present en el 7% dels pacients amb LLC al moment del diagnòstic també s'han observat mutacions puntuals en aquest gen en absència de la deleció 17p en aproximadament el 5% dels casos de LLC en primera línia de tractament(76). La incidència de la pèrdua o mutacions en TP53 augmenta fins al 10% en pacients que han rebut la primera línia de tractament i fins al 50% en pacients refractaris a la fludarabina(74,76,114). Les mutacions en TP53 estan associades amb molt mal pronòstic i amb la resistència als tractaments quimioteràpics(77,78).

Les mutacions al gen ATM es troben aproximadament en el 10-15% dels pacients amb LLC en el moment del diagnòstic i en el 15% dels pacients progressats que requereixen tractament(79). L'expressió d'ATM incrementa al produir-se el trencament de doble cadena del DNA, provocant així l'aturada de la cèl·lula en fase G1/S i G2/M del cicle cel·lular i activant la reparació del DNA

INTRODUCCIÓ

o l'apoptosi en cas d'una reparació fallida(115). S'ha observat que els pacients amb mutacions en ATM, tenen un perfil d'expressió gènica caracteritzat per la desregulació de gens implicats en els processos d'apoptosi i reparació del DNA(80).

Les mutacions en la regió codificant del gen NOTCH1 s'han detectat aproximadament en un 10% dels pacients amb LLC al moment del diagnòstic, però aquesta freqüència incrementa fins al 21% en pacients quimioresistents i fins al 31% en els casos que pateixen síndrome de Richter(116). Les mutacions del gen NOTCH1 han estat associades amb l'absència de mutacions dels gens de les IGHV, amb la trisomia 12 i amb una major probabilitat de progressió(67,84,117). NOTCH1 codifica per un receptor transmembrana que al unir-se amb el seu lligand pateix una sèrie de canvis conformacionals que provoquen l'escissió de la part intracel·lular (ICN1) la qual es desplaça fins al nucli on activa la transcripció de varis gens relacionats amb la diferenciació i proliferació cel·lular i l'apoptosi(118). En la majoria dels casos de LLC, les mutacions de NOTCH1 provoquen la pèrdua del domini PEST, fet que es tradueix en un augment de l'estabilitat i defectes en la degradació de NOTCH1 i per tant en l'acumulació de la seva isoforma activa. En aquest context, la via de senyalització de NOTCH1, que participa en la supervivència i resistència a l'apoptosi en les cèl·lules de LLC, es troba activada de manera constitutiva(83,119).

Les mutacions en el gen SF3B1 es troben aproximadament en un 10% dels pacients al moment del diagnòstic (la majoria d'ells pertanyents al subgrup de pacients amb LLC no mutada) i en un 17% dels casos refractaris a la fludarabina(85). Les mutacions en aquest gen s'associen amb una major probabilitat de progressió, una pitjor resposta a la quimioteràpia i una menor supervivència global(85,86). SF3B1 és un component de l'espliceosoma, un complex format per ribonucleases nuclears petites que s'encarrega d'eliminar els introns del RNA missatger precursor (procés conegut amb el nom d'*splicing* del RNA). S'ha observat que la majoria de les mutacions del gen SF3B1 identificades en la LLC, es produeixen a la regió carboxi terminal de la proteïna, provocant defectes en l'*splicing* de varis RNA missatgers i en la síntesi proteica(86).

INTRODUCCIÓ

Les mutacions en el gen BIRC3 son poc freqüents al moment del diagnòstic, trobant-se només en el 2% dels pacients, en canvi s'observen en el 24% dels casos refractaris a la fludarabina i estan associades amb mal pronòstic(62). La proteïna que codifica pel gen BIRC3 forma un complex proteic juntament amb TRAF2 i TRAF3, el qual regula de manera negativa la proteïna MAP3K14, la qual actua d'activador central de la via de senyalització NF- κ B. En la LLC la majoria de mutacions es produeixen a la regió C-terminal de BIRC3, provocant la inactivació d'aquest gen i com a conseqüència l'activació constitutiva de la via NF- κ B, clau en la regulació de la resposta immunològica(62).

Les mutacions del gen MYD88 han estat descrites aproximadament en el 3% dels pacients amb LLC i estan associades amb un pronòstic favorable(89). La proteïna codificada per aquest gen participa en les vies de senyalització de la IL-1 i dels Toll-like receptors (TLR), les quals estan involucrades en la resposta immunitària primària i en la homeòstasis dels limfòcits B(120). En la LLC la majoria de mutacions de MYD88 afecten al residu L265P, provocant l'activació d'aquest gen i la conseqüent activació de varies vies de senyalització com la via NF- κ B i la via JAK/STAT3 (de l'anglès *janus kinase/signal transducers and activators of transcription*)(112). Les mutacions en MYD88 s'associen amb la deleció 13q i la presència de mutacions als gens de les IGHV(112,121).

El gen RPS15 codifica per la proteïna ribosomal S15. Les mutacions en aquest gen han estat descrites recentment en un estudi amb pacients de LLC recaiguts després del tractament amb FCR. L'estudi mostra que les mutacions del gen RPS15 es detecten abans del tractament i es mantenen estables durant la recaiguda, aproximadament en el 20% dels pacients i que s'associen amb un curs clínic de la malaltia més agressiu(122).

Altres mutacions recurrents, que es troben en menor freqüència que les anteriors, han estat identificades gràcies als estudis de seqüenciació amb grans cohorts de pacients amb LLC. Un d'aquests gens és POT1, que participa en el manteniment dels telòmers. Les mutacions en aquest gen es troben aproximadament en un 3% dels pacients amb LLC. Tots els pacients amb

INTRODUCCIÓ

aquesta mutació pertanyen al subgrup amb LLC no mutada i la majoria es troben en estadis avançats al moment del diagnòstic(82,117). Un altre és el gen XPO1 que es troba mutat en el 2% dels pacients amb LLC, freqüentment amb LLC no mutada, amb sobreexpressió de CD38 o amb alta expressió de ZAP-70. Malgrat la seva relació amb marcadors de mal pronòstic, les mutacions en XPO1 no estan associades amb un mal pronòstic de la malaltia(112,123). El gen NFKBIE codifica per un regulador negatiu de la via NF- κ B i es troba mutat en una petita proporció de pacients amb LLC (1-3%), els quals majoritàriament pertanyen a subgrups de mal pronòstic(98). Finalment el gen EGR2, el qual segons un estudi recent es troba mutat en el 4% dels pacients amb LLC. Les mutacions en aquest gen estan associades amb pacients joves, estadis clínics avançats, alta expressió de CD38, absència de mutacions als gens de les IGHV i amb un pronòstic desfavorable(124).

S'han identificat mutacions en d'altres gens, però que encara no es coneix bé el seu paper en la LLC. Alguns d'ells son per exemple el gen CHD2 que participa en la remodelació de la cromatina i està associat amb el subgrup de pacients amb LLC mutada(125), el gen SAMHD1 que participaria en la reparació del DNA i les mutacions en aquest gen podrien promoure el desenvolupament de la malaltia(126) o el gen PAX5 que codifica per un factor de transcripció amb un paper clau en el desenvolupament dels limfòcits B i amb funció oncogènica(127).

La majoria dels estudis de seqüenciació posen en evidència la heterogeneïtat genètica intertumoral i intratumoral i l'existència de subclones tumorals, demostrant que durant la progressió de la malaltia es produeix una evolució clonal provocada per una competició entre les diferents subclones tumorals. És a dir, l'expansió de poblacions subclonals amb el temps (mutacions que en fases inicials es detecten de manera subclonal i minoritària, es troben en una proporció més gran en fases avançades, quan la malaltia ha progressat) o bé la desaparició en fases avançades de poblacions tumorals amb mutacions detectades en fases inicials(128,129). En canvi hi ha pocs estudis que mostrin la identitat, la freqüència, l'evolució de les alteracions genètiques subclonals i el seu impacte en el curs clínic de la malaltia. Amb l'objectiu d'analitzar l'impacte d'aquestes mutacions subclonals en el desenvolupament de la LLC, Landau i col·laboradors van realitzar la

INTRODUCCIÓ

seqüenciació de l'exoma de mostres de pacients amb LLC i van identificar varies mutacions i alteracions moleculars amb un efecte funcional en la patogènia de la LLC (*driver mutations*) com per exemple la deleció 13q, la trisomia 12 i les mutacions en MYD88 que son clonals, fet que suggereix que podrien ser mutacions inicials de la malaltia i també mutacions en gens com ATM, TP53 i SF3B1, que es troben de manera subclonal en fases inicials però que la seva freqüència augmenta durant l'evolució de la malaltia, degut a que el tractament quimioteràpic elimina els clons dominants i per tant afavoreix l'expansió d'aquests subclons més agressius(130). Posteriorment, un altre estudi realitzat per Landau en el qual va seqüenciar el genoma de mostres aparellades de LLC (abans del tractament amb FCR i després de la recaiguda) va permetre la identificació de noves "driver mutations" com per exemple les que afecten als gens PTPN11 (1.3%) i FUBP1 (1.75%) que podrien modular l'activitat de MYC i als gens RAS (4.1%), BRAF (3.7%) i MAP2K1 (2%) que participen en la via de senyalització de les MAPK (de l'anglès *mitogen-activated protein kinase*)(131).

2.4.4 MicroRNAs

2.4.4.1. Biogènesi i funció dels microRNAs

Els microRNAs o miRNAs son RNAs monocatenaris no codificants que tenen una longitud d'entre 19 i 25 nucleòtids. La biogènesi dels miRNAs comença al nucli, on els gens de microRNA son transcrits per la RNA polimerasa II, generant una molècula de RNA llarga (aproximadament 1 kb) que conté una regió central de RNA de cadena doble, un llaç o forquilla terminal ("*loop*") i dues regions de cadena simple amb una caputxa a l'extrem 5' i una cua de poli-adenines (poli-A) a l'extrem 3', conguda com a microRNA primari (pri-miRNAs)(132). A continuació, aquest pri-miRNA és processat pel complex microprocessador format per l'endonucleasa RNAsa III (Drosha) i la proteïna DGCR8 (de l'anglès *DiGeorge syndrome critical region in gene 8*)(133). La proteïna DGCR8 reconeix la zona d'unió del RNA de cadena simple amb cadena doble i posiciona l'endonucleasa Drosha a una distància d'11 nucleòtids d'aquest punt d'unió on es produirà un tall, que generà el microRNA precursor (pre-miRNA) el qual conté l'estructura de RNA de cadena

INTRODUCCIÓ

doble i el “*loop*” terminal i té menor longitud que el pri-miRNA, concretament entre uns 60 i 70 nucleòtids(134–136).

Els pre-miRNAs son exportats des de el nucli cap al citosol mitjançant exportines del tipus 5 (XPO-5) en un procés dependent d'energia (Ran-GTP)(137). Un cop al citosol, els pre-miRNAs son novament processats per l'acció d'un segon enzim RNAsa III, anomenat Dicer (responsable de la longitud uniforme de 22 nucleòtids aproximadament que tenen tots els miRNAs, a l'eliminar el “*loop*” terminal)(138) que actua conjuntament amb la proteïna TRBP (de l'anglès *trans-activation response RNA-binding protein*) i la proteïna quinasa PRKRA (de l'anglès *protein-kinase, interferon-inducible double-stranded RNA-dependent activator*). Sembla que aquestes proteïnes associades a Dicer no son necessàries pel processament dels pre-miRNAs, si no que la seva funció és la formació del complex RISC (de l'anglès *RNA-induced silencing complex*)(139). Un cop generat el miRNA dúplex, d'uns 22 nucleòtids, s'uneix amb les proteïnes de la família argonauta (Ago 1-4). Una de les cadenes (cadena passatgera) serà degradada mentre que l'altre (cadena guia) es mantindrà unida amb la proteïna Ago facilitant així la incorporació d'aquesta cadena guia al complex RISC format per Dicer, TRBP i/o PRKRA i les proteïnes de la família Ago, que en conjunt conformen la maquinaria catalítica, que serà dirigida fins al RNA missatger diana(139,140). S'ha demostrat que l'activitat endonucleasa d'Ago és responsable de la degradació de la cadena complementaria(141).

La principal funció dels miRNAs és la regulació de l'expressió gènica a nivell post transcripcional, degradant el RNA missatger o bé inhibint la traducció proteica. També exerceixen altres funcions, com son l'estabilització del RNA missatger o l'activació de la traducció(142). Els miRNAs tenen un paper important en gairebé tots els processos cel·lulars, com son la diferenciació, la proliferació, la regulació del cicle cel·lular i l'apoptosi. L'expressió alterada de certs miRNAs està associada amb la patogènesi de varis tipus de càncers, on poden actuar com a oncògens o supressors tumorals(143).

INTRODUCCIÓ

2.4.4.2. MicroRNAs en LLC

miRNAs associats amb les alteracions citogenètiques més comunes

El primer miRNA involucrat en una malaltia es va descriure en la LLC. Concretament, va ser el clúster que conté els miRNAs miR-15a i miR-16-1 i que es troba delecionat o infraexpressat en la majoria de pacients amb LLC. Aquesta infraexpressió es correlaciona amb la pèrdua de la regió cromosòmica 13q, present en més de la meitat dels casos de LLC i associada amb bon pronòstic(54,101). Els miR-15a i miR-16-1 actuen com a gens supressors tumorals al regular l'expressió de varis gens involucrats en la proliferació cel·lular i l'apoptosi, com per exemple els oncògens BCL2 (de l'anglès *B-cell CLL/lymphoma 2*) i MCL1 (de l'anglès *myeloid cell leukemia 1*)(144). Aquest descobriment, suggeria la participació dels miRNAs en la patogènesi de la LLC.

Més endavant, la deleció 13q també es va associar amb la infraexpressió dels miR-16 i miR-363 i amb la sobreexpressió dels miR-146b-5p i miR-148a en els pacients amb LLC(145).

La deleció 11q, observada en el 20% dels pacients i associada amb mal pronòstic, sovint afecta al miR-34b i al clúster miR-34c(54,145) provocant la seva infraexpressió. Aquests miRNAs estan regulats per la proteïna p53, la qual s'uneix directament al promotor dels miR-34b/c i incrementa la seva expressió permeten que cooperin en la inhibició de la proliferació cel·lular(146). La deleció 11q també s'ha associat amb la sobreregulació dels miR-769-5p i miR-338-3p(145).

La trisomia 12 afecta al 16% dels pacients i és un factor de pronòstic intermedi. Els pacients amb aquesta alteració tenen una disminució significativa de l'expressió dels miR-155, miR-148a i miR-483-5p en comparació amb els pacients de LLC amb altres alteracions citogenètiques(145).

Finalment la deleció 17p, present en el 7% dels pacients amb LLC al moment del diagnòstic i associada amb molt mal pronòstic, provoca la pèrdua del gen TP53 i està associada amb la disminució de l'expressió dels miR-34a, miR-150 i miR-181b i amb la sobreexpressió dels miR-33b, miR-96, miR-155, miR-15a i miR-21 al comparar pacients amb la deleció 17p versus pacients sense la deleció(145,147). De fet l'alta expressió dels miR-21 i miR-155 es

INTRODUCCIÓ

correlaciona amb una menor supervivència global en comparació amb els pacients amb nivells baixos d'aquests miRNAs(147,148) i la baixa expressió del miR-181b s'associa amb una menor supervivència global i un menor temps lliure de tractament, observant-se que la seva expressió disminueix durant la progressió de la malaltia, fet que suggereix que aquest miRNA podria ser utilitzat com a marcador de progressió(149).

En un altre estudi es van comparar pacients de LLC amb alteracions en TP53 (deleció i/o mutacions) i amb pacients sense alteracions en aquest gen i es va observar que els miR-34a, miR-29c i miR-17-5p estaven significativament infraexpressats en les mostres dels pacients amb alteracions en TP53(150). La baixa expressió del miR-34a també s'ha detectat en pacients resistent a la fludarabina, de manera independent a la deleció 17p i a l'estat de TP53(151).

miRNAs associats amb altres factors pronòstics

L'expressió d'alguns miRNAs també s'ha associat amb altres factors pronòstics, com son l'estat mutacional dels gens de les IGHV, l'expressió de ZAP-70 i l'expressió de CD38. A més es va demostrar que algunes signatures de miRNAs podien distingir els limfòcits B normals de les cèl·lules de LLC i que estaven associades amb el pronòstic, la progressió, la resistència a drogues i l'estimulació del BCR(152–154). Al 2005, Calin i col·laboradors van identificar una signatura de 13 miRNAs (miR-15a, miR-195, miR-221, miR-23b, miR-155, miR-223, miR-29a-2, miR-29b-2, miR-29c, miR-24-1, miR-146, miR-16-1 i miR-16-2) que es correlacionava amb l'expressió de ZAP-70 i amb l'estat mutacional dels gens de les IGHV i per tant demostrava que els patrons d'expressió dels miRNAs tenien rellevància en el comportament biològic i clínic d'aquesta malaltia(155).

miRNAs circulants

Tot i que la majoria dels estudis es centren en l'anàlisi dels miRNAs expressats en les cèl·lules de LLC, també es poden detectar miRNAs en el plasma i sèrum dels pacients. De fet el número de miRNAs circulants en el plasma dels pacients de LLC és molt superior en comparació amb el número trobat en el plasma d'individus sans. Els miRNAs miR-150, miR-29a, miR-135 i

INTRODUCCIÓ

miR-195 son els que s'expressen de manera més diferencial i permeten discriminar el plasma de pacients del plasma d'individus sans. També hi ha una diferent expressió de miRNAs circulants segons l'expressió de ZAP-70 dels pacients de LLC. Per exemple, en el plasma de pacients amb alta expressió de ZAP-70 es detecten nivells superiors dels miR-29b i miR-144 mentre que en el plasma de pacients amb baixa expressió de ZAP-70 es detecten nivells superiors dels miR-205, miR-29a i miR-652(156).

2.4.4.3. MicroRNA miR-21

El miR-21 és un dels miRNAs que es troba sobreexpressat de manera més freqüent en tumors sòlids i hematològics, on participa en una gran varietat de processos oncogènics, com son el creixement cel·lular, la proliferació, l'apoptosi o la metàstasi(157). Aquest miRNA promou la supervivència cel·lular al bloquejar l'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi, com son els gens supressors tumorals PDCD4 (de l'anglès *programmed cell death protein 4*)(158) i PTEN (de l'anglès *phosphatase and tensin homolog*)(159), fet que afavoreix la senyalització a través de la via PI3K/Akt (de l'anglès *phosphatidylinositol 3-kinase pathway*). Generalment, l'alta expressió del miR-21 es relaciona amb el mal pronòstic, amb la resistència a la quimioteràpia i amb les fases més avançades de les neoplàsies(160). Lawrie i col·laboradors van mostrar que el miR-21 es trobava sobreexpressat en limfòcits B activats, sobretot en limfòcits B del centre germinal i cèl·lules B de memòria(161).

Per tal d'estudiar el paper del miR-21 en càncer, es va utilitzar un model murí que expressava aquest miRNA i es va observar que la sobreexpressió del miR-21 induïa l'aparició d'una síndrome limfoproliferativa pre-B, demostrant així el paper oncogènic d'aquest miRNA(162).

El miR-21 es troba sobreexpressat en la LLC(155,163) i es relaciona amb la resistència a la fludarabina(153), una major probabilitat de progressió i una menor supervivència global(147). També s'ha suggerit que la sobreexpressió d'aquest miRNA es produeix a nivell transcripcional i/o post-transcripcional i podria ser un dels esdeveniments iniciadors de la LLC(164).

Varis estudis han mostrat que la sobreexpressió del miR-21 en LLC pot estar induïda per l'estimulació del BCR(165,166), per l'estimulació del CD40(167)

INTRODUCCIÓ

o per la IL-4 produïda pels limfòcits T CD4+(168) suggerint que el miR-21 estaria implicat en el manteniment de la hiperactivació dels limfòcits B, fet que els acabaria conduint a la transformació maligne(169). Coincidint amb aquestes observacions, estudis que comparaven l'expressió gènica entre les cèl·lules de LLC procedents dels ganglis limfàtics o bé de sang perifèrica, van mostrar que l'expressió del miR-21 era significativament superior en les cèl·lules leucèmiques dels ganglis limfàtics, compartiment on el BCR està més activat i les cèl·lules de LLC reben estímuls de supervivència i proliferació(167,170).

2.4.5 Microambient

Les cèl·lules de LLC depenen altament dels senyals de supervivència, proliferació i quimioresistència procedents de les cèl·lules accessòries i factors solubles del microambient de la medul·la òssia i dels òrgans limfàtics secundaris. Les interaccions entre les cèl·lules de LLC i els components cel·lulars del microambient tenen un paper clau en la patogènesi de la malaltia(171,172). El paper del microambient en la supervivència de les cèl·lules de LLC, va prendre rellevància a l'observar que aquestes cèl·lules morien ràpidament per apoptosi quan eren cultivades *in vitro*, però en canvi *in vivo*, es produïa l'acumulació progressiva de cèl·lules leucèmiques en sang perifèrica, medul·la òssia i òrgans limfàtics secundaris(173). Una altra observació remarcable, era que la majoria de cèl·lules de LLC presents en sang perifèrica es trobaven en estat quiescent, aturades en fase G0/G1 del cicle cel·lular, mentre que les cèl·lules presents als teixits proliferaven de manera activa, amb una taxa de naixement diària d'entre el 0,1% al 1,76%(174). Aquestes observacions indicaven que la supervivència prolongada de les cèl·lules de LLC no era una capacitat intrínseca de la pròpia cèl·lula si no que depenia de senyals externes procedents del microambient i que el compartiment de les cèl·lules de LLC en estat quiescent, estava nodrit per les cèl·lules leucèmiques procedents del compartiment proliferant. Per tant hi havia una recirculació contínua de cèl·lules tumorals entre la sang perifèrica, la medul·la òssia i els òrgans limfàtics secundaris(175).

Les cèl·lules de LLC proliferen principalment als ganglis limfàtics i en menor grau, a la medul·la òssia i a la melsa, concretament dintre d'unes

INTRODUCCIÓ

estructures histològiques anomenades centres de proliferació o pseudofol·licles(176). Els centres de proliferació son el resultat de l'acumulació de cèl·lules leucèmiques proliferants que estan en contacte amb limfòcits T CD4+ activats (la majoria expressen el CD40L), cèl·lules estromals i cèl·lules dendrítiques fol·liculars(177). La interacció de les cèl·lules de LLC amb els limfòcits T a través de la unió del receptor CD40 amb el CD40L, afavoreix la supervivència i la proliferació de les cèl·lules leucèmiques. A més, la senyalització del CD40 en les cèl·lules de LLC, indueix l'expressió de molècules anti-apoptòtiques com la survivina, la Bcl-xL i la Mcl-1(177–179).

2.4.5.1. Compartiments anatòmics de la LLC

Com ja s'ha comentat, les cèl·lules de LLC recirculen entre la sang perifèrica, la medul·la òssia i els teixits limfàtics secundaris (principalment els ganglis limfàtics)(175). En cadascun d'aquests compartiments, es produeix una comunicació recíproca entre les cèl·lules de LLC i les cèl·lules accessòries del microambient.

Sang perifèrica

Les cèl·lules de LLC presents en sang perifèrica, es troben majoritàriament en estat quiescent, tot i això estudis recents mostren que l'endoteli vascular interacciona amb les cèl·lules de LLC proporcionant senyals de supervivència. En aquest compartiment, les cèl·lules de LLC també estan en contacte amb limfòcits T CD4+ i CD8+ però que presenten defectes de funcionalitat(180). Els pacients amb LLC tenen un major numero de limfòcits T (tant CD4+ com CD8+) en sang perifèrica, en comparació amb individus sans(181,182). El numero de limfòcits T CD8+ és una mica superior, fet que provoca que la ratio CD4/CD8 sigui baixa(183).

Medul·la òssia

El microambient de la medul·la òssia està format per varies poblacions cel·lulars, entre elles BMCSs, cèl·lules endotelials i cèl·lules dendrítiques fol·liculars. Les BMSCs son el component principal d'aquest compartiment i

INTRODUCCIÓ

tenen un paper important en la protecció de les cèl·lules leucèmiques davant l'apoptosi espontània i induïda per drogues. La retenció de les cèl·lules tumorals a la medul·la òssia es considera un factor clau en la resistència a fàrmacs i en la persistència de la malaltia mínima residual(184).

Ganglis limfàtics

Els ganglis limfàtics son essencials en la patogènia de la LLC ja que son el compartiment principal on proliferen les cèl·lules de LLC, concretament als centres de proliferació o pseudofol·licles(176). El microambient dels ganglis limfàtics està format per limfòcits T, cèl·lules estromals, cèl·lules dendrítiques fol·liculars i cèl·lules d'origen monocític que in vitro es diferencien a “*nurse-like cells*” (NLCs). La interacció de les cèl·lules de LLC amb els components del microambient dels ganglis limfàtics provoca l'activació de les vies del BCR i NF- κ B i l'increment de l'expressió de gens involucrats en l'activació cel·lular, com CD38 i CD69 i de gens relacionats amb la proliferació, com Ki-67. A més a més, també s'observa una major expressió de proteïnes anti-apoptòtiques, com la survivina, la Bcl-xL i la Mcl-1(170,177–179,185).

2.4.5.2. Interaccions de les cèl·lules de LLC amb els components cel·lulars del microambient

Les cèl·lules de LLC interaccionen amb diferents components cel·lulars segons al compartiment anatòmic en el qual es troben. Les cèl·lules no tumorals que estan en contacte íntim amb les cèl·lules de LLC son les cèl·lules estromals, les NLCs, les cèl·lules endotelials, les cèl·lules dendrítiques fol·liculars i els limfòcits T. Les interaccions (per contacte directe o per factors solubles) amb aquests components regulen el trànsit, la supervivència i la proliferació de les cèl·lules de LLC.

Interaccions de les cèl·lules de LLC amb les cèl·lules estromals

Les BMSCs son cèl·lules mesenquimals que contribueixen al desenvolupament normal dels progenitors hematopoietics de la medul·la òssia. Les BMSCs creen nínxols a la medul·la òssia i estan en contacte directe amb

INTRODUCCIÓ

les cèl·lules de LLC, protegint-les de l'apoptosi espontània i induïda per drogues(184). Als òrgans limfàtics secundaris també hi ha cèl·lules estromals mesenquimals (MSCs, de l'anglès *mesenchymal stromal cells*) que es localitzen de manera difusa per tot el teixit i a les zones perivasculars, on es troben amb les cèl·lules de LLC(186). Les MSCs dels ganglis limfàtics son diferents que les BMSCs però tenen la mateixa funció protectora de les cèl·lules de LLC.

La interacció entre les BMSCs/MSCs i les cèl·lules de LLC es realitza principalment a través de la unió del CD100 (expressat per les cèl·lules de LLC) amb el receptor plexina B1 (expressat per les BMSCs/MSCs) i a través de la unió de VCAM1 (de l'anglès *vascular cell adhesion molecule 1*) amb la integrina VLA-4 (de l'anglès *very late antigen-4*) present a les cèl·lules de LLC, entre d'altres mecanismes.

La interacció amb les BMSCs/MSCs provoca l'activació de la via de senyalització de NOTCH, que promou la supervivència i quimioresistència de les cèl·lules de LLC, al provocar la sobreexpressió de c-MYC(187) i també provoca l'increment de la producció dels factors proangiogènics VEGF (de l'anglès *vascular endothelial growth factor*) i PDGF (de l'anglès *platelet-derived growth factor*) per part de les cèl·lules de LLC(188–190), les quals també expressen el receptor de VEGF(191). Les cèl·lules estromals produeixen VEGF i PDGF que promouen, juntament amb els secretats per les pròpies cèl·lules de LLC, la supervivència i la quimioresistència de les cèl·lules leucèmiques(192,193).

Les cèl·lules de LLC també beneficien a les BMSCs/MSCs activant-les a través de la inducció de l'expressió de la PKC β II (de l'anglès *protein kinase C beta II*) i de l'activació de la via NF-k β (194).

La secreció constitutiva de quimiocines per part de les BMSCs/MSCs provoca la migració i retenció de les cèl·lules de LLC als teixits(195). La CXCL12, és una de les principals quimiocines secretades per les cèl·lules estromals que s'uneix al receptor CXCR4 de les cèl·lules de LLC i provoca la internalització del receptor. Aquesta internalització i per tant disminució de l'expressió de CXCR4 facilita que les cèl·lules de LLC puguin retornar a la sang perifèrica, donant lloc a la recirculació de les cèl·lules leucèmiques entre els diferents compartiments(196). CXCL12 té un paper clau en el reclutament i

INTRODUCCIÓ

retenció de les cèl·lules tumorals als teixits limfàtics i a la medul·la òssia i en l'increment de la supervivència del clon leucèmic a través de l'activació de les vies MAPK i PI3K/Akt(197–200).

Estudis recents, mostren que les BMSCs indueixen l'increment de l'expressió de marcadors de mal pronòstic com CD38(201) i la disminució de l'expressió del CD20 (202) en les cèl·lules de LLC.

Interaccions de les cèl·lules de LLC amb les NLCs

Les NLCs són d'origen monocític i en la LLC corresponen als macròfags associats al tumor presents en tumors sòlids(203) i tenen un fenotip de macròfag tipus M2 (funció antiinflamatòria) amb expressió dels marcadors CD14, CD11b, CD68 i CD163(203–205). Es troben a la melsa i ganglis limfàtics dels pacients amb LLC. Les NLCs es diferencien de manera espontània a partir de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica de pacients amb LLC cultivades *in vitro*. Les NLCs originades són capaces d'atraure les cèl·lules de LLC i promoure la seva supervivència i protegir-les de l'apoptosi espontània i induïda per fàrmacs, a través de la producció de CXCL12, l'expressió de BAFF (de l'anglès *B-cell activating factor*) i APRIL (de l'anglès *proliferation-inducing ligand*) que interaccionen amb els receptors BAFF-R (de l'anglès *BAFF-receptor*), TACI (de l'anglès *transmembrane activator and CAML interactor*) i BCMA (de l'anglès *B cell maturation antigen*) i l'expressió d'antígens com vimentina i calreticulina que activen el BCR(206–209). A més, el perfil d'expressió gènica de les cèl·lules de LLC després d'estar en co-cultiu amb les NLCs (activació de les vies del BCR i NF- κ B i sobrerregulació de gens diana del BCR, com CCL3 i CCL4) és molt semblant al de les cèl·lules de LLC aïllades dels teixits limfàtics secundaris. Aquesta observació dona suport a que les NLCs són un bon model per reproduir el microambient dels teixits limfàtics (170,207). Les NLCs també expressen CD31 i plexina B1, que al unir-se amb els seus respectius receptors CD38 i CD100, indueixen la supervivència i proliferació de les cèl·lules de LLC(210). A més a més, les NLCs indueixen la migració de les cèl·lules leucèmiques cap als teixits, a través de la secreció de les quimiocines CXCL12(206) i CXCL13(200) que interaccionen amb els receptors CXCR4 i CXCR5 respectivament.

INTRODUCCIÓ

Interaccions de les cèl·lules de LLC amb les cèl·lules endotelials

La interacció de les cèl·lules de LLC amb l'endoteli activat és essencial durant la migració des de la sang perifèrica a la medul·la òssia i als òrgans limfàtics secundaris. Un cop les cèl·lules de LLC arriben als nínxols tissulars, reben estímuls de supervivència, activació i quimioresistència procedents de les cèl·lules endotelials(211). Les cèl·lules de l'endoteli protegeixen les cèl·lules de LLC de l'apoptosi espontània i induïda per fàrmacs i estimulen la proliferació cel·lular gràcies al contacte directe cèl·lula – cèl·lula regulat per les interaccions entre les integrines VLA-4 i FLA-1 (de l'anglès *lymphocyte function-associated antigen 1*) i les molècules d'adhesió VCAM-1 i ICAM-1 (de l'anglès *intercellular adhesion molecule 1*) respectivament i també per les interaccions entre BAFF i APRIL amb els receptors BAFF-R, TACI i BCMA. Aquestes interaccions provoquen l'activació de la via NF- κ B resultant en la inducció de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Mcl-1(212). Al mateix temps, els factors BAFF i APRIL endotelials, també incrementen l'expressió del CD40L de les cèl·lules de LLC(213).

Recentment s'ha observat que les cèl·lules de LLC expressen nivells elevats d'endotelina-1 que s'uneix al receptor ETAR (de l'anglès *endothelin subtype A receptor*) de les cèl·lules endotelials i promou la supervivència, el creixement i la quimioresistència de les cèl·lules leucèmiques(214). Les cèl·lules endotelials també expressen CD31 i plexina B1, que al unir-se amb els seus receptors, promouen la supervivència i proliferació de les cèl·lules de LLC(210). Pel que fa a les cèl·lules endotelials de les vècules dels ganglis limfàtics, s'ha descrit que secreten grans quantitats de quimiocines CCL19 i CCL21 que permeten el reclutament de les cèl·lules de LLC circulants que expressen el receptor CCR7(215).

Interaccions de les cèl·lules de LLC amb les cèl·lules dendrítiques fol·liculars

Les cèl·lules dendrítiques fol·liculars son essencials per reclutar i retenir les cèl·lules de LLC als fol·licles limfàtics i protegir-les de l'apoptosi a través de la producció de la quimiocina CXCL13 que s'uneix al receptor CXCR5 de les cèl·lules de LLC, de l'expressió del receptor LT β R (de l'anglès *lymphotoxin beta*

INTRODUCCIÓ

receptor) que interacciona amb la limfotoxina $\alpha\beta$ produïda per les cèl·lules de LLC i de l'expressió del receptor plexina B1 que s'uneix amb la proteïna transmembrana CD100 de les cèl·lules de LLC(172).

Interaccions de les cèl·lules de LLC amb els limfòcits T

Els pacients amb LLC tenen un augment del nombre global de limfòcits T CD4+ i CD8+ circulants, fet que s'associa amb estadis clínics de la malaltia més avançats(216). Aquests limfòcits T presenten una funcionalitat alterada; son incapaçs de formar sinapsis immunològiques eficients(217), tenen una motilitat reduïda(218) i tenen una major expressió de marcadors d'exhaustió, com per exemple CD244, CD160 i PD1 (de l'anglès *programmed cell death protein 1*)(216,219). Aquesta funcionalitat alterada dels limfòcits T permet que el clon leucèmic pugui escapar de la immuno-vigilància(220). Però malgrat tenir aquest fenotip exhaust, els limfòcits T dels pacients amb LLC conserven la capacitat de producció de citoquines com IFN γ (de l'anglès *interferon gamma*) i TNF α (de l'anglès *tumor necrosis factor α*)(221).

Als centres de proliferació de la medul·la òssia i dels ganglis limfàtics també hi ha limfòcits T, majoritàriament CD4+, que tenen un paper essencial en la inducció de la proliferació i de la supervivència de les cèl·lules de LLC. La interacció del CD40L expressat pels limfòcits T amb el CD40 expressat per les cèl·lules de LLC és un dels estímuls més importants del microambient, ja que protegeix les cèl·lules leucèmiques de l'apoptosi espontània i induïda per fàrmacs i juntament amb l'activació del BCR promou la supervivència cel·lular(222). La interacció CD40-CD40L provoca l'activació de les vies PI3K/Akt, MAPK i NF- $\kappa\beta$ que indueixen l'increment de l'expressió de les proteïnes antiapoptòtiques Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL i survivina(178,179). Els limfòcits T també secreten factors solubles que promouen la supervivència com per exemple IL-4(223), IL-13(224), IFN- α (225) i IFN- γ (226) o factors solubles que promouen la proliferació com IL-15(227) i TNF α (228).

INTRODUCCIÓ

Altres interaccions de les cèl·lules de LLC

A part dels senyals que les cèl·lules de LLC reben dels components cel·lulars del microambient hi ha altres interaccions i senyals que contribueixen en la inducció de la supervivència i proliferació del clon leucèmic.

Les cèl·lules de LLC tenen una alta expressió de l'antigen CD44 que actua com a receptor de l'àcid hialurònic de la matriu extracel·lular del microambient dels teixits limfàtics secundaris. Aquesta interacció promou la supervivència de les cèl·lules de LLC, a causa de l'activació de les vies de senyalització PI3K/Akt i MAPK que indueixen l'expressió de la proteïna antiapoptòtica Mcl-1(229).

Les cèl·lules de LLC també expressen els lligands BAFF i APRIL a banda de l'expressió dels receptors BAFF-R, TACI i BCMA. La interacció d'aquests lligands amb els seus receptors promou la supervivència a través de l'activació de la via NF- κ B i la proliferació a través de la inducció de c-MYC per part de BAFF. Les cèl·lules de LLC, per tant, poden regular de manera autocrina aquesta interacció i també de manera paracrina en resposta a l'expressió de BAFF i APRIL per part de les NLCs i les cèl·lules endotelials, com s'ha comentat anteriorment(230,231). Les quimiocines CCL3, CCL4 i CCL22 son secretades per les cèl·lules de LLC, després de l'activació del BCR i la interacció CD40-CD40L. Aquestes quimiocines promouen el reclutament dels limfòcits T i altres cèl·lules accessòries cap als teixits, contribuint així a la creació d'un microambient tumoral favorable on les cèl·lules leucèmiques rebran estímuls de supervivència i proliferació(230).

INTRODUCCIÓ

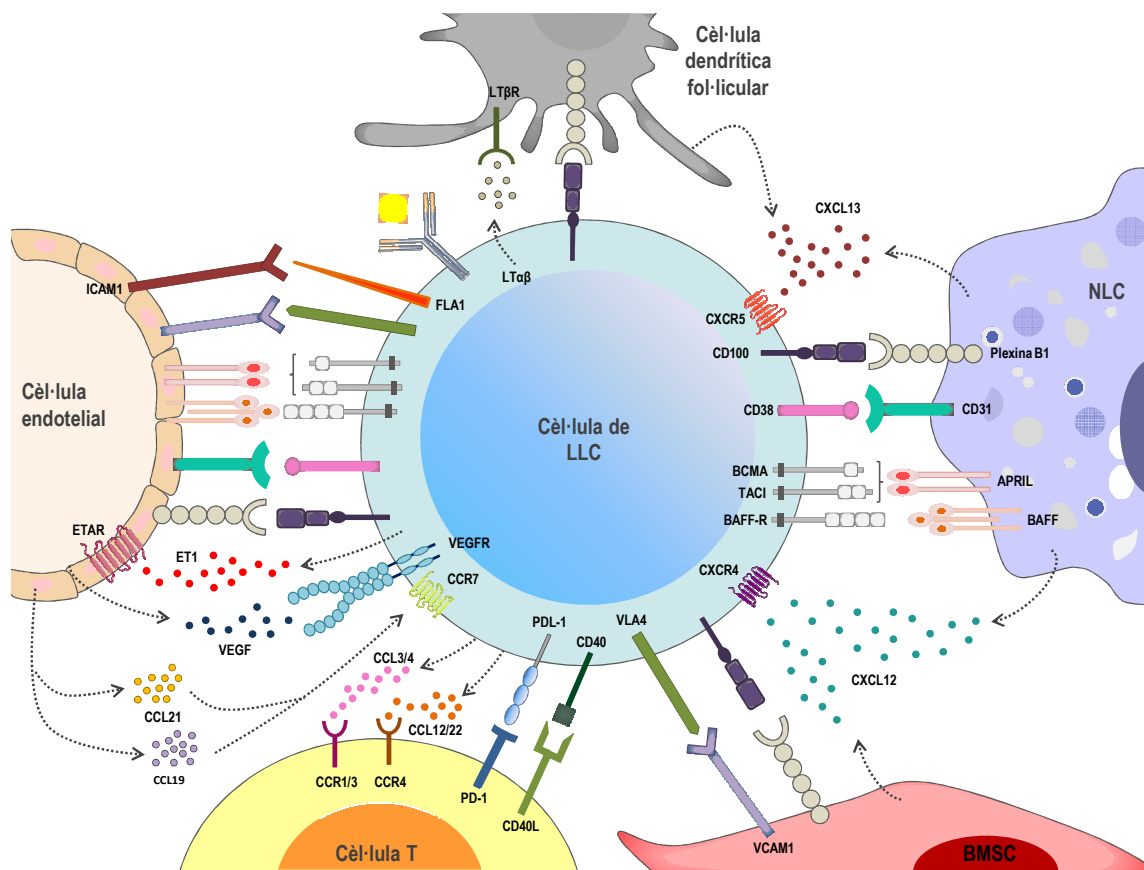


Figura 9. Representació esquemàtica dels principals components del microambient i de les seves interaccions moleculars amb les cèl·lules de LLC.
Elaboració pròpia

INTRODUCCIÓ

2.4.6. Receptor de les cèl·lules B

L'activació i senyalització del BCR és un mecanisme clau en la supervivència i proliferació de les cèl·lules de LLC i per tant en la patogènia d'aquesta malaltia(232). La importància de la senyalització del BCR en la LLC es va fer evident gràcies a la comparació dels perfils d'expressió gènica de cèl·lules de LLC procedents dels diferents compartiments anatòmics (sang perifèrica, medul·la òssia i ganglis limfàtics) que va demostrar que la senyalització del BCR era la principal via activada en les cèl·lules leucèmiques procedents dels ganglis limfàtics(170).

Un fet important en la LLC és que el repertori de gens de les regions variables de les cadenes pesades i lleugeres és diferent i esbiaixat en comparació amb el dels limfòcits B normals, observant-se una alta freqüència dels gens IGHV1-69, IGHV3-07, IGHV3-21,IGHV4-34, IGKV1-33, IGKV2-30, IGLV2-8 i IGLV3-21.

A més a més, el repertori dels gens de les regions variables també varia entre pacients mutats i no mutats, sent els gens IGHV3, IGHV4, IGKV2-30 i IGLV2-8 predominants en els casos mutats i els gens IGHV1, IGKV1-33 i IGLV3-21 predominants en els casos no mutats(233). També es va observar que una part dels pacients tenen seqüències d'aminoàcids altament homòlogues a les regions CDR3 (de l'anglès *complementarity determining region 3*) que són les encarregades del reconeixement del l'antigen. Aquest ús restringit de gens de les regions variables de les cadenes pesades i lleugeres, que a més comparteixen regions CDR3 pràcticament idèntiques, dona lloc als BCRs estereotipats(31,234,235). S'ha observat que més del 20% dels pacients expressen BCRs estereotipats i aproximadament l'1% tenen BCRs pràcticament idèntics(236). La presència dels BCRs estereotipats i la capacitat que tenen les cèl·lules dels pacients amb LLC procedents de sang perifèrica de recuperar l'expressió d'IgM de superfície *in vitro*, la qual es troba disminuïda *in vivo*, a causa de l'endocitosi induïda per la unió amb l'(auto-)antigen(237), suggereixen que la unió recurrent a grups restringits d'(auto-)antígens estaria vinculada amb la selecció de clons de limfòcits B normals que serien conduïts a la transformació leucèmica(238).

INTRODUCCIÓ

A banda de tenir un repertori diferent de gens del BCR segons l'estat mutacional dels gens de les IGHV, els pacients amb LLC mutada i no mutada els pacients amb LLC no mutada expressen una major proporció de reordenaments estereotipats dels segments V, D i J amb una regió CDR3 molt similar entre pacients i tenen BCRs altament polireactius que poden reconèixer tant antígens exògens com autoantígens i per tant el BCR té una major capacitat de senyalització(232,239). En canvi els pacients amb LLC mutada tenen una menor proporció de reordenaments estereotipats i tenen BCRs amb una reactivitat més limitada (mono o oligoreactius) que s'uneixen a conjunts restringits d'antígens i com a conseqüència el clon de cèl·lules de LLC es manté estable o s'expandeix lentament(232,239). A més els casos amb LLC no mutada tenen una major expressió de cadenes μ glicosilades (*in vivo* s'ha observat que la unió de l'antigen amb el BCR, disminueix la N-glicosilació de les IgM de superfície(240)) fet que disminueix la internalització de l'IgM de superfície i per tant incrementa la seva retenció en comparació amb els casos mutats. Una major expressió d'IgM de superfície augmenta la capacitat de senyalització i activa la proliferació i supervivència de les cèl·lules leucèmiques. En canvi, els casos amb LLC mutada tendeixen a expressar menys IgM de superfície, fet que provoca una capacitat reduïda de resposta que condueix les cèl·lules leucèmiques a un estat d'anèrgia(233,241). Aquestes diferències en la modulació de les IgM de superfície, probablement contribueixen en el diferent comportament clínic que té cada subgrup de pacients(241).

2.4.6.1. Senyalització del BCR

La unió de l'antigen a la Ig de superfície provoca l'agrupament de varis BCRs i el seu reclutament cap a dominis especialitzats de la membrana, anomenats vales lipídiques, que son zones enriquides amb glicoproteïnes i proteïnes adaptadores i transmissores de senyals. A més també provoca l'aproximació del correceptor format per les proteïnes de membrana CD2, CD19 i CD81, el qual potenciarà la resposta del BCR(242).

Immediatament després de la unió de l'antigen a la Ig de superfície es produeix l'aproximació i activació de les proteïnes tirosina quinasa Lyn (de l'anglès *Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase*) i Syk (de l'anglès *spleen*

INTRODUCCIÓ

tyrosine kinase) les quals fosforilen els motius ITAM (de l'anglès *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) de les cues citoplasmàtiques de les proteïnes CD79A i CD79B(243). La fosforilació dels motius ITAM crea llocs d'ancoratge per les proteïnes amb dominis SH2 (de l'anglès *Src homology 2*) Syk, Lyn i Btk (de l'anglès *Bruton's tyrosine kinase*). Les quinases Syk i Lyn activades, fosforilen les proteïnes adaptadores CD19, BCAP (de l'anglès *B-cell adaptor for phosphoinositide 3-kinase*) i BLNK (de l'anglès *B cell linker protein*) que representen el punt de sortida de varies vies de senyalització. CD19 i BCAP recluten la proteïna PI3K cap a la membrana plasmàtica on actuarà conjuntament amb BLNK per tal de fosforilar i activar la Btk, la qual activarà la PLCy2 (de l'anglès *phospholipase C gamma 2*)(244). L'activació de PLCy2 inicia una cascada de senyalització que involucra la hidròlisi de PIP2 (de l'anglès *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) per tal de generar els segons missatgers DAG (de l'anglès *diacylglycerol*) i IP3 (de l'anglès *inositol triphosphate*). El DAG provoca l'activació de la PKC i la conseqüent activació de la via de les MAPK i del factor de transcripció NF- κ B. L'IP3 indueix un increment de calci intracel·lular que provoca l'activació de la via de les kinases JNK (de l'anglès *c-Jun N-terminal kinases*). Conjuntament, aquests esdeveniments promouen la supervivència i proliferació dels limfòcits B(242).

El reclutament i activació de la PI3K provoca la fosforilació de PIP2 per tal de generar PIP3 (de l'anglès *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*) que reclutarà proteïnes tirosina quinasa com Btk i Akt (de l'anglès *protein kinase B*). Akt promou la supervivència cel·lular a través de varies vies, per exemple inactiva proteïnes proapoptòtiques com Bad i la procaspasa-9, també activa el factor de transcripció NF- κ B o provoca la inactivació del gen supressor tumoral TP53. Akt també activa la proteïna mTOR (de l'anglès *mammalian target of rapamycin*) que promou la síntesi proteica i el creixement cel·lular(242).

A diferència de l'activació del BCR induïda per l'antigen, explicada anteriorment, l'activació del BCR de manera independent d'antigen està caracteritzada per una senyalització basal contínua procedent del mateix BCR (senyal tònica). Fa uns anys, un estudi va demostrar que els limfòcits B madurs sense BCR eren rescatats de l'apoptosi gràcies a l'activació constitutiva de la via de senyalització de la PI3K i la conseqüent activació d'Akt, sense la participació del factor de transcripció NF- κ B ni l'activació d'ERK (de l'anglès

INTRODUCCIÓ

extracellular-signal-regulated kinase). Per tant, aquest estudi, suggeria el paper crucial de la PI3K i d'Akt en la senyalització tònica del BCR(245).

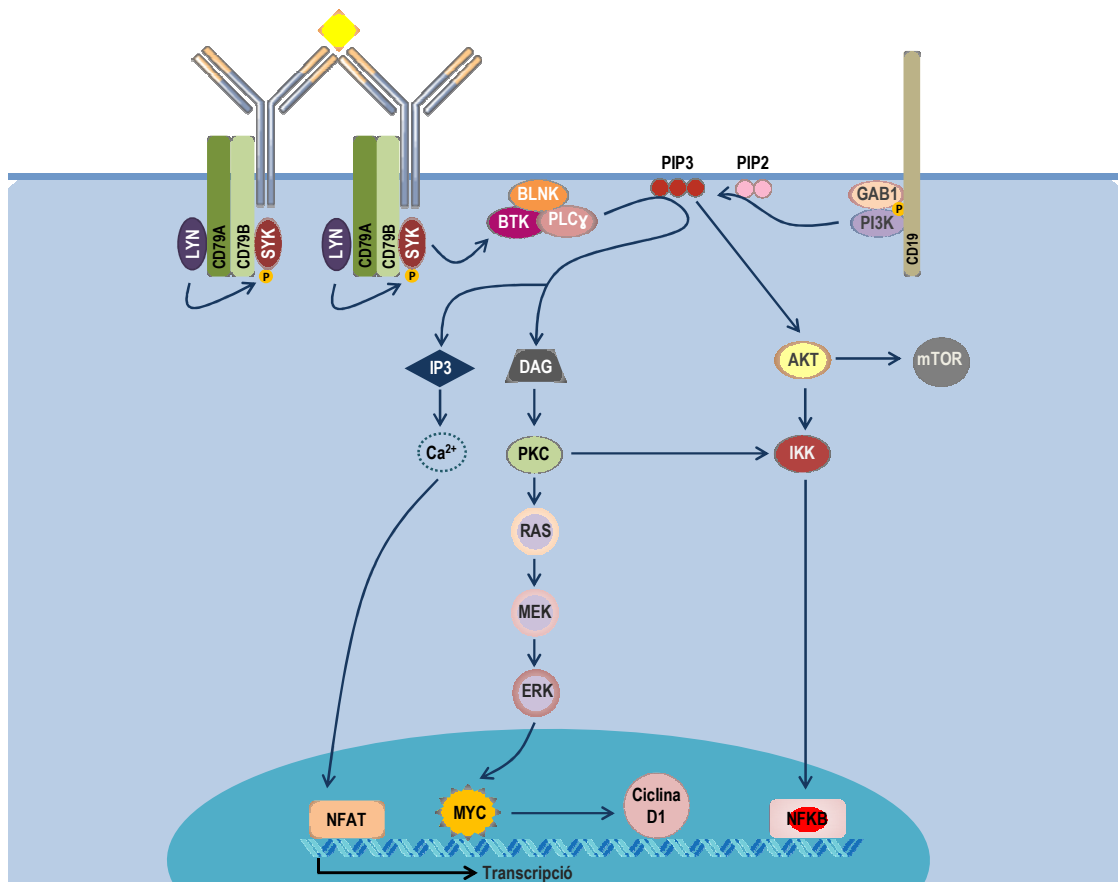


Figura 10. Esquema de la senyalització intracel·lular derivada de l'activació del BCR en els limfòcits B. Elaboració pròpia.

2.4.6.2. La proteïna Syk

Syk és una proteïna citoplasmàtica amb activitat tirosina quinasa que pertany a la família Syk/ZAP-70, que inclou únicament dos membres, Syk i ZAP-70, que són altament homòlegs a nivell estructural i funcional. Syk s'expressa en totes les cèl·lules hematopoètiques mentre que ZAP-70 s'expressa majoritàriament en els limfòcits T i en les cèl·lules NK. Inicialment es pensava que Syk només es trobava en els immunoreceptors implicats en la resposta immune adaptativa, però més endavant es va observar que la senyalització a través de la glicoproteïna VI, un receptor de col·lagen present a les plaquetes, es produïa per un mecanisme semblant(246). També es va

INTRODUCCIÓ

descriure la participació de Syk en altres funcions no immunològiques i en la senyalització d'altres receptors, com per exemple el receptor de quimiocines CXCR4, les integrines com VCAM1 i les lectines de tipus C(247).

Estructura i regulació de Syk

La proteïna Syk conté dos dominis SH2 situats a l'extrem amino terminal i un domini tirosina quinasa a l'extrem carboxi terminal. Els diferents dominis estan separats entre ells per regions intermèdies, anomenades interdominis. Hi ha l'interdomini A que separa els dominis SH2 entre ells i l'interdomini B que separa els dominis SH2 del domini tirosina quinasa(248).

En estat de repòs Syk es troba en una conformació inactiva, en la qual l'interdomini A i B es troben units al centre actiu del domini quinasa. Però quan els dominis SH2 s'uneixen als ITAMs fosforilats, els residus de tirosina Tyr348 i Tyr352 de l'interdomini B son fosforilats, provocant l'activació de Syk i induint un canvi conformacional que permetrà la fosforilació dels residus Tyr525 i Tyr526 del domini quinasa, que actuaran com a llocs d'unió per altres proteïnes que al ser fosforilades permetran l'activació de varies vies de senyalització intracel·lulars(248). Syk també està regulada negativament per l'acció de fosfatases i és el balanç entre l'activitat de Syk i la de les fosfatases el que determina l'activació o inhibició de la quinasa(249). Per una altra banda, les proteïnes ubiquitin lligasa com CBL (de l'anglès *casitas B-lineage lymphoma*) regulen de manera negativa l'expressió de Syk provocant la seva ubiquitinització i posterior degradació(250).

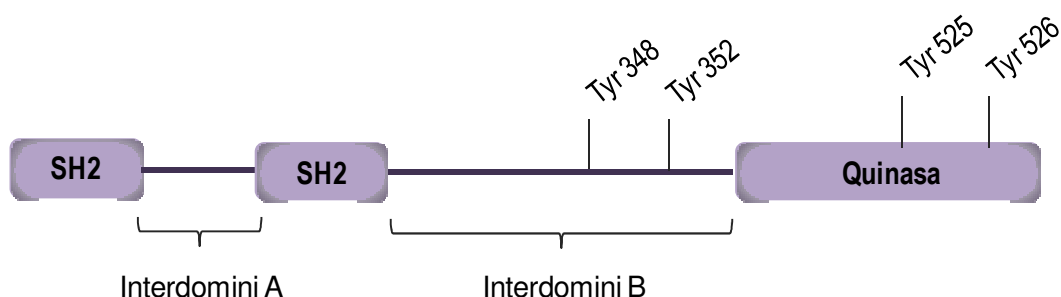


Figura 11. Estructura molecular de SYK.Elaboració pròpia.

INTRODUCCIÓ

Syk en els limfòcits B normals

La proteïna Syk és essencial pel desenvolupament dels limfòcits B normals, concretament per la transició del limfòcit pro-B a pre-B. La deficiència de Syk en ratolins, provoca una acumulació a la medul·la òssia de limfòcits B immadurs en fase pro-B. Això va mostrar que Syk té un paper clau en la senyalització del pre-BCR(251,252).

També es va demostrar que Syk és crucial per la supervivència i manteniment dels limfòcits B madurs normals(252). A part del seu paper en la resposta immune, també es va descriure que l'activació de Syk modula l'adhesió i la quimiotaxis dels limfòcits B normals, suggerint que Syk participaria en la migració i retenció tissular dels limfòcits B activats(253,254). Com ja s'ha explicat, després de la unió de l'antigen a la Ig, Syk és reclutada cap al BCR on és fosforilada. Un cop activada, Syk s'encarrega de propagar la senyal al associar-se amb proteïnes adaptadores i fosforilar altres proteïnes que participen en varies vies de senyalització intracel·lular que regularan la supervivència i proliferació. Per tant, la proteïna Syk és essencial per la transmissió i amplificació de la senyal del BCR.

Syk en les cèl·lules de LLC

Fa uns anys es va observar que Syk estava activada constitutivament en les cèl·lules de LLC, a causa de la fosforilació del residu activador de l'interdomini B Tyr352 per part de Lyn(255). A més Syk està sobrerregulada tant a nivell de RNA missatger com a nivell proteïc en les cèl·lules de LLC en comparació amb els limfòcits B normals(256).

2.4.6.3. La proteïna ZAP-70

ZAP-70 és una proteïna citoplasmàtica amb activitat tirosina quinasa que té un paper crucial en el desenvolupament i activació dels limfòcits T i en la senyalització de les cèl·lules NK(257).

ZAP-70 es va identificar per primera vegada associada a la cadena zeta (ζ) del complex del receptor de les cèl·lules T o TCR (de l'anglès *T-cell receptor*) en la línia cel·lular Jurkat (cèl·lules T de leucèmia limfoblàstica aguda) a l'any 1991(258). El complex del TCR està format per un heterodímer de dues

INTRODUCCIÓ

cadena protèiques transmembrana i altament variables associades de manera covalent per ponts disulfur. La seva funció és el reconeixement de l'antigen. En la majoria de limfòcits T aquest heterodímer està format per les cadenes α i β però de manera menys freqüent també pot estar format per les cadenes γ i δ . Al mateix temps, aquest heterodímer $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ està associat de manera no covalent amb les proteïnes CD3 γ , δ i ϵ (que formen els heterodímers $\gamma\epsilon$ i $\delta\epsilon$) i amb la cadena ζ (que forma un homodímer). CD3 i ζ són idèntiques en tots els limfòcits T i s'encarreguen de la transmissió de la senyal.

Varis estudis han revelat la importància de ZAP-70 en els limfòcits T. En un d'ells es va observar que els pacients deficients en aquesta proteïna no tenien limfòcits T funcionals en sang perifèrica i com a conseqüència desenvolupaven una immunodeficiència combinada greu (SCID de l'anglès *severe combined immunodeficiency*)(259). En un altre es va mostrar que els ratolins amb deficiència de ZAP-70 no tenien un desenvolupament correcte dels limfòcits T(260) i finalment es va observar que la deficiència de ZAP-70 en cèl·lules derivades de la línia cel·lular Jurkat, provocava una falta d'activació de les vies de senyalització després de l'estimulació del TCR(261).

Estructura i regulació de la proteïna ZAP-70

La proteïna ZAP-70 té una estructura homòloga a la proteïna Syk, formada per dos dominis SH2 i un domini tirosina quinasa separats entre ells per l'interdomini A i l'interdomini B, el qual separa els dominis SH2 del domini tirosina quinasa(262).

Els dominis SH2 s'uneixen als residus de tirosina fosforilats dels motius ITAM de les regions citoplasmàtiques de les proteïnes CD3 i de les cadenes ζ del TCR. L'interdomini A s'encarrega de facilitar i estabilitzar aquesta unió(263). Després de que ZAP-70 s'uneixi al TCR els residus tirosina Tyr492 i Tyr493 situats al domini quinasa, són fosforilats per la quinasa Lck (de l'anglès *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) i es produeix l'activació enzimàtica completa de ZAP-70(264). L'interdomini B conté els residus tirosina Tyr292, Tyr315 i Tyr319 que també són fosforilats després de l'estimulació del TCR. Concretament els residus Tyr315 i Tyr319 actuen com a reguladors positius de ZAP-70 ja que estabilitzen la conformació activa de la proteïna i actuen com a

INTRODUCCIÓ

llocs d'unió per altres proteïnes que al ser fosforilades permetran l'activació de varies vies de senyalització intracel·lular i per tant la transducció de la senyal a través del TCR. En canvi el residu Tyr493 actua com a regulador negatiu al provocar la unió de proteïnes reguladores que inactiven la funció quinasa de ZAP-70(264,265).

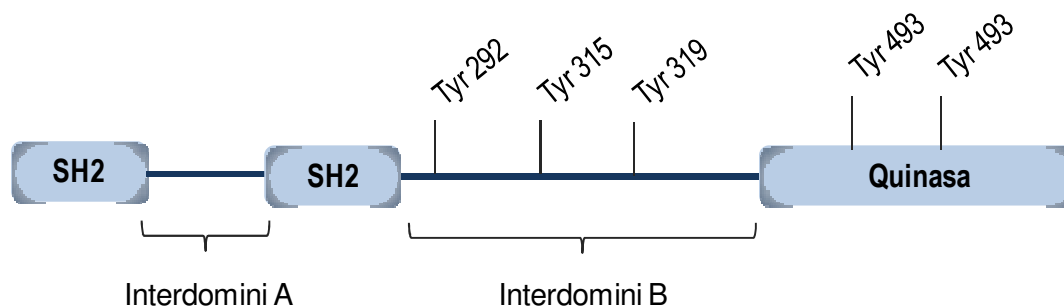


Figura 11. Estructura molecular de ZAP-70. Elaboració pròpia

ZAP-70 en limfòcits T i B normals

El TCR dels limfòcits T s'activa després de reconèixer els pèptids antigènics associats al complex major d'histocompatibilitat, present a la superfície de les cèl·lules presentadores d'antígens. En aquestes zones de contacte, entre el limfòcit T i la cèl·lula presentadora d'antígens, anomenades sinapsis immunològiques, és on es mobilitza el complex del TCR (format pel TCR, les proteïnes CD3 i les cadenes ζ), els correceptors CD4 o CD8 i les molècules transmissores de senyal. Just després de l'activació del TCR la proteïna ZAP-70 que es troba distribuïda pel citoplasma quan els limfòcits T estan en repòs, és reclutada ràpidament cap a la membrana plasmàtica i s'uneix als residus fosforilats dels motius ITAM de les cadenes ζ , on serà fosforilada per Lck, adquirint així la seva pròpia activitat tirosina quinasa. A continuació ZAP-70 fosforila altres proteïnes com LAT (de l'anglès *linker of activated T cells*) i SLP-76 (de l'anglès *SH2 domain-containing leukocyte protein of 76KDa*) que permetran l'activació d'altres proteïnes que participaran en varies vies de senyalització intracel·lular que acabaran promovent la supervivència, proliferació i diferenciació cel·lular(266).

INTRODUCCIÓ

Inicialment es pensava que la proteïna ZAP-70 es trobava expressada exclusivament en limfòcits T i cèl·lules NK(262) però més endavant es va demostrar que ZAP-70 també s'expressava en limfòcits pro-B i pre-B, suggerint que la seva presència era important pel desenvolupament dels limfòcits B(267).

ZAP-70 en cèl·lules de LLC

L'expressió de ZAP-70 en limfòcits pro-B i pre-B va ser un descobriment inesperat, ja que fins al moment no s'havia descrit l'expressió d'aquesta proteïna en limfòcits B normals.

L'estudi del perfil d'expressió gènica de pacients amb LLC va mostrar que l'expressió de certs gens es correlacionava amb l'estat mutacional dels gens de les IGHV. Precisament ZAP-70 va ser un dels gens que s'expressava de manera més diferencial entre els dos subgrups de pacients. Aquest estudi aportava per primera vegada informació molecular sobre els mecanismes biològics que conduïen als diferents comportaments clínics entre els dos subgrups de pacients(40). Crespo i col·laboradors, van confirmar que els pacients sense mutacions als gens de les IGHV expressaven nivells alts de ZAP-70 comparables amb els nivells expressats pels propis limfòcits T. En canvi els pacients amb mutacions als gens de les IGHV expressaven nivells baixos o indetectables de ZAP-70. També van mostrar que ZAP-70 es correlacionava amb la progressió de la malaltia i la supervivència dels pacients(39). Posteriorment es va observar que l'expressió de ZAP-70 es mantenia constant durant el curs de la malaltia i tenia una valor predictiu superior al de l'estat mutacional dels gens de les IGHV(268).

Per tant, aquestes observacions mostraven que l'expressió de ZAP-70 permetia identificar un subgrup de pacients amb un curs clínic més agressiu i una major probabilitat de progressió.

El fet que ZAP-70 tingués un paper crucial en la senyalització del TCR i que fóra homòloga funcional i estructuralment a Syk, feia pensar que podria estar relacionada amb l'increment de la senyalització del BCR en els pacients amb LLC no mutada. Aquesta hipòtesi es va confirmar gràcies a varis estudis que van mostrar que les cèl·lules dels pacients amb LLC no mutada i amb alts nivells d'expressió de ZAP-70 tenien una major fosforilació de les proteïnes

INTRODUCCIÓ

citòsòliques després de l'estimulació del BCR en comparació amb les cèl·lules dels pacients amb LLC mutada i baixa expressió de ZAP-70(269,270). També es va observar que les diferències en la capacitat de resposta a l'estimulació del BCR no eren degudes únicament als nivells d'expressió de Syk, com es creia anteriorment(271), si no que eren degudes al fet d'expressar també la proteïna ZAP-70(269), la qual es pot unir al BCR, incrementar la fosforilació de Syk i activar altres proteïnes citosòliques implicades en aquesta via de senyalització com son BLNK i PLCy2(272). El mecanisme pel qual la proteïna ZAP-70 incrementa la senyalització del BCR no es coneix amb exactitud, però es creu que ZAP-70 facilitaria la translocació del BCR cap a les vales lipídiques i així incrementaria la fosforilació del BCR per part de la quinasa Lyn(273). ZAP-70 també pot incrementar la senyalització del BCR de manera independent de la seva activitat quinasa actuant com a proteïna adaptadora que facilita la senyalització del BCR o bé competint amb reguladors negatius de Syk(274).

L'expressió de ZAP-70 en les cèl·lules de LLC també es va relacionar amb una resposta incrementada als estímuls de supervivència i migració procedents del microambient. Les cèl·lules de LLC amb expressió de ZAP-70 tenen una major expressió del receptor CCR7, això incrementa la capacitat de resposta a les quimiocines CCL19 i CCL21 i per tant afavoreix la supervivència i migració de les cèl·lules de LLC cap als ganglis limfàtics(199). Estudis *in vitro* van demostrar que aquest increment de l'expressió de CCR7 estava induït per ZAP-70 després de l'estimulació del BCR i a través de l'activació d'ERK(275). També es va observar que l'activació d'ERK provocada per la interacció entre el receptor CXCR4 i la quimiocina CXCL12 secretada per les cèl·lules estromals i les NLCs es produïa de manera més ràpida en les cèl·lules de LLC que expressaven ZAP-70, fet que es traduïa en una major supervivència i proliferació cel·lulars(199). Posteriorment, es va demostrar *in vitro* que ZAP-70 incrementava la resposta a l'estimulació del receptor CXCR4 promovent així la migració cap a la medul·la òssia(276). Aquesta correlació entre la infiltració de la medul·la òssia i l'alta expressió de ZAP-70 també s'ha observat en pacients amb LLC(277). A més a més, també s'ha descrit que l'estimulació del BCR de les cèl·lules de LLC amb alta expressió de ZAP-70 indueix una major capacitat de producció de les quimiocines CCL3 i CCL4 en comparació amb les cèl·lules

INTRODUCCIÓ

que no expressen ZAP-70, facilitant així el reclutament de limfòcits T cap a les cèl·lules de LLC i creant un microambient favorable per la seva supervivència(207).

2.5. Tractament

2.5.1. Visió panoràmica del tractament de la LLC

Segons les guies de l'iWCLL només son tractats els pacients amb LLC que mostren evidències de malaltia activa, presència de progressió o aparició de símptomes, mentre que els pacients asimptomàtics i en estadis inicials, només requereixen un seguiment per controlar l'evolució de la malaltia(278).

El tractament dels pacients amb LLC ha canviat considerablement durant les últimes dècades. Fins a l'any 1999, la teràpia estava basada en l'ús dels agents alquilants clorambucil i ciclofosfamida, però aquests tractaments no milloraven la supervivència global de manera significativa. Més endavant, la introducció de la fludarabina (un anàleg de purines) en monoteràpia, va millorar les taxes de remissió completa i de resposta global en comparació a les observades amb els agents alquilants utilitzats fins al moment. Amb la fludarabina com a primera línia de tractament, s'obtenien taxes de remissió completa de fins al 30%(279). Malgrat tot, no millorava la supervivència global. Gràcies a l'evidència del sinergisme entre la fludarabina i la ciclofosfamida demostrada *in vitro*, es va desenvolupar un tractament que combinava aquests dos règims (FC) i que va mostrar unes taxes de remissió completa i de resposta global resuperiors a les que s'obtenien amb la fludarabina en monoteràpia(280). Posteriorment, es va desenvolupar una teràpia més efectiva, basada en la combinació del rituximab (un anticòs monoclonal anti-CD20), la fludarabina i la ciclofosfamida, coneguda com a règim FCR, el qual induïa respostes completes en gairebé el 50% dels pacients, un major temps lliure de progressió i una supervivència global superior en comparació amb el règim FC(281). El règim FCR és el més utilitzat com a primera línia en pacients joves que requereixen tractament i tenen un bon estat físic. No obstant això, la majoria de pacients tractats recauràn en algun moment. A més, aquesta

INTRODUCCIÓ

combinació no millora la supervivència dels pacients que tenen la deleció 17p i degut a la toxicitat que provoca, no és ben tolerat pels pacients d'edat avançada (>65 anys) ni pels pacients amb comorbiditats. La combinació de l'agent alquilant bendamustina amb el rituximab (BR) és menys tòxica que la combinació FCR i ha mostrat ser eficaç en pacients amb LLC tractats prèviament o no tractats, però genera una taxa menor de respostes completes i una menor supervivència lliure de progressió en comparació amb la combinació FCR(282). Tot i això, el règim BR pot ser una opció terapèutica per aquells pacients d'edat avançada i amb un bon estat físic, que no es poden beneficiar del règim FCR.

El progrés en el coneixement de la biologia de la LLC ha permès el desenvolupament de noves molècules que actuen contra dianes més específiques de les cèl·lules de LLC involucrades en la patogènia d'aquesta malaltia. Aquestes noves drogues han estat aprovades recentment o es troben en assajos clínics, i algunes d'elles ja s'estan utilitzant com a primera opció en pacients seleccionats, seguint les guies internacionals(18). A més, algunes d'aquestes noves drogues mostren resultats prometedors en pacients en recaiguda, pacients refractaris o pacients amb mutacions i/o deleció de TP53.

2.5.2. Inhibidors del BCR

Com ja s'ha comentat, l'activació i senyalització del BCR té un paper crucial en la supervivència i proliferació de les cèl·lules de LLC i per tant en la patogènia de la malaltia. Actualment varies evidències sustenten la influència de la senyalització del BCR en el desenvolupament i determinació del curs clínic de la malaltia(241).

A més, marcadors de mal pronòstic ben establerts com son l'absència de mutacions als gens de les IGHV(40) o l'expressió de ZAP-70(41,274) estan associats i/o potencien la senyalització del BCR.

Una de les principals qüestions és en quins punts de la complexa xarxa de vies de senyalització activades després de l'estimulació del BCR és millor actuar. S'ha observat que les quinases fosforilades immediatament després de l'estimulació del BCR com son Syk i PI3K es troben activades de manera constitutiva en la majoria de pacients amb LLC(256,283) i que la quinasa Btk,

INTRODUCCIÓ

que és activada per Syk i PI3K, és essencial per l'activació de la via de les MAPK i del factor de transcripció NF- κ B(284).

2.5.2.1. Inhibidors de Syk

La tirosina quinasa Syk té un paper crucial en el desenvolupament dels limfòcits B i la seva proximitat amb el BCR fa que sigui essencial en la iniciació i amplificació de la de senyal procedent del BCR(252).

Fostamatinib

El fostamatinib (R788) és un potent inhibidor de Syk que s'administra via oral i un cop ingerit es converteix en la seva forma activa (R406). El fostamatinib disminueix la migració de les cèl·lules de LLC cap a les quimiocines CXCL12 i CXCL13 *in vitro*, evitant així que les cèl·lules leucèmiques puguin migrar cap a les cèl·lules estromals i beneficiar-se dels efectes protectors del microambient. A més, aquesta droga també provoca la disminució de la secreció de les quimiocines CCL3 i CCL4 dependent del BCR per part de les cèl·lules de LLC(285). Aquestes observacions van ser demostrades en un estudi *in vivo*, en el qual la inhibició de Syk amb fostamatinib en ratolins transgènics Eu-TCL1, un model utilitzat per l'estudi de la LLC, induïa una limfocitosi transitòria, disminuïa la proliferació i la supervivència de les cèl·lules leucèmiques i allargava la supervivència dels animals tractats(286).

A nivell clínic el fostamatinib va ser el primer inhibidor de la via del BCR utilitzat en un assaig clínic amb pacients de LLC. L'assaig de fase I/II (NCT00446095) que es va realitzar amb aquesta droga com a únic agent, va ser en pacients amb diferents síndromes limfoproliferatives refractaris o en recaiguda, incloent la LLC. Pel que fa als 11 pacients amb LLC que participaven a l'estudi, només 6 van assolir una resposta parcial, 2 una malaltia estable i 3 van progressar. També es va observar que aquesta droga provocava una ràpida reducció de la mida dels ganglis limfàtics, dels símptomes relacionats amb la malaltia, de les citopènies i una redistribució de les cèl·lules de LLC que produïa una limfocitosi en sang perifèrica. Degut als resultats observats i als efectes secundaris que limitaven la dosi tolerada, la

INTRODUCCIÓ

companyia que desenvolupava aquest fàrmac, va decidir no continuar els assajos clínics en LLC(287). Actualment, aquesta limfocitosi en sang perifèrica es reconeix com un efecte característic dels antagonistes del BCR i no com un símptoma de progressió de la malaltia, tal i com es creia en els primers assajos clínics amb aquest tipus d'inhibidors(288). La mobilització de les cèl·lules de LLC residents en teixits cap a la sang es produeix com a resultat de la interrupció de la senyalització del BCR, fet que provoca que les cèl·lules leucèmiques perdin la capacitat d'interactuar amb les cèl·lules del microambient i per tant de rebre estímuls de supervivència, proliferació.

Altres inhibidors de Syk

Hi ha altres inhibidors específics de Syk que estan en desenvolupament i han mostrat a nivell pre-clínic una alta eficàcia en la inhibició de la senyalització del BCR i en la inducció d'apoptosi de les cèl·lules de LLC(289). Un d'ells és l'entospletinib (GS-9973), que és més selectiu que el fostamatinib(290). La seguretat i eficàcia d'aquest inhibidor es va avaluar en un assaig clínic de fase II (NCT01799889) que incloïa pacients amb LLC refractària o en recaiguda i amb d'altres limfomes. En els pacients amb LLC es va obtenir una taxa de resposta global del 61% sense observar-se cap resposta completa(291). Una petita cohort de pacients amb LLC intolerants o resistents a l'ibrutinib o idelalisib, es van afegir a aquest assaig clínic, i de manera preliminar es va observar que els pacients tractats amb entospletinib tenien una disminució de la mida dels ganglis limfàtics i menors taxes de progressió de la malaltia(292).

Actualment s'està avaluant l'eficàcia de la combinació de l'entospletinib amb l'obinutuzumab (un anticòs monoclonal anti-CD20) en pacients de LLC en recaiguda en un assaig clínic de fase I/II (NCT03010358).

2.5.2.2. Inhibidors de PI3K

La PI3K és una tirosina quinasa crucial implicada en la senyalització intracel·lular del BCR. La família PI3K es classifica en tres classes (I, II, III) i la classe I conté varies isoformes (α , β , γ i δ). Les isoformes α i β , es troben àmpliament expressades en la majoria dels teixits mentre que les isoformes γ i δ s'expressen exclusivament en les cèl·lules hematopoiètiques. Concretament

INTRODUCCIÓ

la isoforma δ és la que s'expressa de manera predominant en aquestes cèl·lules i té un paper crucial en la homeòstasi i funció dels limfòcits B(293).

Generalment, les cèl·lules de LLC expressen elevats nivells de PI3K- δ activada(294). Aquesta quinasa participa en la transmissió de senyals entre el microambient i les cèl·lules leucèmiques a través del BCR, el CXCR4 i el CD40 activant la via d'Akt/mTOR i induint la supervivència, proliferació i migració de les cèl·lules de LLC(295).

Degut al paper clau de la PI3K en la patofisiologia de la LLC, hi ha varis inhibidors d'aquesta molècula que es troben en diferents fases de desenvolupament.

Idelalisib

L'idelalisib (GS-1101, CAL-101) és una molècula petita que inhibeix de manera selectiva i reversible la PI3K- δ . *In vitro* es va demostrar que l'idelalisib inhibeix els senyals de supervivència procedents del BCR i de les cèl·lules del microambient, així com l'efecte protector de les cèl·lules del microambient al bloquejar la secreció de quimiocines de les cèl·lules de LLC (CCL3 i CCL4) i de les NLCs (CXCL12 i CXCL13)(296,297). L'idelalisib va ser avaluat per primera vegada en un assaig clínic de fase I (NCT00710528) que incloïa 54 pacients amb LLC en recaiguda o refractària amb característiques clíniques i biològiques adverses. Es va obtenir una taxa de resposta global del 72% (el 39% amb una resposta parcial i el 33% amb una resposta parcial amb limfocitosi persistent) però es van observar efectes secundaris greus, com pneumonitis, colitis o infeccions en el 67% dels pacients, fet que sovint conduïa a la suspensió del tractament(298). La combinació de l'idelalisib amb el rituximab es va provar en pacients amb LLC en recaiguda en un assaig multicèntric de fase III (NCT01539512) en el qual es va observar que aquesta combinació induïa una millora significativa de la taxa de resposta, de la supervivència lliure de progressió i de la supervivència global dels pacients recaiguts. L'assaig clínic va ser aturat a causa dels bons resultats obtinguts en la branca de la combinació i dels efectes secundaris observats en la branca de l'idelalisib en monoteràpia i es va aprovar la combinació d'idelalisib amb rituximab per pacients de LLC recaiguts que no podien rebre quimioteràpia(299).

INTRODUCCIÓ

Duvelisib

El duvelisib és una molècula petita que inhibeix tant la isoforma PI3K- γ com la PI3K- δ . El duvelisib indueix l'apoptosi de les cèl·lules primàries procedents de pacients amb LLC amb mal pronòstic i no afecta als limfòcits B i T normals(300). Aquesta droga ha estat avaluada en un assaig clínic de fase I (NCT01476657) amb pacients amb LLC refractària o recaiguts on s'ha observat que provoca una disminució dels nivells de citoquines i quimiocines en sèrum. La taxa de resposta global és del 55%, incloent un pacient amb una resposta completa i 26 pacients amb una resposta global. La taxa de supervivència lliure de progressió als dos anys és del 59%. A més a més, sembla que els pacients amb la deleció 17p responen millor que els que no tenen aquesta deleció(301). Actualment, un estudi de fase III (NCT02004522) està comparant el duvelisib en monoteràpia amb l'ofatumumab (un anticòs monoclonal anti-CD20) en monoteràpia. De moment s'ha observat que el duvelisib disminueix el risc de progressió o mort i millora la supervivència lliure de progressió en comparació amb l'ofatumumab. Els efectes secundaris més freqüents causats pel duvelisib són la neutropènia, l'anèmia, la trombocitopènia i la diarrea.

2.5.2.3. Inhibidors de Btk

La tirosina quinasa Btk és un membre de la família de les quinases TEC i és un component clau de la via de senyalització del BCR. Després de l'estimulació del BCR, Btk (que és fosforilada i activada per Syk i Lyn) indueix la supervivència, la proliferació i la diferenciació dels limfòcits B, a través de l'activació de les vies de senyalització MAPK i NF- κ B(284). Btk també està implicada en la migració i l'adhesió cel·lular en resposta a les quimiocines CXCL12 i CXCL13(302). L'expressió de Btk a nivell proteic i de mRNA és significativament superior en els pacients amb LLC en comparació amb limfòcits B normals. Malgrat això, Btk no sempre es troba activada de manera constitutiva en les cèl·lules de LLC(303).

INTRODUCCIÓ

Ibrutinib

L'ibrutinib (PCI-32765) és una molècula petita que provoca la inhibició de Btk. Concretament, s'uneix de manera covalent al residu de cisteïna Cys-481, situat al lloc actiu de Btk i provoca la inhibició de l'activitat enzimàtica de la proteïna, provocant així el bloqueig de la propagació de la senyal procedent de l'activació del BCR. L'ibrutinib inhibeix els senyals de supervivència i proliferació derivats del BCR en les cèl·lules de LLC *in vitro*(304). Tot i que l'ibrutinib té poc efecte en la viabilitat de les cèl·lules de LLC, bloqueja de manera efectiva els estímuls de supervivència procedents del microambient, que inclouen el contacte amb les cèl·lules estromals i els factors solubles com CD40L, BAFF, IL-6, IL4 i TNF- α (303). Un altre efecte de l'ibrutinib és la inhibició de la migració de les cèl·lules de LLC en resposta a les quimiocines CXCL12 i CXCL13. També s'ha observat que l'ibrutinib bloqueja la secreció de CCL3 i CCL4 dependent de la senyalització del BCR per part de les cèl·lules de LLC(305). Aquests efectes en la residència i retenció de les cèl·lules de LLC als teixits, expliquen la redistribució de les cèl·lules leucèmiques dels ganglis limfàtics i medul·la òssia cap a la sang perifèrica, fet que resulta en un increment temporal del número cèl·lules leucèmiques en sang observat en els pacients durant les primeres setmanes o mesos de tractament. Finalment les cèl·lules de LLC en sang, acaben morint per apoptosi espontània o induïda pel fàrmac al no estar protegides pel microambient tumoral.

S'ha observat que l'ibrutinib també provoca la inhibició de la quinasa Itk (de l'anglès *interleukin-2 inducible kinase*) de manera irreversible(306). Itk i Btk tenen una seqüència i funció homòlogues. Itk té un paper clau en l'activació de les cèl·lules T helper 1 (Th1) i T helper 2 (*Th2*) a través del TCR, sent essencial només per les cèl·lules Th2(306). Per tant l'ibrutinib suprimeix la immunitat Th2 i potencia la immunitat Th1, incrementant la producció d'IFN- γ i IL-2. L'efecte de la supressió de les cèl·lules Th2 s'observa en pacients de LLC tractats amb ibrutinib, els quals tenen una disminució de les interleuquines IL-10, IL-4 i IL-13(307). Aquestes observacions es corresponen amb el fet que el tractament amb ibrutinib disminueix les complicacions infeccioses en els pacients de LLC durant els 6 primers mesos o més temps de tractament(308). Per una altre banda, també s'ha demostrat recentment *in vitro*, que la inhibició d'Itk causada

INTRODUCCIÓ

per l'ibrutinib antagonitza la citotoxicitat mediada per anticossos dependent de cèl·lules NK induïda per anticossos monoclonals anti-CD20 com per exemple el rituximab(309). Aquests treballs, suggereixen que cal tenir en compte aquestes observacions a l'hora de dissenyar teràpies combinades amb aquests dos tipus de molècules, malgrat això, els assajos clínics que combinen aquests dos tipus de tractaments, mostren resultats molts prometedors, com s'explica més endavant.

L'ibrutinib es va provar per primera vegada en pacients amb LLC refractària o en recaiguda en un assaig clínic de fase I ([NCT00849654](#)). Aquest estudi va servir per observar que dosis baixes d'aquesta molècula ja eren suficients per obtenir una ocupació superior al 90% del domini actiu de Btk. La taxa de resposta global obtinguda va ser del 69%(307). Degut a la gran eficàcia i seguretat de l'ibrutinib observades en aquest assaig clínic, se'n va realitzar un altre de fase Ib/II ([NCT01105247](#)) amb un número més gran de pacients amb LLC refractària o en recaiguda i altament pre-tractats, en el qual es va observar una taxa de resposta global del 71% i una resposta parcial amb limfocitosi persistent en un 20% més dels pacients. Un fet important, va ser que les respostes observades en els pacients d'alt risc (amb la deleció 17p per exemple) eren semblants a les observades en la resta de pacients(310). En aquest mateix assaig clínic també es van incloure pacients majors de 65 anys, observant una taxa de resposta global del 71% en aquest subgrup de pacients. Malgrat els bons resultats obtinguts, també hi ha pacients que desenvolupen resistència a l'ibrutinib(311). Actualment no es coneixen amb exactitud els mecanismes que condueixen a aquesta pèrdua de resposta, però en alguns casos s'associa amb mutacions puntuals al lloc d'unió de l'ibrutinib a la Btk o mutacions de guany de funció en PLC γ 2, proteïna que és fosforilada per Btk(312).

Actualment s'estan realitzant estudis de combinació de l'ibrutinib amb altres agents, per tal de millorar les taxes de resposta i la durabilitat de la resposta, especialment en els pacients d'alt risc, en recaiguda o progressió. De fet, s'ha observat que els pacients que progressen després de respondre al tractament amb ibrutinib, els quals solen ser pacients molt tractats prèviament i amb la deleció 17p, tenen un pronòstic molt dolent(313). Una de les combinacions que ha mostrat resultats prometedors, és l'associació de

INTRODUCCIÓ

l'ibrutinib amb el rituximab, que ha estat testada en un assaig clínic en fase II (NCT01520519), amb pacients amb LLC d'alt risc (deleció 17p, mutacions en TP53, deleció 11q o supervivència lliure de progressió < 36 mesos) i s'han obtingut respostes globals en el 95% dels pacients amb un 8% de respostes completes i una supervivència lliure de progressió als 18 mesos en el 78% dels pacients(314). Una altre combinació és la de l'ibrutinib amb el règim BR. Els resultats de l'assaig clínic en fase Ib ([NCT01292135](#)) amb pacients refractaris o recaiguts també han sigut bons, mostrant que aquesta combinació indueix una taxa de resposta global del 93% que inclou un 17% de respostes completes(315).

Degut als resultats observats en aquests assajos clínics, l'ibrutinib ha estat aprovat com a tractament de primera línia per tots els pacients amb LLC.

Acalabrutinib

L'acalabrutinib (ACP-196) és un inhibidor de Btk de segona generació. El mecanisme d'acció és el mateix que el de l'ibrutinib però és més potent i més selectiu, fet que podria incrementar la seva efectivitat i evitar els efectes secundaris. Els resultats de l'assaig clínic de fase I/II ([NCT02029443](#)) van mostrar que els 61 pacients en recaiguda que van ser tractats, van tenir un perfil de toxicitat favorable(316). Actualment, es troba en assajos clínics de fase III, on es compara amb altres tractaments, com per exemple amb l'ibrutinib en pacients amb LLC refractària o en recaiguda (NCT02477696).

2.5.3. Antagonistes de Bcl-2

L'elevada expressió de la proteïna antiapoptòtica Bcl-2 s'observa de manera freqüent en la LLC(317). A més a més, la sobreexpressió d'aquesta proteïna està associada amb la disminució o deleció dels miR15a i miR16-1(144).

El primer inhibidor de Bcl-2 que es va provar va ser el navitoclax (ABT-263), però de seguida es va aturar el seu desenvolupament a causa de la toxicitat que provocava, en primer lloc trombocitopènia degut a que també inhibia la proteïna Bcl-xL(318).

INTRODUCCIÓ

Venetoclax

El venetoclax (ABT-199, GDC-0199) s'uneix a Bcl-2 amb alta afinitat i provoca la seva inhibició, en canvi s'uneix amb baixa amb altres membres de la família Bcl-2 (319). El venetoclax indueix una ràpida apoptosi de les cèl·lules de LLC, de manera independent de TP53 *in vitro*. Aquesta observació es correspon amb els resultats de l'assaig clínic de fase I ([NCT01328626](#)), que mostren que les respostes clíniques induïdes pel venetoclax son independents de la presència de la deleció 17p i de les mutacions o pèrdua de TP35(320). En aquest mateix assaig clínic, en el qual es tractaven pacients amb LLC d'alt risc recaiguts o refractaris amb el venetoclax com a únic agent, la taxa de resposta global observada va ser del 79% amb un 20% de respostes completes i un 5% de respostes completes amb malaltia residual negativa.

El venetoclax també s'ha estudiat en combinació amb el rituximab en estudi de fase Ib ([NCT01682616](#)) amb 49 pacients amb LLC refractària o en recaiguda. La taxa de resposta global observada va ser del 86% amb un 41% de respostes completes i un 43% de respostes parcials. A més a més, el 41% dels pacients amb respostes completes tenien una malaltia mínima residual negativa(321). Actualment, s'estan portant a terme varis assajos clínics que avaluen l'eficàcia del venetoclax sol o combinat amb quimio-immunoteràpia, com per exemple, la combinació del venetoclax amb bendamustina i rituximab ([NCT01671904](#))(322).

2.5.4. Anticossos monoclonals anti-CD20

El CD20 és una proteïna transmembrana àmpliament expressada en la superfície del limfòcits B normals i neoplàsics de la qual es desconeix la seva funció fisiològica. Els anticossos monoclonals anti-CD20 es classifiquen en dos tipus (I i II) segons la seva activitat citotòxica. Els anticossos monoclonals de tipus I actuen principalment a través de la citotoxicitat dependent del complement i de la citotoxicitat cel·lular dependent d'anticossos i tenen poca capacitat de produir mort cel·lular directa, mentre que els anticossos monoclonals de tipus II, tenen poca citotoxicitat dependent del complement, però indueixen mort cel·lular directa de manera molt eficient(323). Un dels anticossos monoclonals de tipus I és el rituximab, el qual és àmpliament utilitzat

INTRODUCCIÓ

en el tractament de la LLC però té una eficàcia modesta en monoteràpia(324). En canvi, la seva combinació amb agents quimioteràpics, com és el règim FCR, millora les taxes de resposta completa, supervivència lliure de progressió i supervivència global(281). L'ofatumumab és un altre anticòs monoclonal de tipus I. Estudis pre-clínic van mostrar que l'ofatumumab induïa una major toxicitat dependent de complement en comparació amb el rituximab inclús en cèl·lules primàries de LLC resistents a l'ibrutinib(325). La combinació de l'ofatumumab amb la fludarabina i la ciclofosfamida es va provar en pacients amb LLC no tractats prèviament en un assaig clínic de fase Ib ([NCT01682616](#)) en el qual es va observar que aquesta combinació induïa una bona taxa de resposta global però no millorava els resultats obtinguts amb el règim FCR(326). El fet que la inhibició de CD20 representés una diana terapèutica rellevant i millorés el tractament de la LLC, va generar la necessitat de trobar nous anticossos anti-CD20 amb major activitat i eficàcia.

Obinutuzumab

L'obinutuzumab és un anticòs monoclonal humanitzat de tipus II del subtipus IgG1 modificat per glicoenginyeria, fet que augmenta la seva efectivitat en comparació amb el rituximab. Reconeix de manera específica el CD20 de la superfície dels limfòcits pre-B i limfòcits B madurs malignes i no malignes(323). A nivell pre-clínic es va demostrar que l'obinutuzumab era capaç d'induir una mort cel·lular directa i una citotoxicitat cel·lular dependent d'anticossos superior a la induïda pel rituximab(327,328). Els resultats de l'assaig de fase I/II ([NCT00517530](#)) amb pacients amb LLC refractària o en recaiguda i altament pre-tractats, van mostrar una alta eficàcia de l'obinutuzumab en monoteràpia(329). Més endavant, es va realitzar un assaig de fase III ([NCT01010061](#)) en el qual s'avaluava l'eficàcia de l'obinutuzumab en combinació amb el clorambucil en pacients de LLC amb comorbiditats. Els resultats van mostrar que l'addició de l'obinutuzumab allargava de manera significativa la supervivència lliure de progressió en comparació amb els altres tractaments (clorambucil sol o clorambucil amb rituximab)(330). En base a aquests resultats, es va aprovar el tractament amb obinutuzumab i clorambucil pels pacients de LLC amb comorbiditats i no tractats prèviament. També es va

INTRODUCCIÓ

avaluar l'obinutuzumab en combinació amb diferents agents quimioteràpics en un assaig clínic en fase Ib ([NCT01300247](#)) en pacients amb LLC no tractats prèviament. L'obinutuzumab es va combinar amb fludarabina i ciclofosfamida (G-FC) o amb bendamustina (G-B) i es van observar unes taxes de resposta global del 62% (10% de respostes completes) en la combinació G-FC i del 90% (20% de respostes completes) en la combinació G-B(331).

2.5.5. Trasplantament al·logènic de progenitors hematopoètics

El trasplantament al·logènic (allo HSCT de l'anglès *allogeneic stem cell transplantation*) és un tractament amb potencial curatiu en la LLC. L'allo HSCT es basa en l'efecte de l'empelt contra la leucèmia i pot ser una opció terapèutica pels pacients amb LLC d'alt risc, joves i amb bon estat físic que siguin refractaris a les teràpies basades en anàlegs de purina o hagin recaigut (abans de dos anys) després del tractament de combinació amb anàlegs de purina(332). Actualment però, degut al desenvolupament de noves molècules com els inhibidors de la via del BCR, especialment l'ibrutinib, els anticossos monoclonals o els agents immunomoduladors que mostren una bona tolerabilitat i un control de la malaltia a llarg termini, l'allo HSCT ha passat a ser la opció menys utilitzada en la majoria pacients amb LLC.

INTRODUCCIÓ

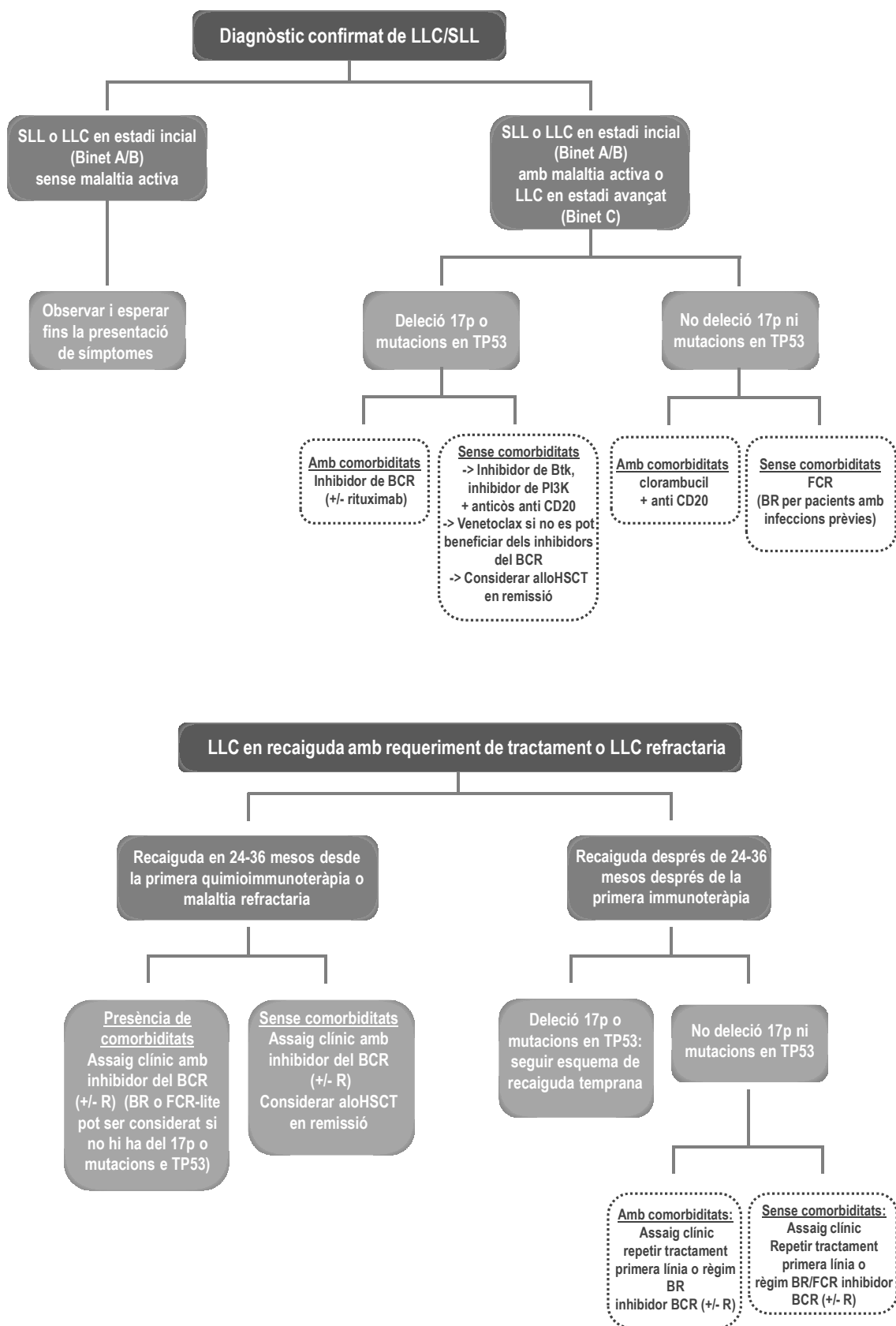


Figura 13. Esquema del tractament recomanat pels pacients amb LLC

II. HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI DE TREBALL

Actualment es considera que el microambient de la medul·la òssia i dels teixits limfàtics és essencial per la supervivència i la proliferació de les cèl·lules de LLC i que per tant té un paper crucial en la patogènesi de la malaltia. Els ganglis limfàtics han estat identificats com a lloc clau per la proliferació de les cèl·lules de LLC i és precisament en aquest teixit on la senyalització del BCR és una de les vies que es troba més activada, fet que posa en evidència el paper crucial del BCR en la supervivència i proliferació de les cèl·lules de LLC. Aquestes observacions han mostrat la importància de la senyalització del BCR en la interacció de les cèl·lules de LLC amb el microambient i han convertit aquesta via en una atractiva diana terapèutica, que podria aconseguir eliminar la malaltia residual localitzada als teixits limfàtics i medul·la òssia.

L'activació del BCR provoca el reclutament i fosforilació de varies proteïnes tirosina quinasa. Una d'elles és Syk, que té un paper essencial en la senyalització del BCR i es troba activada de manera constitutiva en LLC. Per tant representa una excel·lent diana terapèutica.

En base a aquest context, vam plantejar la hipòtesi que la TAK-659, un nou inhibidor de Syk, podria bloquejar de manera eficaç els estímuls de supervivència, proliferació i quimioresistència que les cèl·lules de LLC reben del microambient.

La proteïna ZAP-70 és homòloga estructuralment a Syk i està associada amb un increment de la capacitat de senyalització del BCR, que es tradueix en una major capacitat de resposta als estímuls de supervivència i migració del microambient. L'expressió de ZAP-70 es correlaciona amb l'absència de mutacions als gens de les IGHV i és un factor de mal pronòstic molt ben definit en la LLC. Un altre factor de mal pronòstic en la LLC, és l'expressió del miR-21. Varis estudis han mostrat que el miR-21 es troba sobreexpressat en ganglis limfàtics de pacients amb LLC i en limfòcits B activats. En base a la relació d'aquests dos factors de mal pronòstic amb la senyalització del BCR, vam hipotetitzar que ZAP-70 podria regular l'expressió del miR-21 i que la possible relació entre aquests dos factors de mal pronòstic podria estar influenciada pel microambient tumoral en els pacients de LLC.

OBJECTIUS

1. Analitzar els efectes de l'inhibidor de Syk, TAK-659, en les cèl·lules primàries de LLC cocultivades en condicions que imiten el microambient trobat als centres de proliferació.

- Analitzar els efectes de la TAK-659 en la inhibició de Syk i de la senyalització derivada del BCR.
- Estudiar l'eficàcia de la TAK-659 en la inducció d'apoptosi i inhibició de la supervivència, proliferació i migració de les cèl·lules de LLC.
- Analitzar els efectes citotòxics de la TAK-659 combinada amb altres inhibidors del BCR.
- Estudiar els efectes de la TAK-659 en la senyalització derivada del TCR.

2. Estudiar la relació entre els factors de mal pronòstic ZAP-70 i miR-21 i com el microambient afecta a aquesta relació en cèl·lules primàries de pacients amb LLC.

- Estudiar la relació entre els factors de mal pronòstic ZAP-70 i miR-21 en cèl·lules primàries de pacients amb LLC.
- Estudiar la relació fisiològica entre la proteïna ZAP-70 i el miR-21, i el possible paper regulador de ZAP-70 en l'expressió del miR-21 en limfòcits B madurs neoplàsics amb expressió ectòpica de ZAP-70
- Estudiar el paper del microambient dels centres de proliferació en la regulació de l'expressió del miR-21 en cèl·lules de LLC

III. RESULTATS

ARTICLE 1

La inhibició de la senyalització del BCR utilitzant l'inhibidor de Syk (TAK-659) impedeix la senyalització mediada per l'estroma en les cèl·lules de leucèmia limfàtica crònica.

La LLC es caracteritza per l'expansió monoclonal de limfòcits B CD5+ en sang perifèrica, òrgans limfàtics secundaris i medul·la òssia. És als ganglis limfàtics i a la medul·la òssia on les cèl·lules de LLC, es troben amb un microambient favorable que afavoreix la seva supervivència, proliferació i quimioresistència. Una de les principals molècules involucrades en la interacció entre les cèl·lules de LLC i les cèl·lules accessòries del microambient, és el BCR. La tirosina quinasa Syk és fosforilada immediatament després de l'activació del BCR i com a conseqüència és essencial en la iniciació i amplificació de la senyalització d'aquesta via. A més a més, en la LLC s'ha observat que Syk es troba sobreregulada tant a nivell de RNA missatger com de proteïna i que està activada de manera constitutiva. Per tant, Syk representa una bona diana terapèutica.

Tenint en compte aquest context, l'objectiu principal del nostre treball va ser estudiar l'eficàcia de la TAK-659 (un nou inhibidor de Syk altament específic) en la inhibició dels estímuls de supervivència, proliferació i migració que reben les cèl·lules de LLC procedents del microambient.

Per tal de reproduir *ex vivo* el microambient que les cèl·lules de LLC es troben *in vivo* als centres de proliferació, vam utilitzar un sistema de cocultiu dissenyat anteriorment pel nostre grup, el qual es basa en el cultiu de les cèl·lules primàries de LLC, amb cèl·lules estromals de la medul·la òssia, el lligand del receptor CD40 i oligonucleòtids (CpG ODN) per estimular el receptor TLR9. Com ja havíem observat, aquest sistema de cocultiu induïa la supervivència, la proliferació i la quimioresistència de les cèl·lules primàries de LLC. En aquest estuditambé ens interessava activar directament la via de senyalització del BCR de les cèl·lules de LLC cocultivades i així poder estudiar els efectes de la

RESULTATS

TAK-659 en la inhibició d'aquesta via. Per tal d'estimular el BCR vam afegir anti-IgM al sistema de cocultiu i vam observar que l'estimulació d'aquest receptor incrementava encara més la supervivència i proliferació de les cèl·lules de LLC en cocultiu.

Inicialment, per tal de determinar els efectes de la TAK-659 en la via de senyalització del BCR, vam tractar amb aquest inhibidor cèl·lules B malignes de limfoma de Burkitt (línia cel·lular Ramos) i posteriorment vam estimular el BCR amb anti-IgM. Els resultats van mostrar que la TAK-659 era capaç de suprimir l'activació d'ERK1/2 i de Syk induïda per l'estimulació del BCR. Concretament, vam observar que la TAK-659 bloquejava l'activació del residu de Syk Tyr525 situat al domini quinasa, a dosis altes. En canvi, el residu Tyr352, situat al interdomini B i encarregat de l'activació de Syk, no estava afectat pel tractament amb la TAK-659. Aquest fet, suggereix l'existència d'una regulació diferencial d'aquests residus a través d'una retroalimentació positiva.

A continuació, al tractar les cèl·lules de LLC co-cultivades i estimulades amb anti-IgM amb la TAK-659, vam observar que aquesta droga inhibia l'activació de Syk i com a conseqüència la senyalització del BCR, sense afectar la proteïna homòloga ZAP-70, present en limfòcits T i cèl·lules NK. Per tant, aquesta droga no inhibeix la senyalització del TCR ni l'activació dels limfòcits T dels pacients amb LLC.

Utilitzant el mateix sistema de co-cultiu i estimulació del BCR vam observar que la TAK-659 també suprimia els estímuls de supervivència, proliferació, quimioresistència i activació que les cèl·lules de LLC reben del microambient.

També vam observar que la TAK-659 bloquejava de manera eficaç la migració de les cèl·lules de LLC cap a les cèl·lules estromals i les quimiocines CXCL12 i CXCL13.

A l'estudiar els efectes de la combinació de la TAK-659 amb altres drogues utilitzades en LLC (fludarabina, ibrutinib o idelalisib) vam observar que la combinació de la TAK-659 amb cadascuna de les drogues mencionades tenia un efecte sinèrgic en la inducció d'apoptosi de les cèl·lules de LLC proliferants.

RESULTATS

Finalment, vam demostrar que l'addició de TAK-659 a les cèl·lules de LLC pre-tractades amb ibrutinib incrementava de manera significativa la citotoxicitat en comparació amb les mostres tractades només amb ibrutinib.

Els resultats d'aquest treball mostren que la TAK-659 és capaç de suprimir eficaçment la inducció de la supervivència, proliferació i migració de les cèl·lules de LLC per part del microambient i per tant aporten evidències pel desenvolupament clínic d'aquesta teràpia en pacients amb LLC.

Inhibition of BCR signaling using the Syk inhibitor TAK-659 prevents stroma-mediated signaling in chronic lymphocytic leukemia cells

Noelia Purroy^{1,*}, Júlia Carabia^{1,*}, Pau Abrisqueta¹, Leire Egia¹, Meritxell Aguiló¹, Cecilia Carpio¹, Carles Palacio¹, Marta Crespo^{1,*}, Francesc Bosch^{1,*}

¹Laboratory of Experimental Hematology, Department of Hematology, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

*These authors contributed equally to this work

Correspondence to: Marta Crespo, **email:** macrespo@vhebron.net

Keywords: CLL, Syk, microenvironment, TAK-659, BCR inhibitor

Received: May 18, 2016

Accepted: November 18, 2016

Published: November 24, 2016

ABSTRACT

Proliferation and survival of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells depend on microenvironmental signals coming from lymphoid organs. One of the key players involved in the crosstalk between CLL cells and the microenvironment is the B-cell receptor (BCR). Syk protein, a tyrosine kinase essential for BCR signaling, is therefore a rational candidate for targeted therapy in CLL. Against this background, we tested the efficacy of the highly specific Syk inhibitor TAK-659 in suppressing the favorable signaling derived from the microenvironment. To *ex vivo* mimic the microenvironment found in the proliferation centers, we co-cultured primary CLL cells with BM stromal cells (BMSC), CD40L and CpG ODN along with BCR stimulation. In this setting, TAK-659 inhibited the microenvironment-induced activation of Syk and downstream signaling molecules, without inhibiting the protein homologue ZAP-70 in T cells. Importantly, the pro-survival, proliferative, chemoresistant and activation effects promoted by the microenvironment were abrogated by TAK-659, which furthermore blocked CLL cell migration toward BMSC, CXCL12, and CXCL13. Combination of TAK-659 with other BCR inhibitors showed synergistic effect in inducing apoptosis, and the sequential addition of TAK-659 in ibrutinib-treated CLL cells induced significantly higher cytotoxicity. These findings provide a strong rationale for the clinical development of TAK-659 in CLL.

INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the expansion of monoclonal, mature CD5⁺/CD23⁺ B cells in the peripheral blood (PB) [1], secondary lymphoid tissues, and the bone marrow (BM). In this microenvironment CLL cells receive survival, proliferation and drug resistance signals from accessory cells and soluble factors [2]. The B-cell receptor (BCR) is one of the main molecules involved in this cross-talk, playing a critical role in CLL pathogenesis and prognosis [3]. The importance of the BCR signaling is underlined by several observations. First, from the clinical standpoint, time to first therapy, progression free and overall survival in CLL is dictated in part by whether *IGHV* genes have undergone somatic hypermutation (M-CLL) or not (U-CLL) [1]. Of note, U-CLL cells have stronger BCR

activation and increased proliferation, linking BCR signaling to clinical progression [4]. Moreover, the clinical relevance of BCR signaling has also been inferred by the prognostic impact of ZAP-70 expression. This protein is associated with an increased BCR signaling in CLL cells [5], which translates into an enhanced ability to respond to survival and migratory signals [6]. Finally, the relevance of the BCR signaling in CLL has been proved by the demonstration of an extraordinary clinical activity of several inhibitors of key downstream kinases, such as ibrutinib, idelalisib, duvelisib and many others [7, 8].

Signal transduction initiated by BCR activation leads to the recruitment, phosphorylation, and sustained activity of the spleen tyrosine kinase (Syk) [9]. In CLL, Syk has been shown to be up-regulated at both the mRNA and protein levels, [10] and a constitutive Syk activation has been described [11]. Therefore, Syk has been

hypothesized to be an excellent candidate for targeted therapy in CLL. The effect of Syk inhibition has been tested with fostamatinib (R406), a kinase inhibitor with limited specificity to Syk, demonstrating induction of apoptosis and blockade of chemokine-induced migration of CLL cells [11, 12]. Fostamatinib has been clinically evaluated in CLL and other B cell malignancies with a hint of efficacy in these diseases [13, 14]. Herein, we presented the effectiveness of the novel, highly specific Syk inhibitor TAK-659 in suppressing the induction of survival, proliferation and migration of CLL cells by the microenvironment, thus providing the biological rationale for its clinical development in CLL.

RESULTS

BCR stimulation increases viability and enhances proliferation in primary CLL cells co-cultured with BMSC, CD40L and CpG ODN

To *in vitro* reproduce the microenvironment that CLL cells find in the proliferative centers *in vivo*, we co-cultured primary CLL cells with the BMSC cell line UE6E7T-2, soluble CD40L and CpG ODN which induce proliferation and chemoresistance in primary CLL cells as we have recently shown [15]. Western blot analysis showed that phosphorylation of Akt and ERK1/2 after BCR cross-linking was higher in co-cultured CLL cells than in cells in suspension (Figure 1A). Since the activation of BCR pathway induces pro-survival and proliferative signals in CLL cells, [4, 12, 16, 17, 18] we tested the effects of BCR stimulation with anti-IgM in CLL cell viability and proliferation in this co-culture system. We observed that the addition of anti-IgM for 48 hours protected co-cultured CLL cells from undergoing spontaneous apoptosis (Figure 1B) (mean % of viable co-cultured CLL cells related to CLL cells in suspension: 94.08 ± 20.27 without anti-IgM stimulation vs. 137.52 ± 26.17 with anti-IgM stimulation, $P < 0.05$). Moreover, proliferative responses were already observed after 24 hours of co-culture although a significant induction of Ki-67 expression was only observed after 48 hours of co-culture with the addition of anti-IgM (Figure 1C) (mean % Ki-67-positive cells: 0.91 ± 0.22 in suspension vs. 3.85 ± 0.93 in co-culture, $P > 0.05$, or vs. 7.00 ± 1.49 in co-culture with anti-IgM, $P < 0.001$).

Treatment with TAK-659 inhibits Syk activation and BCR signaling in co-cultured primary CLL cells and Burkitt's lymphoma cells

To determine the effects of the Syk inhibitor TAK-659 on BCR downstream signaling, we firstly used the Burkitt's lymphoma cell line Ramos as a model of mature malignant IgM-positive B-cells. We treated Ramos cells with increasing doses of TAK-659 for 1 hour, and

subsequently, we stimulated BCR with anti-IgM for 5 minutes prior to whole protein extraction. Stimulated Ramos cells displayed enhanced expression of phospho-Syk at Tyr525 and Tyr352 and phospho-ERK1/2. Treatment with TAK-659 was able to completely abrogate ERK phosphorylation induced by anti-IgM stimulation. However, we observed that higher doses of TAK-659 were required to completely inhibit phosphorylation of Syk at the TAK-659 binding site, Tyr525, located within the kinase domain. Interestingly, an initial enhancement on phosphorylation of Syk at this site was observed with lower doses of TAK-659. This observation, along with the enhancement on phosphorylation in residue Tyr352 of Syk protein, an activation site within the interdomain B, in response to TAK-659 treatment at any dose, suggest a differential regulation of these sites via a positive feedback (Figure 2A and 2B).

In primary CLL cells in suspension culture, TAK-659 treatment resulted in a dose-dependent reduction in the phosphorylation of Syk^{Tyr525}, Btk, NFκB, ERK1/2 and STAT3 after BCR stimulation (Figure 2C and 2D). For robust and consistent detection of phosphorylated proteins, we treated cells with H₂O₂, a broad phosphatase inhibitor, as previously described [19]. Finally, in order to assess the effect of TAK-659 in CLL cells being stimulated by different players from the microenvironment we pre-treated CLL cells with TAK-659 1 μM for 1 hour followed by co-culture with BMSC, CD40L and CpG ODN for 15 minutes and subsequent BCR crosslinking for 5 additional minutes. An enhancement on Syk^{Tyr525} was evidenced in co-cultured and BCR-stimulated primary CLL cells with the addition of H₂O₂. This Syk^{Tyr525} enhancement was inhibited by TAK-659 (Figure 2E). Phosphorylation of Btk, Akt, NFκB and STAT3 was also decreased after TAK-659 treatment, thus confirming the inhibition of Syk downstream signaling also in this setting. However, contrary to what we observed when cells were only stimulated by anti-IgM, the phosphorylation of ERK1/2 was not inhibited by TAK-659 treatment, reflecting persistent activation of alternative pathways independent from Syk in co-cultured primary CLL cells (Figure 2E and 2F).

Inhibition of Syk by TAK-659 induces apoptosis of CLL cells and abrogates BCR and co-culture-derived survival signals

To determine whether the pro-survival effect of co-culture and BCR stimulation might be abrogated by TAK-659, we treated co-cultured and anti-IgM stimulated CLL cells with increasing doses of TAK-659. As displayed in Figure 3A, TAK-659 significantly reduced the viability of CLL cells in a dose-dependent manner, after 48 hours of treatment (mean % viability relative to untreated CLL cells for TAK-659 0.1 μM, 1 μM and 10 μM after 48 hours: 93.51 ± 6.78 vs. 67.91 ± 8.88 vs. 63.05 ± 6.39 ,

respectively, $P < 0.001$). Next, to determine differences in the sensitivity to TAK-659 treatment according to the stimuli present in the co-culture system, we cultured primary CLL cells in 4 different conditions: in suspension, stimulated with anti-IgM, co-cultured with BMSC and stimulated with CD40 ligand along with CpG ODN and, co-cultured with the addition of anti-IgM. Increasing doses of TAK-659 were added and viability of CLL cells was assessed after 48 hours of treatment. We observed that the addition of anti-IgM stimulation to the co-culture system provided the greater sensitivity to TAK-659 (TAK-659 LD_{50} for CLL cells in suspension: $38.14 \mu\text{M}$ [95%CI 27.47–52.96] vs. TAK-659 LD_{50} for CLL cells in co-culture and anti-IgM: $16.91 \mu\text{M}$ [95%CI 10.61–26.93], $P = 0.006$) (Figure 3B). No statistically significant difference was observed between dose effect curves for anti-IgM or co-culture alone compared to CLL cells in suspension although LD_{50} for CLL cells in suspension was higher (TAK-659 LD_{50} for CLL cells with anti-IgM: $22.04 \mu\text{M}$ [95%CI 8.72–55.69] vs. TAK-659 LD_{50} for CLL cells in co-culture: $31.89 \mu\text{M}$ [95%CI 19.93–51.05], $P > 0.05$) (Figure 3B). We then compared the effects of TAK-659 with those of Syk-inhibitor R406 (fostamatinib) on the viability of primary CLL cells. We observed that TAK-659 resulted clearly more effective than R406 in inducing CLL cells apoptosis in all culture conditions (Figure 3C–3F).

TAK-659 displayed a significantly stronger capacity to induce apoptosis in primary CLL cells in suspension, being the LD_{50} for TAK-659 more than 40 times lower than the one observed for R406 (Figure 3C). The stimulation with anti-IgM or the co-culture of primary CLL cells seemed to provide slight higher sensitivity to R406 treatment although not significant. However, the combination of anti-IgM stimulation and co-culture induced a marked resistance to R406 treatment that precluded the calculation of a LD_{50} , whereas LD_{50} for TAK-659 was $16.91 \mu\text{M}$ (95%CI 10.61–26.93 μM) (Figure 3D).

Altogether, this data indicates a strong capacity of TAK-659 to block the microenvironment-derived survival signals and a higher efficacy in co-cultured and BCR-stimulated CLL cells compared to cells in suspension.

TAK-659 inhibits the up-regulation of proliferation and activation markers induced by the co-culture in primary CLL cells

To test whether TAK-659 was able to override the co-culture-induced proliferation described above (Figure 1C), primary CLL cells were treated with increasing doses of TAK-659 for one hour and subsequently co-cultured for 48 hours. TAK-659 treatment inhibited co-culture-induced proliferation in a dose-dependent manner, being

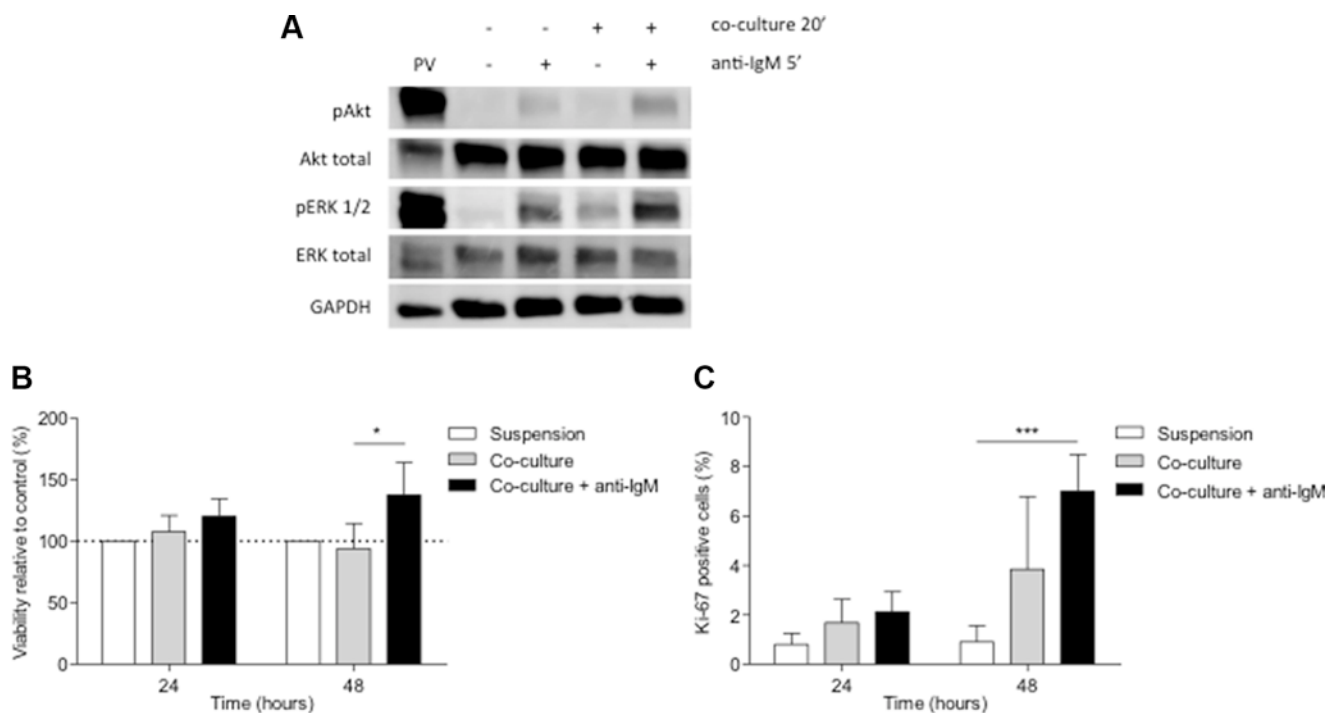


Figure 1: BCR stimulation with anti-IgM increases viability and enhances proliferation in primary CLL cells co-cultured with BMSC, CD40L and CpG ODN. (A) Primary CLL cells were co-cultured with BMSC, CD40L and CpG ODN for 15 minutes and anti-IgM was added for 1 additional minute. Figure shows the immunoblot analysis of Akt and ERK1/2 phosphorylation from a representative patient. (B) Primary CLL cells were co-cultured with BMSC, CD40L, CpG ODN and anti-IgM for 24 and 48 hours. Viability was assessed in primary CLL cells from 9 patients by Annexin V and PI staining. (C) Mean % of Ki-67-positive cells from 9 patients was analyzed by FC. (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, two-way ANOVA, Bonferroni's post-test. Graph shows mean \pm SEM). PV: treatment with pervanadate.

10 μM the TAK-659 dose at which the percentage of Ki-67 positive CLL cells did not significantly differ from that in unstimulated CLL cells (Figure 4A) (mean % of Ki-67-positive cells: 7.00 ± 1.49 in untreated controls vs. 3.39 ± 0.76 in TAK-659 0.1 μM -treated CLL cells, $P < 0.01$ vs. 1.72 ± 0.20 in TAK-659 1 μM -treated CLL cells, $P < 0.01$ vs. 1.27 ± 0.18 in TAK-659 10 μM -treated CLL cells,

$P < 0.001$). We next assessed the effect of TAK-659 on CLL cell activation evaluating expression of CD86, CD69 and CD38. CD86 and CD69 are two activation markers known to be upregulated in CLL cells from LN and BM *in vivo*. [4] CD38 is not only upregulated in activated CLL cells but also serves as prognostic marker [20, 21]. Co-culture of primary CLL cells induced a significant

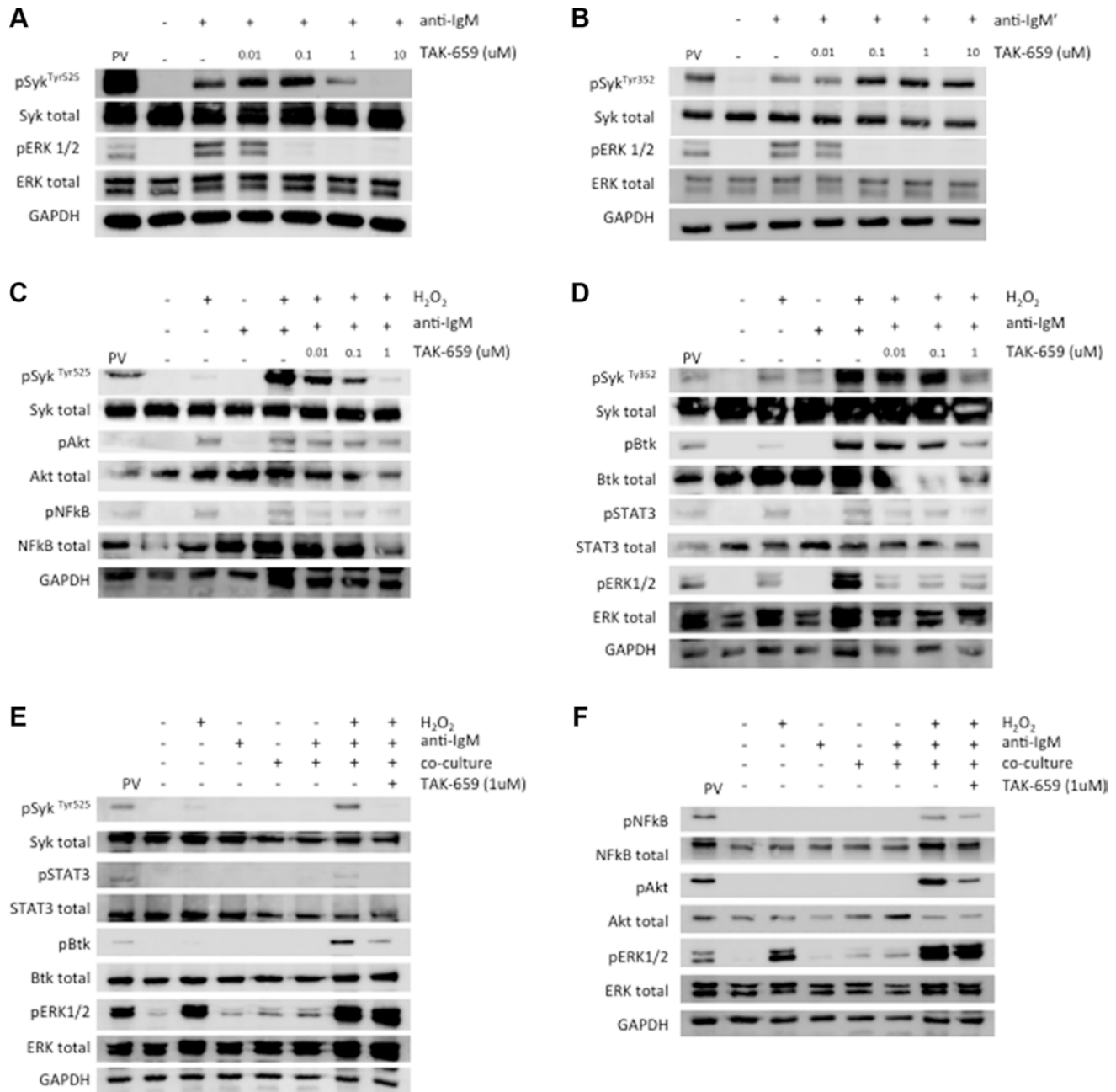


Figure 2: Syk inhibition by TAK-659 downregulates BCR signalling in Ramos and primary CLL cells. (A–B) Phosphorylation of Syk and ERK1/2 were analyzed by Western Blot in Ramos cells incubated with increasing doses of TAK-659 for 1 hour and stimulated with anti-IgM for 5 minutes. (C–D) Phosphorylation of Syk, Btk, NFkB, ERK1/2 and STAT3 were analyzed by Western Blot in primary CLL cells pre-treated with increasing doses of TAK-659 for 1 hour and stimulated with anti-IgM for 5 minutes. (E–F) Primary CLL cells pre-treated with increasing doses of TAK-659 for 1 hour were co-cultured with BMSC, CD40L and CpG ODN for 15 minutes and anti-IgM stimulated for additional 4 minutes. H₂O₂ 3.3 mM was added for 4 minutes. Expression of phosphorylated Syk, Btk, NFkB, Akt, ERK1/2 and STAT3 was analyzed by western blot. PV: treatment with pervanadate

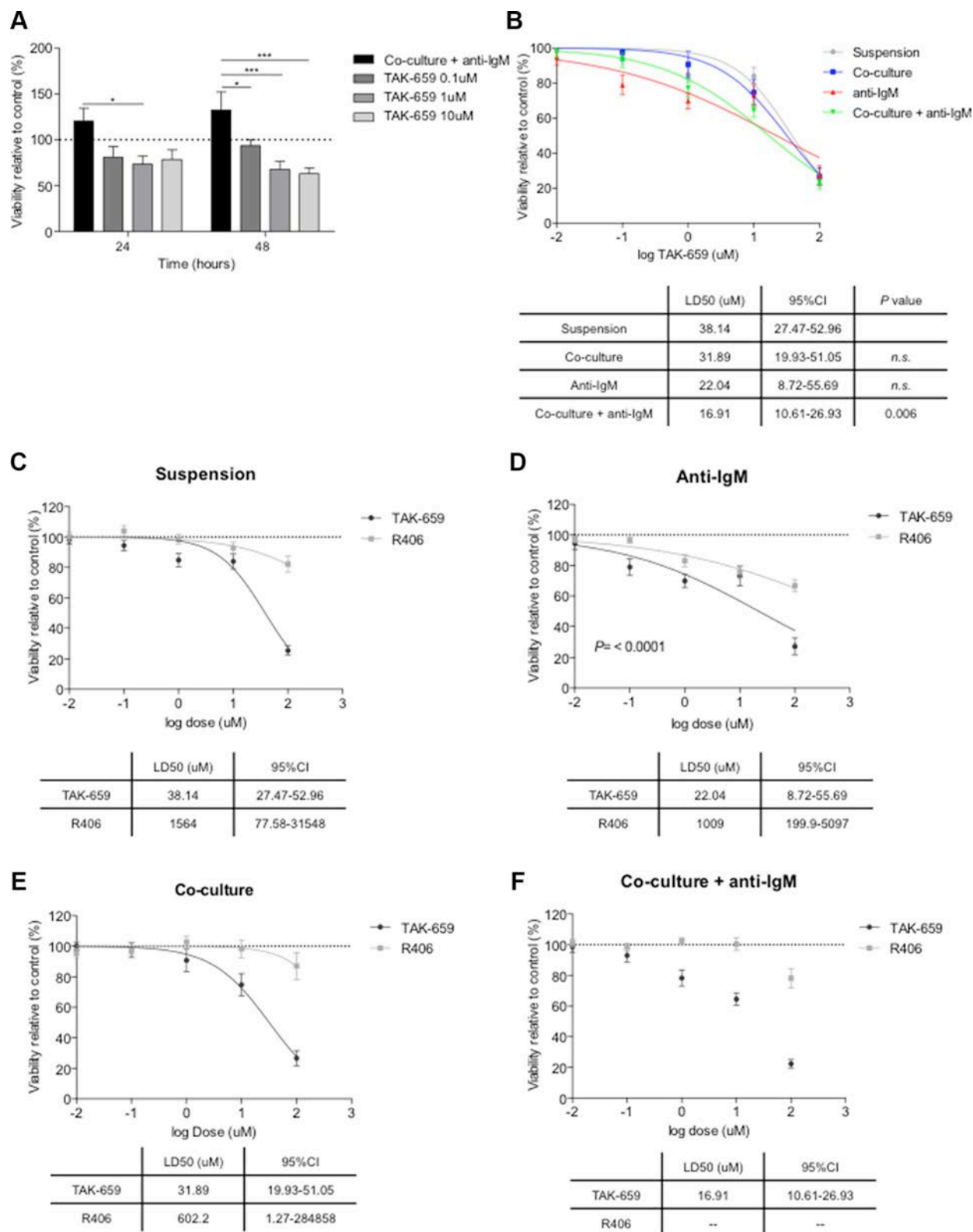


Figure 3: TAK-659 induces higher degree of apoptosis than R406 in primary CLL cells. (A) Primary CLL cells from 12 patients pre-treated with increasing doses of TAK-659 were cultured for 24 and 48 hours with BMSC, CD40L, CpG ODN and anti-IgM. Viability was assessed by Annexin V and PI staining by FC. Primary CLL cells from 26 patients pre-treated with increasing doses of TAK-659 were cultured for 48 hours in suspension, in co-culture, anti-IgM-stimulated or co-cultured and with anti-IgM stimulation (B); or pre-treated with increasing doses of TAK-659 or R406 in suspension (C), anti-IgM-stimulated (D), in co-culture (E) or co-cultured with anti-IgM-stimulation (F). LD₅₀ curves for TAK-659 and R406 are plotted on a logarithmic scale. LD₅₀ for every treatment cohort were calculated and compared (Two-way ANOVA, Bonferroni's post-test. Graph shows mean ± SEM).

increase in the expression of these activation markers. Interestingly, Syk inhibition by TAK-659 resulted in marked downregulation of the expression of CD86, CD69, and CD38 in a dose-dependent manner though the degree of downregulation of CD69 was smaller compared to that of CD86 or CD38 (Figures 4B, 4C, 4D and 4E).

TAK-659 inhibits chemotaxis toward BMSC, CXCL12 and CXCL13 in primary CLL cells

In addition to survival and proliferative signals, BCR signaling also promotes the homing of CLL cells to the BM and the LN, thus facilitating their access to favorable environments. This is mainly mediated by enhancing the response to CXCR4 and CXCR5 [12, 22, 23, 24]. To evaluate the impact of Syk inhibition by TAK-659 on the *ex vivo* chemotaxis of CLL cells, we analyzed the ability of CLL cells to migrate toward CXCL12, CXCL13 and the BMSC cell line HS-5 by performing transmigration assays using bare polycarbonate membranes. Treatment of primary CLL cells with TAK-659 0.1 μ M for 1 hour resulted in a strong reduction of the migratory capacity toward CXCL12, CXCL13 and the BMSC cell line, HS-5 (Figures 5A, 5B and 5C).

TAK569 abrogates microenvironment-induced chemoresistance

As we previously described, [15, 25] the co-culture of CLL cells with BMSC, CD40L and CpG ODN induces marked resistance to fludarabine and bendamustine in primary CLL cells. To test whether the addition of TAK-659 might overcome this co-culture-induced chemoresistance, we assessed the effects of the combination of TAK-659 with fludarabine. For that purpose, we compared the viability rates after treatment with increasing doses of fludarabine with or without 0.1 μ M TAK-659 in primary CLL cells co-cultured with BMSC, CD40L and CpG ODN with the addition of anti-IgM. We chose this dose of TAK-659 according to the significant effects in terms of proliferation, activation, migration and inhibition of BCR signaling mentioned before. In line with our previous observations, [15] this co-culture system inhibited fludarabine-induced apoptosis in primary CLL cells. Interestingly, we observed that this co-culture-induced chemoresistance was markedly reverted by the addition of TAK-659 (Figure 6A). Subsequent calculation of the cooperative index between the two drugs at different fludarabine concentrations indicates that simultaneous treatment with TAK-659 and fludarabine synergistically induces apoptosis in co-cultured CLL cells independently from fludarabine dose (Figure 6D).

TAK-659 synergizes with other BCR inhibitors in co-cultured CLL cells

To investigate the effects of the combination of TAK-659 with other BCR inhibitors we treated primary

CLL cells with 0.1 μ M TAK-659 combined with increasing doses of the Btk inhibitor, ibrutinib, and the PI3K delta-specific isoform inhibitor, idelalisib, and compared their viability rates. We observed that apoptosis was significantly increased by TAK-659 in ibrutinib-treated co-cultured CLL cells (Figure 6B). Interestingly, cooperative index values revealed that TAK-659 strongly potentiated ibrutinib cytotoxicity especially at 1 μ M of ibrutinib in co-cultured CLL cells (Figure 6D). Although we observed no significant difference in the induction of apoptosis between treatment with idelalisib as single agent and in combination with TAK-659 (Figure 6C), synergic cytotoxicity was also demonstrated with the combination. Similarly to the combination of TAK-659 with ibrutinib, the combination with idelalisib displayed highest synergistic effect (lowest cooperative values) at the lowest idelalisib dose tested (Figure 6D).

Sequential treatment with TAK-659 strongly enhances long-term cytotoxicity in ibrutinib-treated CLL cells

Despite the incontestable success in the treatment of CLL shown so far, a progression rate of 5.3% has been already reported in patients under ibrutinib treatment [7, 8]. Resistance to ibrutinib has been related to the overgrowth of subclones with BTK or PLCg2 mutations, resulting in reactivation of the BCR pathway [26]. To test whether the upstream inhibition of BCR signaling with TAK-659 could have a cytotoxic effect in cells that have been under the pressure of ibrutinib treatment we designed an experimental approach using a long-term culture system with CD40-stimulated primary CLL cells. In that culture system we treated CLL cells with ibrutinib for 4 days and subsequently, TAK-659 was added. We used CLL cells treated with either ibrutinib or TAK-659 alone as control. Interestingly, we observed that CD40-stimulated primary CLL cells persisted insensitive, in terms of cytotoxicity, to 1 μ M ibrutinib treatment along time. By contrast, sequential treatment with TAK-659 efficiently decreased the viability of these '*ibrutinib-resistant*' primary CLL cells (mean % viability relative to untreated CLL cells for ibrutinib, TAK-659 or ibrutinib and TAK-659 after 14 days: 85.45 ± 32.10 vs. 23.61 ± 11.62 vs. 17.89 ± 1.43 , respectively, $P < 0.05$; and after 18 days: 165.22 ± 94.10 vs. 0.89 ± 0.01 vs. 3.92 ± 3.20 , respectively, $P < 0.001$) (Figure 6E).

TAK-659 does not inhibit TCR signaling and molecular features of T cell activation in primary T cells from patients with CLL

The primary aminoacid sequence of Syk is homologous to that of ZAP-70, the expression of which is mostly confined to T and natural killer (NK) cells [27]. Given the striking homology between these two Syk family kinases we hypothesized that TAK-659 might be

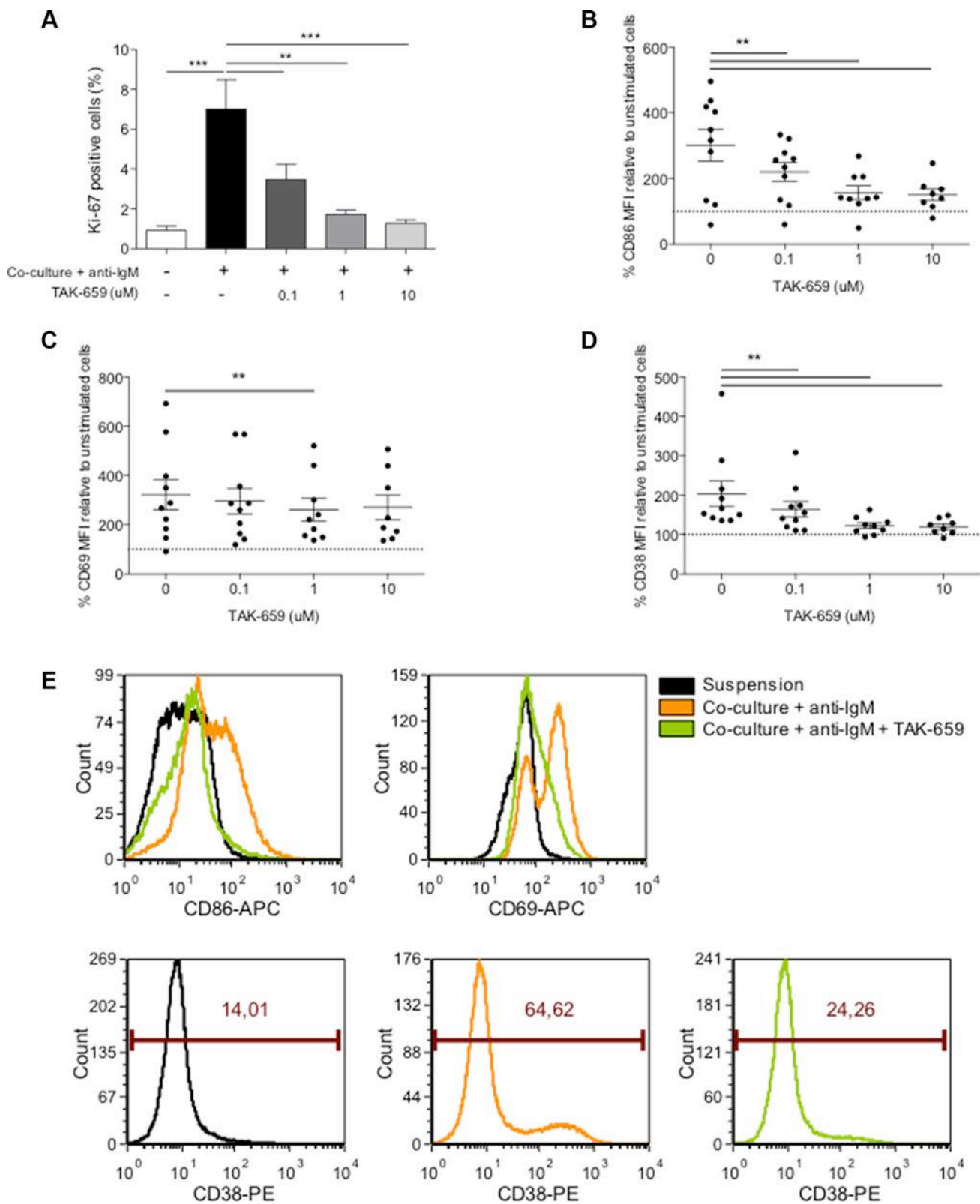


Figure 4: Treatment with TAK-659 effectively abrogates the co-culture-induced proliferation and activation of primary CLL cells. Primary CLL cells from 10 patients pre-treated with increasing doses of TAK-659 were cultured with BMSC, CD40L, CpG ODN and anti-IgM for 48 hours and the expression of Ki-67 (A), CD86 (B), CD69 (C) and CD38 (D) was analyzed by FC. (E) Histograms from a representative patient. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, two-way ANOVA, Bonferroni's post-test. Graph shows mean \pm SEM).

a potential ZAP-70 inhibitor. This might have crucial consequences such as suppression of T cell-based immune responses or antibody-dependent NK-cell mediated cytotoxicity (ADCC), as shown for ibrutinib inhibiting Itk protein which has sequence and functional homology to Btk protein [28, 29].

To investigate the effects of TAK-659 on T cells, we firstly determined the effects on anti-CD3-induced TCR signalling in Jurkat T cells. Immunoblot data revealed that phosphorylation of ZAP-70^{Tyr319}, ZAP-70^{Tyr493}, Itk, Akt and ERK1/2 were not affected by the treatment with TAK-659 (Figure 7A). Further, we evaluated the apoptosis rate in the CD3+ cells obtained from CLL patients; these cells were cultured in our co-culture system and pre-treated with increasing doses of TAK-659. In contrast to primary CLL cells, we found that the co-culture did not modify the viability of primary T cells and that the addition of TAK-659 did not induce apoptosis in these cells (Figure 7B). We also analyzed the effects of TAK-659 on T cell activation by determining the expression of the activation markers CD69 and CD38 by FC. We observed that culturing T cells

in our co-culture system induced the expression of both molecules and that this upregulation was not modified after TAK-659 treatment (Figures 7C, 7D and 7E).

DISCUSSION

Successful targeting of tyrosine kinases that are crucial for BCR signaling has been one of the major recent breakthroughs in the treatment of patients with B-cell malignancies, particularly CLL. Syk protein has a crucial role in transmitting signaling from the BCR and from other receptors, such as CXCR4, providing it with an outstanding relevance as a therapeutic target for CLL [10, 11]. In this sense, targeting Syk has been previously explored using fostamatinib, [11, 10, 12, 30] although some activity was reported in a phase 2 study in NHL and CLL, [13] further clinical development in B-cell malignancies has not been reported. Recently, entospletinib (GS-9973), has been demonstrated to have clinical activity and acceptable toxicity in patients with relapsed or refractory CLL [31]. TAK-659, a new

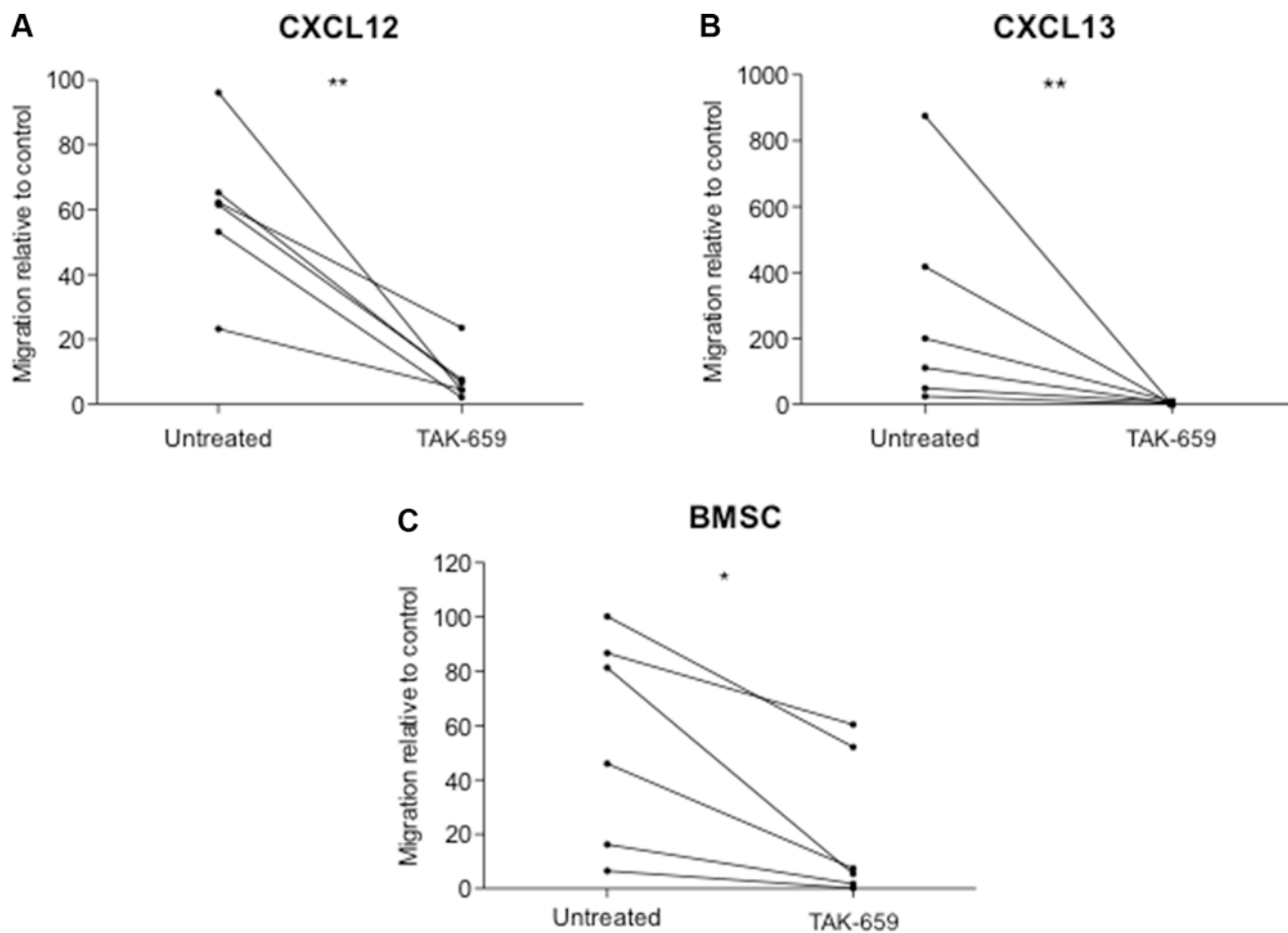


Figure 5: Syk inhibition by TAK-659 inhibits chemotaxis of primary CLL cells toward CXCL12, CXCL13 and BMSC. Primary CLL cells from 6 patients were assayed for chemotaxis toward CXCL12, CXCL13 and the BMSC cell line HS-5 for 4 hours after incubation for 1 hour with TAK-659. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, paired *T*-test. Wilcoxon post-test).

Syk inhibitor, has recently shown antitumor activity in lymphoma xenograft models [32] and in diffuse large B cell lymphoma patients according to preliminary data from the first-in-human phase 1 clinical trial [33].

In the present study, TAK-659 was able to completely block the anti-IgM-induced phosphorylation of Btk, NFκB and ERK1/2. Of note, TAK-659 treatment also led to the inhibition of STAT3^{Tyr705} phosphorylation, as

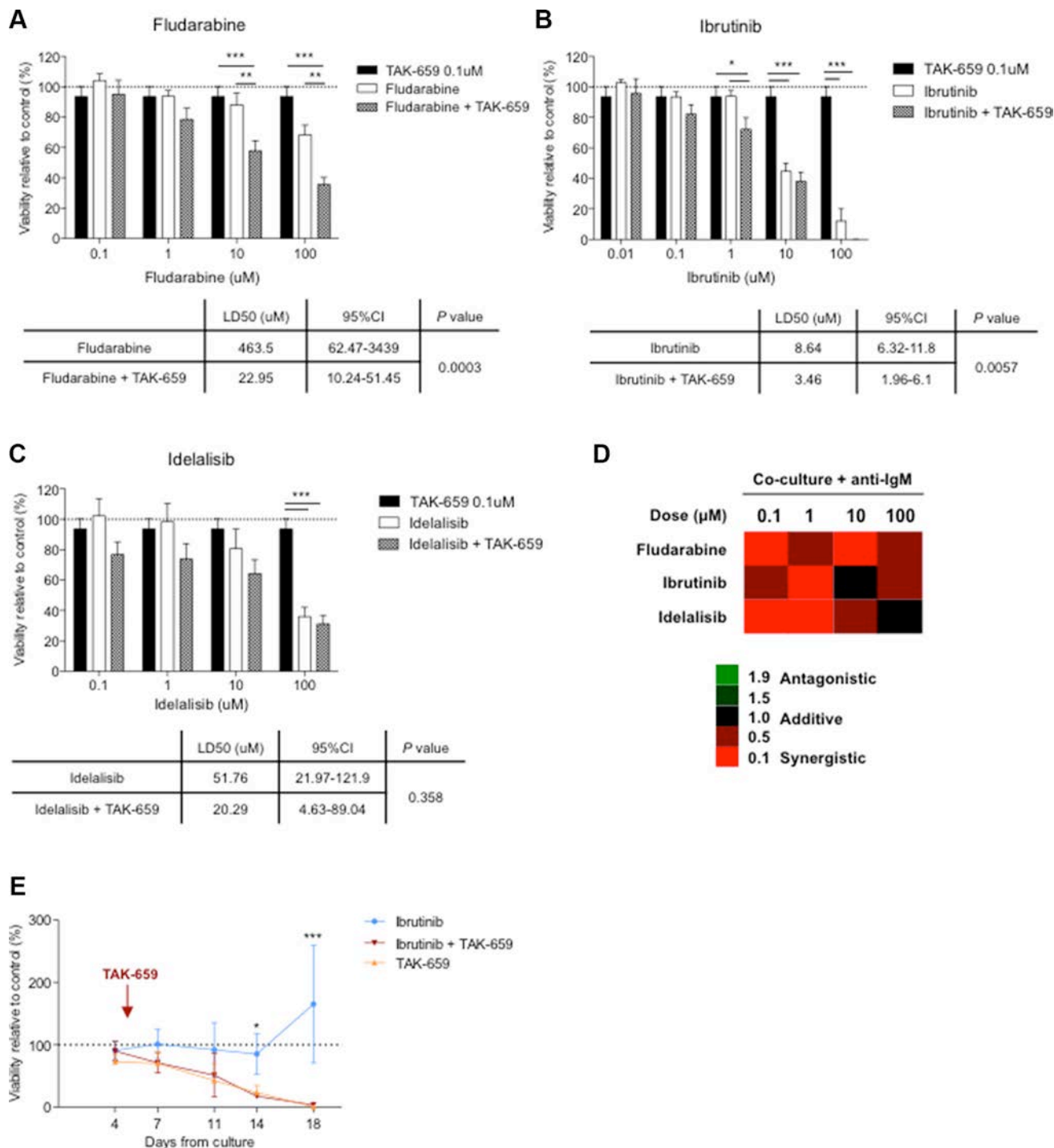


Figure 6: The combination of TAK-659 with fludarabine, ibrutinib or idelalisib synergistically induces apoptosis in proliferative CLL cells. Primary CLL cells from 12 patients were pre-treated with 0.1 μM TAK-659 and increasing doses of fludarabine (A), ibrutinib (B) or idelalisib (C) for 1 hour and co-cultured for 48 hours. LD₅₀ for every treatment cohort were calculated and compared (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, two-way ANOVA, Bonferroni's post-test. Graph shows mean ± SEM). (D) Calculated combination index values are plotted. (E) Primary CLL cells from 6 patients were pre-treated with 1 μM ibrutinib or 1 μM TAK-659 and cultured with CD40L 1 μg/mL. After 4 days, 1 μM TAK-659 was added to ibrutinib-treated cells. Viability of primary CLL cells was analyzed by Annexin V and PI staining by FC at the indicated time points. (**P* < 0.05, ****P* < 0.001, paired *T*-test. Wilcoxon post-test).

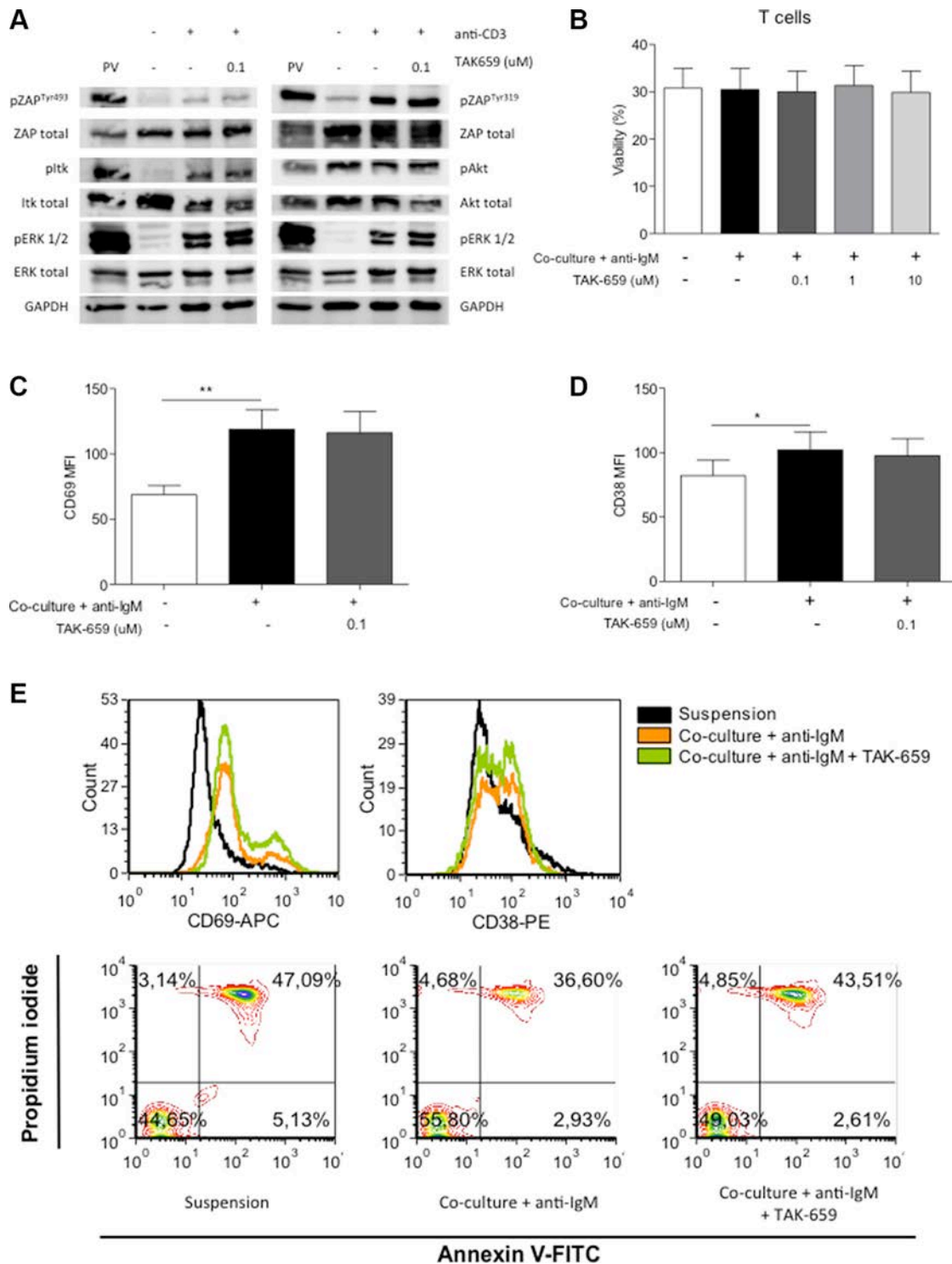


Figure 7: TAK-659 does not inhibit TCR downstream signaling or expression of activation molecules in T cells. (A) Jurkat cells were incubated with 0.1 μM TAK-659 for 1 hour and stimulated with anti-CD3 for 1 minute. Expression of phospho-proteins was analyzed by western blot. Jurkat cells treated with pervanadate (PV) were used as positive controls. (B) PBMC from 10 patients diagnosed with CLL were incubated with increasing doses of TAK-659 for 1 hour and cultured in suspension or in co-culture with BMSC, CD40L, CpG ODN and anti-IgM for 48 hours. Viability of T cells was assessed by Annexin V and PI staining in CD3⁺ cells by FC. (C–D) PBMC from 10 patients diagnosed with CLL were incubated with 0.1 μM TAK-659 for 1 hour and cultured in suspension or in co-culture with BMSC, CD40L, CpG ODN and anti-IgM for 48 hours. The expression levels of CD69 and CD38 were analyzed in CD19⁺/CD3⁺ cells by FC. (E) Histograms for the expression of CD69 and CD38 along with dot-plots for the expression of Annexin V and PI in CLL cells cultured in suspension or in co-culture with anti-IgM with or without TAK-659 from a representative patient are shown. (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, paired *T*-test, Wilcoxon post-test. Graph shows mean ± SEM).

recently described with fostamatinib [34]. Moreover, we observed persistence of phosphorylation of Syk^{Tyr352} and ERK1/2 after TAK-659 treatment, suggesting the existence of molecular feedback loops that would activate Syk^{Tyr352} and alternative signaling pathways, such as CXCR4, responsible for ERK1/2 activation when BCR signaling is inhibited. In this regard, Syk^{Tyr352} phosphorylation through Lyn activation in a feedback response to Syk inhibition by fostamatinib has been previously described [35].

Clinically, BCR inhibitors cause CLL cell redistribution from tissues into the PB [7, 36]. Reduced CLL cell adhesion to stromal cells might promote their mobilization to the PB where a reduced responsiveness to CXCL12 and CXCL13 might block CLL cell tissue homing. In this report we have demonstrated that TAK-659 is able to effectively impair CLL cell migration toward CXCL12, CXCL13 and the BMSC cell line HS-5, in line with previous studies with other BCR inhibitors [37, 38].

Herein, we have also shown how TAK-659 is able to efficiently induce apoptosis in primary CLL cells preferentially in proliferative culture conditions. As seen with other kinase inhibitors like ibrutinib or idelalisib, [37–40] TAK-659 requires doses at the micromolar range to achieve significant cytotoxicity in CLL cells despite its inhibitory dose 50 for enzymatic activity is 3.2 nM [32].

The diverse signaling from the microenvironment is also involved in the induction of resistance to fludarabine. Herein, we show that TAK-659 is able to overcome this microenvironment-induced resistance to fludarabine, and that the combination with ibrutinib or idelalisib synergistically decreased CLL cell viability. Significant induction of apoptosis was specifically seen in co-cultured CLL cells suggesting that the difficulty in eradicating this CLL cell compartment might be successfully targeted with combination treatment strategies. In this sense, cross-talk between signaling pathways and feedback loops induced by continuous inhibition of a single target might drive resistance and have impact on the efficacy of single agent therapy. Therefore, we foresee a near future where the simultaneous or sequential inhibition of multiple CLL cell signaling pathways might progressively become relevant for overcoming resistance to single agents. Further, our experiments with extended culture of primary CLL cells treated with ibrutinib, TAK-659 or the sequential combination of both drugs suggest that combinations of different BCR signaling inhibitors, may be an efficient therapeutical approach. Recently, ibrutinib has been shown to irreversibly bind to and inhibit the Btk homologue Itk protein, therefore inhibiting Th2 activation after TCR stimulation. Moreover, Itk inhibition by ibrutinib also led to antagonize anti-CD20 antibodies-dependent NK-cell mediated cytotoxicity, therefore having a negative interaction that should be considered when designing combination therapies including these two types of drugs. Similar effects have been observed with idelalisib [28, 41, 29]. In contrast,

we showed that TAK-659 treatment does not inhibit the Syk homologue ZAP-70 since downregulation of TCR-derived signaling or inhibition of T cell activation were not observed. These results are in agreement with previous kinase activity assays that showed that TAK-659 IC₅₀ for inhibiting ZAP-70 was 87 nM compared to 3.2 nM for inhibiting Syk [32].

In conclusion, our work contributes to the establishment of Syk inhibition using TAK-659 as a rational therapeutic strategy for patients with CLL.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and culture of primary CLL cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 26 patients diagnosed with CLL were isolated by Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom) density gradient and stored in liquid nitrogen until analysis. Only samples with $\geq 85\%$ of CD19+/CD5+ cells CLL cells, as assessed by flow cytometry (FC), were included in the study. A written informed consent was obtained from all patients in accordance with the Declaration of Helsinki, and the study was approved by the local ethical committee.

Cell lines

The UE6E7T-2 and HS-5 human bone marrow stromal cells (BMSC) cells line were obtained from Riken Cell Bank (Ibaraki, Japan) and ATCC (Manassas, VA, USA), respectively. Cells were cultured at 37°C in 5% CO₂ atmosphere in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Carbbad, CA, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 50 µg/mL penicillin/streptomycin. The T-cell acute lymphoblastic leukemia cell line Jurkat and the Burkitt's lymphoma cell line Ramos were obtained from ATCC and were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% heat-inactivated FBS and 50 µg/mL penicillin/streptomycin. All cell lines were obtained more than 6 months before the date of the experiments, and they were not authenticated by the authors.

Co-culture conditions

Following the method we previously described, [25] BMSCs were seeded at a concentration of 1.5×10^4 cells/mL in 24-well plates and incubated for 24 hours to allow cells to adhere. CLL cells were cultured at a ratio of 100:1 (1.5×10^6 cells/mL) on confluent layers of BMSC in RPMI-10%FCS supplemented with 1 µg/mL CD40L (Peprotech, London, United Kingdom) and 1.5 µg/mL CpG ODN (ODN2006; Invivogen, San Diego, CA, USA). Cross-linking of BCR on primary CLL cells and Ramos cells was performed with 10 µg/mL goat anti-human IgM

F(ab')₂ fragment (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). At the indicated time points, CLL cells were harvested by gently washing off, leaving the adherent stromal cell layer intact.

Flow cytometry

Intracellular staining of Ki-67 was performed using a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled antibody against Ki-67 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) after fixation and permeabilization using the BD Intrasure kit (Becton Dickinson) following the manufacturer's instructions. Surface staining of cells was performed using the following monoclonal antibodies conjugated with the indicated fluorochrome: CD19-phycoerythrin (PE) and CD5-allophycocyanine (APC) (Becton Dickinson).

Expression of CD69, CD38 and CD86 in CD19⁺/CD5⁺ and CD3⁺ cells was assessed using the following antibodies: CD19-energy coupled dye (ECD), CD5-phycoerythrin cyanine 5.5 (PC5.5) (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), CD38-PE (EBioscience, San Diego, CA, USA), CD3-PE-cyanine 7 (Cy7), CD69-APC and CD86-APC (Becton Dickinson). Cells were acquired in a Navios™ cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and the results were analyzed using the FCS Express 4 software (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

Western blot analysis

Ramos, Jurkat and primary CLL cells treated with the phosphatase-inhibitor pervanadate (3 mM H₂O₂/ 1 mM NaVO₄) for 5 minutes or 3.3 mM H₂O₂ for 4 minutes at 37°C were used as positive controls for phospho-proteins. Whole cell protein extracts were prepared from 10 × 10⁶ cells using 50 μL lysis buffer containing 20 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) pH 7.4, 1 mM EDTA, 140 mM NaCl, 1% NP-40 supplemented with 2 mM sodium vanadate and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, USA) for 1 hour at 4°C. Protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Equal amounts of denatured protein were resolved by 10% SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). Membranes were blocked for 1 hour at room temperature (RT) in 3% milk/TBS-T. Membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against phospho-Syk^{Tyr352}/phospho-ZAP-70^{Tyr319}, phospho-ZAP-70^{Tyr493}, phospho-Akt^{Ser473}, phospho-ERK1/2^{Thr202/Tyr204}, phospho-STAT3^{Tyr705}, Akt, ERK1/2 and STAT3 (Cell Signaling Technology), phospho-NFκB p65^{Ser336}, Syk and ZAP-70 (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA), phospho-Btk^{Tyr551}/phospho-Itk^{Tyr511}, Btk and Itk (BD Biosciences), phospho-Syk^{Tyr525} and GAPDH (Abcam, Cambridge, United Kingdom), and NFκB p65 (Chemicon, Millipore). Immunodetection was done with the corresponding IgG HRP-linked secondary antibodies (Dako North America, Glostrup, Denmark), and the ECL chemiluminescence detection system (GE Healthcare).

Reagents

TAK-659 (kindly provided by Takeda Pharmaceutical International Co.), fludarabine (Sigma), ibrutinib, idelalisib and R-406 (Selleckchem, Houston, TX, USA) were dissolved in DMSO and stored at -20°C.

Assessment of apoptosis

Apoptosis was assessed analyzing the binding of annexin V-FITC and the incorporation of propidium iodide (PI) by FC. Annexin V/PI double negative cells were considered viable cells. Staining was performed according to the manufacturer's instructions using the annexin V-FITC apoptosis detection kit (Bender Medsystems, Vienna, Austria).

Chemotaxis assays

Migration toward the chemokines CXCL12 and CXCL13, and to the human BMSC cell line HS-5 was determined in primary cells from 6 patients with CLL by using a transwell migration assay across bare polycarbonate membranes (Corning Incorporated, Corning, NY, USA). A total of 100 μL of RPMI-0.5% bovine serum albumin (BSA) containing 1.5 × 10⁶ CLL cells were pre-incubated for 1 hour with TAK-659 before they were added to the top chamber of a 6.5-mm-diameter transwell culture insert with a pore size of 5 μm. Inserts were then transferred into wells containing 600 μL RPMI-0.5% BSA with or without 200 ng/mL CXCL12 or 1 μg/mL CXCL13. Cells were allowed to migrate toward the lower chamber for 4 hours at 37°C in 5% CO₂. To determine migration of CLL cells toward BMSCs, 1.5 × 10⁴ HS-5 cells were seeded and cultured overnight with 600 μL DMEM-10% FBS on the lower chamber. CLL cells were allowed to migrate for 24 hours at 37°C in 5% CO₂. The number of CLL cells in lower chambers was then determined by FC. The migration index was calculated as the number of CLL cells transmigrating with chemokine or stromal cells divided by the number of transmigrating cells with control medium only.

Statistical analysis

Results are expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM) of at least three independent experiments. The statistically significant difference between groups was analyzed using the Mann-Whitney test or one or two-way ANOVA (*t* test), and *P* < 0.05 was considered significant. Lethal dose 50 (LD₅₀) values were calculated with GraphPad Prism software version 5.0 (San Diego, CA, USA). Chou-Talalay method was used for synergy quantification [42]. Analyses were performed using the biostatistics software package SPSS version 22 (IBM, Chicago, IL, USA). Results were graphed with GraphPad Prism software.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no competing financial interests

GRANT SUPPORT

This work was supported by research funding from the Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI 11/00792, PI14/00055, F.B and PI13/00279, M.C), cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF) and Asociación Española Contra el Cáncer (AECC, M.C). N.P. is a recipient of a PhD fellowship granted by Institut de Recerca Vall d'Hebron. C.C. is supported by a grant from Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH). M.C. holds a contract from Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (RYC-2012-12018).

REFERENCES

1. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005; 352:804–15. doi: 10.1056/NEJMra041720.
2. 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.
3. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011; 118:4313–20. doi: 10.1182/blood-2011-06-338855.
4. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, Gibellini F, Njuguna N, Lee E, Stennett L, Raghavachari N, Liu P, McCoy JP, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011; 117:563–74. doi: 10.1182/blood-2010-05-284984.
5. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, Kipps TJ. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002; 100:4609–14. doi: 10.1182/blood-2002-06-1683.
6. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, Alexander HD, Carey BS, Farrugia J, Gardiner A, Mould S, Oscier D, Copplestone JA, Prentice AG. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*. 2006; 107:3584–92. doi: 10.1182/blood-2005-04-1718.
7. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, Grant B, Sharman JP, Coleman M, Wierda WG, Jones JA, Zhao W, Heerema NA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013; 369:32–42. doi: 10.1056/NEJMoa1215637.
8. O'Brien S, Furman RR, Coutre SE, Sharman JP, Burger JA, Blum KA, Grant B, Richards DA, Coleman M, Wierda WG, Jones JA, Zhao W, Heerema NA, et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol*. 2014; 15:48–58. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70513-8.
9. Sada K, Takano T, Yanagi S, Yamamura H. Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J Biochem (Tokyo)*. 2001; 130:177–86.
10. Buchner M, Fuchs S, Prinz G, Pfeifer D, Bartholomé K, Burger M, Chevalier N, Vallat L, Timmer J, Gribben JG, Jumaa H, Veelken H, Dierks C, et al. Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 2009; 69:5424–32. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4252.
11. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Carsetti L, Berno V, Sica S, Leone G, Efremov DG. Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. 2009; 23:686–97. doi: 10.1038/leu.2008.346.
12. Quiroga MP, Balakrishnan K, Kurtova AV, Sivina M, Keating MJ, Wierda WG, Gandhi V, Burger JA. B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood*. 2009; 114:1029–37. doi: 10.1182/blood-2009-03-212837.
13. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, Johnston PB, Vose JM, LaCasce A, Schaefer-Cuttillo J, De Vos S, Sinha R, Leonard JP, Cripe LD, Gregory SA, Sterba MP, et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010; 115:2578–85. doi: 10.1182/blood-2009-08-236471.
14. Herman SEM, Barr PM, McAuley EM, Liu D, Wiestner A, Friedberg JW. Fostamatinib inhibits B-cell receptor signaling, cellular activation and tumor proliferation in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2013; 27:1769–73. doi: 10.1038/leu.2013.37.
15. Purroy N, Abrisqueta P, Carabia J, Carpio C, Palacio C, Bosch F, Crespo M. Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG ODN promotes proliferation of chemoresistant CLL cells phenotypically comparable to those proliferating *in vivo*. *Oncotarget*. 2014; 6:7632–43. doi: 10.18632/oncotarget.2939.
16. Petlickovski A, Laurenti L, Li X, Marietti S, Chiusolo P, Sica S, Leone G, Efremov DG. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2005; 105:4820–7. doi: 10.1182/blood-2004-07-2669.
17. Krysov S, Dias S, Paterson A, Mockridge CI, Potter KN, Smith K-A, Ashton-Key M, Stevenson FK, Packham G. Surface IgM stimulation induces MEK1/2-dependent MYC

- expression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2012; 119:170–9. doi: 10.1182/blood-2011-07-370403.
18. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Petlickovski A, Pelosi M, Chiusolo P, Sica S, Leone G, Efremov DG. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia*. 2007; 21:110–20. doi: 10.1038/sj.leu.2404417.
 19. Palomba ML, Piersanti K, Ziegler CGK, Decker H, Cotari JW, Bantilan K, Rijo I, Gardner JR, Heaney M, Bemis D, Balderas R, Malek SN, Seymour E, et al. Multidimensional single-cell analysis of BCR signaling reveals proximal activation defect as a hallmark of chronic lymphocytic leukemia B cells. *PLoS One*. 2014; 9:e79987. doi: 10.1371/journal.pone.0079987.
 20. Damle RN, Temburni S, Calissano C, Yancopoulos S, Banapour T, Sison C, Allen SL, Rai KR, Chiorazzi N. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood*. 2007; 110:3352–9. doi: 10.1182/blood-2007-04-083832.
 21. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, Wierda WG, Grever MR, Byrd JC, Kay NE, Brown JR, Gribben JG, Neuberg DS, He F, Greaves AW, Rai KR, et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008; 112:1923–30. doi: 10.1182/blood-2007-05-092882.
 22. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*. 1996; 184:1101–9. doi: 10.1084/jem.184.3.1101.
 23. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells Express Functional CXCR4 Chemokine Receptors That Mediate Spontaneous Migration Beneath Bone Marrow Stromal Cells. *Blood*. 1999; 94:3658–67.
 24. Ohl L, Henning G, Krautwald S, Lipp M, Hardtke S, Bernhardt G, Pabst O, Förster R. Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs. *J Exp Med*. 2003; 197:1199–204. doi: 10.1084/jem.20030169.
 25. Purroy N, Abrisqueta P, Carabia J, Carpio C, Calpe E, Palacio C, Castellvi J, Crespo M, Bosch F. Targeting the proliferative and chemoresistant compartment in chronic lymphocytic leukemia by inhibiting survivin protein. *Leukemia*. 2014; 28:1993–2004. doi: 10.1038/leu.2014.96.
 26. Cheng S, Guo A, Lu P, Ma J, Coleman M, Wang YL. Functional characterization of BTK(C481S) mutation that confers ibrutinib resistance: exploration of alternative kinase inhibitors. *Leukemia*. 2015; 29:895–900. doi: 10.1038/leu.2014.263.
 27. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*. 1992; 71:649–62.
 28. Dubovsky JA, Beckwith KA, Natarajan G, Woyach JA, Jaglowski S, Zhong Y, Hessler JD, Liu T-M, Chang BY, Larkin KM, Stefanovski MR, Chappell DL, Frizzera FW, et al. Ibrutinib is an irreversible molecular inhibitor of ITK driving a Th1-selective pressure in T lymphocytes. *Blood*. 2013; 122:2539–49. doi: 10.1182/blood-2013-06-507947.
 29. Da Roit F, Engelberts PJ, Taylor RP, Breij ECW, Gritti G, Rambaldi A, Introna M, Parren PWI, Beurskens FJ, Golay J. Ibrutinib interferes with the cell-mediated anti-tumour activities of therapeutic CD20 antibodies: implications for combination therapy. *Haematologica*. 2014; 100:77–86. doi: 10.3324/haematol.2014.107011.
 30. Braselmann S, Taylor V, Zhao H, Wang S, Sylvain C, Baluom M, Qu K, Herlaar E, Lau A, Young C, Wong BR, Lovell S, Sun T, et al. R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 319:998–1008. doi: 10.1124/jpet.106.109058.
 31. Sharman J, Hawkins M, Kolibaba K, Boxer M, Klein L, Wu M, Hu J, Abella S, Yasenchak C. An open-label phase 2 trial of entospletinib (GS-9973), a selective Syk inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015; 125:2336–43. doi: 10.1182/blood-2014-08-595934.
 32. Huck J, Brake R, Tirrell S, He H, Theisen M, Yu J, Zhang M, Balani S, Atienza J, Vincent P, Manfredi M, Zalevsky J, Kannan K. Antitumor activity of inhibiting SYK kinase with TAK-659, an investigational agent, in DLBCL models. *J Clin Oncol*. 2014 [cited 2015 Jan 13]; 32:5s. Available from <http://meetinglibrary.asco.org/content/134551-144>
 33. Petrich AM, Gordon LI, Infante JR, Nimeiri HS, Zhang B, Faucette S, Shou Y, Shih KC. Ongoing, first-in-human, phase 1 dose-escalation study of investigational Syk inhibitor TAK-659 in patients with advanced solid tumours or lymphoma. *Hematological Oncology*. 2015 [cited 2015 Nov 2]. p. 100–80. doi: 10.1002/hon.2227.
 34. Rozovski U, Wu JY, Harris DM, Liu Z, Li P, Hazan-Halevy I, Ferrajoli A, Burger JA, O'Brien S, Jain N, Verstovsek S, Wierda WG, Keating MJ, et al. Stimulation of the B-cell receptor activates the JAK2/STAT3 signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2014; 123:3797–802. doi: 10.1182/blood-2013-10-534073.
 35. Suljagic M, Longo PG, Bennardo S, Perlas E, Leone G, Laurenti L, Efremov DG. The Syk inhibitor fostamatinib disodium (R788) inhibits tumor growth in the μ -TCL1 transgenic mouse model of CLL by blocking antigen-dependent B-cell receptor signaling. *Blood*. 2010; 116:4894–905. doi: 10.1182/blood-2010-03-275180.
 36. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, Benson DM, Flinn IW, Wagner-Johnston ND, Spurgeon SE, Kahl BS, Bello C, Webb HK, Johnson DM, Peterman S, Li D, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014; 123:3390–7. doi: 10.1182/blood-2013-11-535047.

37. Ponader S, Chen S-S, Buggy JJ, Balakrishnan K, Gandhi V, Wierda WG, Keating MJ, O'Brien S, Chiorazzi N, Burger JA. 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. doi: 10.1182/blood-2011-10-386417.
38. Herman SEM, Gordon AL, Wagner AJ, Heerema NA, Zhao W, Flynn JM, Jones J, Andritsos L, Puri KD, Lannutti BJ, Giese NA, Zhang X, Wei L, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase- δ inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood*. 2010; 116:2078–88. doi: 10.1182/blood-2010-02-271171.
39. Herman SEM, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, Flynn J, Jones J, Blum KA, Buggy JJ, Hamdy A, Johnson AJ, Byrd JC. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood*. 2011; 117:6287–96. doi: 10.1182/blood-2011-01-328484.
40. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ, Giese N, O'Brien S, Yu A, Miller LL, Lannutti BJ, Burger JA. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011; 118:3603–12. doi: 10.1182/blood-2011-05-352492.
41. Kohrt HE, Sagiv-Barfi I, Rafiq S, Herman SEM, Butchar JP, Cheney C, Zhang X, Buggy JJ, Muthusamy N, Levy R, Johnson AJ, Byrd JC. Ibrutinib antagonizes rituximab-dependent NK cell-mediated cytotoxicity. *Blood*. 2014; 123:1957–60. doi: 10.1182/blood-2014-01-547869.
42. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*. 2010; 70:440–6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.

ARTICLE 2

El microambient regula l'expressió del miR-21 i dels gens supressors tumorals PTEN, PIAS3 i PDCD4 a través de la proteïna ZAP-70 en la leucèmia limfàtica crònica.

Les cèl·lules de LLC son altament dependents de les interaccions amb el microambient. Una de les vies principals que participa en aquesta interacció és la via de senyalització del BCR, la qual té un paper crucial en la patogènia i pronòstic de la malaltia. Varis factors de mal pronòstic estan relacionats amb l'increment de senyalització del BCR. L'alta expressió de ZAP-70 és un d'aquests factors i com ja ha estat descrit s'associa amb un pitjor pronòstic i un curs clínic més agressiu de la malaltia. També s'ha observat que aquesta proteïna augmenta la senyalització del BCR i potencia la resposta als estímuls de supervivència i proliferació procedents del microambient.

Un altre factor de mal pronòstic descrit en la LLC, és l'expressió del microRNA miR-21. De fet, aquest miRNA es troba sobreexpressat en LLC i s'associa amb la resistència a la fludarabina, una menor supervivència i una major probabilitat de progressió.

Amb l'objectiu d'aclarir els mecanismes moleculars involucrats en el mal pronòstic en la LLC i de conèixer millor el paper de la proteïna ZAP-70 en la interacció de les cèl·lules de LLC amb el microambient, vam estudiar la potencial relació entre els factors de mal pronòstic ZAP-70 i miR-21 i com aquesta relació podria estar influenciada pel microambient tumoral.

En primer lloc vam analitzar si hi havia una correlació entre els nivells d'expressió de la proteïna ZAP-70 i de miR-21 en pacients de LLC. Vam observar que l'expressió del miR-21 (mesurada per qRT-PCR, de l'anglès *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*) era significativament superior en els pacients que tenien una alta expressió de ZAP-70 (mesurada per citometria de flux).

Després de comprovar que els dos factors estaven correlacionats, vam voler estudiar quina era la relació fisiològica entre ells. Per fer-ho, vam utilitzar

RESULTATS

un model cel·lular amb expressió ectòpica de ZAP-70, generat anteriorment pel nostre grup. Aquest model es basa en una línia cel·lular de limfòcits B malignes (Ramos) transfectats de manera estable amb la proteïna ZAP-70. Aquests experiments, ens van permetre observar que la proteïna ZAP-70 potenciava l'expressió del miR-21 després de l'activació del BCR amb anti-IgM, a través de la via de senyalització de les MAPK i l'activació del factor de transcripció STAT3.

Com ja ha estat descrit, el miR-21 té un paper oncogènic i té com a dianes varis gens supressors tumorals involucrats en la supervivència i proliferació, com son PTEN, PIAS3 (de l'anglès *protein inhibitor of activated STAT 3*) i PDCD4. Degut a això, vam voler estudiar si aquests gens també estaven regulats pel miR-21 en els limfòcits B malignes. Utilitzant el nostre model cel·lular amb expressió ectòpica de ZAP-70, vam observar que l'estimulació del BCR induïda una lleugera disminució de l'expressió d'aquests gens supressors tumorals a nivell proteic. A més a més, per tal de complementar aquests resultats, vam analitzar el perfil d'expressió gènica del conjunt de gens descrits com a dianes de miR-21 en el nostre model cel·lular. El que vam observar, és que l'estimulació del BCR en les cèl·lules transfectades amb ZAP-70 provocava una disminució significativa de l'expressió dels gens diana de miR-21. Aquesta disminució també es va observar, tot i que de manera no significativa, al comparar les cèl·lules transfectades amb ZAP-70 amb les cèl·lules control, ambdues estimulades amb anti-IgM.

Després d'observar la implicació de la proteïna ZAP-70 en la inducció de l'expressió del miR-21 en limfòcits B malignes. Vam voler estudiar aquesta relació en cèl·lules primàries de pacients amb LLC. Com ja ha estat comentat en el treball previ, el cocultiu de les cèl·lules de LLC amb cèl·lules estromals de medul·la òssia i l'estimulació dels receptors CD40 i TLR9, sistema dissenyat pel nostre grup, incrementa la supervivència, proliferació i quimioresistència de les cèl·lules de LLC. A més a més el cocultiu també induïx l'activació i modulació de l'expressió de varies molècules, com per exemple ZAP-70, ERK1/2 i STAT3. Degut a aquestes observacions, vam mantenir les cèl·lules primàries de LLC en cocultiu per analitzar com influenciava l'expressió del miR-21 i dels seus gens diana. Tal i com esperàvem, vam observar que el cocultiu induïa un increment

RESULTATS

significatiu de l'expressió del miR-21 en les cèl·lules de LLC, que es correlacionava amb una disminució, també significativa, de l'expressió dels gens supressors tumorals PTEN, PIAS3 i PDCD4. Per tal de confirmar aquests resultats, vam analitzar les dades públiques sobre l'expressió gènica de mostres aparellades procedents de sang perifèrica i ganglis limfàtics de pacients amb LLC. Acord amb els nostres resultats, l'expressió del miR-21 estava incrementada de manera significativa als ganglis limfàtics, compartiment on la via de senyalització del BCR es troba constitutivament activada, en comparació amb els nivells d'expressió en sang perifèrica. També en aquest compartiment, l'expressió del gen diana PTEN, era significativament inferior a la corresponent expressió en sang perifèrica.

A continuació, per tal d'estudiar el paper de la via de senyalització del BCR en l'increment de l'expressió del miR-21 induït pel cocultiu en les cèl·lules primàries de LLC, vam inhibir aquesta via utilitzant l'ibrutinib, el qual inhibeix a Btk. En concordança amb els resultats observats fins al moment, vam observar que la inhibició de la senyalització del BCR bloquejava de manera significativa l'increment de l'expressió del miR-21 induït pel cocultiu.

Finalment, vam observar que la supervivència de les cèl·lules de LLC induïda pel cocultiu es correlacionava amb la sobreregulació del miR-21.

En conjunt, aquests resultats mostren que el microambient tumoral és capaç de regular l'expressió del miR-21 i dels seus gens diana (PTEN, PIAS3 i PDCD4) a través de la via de senyalització que involucra les proteïnes ZAP-70 i MAPK i el factor de transcripció STAT3.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Microenvironment regulates the expression of miR-21 and tumor suppressor genes PTEN, PIAS3 and PDCD4 through ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia

Júlia Carabia, Cecilia Carpio, Pau Abrisqueta, Isabel Jiménez, Noelia Purroy, Eva Calpe, Carles Palacio, Francesc Bosch & Marta Crespo

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells are highly dependent on microenvironment, being the BCR pathway one key player in this crosstalk. Among proteins participating, ZAP-70 enhances response to microenvironmental stimuli. MicroRNA-21 (miR-21) is overexpressed in diverse neoplasias including CLL, where it has been associated to refractoriness to fludarabine and to shorter time to progression and survival. To further elucidate the role of ZAP-70 in the biology of CLL, we studied its involvement in miR-21 regulation. MiR-21 expression was higher in CLL cells with high ZAP-70. Ectopic expression of ZAP-70 induced transcription of miR-21 via MAPK and STAT3, which subsequently induced downregulation of tumor suppressors targeted by miR-21. The co-culture of primary CLL cells mimicking the microenvironment induced ZAP-70 and miR-21 expression, as well as downregulation of miR-21 targets. Interestingly, the increase in miR-21 after co-culture was significantly impaired by ibrutinib, indicating that the BCR signaling pathway is involved in its regulation. Finally, survival of CLL cells induced by the co-culture correlated with miR-21 upregulation. In conclusion, stimuli from the microenvironment regulate miR-21 and its targeted tumor suppressor genes via a signaling pathway involving ZAP-70, thus contributing to the cytoprotection offered by the microenvironment particularly observed in CLL cells expressing ZAP-70.

Microenvironment found in bone marrow and lymph nodes supports survival, proliferation and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia (CLL)¹. Indeed, CLL cells are highly dependent on interactions with the microenvironment, as evidenced by the spontaneous apoptosis occurring *ex vivo* and the clinical relevance of impeding the access of CLL cells to lymph nodes and bone marrow that targeted treatments such as BTK or PI3K inhibitors induce². The B-cell receptor (BCR) is one of the key players involved in the crosstalk between CLL cells and the microenvironment with a critical role in pathogenesis and prognosis in CLL. Accordingly, different factors related to increased signaling in the BCR pathway, such as unmutated IGHV genes³, high expression of ZAP-70 protein⁴, or increased serum levels of CCL3⁵ are associated with an adverse prognosis in CLL. Expression of ZAP-70 in CLL cells has been related to enhanced response to BCR stimulation, as well as to increased response to diverse migrative and survival stimuli from the microenvironment⁶. Moreover, we recently described how mimicking the microenvironment *ex vivo* leads to the upregulation of ZAP-70 protein in primary CLL cells and how the small percentage of Ki-67 positive cells in peripheral blood (PB) of patients with ZAP-70 are highly enriched in CLL cells expressing ZAP-70⁷.

Aberrant expression of diverse microRNAs (miRNAs) has been related to pathogenesis and clinical outcome in patients diagnosed with CLL (reviewed in ref.⁸). Among them, miR-21 is overexpressed in a wide variety of tumors, where it participates in different oncogenic processes⁹ and has been associated with poor prognosis¹⁰.

Laboratory of Experimental Hematology, Department of Hematology, Vall d'Hebron Institute of Oncology, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. Júlia Carabia and Cecilia Carpio contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.B. (email: fbsch@vhio.net)

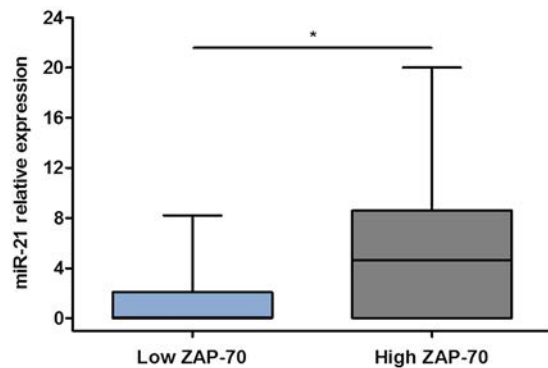


Figure 1. Expression of miR-21 is significantly higher in patients with CLL with high expression of ZAP-70. Expression levels of miR-21 were measured by QRT-PCR in PBMC from 33 patients diagnosed with CLL with high ZAP-70 (N = 17) or low ZAP-70 (N = 16), as indicated at the bottom of the histogram. *P < 0.05.

Gender (F/M in %)	65/35
Age (years)	65 (56–76)
17p deletion (N/P in %)	86/14
13q deletion (N/P in %)	41/59
11q deletion (N/P in %)	84/16
Complex karyotype (No/Yes in %)	90/10
ZAP-70 categorized (Low/High in %)	56/44
IGHV (UM/M in %)	54/46
CLL cells (% CD19/CD5+)	87 (80–94)

Table 1. Characteristics of the patients. Data are expressed as median (Q1–Q3) or in percentages. M: Mutated; UM: Unmutated; N: Negative; P: Positive.

Interestingly, overexpression of miR-21 in mice leads to a pre-B malignant lymphoid-like phenotype, demonstrating that miR-21 is a genuine oncogene¹¹. Also, miR-21 has been shown to be overexpressed in activated B cells, particularly in germinal center and memory B cells. Its expression can be induced by IL-4, IL-4 and CD40L, or by BCR stimulation, suggesting that it may help to maintain B-cell hyperactivation which would prime B cells for malignant transformation¹².

In CLL, miR-21 is overexpressed^{13,14} and it has been associated to refractoriness to fludarabine¹⁵, shorter overall survival and higher probability of progression¹⁶. Against this background, and in order to further elucidate the role of ZAP-70 in the crosstalk between CLL cells and the microenvironment, we studied the potential relationship between ZAP-70 protein and miR-21 and how it would be influenced by the microenvironment. Herein we define the correlation and participation of ZAP-70 protein in the regulation of miR-21 expression. Briefly, we have showed that stimuli from the microenvironment are capable of regulating the expression of miR-21 and its targeted tumor suppressor genes (PTEN, PDCD4 and PIAS3) via a signaling pathway involving ZAP-70, MAPK and STAT3 transcription factor, which correlates with the induction of survival by the microenvironment. These results help to enlighten the biology behind the adverse clinical outcome of patients with CLL and high expression of ZAP-70 and describe the participation of miR-21 in the crosstalk between CLL cells and the microenvironment.

Results

Expression of microRNA miR-21 is significantly higher in CLL cells with high expression of ZAP-70. The relationship of miR-21 expression with indicators of bad prognosis in CLL and its role in B lymphocytes activation and oncogenesis prompted us to initially analyze the differential expression of miR-21 according to ZAP-70 status in primary cells from patients diagnosed with CLL. For that we purified CD19+ cells by means of magnetic separation from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in 33 patients diagnosed with CLL with either high (N = 17) or low (N = 16) expression of ZAP-70 as assessed by flow cytometry. Purity, further determined by flow cytometry, was superior to 90% in all cases. We then determined the expression of miR-21 by QRT-PCR and found that it was significantly higher in patients with high expression of ZAP-70 (mean miR-21 expression: 5.781 ± 1.517) than in patients with low ZAP-70 expression (mean miR-21 expression: 1.149 ± 0.5355 ; $p = 0.0183$) (Fig. 1). The main characteristics of the patients are detailed in Table 1.

In B cells, ZAP-70 protein enhances the induction of expression of miR-21 after BCR stimulation via MAPK and STAT3 activation. ZAP-70 protein participates in different signaling pathways that modulate the interaction of CLL cells with the microenvironment. To elucidate if ZAP-70 protein could be directly involved in miR-21 upregulation in CLL, we stimulated the BCR of Ramos malignant B-cells stably

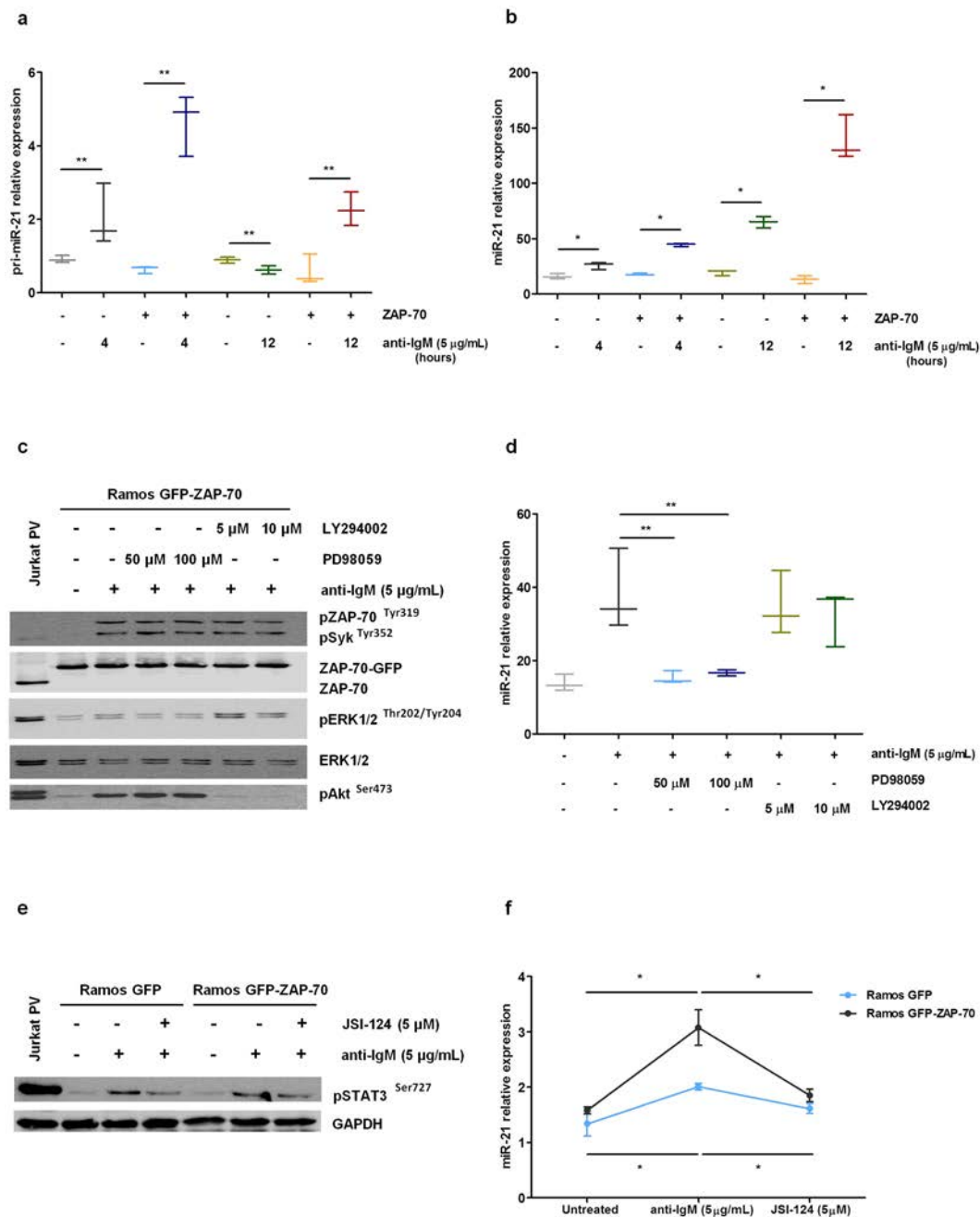


Figure 2. ZAP-70 protein overexpression enhances the induction of miR-21 expression after BCR stimulation in B cells via MAPK and STAT3 activation. (**a–b**) Ramos stable transfectants were stimulated with 5 µg/mL F(ab')₂ anti-IgM for 4 and 12 hours. Expression levels of primary miR-21 (**a**) and miR-21 (**b**) were measured by QRT-PCR. (**c–d**) Ramos GFP-ZAP-70 cells were stimulated with 5 µg/mL F(ab')₂ anti-IgM for 5 minutes after pre-incubation for 1 hour with 5 µM or 10 µM LY294002 for Akt inhibition or 50 µM or 100 µM PD98059 for ERK1/2 inhibition. Immunoblotting analysis confirmed the inhibition of phosphorylation of Akt and ERK1/2 (Jurkat cells treated with PV were used as positive control) (**c**) and expression levels of miR-21 were measured by QRT-PCR after 12 hours (**d**). (**e–f**) Ramos stable transfectants were stimulated with 5 µg/mL F(ab')₂ anti-IgM for 5 minutes and pre-treated 1 hour with 5 µM JSI-124 for STAT3 inhibition. Immunoblotting analysis confirmed the inhibition of STAT3 phosphorylation (Jurkat cells treated with PV were used as positive control) (**e**) and expression levels of miR-21 were measured by QRT-PCR after 48 hours (**f**). *P < 0.05, **P < 0.005.

transfected with a vector expressing a GFP-ZAP-70 fusion protein or GFP-only as a control. After 4 hours of anti-IgM stimulation we observed a 2.217 fold increase of the primary transcript of miR-21 in control Ramos cells (from 0.911 AU ± 0.055 to 2.019 AU ± 0.487), whereas in Ramos-ZAP-70 this fold increase went up to 7.387 (from 0.63 AU ± 0.057 to 4.654 AU ± 0.484) (Fig. 2a). After 12 hours, however, the increase was smaller and only

observed in ZAP-70 expressing cells. On the contrary, mature miR-21 expression was only slightly increased after 4 hours of BCR stimulation (1.619 fold increase in control Ramos cells, and 2.485 fold increase in Ramos GFP-ZAP-70 cells), whereas after 12 hours the increase in expression was much higher, especially in cells expressing ZAP-70 (10.462 fold increase) (Fig. 2b). These results are in agreement with a regulation of miR-21 at the transcriptional level, since we observe a fast increment in its primary transcript followed by an increase in mature miR-21 levels after processing. Therefore, the results indicate that ZAP-70 activation after BCR signaling pathway stimulation is involved in the induction of the transcription of the primary transcript of miR-21 and subsequent increase in mature miR-21 levels.

In order to dissect the signaling pathway involved in the upregulation of miR-21 after ZAP-70 activation via BCR crosslinking we inhibited for 1 hour both Akt and ERK1/2 kinases using LY294002 (5 μ M or 10 μ M) or PD98059 (50 μ M or 100 μ M), respectively, in Ramos GFP-ZAP-70 B cells. In this system, the inhibition of ERK1/2 kinase completely abrogated the rise in miR-21 observed after BCR stimulation, whereas Akt inhibition had no effect (Fig. 2c and d).

The stimulation of the BCR signaling pathway leads to the nuclear translocation and activation of different transcription factors, including STAT3, which binds to the promoter of the primary transcript of miR-21¹⁷. Therefore, we assessed the role of STAT3 in BCR-induced miR-21 upsurge by pharmacological inhibition. For that we incubated Ramos transfectants with 5 μ M JSI-124 for 1 hour and then stimulated the BCR and analyzed miR-21 expression. After 48 hours, we observed that the inhibition of STAT3 blocked the upregulation of miR-21 after BCR stimulation regardless the expression of ZAP-70 (Fig. 2e and f). Altogether these results indicate that the activation of the BCR signaling pathway, which is enhanced when ZAP-70 is expressed, is able to induce an increase in mature miR-21 via transcriptional activation of the primary transcript after a signaling pathway involving MAPK and STAT3 activation.

The tumor suppressor genes PTEN, PDCD4 and PIAS3, targeted by miR-21, are downregulated after BCR stimulation. MicroRNA miR-21 has been shown to target different genes, mostly involved in regulation of proliferation and survival⁹, including tumor suppressors such as PTEN¹⁸, PDCD4¹⁹ and PIAS3²⁰. In order to assess if these genes were also modulated by miR-21 in malignant B cells, we stimulated the BCR of Ramos GFP and Ramos GFP-ZAP-70 cells and observed a modest downregulation at the protein level of PTEN, PDCD4 and PIAS3 (Fig. 3a and b). In addition, the global analysis of gene expression changes in Ramos GFP-ZAP-70 transfectants by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) showed a significant downregulation of miR-21 targets gene set after BCR stimulation (enrichment score: -0.28 ; nominal p-value: 0.049; Fig. 3c). The targets of miR-21 defined in the gene set were also downregulated when comparing Ramos GFP-ZAP-70 cells and Ramos GFP, both stimulated with anti-IgM, although the difference did not reach statistical significance (enrichment score: -0.23 ; nominal p-value: 0.44) (Fig. 3d).

Co-culture of primary CLL cells with BMSC, CD40L and CpG ODN induces the expression of miR-21. With the aim of *in vitro* reproducing the microenvironment that CLL cells find in the proliferative centers *in vivo*, we have developed a co-culture system of primary CLL cells with the bone marrow stromal cell (BMSC) cell line UE6E7T-2, soluble CD40L, CpG ODN and anti-IgM which has been reported elsewhere²¹. Using this approach we observed an increase in survival, proliferation and chemoresistance in primary CLL cells. Interestingly, the co-culture also induced activation and modulation of expression of different molecules, including increased expression of ZAP-70⁷ and phosphorylation of ERK1/2 and STAT3²². Since we observed the involvement of the ZAP-70-ERK1/2-STAT3 axis in the induction of miR-21 expression in Ramos cells, we co-cultured primary CLL cells from 40 patients and observed a relative mean increase of 2.57 fold of miR-21 expression after 48 hours compared to the expression observed in cells kept in suspension (from $7.921 \text{ AU} \pm 1.091$ to $20.35 \text{ AU} \pm 1.938$; $p < 0.0001$) (Fig. 4a). This increase was accompanied by a concomitant downregulation of miR-21 targets PTEN, PDCD4 and PIAS3 at the mRNA level (PTEN from $13.76 \text{ AU} \pm 2.853$ to $3.485 \text{ AU} \pm 0.878$; PDCD4 from $52.3 \text{ AU} \pm 9.01$ to $9.085 \text{ AU} \pm 1.371$; PIAS3 from $13.07 \text{ AU} \pm 1.988$ to $4.353 \text{ AU} \pm 0.569$; $p < 0.001$ in all) (Fig. 4b). The herein described co-culture system is able to mimic the microenvironment found by primary CLL cells in lymph nodes, a tissue that shows constitutively active BCR signaling, as previously reported by Herishanu *et al.*²³. Therefore, we interrogated the PubMed GEO database of expression data from paired samples of lymph nodes (LN), bone marrow (BM) and PB from patients with CLL for the differential expression of miR-21 and its targets in the different compartment. By paired Student's t-test we observed that miR-21 expression level was significantly increased in LNs from patients with CLL compared to PB (from 1.931 ± 0.019 to $1.988 \text{ AU} \pm 0.028$; $p = 0.017$) (Fig. 4c). Moreover, the expression of PTEN was lower in LN compared to PB (from $2.379 \text{ AU} \pm 0.013$ to $2.325 \text{ AU} \pm 0.2$; $p = 0.019$) (Fig. 4d), whereas PIAS3 and PDCD4 did not show any significant change (data not shown). Finally, we aimed to assess the role of the BCR signaling pathway in the induction of miR-21 in co-cultured primary CLL cells. For that we treated primary CLL cells from 13 patients with 5 μ M BTK inhibitor ibrutinib for 1 hour before co-culturing them for 48 hours which significantly impaired miR-21 upregulation, in further agreement with the involvement of the BCR signaling pathway in the regulation of miR-21 expression in CLL (Fig. 4e).

The increase in survival induced by co-culture of primary CLL cells with BMSC, CD40L and CpG ODN correlates with the upregulation of miR-21. Finally, we aimed to study the implication of microRNA miR-21 in the induction of survival and proliferation by the microenvironment in primary CLL cells. For that, we co-cultured primary cells from 11 patients diagnosed with CLL for 48 hours in our co-culture system or in suspension and measured the increase in survival by means of annexinV-PI exclusion, and the proliferation by the percentage of Ki-67 positive CD19+/CD5+ CLL cells. As expected, the co-culture induced an increase in survival, proliferation, and the expression of miR-21 (Fig. 5). Interestingly, we also observed that

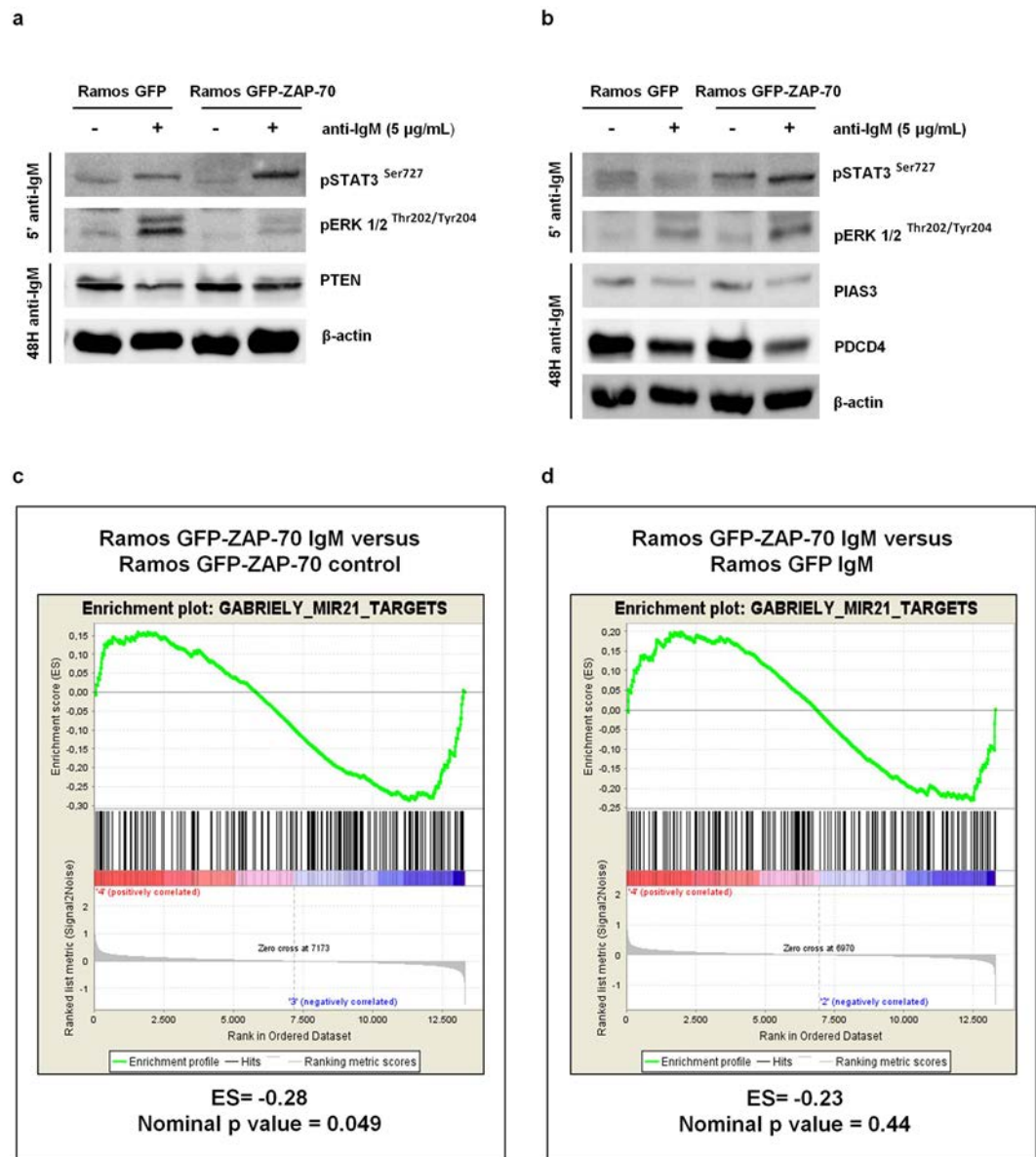


Figure 3. The tumor suppressor genes PTEN, PDCD4 and PIAS3, targeted by miR-21, are downregulated after BCR stimulation. **(a,b)** Ramos stable transfectants were stimulated with 5 µg/mL F(ab')₂ anti-IgM for 5 minutes and 48 hours. Enhanced STAT3 and ERK1/2 phosphorylation was observed in IgM-BCR stimulated cells for 5 minutes. PTEN, PIAS3 and PDCD4 downregulation was observed in IgM-BCR stimulated cells after 48 hours. **(c,d)** Gene set enrichment analysis (GSEA) for Gabriely_miR21_targets gene set (N = 289). The panel shows GSEA of Ramos GFP-ZAP-70 stimulated with 5 µg/mL F(ab')₂ anti-IgM for 4 hours versus Ramos GFP-ZAP-70 unstimulated **(c)**. The enrichment plot shows GSEA of Ramos GFP-ZAP-70 versus Ramos GFP cells, both stimulated with 5 µg/mL F(ab')₂ anti-IgM for 4 hours **(d)**. ES: enrichment score.

the cytoprotection conferred by the microenvironment was significantly correlated to the fold change increase in miR-21 expression observed ($r^2 = 0.479$, $p = 0.018$; Fig. 5a) indicating that miR-21 plays a role, among other factors, in that cytoprotection. The induction of proliferation, however, did not correlate with miR-21 increase (Fig. 5b).

Discussion

The crosstalk between CLL cells and the microenvironment is able to strongly modulate biological processes in these cells, such as sustained survival, proliferation, circulation between different compartments, lack of response to apoptotic signals, and response to different therapeutic agents. CLL cells that express unmutated IGHV genes have an increased BCR signaling, partly because of the usual concomitant expression of ZAP-70 protein which directly enhances that signaling^{24,25}. Moreover, CLL cells temporarily residing in the LNs activate downstream elements of the BCR signaling pathway, regardless of the IGHV mutational status²³. Therefore, we believe that

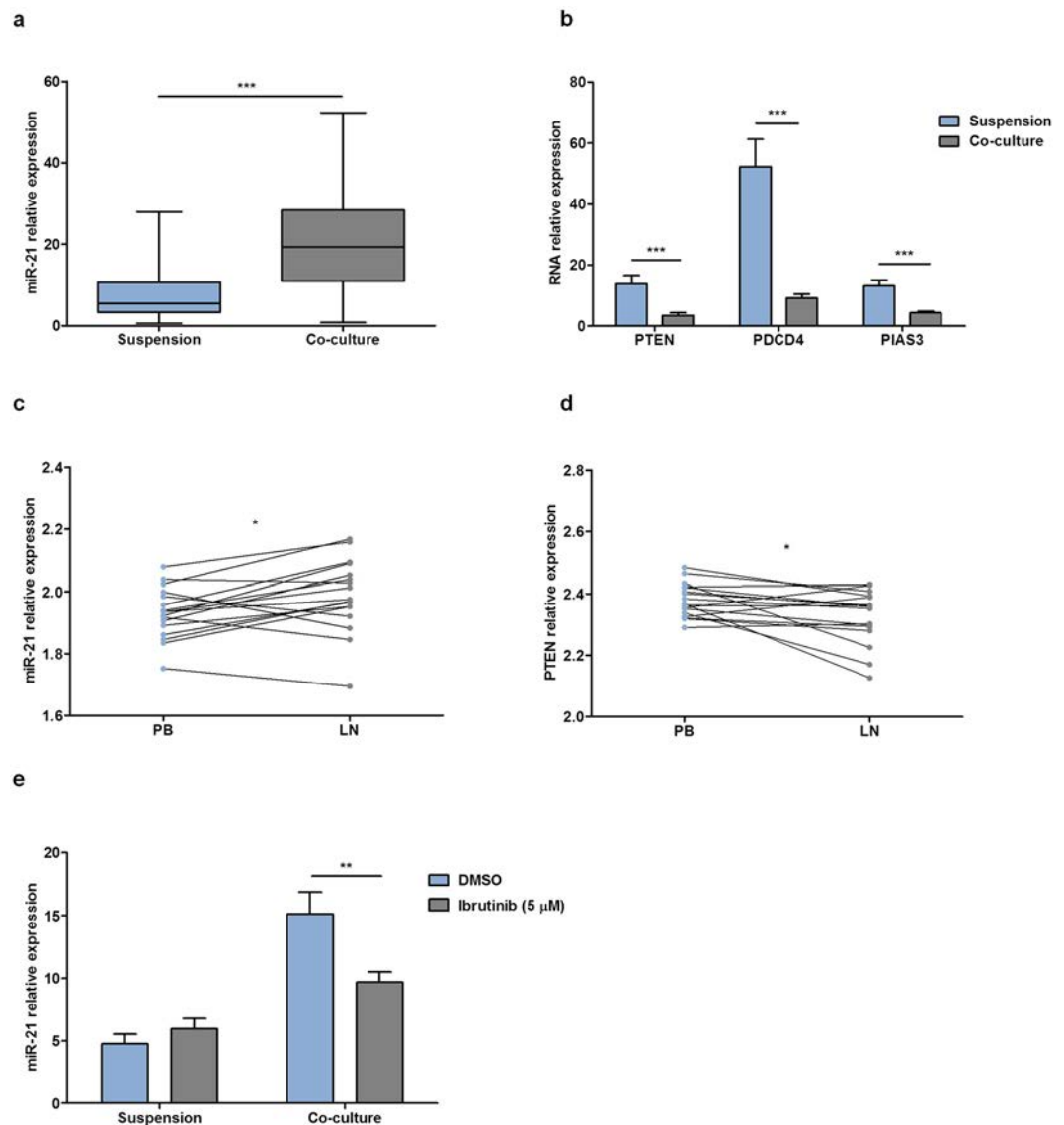


Figure 4. Co-culture of primary CLL cells with BMSC, CD40L and CpG ODN induces the expression of miR-21 and downregulation of the miR-21 targets PTEN, PDCD4 and PIAS3. **(a)** Primary CLL cells from 40 patients were cultured in suspension or in co-culture for 48 hours and miR-21 expression was measured by QRT-PCR. **(b)** Primary CLL cells from 22 patients were cultured in suspension or in co-culture for 48 hours. PTEN, PDCD4 and PIAS3 expression was determined by QRT-PCR. **(c–d)** Relative gene expression comparison between matched samples from peripheral blood (PB) and lymph nodes (LN) from 17 treatment-naïve CLL patients, using public data from Y. Herishanu *et al.*, Blood 2011²³. mRNA expression level of miR-21 **(c)** and PTEN **(d)** were analyzed and compared by Wilcoxon matched pairs signed rank test. **(e)** PBMC from 13 patients were pre-treated with 5 μM PCI-32765 for 1 hour and cultured in suspension or in co-culture for 48 hours. Expression levels of miR-21 were measured by QRT-PCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$.

contributing to further dissecting the different elements participating in this pathway is of relevance for the complete understanding of CLL intricate biology.

MicroRNAs have been described to be of relevance for CLL in different facets, nonetheless the first microRNAs to be proved to be able to act as tumor suppressors were miR-15a and miR-16-1, which are deleted in around 50% of cases of CLL²⁶. Also, both overexpression or downregulation of different microRNAs have been related to features of aggressive disease, including miR-155²⁷ and miR17-92²⁸ whose expression is regulated by microenvironmental stimulus, rather than by the presence of genetic alterations. MicroRNA-21 was the second microRNA to be directly shown to cause a tumor phenotype in a mouse model, specifically the development of a pre-B lymphoproliferative disease, and thus being a genuine oncogene or *onco-miR*¹¹. Although not being extensively studied in CLL, its overexpression has been related to refractoriness to fludarabine¹⁵, to a shorter overall survival, and to a higher probability of progression¹⁶. Also, the cytoprotection offered by IL-4 correlated with miR-21 fold change in a *ex vivo* model of CLL²⁹. Herein, we initially described how primary CLL cells with basal high

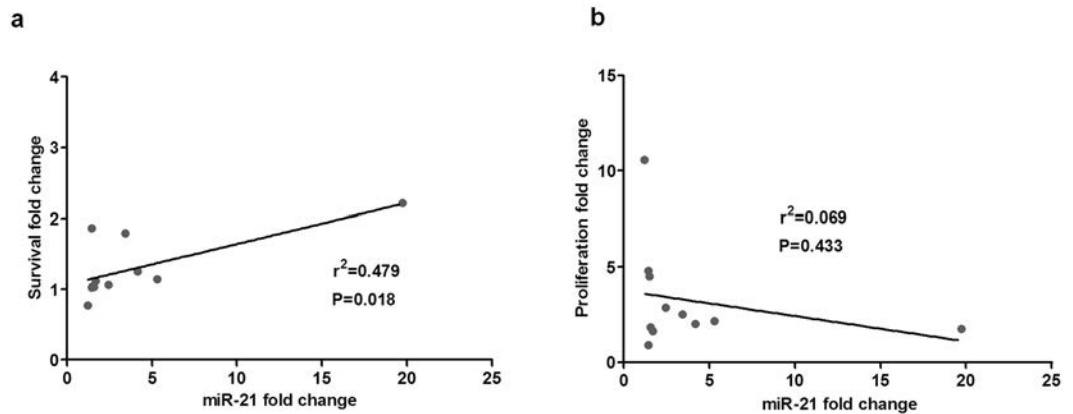


Figure 5. Co-culture of primary CLL cells with BMSC, CD40L and CpG ODN increases survival, proliferation and miR-21 expression. Survival and miR-21 increase are significantly and positively correlated. PBMC from 11 patients diagnosed with CLL were maintained in suspension or in co-culture for 48 hours. (a) Linear regression analysis of the correlation between fold changes of viability (viability in co-culture versus suspension) and fold changes of miR-21 mRNA expression (miR-21 expression in co-culture versus suspension). (b) Linear regression analysis of the correlation between fold changes of proliferation (proliferation in co-culture versus suspension) and fold changes of miR-21 mRNA expression (miR-21 expression in co-culture versus suspension). r^2 is the coefficient of determination.

expression of ZAP-70 also have higher levels of miR-21 expression, which prompted us to further study the potential role of ZAP-70 protein in the regulation of the expression of miR-21. However, although the mean expression of miR-21 was higher in the group of patients with high expression of ZAP-70, we did not observe a significant linear correlation between the percentage ZAP-70-positive CLL cells and the level of miR-21 expression as assessed by QRT-PCR (data not shown); therefore, even though ZAP-70 is probably directly involved in the regulation of the expression of miR-21 in primary CLL cells, it is likely that other proteins and signaling pathways are also participating in miR-21 regulation of expression in CLL, precluding the observation of a direct positive correlation between miR-21 and ZAP-70 expression in primary CLL cells. ZAP-70 protein has been directly involved in previous reports by us and others in the modulation of different proteins implicated in the crosstalk of CLL cells with the microenvironment, such as CCR7²⁴ and CXCR4⁶. Using a system that we had previously described²⁴, in which we study the role of ZAP-70 by transfecting mature neoplastic B cells, in this study we describe how ZAP-70 participates in the induction of miR-21 transcription by a pathway involving MAPK and STAT3 activation.

MicroRNAs can potentially target several different genes, mainly by binding to the 3'UTR region of mRNA and controlling mRNA stability and/or translation³⁰; in the particular case of miR-21, the majority of its described targets are tumor suppressor genes involved in proliferation, apoptosis or inflammation^{9,31}. For the current study we chose to evaluate the three miR-21 target genes, namely PTEN, PDCD4 and PIAS3, defined to be relevant for B-cell malignancies. In Ramos expressing ZAP-70 a slight but reproducible downregulation of PTEN, PDCD4 and PIAS3 at the protein level after BCR activation was detected. In the case of primary CLL cells that were co-cultured in conditions mimicking the microenvironment, there was an upregulation of miR-21 expression that could be explained in part by the concomitant increase of ZAP-70, while other signals from the microenvironment are probably involved in the upregulation of miR-21. In this sense, the stimulation of CLL cells with IL-4 has also been shown to induce upregulation of miR-21²⁹. The co-culture of CLL cells herein described therefore induced the upregulation of miR-21 and a subsequent clear downregulation at the mRNA level of PTEN, PDCD4 and PIAS3, pointing towards the direct downmodulation by miR-21 but not ruling out the possibility of other microenvironmental factors involved in the regulation of these tumor suppressors. Remarkably, the increase of miR-21 in co-cultured CLL cells did actually correlate with the increase in survival or protection from spontaneous apoptosis provided by the microenvironment, again suggesting a clear role for miR-21 and its targets in this phenomenon. The upregulation of the BCR pathway that can be induced by ZAP-70 protein is one of the differential features observed when comparing paired samples of CLL cells residing in the peripheral blood or in the lymph nodes, where the signature of genes related to BCR signaling has been observed to be upregulated. Herein, we interrogated the publicly available data on GEP of paired samples from LNs and PB from patients with CLL provided by Herishanu and collaborators²³ and observed that miR-21 was indeed significantly upregulated in LNs according to paired Wilcoxon t-test. The specific analysis of microRNAs differentially expressed between LNs and PB in CLL has been recently published by Saleh and collaborators¹⁴. They observe that miR-21 is 10 times higher in CLL compared to normal B cells, and also that the expression is higher in LNs compared to PB, although the difference did not reach statistical significance. In order to further relate the increase of miR-21 that we observed after stimulating primary CLL cells with microenvironmental stimuli with BCR signaling we inhibited this pathway with the widely used BTK inhibitor ibrutinib, which caused a marked impairment in the upregulation of miR-21. In conclusion, we have shown that stimuli from the microenvironment are capable of regulating the expression of miR-21 and the tumor suppressor genes (PTEN, PDCD4 and PIAS3) in CLL via a

signaling pathway involving ZAP-70, MAPK and STAT3 transcription factor which correlates with the induction of survival by the microenvironment. Although further experiments are warranted in order to fully elucidate other factors apart from ZAP-70 involved in the regulation and functional role of miR-21 in CLL, these results help to enlighten the biology behind the adverse clinical outcome of patients with CLL having high expression of ZAP-70 and enhanced activation of the BCR signaling pathway.

Methods

Primary CLL cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 77 treatment-naïve patients diagnosed with CLL were isolated by Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) density gradient centrifugation and cryopreserved in liquid nitrogen until analysis. Patients were selected on the basis of availability of frozen samples for biological studies. Written informed consent was obtained from all patients in accordance with the Declaration of Helsinki and all experiments were conducted in accordance to such declaration. The study was approved by the clinical investigation ethical committee from Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona, Spain). ZAP-70 expression was determined by flow cytometry: first, the expression of cell surface antigens was detected using the following fluorochrome-labeled antibodies: CD19-ECD, CD5-PC5.5 (Beckman Coulter) and CD3-PE-Cy7 (Beckton Dickinson) followed by intracellular detection of ZAP-70 using the IntraSure kit (Beckton Dickinson) and primary antibody anti-ZAP-70-PE (Beckman Coulter). Cases with equal or more than 20% of ZAP-70-positive cells, using autologous T cells as an internal control, were considered to be ZAP-70 positive, as previously described⁴.

For determination of miR-21 expression according to ZAP-70 expression, CD19-positive CLL cells from 33 cases were purified prior to nucleic acid extraction by positive selection using anti-CD19 magnetic microbeads (Miltenyi Biotech). Purity of CD19+ cells greater than 95% was obtained in all samples. For the experiments in Figs 4 and 5, additional 44 primary samples from patients with CLL were analyzed. Patient characteristics are summarized in Table 1.

Cell lines. Cell lines were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco[®]) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 µg/mL penicillin/streptomycin and 2 mM L-glutamine at 37 °C in a humidified atmosphere (5% CO₂). Ramos cell line derives from a Burkitt's lymphoma and it was obtained from American Type Culture Collection (ATCC). Ramos cells were stably transfected with a vector encoding for ZAP-70 protein fused with Green fluorescent protein (GFP) or GFP only as a control²⁴. Jurkat cells are derived from a T-cell acute lymphoblastic leukemia and they were obtained from ATCC. Jurkat cells were stimulated with pervanadate (3 mM H₂O₂/1 mM NaVO₄) for 5 minutes at 37 °C, as a positive control for phosphoproteins. Human Bone Marrow Stromal Cell (BMSC) cell line UE6E7T-2 was provided by Riken Cell Bank (Ibaraki, Japan) and cultured at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco[®]) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% heat-inactivated FBS and 50 µg/mL penicillin/streptomycin.

Co-culture of primary CLL cells. PBMC from patients diagnosed with CLL were co-cultured with BMSC at a 100:1 ratio and stimulated with 1 µg/mL CD40L (Peprotech) and 1.5 µg/mL CpG ODN (ODN2006; Invivogen). After 48 hours, CLL cells were harvested by gently washing off, leaving the adherent stromal cell layer intact.

Quantitative RT-PCR. Total RNA from cell lines and PBMC from patients was extracted by using TRIzol reagent (Invitrogen). For miRNA amplification, RNA was reverse transcribed into single stranded complementary DNA (cDNA) using ±TaqMan MicroRNA Assays system (Applied Biosystems) and specific primer for hsa-miR-21 and RNU6B as control. mRNA was reverse transcribed into cDNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Both mRNA and miRNA levels were detected by either TaqMan Assays (PTEN Hs02621230_s1, PDCD4 Hs00377253_m1, PIAS3 Hs00966035_m1) or TaqMan MicroRNA Assay (hsa-miR-21 000397) (Applied Biosystems). RNU6B (001093) and GAPDH (Hs03929097_g1) were used as internal controls for miRNA and mRNAs, respectively. Primary miR-21 was amplified with specific primers previously described (see ref.¹⁷) and quantified using SYBR GreenER qPCR SuperMix. QRT-PCR was performed in an ABI Prism 7900HT Sequence Detector System (Applied Biosystems) in triplicates for each cDNA. ABI SDS 2.4 Software (Life Technologies) was used to calculate relative expression, using comparative Ct method ($\Delta\Delta Ct$). RNA expression levels are defined as arbitrary units (AU) using Ramos cell line as a calibrator.

Immunoblotting. BCR was stimulated with 5 µg/mL F(ab)₂ anti-IgM (Invitrogen). ERK1/2 and Akt were inhibited with PD98059 (Cell Signaling Technology, Inc.) and LY294002 (Sigma-Aldrich), respectively. Protein from cell lines was extracted using 20 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, 140 mM NaCl, 1% of NP-40 supplemented with 2 mM sodium vanadate and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) for 30 minutes at 4 °C. Protein concentration was determined using the Bio Rad Protein Assay system (Bio-Rad). Equal amounts of denatured protein were separated by 10% polyacrylamide-SDS gel electrophoresis. The size-separated proteins were transferred to Immobilon-phosphate membranes (Millipore). Membranes were blocked with 5% milk/TBS-T (Tris-Buffered Saline Tween-20) for 1 hour at room temperature (RT). Membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies against phospho-ZAP-70^{Tyr319}/Syk^{Tyr352}, phospho-Akt^{Ser473}, phospho-ERK1/2^{Thr202}^{Tyr204}, phospho-STAT3^{Ser727}, Akt, ERK1/2, PTEN and PDCD4 (Cell Signalling Technology Inc.), ZAP-70 (clone 2F3.2; Upstate Biotechnology), PIAS3 (WuXi AppTec.ABGENT) and β-actin (Abcam). Immunodetection was done with the corresponding IgG HRP-linked secondary antibodies (Dako North America) for 1 hour at RT. Chemiluminescent images were obtained using LAS-4000 equipment (Buckinghamshire).

Cell viability and proliferation. Cell viability was evaluated by surface annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) and propidium iodide (PI) double-negative staining assessed by flow cytometry (Bender MedSystems).

Expression of Ki-67 was used to measure cell proliferation rate by flow cytometry. Surface staining of 1×10^6 cells was performed with the following monoclonal antibodies conjugated to a fluorochrome: CD19-phycoerythrin (PE) and CD5-allophycocyanine (APC). Intracellular staining was performed using FITC-labeled antibody against Ki-67 (Becton Dickinson) after fixation and permeabilization using the BD Intrasure kit (Becton Dickinson) following the manufacturer's instructions. Cells were acquired in a Navios™ cytometer and the results were analyzed using the FCS Express 4 software (De Novo Software).

Statistical analysis. Results are shown as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of values obtained in three or more independent experiments. Statistical analysis between paired samples was performed using Student's paired two-tailed t-test or Wilcoxon matched pairs signed rank test, difference between groups was analyzed using the Mann-Whitney U test, and $P < 0.05$ was considered significant. Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed using the Gabriely_miR-21_targets gene set from the Molecular Signatures Data Base in the GSEA software from the Broad Institute^{32,33}. Linear regression analysis (Spearman's rank correlation) was used to study the correlation between miR-21 expression and survival or proliferation. Analyses were performed using the biostatistics software package SPSS Version 17 (IBM). Results were graphed with GraphPad Prism software Version 5.0.

Data Availability. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- ten Hacken, E. & Burger, J. A. Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia—focus on the B-cell receptor. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 548–556 (2014).
- Byrd, J. C. *et al.* The 2-year follow-up of treatment-naïve and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood* **125**, 2497–2506 (2015).
- Damle, R. N. *et al.* Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1840–1847 (1999).
- Crespo, M. *et al.* ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1764–1775 (2003).
- Sivina, M. *et al.* CCL3 (MIP-1 α) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **117**, 1662–1669 (2011).
- Calpe, E. *et al.* ZAP-70 promotes the infiltration of malignant B-lymphocytes into the bone marrow by enhancing signaling and migration after CXCR4 stimulation. *PLoS One* **8**, e81221 (2013).
- Purroy, N. *et al.* Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG ODN promotes proliferation of chemoresistant CLL cells phenotypically comparable to those proliferating *in vivo*. *Oncotarget* (2014).
- Bottoni, A. & Calin, G. A. MicroRNAs as Main Players in the Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia. *MicroRNA Shāriqah United Arab Emir.* **2**, 158–164 (2014).
- Jazbutyte, V. & Thum, T. MicroRNA-21: from cancer to cardiovascular disease. *Curr. Drug Targets* **11**, 926–935 (2010).
- Fu, X. *et al.* Prognostic role of microRNA-21 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Clin. Invest.* **41**, 1245–1253 (2011).
- Medina, P. P., Nolde, M. & Slack, F. J. OncomiR addiction in an *in vivo* model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* **467**, 86–90 (2010).
- Thapa, D. R. *et al.* B-cell activation induced microRNA-21 is elevated in circulating B cells preceding the diagnosis of AIDS-related non-Hodgkin lymphomas. *AIDS Lond. Engl.* **26**, 1177–1180 (2012).
- Calin, G. A. *et al.* A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1793–1801 (2005).
- Saleh, L. M. *et al.* Ibrutinib downregulates a subset of miRNA leading to upregulation of tumor suppressors and inhibition of cell proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.181> (2016).
- Ferracin, M. *et al.* MicroRNAs involvement in fludarabine refractory chronic lymphocytic leukemia. *Mol. Cancer* **9**, 123 (2010).
- Rossi, S. *et al.* microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood* **116**, 945–952 (2010).
- Löffler, D. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood* **110**, 1330–1333 (2007).
- Wickramasinghe, N. S. *et al.* Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **37**, 2584–2595 (2009).
- Frankel, L. B. *et al.* Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 1026–1033 (2008).
- Xiong, Q. *et al.* Identification of novel miR-21 target proteins in multiple myeloma cells by quantitative proteomics. *J. Proteome Res.* **11**, 2078–2090 (2012).
- Purroy, N. *et al.* Targeting the proliferative and chemoresistant compartment in chronic lymphocytic leukemia by inhibiting survivin protein. *Leukemia*, doi:<https://doi.org/10.1038/leu.2014.96> (2014).
- Purroy, N. *et al.* Inhibition of BCR signaling using the Syk inhibitor TAK-659 prevents stroma-mediated signaling in chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncotarget* **8**, 742–756 (2017).
- Herishanu, Y. *et al.* The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **117**, 563–574 (2011).
- Calpe, E. *et al.* ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood* **118**, 4401–4410 (2011).
- Chen, L. *et al.* ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **111**, 2685–2692 (2008).
- Klein, U. *et al.* The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* **17**, 28–40 (2010).
- Cui, B. *et al.* MicroRNA-155 influences B-cell receptor signaling and associates with aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **124**, 546–554 (2014).
- Bomben, R. *et al.* The miR-17~92 family regulates the response to Toll-like receptor 9 triggering of CLL cells with unmutated IGHV genes. *Leukemia* **26**, 1584–1593 (2012).
- Ruiz-Lafuente, N. *et al.* IL-4 Up-Regulates MiR-21 and the MiRNAs Hosted in the CLCN5 Gene in Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS One* **10**, e0124936 (2015).
- Liu, J. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 214–221 (2008).

31. Buscaglia, L. E. B. & Li, Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin. J. Cancer* **30**, 371–380 (2011).
32. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 15545–15550 (2005).
33. Mootha, V. K. *et al.* PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* **34**, 267–273 (2003).

Acknowledgements

This work was supported by research funding from the Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI14/00055, F.B. and PI13/00279, M.C.), cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF) and Asociación Española Contra el Cáncer (AECC Barcelona, M.C. and P.A.). M.C. holds a contract from Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (RYC-2012-12018). Authors thank the Cellex Foundation for providing research facilities and equipment.

Author Contributions

Designed research and supervised the work: M.C., F.B. Performed experiments: J.C., C.C., P.A., I.J., N.P., E.C. Analyzed and interpreted data: M.C., F.B., J.C., C.C., P.A., C.P. Wrote the manuscript: J.C., M.C., F.B. Revised the manuscript: all authors

Additional Information

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

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) 2017

IV. DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

La LLC es caracteritza per l'acumulació de limfòcits B madurs CD5+ en sang perifèrica, medul·la òssia i òrgans limfàtics secundaris. És a la medul·la òssia i als teixits limfàtics on les cèl·lules de LLC reben estímuls de supervivència, proliferació i quimioresistència procedents de les cèl·lules accessòries, com són les cèl·lules estromals, les NLCs i els limfòcits T(206). L'activació i senyalització del BCR té un paper crucial en la interacció entre les cèl·lules de LLC i el microambient i per tant en la patogènesi d'aquesta malaltia. La importància del BCR va ser demostrada a l'observar que la senyalització d'aquest receptor era la via activada de manera més destacada als ganglis limfàtics, principal compartiment on les cèl·lules de LLC proliferen, en unes estructures anomenades centres de proliferació o pseudofolicles(170). Per tant la senyalització del BCR és essencial per la supervivència i proliferació de les cèl·lules LLC, així com per la migració de les cèl·lules leucèmiques cap als teixits i per la interacció de les cèl·lules de LLC amb els components cel·lulars del microambient(170,197).

La senyalització del BCR també està relacionada amb la progressió clínica de la malaltia. Varis factors de mal pronòstic estan associats amb l'increment de la senyalització del BCR, com per exemple l'absència de mutacions als gens de les IGHV(32), l'alta expressió de ZAP-70(39) o els nivells incrementats en sèrum de les citokines CCL3 i CCL4(333).

Aquestes observacions presentaven la via de senyalització del BCR com una bona diana terapèutica i per això es van desenvolupar varies molècules que inhibien quinases específiques involucrades en la seva senyalització, principalment Syk, PI3K i Btk. Gràcies als estudis *in vitro* que van demostrar que aquests inhibidors eren capaços de bloquejar de manera eficaç els estímuls de supervivència, proliferació i migració procedents del microambient (285,296,297,303,304) es van provar aquestes molècules en pacients amb LLC en assajos clínics, els quals han mostrat uns resultats molt prometedors. Malgrat la gran eficàcia d'aquests tractaments i l'assoliment de respostes duradores en els pacients amb LLC de mal pronòstic, refractaris o en recaiguda, la majoria no assolixen respostes completes i una part dels pacients acaben progressant o

DISCUSSIÓ

desenvolupant resistència al tractament. És per aquesta raó, que és necessari explorar la inhibició d'altres quinases involucrades en la senyalització del BCR i l'eficàcia de noves molècules, per tal de poder inhibir aquesta via de manera simultània o seqüencial i aconseguir una teràpia més eficaç que permeti superar la resistència desenvolupada a un agent en monoteràpia.

En aquest sentit, la proteïna tirosina quinasa Syk representa una excel·lent diana terapèutica, ja que és fosforilada immediatament després de l'activació del BCR, permetent la transmissió i amplificació de la senyal. Per tant és essencial en la senyalització d'aquest receptor. A més a més, en la LLC la proteïna Syk es troba sobrerregulada tant a nivell de RNA missatger com a nivell de proteïna(256) i està activada de manera constitutiva(255).

Amb el primer treball, vam voler estudiar l'eficàcia de la TAK-659, un nou inhibidor de Syk, altament específic. L'efecte de la inhibició de Syk ja havia estat explorat amb el fostamatinib (R406), el qual tenia una especificitat limitada. Els resultats de l'assaig clínic en fase I/II amb aquest agent en monoteràpia van mostrar una certa activitat del fàrmac, al induir una resposta parcial en el 55% dels pacients, però la dosi tolerada es va veure limitada pels efectes secundaris provocats pel fàrmac i el seu desenvolupament es va aturar(287). Tot i així, les dades indicaven que la inhibició de Syk podria ser una bona estratègia terapèutica, per això ens vam interessar per la TAK-659.

Amb la finalitat d'analitzar els efectes de la TAK-659 en la supressió dels estímuls procedents del microambient, vam utilitzar un sistema de cocultiu dissenyat anteriorment pel nostre grup(201). Aquest sistema es basa en el cultiu de les cèl·lules primàries de LLC, amb cèl·lules estromals de medul·la òssia (les quals protegeixen les cèl·lules de LLC de l'apoptosi espontània i induïda per fàrmacs i indueixen l'expressió de marcadors d'activació), amb el lligand del receptor CD40 (per reproduir el paper dels limfòcits T en la inducció de proliferació i supervivència) i amb oligonucleòtids per estimular el TLR9 (receptor amb una potent capacitat d'induir proliferació, producció de citoquines i sobreexpressió de molècules involucrades en la relació entre limf B i T). D'aquesta manera s'aconsegueix reproduir *in vitro* les condicions que les cèl·lules de LLC es troben *in vivo* als centres de proliferació. Prèviament ja havíem observat que aquest model de cocultiu era capaç d'induir la proliferació i la quimioresistència de les cèl·lules primàries de LLC, així com de generar un

DISCUSSIÓ

fenotip comparable al de les cèl·lules de LLC proliferants procedents de sang perifèrica de pacients, al induir l'increment de l'expressió de ZAP-70(201).

A banda de reproduir el compartiment de cèl·lules proliferants i quimioresistents dels pacients amb LLC, en aquest treball necessitàvem activar directament la senyalització del BCR, per tal de poder analitzar els efectes de la TAK-659 en la inhibició d'aquesta via. Per aquesta raó, vam afegir anti-IgM al sistema de co-cultiu, que ja és sabut que indueix respostes més duradores i robustes que les generades per l'estimulació amb anti-IgD(334). Tal i com esperàvem, vam observar que l'estimulació del BCR provocava un increment de la fosforilació d'Akt i d'ERK1/2, de la viabilitat i de la proliferació induïdes pel cocultiu. Els resultats d'aquest treball, mostren que la TAK-659 és capaç de bloquejar de manera dosi dependent la fosforilació de Syk^{Tyr525}, Btk, NF- κ B, ERK1/2 i STAT3 induïda per l'estimulació del BCR, en les cèl·lules de LLC en suspensió, però en canvi no bloqueja completament la fosforilació Syk^{Tyr352}. Aquesta observació juntament amb el fet que hi hagi una fosforilació persistent d'ERK1/2, després de tractar amb la TAK-659 les cèl·lules de LLC cocultivades i estimulades amb anti-IgM, suggereix l'existència d'un circuit de retroalimentació positiva que podria activar el residu Tyr352 de Syk i vies de senyalització alternatives responsables de l'activació d'ERK1/2 quan la via del BCR es troba inhibida.

També vam analitzar la capacitat de la TAK-659 d'inhibir els estímuls de supervivència, proliferació i activació procedents del microambient i de l'estimulació del BCR. Vam observar que la TAK-659 induïa l'apoptosi de les cèl·lules de LLC tant en suspensió com en condicions de cocultiu amb l'estimulació del BCR. Però la capacitat d'induir apoptosi era significativament superior en les cèl·lules de LLC proliferants. A més la TAK-659 induïa l'apoptosi de les cèl·lules de LLC de manera molt més eficaç que el fostamatinib (R406). Els resultats també van mostrar que la TAK-659 inhibia l'increment de proliferació i d'activació cel·lular induït pel cocultiu.

Un dels efectes característics provocats pels inhibidors del BCR, és la redistribució de les cèl·lules de LLC dels teixits cap a la sang perifèrica(298,310) a causa de la interrupció de la senyalització del BCR, que provoca una disminució de la capacitat d'interacció amb les cèl·lules del microambient. Un cop en sang perifèrica, les cèl·lules leucèmiques perden l'efecte protector del

DISCUSSIÓ

microambient i al tenir una capacitat de resposta disminuïda a les quimiocines CXCL12 i CXCL13, no poden migrar cap als teixits(283,304). En relació amb aquesta observació, el nostre treball mostra que la TAK-659 bloqueja de manera efectiva la migració de les cèl·lules de LLC cap a les quimiocines CXCL12 i CXCL13 i cap a les cèl·lules estromals. Per tant la TAK-659 és capaç d'interrompre la residència de les cèl·lules de LLC a la medul·la òssia i ganglis limfàtics.

La resistència als tractaments és una característica freqüent observada en els pacients de LLC, especialment en aquells que ja han estat tractats prèviament i pateixen una recaiguda. Estudis previs realitzats pel nostre grup, van mostrar que els diversos estímuls procedents del microambient induïen la resistència a la fludarabina i a la bendamustina en les cèl·lules primàries de LLC cocultivades(201,335). En aquest treball, vam trobar interessant, analitzar si la TAK-659 era capaç de vèncer aquesta quimioresistència induïda pel cocultiu. El que vam observar és que l'addició de TAK-659 a les cèl·lules primàries tractades amb dosis creixents de fludarabina, era capaç de revertir la quimioresistència induïda pel cocultiu i que la combinació de les dues drogues actuava de manera sinèrgica en la inducció d'apoptosi. També vam estudiar els efectes de la combinació de la TAK-659 amb altres inhibidors de la via de senyalització BCR i vam observar que les combinacions amb idelalisib o ibrutinib disminuïen la viabilitat de les cèl·lules de LLC també de manera sinèrgica. Concretament, en la condició de cocultiu, és on es va observar la inducció d'apoptosi més significativa, suggerint que la combinació de tractaments podria ser una bona estratègia terapèutica per eradicar la malaltia d'aquest compartiment proliferant. A més, la combinació simultània o seqüencial de diferents tractaments podria ser eficaç per superar la resistència generada a un fàrmac concret a causa de la inhibició continua d'una única diana. Aquesta aparició de resistència deguda a la contínua inhibició d'una diana concreta, s'ha observat en un 5.3% dels pacients tractats amb ibrutinib, en els quals apareixen subclones amb mutacions en Btk i mutacions de guany de funció en PLC γ 2, que provoquen una reactivació de la via de senyalització del BCR(312). En base a aquesta observació, vam observar que la inhibició de Syk (la qual és fosforilada abans que Btk) amb la TAK-659 té efectes citotòxics en cèl·lules de LLC resistents a ibrutinib.

DISCUSSIÓ

Finalment, vam voler confirmar que la TAK-659 inhibia de manera específica a Syk i que no tenia cap efecte sobre la seva proteïna homòloga ZAP-70. Ja que la inhibició de ZAP-70 podria provocar la supressió de les cèl·lules T al bloquejar la senyalització del TCR. Recentment, s'ha demostrat que l'ibrutinib també inhibeix de manera irreversible l'Itk, una proteïna homòloga a Btk, fet que provoca la inhibició de l'activació dels limfòcits Th2 després de l'estimulació del TCR(306). A diferència de l'observat amb l'ibrutinib, nosaltres vam mostrar que el tractament amb TAK-659 no provoca la inhibició de ZAP-70 ja que no vam observar disminució de la senyalització derivada del TCR ni inhibició de l'activació dels limfòcits T procedents de pacients amb LLC, cultivats en el nostre sistema de cocultiu.

Per tant, el conjunt de resultats d'aquest treball, aporta raons consistents, per establir la TAK-659 com a estratègia terapèutica pels pacients amb LLC.

En el segon treball ens vam centrar en la proteïna ZAP-70, la qual pertany a la mateixa família de tirosines quinasa que Syk i comparteixen estructura(248). En la LLC l'expressió de ZAP-70 està associada amb un increment de la capacitat de senyalització del BCR de les cèl·lules leucèmiques, que es tradueix en una major capacitat de resposta als estímuls de supervivència i migració procedents del microambient(276). De fet, es va observar que les diferències en la capacitat de resposta a l'estimulació del BCR en els pacients de LLC no eren degudes únicament als nivells d'expressió de Syk, si no al fet d'expressar també la proteïna ZAP-70(269), la qual incrementa la fosforilació de Syk i activa altres proteïnes citosòliques implicades en la senyalització del BCR(272). L'alta expressió de ZAP-70 (>20%) en els pacients amb LLC es correlaciona amb l'absència de mutacions als gens de les IGHV i amb una major probabilitat de progressió i una menor supervivència global (39,42,268,277). A més a més, les cèl·lules de LLC que resideixen als ganglis limfàtics mostren activació dels components de la via de senyalització del BCR, independentment de l'estat mutacional dels gens de les IGHV(170). Per tant, entendre millor el paper de la proteïna ZAP-70 en la interacció de les cèl·lules de LLC amb el microambient, podria afavorir el coneixement dels mecanismes

DISCUSSIÓ

moleculars que regulen la seva expressió i defineixen el mal pronòstic de la malaltia. El miR-21, és un miRNA amb paper oncogènic. Aquesta observació es va demostrar amb un model murí, en el qual l'expressió d'aquest miRNA provocava l'aparició d'una síndrome limfoproliferativa pre-B(162). En la LLC el miR-21 no ha estat estudiat de manera extensa, però la seva sobreexpressió (155,163) es relaciona amb la resistència a la fludarabina(153), una major probabilitat de progressió i una menor supervivència global(147). A més a més, varis estudis mostren que la seva sobreexpressió pot estar induïda per l'estimulació del BCR(165,166) i que podria ser un dels esdeveniment iniciadors de la LLC(164). En base a aquestes observacions, vam hipotetitzar que la proteïna ZAP-70 i el miR-21, ambdós relacionats amb el mal pronòstic de la LLC, podrien estar relacionats entre ells i que el microambient tumoral podria influència aquesta relació.

Per resoldre aquesta hipòtesi, el primer que vam fer va ser analitzar si hi havia una expressió diferencial del miR-21 segons el nivell d'expressió basal de ZAP-70 en cèl·lules primàries de pacients de LLC. Vam observar que l'expressió del miR-21 (mesurada per qRT-PCR) era significativament superior en aquells pacients que també tenien una alta expressió de ZAP-70 (mesurada per citometria de flux i considerat-se alta quan s'expressa en més del 20% de les cèl·lules de LLC). Tot i això, aquesta correlació no era linear, per tant, a banda de ZAP-70, hi hauria altres proteïnes i vies de senyalització implicades en la regulació de l'expressió del miR-21 en la LLC.

La proteïna ZAP-70 participa en diferents vies de senyalització que regulen la interacció de les cèl·lules de LLC amb el micromabient. Estudis prèvis realitzats pel nostre grups, van mostrar que ZAP-70 participa en la senyalització dels receptors CCR7(275) i CXCR4(276) promovent la migració de les cèl·lules B malignes cap als teixits. Per tal d'aclarir si ZAP-70 podria estar involucrada en la sobreregulació del miR-21, vam utilitzar un model cel·lular amb expressió ectòpica de ZAP-70, generat anteriorment pel nostre grup(275). Aquest model es basa en línia cel·lular de limfòcits B de limfoma de Burkitt (Ramos) transfectades de manera estable amb un vector que expressa la proteïna de fusió GFP (de l'anglès *green fluorescent protein*) - ZAP-70 o bé la proteïna GFP sola, com a control. Després de l'estimulació del BCR d'aquestes cèl·lules amb anti-IgM, vam observar en primer moment un increment de

DISCUSSIÓ

l'expressió del miR-21 primari, que més endavant, es traduïa a un increment de l'expressió del miR-21 madur. Aquest increment era superior en les cèl·lules que expressaven ZAP-70 en comparació amb les que no expressaven la proteïna. Per tant, els resultats indicaven que l'activació de ZAP-70 induïda per l'estimulació del BCR estava involucrada en la inducció de la transcripció del miR-21 primari i el conseqüent increment de l'expressió del miR-21 madur.

L'estudi de la via de senyalització involucrada en aquesta sobreexpressió del miR-21 per part de ZAP-70, va mostrar que la inhibició d' ERK1/2 bloquejava completament l'increment del miR-21 observat després de l'estimulació del BCR, però que en canvi la inhibició d'Akt no tenia cap efecte. Ja ha estat descrit que l'estimulació del BCR provoca la translocació nuclear de varis factors de transcripció, entre ells STAT3, el qual s'uneix directament al promotor de la transcripció del miR-21 primari(336). En base a això, els nostres resultats van mostrar que la inhibició d'aquest factor de transcripció bloquejava l'increment d'expressió del miR-21 induït per l'estimulació del BCR.

El miR-21 té com a dianes varis gens supressors tumorals involucrats en proliferació, apoptosi o inflamació(157,337). En el nostre estudi, ens vam centrar en tres dels gens diana de miR-21, concretament PTEN(159), PIAS3(338) i PDCD4(158), tots ells amb un paper rellevant en neoplasies de cèl·lules B. Utilitzant el model cel·lular anterior, vam observar que l'estimulació del BCR de les cèl·lules Ramos amb expressió de ZAP-70 induïa una lleugera disminució d'aquests gens a nivell proteic. Aquesta observació es corresponia amb l'anàlisi del perfil d'expressió gènica del conjunt de gens descrits com a dianes de miR-21 (Gabrielly_miR-21 targets_Gene set), el qual va mostrar que es produïa una disminució significativa dels gens diana del miR-21 després de l'estimulació del BCR de les cèl·lules transfectades amb ZAP-70.

Després d'observar la implicació de la proteïna ZAP-70 en la inducció de l'expressió del miR-21 en limfòcits B malignes vam voler estudiar aquesta relació en cèl·lules primàries de pacients amb LLC. Per tal de reproduir *in vitro* el microambient que les cèl·lules de LLC es troben als centres de proliferació *in vivo*, vam utilitzar el sistema de cocultiu amb cèl·lules estromals de medul·la òssia, CD40L i oligonucleòtids dissenyat pel nostre grup(201), el qual ja havíem observat que incrementa la supervivència, la proliferació, la quimioresistència i l'expressió de ZAP-70, ERK1/2 i STAT3 en les cèl·lules de LLC. Els nostres

DISCUSSIÓ

resultats van mostrar que el cocultiu també incrementa de manera significativa l'expressió del miR-21. Aquest fet s'explicaria per l'increment de ZAP-70 induït també pel cocultiu juntament amb altres senyals procedents del microambient, com és el cas de la IL-4, la qual indueix la sobreexpressió del miR-21 en cèl·lules de LLC (168). En concordança amb aquesta observació, el cocultiu també va provocar una disminució significativa de l'expressió dels gens diana PTEN, PIAS3 i PDCD4 a nivell de RNA missatger en les cèl·lules de LLC. Les nostres observacions *in vitro* es corresponen amb les dades de l'estudi realitzat per Herishanu i col·laboradors(170), en el qual comparen el perfil d'expressió gènica de mostres aparellades de sang perifèrica i ganglis limfàtics de pacients amb LLC i entre d'altres gens, observen que l'expressió del miR-21 és significativament superior en ganglis limfàtics en comparació amb les mostres procedents de sang perifèrica i que l'expressió de PTEN és significativament inferior en ganglis en comparació amb l'expressió en sang perifèrica. Pel que fa a l'expressió de PIAS3 i PDCD4 no hi havia una diferència significativa entre els dos compartiments.

La via de senyalització del BCR, és una de les principals vies activades als ganglis limfàtics(170), per això resultava interessant estudiar més a fons el paper d'aquesta via en la inducció de l'expressió del miR-21 observada en les cèl·lules de LLC en cocultiu. Al tractar les cèl·lules de LLC en condicions de cocultiu amb l'inhibidor de Btk ibrutinib, vam observar que la inhibició d'aquesta via bloquejava de manera significativa l'increment de l'expressió del miR-21 induït pel cocultiu posant en evidència la participació de la senyalització del BCR en la regulació del miR-21 en la LLC, tal i com ja havíem observat en el model cel·lular amb limfòcits B malignes.

Finalment, vam voler aclarir si el miR-21 estava implicat en l'increment de supervivència i proliferació induït pel microambient. El que vam observar és que l'increment de supervivència i l'increment de l'expressió del miR-21, ambdós induïts pel cocultiu, es correlacionaven de manera significativa. Per tant, aquests resultats indiquen el miR-21 participa, juntament amb d'altres factors, en la protecció de les cèl·lules leucèmiques, conferida pel microambient. No obstant això, l'increment de proliferació no estava correlacionat amb l'increment del miR-21.

DISCUSSIÓ

Per tant, el conjunt de resultats d'aquest segon treball, va mostrar que els estímuls procedents del microambient eren capaços de regular l'expressió del miR-21 i dels seus gens diana PTEN, PDCD4 i PIAS3 a través de la proteïna ZAP-70, la via de senyalització de les MAPK i el factor de transcripció STAT3. I que aquest increment del miR-21 està correlacionat amb l'increment de supervivència induït pel microambient.

V. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. El tractament de les cèl·lules primàries de LLC amb TAK-659, inhibeix de manera específica l'activació de Syk i per tant la senyalització del BCR induïda pel co-cultiu, sense afectar la seva proteïna homòloga ZAP-70 present en cèl·lules T.

2. La TAK-659 és capaç de suprimir de manera eficaç els estímuls de supervivència, proliferació, quimioresistència i activació de les cèl·lules de LLC, procedents del microambient.

3. El tractament de les cèl·lules de LLC amb TAK-659, bloqueja la migració de les cèl·lules leucèmiques cap a les quimiocines CXCL12 i CXCL13 i cap a les cèl·lules estromals.

3. La combinació de la TAK-659 amb altres inhibidors del BCR té un efecte sinèrgic en la inducció d'apoptosi de les cèl·lules de LLC.

4. L'expressió del miR-21 és significativament superior en els pacients amb LLC que tenen una alta expressió de ZAP-70.

5. La proteïna ZAP-70 participa en la inducció de l'expressió del miR-21 després de l'estimulació del BCR, a través de l'activació de la via de les MAPK i el factor de transcripció STAT3 en cèl·lules B malignes.

6. La via de senyalització del BCR participa en l'increment de l'expressió del miR-21 induït pel co-cultiu. Aquest increment del miR-21, es correlaciona amb la disminució de l'expressió dels seus gens diana PTEN, PDCD4 i PIAS3.

7. L'increment de supervivència de les cèl·lules de LLC induït pel co-cultiu es correlaciona amb l'increment de l'expressió del miR-21.

VI. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi B-I, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity*. 2004 Jun;20(6):707–18.
2. Dias S, Silva H, Cumano A, Vieira P. Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *J Exp Med*. 2005 Mar 21;201(6):971–9.
3. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S33-40.
4. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1570–80.
5. Melchers F. Checkpoints that control B cell development. *J Clin Invest*. 2015 Jun;125(6):2203–10.
6. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:541–70.
7. Vettermann C, Schlissel MS. Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms. *Immunol Rev*. 2010 Sep;237(1):22–42.
8. Zhang M, Srivastava G, Lu L. The pre-B cell receptor and its function during B cell development. *Cell Mol Immunol*. 2004 Apr;1(2):89–94.
9. Herzog S, Jumaa H. Self-recognition and clonal selection: autoreactivity drives the generation of B cells. *Curr Opin Immunol*. 2012 Apr;24(2):166–72.
10. Geier JK, Schlissel MS. Pre-BCR signals and the control of Ig gene rearrangements. *Semin Immunol*. 2006 Feb;18(1):31–9.
11. Melchers F. The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat Rev Immunol*. 2005 Jul;5(7):578–84.
12. Nemazee D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):728–40.
13. Osmond DG. Population dynamics of bone marrow B lymphocytes. *Immunol Rev*. 1986 Oct;93:103–24.
14. Zhang Y, Garcia-Ibanez L, Toellner K. Regulation of germinal center B-cell differentiation. *Immunol Rev*. 2016 Mar;270(1):8–19.
15. Przylepa J, Himes C, Kelsoe G. Lymphocyte development and selection in germinal centers. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1998;229:85–104.
16. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment and supportive management of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2018 Jan 1;blood-2017-09-806398.

BIBLIOGRAFIA

17. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010 - Previous Version - SEER Cancer Statistics Review [Internet]. [cited 2017 Sep 14]. Available from: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2010/
18. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2015 Sep;26 Suppl 5:v78-84.
19. Scarfò L, Ferreri AJM, Ghia P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016 Aug;104:169–82.
20. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJM, Kwok M, Fenton JAL, Plummer M, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2008 Aug 7;359(6):575–83.
21. Cheson BD, Bennett JM, Rai KR, Grever MR, Kay NE, Schiffer CA, et al. Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia: recommendations of the National Cancer Institute-sponsored working group. *Am J Hematol*. 1988 Nov;29(3):152–63.
22. Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010 Mar;23(1):145–53.
23. Jain P, O'Brien S. Richter's transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Williston Park N*. 2012 Dec;26(12):1146–52.
24. Matutes E, Polliack A. Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*. 2000 Mar;4(1):22–47.
25. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011 May 12;117(19):5019–32.
26. Oscier D, Else M, Matutes E, Morilla R, Strefford JC, Catovsky D. The morphology of CLL revisited: the clinical significance of prolymphocytes and correlations with prognostic/molecular markers in the LRF CLL4 trial. *Br J Haematol*. 2016 Sep;174(5):767–75.
27. Alapat D, Coviello-Malle J, Owens R, Qu P, Barlogie B, Shaughnessy JD, et al. Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2012 Jan;137(1):93–100.
28. Cui B, Ghia EM, Chen L, Rassenti LZ, DeBoever C, Widhopf GF, et al. High-level ROR1 associates with accelerated disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016 Dec 22;128(25):2931–40.
29. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975 Aug;46(2):219–34.
30. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981 Jul 1;48(1):198–206.

BIBLIOGRAFIA

31. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*. 1998 Oct 15;102(8):1515–25.
32. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Sep 15;94(6):1840–7.
33. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Sep 15;94(6):1848–54.
34. Rossi D, Terzi-di-Bergamo L, De Paoli L, Cerri M, Ghilardi G, Chiarenza A, et al. Molecular prediction of durable remission after first-line fludarabine-cyclophosphamide-rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015 Oct 15;126(16):1921–4.
35. Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM, Wierda WG, Stingo F, Plunkett W, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016 Jan 21;127(3):303–9.
36. Farooqui MZH, Valdez J, Martyr S, Aue G, Saba N, Niemann CU, et al. Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*. 2015 Feb;16(2):169–76.
37. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, Robak T, Owen C, Ghia P, et al. Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2015 Dec 17;373(25):2425–37.
38. Kipps TJ, Fraser G, Coutre S, Brown JR, Barrientos JC, Barr PM, et al. Abstract CT158: Unmutated IGHV is not an adverse predictor of outcome to therapy with ibrutinib in patients with chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL). *Cancer Res*. 2017 Jul 1;77(13 Supplement):CT158-CT158.
39. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003 May 1;348(18):1764–75.
40. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001 Dec 3;194(11):1639–47.
41. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003 Jun 15;101(12):4944–51.
42. Principe MID, Poeta GD, Buccisano F, Maurillo L, Venditti A, Zucchetto A, et al. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006 Aug 1;108(3):853–61.

BIBLIOGRAFIA

43. Bosch F, Crespo M, Villamor N, Muntañola A, Ferrer A, Domingo A, et al. Clinical Characteristics and Outcome of a Large Series of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) According to ZAP-70 Expression. *Blood*. 2004 Nov 16;104(11):14–14.
44. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev*. 2008 Jul;88(3):841–86.
45. Deaglio S, Mehta K, Malavasi F. Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leuk Res*. 2001 Jan;25(1):1–12.
46. Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, Dürig J, Morabito F, Dührsen U, et al. CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2003 Sep 15;102(6):2146–55.
47. Dianzani U, Funaro A, DiFranco D, Garbarino G, Bragardo M, Redoglia V, et al. Interaction between endothelium and CD4+CD45RA+ lymphocytes. Role of the human CD38 molecule. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1994 Aug 1;153(3):952–9.
48. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):1023–9.
49. Matrai Z. CD38 as a prognostic marker in CLL. *Hematol Amst Neth*. 2005 Feb;10(1):39–46.
50. Ghia P, Guida G, Stella S, Gottardi D, Geuna M, Strola G, et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood*. 2003 Feb 15;101(4):1262–9.
51. Malavasi F, Deaglio S, Damle R, Cutrona G, Ferrarini M, Chiorazzi N. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood*. 2011 Sep 29;118(13):3470–8.
52. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, Buccisano F, Epiceno AM, Capelli G, et al. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001 Nov 1;98(9):2633–9.
53. Chang C-C, Cleveland RP. Conversion of CD38 and/or myeloid-associated marker expression status during the course of B-CLL: association with a change to an aggressive clinical course. *Blood*. 2002 Aug 1;100(3):1106–1106.
54. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000 Dec 28;343(26):1910–6.
55. Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, Jenkins RB, Paternoster SF, Smoley SA, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 Oct 1;24(28):4634–41.
56. Hernández JA, Rodríguez AE, González M, Benito R, Fontanillo C, Sandoval V, et al. A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and

BIBLIOGRAFIA

- biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica*. 2009 Mar;94(3):364–71.
57. Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D, Deambrogi C, Bertoni F, Del Giudice I, et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Aug;50(8):633–43.
 58. Ouillette P, Erba H, Kujawski L, Kaminski M, Shedden K, Malek SN. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res*. 2008 Feb 15;68(4):1012–21.
 59. Mosca L, Fabris S, Lionetti M, Todoerti K, Agnelli L, Morabito F, et al. Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2010 Dec 1;16(23):5641–53.
 60. Parker H, Rose-Zerilli MJJ, Parker A, Chaplin T, Wade R, Gardiner A, et al. 13q deletion anatomy and disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2011 Mar;25(3):489–97.
 61. Austen B, Skowronska A, Baker C, Powell JE, Gardiner A, Oscier D, et al. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Dec 1;25(34):5448–57.
 62. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012 Mar 22;119(12):2854–62.
 63. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*. 1997 Apr 1;89(7):2516–22.
 64. Stankovic T, Skowronska A. The role of ATM mutations and 11q deletions in disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2014 Jun;55(6):1227–39.
 65. Rose-Zerilli MJJ, Forster J, Parker H, Parker A, Rodríguez AE, Chaplin T, et al. ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica*. 2014 Apr;99(4):736–42.
 66. Baliakas P, Moysiadis T, Hadzidimitriou A, Xochelli A, Mattsson M, Sutton L-A, et al. Tailored Approaches for Refined Prognostication in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients with Mutated Versus Unmutated Immunoglobulin Receptors. *Blood*. 2016 Dec 2;128(22):3199–3199.
 67. Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S, Marinelli M, Tavoraro S, Gabrielli S, et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica*. 2012 Mar;97(3):437–41.

BIBLIOGRAFIA

68. Fabbri G, Khiabanian H, Holmes AB, Wang J, Messina M, Mullighan CG, et al. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *J Exp Med*. 2013 Oct 21;210(11):2273–88.
69. Strati P, Abruzzo LV, Wierda WG, O'Brien S, Ferrajoli A, Keating MJ. Second cancers and Richter transformation are the leading causes of death in patients with trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015 Jul;15(7):420–7.
70. Fiegl M, Erdel M, Tinhofer I, Brychtova Y, Panovska A, Doubek M, et al. Clinical outcome of pretreated B-cell chronic lymphocytic leukemia following alemtuzumab therapy: a retrospective study on various cytogenetic risk categories. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2010 Dec;21(12):2410–9.
71. Edelmann J, Holzmann K, Miller F, Winkler D, Bühler A, Zenz T, et al. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood*. 2012 Dec 6;120(24):4783–94.
72. Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, et al. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jun 15;88(12):5413–7.
73. Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 1995 Mar 15;85(6):1580–9.
74. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Döhner K, et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*. 2014 May 22;123(21):3247–54.
75. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, Hockley S, Oscier D, Matutes E, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Jun 1;29(16):2223–9.
76. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, Trbusek M, Rossi D, Kater AP, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2012 Jul;26(7):1458–61.
77. Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel B, Dervite I, et al. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*. 1994 Nov 1;84(9):3148–57.
78. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009 Feb 1;15(3):995–1004.
79. Ouillette P, Li J, Shaknovich R, Li Y, Melnick A, Shedden K, et al. Incidence and clinical implications of ATM aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Dec;51(12):1125–32.

BIBLIOGRAFIA

80. Guarini A, Marinelli M, Tavolaro S, Bellacchio E, Magliozzi M, Chiaretti S, et al. ATM gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica*. 2012 Jan;97(1):47–55.
81. Bullrich F, Rasio D, Kitada S, Starostik P, Kipps T, Keating M, et al. ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 1999 Jan 1;59(1):24–7.
82. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2011 Dec 29;365(26):2497–506.
83. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012 Jan 12;119(2):521–9.
84. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*. 2011 Jul 4;208(7):1389–401.
85. Rossi D, Brusca A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*. 2011 Dec 22;118(26):6904–8.
86. Wan Y, Wu CJ. SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013 Jun 6;121(23):4627–34.
87. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Bassaganyas L, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2011 Dec 11;44(1):47–52.
88. Rossi D, Rasi S, Spina V, Brusca A, Monti S, Ciardullo C, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013 Feb 21;121(8):1403–12.
89. Martínez-Trillos A, Pinyol M, Navarro A, Aymerich M, Jares P, Juan M, et al. Mutations in TLR/MyD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood*. 2014 Jun 12;123(24):3790–6.
90. Caligaris-Cappio F. B-chronic lymphocytic leukemia: a malignancy of anti-self B cells. *Blood*. 1996 Apr 1;87(7):2615–20.
91. Schroeder HW, Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today*. 1994 Jun;15(6):288–94.
92. Capello D, Fais F, Vivenza D, Migliaretti G, Chiorazzi N, Gaidano G, et al. Identification of three subgroups of B cell chronic lymphocytic leukemia based upon mutations of BCL-6 and IgV genes. *Leukemia*. 2000 May;14(5):811–5.
93. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001 Dec 3;194(11):1625–38.

BIBLIOGRAFIA

94. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood*. 2011 Feb 10;117(6):1781–91.
95. Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, Wein F, Stilgenbauer S, Dürig J, et al. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2012 Nov 19;209(12):2183–98.
96. Vardi A, Agathangelidis A, Sutton L-A, Ghia P, Rosenquist R, Stamatopoulos K. Immunogenetic studies of chronic lymphocytic leukemia: revelations and speculations about ontogeny and clinical evolution. *Cancer Res*. 2014 Aug 15;74(16):4211–6.
97. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2011 Aug 16;20(2):246–59.
98. Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Della Valle V, Mouly E, et al. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov*. 2014 Sep;4(9):1088–101.
99. Migliazza A, Bosch F, Komatsu H, Cayanis E, Martinotti S, Toniato E, et al. Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001 Apr 1;97(7):2098–104.
100. Kalachikov S, Migliazza A, Cayanis E, Fracchiolla NS, Bonaldo MF, Lawton L, et al. Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Genomics*. 1997 Jun 15;42(3):369–77.
101. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15524–9.
102. Palamarchuk A, Efanov A, Nazaryan N, Santanam U, Alder H, Rassenti L, et al. 13q14 deletions in CLL involve cooperating tumor suppressors. *Blood*. 2010 May 13;115(19):3916–22.
103. Hammarsund M, Corcoran MM, Wilson W, Zhu C, Einhorn S, Sangfelt O, et al. Characterization of a novel B-CLL candidate gene--DLEU7--located in the 13q14 tumor suppressor locus. *FEBS Lett*. 2004 Jan 2;556(1–3):75–80.
104. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):28–40.
105. Lia M, Carette A, Tang H, Shen Q, Mo T, Bhagat G, et al. Functional dissection of the chromosome 13q14 tumor-suppressor locus using transgenic mouse lines. *Blood*. 2012 Mar 29;119(13):2981–90.
106. Skowronska A, Parker A, Ahmed G, Oldreive C, Davis Z, Richards S, et al. Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012 Dec 20;30(36):4524–32.

BIBLIOGRAFIA

107. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, Tichy B, Kuglik P, Vranova V, et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood*. 2009 Dec 17;114(26):5307–14.
108. Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, De Angeli C, Veronese A, Cavazzini F, et al. Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia*. 2004 Mar;18(3):476–83.
109. Wang D-M, Miao K-R, Fan L, Qiu H-R, Fang C, Zhu D-X, et al. Intermediate prognosis of 6q deletion in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2011 Feb;52(2):230–7.
110. Chen W, Miao Y, Wang R, Wu Y, Qiu H, Xu W, et al. t(14;18)(q32;q21) in chronic lymphocytic leukemia patients: Report of two cases and a literature review. *Oncol Lett*. 2016 Dec;12(6):4351–6.
111. Put N, Meeus P, Chatelain B, Rack K, Boeckx N, Nollet F, et al. Translocation t(14;18) is not associated with inferior outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2009 Jun;23(6):1201–4.
112. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011 Jun 5;475(7354):101–5.
113. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 1991 Jun 6;351(6326):453–6.
114. Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2010 Jan;10(1):37–50.
115. Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 Apr;14(4):197–210.
116. Rossi D, Rasi S, Spina V, Fangazio M, Monti S, Greco M, et al. Different impact of NOTCH1 and SF3B1 mutations on the risk of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol*. 2012 Aug;158(3):426–9.
117. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2015 Oct 22;526(7574):519–24.
118. Kopan R, Ilagan MXG. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell*. 2009 Apr 17;137(2):216–33.
119. Sportoletti P, Baldoni S, Cavalli L, Del Papa B, Bonifacio E, Ciurnelli R, et al. NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *Br J Haematol*. 2010 Nov;151(4):404–6.
120. Rawlings DJ, Schwartz MA, Jackson SW, Meyer-Bahlburg A. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat Rev Immunol*. 2012 Mar 16;12(4):282–94.

BIBLIOGRAFIA

121. Cortese D, Sutton L-A, Cahill N, Smedby KE, Geisler C, Gunnarsson R, et al. On the way towards a “CLL prognostic index”: focus on TP53, BIRC3, SF3B1, NOTCH1 and MYD88 in a population-based cohort. *Leukemia*. 2014 Mar;28(3):710–3.
122. Ljungström V, Cortese D, Young E, Pandzic T, Mansouri L, Plevova K, et al. Whole-exome sequencing in relapsing chronic lymphocytic leukemia: clinical impact of recurrent RPS15 mutations. *Blood*. 2016 Feb 25;127(8):1007–16.
123. Jain P, Kanagal-Shamanna R, Wierda W, Keating M, Sarwari N, Rozovski U, et al. Clinical and molecular characteristics of XPO1 mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*. 2016 Nov;91(11):E478–9.
124. Young E, Noerenberg D, Mansouri L, Ljungström V, Frick M, Sutton L-A, et al. EGR2 mutations define a new clinically aggressive subgroup of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2017 Jul;31(7):1547–54.
125. Rodríguez D, Bretones G, Quesada V, Villamor N, Arango JR, López-Guillermo A, et al. Mutations in CHD2 cause defective association with active chromatin in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015 Jul 9;126(2):195–202.
126. Clifford R, Louis T, Robbe P, Ackroyd S, Burns A, Timbs AT, et al. SAMHD1 is mutated recurrently in chronic lymphocytic leukemia and is involved in response to DNA damage. *Blood*. 2014 Feb 13;123(7):1021–31.
127. Arseneau J-R, Laflamme M, Lewis SM, Maïcas E, Ouellette RJ. Multiple isoforms of PAX5 are expressed in both lymphomas and normal B-cells. *Br J Haematol*. 2009 Nov;147(3):328–38.
128. Schuh A, Becq J, Humphray S, Alexa A, Burns A, Clifford R, et al. Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood*. 2012 Nov 15;120(20):4191–6.
129. Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, Benner A, Leupolt E, Winkler D, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica*. 2007 Sep;92(9):1242–5.
130. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013 Feb 14;152(4):714–26.
131. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015 Oct 22;526(7574):525–30.
132. Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002 Sep 2;21(17):4663–70.
133. Gregory RI, Yan K-P, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004 Nov 11;432(7014):235–40.

BIBLIOGRAFIA

134. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):415–9.
135. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, Rhee J-K, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*. 2006 Jun 2;125(5):887–901.
136. Zeng Y, Cullen BR. Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J Biol Chem*. 2005 Jul 29;280(30):27595–603.
137. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004 Jan 2;303(5654):95–8.
138. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J*. 2002 Nov 1;21(21):5875–85.
139. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):740–4.
140. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Nov;1803(11):1231–43.
141. Diederichs S, Haber DA. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*. 2007 Dec 14;131(6):1097–108.
142. Van Roosbroeck K, Pollet J, Calin GA. miRNAs and long noncoding RNAs as biomarkers in human diseases. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013 Mar;13(2):183–204.
143. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281–97.
144. Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 1;105(13):5166–71.
145. Negrini M, Cutrona G, Bassi C, Fabris S, Zagatti B, Colombo M, et al. microRNAome expression in chronic lymphocytic leukemia: comparison with normal B-cell subsets and correlations with prognostic and clinical parameters. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014 Aug 1;20(15):4141–53.
146. Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Wang W, Nikitin AY. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res*. 2007 Sep 15;67(18):8433–8.
147. Rossi S, Shimizu M, Barbarotto E, Nicoloso MS, Dimitri F, Sampath D, et al. microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood*. 2010 Aug 12;116(6):945–52.

BIBLIOGRAFIA

148. Cui B, Chen L, Zhang S, Mraz M, Fecteau J-F, Yu J, et al. MicroRNA-155 influences B-cell receptor signaling and associates with aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014 Jul 24;124(4):546–54.
149. Visone R, Veronese A, Rassenti LZ, Balatti V, Pearl DK, Acunzo M, et al. miR-181b is a biomarker of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Sep 15;118(11):3072–9.
150. Mraz M, Malinova K, Kotaskova J, Pavlova S, Tichy B, Malcikova J, et al. miR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. *Leukemia*. 2009 Jun;23(6):1159–63.
151. Zenz T, Mohr J, Eldering E, Kater AP, Bühler A, Kienle D, et al. miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009 Apr 16;113(16):3801–8.
152. Kluiver JL, Chen C-Z. MicroRNAs regulate B-cell receptor signaling-induced apoptosis. *Genes Immun*. 2012 Apr;13(3):239–44.
153. Ferracin M, Zagatti B, Rizzotto L, Cavazzini F, Veronese A, Ciccone M, et al. MicroRNAs involvement in fludarabine refractory chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer*. 2010 May 26;9:123.
154. Calin GA, Liu C-G, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 10;101(32):11755–60.
155. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005 Oct 27;353(17):1793–801.
156. Moussay E, Wang K, Cho J-H, van Moer K, Pierson S, Paggetti J, et al. MicroRNA as biomarkers and regulators in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Apr 19;108(16):6573–8.
157. Volinia S, Calin GA, Liu C-G, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 14;103(7):2257–61.
158. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2008 Jan 11;283(2):1026–33.
159. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007 Aug;133(2):647–58.
160. Wang W, Li J, Zhu W, Gao C, Jiang R, Li W, et al. MicroRNA-21 and the clinical outcomes of various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2014 Nov 7;14:819.

BIBLIOGRAFIA

161. Lawrie CH, Soneji S, Marafioti T, Cooper CDO, Palazzo S, Paterson JC, et al. MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2007 Sep 1;121(5):1156–61.
162. Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature*. 2010 Sep 2;467(7311):86–90.
163. Saleh LM, Wang W, Herman SEM, Saba NS, Anastas V, Barber E, et al. Ibrutinib downregulates a subset of miRNA leading to upregulation of tumor suppressors and inhibition of cell proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2017 Feb;31(2):340.
164. Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, Azzalin G, Carucci N, Tavolaro S, et al. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007 Jun 1;109(11):4944–51.
165. Humphries LA, Godbersen JC, Danilova OV, Kaur P, Christensen BC, Danilov AV. Pro-apoptotic TP53 homolog Tap63 is repressed via epigenetic silencing and B-cell receptor signalling in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2013 Dec;163(5):590–602.
166. Pede V, Rombout A, Vermeire J, Naessens E, Mestdagh P, Robberecht N, et al. CLL cells respond to B-Cell receptor stimulation with a microRNA/mRNA signature associated with MYC activation and cell cycle progression. *PLoS One*. 2013;8(4):e60275.
167. Danilova OV, Paiva C, Kaur P, Kamal A, Sempere LF, Danilov AV. MIR21 is differentially expressed in the lymphoid tissue and modulated by stromal signalling in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2015 Jul 1;170(2):272–5.
168. Ruiz-Lafuente N, Alcaraz-García M-J, Sebastián-Ruiz S, García-Serna A-M, Gómez-Espuch J, Moraleda J-M, et al. IL-4 Up-Regulates MiR-21 and the MiRNAs Hosted in the CLCN5 Gene in Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124936.
169. Thapa DR, Bhatia K, Bream JH, D'Souza G, Rinaldo CR, Wolinsky S, et al. B-cell activation induced microRNA-21 is elevated in circulating B cells preceding the diagnosis of AIDS-related non-Hodgkin lymphomas. *AIDS Lond Engl*. 2012 Jun 1;26(9):1177–80.
170. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- κ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):563–74.
171. Caligaris-Cappio F, Bertilaccio MTS, Scielzo C. How the microenvironment wires the natural history of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Cancer Biol*. 2014 Feb;24:43–8.
172. Ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Mar;1863(3):401–13.
173. Ghia P, Caligaris-Cappio F. The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms. *Adv Cancer Res*. 2000;79:157–73.

BIBLIOGRAFIA

174. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest*. 2005 Mar;115(3):755–64.
175. Friedberg JW. CLL microenvironment: macro important. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):377–8.
176. Wright DH. Malignant Lymphomas other than Hodgkin's Disease: Histology, Cytology, Ultrastructure, Immunology. *J Clin Pathol*. 1979 Apr;32(4):414.
177. Herishanu Y, Katz B-Z, Lipsky A, Wiestner A. Biology of Chronic Lymphocytic Leukemia in Different Microenvironments: Clinical and Therapeutic Implications. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013 Apr;27(2):173–206.
178. Granziero L, Ghia P, Circosta P, Gottardi D, Strota G, Geuna M, et al. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001 May 1;97(9):2777–83.
179. Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Bryostatin and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1999 Sep;106(4):995–1004.
180. Riches JC, Gribben JG. Understanding the immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia: potential clinical implications. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013 Apr;27(2):207–35.
181. Serrano D, Monteiro J, Allen SL, Kolitz J, Schulman P, Lichtman SM, et al. Clonal Expansion Within the CD4+CD57+ and CD8+CD57+ T Cell Subsets in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Immunol*. 1997 Feb 1;158(3):1482–9.
182. Porakishvili N, Roschupkina T, Kalber T, Jewell AP, Patterson K, Yong K, et al. Expansion of CD4+ T cells with a cytotoxic phenotype in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). *Clin Exp Immunol*. 2001 Oct;126(1):29–36.
183. Christopoulos P, Pfeifer D, Bartholomé K, Follo M, Timmer J, Fisch P, et al. Definition and characterization of the systemic T-cell dysregulation in untreated indolent B-cell lymphoma and very early CLL. *Blood*. 2011 Apr 7;117(14):3836–46.
184. Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, Ding W, Schnabl S, Quiroga MP, 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 Nov 12;114(20):4441–50.
185. Jaksic O, Paro MMK, Kardum Skelin I, Kusec R, Pejisa V, Jaksic B. CD38 on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells has higher expression in lymph nodes than in peripheral blood or bone marrow. *Blood*. 2004 Mar 1;103(5):1968–9.
186. Ruan J, Hyjek E, Kermani P, Christos PJ, Hooper AT, Coleman M, et al. Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2006 Oct 1;12(19):5622–31.

BIBLIOGRAFIA

187. Jitschin R, Braun M, Qorraj M, Saul D, Le Blanc K, Zenz T, et al. Stromal cell-mediated glycolytic switch in CLL cells involves Notch-c-Myc signaling. *Blood*. 2015 May 28;125(22):3432–6.
188. Baban D, Murray J, Earl H, Kerr D, Seymour L. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor expression in chronic lymphocytic leukaemia. *Int J Oncol*. 1996 Jan;8(1):29–34.
189. Ding W, Knox TR, Tschumper RC, Wu W, Schwager SM, Boysen JC, 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 Oct 21;116(16):2984–93.
190. Ding W, Nowakowski GS, Knox TR, Boysen JC, Maas ML, Schwager SM, et al. Bi-directional Activation between Mesenchymal Stem Cells and CLL B-Cells: Implication for CLL Disease Progression. *Br J Haematol*. 2009 Nov;147(4):471–83.
191. Bairey O, Boycov O, Kaganovsky E, Zimra Y, Shaklai M, Rabizadeh E. All three receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) are expressed on B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leuk Res*. 2004 Mar;28(3):243–8.
192. Lee YK, Shanafelt TD, Bone ND, Strege AK, Jelinek DF, Kay NE. VEGF receptors on chronic lymphocytic leukemia (CLL-B) cells interact with STAT1 and 3: implication for apoptosis resistance. *Cancer Res*. 2005 May 1;65(9 Supplement):1082–1082.
193. Wang L, Coad JE, Fortney JM, Gibson LF. VEGF-induced survival of chronic lymphocytic leukemia is independent of Bcl-2 phosphorylation. *Leukemia*. 2005 Aug;19(8):1486–7.
194. Lutzny G, Kocher T, Schmidt-Suppran M, Rudelius M, Klein-Hitpass L, Finch AJ, 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 Jan 14;23(1):77–92.
195. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood*. 2009 Oct 15;114(16):3367–75.
196. Cyster JG. Homing of antibody secreting cells. *Immunol Rev*. 2003 Aug;194:48–60.
197. Burger JA. Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): from understanding the basics towards therapeutic targeting. *Semin Cancer Biol*. 2010 Dec;20(6):424–30.
198. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*. 1999 Dec 1;94(11):3658–67.
199. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, Alexander HD, Carey BS, Farrugia J, et al. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*. 2006 May 1;107(9):3584–92.

BIBLIOGRAFIA

200. 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 Nov 1;110(9):3316–25.
201. Purroy N, Abrisqueta P, Carabia J, Carpio C, Palacio C, Bosch F, et al. Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG ODN promotes proliferation of chemoresistant CLL cells phenotypically comparable to those proliferating in vivo. *Oncotarget*. 2015 Apr 10;6(10):7632–43.
202. Marquez M-E, Hernández-Uzcátegui O, Cornejo A, Vargas P, Da Costa O. Bone marrow stromal mesenchymal cells induce down regulation of CD20 expression on B-CLL: implications for rituximab resistance in CLL. *Br J Haematol*. 2015 Apr;169(2):211–8.
203. Boissard F, Fournié J-J, Laurent C, Poupot M, Ysebaert L. Nurse like cells: chronic lymphocytic leukemia associated macrophages. *Leuk Lymphoma*. 2015 May;56(5):1570–2.
204. Ysebaert L, Fournié J-J. Genomic and phenotypic characterization of nurse-like cells that promote drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2011 Jul;52(7):1404–6.
205. Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of “nurselike” cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):1030–7.
206. 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 Oct 15;96(8):2655–63.
207. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, Bürkle A, Wierda WG, Keating MJ, et al. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood*. 2009 Mar 26;113(13):3050–8.
208. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, 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-1alpha. *Blood*. 2005 Aug 1;106(3):1012–20.
209. Binder M, Léchenne B, Ummanni R, Scharf C, Balabanov S, Trusch M, et al. Stereotypical chronic lymphocytic leukemia B-cell receptors recognize survival promoting antigens on stromal cells. *PLoS One*. 2010 Dec 30;5(12):e15992.
210. Deaglio S, Vaisitti T, Bergui L, Bonello L, Horenstein AL, Tamagnone L, et al. CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood*. 2005 Apr 15;105(8):3042–50.
211. Badoux X, Bueso-Ramos C, Harris D, Li P, Liu Z, Burger J, et al. Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and bone marrow endothelial cells: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hum Pathol*. 2011 Dec;42(12):1989–2000.
212. Buggins AGS, Pepper C, Patten PEM, Hewamana S, Gohil S, Moorhead J, et al. Interaction with vascular endothelium enhances survival in primary chronic lymphocytic leukemia cells

BIBLIOGRAFIA

- via NF-kappaB activation and de novo gene transcription. *Cancer Res.* 2010 Oct 1;70(19):7523–33.
213. Cols M, Barra CM, He B, Puga I, Xu W, Chiu A, 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 Baltim Md 1950.* 2012 Jun 15;188(12):6071–83.
 214. Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, Martinelli S, Castelli I, Valenti V, et al. Endothelin-1 promotes survival and chemoresistance in chronic lymphocytic leukemia B cells through ETA receptor. *PloS One.* 2014;9(6):e98818.
 215. 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 Apr 15;99(8):2977–84.
 216. Brusa D, Serra S, Coscia M, Rossi D, D'Arena G, Laurenti L, et al. The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2013 Jun;98(6):953–63.
 217. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, Gorgün G, Le Dieu R, Blum W, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest.* 2008 Jul;118(7):2427–37.
 218. Ramsay AG, Evans R, Kiaii S, Svensson L, Hogg N, Gribben JG. Chronic lymphocytic leukemia cells induce defective LFA-1-directed T-cell motility by altering Rho GTPase signaling that is reversible with lenalidomide. *Blood.* 2013 Apr 4;121(14):2704–14.
 219. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011 Jun;12(6):492–9.
 220. Görgün G, Holderried TAW, Zahrieh D, Neuberg D, Gribben JG. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *J Clin Invest.* 2005 Jul;115(7):1797–805.
 221. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, Fatah R, Iqbal S, Agrawal S, et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood.* 2013 Feb 28;121(9):1612–21.
 222. Os A, Bürgler S, Ribes AP, Funderud A, Wang D, Thompson KM, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells are activated and proliferate in response to specific T helper cells. *Cell Rep.* 2013 Aug 15;4(3):566–77.
 223. Dancescu M, Rubio-Trujillo M, Biron G, Bron D, Delespesse G, Sarfati M. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J Exp Med.* 1992 Nov 1;176(5):1319–26.
 224. Chaouchi N, Wallon C, Goujard C, Tertian G, Rudent A, Caput D, et al. Interleukin-13 inhibits interleukin-2-induced proliferation and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from in vitro apoptosis. *Blood.* 1996 Feb 1;87(3):1022–9.

BIBLIOGRAFIA

225. Jewell AP, Worman CP, Lydyard PM, Yong KL, Giles FJ, Goldstone AH. Interferon-alpha up-regulates bcl-2 expression and protects B-CLL cells from apoptosis in vitro and in vivo. *Br J Haematol.* 1994 Oct;88(2):268–74.
226. Buschle M, Campana D, Carding SR, Richard C, Hoffbrand AV, Brenner MK. Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 1993 Jan 1;177(1):213–8.
227. Trentin L, Cerutti A, Zambello R, Sancretta R, Tassinari C, Facco M, et al. Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Blood.* 1996 Apr 15;87(8):3327–35.
228. Foa R, Massaia M, Cardona S, Tos AG, Bianchi A, Attisano C, et al. Production of tumor necrosis factor-alpha by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: a possible regulatory role of TNF in the progression of the disease. *Blood.* 1990 Jul 15;76(2):393–400.
229. Herishanu Y, Gibellini F, Njuguna N, Hazan-Halevy I, Farooqui M, Bern S, 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 Sep;52(9):1758–69.
230. Burger JA. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:96–103.
231. Kern C, Cornuel J-F, Billard C, Tang R, Rouillard D, Stenou V, et al. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood.* 2004 Jan 15;103(2):679–88.
232. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood.* 2004 Jun 15;103(12):4389–95.
233. Potter KN, Orchard J, Critchley E, Mockridge CI, Jose A, Stevenson FK. Features of the overexpressed V1-69 genes in the unmutated subset of chronic lymphocytic leukemia are distinct from those in the healthy elderly repertoire. *Blood.* 2003 Apr 15;101(8):3082–4.
234. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stella S, Guida G, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood.* 2005 Feb 15;105(4):1678–85.
235. Stamatopoulos K, Belessi C, Hadzidimitriou A, Smilevska T, Kalagiakou E, Hatzi K, et al. Immunoglobulin light chain repertoire in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2005 Nov 15;106(10):3575–83.
236. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood.* 2007 Jan 1;109(1):259–70.
237. Mockridge CI, Potter KN, Wheatley I, Neville LA, Packham G, Stevenson FK. Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood.* 2007 May 15;109(10):4424–31.

BIBLIOGRAFIA

238. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:841–94.
239. Hervé M, Xu K, Ng Y-S, Wardemann H, Albesiano E, Messmer BT, et al. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest.* 2005 Jun;115(6):1636–43.
240. Krysov S, Potter KN, Mockridge CI, Coelho V, Wheatley I, Packham G, et al. Surface IgM of CLL cells displays unusual glycans indicative of engagement of antigen in vivo. *Blood.* 2010 May 27;115(21):4198–205.
241. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011 Oct 20;118(16):4313–20.
242. Koehrer S, Burger JA. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell malignancies. *Clin Adv Hematol Oncol HO.* 2016 Jan;14(1):55–65.
243. Reth M. Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:97–121.
244. Tsubata T, Wienands J. B cell signaling. Introduction. *Int Rev Immunol.* 2001;20(6):675–8.
245. Srinivasan L, Sasaki Y, Calado DP, Zhang B, Paik JH, DePinho RA, et al. PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell.* 2009 Oct 30;139(3):573–86.
246. Poole A, Gibbins JM, Turner M, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, et al. The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *EMBO J.* 1997 May 1;16(9):2333–41.
247. Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VLJ. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol.* 2010 Jun;10(6):387–402.
248. Grädler U, Schwarz D, Dresing V, Musil D, Bomke J, Frech M, et al. Structural and biophysical characterization of the Syk activation switch. *J Mol Biol.* 2013 Jan 23;425(2):309–33.
249. Veillette A, Latour S, Davidson D. Negative regulation of immunoreceptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:669–707.
250. Luper ML, Rao N, Lill NL, Andoniou CE, Miyake S, Clark EA, et al. Cbl-mediated negative regulation of the Syk tyrosine kinase. A critical role for Cbl phosphotyrosine-binding domain binding to Syk phosphotyrosine 323. *J Biol Chem.* 1998 Dec 25;273(52):35273–81.
251. Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature.* 1995 Nov 16;378(6554):303–6.
252. Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, et al. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature.* 1995 Nov 16;378(6554):298–302.
253. Zarbock A, Lowell CA, Ley K. Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity.* 2007 Jun;26(6):773–83.

BIBLIOGRAFIA

254. Ganju RK, Brubaker SA, Chernock RD, Avraham S, Groopman JE. Beta-chemokine receptor CCR5 signals through SHP1, SHP2, and Syk. *J Biol Chem*. 2000 Jun 9;275(23):17263–8.
255. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Carsetti L, Berno V, Sica S, et al. Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. 2009 Apr;23(4):686–97.
256. Buchner M, Fuchs S, Prinz G, Pfeifer D, Bartholomé K, Burger M, et al. Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 2009 Jul 1;69(13):5424–32.
257. Vivier E, da Silva AJ, Ackerly M, Levine H, Rudd CE, Anderson P. Association of a 70-kDa tyrosine phosphoprotein with the CD16: zeta: gamma complex expressed in human natural killer cells. *Eur J Immunol*. 1993 Aug;23(8):1872–6.
258. Chan AC, Irving BA, Fraser JD, Weiss A. The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Oct 15;88(20):9166–70.
259. Elder ME, Lin D, Clever J, Chan AC, Hope TJ, Weiss A, et al. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science*. 1994 Jun 10;264(5165):1596–9.
260. Negishi I, Motoyama N, Nakayama K, Nakayama K, Senju S, Hatakeyama S, et al. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature*. 1995 Aug 3;376(6539):435–8.
261. Williams BL, Schreiber KL, Zhang W, Wange RL, Samelson LE, Leibson PJ, et al. Genetic evidence for differential coupling of Syk family kinases to the T-cell receptor: reconstitution studies in a ZAP-70-deficient Jurkat T-cell line. *Mol Cell Biol*. 1998 Mar;18(3):1388–99.
262. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*. 1992 Nov 13;71(4):649–62.
263. Hatada MH, Lu X, Laird ER, Green J, Morgenstern JP, Lou M, et al. Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature*. 1995 Sep 7;377(6544):32–8.
264. Watts JD, Affolter M, Krebs DL, Wange RL, Samelson LE, Aebersold R. Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70. *J Biol Chem*. 1994 Nov 25;269(47):29520–9.
265. Zhao Q, Williams BL, Abraham RT, Weiss A. Interdomain B in ZAP-70 regulates but is not required for ZAP-70 signaling function in lymphocytes. *Mol Cell Biol*. 1999 Jan;19(1):948–56.
266. Au-Yeung BB, Deindl S, Hsu L-Y, Palacios EH, Levin SE, Kuriyan J, et al. The structure, regulation, and function of ZAP-70. *Immunol Rev*. 2009 Mar;228(1):41–57.

BIBLIOGRAFIA

267. Schweighoffer E, Vanes L, Mathiot A, Nakamura T, Tybulewicz VLJ. Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion. *Immunity*. 2003 Apr;18(4):523–33.
268. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2004 Aug 26;351(9):893–901.
269. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4609–14.
270. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003 Feb 1;101(3):1087–93.
271. Semichon M, Merle-Béral H, Lang V, Bismuth G. Normal Syk protein level but abnormal tyrosine phosphorylation in B-CLL cells. *Leukemia*. 1997 Nov;11(11):1921–8.
272. Chen L, Apgar J, Huynh L, Dicker F, Giago-McGahan T, Rassenti L, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):2036–41.
273. Allsup DJ, Kamiguti AS, Lin K, Sherrington PD, Matrai Z, Slupsky JR, et al. B-cell receptor translocation to lipid rafts and associated signaling differ between prognostically important subgroups of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7328–37.
274. Chen L, Huynh L, Apgar J, Tang L, Rassenti L, Weiss A, et al. ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2685–92.
275. Calpe E, Codony C, Baptista MJ, Abrisqueta P, Carpio C, Purroy N, et al. ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood*. 2011 Oct 20;118(16):4401–10.
276. Calpe E, Purroy N, Carpio C, Abrisqueta P, Carabia J, Palacio C, et al. ZAP-70 Promotes the Infiltration of Malignant B-Lymphocytes into the Bone Marrow by Enhancing Signaling and Migration after CXCR4 Stimulation. *PLOS ONE*. 2013 Dec 3;8(12):e81221.
277. Muntañola A, Bosch F, Arguis P, Arellano-Rodrigo E, Ayuso C, Giné E, et al. Abdominal computed tomography predicts progression in patients with Rai stage 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Apr 20;25(12):1576–80.
278. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5446–56.
279. Johnson S, Smith AG, Löffler H, Osby E, Juliusson G, Emmerich B, et al. Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia. The French Cooperative Group on CLL. *Lancet Lond Engl*. 1996 May 25;347(9013):1432–8.

BIBLIOGRAFIA

280. O'Brien SM, Kantarjian HM, Cortes J, Beran M, Koller CA, Giles FJ, et al. Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2001 Mar 1;19(5):1414–20.
281. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2010 Oct 2;376(9747):1164–74.
282. Fischer K, Cramer P, Busch R, Böttcher S, Bahlo J, Schubert J, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012 Sep 10;30(26):3209–16.
283. Herman SEM, Gordon AL, Wagner AJ, Heerema NA, Zhao W, Flynn JM, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase- δ inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood*. 2010 Sep 23;116(12):2078–88.
284. Muggen AF, Singh SP, Hendriks RW, Langerak AW. Targeting Signaling Pathways in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Cancer Drug Targets*. 2016;16(8):669–88.
285. Buchner M, Baer C, Prinz G, Dierks C, Burger M, Zenz T, et al. Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010 Jun 3;115(22):4497–506.
286. Suljagic M, Longo PG, Bennardo S, Perlas E, Leone G, Laurenti L, et al. The Syk inhibitor fostamatinib disodium (R788) inhibits tumor growth in the E μ -TCL1 transgenic mouse model of CLL by blocking antigen-dependent B-cell receptor signaling. *Blood*. 2010 Dec 2;116(23):4894–905.
287. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, Johnston PB, Vose JM, Lacasce A, et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010 Apr 1;115(13):2578–85.
288. Burger JA. Inhibiting B-cell receptor signaling pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2012 Mar;7(1):26–33.
289. Hoellenriegel J, Coffey GP, Sinha U, Pandey A, Sivina M, Ferrajoli A, et al. Selective, novel spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitors suppress chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and migration. *Leukemia*. 2012 Jul;26(7):1576–83.
290. Currie KS, Kropf JE, Lee T, Blomgren P, Xu J, Zhao Z, et al. Discovery of GS-9973, a selective and orally efficacious inhibitor of spleen tyrosine kinase. *J Med Chem*. 2014 May 8;57(9):3856–73.
291. Sharman J, Hawkins M, Kolibaba K, Boxer M, Klein L, Wu M, et al. An open-label phase 2 trial of entospletinib (GS-9973), a selective spleen tyrosine kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015 Apr 9;125(15):2336–43.
292. Sharman J, Di Paolo J. Targeting B-cell receptor signaling kinases in chronic lymphocytic leukemia: the promise of entospletinib. *Ther Adv Hematol*. 2016 Jun;7(3):157–70.

BIBLIOGRAFIA

293. Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol*. 2003 Apr;3(4):317–30.
294. Cuní S, Pérez-Aciego P, Pérez-Chacón G, Vargas JA, Sánchez A, Martín-Saavedra FM, et al. A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. 2004 Aug;18(8):1391–400.
295. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Sica S, Leone G, Efremov DG. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2008 Jan 15;111(2):846–55.
296. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ, et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Sep 29;118(13):3603–12.
297. Lannutti BJ, Meadows SA, Herman SEM, Kashishian A, Steiner B, Johnson AJ, et al. CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):591–4.
298. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, Benson DM, Flinn IW, Wagner-Johnston ND, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110δ, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014 May 29;123(22):3390–7.
299. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014 Mar 13;370(11):997–1007.
300. Balakrishnan K, Peluso M, Fu M, Rosin NY, Burger JA, Wierda WG, et al. The phosphoinositide-3-kinase (PI3K)-delta and gamma inhibitor, IPI-145 (Duvelisib), overcomes signals from the PI3K/AKT/S6 pathway and promotes apoptosis in CLL. *Leukemia*. 2015 Sep;29(9):1811–22.
301. O'Brien S, Patel M, Kahl BS, Horwitz SM, Foss FM, Porcu P, et al. Duvelisib (IPI-145), a PI3K-δ,γ Inhibitor, Is Clinically Active in Patients with Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 2014 Dec 6;124(21):3334–3334.
302. de Gorter DJJ, Beuling EA, Kersseboom R, Middendorp S, van Gils JM, Hendriks RW, et al. Bruton's tyrosine kinase and phospholipase Cgamma2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. *Immunity*. 2007 Jan;26(1):93–104.
303. Herman SEM, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood*. 2011 Jun 9;117(23):6287–96.
304. Ponader S, Chen S-S, Buggy JJ, Balakrishnan K, Gandhi V, Wierda WG, 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 Feb 2;119(5):1182–9.

BIBLIOGRAFIA

305. Cheng S, Ma J, Guo A, Lu P, Leonard JP, Coleman M, et al. BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. *Leukemia*. 2014 Mar;28(3):649–57.
306. Dubovsky JA, Beckwith KA, Natarajan G, Woyach JA, Jaglowski S, Zhong Y, et al. Ibrutinib is an irreversible molecular inhibitor of ITK driving a Th1-selective pressure in T lymphocytes. *Blood*. 2013 Oct 10;122(15):2539–49.
307. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Jan 1;31(1):88–94.
308. Byrd J, Furman RR, Coutre S. The Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor Ibrutinib (PCI-32765) Promotes High Response Rate, Durable Remissions, and Is Tolerable in Treatment Naïve (TN) and Relapsed or Refractory (RR) Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) or Small Lymphocytic Lymphoma (SLL) Patients Including Patients with High-Risk (HR) Disease: New and Updated Results of 116 Patients in a Phase Ib/II Study. *Blood*. 2012 Jan 1;120.
309. Kohrt HE, Sagiv-Barfi I, Rafiq S, Herman SEM, Butchar JP, Cheney C, et al. Ibrutinib antagonizes rituximab-dependent NK cell-mediated cytotoxicity. *Blood*. 2014 Mar 20;123(12):1957–60.
310. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013 Jul 4;369(1):32–42.
311. O'Brien S, Furman RR, Coutre SE, Sharman JP, Burger JA, Blum KA, et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Jan;15(1):48–58.
312. Woyach JA, Furman RR, Liu T-M, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med*. 2014 Jun 12;370(24):2286–94.
313. Jain P, Keating M, Wierda W, Estrov Z, Ferrajoli A, Jain N, et al. Outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia after discontinuing ibrutinib. *Blood*. 2015 Mar 26;125(13):2062–7.
314. Burger JA, Keating MJ, Wierda WG, Hartmann E, Hoellenriegel J, Rosin NY, et al. Safety and activity of ibrutinib plus rituximab for patients with high-risk chronic lymphocytic leukaemia: a single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2014 Sep;15(10):1090–9.
315. Brown JR, Barrientos JC, Barr PM, Flinn IW, Burger JA, Tran A, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib with chemoimmunotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015 May 7;125(19):2915–22.
316. Byrd JC, Harrington B, O'Brien S, Jones JA, Schuh A, Devereux S, et al. Acalabrutinib (ACP-196) in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016 Jan 28;374(4):323–32.

BIBLIOGRAFIA

317. Schena M, Larsson LG, Gottardi D, Gaidano G, Carlsson M, Nilsson K, et al. Growth- and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 1992 Jun 1;79(11):2981–9.
318. Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL, et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012 Feb 10;30(5):488–96.
319. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med*. 2013 Feb;19(2):202–8.
320. Anderson MA, Deng J, Seymour JF, Tam C, Kim SY, Fein J, et al. The BCL2 selective inhibitor venetoclax induces rapid onset apoptosis of CLL cells in patients via a TP53-independent mechanism. *Blood*. 2016 Jun 23;127(25):3215–24.
321. Seymour JF, Ma S, Brander DM, Choi MY, Barrientos J, Davids MS, et al. Venetoclax plus rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1b study. *Lancet Oncol*. 2017 Feb;18(2):230–40.
322. Vitale C, Burger JA. Chronic lymphocytic leukemia therapy: new targeted therapies on the way. *Expert Opin Pharmacother*. 2016 Jun;17(8):1077–89.
323. Beers SA, Chan CHT, French RR, Cragg MS, Glennie MJ. CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin Hematol*. 2010 Apr;47(2):107–14.
324. McLaughlin P, White CA, Grillo-López AJ, Maloney DG. Clinical status and optimal use of rituximab for B-cell lymphomas. *Oncol Williston Park N*. 1998 Dec;12(12):1763–1769; discussion 1769–1770, 1775–1777,.
325. Pawluczko AW, Beurskens FJ, Beum PV, Lindorfer MA, van de Winkel JGJ, Parren PWHI, et al. Binding of submaximal C1q promotes complement-dependent cytotoxicity (CDC) of B cells opsonized with anti-CD20 mAbs ofatumumab (OFA) or rituximab (RTX): considerably higher levels of CDC are induced by OFA than by RTX. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Jul 1;183(1):749–58.
326. Wierda WG, Kipps TJ, Dürig J, Griskevicius L, Stilgenbauer S, Mayer J, et al. Chemoimmunotherapy with O-FC in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Jun 16;117(24):6450–8.
327. Mössner E, Brünker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C, Herter S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*. 2010 Jun 3;115(22):4393–402.
328. Alduaij W, Ivanov A, Honeychurch J, Cheadle EJ, Potluri S, Lim SH, et al. Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood*. 2011 Apr 28;117(17):4519–29.

BIBLIOGRAFIA

329. Cartron G, de Guibert S, Dilhuydy M-S, Morschhauser F, Leblond V, Dupuis J, et al. Obinutuzumab (GA101) in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: final data from the phase 1/2 GAUGUIN study. *Blood*. 2014 Oct 2;124(14):2196–202.
330. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*. 2014 Mar 20;370(12):1101–10.
331. Brown JR, O'Brien S, Kingsley CD, Eradat H, Pagel JM, Lymp J, et al. Obinutuzumab plus fludarabine/cyclophosphamide or bendamustine in the initial therapy of CLL patients: the phase 1b GALTON trial. *Blood*. 2015 Apr 30;125(18):2779–85.
332. Herth I, Dietrich S, Benner A, Hegenbart U, Rieger M, Stadtherr P, et al. The impact of allogeneic stem cell transplantation on the natural course of poor-risk chronic lymphocytic leukemia as defined by the EBMT consensus criteria: a retrospective donor versus no donor comparison. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2014 Jan;25(1):200–6.
333. Yan X-J, Dozmorov I, Li W, Yancopoulos S, Sison C, Centola M, et al. Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Nov 10;118(19):5201–10.
334. Ten Hacken E, Sivina M, Kim E, O'Brien S, Wierda WG, Ferrajoli A, et al. Functional Differences between IgM and IgD Signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2016 Sep 15;197(6):2522–31.
335. Purroy N, Abrisqueta P, Carabia J, Carpio C, Calpe E, Palacio C, et al. Targeting the proliferative and chemoresistant compartment in chronic lymphocytic leukemia by inhibiting survivin protein. *Leukemia*. 2014 Oct;28(10):1993–2004.
336. Löffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, Hackermüller J, Kretzschmar AK, et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1330–3.
337. Buscaglia LEB, Li Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin J Cancer*. 2011 Jun;30(6):371–80.
338. Xiong Q, Zhong Q, Zhang J, Yang M, Li C, Zheng P, et al. Identification of novel miR-21 target proteins in multiple myeloma cells by quantitative proteomics. *J Proteome Res*. 2012 Apr 6;11(4):2078–90.

