

**Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas
Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas**

**Caracterización de marcadores de proliferación
tumoral y/o posibles blancos terapéuticos
relacionados a la progresión de la Leucemia
Linfoide Crónica**

Mag. Cecilia Abreu Olano

Laboratorio de Investigación en Leucemia Linfoide Crónica
Institut Pasteur de Montevideo

Orientador: Dr. Pablo Opezzo
Co-Orientador: Prof. Dr. Guillermo Dighiero

Tribunal de tesis:
Dr. Alfonso Cayota
Dra. Irma Slavutsky
Dr. Marcelo Navarrete

Montevideo, 17 de junio de 2015

Tabla de Contenido

RESUMEN	3
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	4
1.1.0 La Leucemia Linfoide Crónica.....	4
1.1.1 Generalidades	4
1.1.2 Epidemiología de LLC.....	5
1.1.3 Diagnóstico y clasificación anátomo-clínica de la LLC.....	5
1.1.4 Marcadores pronóstico en la LLC	7
1.1.5 Tratamiento en la LLC	20
1.2.0 La biología del linfocito B de la LLC y su microambiente.....	24
1.2.1 El receptor de la célula B en la LLC	25
1.2.2 El linfocito B de la LLC presenta inhibida la apoptosis <i>in vivo</i> pero muere <i>in vitro</i>	25
1.2.3 Rol de las células T, de las células estromales y de las células dendríticas diferenciadas ("nurse like cells") en la activación del clon leucémico.....	27
1.2.3.1 Las citoquinas en el "homing" del linfocito B leucémico.....	27
1.2.3.2 Rol de las células T en el microambiente leucémico.....	28
1.2.3.3 Rol de las células estromales y "nurse like cells" en el microambiente leucémico.....	30
1.2.3.4 Otras señales recibidas por el clon leucémico.....	31
1.3.0 Poblaciones proliferantes en la LLC y su asociación con la progresión tumoral.....	32
1.3.1 El linfocito B leucémico puede proliferar	32
1.3.2 Distintas poblaciones proliferantes dentro del clon tumoral y su asociación con la progresión de la LLC.....	34
1.3.2.1 Población proliferante CD38 ^{pos} en células B de LLC.....	34
1.3.2.2 Población proliferante CXCR4 ^{low} CD5 ^{high} en células B de LLC.....	35
1.3.2.3 Población proliferante AID ^{pos} y un proceso activo de Cambio de Clase en LLC.....	36
1.3.2.4 Población proliferante CD86 ^{pos} en células de LLC.....	39
1.4.0 La Citidina Deaminasa Inducida por Activación (AID) en la LLC.....	39
1.4.1 La enzima AID y sus diferentes funciones	39
1.4.2 Implicancias de AID en el desarrollo tumoral.....	41
1.4.3 AID en la LLC	43
1.4.4 Rol de AID en la desmetilación del ADN.....	44

1.5.0 Metilacion de ADN en LLC.....	49
1.5.1 Metilación del ADN a nivel de genes específicos en la LLC	52
1.6.0 Estudios proteómicos en la LLC.....	54
2 OBJETIVOS	58
3 RESULTADOS.....	60
3.1 Mecanismos moleculares responsables de la alta expresión del marcador pronóstico <i>LPL</i> en la célula B leucémica de pacientes de LLC con mal pronóstico.....	60
3.2 Perfil de metilación de ADN de una sub-población leucémica proliferante AID ^{pos} y su contraparte quiescente AID ^{neg}	77
3.2.1 Aislamiento de una población proliferante IgG ^{pos} AID ^{pos} y su contraparte quiescente IgM ^{pos} AID ^{neg}	77
3.2.2 Microarreglo de islas CpG de una población proliferante IgG ^{pos} AID ^{pos} y su contraparte quiescente IgM ^{pos} AID ^{neg}	78
3.2.3- Estudio del estado de metilación de genes por el método del bisulfito	84
3.3 Perfil proteómico de una población leucémica proliferante AID ^{pos} y su contraparte quiescente AID ^{neg}	91
4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	98
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	112
6 BIBLIOGRAFÍA.....	120
LISTA DE ABREVIATURAS.....	144
ANEXO I	145
ANEXO II	146
ANEXO III	147

RESUMEN

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la más frecuente de las leucemias entre las poblaciones adultas de origen caucásico. Esta patología se define como un tumor quiescente de células B CD5⁺, donde solo una pequeña fracción de las células tumorales es capaz de proliferar en la médula ósea y tejidos linfoides, luego de una activación por su microambiente. La LLC sigue un curso sumamente variable, con pacientes que presentan una sobrevida que oscila entre meses y décadas. La necesidad de distinguir los pacientes que presentan una enfermedad indolente, de aquellos que van a progresar hacia una forma agresiva de LLC, ha llevado a la búsqueda exhaustiva de marcadores genéticos y/o moleculares que ayuden a predecir la evolución clínica de la enfermedad.

La expresión del ARNm de *LPL* se ha posicionado como el mejor marcador a nivel de ARNm de la evolución clínica de la LLC (Kaderi et al. 2011). Sin embargo, y a pesar de su importancia en la predicción evolutiva en esta leucemia, no se conocía el origen de su expresión anómala en el linfocito B leucémico. En una primera parte de este trabajo de tesis se investigó y describió que la desmetilación del promotor génico de *LPL* es la responsable de la expresión anómala de este gen en pacientes con una LLC de mala evolución clínica. Por otra parte, nuestro trabajo demuestra que la expresión de *LPL* puede ser inducida por señales específicas del microambiente tumoral como ser CD40L/IL-4 y anti-IgM, logrando estimular la proliferación del clon leucémico. Esta primera parte de la tesis logra demostrar por primera vez una asociación directa entre un perfil de metilación diferencial, la expresión de *LPL* y la proliferación del clon leucémico.

Evidencias recientes sugieren que el diálogo de las células leucémicas con células accesorias en microambientes especializados, favorece la progresión de la enfermedad y la refractoriedad al tratamiento a través del mantenimiento las células B proliferante (Ghia et al., 2008). En este sentido, nuestro grupo describió una sub-población proliferante del clon tumoral que sobre-expresa la enzima AID, moléculas asociadas a proliferación y anti-apoptosis y que fue correlacionada con una menor sobrevida y refractoriedad al tratamiento (Palacios et al. 2010). En busca de nuevos marcadores de agresividad en la LLC estudiamos el perfil de metilación global de esta población y su contraparte quiescente, encontrando a los genes *GIMAP1*, *GIMAP5*, *MYO1G*, *PRKCH* y *STARD10* sobre-expresados en la población proliferante y mostrando una correlación positiva entre desmetilación y transcripción. Proseguimos la búsqueda de moléculas características de estas poblaciones analizando sus perfiles proteómicos, identificando 14 proteínas diferencialmente expresadas en ambas poblaciones. Estas moléculas expresadas diferencialmente en la población proliferante leucémica podrían ser relevantes en estudios posteriores para una aplicación posible en el uso pronóstico o terapéutico de la enfermedad.

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1.0 La Leucemia Linfoide Crónica

1.1.1 Generalidades

La leucemia linfoide crónica (LLC) es una neoplasia humana caracterizada por la acumulación progresiva de linfocitos B clonales pequeños CD5+ en sangre periférica (SP) y órganos linfoides secundarios. En esta enfermedad la vida de las células B se ve prolongada por un defecto en la apoptosis celular. Sin embargo, trabajos relativamente recientes en el área molecular demuestran que la LLC no solo es una enfermedad acumulativa de linfocitos B quiescentes sino también una leucemia en la que existen linfocitos tumorales con una alta capacidad proliferante (Chiorazzi 2007). Esta población que se duplica activamente representa entre el 0.1-1% de la población tumoral en la LLC y ha sido correlacionado positivamente con una forma más agresiva de la enfermedad (Messmer et al. 2005; Palacios et al. 2010).

Una de las principales características de esta leucemia es la heterogeneidad clínica sintomática, en donde pueden observarse tres tipos de comportamientos: a) pacientes que nunca requieren tratamiento, b) pacientes que inician con una enfermedad indolente y evolucionan hacia una progresiva y c) pacientes que se inician con una forma agresiva de la leucemia, necesitando terapia de forma inmediata (Dighiero 2005). Dentro del segundo y tercer grupo nos encontramos con pacientes que responden a las terapias actuales y otros que son refractarios a las mismas, por lo que al presente la LLC es considerada una enfermedad heterogénea y en muchos casos incurable.

1.1.2 Epidemiología de LLC

La incidencia de esta enfermedad puede variar con la edad y con el sexo, siendo mayor en hombres que en mujeres (relación 2:1). En países occidentales se estima que la incidencia oscila entre 4,1 - 6,5 casos por cada 100.000 habitantes por año. En particular, datos provistos por la agencia nacional de investigación de Estados Unidos ("National Cancer Research, Surveillance Epidemiology and End Results") muestran que para el período 2006-2010 la incidencia fue de 4,3 por cada 100.000 al año (Howlader et al. 2013). A su vez, se observa que los americanos blancos presentan una incidencia ligeramente superior que los afro-americanos (Weiss 1979). Los valores observados en Estados Unidos son similares a los observados en Inglaterra, sin embargo en países asiáticos la incidencia es casi cinco veces menor en comparación con los países occidentales (Tamura et al. 2001). A pesar de estas observaciones, no existen evidencias consistentes capaces de relacionar la predisposición a la enfermedad con el medioambiente (Dighiero G, Hamblin 2008).

Estudios recientes realizados en Uruguay muestran que a semejanza del resto de Europa occidental la incidencia de la LLC es de 5,3 por cada 100.000 habitantes por año (Moro et al. 2009). La edad media para el diagnóstico varía entre 70 años para el hombre y 74 para la mujer en un rango de entre 35 a 90 años, mientras que la edad media de muerte es de 76 y 81 años respectivamente.

1.1.3 Diagnóstico y clasificación anátomo-clínica de la LLC

1.1.3.1 Diagnóstico de la LLC

La mayoría de los pacientes con LLC se diagnostican en ausencia de sintomatología a causa de un hemograma de rutina. El diagnóstico se realiza tomando en cuenta el recuento linfocitario en sangre periférica (SP) y el estudio del inmunofenotipo. El diagnóstico clínico de LLC se define por: **1- una linfocitosis absoluta de al menos $5 \times 10^9/L$ (5000/ μ l de sangre) de linfocitos maduros en sangre; 2-un inmunofenotipo característico del linfocito B.** En la LLC, la célula B presenta un

patrón diferencial de moléculas específicas que permiten su diferenciación de otros tipos de linfomas (Figura 1).

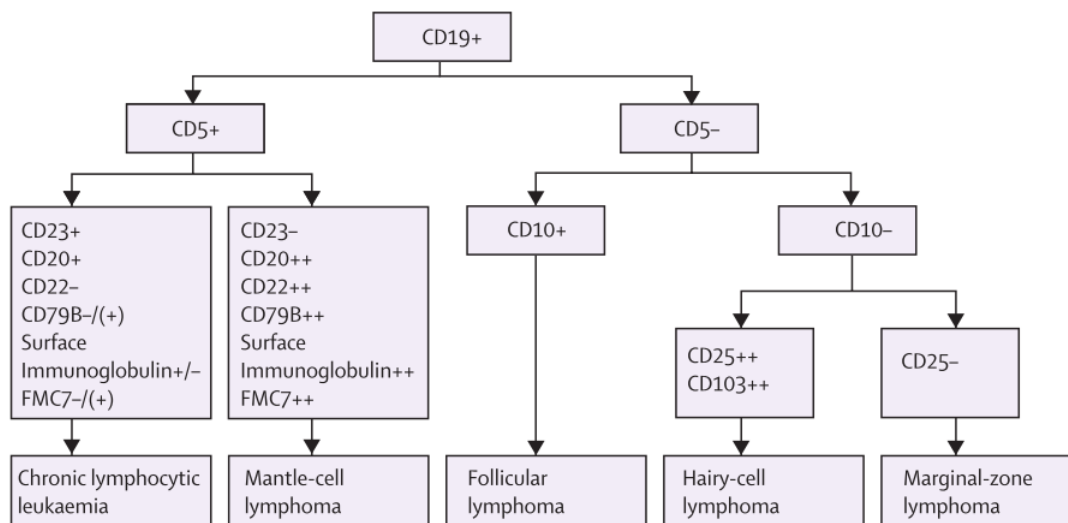


Figura 1. Diagnóstico diferencial de linfocitosis CD19+ (Dighiero & Hamblin, 2008)

En cuanto al inmunofenotipo de las células de LLC, es importante destacar que estas células co-expresan el antígeno (Ag) de células T CD5 y el Ag de superficie de las células B CD19, CD20 y CD23. Los niveles de CD20, CD79b e inmunoglobulinas de membrana (Igs), son particularmente bajos comparados con aquellos encontrados en células B de donante sanos (Ginaldi et al. 1998; Moreau et al. 1997).

1.1.3.2 Clasificación anátomo-clínica de la LLC

A mediados de los años 70 Rai y col. proponen una clasificación con 5 estadios (0, I, II, III y IV) (Rai et al. 1975), que luego fue modificada para reducir el número de estadios de 5 a 3 (Rai 1987).

La clasificación modificada de Rai permite definir a los pacientes de bajo riesgo, (estadio 0 de Rai), pacientes con riesgo intermedio (estadio I o II de Rai) y enfermedad de alto riesgo (estadio III o IV de Rai).

Años más tarde Binet y col. realizaron otra clasificación anatómico-clínica de pacientes con LLC que permitió subdividirlos en tres grupos pronóstico: bueno (estadio A), intermedio (estadio B) y severo (estadio C) (Binet et al. 1977).

Ambas clasificaciones se basan en la evaluación de la linfocitosis, tamaño de los nódulos linfáticos, detección de organomegalia y presencia o ausencia de anemia o trombocitopenia. La clasificación de Binet y Rai está directamente relacionada con la supervivencia de los pacientes, siendo aquellos con estadio Binet A o Rai 0 los que presentan una supervivencia media de más de 10 años. Los pacientes con estadio Binet B o Rai I/II presentan una supervivencia media de entre 5 a 7 años, mientras que los que presentan una menor supervivencia, de aproximadamente 3 años son los de estadio Binet C o Rai III/IV (Hamblin, 2007).

Al día de hoy ambas clasificaciones son usadas indistintamente en la estratificación clínica de la LLC. Las dos procuran un sistema sumamente simple, que requiere tests de laboratorios sencillos y que permiten tanto el diseño de estudios clínicos como de estrategias terapéuticas racionales.

1.1.4 Marcadores pronóstico en la LLC

Al presente, ni la clasificación de Rai, ni la de Binet, permiten pronosticar con una certeza razonable la evolución de los pacientes, sobre todo de aquellos que se incluyen en los estadios iniciales de la enfermedad donde el tratamiento podría ser más efectivo (Dighiero 2003). Esto lleva a la necesidad imperiosa de obtener marcadores de progresión en esta leucemia.

Los mayores avances en lo que respecta a la predicción del proceso evolutivo de la enfermedad, fueron realizados en la década de 1990 donde gracias al desarrollo tecnológico en el área de la biología molecular se empieza a conocer en más detalle la biología de esta leucemia.

Una de los grandes avances en este campo comienza con el trabajo de Schroeder y Dighiero en 1994 (Schroeder & Dighiero 1994) sugiriendo que la LLC es una enfermedad heterogénea en donde el proceso tumoral puede originarse ya sea en linfocitos B memoria o linfocitos B vírgenes. En este trabajo se muestra que por lo menos el 50% de los pacientes expresaban los genes variables de sus Igs en forma mutada, mientras que el resto presentan los genes V_H en configuración germinal. Años después este concepto de heterogeneidad molecular en la LLC es reafirmada con los trabajos de Hamblin y col. (Hamblin et al. 1999) y Damle y col. (Damle et al.

1999). Ambos trabajos demuestran que el perfil mutacional de los genes V_H del clon tumoral en la LLC surge como el principal método pronóstico en esta leucemia. A partir de entonces es reconocido a nivel clínico que aquellos pacientes con genes V_H mutados (Mut), tienen un mejor pronóstico que los pacientes en los cuales el clon leucémico muestra un gen V_H en su configuración germinal, no mutado (NM).

Los pacientes de LLC Mut fueron originalmente definidos como aquellos que tienen menos del 98% de identidad nucleotídica con respecto a la línea germinal de los genes V_H . A pesar de que otros puntos de corte, como 94% o 95% de identidad fueron propuestos durante varios años, hoy en día la mayoría de las publicaciones han establecido que el mejor punto de corte para discriminar el curso clínico del paciente es 98% (Hamblin et al. 2008).

Es importante destacar que el clon tumoral presenta un único tipo de rearrreglo de las cadenas *IGH-VDJ* que darán lugar a las Igs de membrana de los linfocitos B tumorales. Sin bien existe un clon tumoral predominante, estudios recientes empleando la tecnología de secuenciado masivo han permitido evidenciar la presencia de más de un clon tumoral en pacientes de LLC, introduciendo el concepto de oligoclonalidad en esta leucemia (Niklas et al. 2014). Se ha determinado que la presencia o ausencia de hipermutación somática (HMS) se encuentra asociada con el uso de determinados segmentos génicos. Pacientes con un rearrreglo *IGHV1-69* en general presentan un perfil NM, mientras que la mayoría de los pacientes que presentan un rearrreglo de la familia *IGHV3*, tienen un perfil Mut. Al igual que los pacientes de LLC de Europa, Norteamérica y Asia, en Argentina (Stanganelli et al. 2013) y en Uruguay (Bianchi et al. 2010) se ha observado que existe un sesgo en el uso del segmento génico de la familia de *IGH-VDJ*. Los rearrreglos de *IGHV* más frecuentes en los pacientes uruguayos de LLC se parecen más a los europeos del mediterráneo que a los Brasileños. Posiblemente eso se deba a que más del 80% de los Uruguayos y Argentinos presentan ancestros de origen Europeo mientras que en los Brasileños este porcentaje es mucho menor y existe una mayor ascendencia de origen Africano. Esto sugiere que las influencias genéticas podrían ser importantes en el desarrollo de la etiopatogénesis de la LLC, (Bianchi et al. 2010).

En los años subsiguientes al descubrimiento de genes V_H Mut o NM, numerosos marcadores moleculares han sido propuestos con el objetivo de reemplazar al estudio del perfil mutacional de los genes V_H , cuya principal desventaja es la difícil aplicación en la rutina hospitalaria. De acuerdo a Moreno y Montserrat (Montserrat & Moreno 2008) los marcadores pronósticos se pueden dividir en dos grandes grupos: los clásicos, y los biológicos.

Los **marcadores pronóstico clásicos** son: **1- la estratificación clínica** (Clasificación Binet - Rai), **2- recuento linfocitario**, **3- morfología de linfocitos de SP**, **4- tiempo de duplicación linfocitaria** y **5- grado de infiltración en médula**.

Tanto el recuento de linfocitos como la morfología de los mismos son estudiados durante el diagnóstico para la clasificación de estadio Binet o Rai. Mientras que el tiempo de duplicación linfocitaria ("Lymphocyte Doubling Time", LDT) está definido como el número de meses que le lleva a los linfocitos doblar su número absoluto. Lo que quiere decir que si el valor de LDT es bajo, en poco tiempo los linfocitos se duplican, por esta razón es que pacientes que presentan un LDT menor a 6 meses se los asocia con una alta proliferación y una enfermedad más agresiva.

Por otro lado, el grado de infiltración medular se determina mediante histología de la médula ósea (Binet 1999; Montserrat 2002). Cuando hay una infiltración medular difusa se ha observado una supervivencia entre 2 a 4 años, mientras que en los casos con un patrón no difuso (nodular, intersticial, mixto), esta ha variado de 8 a 11 años. El patrón difuso generalmente se correlaciona con un estadio clínico avanzado y cuando se observa en un estadio clínico precoz, se considera un indicador de rápida progresión (Catovsky & Murphy 1995).

Los **marcadores pronósticos biológicos** se pueden subdividir en tres grandes grupos: **1- marcadores genéticos** (perfil mutacional de los genes V_H , aberraciones cromosómicas y mutaciones en genes específicos), **2- expresión anómala de genes en linfocitos leucémicos** (a nivel de proteínas, ARNm, y microARNs) y **3- proteínas presentes en el suero**

1-Marcadores pronósticos genéticos

A pesar de que varios trabajos sugieren que la LLC podría tener un componente genético importante, la naturaleza de esta predisposición no ha sido aún bien dilucidada. Dado que ninguna de las aberraciones cromosómicas descritas se observa en todos los pacientes de LLC, es difícil proponer la presencia de alguna anomalía específica en esta leucemia así como que alguna de ellas sea el evento inicial en la transformación maligna. Sin embargo, trabajos de Döhner y col. demuestran la presencia de aberraciones cromosómicas en un 82% de las LLC estudiadas, sugiriendo la importancia de las mismas en la enfermedad (Döhner et al. 2000). Diferentes estudios han encontrado asociación entre rearrreglos estructurales y/o cariotipos complejos con progresión de la enfermedad, menor supervivencia libre de tratamiento e inclusive escasa respuesta a la quimioterapia (Döhner et al. 2000).

La delección 13q14 ha sido identificada en un 55% de los pacientes, la trisomía 12 en un 18%, la delección 11q22-23 en un 16%, mientras que la delección menos frecuente es la 17p13, encontrándose sólo en un 7% de los pacientes.

La delección 13q se encuentra a menudo en pacientes Mut y de buen pronóstico, estando directamente relacionada a la expresión del gen *BCL-2* (Hallek et al, 2008). Trabajos del grupo de Croce han demostrado que la ausencia de este fragmento de ADN frecuentemente conlleva a la falta de expresión de los microARNs 15a y 16-1. La delección 13q y ausencia de estos microRNAs hace que se sobre exprese la proteína Bcl2 impidiendo la muerte del clon leucémico (Calin et al. 2004; Cimmino et al. 2005).

En lo que respecta a la trisomía del cromosoma 12 (tri 12) no se ha encontrado un efecto directo sobre ningún gen. Sin embargo, comparaciones entre pacientes de LLC sin anomalías genéticas y portando la tri 12, demuestran una menor supervivencia y peor evolución en estos últimos casos (Döhner et al. 2000). Recientemente, se ha observado que mutaciones en *NOTCH1* (*neurogenic locus notch homolog protein 1*) aparecen con alta frecuencia en pacientes con tri 12, especialmente en los que presentan mal pronóstico (*IGHV* NM y/o ZAP-70⁺) (Balatti et al. 2012), estos pacientes presentan una menor supervivencia global que está asociada a una mayor resistencia

a la muerte celular del linfocito leucémico (Balatti et al. 2012; Fabbri et al. 2011; Puente et al. 2011).

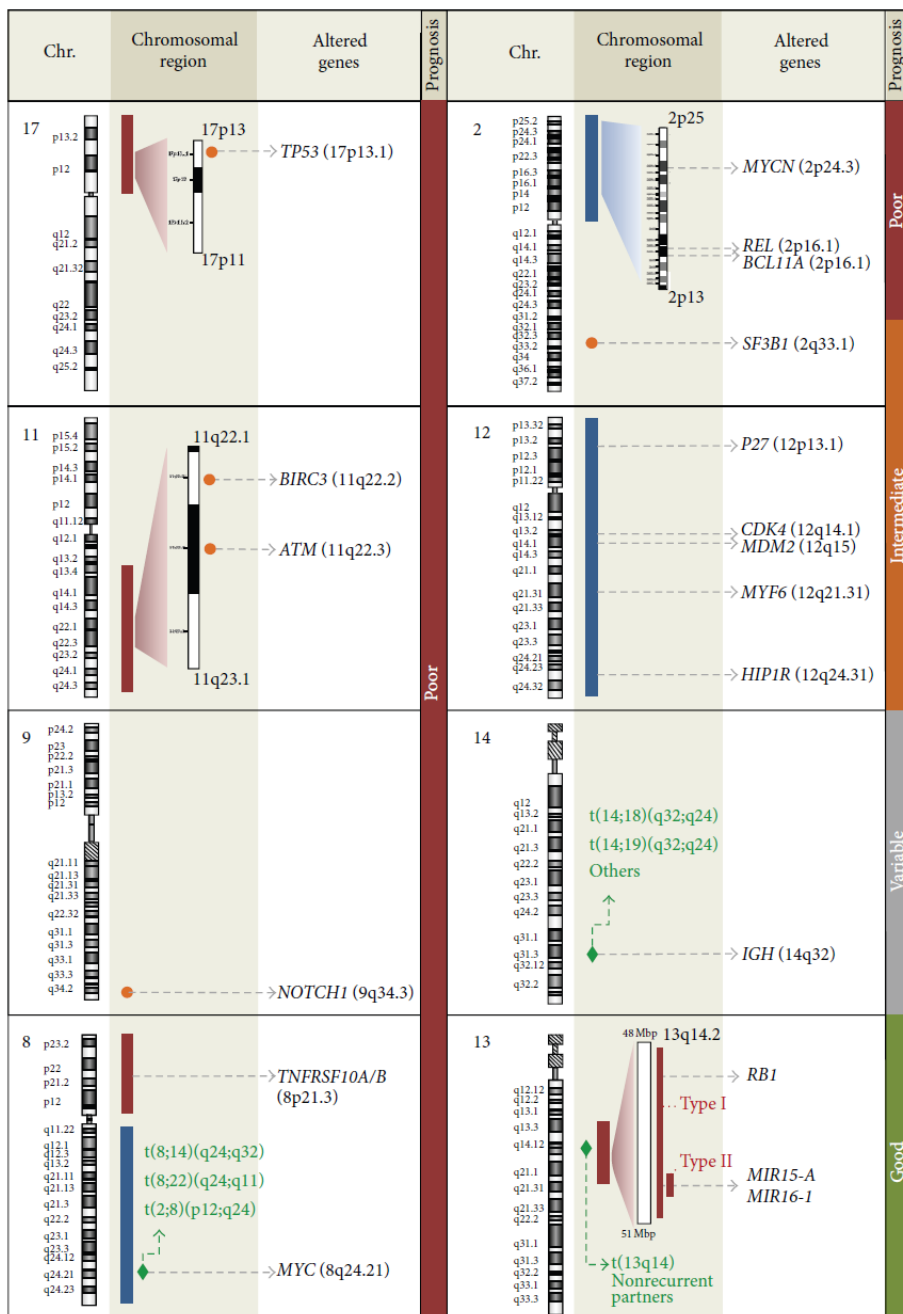


Figura 2. Principales anomalías genéticas con significado pronóstico conocido en LLC. Las anomalías están agrupadas por cromosomas (Chr). Las pérdidas y ganancias de regiones cromosómicas están representadas con barras rojas y azules respectivamente; los puntos de corte en las translocaciones están indicados como diamantes verdes; los loci donde se encuentran genes frecuentemente mutados se indican con círculos naranja. Imagen extraída de (Puiggros et al. 2014).

Por su parte, pacientes con la delección 11q22-23 afectando genes como *ATM* (*Ataxia telangiectasia*), *RDX* (*Radixin*) y *BIRC3* (*Baculoviral IAP Repeat Containing 3*) y la delección 17p afectando genes como *TP53*, presentan indefectiblemente una evolución clínica desfavorable (Stilgenbauer et al. 2002). Estos pacientes son en general NM, lo cual es consistente con el mal pronóstico (Hamblin et al, 1999). Tanto el gen *ATM* como el gen *TP53* son esenciales en la reparación del ADN y detención del ciclo celular frente al daño de la célula. La ausencia de estos genes contribuye a una evolución clonal agresiva en donde la adquisición de nuevas variantes genómicas llevan al origen de un clon leucémico refractario al tratamiento (revisado en (Chiorazzi 2012)).

La evaluación de las alteraciones genéticas antes mencionadas son realizadas por técnicas citogenéticas que presentan limitaciones, solamente pueden detectar lesiones que hayan sido previamente descritas en otros pacientes. Por esta razón, técnicas más sensibles capaces de reconocer nuevas alteraciones genéticas son de gran importancia para el estudio de esta y otras enfermedades. En este sentido es que mediante secuenciado masivo ("whole-exome o whole genome Sequencing") se han logrado identificar, al día de hoy, más de 25 mutaciones genéticas recurrentes que afectan siete vías de traducción de señales diferentes. Los genes mayormente estudiados son los siguientes: *NOTCH1*, *XPO1* (*exportina 1*), *MYD88* (*diferenciación mieloide gen 88 de respuesta primaria*), *KLH6* (*Kelch-like 6*), *TP53*, *TGM* (*transglutaminasa 7*), *BIRC3* (*baculovirus IAP conteniendo el repetido3*), *PLEKHG5* (*pleckstrin homology domain containing, family G*), *ATM* y *SF3B1* (*factor 3 de splicing, unidad B1*) (Fig. 2, Fig.3 y Tabla 1) (Fabbri et al. 2011; Puente et al. 2011; Quesada et al. 2012; D Rossi et al. 2012; Wang et al. 2011; Baliakas et al. 2014).

La presencia de mutaciones en los genes antes descritos ha mostrado tener valor pronóstico con muchas, aunque no todas, las modalidades de tratamiento. Por lo tanto, se ha sugerido que estas mutaciones puntuales deben ser incorporadas en el modelo de jerarquía citogenética, mostrándose así una mejora en la discriminación de pacientes de bajo y alto riesgo así como un aumento sustancial en la capacidad de predecir la sobrevida (Rossi et al. 2013; Baliakas et al. 2014).

Tabla 1- Mutaciones somáticas más frecuentes en la LLC

Gen Mutado	Prevalencia (%)	Asociación con	Rol funcional	Tipo de mutación	Pronóstico
<i>IGHV</i>	60-55%	----	LLC-Mut típicamente progresión más lenta de la enfermedad y mayor supervivencia	----	Favorable
<i>TP53</i>	4-12%	del(17p13)	Rol esencial en apoptosis o arresto celular luego de daño de ADN	Inactivación	Desfavorable
<i>ATM</i>	~ 12%	del(11q23)	Activa puntos de control del ciclo celular	Inactivación	Desfavorable
<i>NOTCH1</i>	~ 10%	Trisomía 12 del(17p13)*	Regula genes incluidos <i>MYC</i> , <i>TP53</i> y moléculas de la vía NFκB	Activación	Desfavorable
<i>SF3B1</i>	5-10%	del(11q22-q23) mutaciones <i>ATM</i> , <i>NM-IGHV</i> , expresión ZAP-70	Componente estructural del espleiceosoma	Inactivación	Desfavorable
<i>BIRC3</i>	~ 4%	del(11q22-q23)	Regulador negativo de MAP3K14 (activador de señalización NFκB)	Inactivación	Desfavorable
<i>MYD88</i>	3-5%	Mut- <i>IGHV</i> y del(13q14)	Fosforilación de <i>MYD88</i> resulta en activación de vía NFκB	Activación	----

Modificado de (Shahjehani et al. 2015). * Si bien aún es controversial un estudio reciente en una corte de 889 pacientes muestra que las mutaciones en *NOTCH1* tienden a coincidir con del(17p13) (Baliakas et al. 2014).

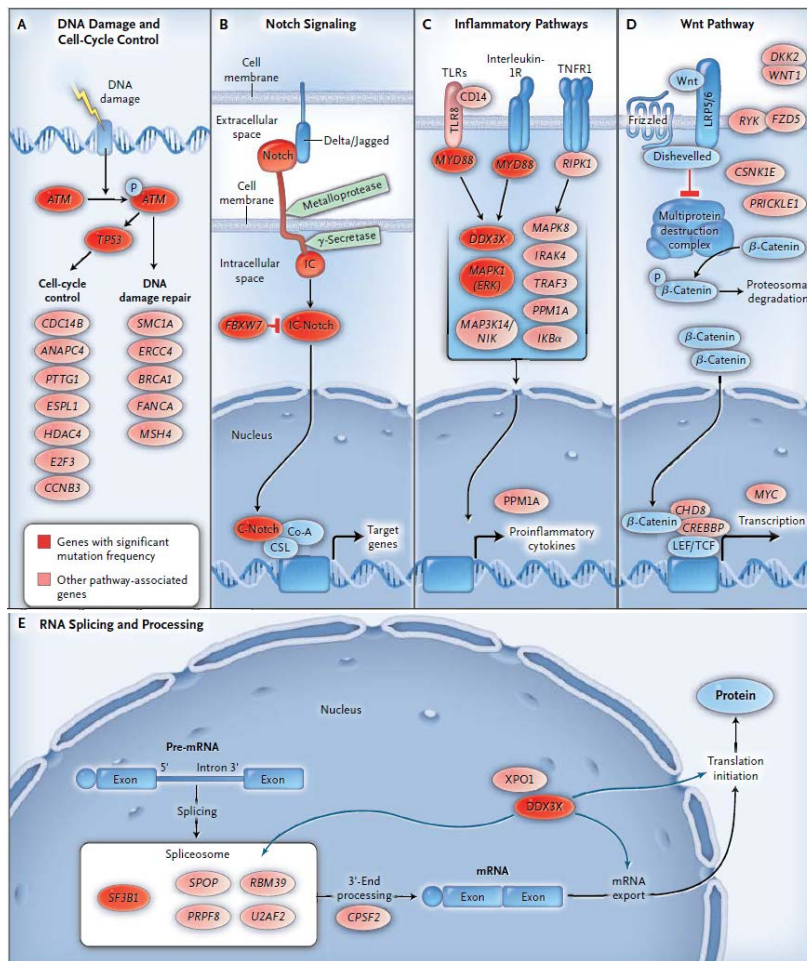


Figura 3. Principales vías de señalización en Leucemia Linfocítica Crónica. Genes con una frecuencia de mutación significativa participan en cinco vías de señalización, en las cuales estos genes cumplen roles bien establecidos: Control de la reparación de ADN y ciclo celular (Panel A), Señalización vía Notch (Panel B), Vía inflamatoria (Panel C), Señalización vía Wnt (Panel D) y Procesamiento y esplicing de ARN (Panel E). Los genes con alta frecuencia de mutados se muestran en rojo y los genes con mutaciones que están en vías de señalización relacionadas con LLC se muestran en rosa. Imagen extraída de (Wang et al. 2011).

2-Expresión anómala de genes en linfocitos leucémicos (a nivel de proteínas, ARNm, microARNs)

La expresión anómala de genes en el clon leucémico ha sido estudiada en gran detalle y durante mucho tiempo con el fin de encontrar mejores predictores de la evolución clínica que el estudio mutacional de genes de *IGHV*. Con el advenimiento de la tecnología de microarreglos en la primera década de este siglo, aparecen diferentes marcadores pronósticos que aún hoy en día se siguen utilizando, si bien al presente no existe un único y mejor marcador pronóstico para esta leucemia.

Proteínas con expresión anómala en la LLC como marcadores pronósticos

El estudio del nivel de expresión de las proteínas CD38 (Damle et al. 1999), ZAP-70 (Rassenti et al. 2008) y de la integrina CD49d (Gattei et al. 2008) por citometría de flujo son los tres marcadores proteicos más usados como predictores de la evolución de esta leucemia.

CD38 es una glicoproteína de membrana que se expresa en células con origen hematopoyético. Las células B y T activadas expresan CD38, así como las células "natural killers" y las células dendríticas. La proteína CD38 funciona como un receptor de membrana interaccionando con CD31 y llevando a la activación del linfocito B a través de la regulación de los niveles de calcio celular (Malavasi et al. 2008). El porcentaje de células CD38 positivas dentro del clon tumoral es un indicador de la activación celular del clon. Aquellos que presentan un porcentaje elevado responden de mejor manera a las señales de activación (Chiorazzi 2012). Debido a esto, la expresión de CD38 es una medida de división celular y reflejo del crecimiento *in vivo*. A pesar de estas características la expresión de CD38 como marcador pronóstico presenta ciertas desventajas: i- su expresión varía durante el curso de la enfermedad, ii- CD38 no es exclusiva de linfocitos B tumorales sino que presenta heterogeneidad de expresión en las muestras de sangre y iii- la ausencia de un valor definido de un punto de corte que permita decir cuando un paciente es o no positivo para CD38. Al día de hoy, los valores sugeridos de puntos de corte varían desde 5-30% (Ghia et al. 2003; Hamblin et al. 2002). Por esta razón es que se ha propuesto a CD38 como un marcador complementario al perfil mutacional de genes *VH*.

La proteína ZAP-70 es una tirosina-quinasa de 70 kDa que se expresa generalmente en células "natural killers" y en linfocitos T. Juega un rol central en la vía de señalización del receptor de células T (TCR), en migración y apoptosis (Chan et al. 1992). En los linfocitos B, ZAP-70 se expresa en células normales y tumorales en diferentes etapas del desarrollo (Scielzo et al. 2006). Un estudio de expresión diferencial entre pacientes NM y Mut determinó que ZAP-70 se sobreexpresa en individuos NM de mal pronóstico (Rosenwald et al. 2001). En la LLC y otras leucemias la expresión de ZAP-70 está regulada por metilación de la región 5' del gen (Corcoran et al. 2005; Claus et al. 2012). En cuanto a la función de ZAP-70 en el linfocito leucémico, se ha observado que prolonga la vía de señalización del BCR (Chen et al. 2008) y que promueve la migración celular (Richardson et al. 2006; Calpe et al. 2011). Dado que la expresión de ZAP-70 en pacientes de LLC se correlaciona con el perfil mutacional de genes *VH* y con la expresión de CD38, el estudio de los niveles de expresión de ZAP-70 se ha propuesto como un marcador independiente de la evolución clínica (Crespo et al. 2003). Sin embargo, el análisis de ZAP-70 ha sido difícil de estandarizar en la práctica clínica, y la ausencia de resultados de distribución bimodal hace que muchos pacientes presenten resultados muy cercanos a la línea de corte. Estudios recientes sugieren que el análisis del perfil de metilación del promotor de ZAP-70 podría arrojar resultados más robustos (Claus et al. 2014).

Recientemente, la proteína CD49d ha sido propuesto como un interesante marcador pronóstico en la LLC. Pacientes con más de 30% de células positivas para CD49d presentan una menor sobrevida (Gattei et al. 2008; Rossi et al. 2008; Bulian et al. 2014). CD49d es la subunidad $\alpha 4$ de la integrina heterodimérica $\alpha 4/\beta 1$ que juega un papel importante en la migración de los linfocitos, regulando la adhesión de las células a los tejidos. Su unión a fibronectina y a la molécula de adhesión celular vascular (*vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM1) desencadena señales que contribuyen con la sobrevida celular. Esta integrina previene la apoptosis espontánea o inducida por drogas en células normales y neoplásicas. Su expresión se encuentra asociada a CD38 y por lo tanto a mal pronóstico (Gattei et al. 2008; Zucchetto et al. 2006). En una publicación reciente, se describió que pacientes con trisomía 12 presentaban un número significativamente mayor de células CD49d⁺ y que esta aumento en la expresión se correlacionaba directamente con la

desmetilación del gen (Zucchetto et al. 2013). Interesantemente, ya ha sido descrito que en las LLC con trisomía 12 las células tumorales presentan un “homing” preferencial hacia los nódulos linfáticos en comparación con la médula ósea o sangre periférica (Liso et al. 2001), de esta manera conectando el marcador pronóstico CD49d con una aberración cromosómica (tri12) y un fenotipo leuquemiogénico (“homing” hacia un nicho tumoral activador). Esto es de interés teniendo en cuenta los recientes desarrollos terapéuticos dirigidos a inhibir la señalización del BCR, tales como ibrutinib y CC-292 (dirigido a BTK) e idelalisib y IPI-145 (ambos dirigidos a PI3K; Fig. 4). La actividad clínica del ibrutinib es llevada a cabo, al menos parcialmente, por la movilización de las células de LLC que se encuentran en los órganos linfoides secundarios (Burger & Montserrat 2012; Ponader et al. 2014), posiblemente actuando a nivel de la interacción CD49d/VCAM-1 (De Rooij et al. 2012). Por lo tanto se ha sugerido que CD49d podría tener un potencial predictivo para nuevos tratamientos que cambian el “homing” y movilizan las células de LLC (Zucchetto et al. 2013).

ARNm y MicroARNs con expresión anómala en la LLC con valor pronóstico

Con el advenimiento de los análisis genómicos por microarreglos, han sido descritos diferentes marcadores pronósticos implicando la expresión de ARN mensajeros. Dentro de los principales marcadores propuestos al momento encontramos el ARNm de la lipoprotein lipasa (*LPL*) (Heintel et al. 2005), la relación *LPL/metaloproteasa ADAM29* (Oppezzo, Vasconcelos, et al. 2005) y de *CLLU1* (Buhl, Jurlander, Geisler, et al. 2006).

De todos ellos describiremos en detalle la expresión anómala del gen *LPL* por ser parte del trabajo de esta tesis. La expresión normal de *LPL* se ha descrito principalmente en tejido adiposo, músculo estriado esquelético y cardíaco, células dendríticas y células del linaje mielóide CD33⁺, pero nunca en la población de células B. *LPL* es un actor central del metabolismo lipídico, catalizando la hidrólisis de los triglicéridos presentes en lipoproteínas circulantes, como quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), en ácidos grasos libres y glicerol. Además de su función catalítica, la proteína *LPL* podría funcionar como pivot entre proteínas de la superficie celular y lipoproteínas, aumentando el contacto entre los monocitos y la superficie del

endotelio vascular a través de interacciones con proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs) (Bilban et al. 2006; Mansouri et al. 2010). Así, LPL puede mediar la formación de complejos trimoleculares entre moléculas de distintas células (Kolset & Salmivirta 1999). Del mismo modo esta proteína podría contribuir a que las células incorporen lipoproteínas a través de la interacción con el receptor LRP (LDL receptor-like protein) o los proteoglicanos de la célula blanco (Beisiegel & Heeren 1997).

Una alta expresión del ARNm del gen *LPL* en células B de pacientes de LLC ha sido correlacionada con una mala evolución clínica (Oppezzo, Vasconcelos, et al. 2005). La expresión anómala de esta enzima se encuentra asociada a los marcadores pronósticos CD38, ZAP-70, LDT, alto riesgo de aberraciones genéticas y especialmente con el estado mutacional de los genes *IGHV* (Heintel et al. 2005; Oppezzo, Vasconcelos, et al. 2005). Los niveles de ARNm de *LPL* no cambian significativamente durante el curso de la enfermedad, por lo que puede ser utilizado como marcador pronóstico tanto en pacientes de bajo riesgo como en pacientes en etapas más avanzadas de la enfermedad (Oppezzo, Vasconcelos, et al. 2005). También se ha proporcionado evidencia que muestra a *LPL* como un buen marcador pronóstico de la evolución en pacientes en remisión del cáncer luego del tratamiento (Maloum et al. 2009).

Esta correlación entre LPL y el estado mutacional de los genes *IGHV* también fue confirmada a nivel de proteína intracelular, pero con diferencias menos significativas y no observándose correlación comparando la proteína en superficie (Mansouri et al. 2010). Por esta razón, la determinación del nivel de ARNm constituye una mejor herramienta. Estudios recientes de Kaderi y col. proponen a *LPL* como el mejor marcador pronóstico a nivel de ARN debido a que, a diferencia del resto de los marcadores, éste puede ser medido directamente a partir de muestras de SP sin requerir aislar los linfocitos B previo a su análisis (Van Bockstaele et al. 2007). Por lo que, los autores consideran al marcador pronóstico *LPL* como prometedor para un futuro uso en la clínica (Kaderi et al. 2011).

Se muestra a continuación una tabla que resume la importancia de la expresión de *LPL* en la LLC como marcador pronóstico en esta leucemia (Tabla 2).

Tabla 2. Lipoprotein lipasa como factor pronóstico en la leucemia linfocítica crónica

Referencias	Número de pacientes	Correlación con mutaciones en <i>IgVH</i>	Correlación estadísticamente no significativa	Correlación estadísticamente significativa ⁴
Oppezzo, Vasconcelos, et al. 2005 ¹	127	76%		EFS ZAP-70
Heintel et al. 2005 ²	104	84%	Estadío Rai y Binet	TFS OS del11q, del17p
Nüchel et al. 2006 ¹	133	No determinado		TFS ZAP-70, CD38
Van't Veer et al. 2006	130	84%	Género, edad, del11q	OS ZAP-70
Van Bockstaele et al. 2007 ³	50	80%		TFS OS ZAP-70, cariotipo anormal
Nikitin et al. 2007	134	88%	Anormalidades de cariotipo	OS LDT, Estadío Rai o Binet
Saad et al. 2008	25	No se investigó	ZAP-70	LDH, cariotipo anormal, respuesta pobre a la terapia
Maloum et al. 2009	119	76%		EFS OS
Xu et al. 2009	58	No determinado	Género, edad	ZAP-70, CD38, estadío Binet, anomalías de cariotipo
Mansouri et al. 2010 ²	148	No determinado	Edad, estadío Rai	TFS OS
Kienle et al. 2010	222	76%		OS
Kaderi et al. 2011	252	No determinado		OS CD38, cariotipo anormales

EFS: supervivencia libre de evento; TFS: supervivencia libre de tratamiento; OS: tiempo de supervivencia; LDT: tiempo de duplicación linfocitaria; LDH: deshidrogenasa láctica

1-También fue determinado el índice *LPL/ADAM29*; 2-Evaluación de LPL a nivel de ARNm y proteína (en el resto de los estudios se estudió solo ARNm); 3-Fue usado lisado de sangre total; 4-Además de mutaciones en *IgVH*

A pesar de los estudios existentes y de su valor pronóstico en la LLC, el rol funcional de LPL en la patogénesis de esta leucemia aún no ha sido dilucidado, así como tampoco los mecanismos moleculares que regulan su expresión.

En lo que respecta a los mecanismos moleculares que regulan la expresión del gen *LPL* resultados obtenidos en esta tesis muestran que la expresión diferencial de esta proteína se encuentra asociada a cambios epigenéticos dependientes del microambiente tumoral. Estos datos apoyan la hipótesis de que la expresión de LPL en la LLC pueda estar asociada al metabolismo lipídico de una célula con una alta tasa de proliferación, así como también a la hipótesis en la cual LPL actúa como un facilitador de cohesión intercelular, ayudando en consecuencia a la proliferación leucémica. Una publicación reciente, aportando información sobre la regulación de *LPL* muestra que el factor de transcripción STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription-3*) activa el promotor de *LPL* (Rozovski et al. 2015). STAT3 transmite las señales de citoquinas y factores de

crecimiento de la membrana celular al núcleo y en LLC se encuentra constitutivamente activado (Hazan-Halevy et al. 2010).

El otro marcador de progresión a nivel de ARNm de importancia fue propuesto por Buhl y col. en 2006, quienes describen la expresión del gen *CLLU1* (CLL upregulated gene 1) (Buhl, Jurlander, Geisler, et al. 2006). Este gen se expresa únicamente en células de LLC y niveles altos de expresión se correlacionan con marcadores de mal pronóstico como genes *IGHV* NM, alta expresión de ZAP-70 y CD38 (Gonzalez et al. 2013). Si bien *CLLU1* no es capaz de predecir de manera independiente la supervivencia del paciente, su análisis ha mostrado ser una medida sensible y específica para detectar células de LLC residuales luego del tratamiento (Buhl et al. 2011). *CLLU1* codifica para 6 ARNm, de los cuales solo 2 potencialmente podrían traducirse a péptidos los cuales tendrían una estructura similar a IL-4 (Buhl et al. 2008). Sin embargo, al presente no se han obtenido datos sobre la posible función que cumple en la célula de LLC la sobre-expresión de esta molécula.

Con el propósito de caracterizar a los pacientes de buen y mal pronóstico se han realizado también estudios de expresión diferencial de microARNs (miRNAs) entre los diferentes perfiles evolutivos de LLC (Calin et al. 2005; Fulci et al. 2007). En particular, el trabajo de Calin y col. determinó la presencia de 13 miRNAs diferencialmente expresados entre pacientes ZAP70^{pos}, NM con mal pronóstico y ZAP70^{neg}, Mut con una enfermedad indolente. A partir de este trabajo numerosos esfuerzos se han realizado con el propósito de identificar nuevos miRNAs. Al presente, el miR-21, miR-29, miR-34a, miR-181b y miR-223 han sido propuestos como marcadores pronósticos de utilidad en la LLC (Marton et al. 2008; Pekarsky et al. 2006; Rossi et al. 2010; Stamatopoulos et al. 2009; Zenz et al. 2009).

1.3 Proteínas del suero como marcadores pronóstico de la LLC

La mayoría de los marcadores disponibles del suero pueden ser fácilmente medibles y proveen de una información útil para el pronóstico, aunque en algunos casos no son específicos de LLC. Tanto

la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), β 2-microglobulina y la timidina quinasa, son proteínas que se han visto incrementadas en el suero de pacientes de LLC con estadios clínicos agresivos y han mostrado ser útiles como marcadores pronósticos (Fasola et al. 1984; Hallek et al. 1996; Berrebi et al. 2010; Szánthó et al. 2014).

Si bien con el correr de los años siguen surgiendo nuevas moléculas propuestas como marcadores, los más utilizados al momento siguen siendo: la expresión anómala en el linfocito B de ZAP-70, (Crespo et al. 2003), CD38 (Lanham et al. 2003), *LPL* (Heintel et al. 2005) y *CLLU1* (Buhl, Jurlander, Jørgensen, et al. 2006), así como el estudio de ciertas alteraciones cromosómicas asociadas a la progresión y refractoriedad en el tratamiento como las deleciones 11q y 17p. A modo de resumen podemos decir que al día de hoy en la LLC se considera que no hay un único marcador de progresión sino que la determinación de varios de ellos es el método más seguro para aumentar la posibilidad de obtener una predicción evolutiva del paciente lo más acertada posible.

1.1.5 Tratamiento en la LLC

Es importante destacar que los marcadores pronósticos mencionados anteriormente son importantes para predecir el curso de la evolución clínica, y deberían ayudar a la decisión de tratar o no tratar a un paciente. Los parámetros principales considerados para incluir o no al paciente en un protocolo terapéutico son el estadio de la enfermedad, la salud general del paciente, marcadores genéticos de alto riesgo y el tipo de terapia recibida durante el transcurso de la enfermedad (primera vs segunda línea de tratamiento, respuesta vs no respuesta de la última terapia (Hallek 2013).

En general, pacientes asintomáticos que debutan con estadio A de Binet o 0 de Rai, son monitoreados sin terapia. Por otro lado, pacientes con estadios intermedios y de alto riesgo (B y C de Binet o III y IV de Rai) generalmente se ven beneficiados con el tratamiento. Algunos de los

pacientes con estadios intermedios son monitoreados sin terapia hasta que manifiestan síntomas o una progresiva o activa enfermedad definida por la guía del iwCLL (Hallek et al. 2008).

Los tratamientos disponibles se pueden dividir en tres grandes grupos, **1- agentes simples, 2- anticuerpos monoclonales y 3- Inhibidores de quinasas.**

1-Agentes simples

La monoterapia con agentes alquilantes ha servido como la primera línea para la terapia de pacientes de LLC. El clorambucil fue considerado el "gold standard" por varias décadas (CLL Trialists' Collaborative Group 1999). A nivel celular reacciona con las bases nitrogenadas del ADN y da lugar a la formación de puentes inter e intracatenarios, alterando las funciones normales del ADN y llevando a la muerte celular (Begleiter et al. 1996). Sus mayores desventajas son su casi inexistente remisión completa y algunos efectos que ocurren cuando se usa por períodos prolongados como citopenias, mielodisplasia y hasta un posible desarrollo de leucemias aguda (Hallek 2013).

Otro agente simple que se utilizan son el agente alquilante Bendamustina y los análogos de purinas como fludarabina, pentostatina o la cladribina. La fludarabina induce más remisiones (7-40%) que otras quimioterapias convencionales (Johnson et al. 1996; Leporrier et al. 2001; Rai et al. 2000).

2-Anticuerpos monoclonales

Con el propósito de eliminar el clon tumoral se han desarrollado anticuerpos específicos contra moléculas claves como el Ag de linfocitos B CD20. La proteína CD20 es una glico-fosfoproteína que se expresa en la superficie de células pre B, linfocitos B maduros normales y tumorales. Debido a que se expresa en la mayoría de los tumores de células B, se han diseñado numerosos anticuerpos recombinantes anti-CD20 (Hagemeister 2010; Walshe et al. 2008). Al presente los anticuerpos recombinantes más utilizados en la clínica hematológica son el Rituximab, el Ofatumumab y el Obinutuzumab.

El Rituximab es un anticuerpo quimérico de isotipo IgG1 y ha sido uno de los primeros en ser probados en ensayos clínicos en LLC. Se ha visto que la utilización del mismo es más eficiente en combinación con quimioterapia que cuando se lo utiliza sólo. Además, se ha evidenciado que ciertos pacientes de LLC tratados con Rituximab junto con ciclofosfamida y fludarabina (FCR) presentan remisiones completas con una mayor sobrevida (Bryan & Borthakur 2010). Debido a estos resultados la FDA ("Food and Drug Administration") de Estados Unidos aprobó el uso de FCR como el tratamiento de primera línea y la técnica "gold standart" en pacientes con LLC.

El último anticuerpo anti-CD20 desarrollado y aprobado por varios países es llamado Obinutuzumab (GA-101). En este caso es un anticuerpo derivado del Rituximab, que se encuentra completamente humanizado y que además presenta una modificación en la cadena de azúcares en los dominios constantes de la Ig. Esta modificación contribuye a una mayor afinidad de unión por los receptores humanos $Fc\gamma RIII$, lo que resulta en una mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (*Antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) y apoptosis independiente de caspasas (Goede et al, 2012).

Para el tratamiento de LLC también se han usado anticuerpos monoclonales contra otros Ags, como por ejemplo el Alemtuzumab (Camphath-1H) el cual reconoce el Ag CD52 (Hale et al. 1990). A pesar de que este anticuerpo monoclonal es comúnmente usado como tratamiento de primera línea para la LLC, se han evidenciado en ciertos pacientes efectos adversos importantes. Debido a todo esto el uso del Alemtuzumab es considerado una opción terapéutica para pacientes con mal pronóstico que no responden al clásico tratamiento de FCR.

3- Inhibidores de quinasas

El BCR forma parte de la vía de traducción de señales esenciales para la sobrevida y proliferación de linfocitos B maduros. Dada su importancia, el diseño de nuevas drogas ha estado enfocado en inhibir la vía de señalización del BCR con el propósito de inducir la muerte del clon tumoral (Fig. 4). El Fostamatinib ha sido diseñado en esta línea de pensamiento y está dirigido hacia la inhibición de la tirosina-quinasa del bazo (*spleen tyrosine kinase*, Syk). Esta proteína se encuentra

sobre-expresada en células de pacientes LLC y su inhibición induce apoptosis por disrupción de la vía de señalización del BCR (revisado en (Hallek 2013)).

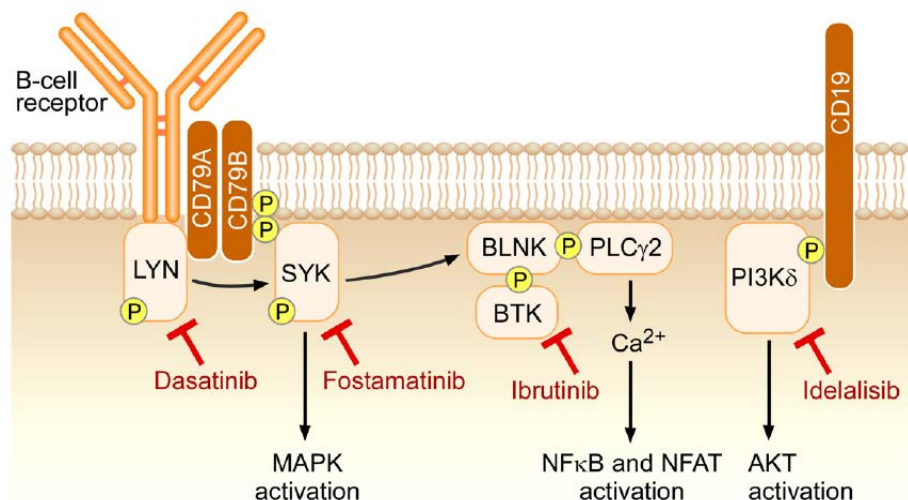


Figura 4- Señalización por el BCR y su inhibición. El receptor de la célula B (BCR) es la inmunoglobulina de superficie y transduce la señalización antigénica a través de los co-receptores CD79A y CE79B a quinasas próximas, incluyendo LYN y SYK. El adaptador BLNK está involucrado en la activación de la quinasa BTK, PLCγ2 y PI3Kδ. La activación de SYK lleva a la activación de quinasas MAP. PLCγ2 es crucial para la movilización de Ca²⁺ y la subsecuente activación de NFκB y NFAT y la activación de PI3Kδ provoca la activación de AKT. Se ha podido interferir la función de la vía de señalización por el BCR con inhibidores de LYN (ej. Dasatinib), SYK (ej. Fostamatinib), BTK (ej. Ibrutinib) y PI3Kδ (ej. Idelalisib). Imágen extraída de (ten Hacken & Burger 2014)

Otra de las drogas que se está evaluando en LLC es el Ibrutinib, un inhibidor específico de la Bruton tirosin-quinasa (BTK) (Figura 4). La BTK permite la activación las vías NFκB y MAPK vía la familia de proteínas quinasas Src estimulando el desarrollo, supervivencia y migración celular (Herman et al. 2011).

El Dasatinib es otro inhibidor de tirosina-quinasa, desarrollado como un inhibidor de segunda generación de la quinasa oncogénica BCR-ABL (Lombardo et al. 2004). Dasatinib también inhibe LYN, BTK y una variedad de otras quinasas. En ensayos clínicos se han observado tasas de respuesta relativamente bajas (Amrein et al. 2011; Kater et al. 2014) en comparación con inhibidores de quinasas dirigidos a BTK, SYK o PI3K, posiblemente debido al hecho de que *in vivo* LYN es capaz de funcionar como un regulador negativo del BCR (Hibbs et al. 1995).

Finalmente uno de los inhibidores más estudiados es el Idelalisib o CAL-101 (*class 1 fosfatidil inositol 3-quinasa*) el cual inhibe la isoforma δ de la PI3K (Figura 4). La PI3K integra y trasmite señales de diferentes moléculas de superficie, como el BCR (Srinivasan et al. 2009), receptores de quimioquinas y moléculas de adhesión, de esta manera regula las funciones celulares como el crecimiento celular, la supervivencia y migración (Okkenhaug & Vanhaesebroeck 2003).

A pesar de los grandes avances en el tema, y probablemente debido a la alta heterogeneidad biológica de la LLC una gran cantidad de los pacientes recaen en el correr del tiempo. Incluso, alguno de ellos no generan ningún tipo de respuesta frente al tratamiento. Por esta razón, los investigadores se han centrado en lograr identificar marcadores predictivos frente a determinado tipo de terapia. Predecir grupos de pacientes que responden a una determinada terapia puede ser útil para evitar toxicidad innecesaria dada por el tratamiento.

1.2.0 La biología del linfocito B de la LLC y su microambiente

Los linfocitos de LLC son células pequeñas que co-expresan el antígeno CD5 propio de células T y los antígenos (Ags) de superficie CD19, CD20 y CD23 característicos de una célula B. Esta célula leucémica tiene la particularidad de presentar una débil expresión de inmunoglobulinas (Igs) de superficie y de los Ags de superficie CD20, CD22 y CD79b en comparación con una célula B normal. Las Igs de superficie son IgM e IgD independientemente del estado mutacional de sus genes V_H (Oppezco et al. 2002). Solo en ciertos casos se encuentran células que hayan realizado el proceso de cambio de clase (Fais et al. 1996; Oppezco et al. 2002). Las células de LLC también expresan los Ags HLA de clase I y II y frecuentemente CD18, CD27, CD32, CD37, CD39, CD40, CD44, CD45RA y CDw75, mientras que otros Ags característicos del linfocito B como FMC7 y CD10 no están presentes.

1.2.1 El receptor de la célula B en la LLC

Una de las principales características del linfocito B leucémicos es la baja expresión de su BCR. Esta molécula es un complejo multimérico formado por la Ig y el heterodímero Ig α /Ig β (CD79a/CD79b) anclados en la membrana celular. La unión del Ag al complejo desencadena una activación de la vía de traducción de señales mediada por tirosin-quinazas de la familia Src. En linfocitos normales, la vía del BCR es usada para promover la proliferación celular e inducir la producción de anticuerpos. Una vez que la Ig reconoce y se une al Ag específico, el complejo activado recluta quinasas como SYK y LYN las cuales fosforilan dominios de las proteínas Ig α /Ig β llamados ITAMS ("immunoreceptor tyrosine – based motifs receptors") (Wang et al. 2013). La fosforilación de estos motivos induce una cascada de señalización río abajo activando diferentes quinasas como BTK o PI3K (Longo et al. 2007), protein quinasa C, mTOR ("mammalian target of rapamycin") y MAP/ERK (Davids & Brown 2012). Debido a que la estimulación del BCR promueve la supervivencia y proliferación activando el NF κ B (Wang et al. 2013) es que la mayoría de los nuevos blancos terapéuticos están enfocados a inhibir cascadas de señalización celular como las mencionados anteriormente (fosfamatínib, ibrutinib e idelalisib) (Burger 2012) (Fig.4).

1.2.2 El linfocito B de la LLC presenta inhibida la apoptosis *in vivo* pero muere *in vitro*

La célula B de la LLC presenta un defecto en el proceso de muerte celular programada, lo que lleva a la acumulación progresiva de linfocitos B clonales que permanecen bloqueados en las fases iniciales del ciclo celular (G0/G1). La mayoría de los pacientes con LLC presentan elevados niveles de p27kip1 (p27), regulador negativo del ciclo celular (Vrhovac et al. 1998). Dado las funciones claves que tiene p27 en la regulación del ciclo celular, su sobre-expresión podría contribuir a la acumulación de células B en las etapas tempranas del ciclo. Más aún, se ha postulado que la supervivencia de células B de LLC también puede estar dada por la sobre-expresión anómala de la familia de proteínas anti-apoptóticas Bcl2 y Mcl1 (Krajewski et al. 1995). Otros

miembros de la familia Bcl2, como Bcl-xL y BAG1 también se encuentran sobre-expresados en linfocitos B de LLC mientras que proteínas pro-apoptóticas, como Bax y Bcl-xS se encuentran reprimidas (Caligaris-Cappio & Hamblin 1999).

Por otro lado, también se ha determinado que los miRNAs pueden contribuir a la regulación del ciclo celular reprimiendo genes relacionados con la supervivencia. Los primeros trabajos en esta área llevados a cabo por el grupo de Croce muestran diferencias significativas en la expresión de miRNAs entre células B de LLC y las células B normales CD5 positivas. Lo más relevante en el contexto de la resistencia a la apoptosis por el linfocito B leucémico está dado en los pacientes que presentan la delección 13q. Las células B que presentan esta delección son incapaces de sintetizar los miRNAs 15a y 16-1 (Calin et al. 2004). Debido a que en células B normales dichos miRNAs regulan la expresión de Bcl-2, los autores proponen que la sobre-expresión de Bcl2 en pacientes de LLC podría estar dada por la ausencia de los miR-15a y miR-16-1. Estas observaciones establecen a la familia de proteínas anti-apoptóticas Bcl2 como moléculas claves en la supervivencia celular de pacientes de LLC (Cimmino et al. 2005).

En contraste a lo que ocurre *in vivo*, los linfocitos B de LLC rápidamente mueren por apoptosis cuando se los cultiva *in vitro* en ausencia de células accesorias, indicando que el microambiente celular juega un rol esencial en la supervivencia de las células de LLC (Caligaris-Cappio 2003). Estas observaciones hacen pensar que la interacción con el microambiente celular, especialmente con células estromales de la médula ósea, células T activadas ($CD3^{pos}CD4^{pos}$ y $CD40L^{pos}$) y células dendríticas foliculares podrían ser las responsables de mantener el defecto en la apoptosis y de aumentar la supervivencia de las células tumorales (Ghia et al. 2008). Por lo tanto, la exposición de clones malignos a estímulos del microambiente puede resultar en un incremento de la proliferación y la aparición de nuevas aberraciones genéticas que llevan a una enfermedad más agresiva.

Los procesos fisiológicos durante los cuales las células B encuentran el Ag ocurren en microambientes especializados llamados centros germinales (CG). Los CG son estructuras dinámicas que se forman en los órganos linfoides secundarios capaces de generar microambientes especializados donde las células T junto con diferentes tipos de células adherentes o estromales envían señales de supervivencia a los linfocitos B.

En LLC el compartimiento proliferativo se encuentra representado en agregados locales de prolinfocitos y parainmunoblastos proliferantes que forman los pseudofolículos o centros proliferantes (CPs) (Lennert et al. 1978). Los pseudofolículos son estructuras histológicas claves en los nódulos linfáticos, pulpa blanca del bazo y médula ósea donde se encuentran infiltrados de células B de LLC. La interacción de estas células con las células T, células estromales o dendríticas foliculares activan cascadas de señalización que permiten la expresión de marcadores de proliferación (Ki-67) y de progresión de la enfermedad (CD38 y CD49d) (Gattei et al. 2008; Patten et al. 2008).

1.2.3 Rol de las células T, de las células estromales y de las células dendríticas diferenciadas ("nurse like cells") en la activación del clon leucémico

1.2.3.1 Las citoquinas en el "homing" del linfocito B leucémico

El patrón de infiltración en los tejidos puede ser variable en los diferentes pacientes de LLC. En general, la mayoría de las células malignas se encuentran en SP y médula ósea, aunque algunos pacientes presentan también los nódulos linfáticos comprometidos. Esta observación clínica resalta la existencia de mecanismos que regulan la migración linfocitaria del clon tumoral. Las quimioquinas, moléculas quimioatrayentes, y sus receptores forman parte del mecanismo de tráfico linfocitaria en el organismo. Recientemente se ha determinado que las células de LLC expresan un grupo específico de quimioquinas y receptores de quimioquinas en respuesta a señales del microambiente (Burger 2010). Debido a sus funciones, las quimioquinas han sido asociadas a una variedad de procesos patológicos. En particular durante la tumorigénesis, las quimioquinas contribuyen a la infiltración de células hematopoyéticas a los tejidos así como a la neovascularización, contribuyendo con la distribución del tumor (Burger 2010).

La distribución de las células B en los nódulos linfáticos está determinada por la expresión de CXCR4 y CXCR5, receptores de las quimioquinas CXCL12 y CXCL13 expresadas por las células estromales. A su vez, las células estromales de la médula ósea secretan CXCL9, 10, 11, 12 y 13 y

CCL19 y 21 que se unen a los receptores CXCR3, CXCR4 y CXCR5 diferentemente expresados por el clon leucémico (Davids & Burger 2012). Las quimioquinas entonces juegan un rol importante en lo que respecta a la sobrevida dado que favorece la migración de los linfocitos de la sangre a los tejidos linfoides permitiendo que reciban las señales de sobrevida y proliferación.

La importancia de las quimioquinas en LLC en relación a la sobrevida del clon tumoral también se ha evidenciado en el trabajo de Zucchetto y col. en el cual estudiaron el perfil de expresión diferencial entre células B de LLC CD38^{pos}/CD49d^{pos} y CD38^{neg}/CD49d^{neg}. En este trabajo determinaron que CCL3 induce la migración de los monocitos e infiltración de los macrófagos en médula ósea de pacientes de LLC CD38^{pos}/CD49d^{pos}. A partir de estos resultados los autores propusieron que las quimioquinas CCL3 y CCL4 producidas por células B de LLC son reconocidas por receptores de monocitos/macrófagos y así reclutados al microambiente tumoral (Zucchetto et al. 2009). Resaltando la importancia de estas quimioquinas en la progresión tumoral, Sivina y col. han propuesto a CCL3 como un nuevo marcador pronóstico, sugiriendo que su evaluación podría ser útil para conocer la evolución clínica de pacientes de LLC (Sivina et al. 2011).

En las siguientes secciones analizaremos el rol de las células que interaccionan con el clon tumoral leucémico en llevar a la progresión de la enfermedad (Fig. 5).

1.2.3.2 Rol de las células T en el microambiente leucémico

Es importante destacar que las células T juegan un rol importante en la inhibición de la apoptosis y progresión de la enfermedad de las células B malignas (Ghia et al, 2008). Numerosos trabajos sugieren la existencia de un diálogo bidireccional entre las células B de LLC y las células T CD4^{pos}, mediado por moléculas de adhesión y quimioquinas que inducen la expresión de varias citoquinas en ambos tipos de células (revisado en (Caligaris-Cappio, 2003)). Las células T expresan interleuquina 4 (IL4), interferón γ (INF γ) e interleuquina 2 (IL2), capaces de inhibir la apoptosis de las células B de LLC induciendo la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl2 (Caligaris-Cappio 2003).

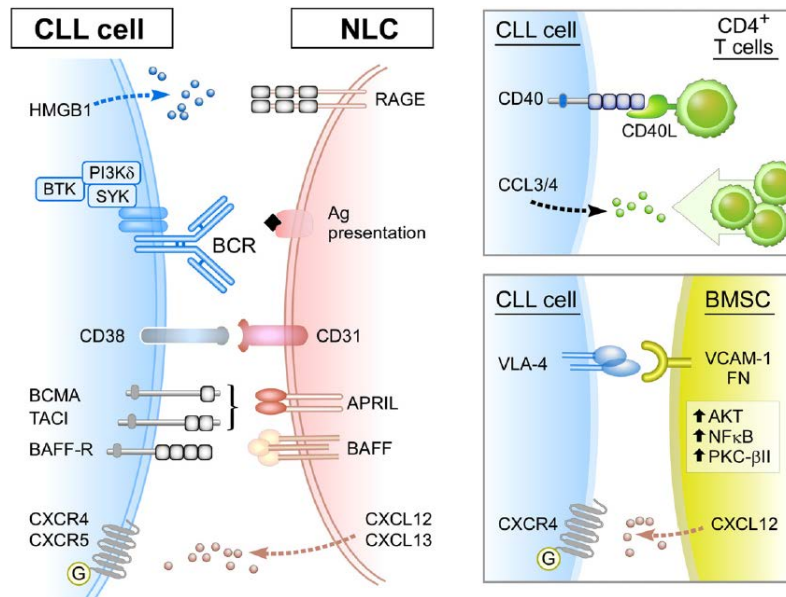


Figura 5. Interacciones entre las células de LLC y las células tipo “Nurse like cells” (NLC), células estromales de la médula ósea (Bone marrow estromal cells, BMSC) y células T CD4⁺. Imagen extraída de ten Hacken et al. 2014.

La unión de CD40-CD40L desencadena una vía de traducción de señales que permite la activación de factores de transcripción NFκB/Rel, así como ciertas vías de señalización JAK-STAT formadas por quinasas Janus (JAK3) y las proteínas traductores de señales y activadores de la transcripción (STAT3). La vía JAK3-STAT3 induce la expresión de altos niveles de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-xL y Mcl1 (De Toter et al. 2006), mientras que la activación de NFκB permite la activación de TP63 que a través de la proteína CD49d facilita la migración de las células B leucémicas (Shachar & Haran 2011). Además de la activación de estas vías, la interacción CD40-CD40L puede inducir la expresión de proteínas inhibitoras de la apoptosis como es la survivina, un miembro de la familia de proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAP) (Granziero et al. 2001). A pesar de la existencia de datos mostrando la importancia de las señales recibidas a través de la vía CD40L en el clon leucémico, resultados del grupo de Gribben sugieren la existencia de linfocitos T defectuosos en pacientes con leucemia. Análisis de la expresión génica de linfocitos T

de pacientes con LLC muestran importantes defectos funcionales a pesar de que se ha evidenciado un aumento del número absoluto de linfocitos T en sangre (Burger & Gribben 2014). Además, presentan alteraciones en varios genes relacionados a la formación del citoesqueleto que pueden interferir directamente con la formación de la sinapsis inmunológica (Görgün et al. 2005). Un dato de interés a resaltar es que, dichos cambios han sido observados en células T de donantes sanos co-cultivadas con células de LLC, lo cual indica que las modificaciones estarían inducidas por las propias células leucémicas.

1.2.3.3 Rol de las células estromales y “nurse like cells” en el microambiente leucémico

Se ha demostrado que un contacto directo entre las células estromales de la médula ósea y las células leucémicas aumenta la supervivencia de las células de LLC (Lagneaux et al. 1998). La adhesión a través de la integrina VLA-4 (*very late antigen 4*) con su ligando VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) presente en las células estromales de la médula ósea (Lagneaux et al. 1998) favorece las interacciones entre las células de LLC y el estroma y la subsiguiente desregulación de la proteína anti-apoptótica Mcl1 (*myeloid cell leukemia 1*) (Kurtova et al. 2009) y el proto-oncogen TCL1 (*T-cell leukemia/lymphoma 1*) (Sivina et al. 2012). Por otra parte, la quimioquina CXCL12 secretada por las células estromales de la médula y su interacción con su receptor CXCR4 presente en la célula de LLC está involucrada en el tráfico y “homing” de las células de LLC (Burger et al. 1999). Las células de LLC a su vez, pueden activar las células estromales con las cuales entran en contacto a través de la inducción de la proteína quinasa C beta II (PKC β II) y subsecuente activación de la vía NF κ B (Lutzny et al. 2013).

Otro componente crucial del microambiente en la LLC son las células adherentes de tipo “nurse like cells” (NLC). Se ha determinado, como a partir de células de SP de pacientes con LLC pueden diferenciarse *in vitro* células NLC que presentan la capacidad de secretar las quimioquinas CXCL12 (Burger et al. 2000) y CXCL13 (Bürkle & Niedermeier 2007), las cuales atraen a las células de LLC al microambiente. Además de secretar estas quimioquinas y activar la señalización por el BCR en las células de LLC (Burger et al. 1999) las células NLC son capaces de secretar el factor de necrosis tumoral APRIL (“a proliferation inducing ligand”, APRIL) así como también BAFF (“B-cell activation factor”, BAFF). Ambos ligandos tienen la capacidad de proteger al clon leucémico de la apoptosis

(Cols et al. 2012). Las células estromales y las NLC tienen actividad anti-apoptótica y la combinación de estos dos tipos de células genera un ambiente celular que contribuye a la supervivencia de las células leucémicas de LLC (Ramsay & Rodríguez-Justo 2013).

1.2.3.4 Otras señales recibidas por el clon leucémico

Estudios recientes muestran que no sólo las señales enviadas por las células estromales y células T parecen ser esenciales para el diálogo entre el microambiente y las células leucémicas. En este sentido, un trabajo de Seiffert y col. mostró que los monocitos en presencia de células B de LLC incrementan la expresión de CD14 soluble. Esta molécula se encuentra directamente relacionada con la inducción de la activación del NFκB en las células B de LLC, favoreciendo su supervivencia y proliferación (Seiffert et al. 2010).

Las células leucémicas no sólo están expuestas a señales de las células accesorias no malignas en los órganos linfoides, sino que son capaces de censurar la presencia de patógenos mediante receptores de patrones moleculares asociados a patógenos. Los "Toll like receptors" o TLRs 7 y 9 son capaces de reconocer simple hebra de ARN o ADN respectivamente. En este sentido Decker y col. describieron que estímulos *in vitro* de células B de LLC con análogos de ADN bacteriano (oligonucleótidos CpG) inducen la expresión de proteínas que regulan el ciclo celular como la ciclina D2, D3 y bajan la expresión del regulador negativo del ciclo celular p27 (Decker et al. 2002).

Por otra parte, las células de LLC también son capaces de enviar señales a su entorno a través de la liberación de microvesículas, las cuales están enriquecidas en proteínas activadoras de vías de señalización, siendo capaces de activar la vía AKT en células estromales de la médula ósea estimulando la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), un factor de supervivencia para la LLC (Ghosh et al. 2010). La proteína de membrana citoplasmática LCP1 (*lymphocyte cytosolic protein 1*) también se ha encontrado enriquecida en las microvesículas de pacientes de LLC y está involucrada en la quimiotaxis mediada por CXCL12 y en el "homing" a la médula ósea *in vivo* (Dubovsky et al. 2013).

Toda la información detallada anteriormente propone la presencia de una conexión entre factores del microambiente y el dilema de la proliferación y apoptosis de las células B de LLC. En la actualidad la mayor parte de los trabajos en el área muestran a esta leucemia como una enfermedad hematológica maligna cuya evolución es totalmente dependiente del microambiente. Esta idea va de la mano con un modelo de heterogeneidad de la LLC en donde existe una sobrevida selectiva de ciertos sub-miembros clonales los cuales podrían recibir señales de sobrevida en estos ambientes especializados de los órganos linfoides.

1.3.0 Poblaciones proliferantes en la LLC y su asociación con la progresión tumoral

1.3.1 El linfocito B leucémico puede proliferar

La importancia del microambiente inmunológico en generar señales que contribuyen a la sobrevida y proliferación de las células B leucémicas permitió postular una interesante hipótesis en la cual se contempló la existencia de dos tipos de poblaciones dentro del clon tumoral de un paciente con LLC. La primera, es la población mayoritaria, con características de una célula B quiescente y no proliferante que lleva a la acumulación linfocitaria típica de esta leucemia. La segunda, claramente minoritaria (0,1 a 1% aproximadamente), la cual mantienen interacciones con el microambiente celular que determinan una alta proliferación celular así como la sobre-expresión de numerosos marcadores moleculares de agresividad tumoral (Caligaris-Cappio 2003; Deaglio & Malavasi 2009; Burger et al. 2009).

Esta hipótesis fue confirmada cuando Messmer y col. realizando marcados radioactivos de las células tumorales *in vivo* mostraron que los linfocitos B de LLC eran capaces de multiplicarse y morir. Estos resultados sugieren por primera vez en la historia de la biología de la LLC, que esta leucemia no es solo una enfermedad estática resultado de la acumulación de linfocitos B, sino también una enfermedad dinámica en donde el equilibrio de estas dos poblaciones pueden definir la evolución tumoral (Messmer et al. 2005). Apoyando esta hipótesis, los resultados

muestran que existe una correlación entre la tasa de nacimiento y muerte celular con la actividad y progresión de la enfermedad. Por lo tanto, al presente se propone que estudiar la tasa de división y muerte celular puede ayudar a identificar pacientes con una LLC más agresiva (Chiorazzi et al. 2005).

Al día de hoy, diferentes grupos de investigación han estudiado distintas sub-poblaciones proliferantes relacionadas con la progresión y el mal pronóstico (revisado en (Palacios et al. 2012) Anexo III). En el 2007, Damle y col. proponen que el sub-grupo de células B de LLC expresando CD38 y el marcador de proliferación Ki-67 es una sub-población proliferante dentro del clon tumoral de LLC y está asociada a un mal pronóstico (Damle et al. 2007). En un trabajo realizado por nuestro grupo, se describe una segunda población proliferante correspondiente a un sub-grupo de células B que con un activo proceso de cambio de clase (CC) sobre-expresan la enzima citidina deaminasa inducida por activación (AID, por *Activation Induced Cytidine Deaminase*). Esta sub-población tumoral es encontrada principalmente en pacientes NM, con una alta progresión de la enfermedad (Palacios et al. 2010). Posteriormente, Calissano y col. propone un modelo donde la sub-población tumoral proliferante expresa altos niveles de CD5 y baja expresión del receptor de quimioquinas CXCR4. Esta expresión diferencial colabora con el "homing" de linfocitos B hacia el nódulo linfático y explica como las células proliferantes reciben sus señales de sobrevivencia (Calissano et al. 2011). En un trabajo publicado recientemente, se describe como dentro de las células proliferantes CXCR4^{low}CD5^{high} descritas por Calissano y col. aquellas que son CD86^{pos} constituyen una población proliferante que recientemente ha emigrado de un nicho linfoide y presentan la mayor diversidad genética sub-clonal. Característica que favorecen la evolución hacia formas más agresivas de la enfermedad (Huemer et al. 2014).

1.3.2 Distintas poblaciones proliferantes dentro del clon tumoral y su asociación con la progresión de la LLC

1.3.2.1 Población proliferante CD38^{pos} en células B de LLC

La expresión de CD38 y su asociación con la evolución de la enfermedad ha sido intensamente estudiada durante el correr de los años. Se ha demostrado que células B CD38^{pos} responden mejor a las señales del BCR y se caracterizan por una mejor migración. Estudios *in vitro* en el mismo sentido muestran que la activación de CD38 lleva a la proliferación y quimiotaxis de células B de LLC a través de ZAP-70 y la vía de señalización ERK1/2. La interacción de CD38 con su receptor CD31 *in vivo*, tiene un rol importante en la interacción célula-célula activando señales de sobrevivencia tanto en células normales como leucémicas (Malavasi et al. 2008). Con el propósito de profundizar en el área Pepper y col. extendieron estas observaciones comparando el perfil de expresión génica de células B de LLC CD38^{pos} con CD38^{neg} de cada paciente. Los resultados mostraron que existe un perfil de expresión diferencial entre ambas poblaciones CD38^{pos} vs CD38^{neg}. Mediante este estudio determinaron que las células CD38^{pos} sobre-expresan el factor de crecimiento endotelial (VEGF), el cual se encuentra directamente asociado con un incremento de la expresión de la proteína anti-apoptótica Mcl1 (Pepper et al. 2007). Estos resultados sugirieron que los miembros del clon CD38^{pos} se encuentran más activados y propensos a entrar al ciclo celular en comparación con su contrapartida CD38^{neg} (Pepper et al. 2007).

Sin embargo, estudios del mismo laboratorio fallaron en establecer una correlación fuerte entre el porcentaje de células B de LLC proliferantes CD38^{pos} con la sobrevivencia y la progresión de la enfermedad (Calissano et al. 2009). Se determinó que el hecho de que existe un gran porcentaje de células CD38^{pos} en pacientes de mal pronóstico NM, indica que las células leucémicas CD38^{pos} constituyen una población heterogénea. Donde una pequeña fracción de estas células CD38^{pos} presentan un incremento en el potencial proliferativo. A su vez, recordando los resultados de Messmer donde demostró que las células leucémicas proliferantes constituyen entre 0,1% a 1%

del clon tumoral (Messmer et al. 2005), se sugiere que no todas las células CD38^{pos} son las proliferantes.

1.3.2.2 Población proliferante CXCR4^{low}CD5^{high} en células B de LLC

Calissano y col. estudiaron la complejidad dentro del clon tumor de LLC, midiendo *in vivo* la cinética de división celular del linfocito B leucémico mediante la cuantificación de la incorporación de deuterio (²H) en el ADN neo-sintetizado en células en división (Calissano et al. 2011). Por otra parte, seleccionaron clones que presentaban diferente densidad de expresión de los marcadores de superficie celular CD5, molécula sobre-expresada luego de la activación de la célula B normal, y CXCR4, receptor involucrado en mantener el contacto entre la célula B y las células estromales en los órganos linfoides secundarios. De esta manera determinaron que a las células CXCR4^{low}CD5^{high} contienen la mayor cantidad de deuterio, indicando que estas células se dividieron recientemente y definiendo esta fracción como proliferante. Por otra parte, a las células CXCR4^{high}CD5^{low} y con menor cantidad de ²H las definieron como la fracción quiescente. Aislaron estas dos poblaciones y estudiaron su perfil de expresión génica en nueve pacientes. Los resultados mostraron que la fracción proliferante presenta una sobre-expresión de genes relacionados con la proliferación celular, anti-apoptosis y genes involucrados en el daño oxidativo en comparación con las células quiescente.

Este estudio de la complejidad de células dentro del clon tumoral sugiere un modelo sobre la biología celular de la LLC. En este trabajo se propone que el clon leucémico contiene un espectro de células que van desde la fracción proliferante, enriquecida en células recientemente divididas que han emigrado del nódulo linfático, hasta la fracción quiescente, que se encuentra enriquecida con células más viejas y menos vitales que necesitan migrar hacia los nódulos linfáticos para recibir señales de supervivencia o directamente morir (Fig. 6) (Calissano et al. 2011). Este trabajo resalta una vez más la importancia del microambiente celular en mantener la supervivencia del clon tumoral y propone una interesante explicación a la heterogeneidad encontrada en la LLC.

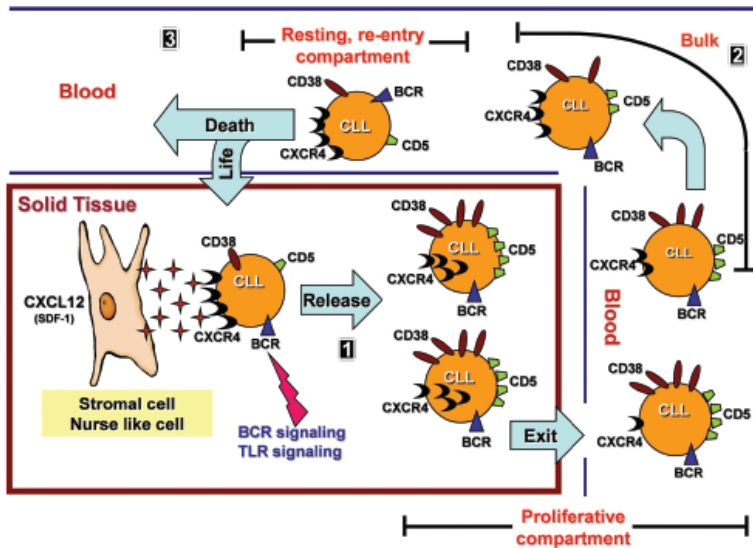


Figura 6. Modelo hipotético del ciclo de vida de la célula B de LLC. (1) Las células B de LLC son activadas a través del BCR o TLRs en el microambiente tumoral dentro de los órganos linfoides secundarios (nódulo, bazo). Se dividen y aumentan la expresión de CD5, internalizan CXCR4 y salen del nódulo. La baja expresión de CXCR4 favorece a las células recientemente divididas ($CXCR4^{low}CD5^{high}$) a salir del tejido sólido y alcanzar la SP. (2) Las células recientemente divididas alcanzan la sangre como $CXCR4^{low}CD5^{high}$. Conforme pasa el tiempo, posiblemente debido a la

ausencia de señales del microambiente inmunogénico, las células comienzan a re-expresar CXCR4 para volver a los órganos linfoides secundarios. Esto hace que podamos identificar un fenotipo con una expresión intermedia de ambos marcadores, $CXCR4^{int}CD5^{int}$ y luego linfocitos B $CXCR4^{high}CD5^{low}$. (3) Las células B de LLC que presentan $CXCR4^{high}CD5^{low}$ tienen una alta capacidad de detectar y reconocer un gradiente de CXCL12 y de esta manera re-entrar a los tejidos linfoides y recibir señales de supervivencia. Aquellas células que no son capaces de entrar al tejido linfoides mueren por agotamiento (extraído de (Calissano et al. 2011)).

1.3.2.3 Población proliferante AID^{pos} y con un proceso activo de Cambio de Clase en LLC

Un trabajo reciente de nuestro grupo muestra la importancia de otra sub-población dentro del clon tumoral de la LLC, que se caracteriza por la expresión anómala de la enzima AID (Palacios et al. 2010). Esta proteína es propia de la célula B, inducida principalmente a través del contacto entre células T y B vía interacción CD40L-CD40, sin bien hay trabajos que muestran que la respuesta inmune innata vía receptores TLR es capaz de disparar su expresión (Glaum et al. 2009). La expresión fisiológica de esta enzima es responsable de los procesos de hipermutación somática (HMS) y de cambio de clase (CC) de los anticuerpos en el linfocito B (Kinoshita et al. 2001). Si bien AID es una enzima de vital importancia en el desarrollo del sistema inmune, debido a su acción mutagénica presenta también un “lado oscuro” (de Yébenes & Ramiro 2006; Kinoshita

& Nonaka 2006) que la relaciona a la presencia de translocaciones y generación de linfomas (Pérez-Durán et al. 2007).

En la LLC, Oppezzo y col. describieron que la enzima AID se expresa de forma anómala en células leucémicas encontradas en sangre periférica en algunos pacientes con genes *IGHV* NM, activo cambio de clase y mal pronóstico (Oppezzo et al. 2005). Si bien esta enzima es responsable del proceso de HMS, contrariamente a lo esperado, aquellos pacientes con sobre-expresión de AID funcional, son incapaces de mutar sus genes *IGHV* (Oppezzo et al. 2003). Sin bien el proceso de CC clonal en las células B de LLC fue descrito tiempo atrás (Kimby et al. n.d.; Stoecker et al. 1989), trabajos posteriores mostraron que este proceso ocurre principalmente en pacientes con un perfil NM de sus genes *IGHV* (Oppezzo et al. 2003; Efremov et al. 1996).

Teniendo en cuenta que la expresión de AID está asociada con un activo CC en pacientes NM, nuestro grupo investigó la relación entre la expresión de AID, el proceso de CC y la activación por parte del microambiente en las células en SP de pacientes de LLC con diferentes perfiles clínicos.

En este trabajo se determinó que la expresión de AID se encuentra mayormente restringida a la sub-población de linfocitos B con un activo proceso de CC ($IgM^{pos}IgG^{pos}$ e IgG^{pos}) en pacientes NM y de mal pronóstico. Interesantemente, se observó que la sub-población de linfocitos B AID^{pos} sobre-expresa moléculas relacionadas con la proliferación y anti-apoptosis. En particular, en comparación con su contraparte del clon tumoral $AID^{neg} IgM^{pos}$, presenta una sobre-expresión del Ag nuclear Ki-67, del oncogen c-myc y de la proteína anti-apoptótica Bcl2, así como una disminución del regulador negativo del ciclo celular p27. Estos resultados constituyen una evidencia de que estas células poseen características de células en activa proliferación. Además, se observó que la sub-población AID^{pos} expresa moléculas relacionadas con la interacción con el microambiente en centros proliferantes y la migración de linfocitos, como son CD49d y las quimioquinas CCL3 y CCL4. Esto datos estarían sugiriendo que esta sub-población de células tumorales ha estado en contacto reciente con un microambiente activador y que la presencia de dicha sub-población está fuertemente asociada con la progresión leucémica (Palacios et al. 2010).

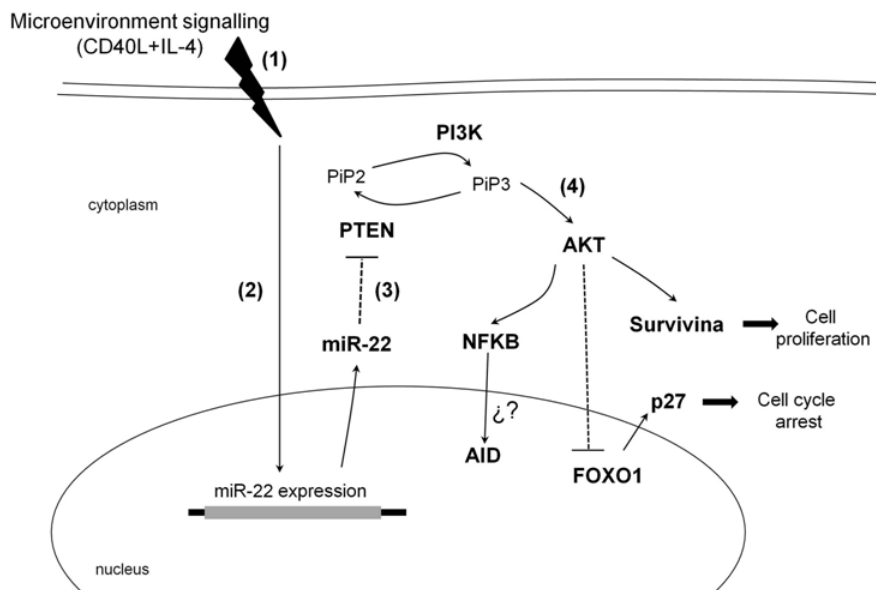


Figura 7. Modelo hipotético que explica el comportamiento proliferante de de sub-población celular de pacientes NM progresores. (1, 2) La expresión de miR-22 es inducida a través de la estimulación de CD40 luego de la interacción de la célula B de LLC con el microambiente tumoral de órganos linfoides secundarios. (3) El miR-22 regula negativamente a PTEN y PI3K fosforila y convierte PIP2 a PIP3 que recluta y activa PDK1. (4) PDK1 fosforila y activa la treonin protein quinasa AKT (pAKT-Thr308) que inhibe la actividad del factor de transcripción FOXO1. (5) La inactivación de

FOXO1 lleva a la regulación negativa de proteínas involucradas en el arresto del ciclo celular como p27. (6) La activación de la cascada PI3K/AKT dispara la expresión de Survivina que contribuye a la progresión y proliferación celular. AKT también puede activar la cascada NFκB que induce la expresión de AID en la fracción proliferante de estos pacientes NM con una LLC que progresa. Extraída de (Palacios et al. 2014).

Con el propósito de seguir profundizando el conocimiento de estas poblaciones del clon tumoral, Palacios y col. estudiaron el perfil de expresión génica del sub-grupo de células B proliferantes AID^{pos} en comparación con su contraparte quiescente del mismo paciente. Los resultados obtenidos sugieren que la proliferación de esta sub-población está relacionada con la sobre-expresión del miR-22, el cual actuaría como molécula clave en la regulación de la vía de señalización fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)/AKT mediante la regulación negativa de PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) en células B de pacientes de LLC (Fig. 7). En este trabajo, también se muestra que esta vía puede desencadenarse por señales del microambiente como CD40L/IL-4 y más aún, que esta regulación también está presente en los nódulo linfáticos de pacientes NM con progresión de la enfermedad. Todos estos datos, resaltan la importancia de las interacciones con el microambiente en sostener el pool proliferante en las LLC con rápida evolución (Palacios et al. 2014; Palacios et al. 2015).

1.3.2.4 Población proliferante CD86^{pos} en células de LLC

Un trabajo recientemente publicado por Huemer y col. presenta a una población positiva para la molécula de superficie CD86 como una población proliferante que recientemente ha emigrado de un nicho linfoide (Huemer et al. 2014). Estas células presentan alta expresión de Ki67 y se encuentran mayoritariamente en la fase G2/M del ciclo celular. En línea con estos resultados, la población CD86^{pos} se superpone con las células CXCR4^{low}CD5^{high}, previamente descritas por Callisano y col. (2011) como células altamente proliferantes. Por otra parte, los autores mostraron que las células CD86^{pos} presentaban la mayor diversidad sub-clonal a nivel del VDJ así como de las regiones “switch” IgM (S μ) y una mayor cantidad de focos γ -H2AX, lo cual es un indicativo de un alto nivel de daño de ADN. Características que, según los autores, podrían ser originadas por la acción de la enzima AID en un nicho linfoide de donde estas células han emergido recientemente (Huemer et al. 2014).

1.4.0 La Citidina Deaminasa Inducida por Activación (AID) en la LLC

1.4.1 La enzima AID y sus diferentes funciones

Un gran avance en la inmunología de la última década fue el descubrimiento de la enzima “citidina deaminasa inducida por activación” (AID del inglés *activation-induced cytidine deaminase*) (Muramatsu et al. 1999). Esta molécula aislada en un proceso de sustracción entre linfocitos B con y sin activación, fue descrita como la única molécula indispensable para la iniciación de los procesos de Hipermutación Somática (HMS) (Yoshikawa et al. 2002) y de Cambio de Clase (CC) (Okazaki et al. 2002).

A pesar de que el mecanismo de acción de esta enzima no ha sido dilucidado en su totalidad, se acepta mayormente que AID actúa sobre el ADN simple hebra generando mutaciones puntuales por deaminación de citidinas en los genes de inmunoglobulinas que se están transcribiendo (Bransteitter et al. 2006; Muramatsu et al. 1999).

Como es de esperar, una enzima capaz de mutar el ADN debe estar altamente controlada y esta regulación se da a varios niveles (Fig. 8). El locus *ACIDA* (que codifica para AID) presenta sitios de unión para numerosos factores de transcripción (FT). Entre los que se encuentran IRF4 (*interferon regulatory factor 3*), BLIMP1 (*PR domain containing 1*), ID2 (*inhibitor of DNA binding 2*), E2F (*E2 factor*) y *c-Myb* (*v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog*), quienes ejercen una regulación negativa sobre este gen (Tran et al. 2010; Lee-Theilen & Chaudhuri 2010). Luego de la estimulación del linfocito, varios FT incluyendo NFκB, STAT6 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 6*), PAX5 (*paired box 5*), C/EBP (*CCAAT-enhancer-binding protein*) y E2A (*transcription factor 3*) son reclutados al gen *ACIDA* (Dedeoglu et al. 2004; Oppezso, Dumas, et al. 2005; Tran et al. 2010; Maul & Gearhart 2010; Lee-Theilen & Chaudhuri 2010). Además se ha descrito una vía de control post-transcripcional involucrando al miR-155 y miR-181b en la estabilidad del mensajero (Teng et al. 2008; de Yébenes et al. 2008). Así como control post-traducciona, regulando su actividad a través de su fosforilación (McBride et al. 2008; Demorest et al. 2011) y controlando su estabilidad en el citosol a través de la interacción con la chaperona HSP90 (*heat shock protein 90 kD*) (Orthwein et al. 2010).

Otra estrategia para controlar la actividad de esta enzima es regular su localización sub-celular, manteniéndola en el citoplasma se evita una mutación generalizada sobre el ADN. En este sentido, se han descrito mecanismos de exportación nuclear (Ito et al. 2004; McBride et al. 2004; Brar et al. 2004), importación nuclear activa y retención en citoplasma (Patenaude et al. 2009), así como rápida degradación en el núcleo (Aoufouchi et al. 2008; Hasler et al. 2011). Un mecanismo de control adicional, el cual aún no es totalmente comprendida, es el esplicing alternativo del ARNm de AID.

La pérdida de alguno o varios de estos mecanismos de control podrían, en un determinado ambiente celular, convertir a la enzima AID en un activo agente mutagénico (Okazaki et al. 2003). Por lo que, la enzima AID ha sido relacionada con el origen de muchos síndromes linfoproliferativos (Pérez-Durán et al. 2007).

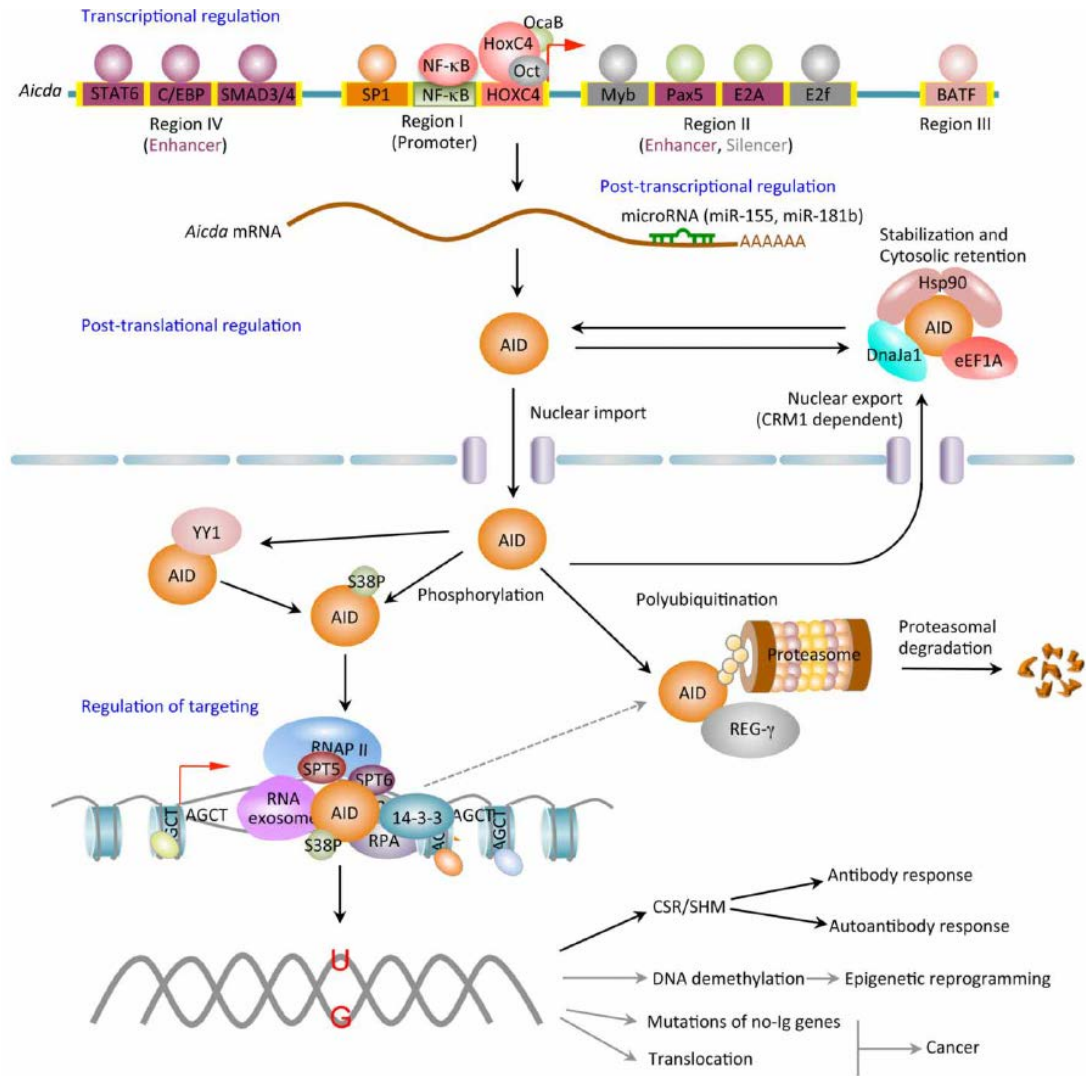


Figura 8. La expresión y actividad de AID se encuentra altamente regulada al nivel transcripcional, post-transcripcional, pos-traduccional (incluyendo distribución nuclear/citoplasmática y estabilidad) y función enzimática. Extraída de (Zan & Casali 2013).

1.4.2 Implicancias de AID en el desarrollo tumoral

La mayor parte de las neoplasias linfocitarias son originadas a partir de translocaciones cromosómicas que pueden activar distintos oncogenes, por ejemplo reuniendo uno de los loci de Igs con un proto-oncogen, como es el caso de *C-myc/IgH* en los linfomas de Burkitt, *BCL2/IgH* en linfomas no Hodgkin's o *BCL6* en los linfomas difusos de células B (Perez-Chacon et al. 2007). Debido a su acción mutagénica numerosos trabajos involucran la sobre-expresión de AID con la

generación de linfomas, relacionando a esta enzima con la presencia de estas translocaciones. Datos *in vivo* en un modelo de hiperplasia linfocitaria, muestran que en ausencia de AID, no existe translocación del proto-oncogen *C-myc* (Duquette et al. 2005), mientras que la sobre-expresión de esta enzima en modelos transgénicos lleva a la generación de linfomas T y B (Okazaki et al. 2003). El mecanismo molecular por el cual AID lleva a la transformación maligna no está del todo claro. Sin embargo, ha sido demostrado que genes distintos a las Ig, tales como *BCL6*, *CD79B* o *CD95* son susceptibles de ser mutados por AID (Shen et al. 1998; Pasqualucci et al. 1998; Gordon et al. 2003). Profundizando en este sentido, Liu y col. mostraron que cerca de un 25% de los genes altamente expresados en GC, incluyendo *BCL6*, *CD38*, *PIM1*, *PAX5* y *MYC* entre otros, experimentan deaminación mediada por AID y bajos niveles de HMS (Liu et al. 2008). Los autores demostraron que estos genes no Ig son protegidos de las mutaciones en una célula B normal por la actividad de reparación de alta fidelidad del sistema de reparación por escisión de bases (“base-excision repair”, BER). En línea con estos resultados, Yamane y col. realizaron una inmunoprecipitación de cromatina y secuenciación masiva (CHIP-seq) para AID a partir de células B de ratón activadas *in vitro* y propusieron que AID es reclutada a lo largo de todo el genoma por la polimerasa PolIII, induciendo bajos niveles de hipermutación en dichos genes blancos de AID (Yamane et al. 2011). Por otra parte, trabajos recientes del grupo de M. Nussenzweig y de F. Alt, utilizando la identificación masiva de translocaciones en el genoma, muestran que además de las mutaciones puntuales, AID es capaz de generar cortes dobles en la hebra de ADN sobre otros genes que no son de Igs, con la consecuente translocación cromosómica (Klein et al. 2011; Chiarle et al. 2011).

Las consecuencias de la sobre-expresión de AID y su asociación con el origen de las neoplasias humanas no han sido aun demostradas directamente. Si bien existe una clara asociación entre la desregulación de la expresión de AID y un contexto linfoproliferativo queda aun bastante trabajo a realizar para entender los mecanismos moleculares responsables de la especificidad de AID (Montamat-Sicotte et al. 2013).

1.4.3 AID en la LLC

En la LLC Oppezzo y col. describen por primera vez una sobre-expresión de la enzima AID en linfocitos B de sangre periférica en pacientes de mal pronóstico (Oppezzo et al. 2003). La caracterización clínica y molecular de estos pacientes con mal pronóstico permitió observar la presencia de un clon tumoral minoritario con un activo proceso de CC a IgG y/o IgA y correlacionar la presencia de este proceso con la expresión anómala de AID en SP. Si bien esta enzima es responsable del proceso de HMS, contrariamente a lo esperado, aquellos pacientes con sobre-expresión de AID presentan un perfil NM de sus genes *IGHV*. Estudios adicionales mostraron que esta enzima AID, era funcional para el proceso de CC, a pesar de que el proceso de HMS seguía bloqueado. A partir de estos resultados se propone que AID podría actuar en forma diferencial para ambos procesos probablemente a través de la presencia de co-factores específicos, aún desconocidos para ambos eventos (Oppezzo et al, 2003). Sin embargo, un trabajo reciente muestra como la enzima AID producida luego de la estimulación *in vitro* tanto de pacientes NM como Mut de LLC, es totalmente funcional, asociando la expresión de la proteína con los procesos de CC y HMS *de novo* (Patten et al. 2012). Por otra parte, Huemer y col. muestran en pacientes NM con expresión de AID que si bien encuentran un rearrreglo VDJ dominante, se observa una diversidad de secuencia intraclonal importante a nivel del VDJ así como de las regiones “switch” IgM (S μ). Estos resultados evidencian actividad de AID *in vivo* durante la progresión de la enfermedad y sugieren un papel importante de esta enzima en la evolución clonal en la LLC (Huemer et al. 2014).

Al día de hoy, numerosos trabajos han ratificado la asociación de AID con un mal pronóstico de la enfermedad y con un perfil citogenético adverso (Leuenberger et al. 2010; Hancer et al. 2011; Patten et al. 2012; Gelmez et al. 2014; Huemer et al. 2014) pero las implicancias directas de esta enzima en la progresión de la enfermedad no ha sido aún demostrada.

1.4.4 Rol de AID en la desmetilación del ADN

Recientemente, se le ha atribuido una nueva e interesante función a esta enzima tan particular. Además de su rol en la maduración de la afinidad, en el cambio de clase de anticuerpos y en la generación de linfomas (Okazaki et al. 2003), y si bien al día de hoy es un tema controversial, esta enzima ha sido implicada en la desmetilación activa del ADN. Pocos años atrás, investigaciones de grupos independientes involucraron a AID en la desmetilación del ADN en tres paradigmas: reprogramación epigenética en heterocariontes utilizando células madre embrionarias de ratón (Bhutani et al. 2010), desmetilación en embriones de zebrafish (Rai et al. 2008) y desmetilación global en células germinales primordiales de ratón (Popp et al. 2010). Estos trabajos impulsaron el estudio sobre esta nueva función de AID en múltiples sistemas, y hoy en día es un área de intensa investigación.

Décadas atrás el grupo de Petersen-Mahrt fue de los primeros en documentar, en experimentos *in vitro*, la capacidad de AID para deaminar citocinas metiladas (5mC) y sugirió que la desregulación de AID, y otros miembros de la familia APOBEC, en tejidos pluripotentes podrían jugar un rol en la reprogramación epigenética durante el desarrollo (Morgan et al. 2004). Rai y col. siguiendo esta hipótesis y utilizando el modelo de zebrafish, mostraron que la desmetilación de fragmentos de ADN inyectados en embriones, así como de todo el genoma, ocurre de manera dependiente de los niveles de AID/APOBEC. Por otra parte, mostraron como el silenciamiento de AID/APOBEC provoca la pérdida de neuronas en los embriones, debido en parte al aumento en la metilación del promotor *neurod2*, presentando así la primera evidencia del rol epigenético de AID (Rai et al. 2008).

Un trabajo de Bhutani y col. utilizando heterocariontes, permitió la identificación de la desmetilación mediada por AID como un proceso clave para la reprogramación nuclear hacia células pluripotentes (Bhutani et al. 2010). Los autores mostraron que el silenciamiento del ARNm de AID humano y murino 24 horas antes de la fusión, inhibió la expresión de los genes *Oct4* y *Nanog*, lo cual se correlacionó con una disminución de la desmetilación de sus promotores. La desmetilación de estos genes mediada por AID fue corroborada por un estudio

reciente en heterocariontes de fibroblastos y células madre (Sabag et al. 2014). Sin embargo, otro trabajo realizado en un sistema de heterocariontes similar infiere que AID no sería necesaria para la activación de los genes *Oct4* y *Nanog* (Foshay et al. 2012).

Las células germinales primordiales (CGP) también experimentan un proceso de reprogramación epigenética, incluyendo desmetilación del ADN, que es fundamental para la adquisición de pluripotencialidad durante el desarrollo de la línea germinal (Hajkova et al. 2002; Sasaki & Matsui 2008). Popp y col. demostraron, mediante secuenciación masiva de ADN tratado con bisulfito, que el genoma de CGP de ratón que ya han sido completamente reprogramadas se encuentra extensamente desmetilado y que en ratones AID^{-/-} el nivel de ADN metilado aumenta, principalmente en intrones y elementos repetidos y en menor medida en exones pero no así en regiones promotoras (Popp et al. 2010).

El rol de AID en la reprogramación del genoma también ha sido investigado en la generación de células madre pluripotenciales inducidas (CMPi), las cuales son generadas por transducción de células diferenciadas con vectores que codifican para los factores de transcripción OCT4, KLF4, SOX2 y cMYC. Interesantemente las investigaciones en esta área son controversiales, mientras que Bhutani y col. concluyen que AID es necesaria en la fase temprana de la reprogramación, los resultados obtenidos por Kumar y col. evidencian que AID sería requerida para el mantenimiento de la pluripotencialidad (Bhutani et al. 2013; Kumar et al. 2013). Por otra parte, dos publicaciones recientes muestran que AID no sería necesaria para obtener CMPi estables y que su sobreexpresión no aumentaría la eficiencia de reprogramación (Habib et al. 2013; Shimamoto et al. 2014).

En resumen, si bien los hallazgos no han podido ser siempre replicados, como es el caso de los estudios en heterocariontes y células madre pluripotenciales inducidas, los estudios en células no linfoides han generado datos que apoyan el rol de AID en procesos que involucran una activa desmetilación del ADN. Las evidencias de una desmetilación global del genoma son limitadas pero no hay dudas de que AID puede estar involucrada en eventos de desmetilación de genes

específicos relacionados con la diferenciación de células no linfoides (revisado en (Ramiro & Barreto 2015)).

Relación entre AID y metilación del ADN en Linfocitos B

Si bien AID es expresada en altos niveles en las células B de centros germinales, hasta la fecha se han realizado pocos estudios sobre el rol epigenético de AID en el linfocito B activado (Shaknovich et al. 2011; Fritz et al. 2013). Varios estudios han establecido un vínculo entre la HMS y la hipometilación del ADN (Zan & Casali 2013; Larijani et al. 2005; Jolly & Neuberger 2001). Regiones localizadas cerca de los potenciadores intrónicos J-C se encuentran metilados en células somáticas pero están demetilados en células B (Fraenkel et al. 2007; Storb & Arp 1983). En el mismo sentido, Jolly y Neuberger demostraron que la región Jk5 se encuentra altamente metilada en ADN de cola de ratón y por el contrario está totalmente desmetilada en las células B de centros germinales (Jolly & Neuberger 2001). Estos autores, estudiando el transgen Igk y analizando el locus Jk5 fueron capaces de demostrar que el nivel de desmetilación se correlaciona con el grado de HMS: solo los loci desmetilados evidencian mutaciones. Estos resultados llevaron a los autores a proponer que tanto la transcripción como la desmetilación son requeridas por la HMS y por ende para el reclutamiento de AID. Hoy en día se podría proponer que es igualmente posible que la desmetilación sea una consecuencia de la actividad deaminasa de AID, la cual introduce mutaciones que son rápidamente reparadas.

Recientemente se han realizado varios estudios que apunta a estudiar la metilación a nivel global del genoma en el linfocito B. Empleando microarreglos de ADN, Shaknovich y col. analizaron el perfil de metilación de ADN de células B *naïve* y de centro germinal, demostrando que los loci hipometilados en células de centro germinal estaban significativamente asociados con motivos de reconocimiento de AID del tipo RGYW (Shaknovich et al. 2011). En el mismo sentido, los experimentos de CHIP-seq que identificaron sitios de unión para AID (Yamane et al. 2011) proporcionaron otra línea de evidencia de la relación entre AID y la hipometilación del ADN en el linfocito B.

Por otra parte, Fritz y col. realizaron experimentos *ex vivo* utilizando ratones *Aicda* *-/-* y reportaron que la ausencia de AID no afecta el metiloma de células B del bazo estimuladas con lipopolisacáridos, IL-4 y anti CD40. Sin embargo, los autores no excluyen la posibilidad de que AID pueda actuar desmetilando el ADN *in vivo* (Fritz et al. 2013). En el mismo sentido, el estudio llevado a cabo por Hogenbirk y col., no encontró metilación dependiente de AID en células B aisladas de centros germinales de ratones inmunizados, las cuales expresan altos niveles de AID (Hogenbirk et al. 2013). Sin embargo, es posible que en ninguno de los dos estudios se alcanzara la resolución de secuenciación necesaria para identificar eventos de desmetilación en genes específicos que estuvieran ocurriendo solo en una fracción de las células analizadas.

Por lo tanto, parecería que mejores herramientas y otros abordajes experimentales son necesarios para dilucidar el rol de AID en el proceso normal de desmetilación del ADN que ocurre en células B durante su tránsito a través del centro germinal o un microambiente tumoral activador.

Mecanismos propuestos para la desmetilación activa del ADN

El primer modelo de desmetilación activa de la 5mC fue descrito en embriones de zebrafish y propone que la conversión de la 5mC a timina a través de la actividad deaminasa de AID genera un “mismatch” T:G que es reparado por MBD4 (*thymine glycosylase methyl-CpG binding domain protein 4*), una de las glicosidasas del sistema de reparación por escisión de base (BER) (Fig. 9). Además, proponen que es necesaria la cooperación con GADD45a (*growth arrest and DNA damage-inducible 45a*), la cual probablemente actúa como una proteína puente entre AID y MBD4 (Rai et al. 2008). La formación de un complejo conteniendo AID, GADD45 y otra glicosidasa de ADN, TDG (*thymine DNA glycosylase*), fue observado en un estudio independiente empleando células HEK293 (Cortellino et al. 2011).

El descubrimiento de la familia de proteínas TET (*ten-eleven translocation*), que pueden oxidar la 5mC y convertirla en 5-hidroximetil-2-deoxicidina (5hmC) (Kriaucionis & Heintz 2009; Tahiliani et al. 2009), permitió la identificación de otro posible mecanismo de desmetilación activa del ADN (Wu & Zhang 2010). Se ha propuesto, que la conversión de la 5mC a 5hmC por TET1 inicia el

proceso. Los eventos bioquímicos sucesivos no han sido totalmente dilucidados, una posibilidad es que la 5hmC continúe oxidándose a 5-formil-C (5fC) y 5-carboxil-C (5caC), que pueden ser escindidas por glicosidasas y remplazadas por C (Kohli & Zhang 2013; Huang & Rao 2014). Otra posibilidad es que la 5hmC sea deaminada por AID/APOBEC y se prosiga con la vía BER, que lleva finalmente a la desmetilación del ADN (Guo et al. 2011). Este modelo fue posteriormente cuestionado, dado que el análisis bioquímico de la actividad enzimática de AID indicó que la eficiencia de deaminación de la 5mC es diez veces menor en comparación con la C y no se detecta actividad sobre la 5hmC *in vitro* (Rangam et al. 2012; Nabel et al. 2012).

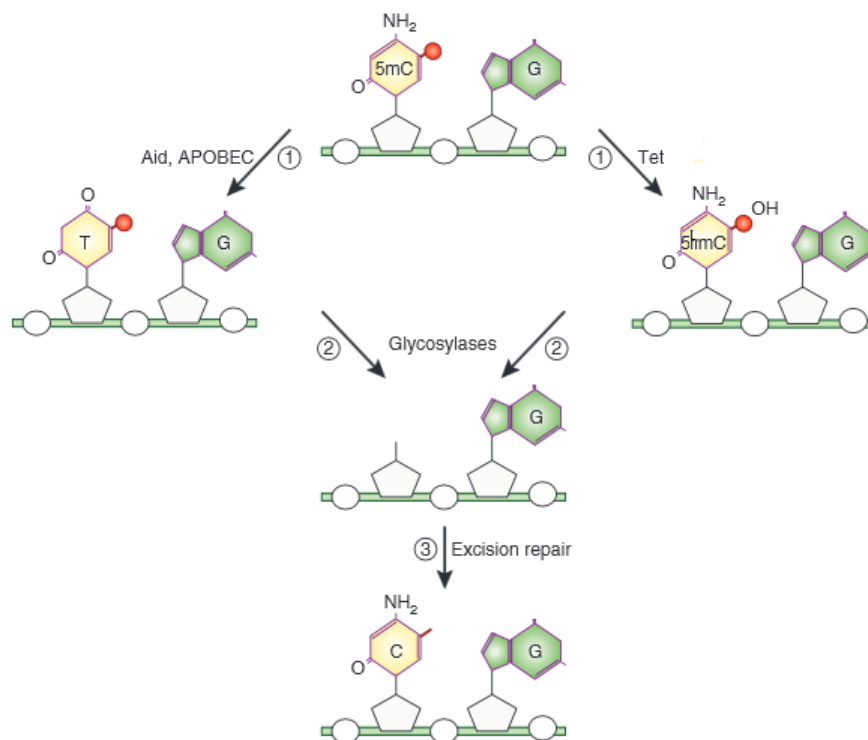


Figura 9. Vías propuestas para la desmetilación activa del ADN. Es probable que el paso 1 de la desmetilación involucre la modificación de 5mC a través de su deaminación (AID, APOBEC) o hidroximetilación (TET). Estas bases modificadas son removida por glicosidasas, las cuales generan un ácido apirimidínico (paso 2) que es subsecuentemente removido por el sistema de reparación por escisión de bases y sustituido por una citosina (paso 3). Debe ser notado que la 5hmC puede ser oxidada a 5fC o 5caC, la cuales pueden también ser removidas por glicosidasas (no se muestra). Imagen extraída de (Bergman & Cedar 2013).

Teniendo en cuenta estos estudios, el grupo de Petersen-Mahrt recientemente propuso un modelo alternativo en el que las C metiladas no tienen que ser blancos directos de AID para ser desmetiladas (Franchini et al. 2014). Utilizando un ensayo *in vitro*, este estudio propone que la deaminación de C (o 5mC) a U (o T) por AID puede promover la activación de la ADN polimerasa procesiva, la cual es capaz de introducir hasta 2kb de ADN simple hebra. Como resultado, podría haber una desmetilación en una región extensa del ADN en torno a la lesión original y la desmetilación de 5hmC puede ocurrir de manera independiente de la deaminación producida por AID (Franchini et al. 2014). Sin embargo, la relevancia fisiológica de ese modelo aún debe ser confirmada.

Basado en los resultados antes mencionados, parece razonable concluir que ambos mecanismos, dependiente de AID y de las proteínas TET, participan en la desmetilación activa del genoma (Fig. 9). Se requiere más investigación para determinar hasta qué punto estos mecanismos están interconectados o cual de ellos es preferencialmente activado dependiendo de las necesidades de la célula.

1.5.0 Metilacion de ADN en LLC

Las modificaciones epigenéticas, incluyendo la metilación aberrante del ADN, han mostrado jugar un rol importante en la tumorigénesis, donde la hipometilación global del genoma y la hipermetilación en promotores de genes supresores de tumores son características de muchos cánceres (Eden et al. 2003). La caracterización de los patrones de metilación de genes individuales en la CLL, aunque limitada, evidenció la capacidad de la metilación del ADN para influir sobre la función de genes con importancia clínica y biológica en la LLC. Estos resultados iniciales han promovido la investigación sobre la metilación en todo el genoma, en busca de obtener un mapa global de metilación así como determinar el papel que la metilación del ADN pueda tener fuera de las tradicionales islas CpG de los promotores génicos (Fig. 10).

En el primero de estos estudios, usando la técnica “*Restriction Landmark Genomic Scanning*”, observaron que del 2% al 8% de las islas CpG se encontraban metiladas de forma anormal en LLC en comparación con los controles normales y que los eventos de metilación mostraban una distribución no azarosa (Rush et al. 2004). Sin embargo, la técnica empleada solo abarca 3.000 islas CpG y no brinda un cubrimiento completo de genoma.

Desde entonces, una serie de estudios basados en microarreglos de ADN, cada vez con mayor resolución y mayor número de CpG evaluadas, han sido publicados en LLC. Empleando dos microarreglos diferentes, Rahmatpanah y col. identificaron más de 100 genes hipermetilados en LLC en comparación con células B normales (Rahmatpanah et al. 2009). Algunos de estos genes segregaron de acuerdo con el nivel de expresión de CD38. Por ejemplo, *NRP2*, *SFRP2* y *ADAM12* se encontraron preferencialmente metilados en pacientes con niveles altos de CD38 (mal pronóstico), mientras que la metilación de *DLEU7* se encontró en pacientes con baja expresión de CD38 (buen pronóstico).

Otros estudios basados en microarreglos han identificado patrones de metilación característicos en ciertos sub-grupos pronóstico en LLC. Tong y col. documentaron 280 genes con metilación aberrante en pacientes de mal pronóstico con delección 17p (Tong et al. 2010). Por su parte, el grupo de Rosenquist identificó patrones de metilación diferencial asociados a pacientes NM con mal pronóstico y a pacientes Mut con pronóstico favorable (Kanduri et al. 2010). Entre los genes diferencialmente metilados encontraron genes supresores de tumor, genes que participan en la proliferación celular y en la progresión tumoral. Posteriormente, usando el mismo tipo de microarreglo, Kanduri y col. compararon el perfil de metilación de tres grupos paradigmáticos en la LLC agrupados según su estereotipo de BCR: grupos con mal pronóstico #1 (*IGHV1/5/7/IGKV1-39*) y #2 (*IGHV3-21/IGVL3-21*) y el grupo con buen pronóstico #4 (*IGHV4-34/IGKV2-30*), encontrado distinto perfil de metilación para cada uno de ellos (Kanduri et al. 2012).

Estudios masivos de metilación en LLC han mostrado una regulación alterada de la vía de señalización WNT a través de la metilación aberrante de diferentes genes de esta vía (Liu et al. 2006; Chim et al. 2008; Moskalev et al. 2012; Pei et al. 2012)

Más recientemente, empleando un microarreglo de 450K, que interroga 485.000 sitios CpG, Cahill y col. identificaron un grupo de genes pronóstico (*CLLU1*, *LPL*, *ZAP-70* y *NOTCH1*), así como reguladores epigenéticos (*HDAC9*, *HDAC4*), el gen de señalización en células B *IBTK* y numerosas moléculas involucradas en las vías TGF- β y NF κ B/TNF que mostraron diferente patrón de metilación entre LLC con *IGHV* Mut y NM (Cahill et al. 2013a). En este mismo trabajo, se evidencia que la metilación del ADN en la LLC parece ser estable en el tiempo y similar en células derivadas de un microambiente proliferante como es un nódulo linfático y un ambiente de no proliferación como es la sangre periférica.

El desarrollo de la tecnología de secuenciado masivo, NGS (*next generation sequencing*), ha permitido superar las limitaciones de los microarreglos y tener una cobertura completa del genoma. Un trabajo en el que se combinan el uso de secuenciación masiva de ADN tratado con bisulfito y microarreglos de alta densidad para el estudio de 139 pacientes de LLC y células B normales, constituye el análisis más amplio del metiloma de LLC realizado hasta el momento (Kulis et al. 2012). Este trabajo describe una hipometilación global del cuerpo de los genes, y a pesar de encontrar una correlación limitada entre la metilación del ADN y la expresión génica, pudieron establecer tanto correlaciones negativas como positivas entre la metilación del cuerpo de ciertos genes y su nivel de expresión. Este trabajo confirma la existencia de diferencias de metilación global entre LLC Mut y NM, mayormente afectando regiones potenciadoras de los genes. Es interesante destacar, que estos cambios en la metilación se parecen a los cambios encontrados entre las células B *naïve* y memoria, sugiriendo por lo tanto la primera como la célula de origen para las LLC NM, siendo las células B de memoria propuestas como los precursores de las LLC Mut (Queirós et al. 2014).

Con el objetivo de profundizar en la naturaleza de las alteraciones epigenéticas en la LLC, recientemente se ha intentado describir la heterogeneidad de metilación de ADN dentro del clon tumoral. El análisis de 104 pacientes de LLC y 26 muestras de células B normales mediante secuenciación por bisulfito de representación reducida (*reduced representation bisulfite sequencing*, RRBS) evidenció que las células de LLC presentaban mayor variabilidad intra-muestra en los patrones de metilación, la cual provenía del “desorden estocástico” que se da en la

metilación en las células cancerosas (Landau et al. 2014). Niveles elevados de heterogeneidad en la metilación a nivel intra-tumoral se correlacionan con una evolución clínica desfavorable. Por lo que éste y otros trabajos proponen entonces, que esta heterogeneidad en la metilación dentro del clon tumoral juega un rol similar al de la inestabilidad genética, potenciando la capacidad de las células cancerosas de alcanzar destinos evolutivos más adversos (Landau et al. 2014; Oakes et al. 2014).

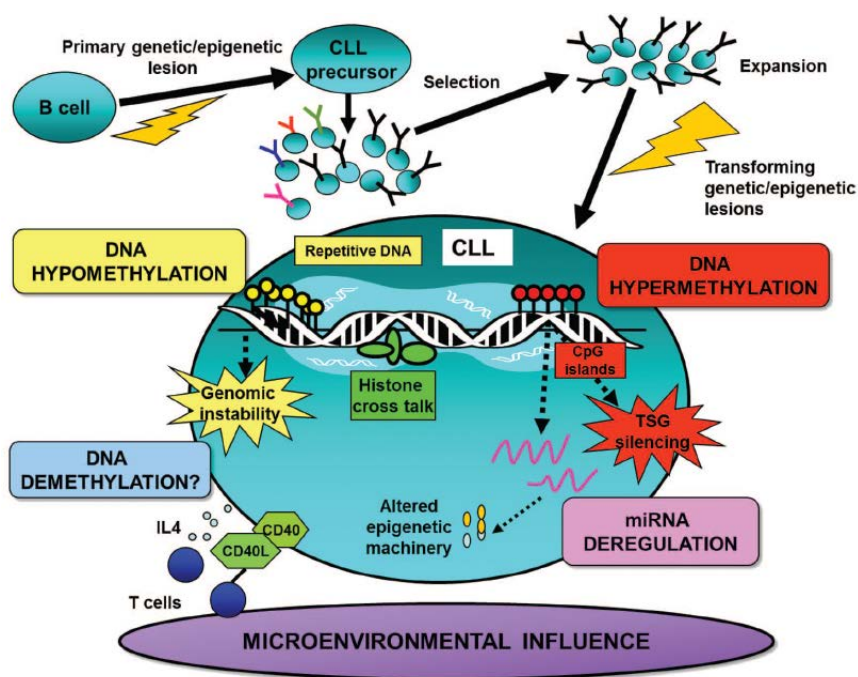


Figura 10. Ilustración de factores epigenéticos que configuran el metiloma ADN en la LLC. Este esquema detalla: (1) la posible ocurrencia temporal y el papel de la metilación del ADN en la patogénesis de CLL, (2) el silenciamiento por hipermetilación del ADN de genes supresores de tumores (TSGs), (3) hipometilación del ADN que lleva a inestabilidad genómica, (4) la desregulación de reguladores y maquinaria epigenética a través de la metilación aberrante y (5) la interrelación entre la metilación del ADN y otros factores microambientales/epigenéticos. (Extraída de Cahill & Rosenquist 2013)

1.5.1 Metilación del ADN a nivel de genes específicos en la LLC

Los estudios realizados sobre el estado general de metilación del ADN en la LLC han demostrado en su mayoría una hipometilación del genoma en relación al linfocito B normal y particularmente

de secuencias repetitivas, como ALU, LINE y SAT α (Wahlfors et al. 1992; Stach 2003). Sin embargo, el análisis detallado de algunos genes en particular muestra que en la LLC existe tanto un perfil diferencial de hipermetilación como de hipometilación con respecto al perfil de los mismos genes en un linfocito B normal.

Dichas diferencias han sido estudiadas extensamente aunque su correlación e importancia con la progresión de la enfermedad sigue necesitando de estudios prospectivos más detallados. A modo de ejemplo se citan algunos genes hipermetilados en LLC como la quinasa *DAPK1* (*death-associated protein kinase 1*) (Raval et al. 2007), el inhibidor de diferenciación *ID4* (*inhibitor of DNA binding protein 4*) (Yu et al. 2005; Chen et al. 2011) y los factores de transcripción *HoxA4* (*homeobox A4*) (Strathdee et al. 2006) y *TWIST2* (*twist family bHLH transcription factor 2*) (Raval et al. 2005).

En cuanto a los genes hipometilados podemos resaltar el gen anti-apoptótico *BCL2* (Hanada et al. 1993), el de la *ornitina descarboxilasa* que es un regulador del oncogen *MYC* (Lipsanen et al. 1988), *MDR1* (*multiple drug resistance gene*) (Kantharidis et al. 1997) y el de tres genes usados como marcadores de la progresión de la enfermedad como son *TCL1*, *ZAP-70* y *NOTCH1* (Yuille et al. 2001; Corcoran et al. 2005; Cahill et al. 2013a). Finalmente, también se ha mostrado una clara correlación entre el estado de metilación de varios de estos genes y el perfil mutacional de los genes *IGHV* (Raval et al. 2005), lo que indirectamente relaciona el perfil de metilación con la progresión de la enfermedad. En el caso de *ZAP-70*, un trabajo reciente propone que la determinación del estado de metilación de sitios CpG específicos podría ser utilizado como un método pronóstico alternativo que muestra una buena correlación con la expresión del gen y con la evolución clínica (Corcoran et al. 2005; Chantepie et al. 2010; Claus et al. 2012; Cahill et al. 2013).

En el mismo sentido de estos trabajos, esta tesis doctoral ha realizado importantes avances analizando el estado de metilación de otro marcador pronóstico relevante en la LLC como es *LPL*. Resultados obtenidos en esta tesis nos permitieron describir por primera vez que la expresión de *LPL*, se encuentra regulada por un proceso de metilación diferencial en donde la hipometilación

del promotor de este gen se correlaciona con un aumento de su expresión, con un perfil NM de *IGHV* y con la progresión de la enfermedad (Abreu, Moreno et al. 2013; Moreno, Abreu et al. 2013).

La metilación aberrante de promotores en LLC también afecta la expresión de varios miRNAs (revisado por (Cahill & Rosenquist 2013), incluyendo *miR15a/16-1* y *miR29* (Baer et al. 2012). En el mismo sentido, la desmetilación del promotor de los dos lncRNAs (*large non coding RNAs*) localizados en la región 13q14 comúnmente deletada en LLC (que también involucra los *miR15a/16-1*) parece actúa en *cis* provocando la disminución de la expresión de un gen vecino supresor de tumor que modula la vía NFkB (Sampath et al. 2012).

1.6.0 Estudios proteómicos en la LLC

El estudio de proteínas expresadas de forma anómala en células B tumorales puede permitir la identificación de moléculas con potencialidad para ser usadas en la predicción o terapia de la enfermedad.

Desde los estudios iniciales del contenido proteómico de la LLC en los años 70 (Andersson 1976), el progreso en las técnicas de análisis preteómico, especialmente en la electroforesis en 2 dimensiones (2D-PAGE), ha permitido la comparación de perfiles proteómicos de diferentes subgrupos dentro de la LLC cada vez con mayor resolución.

Voss y col. demostraron por primera vez en pacientes de LLC una correlación entre el perfil protéico global y parámetro clínicos. En particular mostraron que pacientes que presentaban menor tiempo de supervivencia con del(11q22-q23) o del(17p13) en comparación con pacientes con del(13q14), presentaban niveles elevados de la proteína HSP27 (*heat shock protein 27*) y niveles disminuidos de tioredoxina peroxidasa I y disulfuro isomerasa (PDI), enzimas que pueden estar asociadas con resistencia a drogas (Voss et al. 2001). Cochran y col. analizaron el proteoma de 12 pacientes de LLC mediante 2D-PAGE asociada a espectrometría de masa (MS), encontrando que

las proteínas CapZ β (*F-actin-capping protein β subunit*), 14-3-3 β y la “*laminin-binding protein precursor*” estaban significativamente aumentadas en pacientes Mut de LLC en comparación con pacientes NM. Sin embargo, no se detectaron diferencias específicas entre pacientes CD38 positivos y negativos (Cochran et al. 2003). Empleando la misma metodología, Scielzo y col. evidenciaron que pacientes Mut y NM difieren en la expresión de la proteína HCLS1 (*hematopoietic lineage cell-specific protein 1*) (Scielzo et al. 2005). Esta proteína ha mostrado tener un rol central en el tráfico y “homing” de la célula B de LLC (Scielzo et al. 2010). Por su parte Rees-Unwin y col. encontraron a la proteína nucleofosmina 1 (npm 1) como la proteína más diferencialmente expresada, presentando mayores niveles en pacientes NM (Rees-Unwin et al. 2010).

La hiper-reactividad del BCR desempeña un papel fundamental en la supervivencia de las células de CLL, por lo que esta vía también ha sido estudiada desde un enfoque proteómico con el objetivo de encontrar moléculas con relevancia clínica en la enfermedad. Perrot y col. evaluaron el perfil proteómico de células de pacientes Mut y NM luego de la estimulación de su BCR con anti-IgM. En este trabajo empleando la técnica 2D-DIGE (*2 dimensional fluorescence differential gel electrophoresis*) acoplada a MS encontraron que esta estimulación induce una respuesta proteómica específica, siendo más pronunciada en las LLC más agresivas (Perrot et al. 2011). En un trabajo de similares características publicado recientemente, se describió que la proteína kininogen era significativamente sobre-expresada luego de la activación con anti-IgM (Kashuba et al. 2013).

Otra estrategia experimental utilizada en los estudios proteómicos es el empleo de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa. Utilizando esta metodología, Boyd y col. evaluaron las proteínas de la membrana plasmática de células de LLC en busca de proteínas características de las células leucémicas, identificando la proteína MIG2B (*fermitin family member 3*), que colocaliza con integrinas en complejos de adhesión célula-matriz y BCNP1 (*B-cell novel protein #1*) una proteína de función desconocida hasta el momento (Boyd et al. 2003).

Empleando técnicas similares, pero incorporando el uso del reactivo cICAT (*acid-cleavable Isotope-code Affiniti Tag*) que permite adicionar una cromatografía de afinidad, Barnidge y col. analizaron las proteínas citosólicas y de membrana de pacientes Mut y NM de LLC. En este

estudio se identificaron 13 proteínas diferencialmente expresadas entre pacientes Mut y NM, de las cuales mediante western blot se confirmó la sobre-expresión en los pacientes Mut de la proteínas COX G (*cytochrome c oxidase subunit G*) (Barnidge et al. 2005).

Se ha continuado explorando esta tecnología en estudios proteómicos en LLC. Dos trabajos recientes, incorporan una paso extra que permite realizar análisis cuantitativos marcando las proteínas previamente con el reactivo iTRAQ (Alsagaby et al. 2014; Eagle et al. 2015). Ambas publicaciones comparan el proteoma de pacientes Mut y NM encontrado diferencias en numerosos genes. Las proteínas diferenciales encontradas por Eagle y col. sugieren que las células de pacientes NM migran menos y son más adherentes que las células Mut de LLC, lo cual provocaría su retención en los nódulos linfoides donde estas células están expuestas estímulos de proliferación (Eagle et al. 2015). A continuación se muestra un esquema donde se indican todas las proteínas relacionadas con la migración de la célula de LLC que fueron encontradas por Eagle y col. alteradas en pacientes NM vs Mut (Fig. 11). Ilustrando la información que pueden proveer los análisis proteómicos sobre el comportamiento y fisiología de las células de LLC.

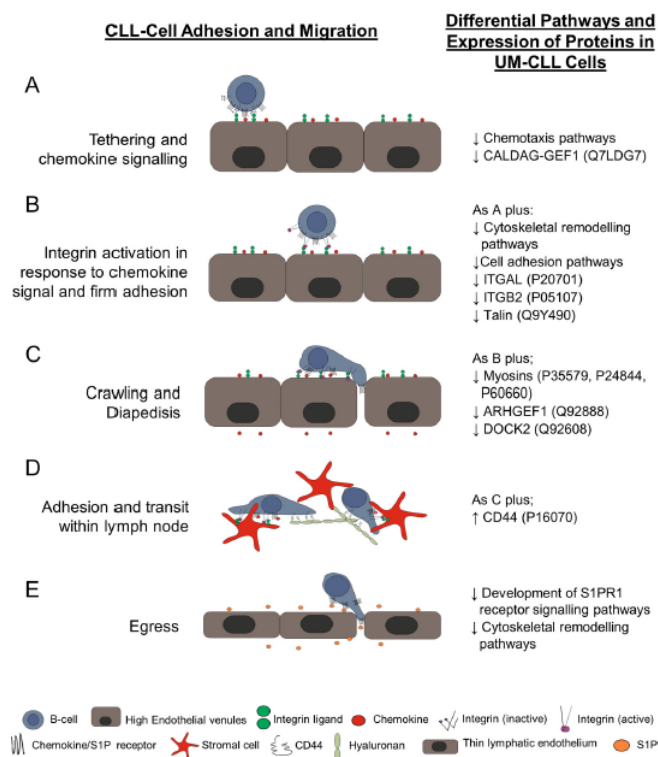


Figura 11. Diagrama esquemático ilustrando factores involucrados en la migración del linfocito hacia nódulos linfoides, su retención y salida. Se ilustran los pasos principales, en los cuales las vías/proteínas están alteradas en LLC-NM vs LLC-Mut. En el contacto inicial con el endotelio, el linfocito se adhiere débilmente (A). Si la célula encuentra citoquinas en la superficie del endotelio se adhiere firmemente en un proceso que involucra la activación de integrinas y señalización de citoquinas (B). La célula se desplaza por el endotelio hasta encontrar una unión intracelular, donde experimenta diapédesis en respuesta a citoquinas (C). Una vez dentro del tejido linfoide (D), dos mecanismos median la adherencia de las células de LLC en el tejido, estos involucran la unión de la integrina $\alpha 4\beta 1$ y CD44 a sus respectivos ligandos. El paso final del tránsito a través del nódulo linfoide es el egreso (E), un proceso que es enteramente dependiente de S1PR1 e independiente de integrinas. Imágen extraída de (Eagle et al. 2015).

Como ha sido descrito en esta introducción, al día de hoy continúa siendo importante para la LLC profundizar el conocimiento sobre moléculas relevantes para la proliferación y supervivencia del clon leucémico. Por una parte, buscando nuevos marcadores que permitan predecir la evolución de esta patología tan heterogénea, e igualmente relevante, intentar comprender los mecanismos moleculares que regulan la expresión de estas moléculas y cuál es su rol biológico en la célula tumoral. Es así, que la presente tesis de doctorado se centró en intentar aportar conocimiento sobre los mecanismos moleculares que regulan la expresión de LPL, uno de los marcadores de progresión ampliamente validado en la LLC. Por otra parte, en la búsqueda de nuevos marcadores de agresividad en la LLC es que nos concentramos en el estudio de una sub-población proliferante del clon tumoral recientemente descrita por nuestro grupo de trabajo. Esta sub-población, presente en pacientes NM con mal pronóstico, sobre-expresa la enzima AID. Esta enzima con capacidad mutagénica, recientemente también se la ha adjudicado un rol en la desmetilación activa del ADN, por lo cual consideramos interesante estudiar el perfil global de metilación de ADN de la población proliferante y su contraparte quiescente. La expresión diferencial de genes en estas dos poblaciones a nivel de ARNm ya ha sido estudiada por nuestro grupo de trabajo. Sin embargo, dado que existen diversos mecanismos que permiten o no a esa molécula de ARNm traducirse a proteína, entendimos interesante estudiar también las proteínas diferencialmente expresadas en ambas poblaciones.

2 OBJETIVOS

Debido a la gran heterogeneidad en la evolución de los pacientes de LLC y la resistencia a la terapia que alguno de ellos presentan, la búsqueda de moléculas con potencialidad de ser buenos marcadores pronóstico así como posibles blancos terapéuticos es un tema de intensa investigación en la LLC. Entre las moléculas con valor pronóstico que han sido descritas en la LLC, el nivel de ARNm de *LPL* se ha consolidado como un excelente predictor de la evolución clínica. Observándose altos niveles de expresión en pacientes NM con mal pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, el rol funcional de su sobreexpresión en la patogénesis de esta leucemia aún no ha sido dilucidado, así como tampoco los mecanismos moleculares que regulan su expresión.

La regulación de genes supresores de tumores así como de genes que le dan una ventaja selectiva a las células tumorales puede darse a través de múltiples mecanismos. No obstante, la regulación mediante modificaciones epigenéticas ha mostrado jugar un rol importante en la tumorigénesis de muchos cánceres, incluida la LLC. Sorprendentemente la hipermetilación de promotores es al menos tan común como la disrupción por mutaciones de los clásicos genes supresores de tumores en humanos. Cerca del 50% de los genes que causan formas familiares de cáncer cuando son mutados en la línea germinal se sabe que sufren silenciamiento asociado a la metilación en varias formas esporádicas de cáncer.

Más allá del estudio de moléculas concretas, hoy en día diferentes grupos de investigación están estudiando distintas sub-poblaciones con características proliferantes dentro del clon tumoral que están relacionadas con la progresión y el mal pronóstico en la LLC. Y que a su vez, podrían ser responsables de la sobre-expresión de numerosos marcadores moleculares de agresividad tumoral en estos pacientes de LLC. En este sentido, en un trabajo previo de nuestro grupo se describió una población proliferante dentro del clon tumoral de la LLC correspondiente a un sub-grupo de células B que con un activo proceso de cambio de clase (CC) sobre-expresan la enzima AID. Esta sub-población tumoral es encontrada principalmente en pacientes NM, con una alta progresión de la enfermedad. En cuanto a esta enzima, además de su papel fundamental en los

procesos de HMS y CC y su capacidad mutagénica, recientemente se le ha adjudicado un rol en la desmetilación activa del ADN.

Tomando en cuenta los antecedentes antes mencionados en el área de la LLC, la importancia de la metilación en el cáncer y finalmente las distintas funciones e implicancias de la expresión de AID en el linfocito B, es que planteamos el siguiente objetivo general y objetivos específicos para esta tesis de doctorado.

Objetivo general

Caracterización de marcadores de proliferación tumoral y/o posibles blancos terapéuticos relacionados a la progresión de la Leucemia Linfocítica Crónica

Objetivos Específicos

- I- Profundizar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares responsables de la alta expresión del marcador pronóstico *LPL* en la célula B leucémica de pacientes progresores.
- II- Identificar posibles blancos terapéuticos y/o moléculas implicadas en la proliferación tumoral a través del análisis del perfil de metilación de ADN de una población proliferante encontrada en pacientes de LLC con mala evolución clínica.
- III- Identificar posibles blancos terapéuticos y/o moléculas implicadas en la proliferación tumoral a través del análisis del perfil proteómico de una subpoblación proliferante en la LLC.

3 RESULTADOS

3.1 Mecanismos moleculares responsables de la alta expresión del marcador pronóstico *LPL* en la célula B leucémica de pacientes de LLC con mal pronóstico

ARTÍCULO 1

METHYLATION STATUS REGULATES LIPOPROTEIN LIPASE EXPRESSION IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA.

Cecilia Abreu ^{1 *}, Pilar Moreno ^{4 *}, Florencia Palacios ¹, Mercedes Borge ², Pablo Morande ², Ana Inés Landoni ³, Raul Gabus ³, Guillermo Dighiero ³, Mirta Giordano ², Romina Gamberale ² and Pablo Oppezzo ^{1,5}

1 Recombinant Protein Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; 2 Immunology Department, Institute of Experimental Medicine (IMEX)-CONICET, National Academy of Medicine, Buenos Aires, Argentina; 3 Service of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Hospital Maciel, Montevideo, Uruguay; 4 Molecular Virology Laboratory, School of Science, Montevideo, Uruguay and 5 Immunobiology Department, School of Medicine, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

* These authors contributed equally to this work

Leukemia & Lymphoma, August 2013; 54(8): 1844–1848
online DOI: 10.3109/10428194.2013.796057

CLL YOUNG INVESTIGATORS' MEETING 2012

Methylation status regulates lipoprotein lipase expression in chronic lymphocytic leukemia

Cecilia Abreu^{1*}, Pilar Moreno^{4*}, Florencia Palacios¹, Mercedes Borge², Pablo Morande², Ana Inés Landoni³, Raul Gabus³, Guillermo Dighiero³, Mirta Giordano², Romina Gamberale² & Pablo Oppezzo^{1,5}

¹Recombinant Protein Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, ²Immunology Department, Institute of Experimental Medicine (IMEX)-CONICET, National Academy of Medicine, Buenos Aires, Argentina, ³Service of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Hospital Maciel, Montevideo, Uruguay, ⁴Molecular Virology Laboratory, School of Science, Montevideo, Uruguay and ⁵Immunobiology Department, School of Medicine, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Abstract

Among different prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia (CLL), we previously demonstrated that lipoprotein lipase (LPL) is associated with an unmutated immunoglobulin profile and clinical poor outcome. Despite the usefulness of LPL for CLL prognosis, its functional role and the molecular mechanism regulating its expression are still open questions. Interaction of CLL B-cells with the tissue microenvironment favors disease progression by promoting malignant B-cell growth. Since tissue methylation can be altered by environmental factors, we investigated the methylation status of the LPL gene and the possibility that overexpression could be associated with microenvironment signals. Our results show that a demethylated state of the LPL gene is responsible for its anomalous expression in unmutated CLL cases and that this expression is dependent on microenvironment signals. Overall, this work proposes that an epigenetic mechanism, triggered by the microenvironment, regulates LPL expression in CLL disease.

Keywords: CLL, methylation, prognostic factors

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a heterogeneous disease, with survival ranging from months to decades. The development of the Rai and Binet staging systems has allowed the division of patients with CLL into three prognostic groups: good, intermediate and poor prognosis. The two staging systems have improved the identification of patients who need immediate treatment. However, neither the Rai nor the Binet staging system can predict which patients among the good prognosis group will have progressive disease [1]. Major progress has been made to identify molecular and cellular markers that predict disease progression in patients with CLL. Among these markers, cytogenetic abnormalities

including 11q or 17p deletions in the leukemic B cells, or the presence of an unmutated (Um) status of the immunoglobulin heavy chain genes (*IGHV*), are the better predictors of rapid progression and shorter survival [1].

Gene-expression profiling (GEP) has introduced a new dimension into our understanding of CLL biology and clinical behavior. Results from GEP in CLL led us to propose that aberrant overexpression of the lipoprotein lipase (LPL) gene is a surrogate marker of the mutational status of *IGHV* [2]. This observation was extensively confirmed by other groups [3–7]. Thus, LPL mRNA overexpression is currently demonstrated to be associated with Um status and clinical poor outcome, and also it appears to be the most powerful prognostic tool among RNA-based markers in CLL [8].

Previous work suggests a role for LPL expression in CLL disease, not only in gene expression changes but also in functional pathways related to fatty acid degradation and signaling, which may influence CLL cell behavior [9]. Despite these studies and though the prognostic value of the LPL gene is well established, the functional consequences of LPL overexpression in CLL pathogenesis as well as the molecular mechanism regulating its expression remain elusive.

Aberrant DNA methylation has been shown to play a strong role in tumorigenesis, where genome-wide hypomethylation and regional hypermethylation of tumor suppressor gene promoters are characteristic hallmarks of many cancers. Tissue specific patterns of methylated cytosine residues can be altered by environmental factors, and are often abnormal in tumor disorders [10].

The main goal of this investigation was to obtain deep insight into the molecular mechanisms responsible for the high expression of LPL in Um CLL B cells. Along this line, we investigated the methylation status of the LPL gene promoter region, as well as the possibility that its expression could be related to specific signals delivered by the microenvironment.

*These authors have contributed equally to this work.

Correspondence: Oppezzo Pablo, PhD, Institut Pasteur de Montevideo, Unit of Recombinant Protein, Matajojo 2020, Montevideo (11400), Uruguay. Tel: + 33-598-2-5220910. Fax: + 33-598-2-5224185. E-mail: poppezzo@pasteur.edu.uy

Received 1 April 2013; accepted 2 April 2013

Our results suggest that the demethylated status of the LPL gene is responsible for the anomalous expression of this prognostic marker in Um CLL, and that this epigenetic mechanism can be induced in the leukemic clone by microenvironment signals.

Materials and methods

Patient samples and clinical data

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from 26 patients with CLL. Samples were characterized at a molecular level through CD38, LPL expression, and *IGHV* status as well as fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis (Supplementary Table I to be found online at <http://infor-mahealthcare.com/lal/doi/10.3109/10428194.2013.796057>). All patients were followed at the Hospital Maciel, Montevideo, and provided informed consent in accordance with the ethical regulations of Uruguay and the Declaration of Helsinki.

RNA extraction and analysis of LPL transcripts by PCR

Genomic DNA and RNA extraction, cDNA synthesis, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative PCR (Q-PCR) for LPL amplification were performed as described [2].

Methylation analysis and 5-aza-2'-deoxycytidine treatment

The CpG island in the 5'-region of the LPL gene was identified by EMBOSS/CpGPlot/CpGReport/Isochore software. Five hundred ng of genomic DNA was treated with sodium bisulfite and amplified using bisulfite-sequencing primers. PCR products were cloned and five clones from each patient with CLL were sequenced to evaluate the methylation status of the CpG island. In order to confirm the specificity of changes in LPL methylation status, the Daudi cell line was cultured over 3 and 5 days in supplemented RPMI medium containing 10 μ M 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC) (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Medium was changed every 24 h and bisulfite analysis was carried out as describe above.

CLL B cell stimulation with different microenvironment signals

Stimulation of PBMCs from patients with negative LPL expression with autologous T cells or with recombinant CD40L and interleukin 4 (IL-4) was performed as described previously [11,12]. In turn, B cell receptor (BCR) stimulation was achieved by anti-immunoglobulin M (IgM) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) immobilized on culture plates at 15 μ g/mL, and the cells collected after 4 days.

Flow cytometry analysis

A total of 1×10^6 PBMCs were incubated for 45 min at 4°C with anti-CD19-peridinin chlorophyll protein complex (PerCP), anti-CD25-phycoerythrin (PE), anti-CD80-PE and anti-CD86-fluorescein isothiocyanate (FITC) (BD Biosciences, San Jose, CA). The cells were then washed and analyzed. Negative isotype controls were performed with

irrelevant antibody in the same conditions. Results were analyzed using Summit v4.3 software (Dako Inc., Carpinteria, CA).

Epifluorescence microscopy

For intracellular detection of LPL, an indirect immunofluorescence technique was performed using anti-LPL monoclonal antibody 5D2 (kindly provided by Dr. J. Brunzell, University of Washington). PBMCs from patients with CLL were isolated using a B-Cell Isolation Kit for B-CLL (<http://www.miltenyibiotec.com>), washed with phosphate buffered saline (PBS) and 5 U/mL heparin (Sigma Aldrich), fixed with 3.7% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS. Non-specific binding was blocked with 5% fetal bovine serum (FBS) in PBS, incubated with anti-LPL antibody overnight at 4°C, and finally with Alexa Fluor® 488-labeled goat anti-mouse antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA) for 1 h. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). After washes, preparations were visualized ($\times 100$) and photographed using an Olympus CKX31 inverted microscope.

Statistical analyses

Expression of LPL mRNA, CD25, CD80 and CD86 as activation control proteins and methylation percentage of the R1-LPL region were compared between control samples and different activation subsets using either a paired Wilcoxon signed-rank test or two-tailed unpaired Student's *t*-test. Variables with *p*-values less than 0.05 were considered to be significant. The Spearman rank correlation coefficient was calculated to determine the strength of association between LPL expression and methylation percentage. *p*-Values ≤ 0.01 were considered significant. All analyses were done using GraphPad Prism, version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

First exon/intron within core promoter of LPL gene is differentially methylated in patients with mutated and unmethylated CLL

In order to address whether the LPL gene can be regulated epigenetically through CpG methylation, we analyzed the CpG sites in the LPL gene. This analysis revealed CpG-rich sequences encompassing a classical CpG island of 1163 bp with 112 CpG dinucleotides. This region is located within the first exon and first intron of the LPL gene. To better characterize this CpG island we focused on the methylation status of CpG dinucleotides in two different regions (R1 = 248 bp, from + 87 bp to + 335 bp and R2 = 261 bp, from + 446 bp to + 707 bp) [Figures 1(A)–1(C)]. Methylation of the first exon is critical for transcriptional silencing [10]. In accordance with this, our initial results comparing methylation changes between these two regions in six CLL samples showed that the main differences appeared to be restricted to R1 (exon 1, CpG dinucleotides numbers 1–18) [Figure 1(C)]. Following this, 26 patients with CLL (14 Um expressing LPL and 12 mutated [Mut] negative for LPL mRNA, Supplementary Table I to be found online at <http://infor-mahealthcare.com/lal/doi/>

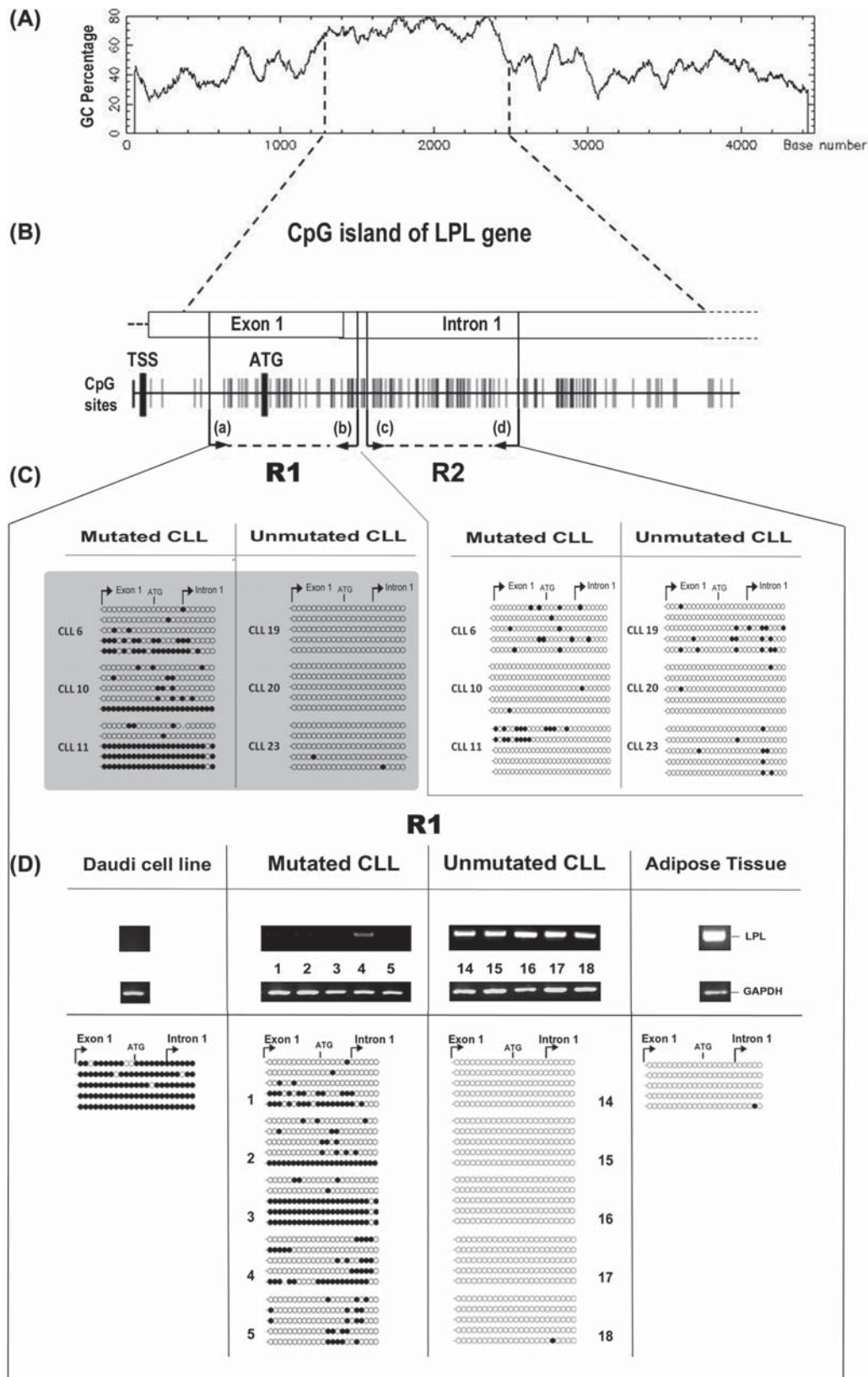


Figure 1. CpG island analysis of LPL gene in patients with CLL. (A) Localization of CpG island of LPL gene. The CpG island was defined as the region containing over 50% of CpG dinucleotides by EMBOSS/CpGPlot/CpGReport/Isochore software. (B) Schematic representation of exon 1 and intron 1 within CpG island of LPL gene. The position of exon 1, intron 1, transcription start site (TSS) and PCR primers for R1 and R2 are depicted as (a), (b), (c) and (d). (C) R1 and R2 profile methylation differences. Methylation analysis of R1- and R2-LPL regions was performed in six CLL cases (three Mut and three Um) in order to visualize the main changes in methylation status of both subsets. Shaded squares highlight the fact that major differences concerning the methylation profile are located in R1 and not R2. Each row represents one bacterial clone in which black and white circles represent methylated and unmethylated CpG dinucleotides, respectively. (D) Differential expression of LPL gene and methylation status in patients with Mut and Um CLL. Results from five representative patients with Mut (1-5) and five with Um (14-18) CLL, Daudi cell line and adipose tissue samples as negative and positive controls, respectively, are depicted. LPL mRNA expression evaluated by RT-PCR is shown in agarose gel stained with ethidium bromide. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was amplified in all cases as internal control. Methylation status evaluated by bisulfate sequencing of R1-LPL region is shown as lollipop diagrams. Each row represents one bacterial clone in which black and white circles represent methylated and unmethylated CpG dinucleotides, respectively.

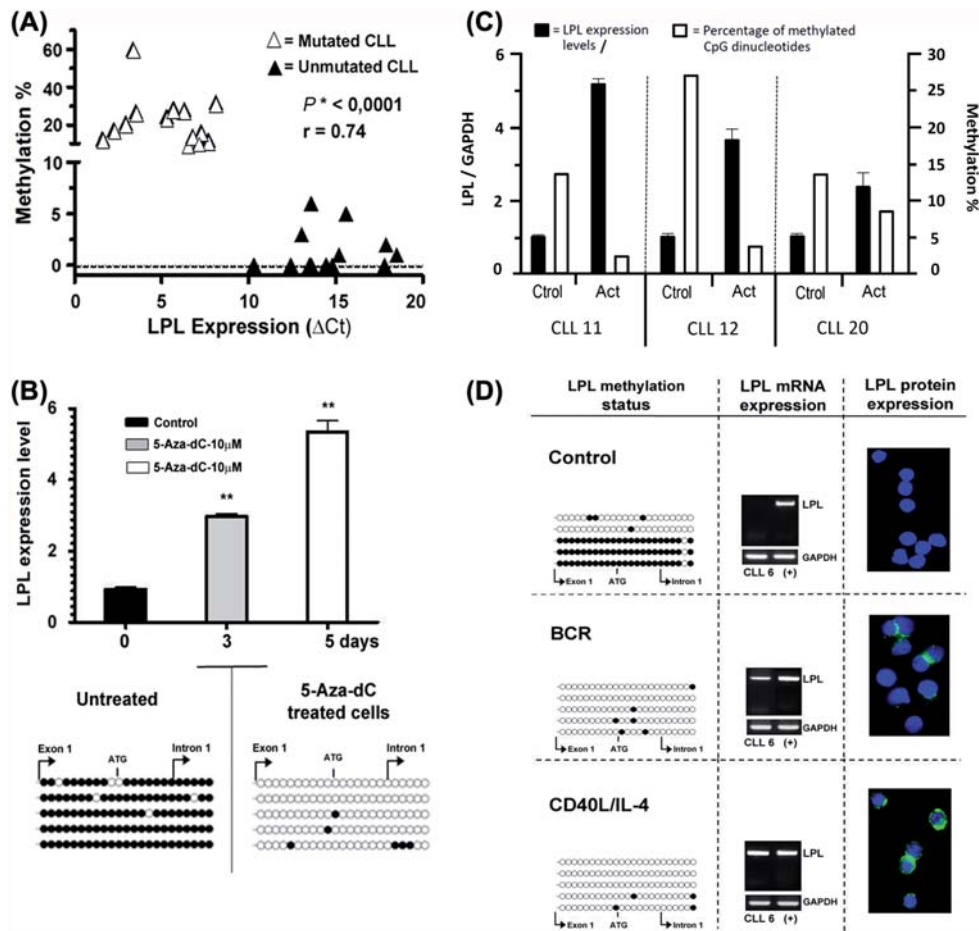


Figure 2. LPL expression and methylation change analysis after incubation with demethylated agents or microenvironment signals. (A) Correlation between LPL mRNA expression of 14 Mut and 12 Um CLL evaluated by quantitative reverse transcription PCR and methylation percentage in R1-LPL region. Statistical analysis indicating a significant correlation by Spearman's rank (p -values ≤ 0.001) is shown. In this case LPL expression was correlated to methylation status ($p < 0.00015$; Spearman's rank coefficient $p = 0.72$) in 26 CLL samples. (B) Activation of LPL expression and DNA demethylation after 5-Aza-dC treatment. LPL expression level ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) by QRT-PCR after 5-Aza-dC treatment on Daudi cell line is depicted (error bars indicate range factor difference). The histogram represents mean of three replicates (** $p < 0.01$ by unpaired two-tailed Student's t -test). DNA methylation status of R1-LPL region in untreated and treated cells by 5 days is shown. Black and white circles represent methylated and unmethylated cytosines, respectively, and each row represents one bacterial clone. (C) Autologous T cell activation on CLL B cells. Black bars depict LPL expression at mRNA levels in control cultures (Ctrl) and in stimulated T cell cultures (Act). Quantification was performed by QRT-PCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Expression levels of control samples were normalized to 1 as expression relative unit. White bars represent the percentage of methylated CpG dinucleotides in control and activated T cell cultures. (D) Representative CLL sample after stimulation with different microenvironment signals. LPL methylation status: DNA methylation profile of R1-LPL region before and after different activation signals. Each row represents one bacterial clone in which black and white circles represent methylated and unmethylated CpG dinucleotides, respectively. LPL mRNA expression: LPL expression by RT-PCR is depicted in agarose gel stained with ethidium bromide. Um/LPL(pos) CLL sample was used as positive control and GAPDH was used as endogenous control. LPL protein expression: protein expression was visualized by epifluorescence microscopy. Green: antibody anti-LPL, blue dye: DAPI. Successful activations with autologous T cells, CD40L/IL-4 and anti-BCR were corroborated by cytometry flow analysis with anti-CD19-PerCP, anti-CD25-PE anti-CD80-PE and anti-CD86-FITC.

10.3109/10428194.2013.796057) were analyzed by bisulfite DNA conversion and sequencing methodology focusing on R1 of the LPL CpG island [Figure 1(C)]. We found that Mut CLL cases that did not express, or expressed minimal levels of LPL mRNA had a methylated R1 profile. In contrast, Um CLL cases expressing higher levels of LPL mRNA displayed a demethylated profile of this region [Figure 1(D)]. Overall, these results suggest that differential methylation status is responsible for LPL gene expression in patients with Mut and Um CLL.

LPL expression correlates with methylated status of CpG island and depends on microenvironment signals

To confirm previous results linking LPL expression with demethylation status, we studied the LPL mRNA expression of these 26 patients with CLL by QRT-PCR. A significant

correlation ($p < 0.0001$) between LPL expression and demethylated status in patients with Um CLL and absence of LPL expression and methylated status in patients with Mut CLL [Figure 2(A)] was found. To further analyze the epigenetic mechanism of LPL expression we exposed LPL-negative Daudi cells to 5-Aza-dC, a DNA methyltransferase inhibitor. Results showed that exposure to this drug triggered mRNA LPL expression at significant levels compared with untreated cells (3 and 5 days, $p < 0.01$), and was also able to induce demethylation of the R1-LPL region [Figure 2(B)]. These data confirm that demethylation in exon 1/intron 1 of the LPL gene is correlated with the expression of this prognostic marker in leukemic CLL B-cells. Additionally, we queried whether LPL anomalous expression in leukemic B-cells could be related to the microenvironment signals. To obtain deep

insight into this hypothesis, PBMCs from three LPL-negative samples were incubated with or without autologous T-cells, activated through T cell receptor (TCR) cross-linking. After 4 days, CD19/CD5 positive cells were purified, for LPL mRNA expression and methylation status of the R1-LPL region were evaluated. As depicted in Figure 2(C), we found that following autologous T cell activation, the leukemic clone expressed LPL and altered the methylation status of the R1-LPL region to a mostly unmethylated pattern. To confirm this result we also stimulated another six LPL-negative samples through CD40 and IL-4 receptors or through the BCR. Both activation protocols were able to induce LPL mRNA and protein expression, and this was associated with DNA demethylation of the R1-LPL region. Results for a representative patient with LPL-negative CLL with or without stimulation are shown in Figure 2(D). Overall, these results suggest that LPL expression in CLL is related to proliferative microenvironment signals that appear to induce a demethylation process in the leukemic clone.

Discussion

Although it has traditionally been assumed that CLL is the consequence of long-lived tumor cell accumulation, evidence indicates that disease evolution results from the balance between proliferating cells in a specialized tissue microenvironment and circulating cells resisting apoptosis [13]. This equilibrium is finely tuned by a set of surface molecules expressed by CLL B cells and modulated in response to environment signals [14].

Since there is no expression of LPL in normal B cells, the presence of high levels of LPL in Um CLL B cells is a very interesting issue. This anomalous expression not only constitutes a suitable prognostic marker for the disease but could also be helpful to understand the heterogeneous proliferative behavior of CLL B cells.

At a physiological level, the largest expression of the LPL gene has been reported in adipose tissue, skeletal muscle, heart tissue, dendritic cells and CD33 myeloid cells [9]. LPL is a protein located on the luminal side of the wall vessels, where it is anchored to heparan sulfate proteoglycans and contains binding sites for heparan sulfate chains and apoproteins [15]. Furthermore, LPL has a bridging function in the formation of a trimolecular complex including a lipoprotein particle, LPL and heparan sulfate proteoglycans from different cells [15]. This is an interesting characteristic of LPL because, independent of its catalytic function, LPL expression in patients with Um CLL may be associated with cell spreading and the migratory capacity of the proliferative cell subset [5,15]. If this is the case, LPL might also act as a cross-talk factor, facilitating specific interactions with accessory cells in the tissue microenvironment.

The results presented here link tumor cell proliferation with epigenetic changes on the CpG island of LPL DNA, suggesting that LPL expression in CLL is related to microenvironment signals that appear to induce a demethylation

process in the leukemic clone. These data are supported by the fact that anomalous LPL expression is a hallmark of patients with Um CLL.

In conclusion, this work shows that an epigenetic mechanism, triggered by the microenvironment, is responsible for the anomalous LPL expression in patients with Um CLL.

Acknowledgements

We wish to thank Dr. Miquel Llobera for critical comments, Dr. J. Brunzell for the anti-LPL antibody and Mrs. Ivana Facchini for helpful secretarial assistance.

Potential conflict of interest: Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at www.informahealthcare.com/lal.

This work was supported by grants from CHLCC (Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer).

References

- [1] Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-1854.
- [2] Oppezzo P, Vasconcelos Y, Settegrana C, et al. The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005;106:650-657.
- [3] Heintel D, Kienle D, Shehata M, et al. High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005;19:1216-1223.
- [4] Sevov M, Kaderi M, Kanduri M, et al. A comparative study of RNA-based markers in chronic lymphocytic leukemia reveals LPL as a powerful predictor of clinical outcome. *Haematologica* 2009;94:1-95.
- [5] Mansouri M, Sevov M, Fahlgren E, et al. Lipoprotein lipase is differentially expressed in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia but displays invariably low catalytic activity. *Leuk Res* 2010;34:301-306.
- [6] Van Bockstaele F, Pede V, Janssens A, et al. Lipoprotein lipase mRNA expression in whole blood is a prognostic marker in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Chem* 2007;53:204-212.
- [7] van't Veer MB, Brooijmans AM, Langerak AW, et al. The predictive value of lipoprotein lipase for survival in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006;91:56-63.
- [8] Kaderi MA, Kanduri M, Buhl AM, et al. LPL is the strongest prognostic factor in a comparative analysis of RNA-based markers in early chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2011;96:1153-1160.
- [9] Bilban M, Heintel D, Scharl T, et al. Deregulated expression of fat and muscle genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia with high lipoprotein lipase expression. *Leukemia* 2006;20:1080-1088.
- [10] Brenet F, Moh M, Funk P, et al. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS One* 2011;6:e14524.
- [11] Oppezzo P, Dumas G, Lalanne AI, et al. Different isoforms of BSAP regulate expression of AID in normal and chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2005;105:2495-2503.
- [12] Borge M, Nannini PR, Morande PE, et al. CXCL12 is a costimulator for CD4(+) T cell activation and proliferation in chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62:113-124.
- [13] Chiorazzi N. Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:399-413.
- [14] Burger JA. Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): from understanding the basics towards therapeutic targeting. *Semin Cancer Biol* 2010;20:424-430.
- [15] Kolset SO, Salmivirta M. Cell surface heparan sulfate proteoglycans and lipoprotein metabolism. *Cell Mol Life Sci* 1999;56:857-870.

Supplementary material available online

Table showing clinical and molecular characteristics of patients

ARTÍCULO 2

LIPOPROTEIN LIPASE EXPRESSION IN UNMUTATED CLL PATIENTS IS THE CONSEQUENCE OF A DEMETHYLATION PROCESS INDUCED BY THE MICROENVIRONMENT.

Pilar Moreno ^{1,6,8}, Cecilia Abreu ^{1,8}, Mercedes Borge ², Florencia Palacios ¹, Pablo Morande ², Mariana Pegazzano ¹, Sergio Bianchi ³, Ana Inés Landoni ⁴, Ruben Agrelo ⁵, Mirta Giordano ², Guillermo Dighiero ¹, Romina Gamberale ² and Pablo Opezzo ^{1,7}

1 Recombinant Protein Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; 2 Immunology Department, Institute of Experimental Medicine (IMEX)-CONICET, National Academy of Medicine, Buenos Aires, Argentina; 3 Biophysics Protein Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; 4 Service of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Hospital Maciel, Montevideo, Uruguay; 5 Epigenetics of Cancer and Aging Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; 6 Molecular Virology Laboratory, School of Science, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay and 7 Immunobiology Department, School of Medicine, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

8 These authors contributed equally to this work

Leukemia (2013) 27, 721–725; doi:10.1038/leu.2012.212

LETTER TO THE EDITOR

Lipoprotein lipase expression in unmutated CLL patients is the consequence of a demethylation process induced by the microenvironment

Leukemia advance online publication, 14 August 2012;
doi:10.1038/leu.2012.212

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) can be defined as a low-grade B-cell tumor with antigen-experienced monoclonal CD5⁺ B cells that, having escaped programmed cell death and undergone cell cycle arrest in the G0/G1 phase, relentlessly accumulate in lymphoid organs and circulate into the peripheral blood.¹ This leukemic B-cell accumulation results from a complex balance between activation of cell proliferation and inhibition of apoptotic death.² During the past few years, several new prognostic markers have emerged in CLL. Among them, the mutational status of the immunoglobulin heavy-chain variable (*IGHV*) genes is considered one of the strongest.³ Results from gene expression profile in CLL led us to propose that expression of the lipoprotein lipase (*LPL*) gene could constitute a suitable surrogate marker of the mutational status of *IGHV*.⁴ Despite the usefulness of *LPL* for CLL prognosis,^{5–8} its functional role and the molecular mechanism regulating its expression remain elusive as yet.

LPL has a central role in lipid metabolism by catalyzing the hydrolysis of chylomicrons and very-low-density lipoproteins. In addition to its catalytic function, *LPL* acts as a bridging protein between cell surface proteins and lipoproteins, by increasing the contact between monocytes and endothelial cell surface through its interaction with heparan sulfate proteoglycans.⁹ In CLL B cells, *LPL* expression has been related to functional pathways involved in fatty acid degradation and signaling, which may influence CLL biology and clinical outcome.¹⁰

There is increasing evidence that regulation of gene expression during normal lymphocyte development is mediated through changes in chromatin structure and/or through the methylated patterns of CpG islands. Tissue-specific patterns of methylated cytosine residues can be altered by environmental factors, and are often abnormal in tumor disorders.^{11,12}

To gain insight into the molecular mechanisms responsible for the high *LPL* expression in Unmutated (Um) CLL B cells, we investigated: (a) the methylation status of the CpG island from this gene in 26 CLL cases and (b) the possibility that *LPL* expression could be related to specific signals delivered from an activated CLL microenvironment.

In a first step, we analyzed the CpG sites in the *LPL* gene. This analysis revealed CpG-rich sequences encompassing a CpG island of 1163 bp with 112 CpG dinucleotides. This area includes a region within the first exon and the first intron of the *LPL* gene. To better characterize this CpG island, we focused on methylation status of CpG dinucleotides in two different regions (R1 = 248 bp, from +87 bp to +335 bp and R2 = 261 bp, from +446 bp to +707 bp). Our results comparing methylation changes between R1 and R2 region in preliminary six CLL samples showed that the main differences appeared to be restricted to exon 1 (CpG dinucleotides number 1–18) and to the first region of intron 1 (CpG dinucleotides number 19–23) (Supplementary Figures 1A–C). Importance of the DNA methylation in the first exon has been

recently linked to transcriptional gene expression.¹¹ To confirm these results, we performed methylation analysis on the R1 region of *LPL*-CpG island in 26 CLL patients, 14 Um/*LPL*-positive CLLs and 12 mutated (Mut)/*LPL*-negative patients (clinical and molecular CLL characterization is shown in Supplementary Table 1). All samples were analyzed following bisulphite DNA conversion, methylation-specific primer-PCR and confirmed by PCR amplification, cloning and sequencing of bisulphite DNA corresponding to R1-*LPL* region (Material and Methods available as Supplementary Material online). Results have shown that Mut CLL samples and Daudi Human Burkitt's lymphoma cell line (negative control) did not express, or expressed minimal levels of *LPL* mRNA. In contrast, Um CLL cases expressed high levels of *LPL* mRNA, though lower than adipocyte cells (AT) (Figure 1a). Interestingly, a different methylation pattern between Um and Mut CLL samples has been found (Figures 1b and c), suggesting that differential methylation status is responsible for *LPL* gene expression in Mut and Um CLL patients. To confirm these results, we studied *LPL* mRNA expression of these 26 CLL patients by quantitative reverse transcription PCR and correlated *LPL* expression to the analysis of methylation status by bisulphite sequencing. Results showed a significant correlation ($P < 0.0001$) between *LPL* expression and demethylated status in Um CLL patients and absence of *LPL* expression and methylated status in Mut CLL patients (Figure 1d). To further characterize this observation, *in vitro* treatment with DNA methyltransferase inhibitor 5-Aza-dC on Daudi cell line was performed. Results showed that exposure to this drug triggered *LPL* mRNA expression at significant levels compared with untreated cells and that 5-Aza-dC was capable to induce a clear demethylation of R1-*LPL* region (Supplementary Figure 2). Overall, these data confirm that demethylation in Exon 1/Intron 1 of *LPL* gene correlates with *LPL* expression in leukemic CLL B cells.

Previous work suggests that lipid metabolism activation is associated with high *LPL* expression in Um and progressive CLL patients.¹³ Therefore, we investigated whether this anomalous expression could be related with proliferative microenvironment signals delivered to the leukemic clone. For this, we stimulated PBMC from six *LPL*-negative patients with CD40 ligand plus IL-4, anti-IgM, CpG-ODN or Pam3CSK4, (see Material and Methods in Supplementary Data). Activation through CD40/IL-4 was able to induce high expression of *LPL* gene at mRNA and protein levels (Figures 2b and c). Accordingly, this expression was associated with both, DNA demethylation of R1-*LPL* region and with proliferation of CLL B cells as evidenced by Ki-67 protein expression (Figures 2a and d). Stimulation through the BCR also increased *LPL* expression and demethylation of R1-*LPL* region in four out of six CLL samples, as well as Ki-67 protein expression in three of them. In contrast, stimulation through TLR receptors did not result in DNA demethylation and Ki-67 protein expression, nor induced *LPL* expression in any of the six samples evaluated (Supplementary Figures 3A–C). Results from one representative *LPL*-negative CLL patient before and following these different stimulations are shown in Figure 2. To better characterize these results, we evaluated whether *LPL* methylation status and *LPL*

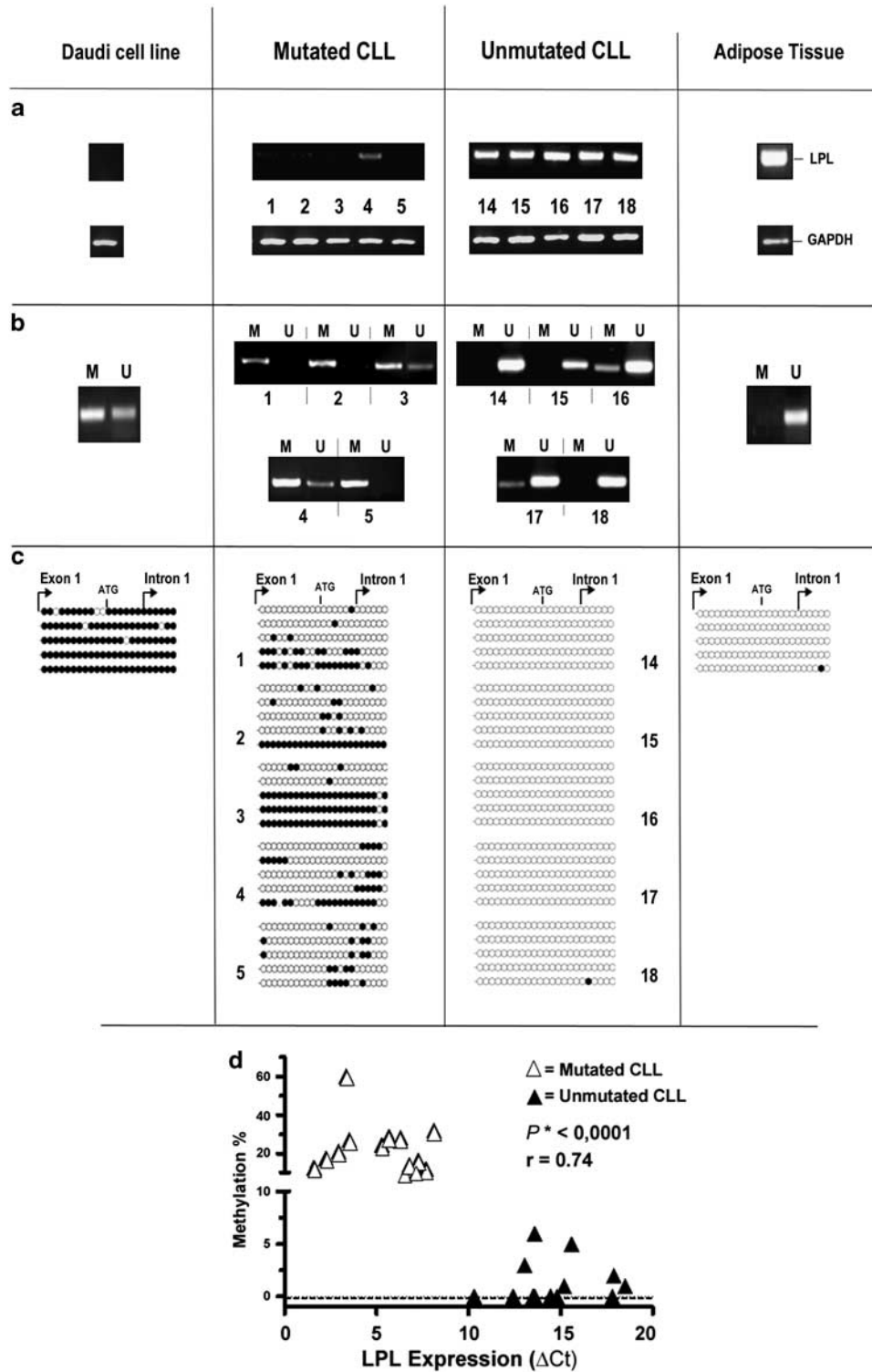


Figure 1. Differential expression of *LPL* gene and methylation status in Mut and Um CLL patients. (a–c) Results from five Mut (1–5) and five Um (14–18) representative CLL patients, Daudi cell line and adipose tissue samples as negative and positive controls, respectively, are depicted. (a) *LPL* mRNA expression evaluated by RT-PCR is shown in agarose gel stained with ethidium bromide. GAPDH was amplified in all cases as internal control. (b) Methylation-specific PCR analysis for R1-*LPL* region. U, unmethylated and M, methylated. (c) Results of bisulphite sequencing of R1-*LPL* region. Each row represents one bacterial clone in which black and white circles represent methylated and unmethylated CpG dinucleotides, respectively. (d) Correlation between *LPL* mRNA expression of 14 Mut and 12 Um CLL patients evaluated by quantitative reverse transcription PCR and methylation percentage in R1-*LPL* region is shown. Statistical analysis indicating a significant correlation (*) by Spearman's rank test where P -values are ≤ 0.001 is shown. In this case for *LPL*, expression correlated to methylation status $P < 0.00015$; Spearman's rank coefficient $P = 0.72$.

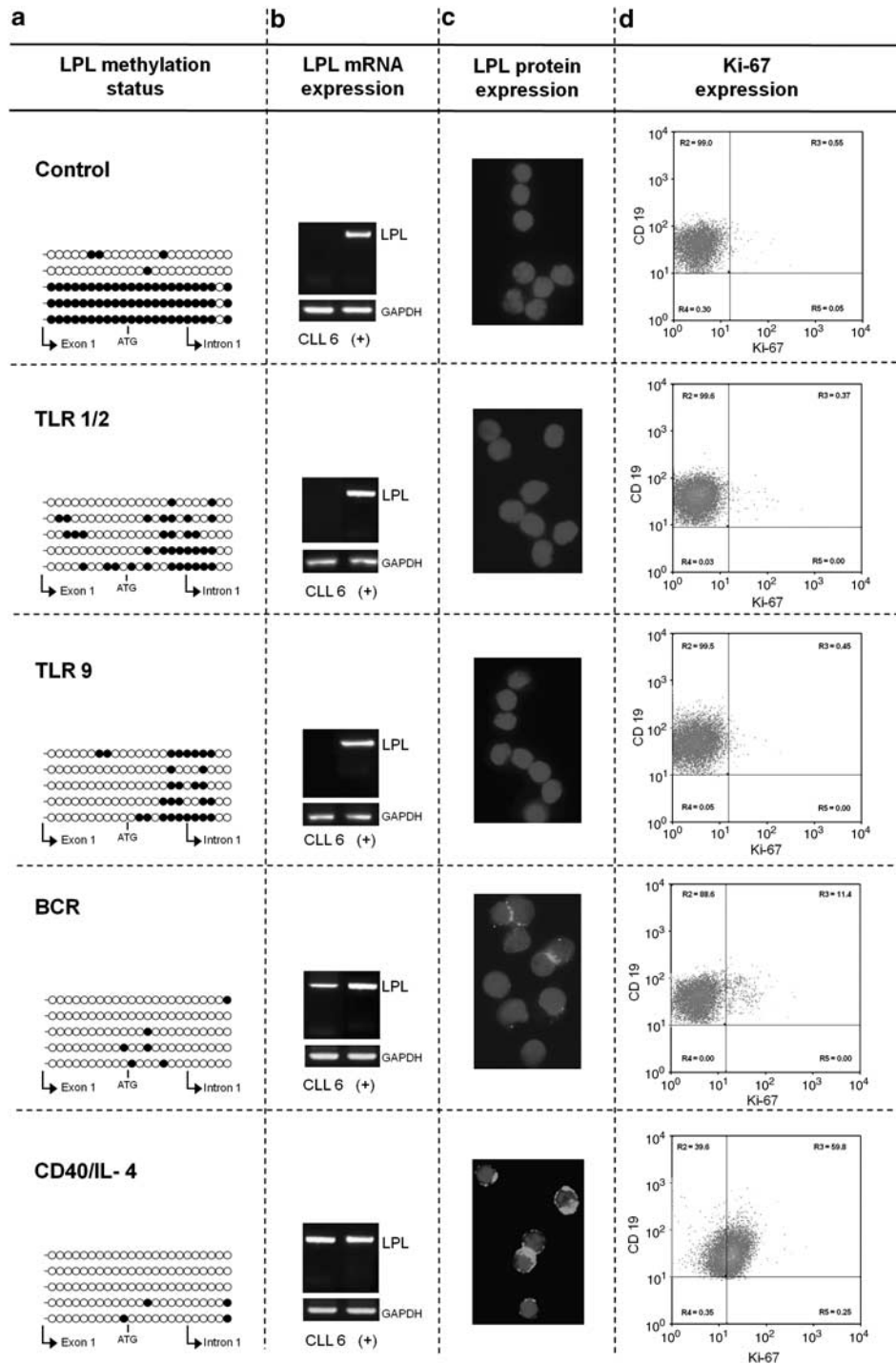


Figure 2. Representative CLL patient after stimulation with different microenvironment signals. (a) DNA methylation profile of R1-LPL region of CLL number 6 before and after different activation signals. Each row represents one bacterial clone in which black and white circles represent methylated and unmethylated CpG dinucleotides, respectively. (b) LPL mRNA expression by RT-PCR. LPL expression is depicted in agarose gel stained with ethidium bromide. Um/LPL^(pos) CLL was used as positive control and GAPDH was used as endogenous control. (c) LPL protein expression in CLL patient. Protein expression was visualized by epifluorescence microscopy in Mut/LPL^(neg) CLL B cells and in the same CLL case after different stimulations. Green: antibody anti-LPL, blue dye: DAPI. (d) Evaluation of Ki-67 expression. Cytometry assays displaying Ki-67 and CD19 expression in CLL patient (Mut/LPL^(neg) number 6). Cell populations were discriminated by forward scattering and later B lymphocytes were discriminated by gating CD19 subset. The color reproduction of this figure is available at the *Leukemia* journal online.

expression in CLL B cells could be also affected by their interaction with autologous-activated T cells. To this aim, PBMC from two negative LPL CLL samples and one weak positive CLL sample were stimulated with immobilized anti-CD3 for 4 days. We found that

both negative cases became positive for LPL mRNA after autologous T-cell activation, whereas the weakly positive CLL sample slightly enhanced LPL expression. Moreover, the methylation status of R1-LPL region turned into a mostly unmethylated

pattern of CpG dinucleotides (methylation % in Supplementary Figure 3D), confirming previous results obtained with recombinant CD40L and IL-4. Graphics and statistical analysis of the six stimulated CLL samples with the different signals and of the three CLL activated with autologous T cells are provided in the Supplementary Figure 3. Overall, these results link tumoral cell proliferation to a demethylation process in the CpG island of LPL DNA and suggest that expression of this gene in CLL could be related to specific proliferative microenvironment signals.

Evidences indicate that CLL evolution results from the balance between proliferating cells in specialized tissue microenvironment and circulating cells resisting apoptosis.² This equilibrium is finely tuned by a set of surface molecules expressed by CLL B cells and modulated in response to environment signals.¹⁴ High expression of *LPL* gene in Um CLL B cells constitutes an unexpected observation. This specific and anomalous expression constitutes not only a suitable prognostic marker in CLL, but could also help to understand the heterogeneous behavior of this disease. LPL has a bridging function in the formation of a trimolecular complex (lipoprotein particle, LPL and heparan sulfate proteoglycans).⁹ This role is a very interesting characteristic, because in addition to its catalytic function, LPL expression in Um CLL patients might be associated with the migratory capacity of a tumoral proliferative cell subset. If true, LPL might also act as a crosstalk factor facilitating specific interactions with accessory cells in the tissue microenvironments. The expression of this protein in concert with integrins, such as CD49d, antiapoptotic molecules (BCL2) as well as chemokines (CCL3, CCL4, CXCL12), implicated in the activation of CLL proliferative pool,^{14,15} could be responsible for a circular activation loop in which the leukemic clone is continuously nourished.

The role that abnormal LPL expression could have in disease evolution, has been also addressed by previous work from Pallash *et al.*,¹⁰ demonstrating that lipase-associated genes and triglyceride-specific lipase activity were increased when comparing CLL B cells to normal CD5⁺ B cells. The same authors suggest that lipid metabolism and lipase activity may be functionally relevant in aggressive CLL.¹⁰ Our results showing proliferation of the tumoral clone associated with demethylation and subsequent LPL expression support these results and highlight the idea that *LPL* gene could constitute a potential therapeutic target in Um CLL cases.

In conclusion, by comparing methylation changes in the LPL-CpG island between Um and Mut CLL patients, we demonstrate a clear association between LPL expression and a demethylation process in the CpG island of the *LPL* gene. This process can be induced in the leukemic clone by specific microenvironment signals, delivered by CD40L/IL-4 and anti-IgM, but not by T-independent related signals delivered through Toll-like receptors. Overall, these results suggest that an epigenetic mechanism, triggered by the microenvironment, regulates LPL expression in CLL B cells.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from CHLCC (Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer) and ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación), Montevideo, Uruguay. We wish to thank Gonzalo Obal, Gonzalo Moratorio and Cecilia Portela for technical assistance, Dr Otto Pritsch and Dr Miquel Llobera for critical comments, Dr J Brunzell for anti-LPL antibody and Mrs Ivana Faccini for helpful secretarial assistance.

Supplementary Information accompanies the paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

P Moreno^{1,6,8}, C Abreu^{1,8}, M Borge², F Palacios¹, P Morande², M Pegazzano¹, S Bianchi³, AI Landoni⁴, R Agrelo⁵, M Giordano², G Dighiero¹, R Gamberale² and P Oppezzo^{1,7}

¹Recombinant Protein Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay;

²Immunology Department, Institute of Experimental Medicine (IMEX)-CONICET, National Academy of Medicine, Buenos Aires, Argentina;

³Biophysics Protein Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay;

⁴Service of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Hospital Maciel, Montevideo, Uruguay;

⁵Epigenetics of Cancer and Aging Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay;

⁶Molecular Virology Laboratory, School of Science, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay and

⁷Immunobiology Department, School of Medicine, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

E-mail: poppezzo@pasteur.edu.uy

⁸These authors contributed equally to this work.

REFERENCES

- Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2008; **371**: 1017–1029.
- Caligaris-Cappio F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; **123**: 380–388.
- Zenz T, Fulda S, Stilgenbauer S. More (on) prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2010; **51**: 5–6.
- Oppezzo P, Vasconcelos Y, Settegrana C, Jeannel D, Vuillier F, Legarff-Tavernier M *et al.* The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005; **106**: 650–657.
- Heintel D, Kienle D, Shehata M, Krober A, Kroemer E, Schwarzingler I *et al.* High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005; **19**: 1216–1223.
- Sevov M, Kaderi M, Kanduri M, Mansouri, Buhl A, Cahill N *et al.* A comparative study of RNA-based markers in chronic lymphocytic leukemia reveals LPL as a powerful predictor of clinical outcome. *Haematologica* 2009; **94**(Suppl 3): 1–95.
- Van Bockstaele F, Pede V, Janssens A, Callewaert F, Offner F, Verhasselt B *et al.* Lipoprotein lipase mRNA expression in whole blood is a prognostic marker in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Chem* 2007; **53**: 204–212.
- Kaderi MA, Kanduri M, Buhl AM, Sevov M, Cahill N, Gunnarsson R *et al.* LPL is the strongest prognostic factor in a comparative analysis of RNA-based markers in early chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2011; **96**: 1153–1160.
- Kolset SO, Salmivirta M. Cell surface heparan sulfate proteoglycans and lipoprotein metabolism. *Cell Mol Life Sci* 1999; **56**: 857–870.
- Pallasch CP, Schwamb J, Konigs S, Schulz A, Debey S, Kofler D *et al.* Targeting lipid metabolism by the lipoprotein lipase inhibitor orlistat results in apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2008; **22**: 585–592.
- Brenet F, Moh M, Funk P, Feierstein E, Viale AJ, Socci ND *et al.* DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS One* 2011; **6**: e14524.
- Watanabe M, Ogawa Y, Itoh K, Koiwa T, Kadin ME, Watanabe T *et al.* Hypomethylation of CD30 CpG islands with aberrant JunB expression drives CD30 induction in Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma. *Lab Invest* 2008; **88**: 48–57.
- Bilban M, Heintel D, Scharl T, Woelfel T, Auer MM, Porpaczky E *et al.* Deregulated expression of fat and muscle genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia with high lipoprotein lipase expression. *Leukemia* 2006; **20**: 1080–1088.
- Burger JA. Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): from understanding the basics towards therapeutic targeting. *Semin Cancer Biol* 2010; **20**: 424–430.
- Palacios F, Moreno P, Morande P, Abreu C, Correa A, Porro V *et al.* High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood* 2010; **115**: 4488–4496.

La LLC es una enfermedad con una evolución clínica sumamente heterogénea, con pacientes que presentan una sobrevida que oscila entre meses y décadas. La necesidad de distinguir los pacientes que presentan un enfermedad indolente, de aquellos que van a mostrar una progresión hacia una forma agresiva de LLC, ha llevado a la búsqueda exhaustiva de marcadores genéticos y/o moleculares que ayuden a predecir la evolución clínica de la enfermedad. En esta búsqueda, la expresión del ARNm de *LPL* se ha posicionado como el mejor marcador a nivel de ARNm de la evolución clínica de la LLC (Kaderi et al. 2011). Sin embargo, y a pesar de su importancia en la predicción evolutiva en esta leucemia, el origen de la expresión anómala de *LPL* en el linfocito B leucémico no ha sido aún dilucidado. Teniendo en cuenta que no hay expresión de *LPL* en células B normales, la presencia de altos niveles de esta molécula en células B de pacientes NM de LLC es un fenómeno muy interesante. Su expresión anormal no solo constituye un buen marcador pronóstico para la enfermedad sino que también puede ayudar a entender la heterogeneidad en la proliferación de las células de LLC.

Al comenzar este trabajo de tesis, el único estudio que se había realizado en cuanto a la regulación de la expresión de *LPL* en la LLC, era el trabajo de Pallasch y col. (Pallasch et al. 2008). Si bien, los datos aportados en ese manuscrito sugieren que la expresión de *LPL* en células de LLC es resultado de la activación del BCR, no existía ningún trabajo investigando el mecanismo molecular subyacente a la expresión de esta molécula en el linfocito leucémico. En este contexto es que nos propusimos ahondar en los mecanismos que llevan a la expresión anómala de *LPL* en los pacientes con mal pronóstico en la LLC.

Numerosas evidencias indican que la regulación de la expresión génica durante el desarrollo normal del linfocito está mediada por cambios en la estructura de la cromatina y/o de patrones de metilación de islas CpG. A su vez, en muchos tipos de cáncer incluida la LLC, la regulación a través de la metilación anormal del ADN ha mostrado tener un papel importante en la desregulación de genes relevantes para la célula tumoral. Teniendo en cuenta además, que otro gen importante en el pronóstico de esta neoplasia, ZAP-70, es regulado por un proceso epigenético de metilación (Corcoran et al. 2005) es que decidimos investigar la presencia de islas CpG en el gen *LPL* y determinar por la técnica de secuenciación de ADN tratado con bisulfito de sodio si estas islas podrían estar o no diferencialmente metiladas.

Nuestros primeros resultados a nivel bioinformático muestran la presencia de una isla CpG en la región del primer exón/intrón del gen *LPL*. Esta zona rica en dinucleótidos CpG se dividió en dos regiones con el objetivo de lograr un mejor análisis de su nivel de metilación. Al realizar la comparación de ambas regiones (mencionadas como R1 y R2 en artículo n° 1) entre pacientes NM y Mut de LLC, encontramos que el nivel de metilación de R1 está altamente correlacionada con el nivel de expresión de ARNm de *LPL* (Figura 1D, artículo n°1). Los pacientes Mut con baja o ninguna expresión de ARNm de *LPL* muestran la región R1 con un alto porcentaje de nucleótidos CpG metilados, mientras que aquellos pacientes NM expresando altos niveles de *LPL* muestran una ausencia casi total de nucleótidos CpG metilados en esta región.

Dado que las células de LLC mueren rápidamente cuando son puestas en cultivo sin estímulos o células accesorias, nos fue técnicamente imposible desmetilar *in vitro* células de pacientes Mut usando un agente demetilante como la 5-Aza-2'-deoxicitidina y verificar si estos pacientes eran capaces de expresar el ARNm de *LPL* luego de este tratamiento. De modo alternativo, identificamos una línea celular B negativa para el ARNm de *LPL*. Esta línea celular conocida como Daudi, es una línea estabilizada a partir de células de un paciente con un linfoma de Burkitt y que al no expresar el *LPL* era una opción muy interesante para evaluar la hipótesis planteada en este primer trabajo, de que la expresión del ARNm de *LPL* en un linfocito tumoral estaba regulada por un proceso de metilación.

En este contexto, evaluamos la región R1 y comprobamos que se encontraba totalmente metilada en las células Daudi (Figura 2B, artículo n°1). Interesantemente, luego del tratamiento con la 5-Aza-2'-deoxicitidina fuimos capaces de desmetilar esta región y promover la expresión del ARNm de *LPL* en esta línea celular.

Todos estos datos, estarían indicando que la desmetilación del gen sería el mecanismo molecular responsable de la expresión anómala de *LPL* en los pacientes progresores (NM) con LLC.

Pallasch y col. sugieren en 2008 que la expresión de *LPL* podría estar relacionada con el metabolismo lipídico ya que, las células de LLC presentan más actividad lipasa que células B normales y el inhibidor de lipasas orlistat induce la apoptosis de las células leucémicas. Conectando así alteraciones en el metabolismo lipídico con la patogénesis de la LLC y sugiriendo a *LPL* como un blanco terapéutico (Pallasch et al. 2008). Sin embargo dos años más tarde, en contraposición con estos resultados se describe que dentro de los pacientes de LLC los que presentan un perfil NM tienen menor actividad lipolítica a pesar de tener altos niveles de expresión de *LPL* (Mansouri et al. 2010). Esto estaría en concordancia con la idea de que esta enzima estaría involucrada en procesos distintos al del metabolismo lipídico. Dada la capacidad de *LPL* de formar complejos trimoleculares entre moléculas de distintas células, Mansouri y col proponen que la expresión de *LPL* en la LLC podría no estar tan relacionada con su metabolismo lipídico sino con una función no catalítica, como podría ser la de facilitar la migración de las células de LLC y/o su interacción con otras células.

Teniendo en cuenta que *LPL* se expresa en pacientes NM y con mal pronóstico, nos propusimos determinar y profundizar sobre que señales propias de las células NM de LLC podrían estar activando el proceso de desmetilación de la región R1 y en consecuencia provocando la expresión anómala del gen *LPL* en el clon leucémico. Nuestra hipótesis de trabajo fue la siguiente:

La expresión del gen *LPL* en células B de pacientes progresores con LLC es en parte consecuencia de la presencia de estas células en microambientes tumorales activados, donde las células de LLC mantienen contactos con células accesorias del tipo "nurse like cells", células estromales y linfocitos T. Un microambiente tumoral activador parece ser a su vez, el sitio propicio para la expresión de *LPL*, el cual ya sea a través de su función catalítica o mediadora de interacciones intercelulares puede favorecer la capacidad de proliferación del clon tumoral y así podría explicarse su correlación con el perfil clínico de mal pronóstico encontrado en los pacientes con genes *IGHV* no mutados.

Los resultados de la tesis publicados en este campo, mostraron que la expresión de *LPL* puede ser inducida en el clon leucémico por señales del microambiente específicas, como ser CD40/IL-4 y anti-IgM, pero no por señales T-independientes entregadas a través de receptores TLR. Las activaciones a través de CD40/IL-4R así como del BCR, son capaces de inducir la expresión de *LPL* tanto a nivel de ARNm como de proteína. En consecuencia con los resultados descritos

anteriormente, esta expresión se correlacionó con la desmetilación de la región R1 del gen *LPL* e interesantemente con la proliferación de las células B de LLC evidenciada por un aumento en los niveles de Ki-67 (Figura 2, artículo n° 2). En el mismo sentido, el cultivo de células de LLC *LPL*-negativas con células T autólogas activadas mostró ser capaz de desmetilar al gen *LPL* y activar su expresión, confirmando los datos previamente obtenidos con CD40L/IL-4. Estudios adicionales nos permitieron evidenciar como una estimulación independiente de células T, generada a través de receptores TLR no logró desmetilar la isla CpG de *LPL* ni inducir su expresión, así como tampoco indujo la proliferación de las células. En conjunto, estos resultados relacionan la proliferación de las células de LLC con un proceso de desmetilación de la isla CpG de *LPL* y sugieren que la expresión de este gen podría estar relacionada con señales específicas del microambiente.

Estos datos en su conjunto, nos llevan a especular sobre la posible función que *LPL* está cumpliendo en las células B de LLC. Nuestros resultados dejan abierta la posibilidad de que la expresión de *LPL* en los pacientes progresores tenga diferentes funciones: **a)** otorgar al clon leucémico energía adicional para su proliferación, luego de recibir señales específicas de un microambiente inmunológico activado, **b)** actuar como un puente intercelular, formando complejos a través de la interacción con moléculas de la superficie de otras células, creándose en consecuencia una retroalimentación positiva que lleva a una proliferación anómala.

En suma, estos resultados sugieren que un mecanismo epigenético, desencadenado por el microambiente tumoral, regula la expresión de *LPL* en las células de pacientes progresores con LLC.

3.2 Perfil de metilación de ADN de una sub-población leucémica proliferante AID^{pos} y su contraparte quiescente AID^{neg}

Recientemente nuestro grupo describió una población proliferante dentro del clon tumoral de LLC que corresponde a un sub-grupo de células B con un activo proceso de cambio de clase y que sobre-expresan la enzima AID (IgG^{pos}AID^{pos}), además de moléculas relacionadas con proliferación y anti-apoptosis (Ver Anexo III (Palacios et al., 2010)). Durante el transcurso de esta tesis, nuestro grupo estudió la expresión de ARNm y miRNAs de esta sub-población en comparación con su contraparte quiescente, revelando que existen múltiples moléculas diferencialmente expresadas (Ver Anexo III (Palacios et al., 2014)). Los resultados de estos trabajos nos sugieren la existencia de una regulación génica diferencial entre las distintas sub-poblaciones de un mismo paciente. Dado que solo una de estas sub-poblaciones expresa la enzima AID y teniendo en cuenta los datos antes mencionados sobre la implicancia de AID en la regulación epigenética (ver introducción) se decidieron estudiar los perfiles de metilación en la población proliferante AID positiva y su contraparte, la sub-población quiescente AID negativa.

3.2.1 Aislamiento de una población proliferante IgG^{pos}AID^{pos} y su contraparte quiescente IgM^{pos}AID^{neg}

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de siete pacientes de LLC NM con una evolución clínica desfavorable se marcaron con anticuerpos específicos anti-IgG y anti-IgM, ambos conjugados a fluoróforos, y se procedió a aislar las poblaciones IgM^{pos} e IgG^{pos} + IgG^{pos}IgM^{pos} mediante citometría de flujo. Como puede observarse en el plot de citometría de la figura 3.2.1, los pacientes presentan células con una marcación simultánea de IgG e IgM. En un trabajo previo de nuestro laboratorio y en el marco de esta tesis se aislaron las sub-poblaciones IgG^{pos} e IgG^{pos}IgM^{pos}, confirmándose que ambas fracciones celulares presentan sobre-expresión de AID y de moléculas relacionadas con proliferación y anti-apoptosis. En particular una sobre-expresión de Ki-67, del oncogen c-myc y de la proteína anti-apoptótica Bcl2, así como una disminución del regulador negativo del ciclo celular p27 (Ver Anexo III (Palacios et al., 2010)). Por

lo tanto, al momento de la separación por “cell sorter” de las sub-poblaciones de interés se seleccionaron las células $IgG^{pos} + IgG^{pos}IgM^{pos}$ como la fracción proliferante. Las células aisladas se procesaron utilizando TRI-Reagent, lo cual permitió extraer tanto el ARN como el ADN y las proteínas de las muestras. Luego de la separación celular se confirmó mediante amplificación por PCR que la expresión de la enzima AID estaba restringida a las células $IgG^{pos} + IgG^{pos}IgM^{pos}$.

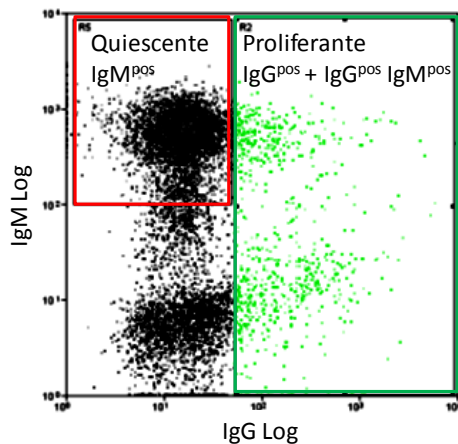


Figura 3.2.1. Plot de citometría de flujo de un paciente de LLC NM representativo donde se indican las poblaciones celulares seleccionadas en el aislamiento por “cell sorter”. Población proliferante ($IgG^{pos} + IgG^{pos} IgM^{pos}$) recuadrada en verde y quiescente (IgM^{pos}) en rojo.

3.2.2 Microarreglo de islas CpG de una población proliferante $IgG^{pos}AID^{pos}$ y su contraparte quiescente $IgM^{pos}AID^{neg}$

Utilizando el ADN obtenido de las poblaciones quiescente AID^{neg} y proliferante AID^{pos} luego del aislamiento celular, se llevo a cabo el análisis de metilación de ADN diferencial entre las sub-poblaciones de interés. Para ello se utilizó un microarreglo que consta de 237.006 sondas de oligonucleótidos de 60pb que evalúan 27.800 islas CpG, cubriendo el 97.5% de las islas CpG anotadas (“Human 244K Agilent CpG island microarray”).

En primer lugar, se extrajo el ADN genómico de las sub-poblaciones celulares y se realizó un enriquecimiento de secuencias metiladas mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo específico contra citosinas metiladas (*MeDIP: Methylated DNA Immunoprecipitation*). Este ADN enriquecido y el ADN de partida (ADN input) se marcaron con sondas fluorescentes cianina-5 (Cy5) y cianina-3 (Cy3) respectivamente. Estas dos muestras de ADN son utilizadas para co-hibridar la lámina del microarreglo. Se hibridaron cuatro láminas, dos de ellas evaluando la población proliferante y quiescente del paciente LLC#1 (ver Tabla 5.1 en materiales y métodos) y

las otras dos con la población proliferante y quiescente purificadas a partir de un *pool* de tres pacientes de LLC previamente seleccionados por sus características clínicas y moleculares similares (LLC#2, 3 y 8).

El análisis bioinformático de los resultados del microarreglo de islas CpG fue llevado a cabo en la Unidad de Bioinformática del Institut Pasteur de Montevideo. Los controles de calidad, en cuanto a intensidad de fluorescencia, señal inespecífica del fondo entre otros parámetros analizados en las 4 láminas fue satisfactorio (Ver Anexo I). La diferencia en la intensidad de fluorescencia de Cy3 (ADN input) y Cy5 (ADN enriquecido en secuencias metiladas) en cada sonda indica si dicha región del genoma se encuentra metilada o no en la población hibridada en el microarreglo. Luego de obtener esta información, se procedió a comparar qué regiones del genoma se encontraban diferencialmente metiladas en las dos sub-poblaciones de estudio. Este análisis evidenció que en las muestras correspondientes al “pool” de ADN prácticamente no había diferencias entre la población proliferante y quiescente pero si las había entre las poblaciones del paciente LLC#1. Como una primera aproximación al análisis de los datos, decidimos centrarnos en aquellos genes desmetilados en la población proliferante expresando AID. El análisis de estos resultados tiene dos objetivos principales **a)** identificar una posible metilación diferencial de genes asociada a la expresión de AID en las poblaciones aisladas, **b)** identificar genes cuya desmetilación diferencial se correlacione con un aumento de su expresión y consecuentemente explique el comportamiento más proliferante de la sub-población tumoral en estudio.

El análisis bioinformático llevado a cabo muestra que 322 genes se encuentran desmetilados en la población proliferante AID^{pos} en comparación con las células quiescentes AID^{neg}. A modo de focalizar el estudio se realizó un análisis bioinformático de función génica seleccionándose aquellos genes implicados en diferentes vías asociadas a la progresión tumoral: **a)** citoesqueleto y crecimiento celular (n=23), **b)** metabolismo lipídico (n=9), **c)** señalización quinasas/fosfatasas (n=8) y **d)** otros genes relacionados con distintos tipos de cáncer (n=12). Esta selección se muestra en la Tabla 3.2.1.

Tabla 3.2.1 Lista de genes desmetilados en población proliferante IgG^{pos}AID^{pos} relacionados con diferentes funciones celulares asociadas a la progresión tumoral.

Metabolismo lipídico	
<i>LRP3</i>	Low density lipoprotein receptor-related protein 3
<i>PLCB2</i>	Phospholipase C, beta 2
<i>LRP8</i>	Low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor
<i>PAQR8</i>	Progesterin and adipoQ receptor family member VIII
<i>BCL11B</i>	B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein)
<i>SNX20</i>	Sorting nexin 20
<i>ELOVL2</i>	ELOVL fatty acid elongase 2
<i>STARD10*</i>	STAR-related lipid transfer (START) domain containing 10
<i>STARD10-AS1</i>	STARD10 antisense RNA 1 (non-protein coding)
Citoesqueleto y crecimiento celular	
<i>LRFN3</i>	Leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 3
<i>KIF13B</i>	Kinesin family member 13B
<i>SPTBN4</i>	Spectrin, beta, non-erythrocytic 4
<i>SPTB</i>	Spectrin, beta, erythrocytic
<i>PRRT3</i>	Proline-rich transmembrane protein 3
<i>HAPLN4</i>	Hyaluronan and proteoglycan link protein 4
<i>ATAD3A</i>	ATPase family AAA domain containing 3A
<i>SIPA1</i>	Signal-induced proliferation-associated1
<i>COL9A2</i>	Collagen, type IX, alpha 2
<i>DNASE2</i>	Deoxyribonuclease II, lysosomal
<i>LTBP3</i>	Latent transforming growth factor beta binding protein 3
<i>COL9A2</i>	Collagen, type IX, alpha 2
<i>CDHR5</i>	Cadherin-related family member 5
<i>COL5A1</i>	Collagen, type V, alpha 1
<i>MAP7</i>	Microtubule-associated protein 7
<i>CKAP4</i>	Cytoskeleton-associated protein 4
<i>MYO1G*</i>	Myosin IG
<i>FNDC1</i>	Fibronectin type III domain
<i>PCDH7</i>	Protocadherin 7
<i>MYO1D</i>	Myosin ID
<i>MYL5</i>	Myosin, light chain 5, regulatory
<i>PCDH8P1</i>	Protocadherin 8 pseudogene 1
<i>ACAP3</i>	ArfGAP with coiled-coil, ankyrin repeat and PH domains 3
Señalización- quinasas/fosfatasa	
<i>PRKCH*</i>	<i>Protein kinase C, eta</i>
<i>RPS6KA2</i>	Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa,
<i>PPP1R37</i>	<i>Protein phosphatase 1, regulatory subunit 37</i>
<i>STK11</i>	Serine/threonine kinase 11
<i>MAPK4</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase 4</i>
<i>CDK10</i>	Cyclin-dependent kinase 10
<i>GIMAP5*</i>	GTPase, IMAP family member 5
<i>GIMAP1*</i>	GTPase, IMAP family member 1
Otros genes relacionados con cáncer	
<i>DPF1</i>	<i>D4, zinc and double PHD fingers family 1</i>
<i>DNAJB6</i>	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6</i>
<i>IRF2BPL</i>	Interferon regulatory factor 2 binding protein-like
<i>AATK</i>	Apoptosis-associated tyrosine kinase
<i>TNFAIP2</i>	<i>Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2</i>
<i>TIAF1</i>	<i>TGFB1-induced anti-apoptotic factor 1</i>
<i>ADAT3</i>	Adenosine deaminase, tRNA-specific 3
<i>CHST3</i>	Carbohydrate (chondroitin 6) sulfotransferase 3
<i>PLEKHF1</i>	Pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain)
<i>VGLL4</i>	Vestigial like 4 (Drosophila)
<i>SPI1 / (PU.1)</i>	Spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1
<i>B3GNT2</i>	UDP-GlcNAc:betaGalbeta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2

Los genes en negrita han sido previamente descritos como potenciales genes blanco de AID (Yamane et al. 2011). *Genes cuya sobreexpresión fue validada posteriormente a nivel de ARNm por Q-PCR.

Luego de este primer análisis y de acuerdo con los objetivos planteados previamente, se hizo una primera evaluación de los genes seleccionados entre los encontrados desmetilados en la población AID positiva, en busca de aquellos que hubieran sido descritos como posibles blancos de AID por Yamane y col. (Yamane et al. 2011). Este artículo fue publicado a comienzos de esta tesis e identifica por primera vez en células murinas, blancos genómicos de AID mediante la inmunoprecipitación de esta enzima y posterior secuenciado masivo. Nuestros resultados mostraron que de los 52 genes previamente seleccionados con metilación diferencial entre ambas subpoblaciones tumorales, 27 estaban dentro de los blancos de AID descritos por Yamane y col. (Tabla 3.2.1).

Como fue mencionado anteriormente, en el transcurso de esta tesis nuestro grupo generó datos de expresión génica obtenidos por microarreglos de ARNm de las mismas poblaciones quiescente y proliferante (Anexo III (Palacios et al., 2014)). Si bien generalmente existe una correlación directa entre desmetilación y expresión génica, se han descrito genes en los cuales se observa un comportamiento inverso, en donde la metilación del gen provoca un aumento de su expresión. Esto lleva a que los análisis a gran escala de perfiles globales de metilación y expresión génica no siempre tengan una buena correlación (Kulis et al. 2012).

Considerando estos datos y con el objetivo de seguir focalizando sobre qué genes trabajar, decidimos utilizar los análisis de expresión de ARNm de estas mismas poblaciones y cruzar los datos de modo de obtener un análisis adicional, acerca de qué genes mostraban aumento de expresión y una correlación positiva con los datos de desmetilación obtenidos. Este estudio nos permitió identificar 7 genes que estarían desmetilados en la población proliferante y sobre-expresados a nivel de ARNm en esta población (Tabla 3.2.2). Éstos son, *KCTD12* (*Potassium channel tetramerisation domain containing 12*), *STX11* (*Syntaxin 11*), *GFI1* (*Growth factor independent 1 transcription repressor*), *MYO1G* (*Myosin IG*), *ACAP3* (*ArfGAP with coiled-coil, ankyrin repeat and PH domains 3*), *PRRT3* (*Proline-rich transmembrane protein 3*) y *PLB2* (*Fosfolipase C beta 2*).

Tabla 3.2.2 Lista de genes desmetilados y diferencialmente expresados en población proliferante IgG^{pos} AID^{pos} vs IgM^{pos} AID^{neg} según análisis de microarreglos de expresión génica y metilación.

Símbolo	Nombre Entrez	Función	Expresión *	
			IgG ⁺ AID ⁺ vs IgM ⁺ AID ⁻	
			Estado	FC
<i>KCTD12</i>	<i>Potassium channel tetramerisation containing 12</i>	Subunidad auxiliar de receptores GABA-B, determina su farmacología y cinética	aumentado	9,3
<i>STX11</i>	<i>Syntaxin 11</i>	Regula transporte de proteínas entre endosomas tardíos y el trans-Golgi	aumentado	3,7
<i>GFI1</i>	<i>Growth factor independent transcription repressor 1</i>	Represor transcripcional esencial en hematopoyesis. Controla modificaciones de histonas. Mutaciones en este gen predisponen a leucemias e infecciones	aumentado	3,6
<i>MYO1G</i>	<i>Myosin IG</i>	Movimiento intracelular de vesículas, asociada con actina	aumentado	2,2
<i>ACAP3</i>	<i>ArfGAP with coiled-coil, ankyrin repeat and PH domains 3</i>	Activador de GTPasa	aumentado	2,0
<i>PRRT3</i>	<i>Proline-rich transmembrane protein 3</i>	No conocida hasta el momento	aumentado	2,0
<i>PLCB2</i>	<i>Fosfolipase C beta 2</i>	Producción de segundos mensajeros, DAG y IP3. Rol en inflamación, crecimiento, señalización y muerte celular	aumentado	1,7

*Expresión en IgG⁺ AID⁺ vs IgM⁺ AID⁻ según resultados de microarreglo de ARNm (Palacios et al. 2014). FC: Fold Change

Una vez realizados todos estos análisis decidimos finalmente seleccionar 15 genes, los cuales estaban relacionados directa o indirectamente con AID así como con el desarrollo y/o progresión de la LLC y validarlos a través de RT-PCR cuantitativa (Q-PCR).

Dentro de los 15 genes analizados 5 mostraron una clara correlación entre desmetilación y transcripción, ellos son: *GIMAP1* (*GTPase, IMAP family member 1*), *GIMAP5* (*GTPase, IMAP family member 5*), *MYO1G* (*myosin IG*), *PRKCH* (*protein kinase C, eta*) y *STARD10* (*StAR-related lipid transfer (START) domain containing 10*) (Tabla 3.2.3).

Tabla 3.2.3 Expresión diferencial a nivel de ARNm en población proliferante y quiescente de genes desmetilados en población proliferante.

Símbolo	Nombre Entrez	Función	Expresión IgG ⁺ AID ⁺ vs IgM ⁺ AID ⁺ (2 ^{-($\Delta\Delta Ct$)})*
ACAP3	<i>ArfGAP with coiled-coil, ankyrin repeat and PH domains 3</i>	Activador de GTPasa	NA
CDK10	<i>Cyclin-dependent kinase 10</i>	Proliferación celular, específica de fase G2/M de ciclo celular	0.6
DNASE2	<i>Deoxyribonuclease II, lysosomal</i>	Degradación de ADN nuclear en apoptosis celular durante el desarrollo	0.96
GIMAP1	<i>GTPase, IMAP family member 1</i>	Desarrollo de linfocitos B y T maduros	92.75
GIMAP5	<i>GTPase, IMAP family member 5</i>	Funciones anti-apoptóticas en linfocito T. Mantenimiento de la integridad de mitocondrias	7.74
LRP8	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor</i>	Transducción de señales y endocitosis mediada por receptor para degradación lisosomal. Migración neuronal en desarrollo	NA
MYO1G	<i>Myosin IG</i>	Movimiento intracelular de vesículas, asociada con actina	2.36
MYO1D	<i>Myosin ID</i>	Movimiento intracelular de vesículas, asociada con actina	NA
PLCB2	<i>Fosfolipase C beta 2</i>	Producción de segundos mensajeros, DAG y IP3. Rol en inflamación, crecimiento, señalización y muerte celular	0.73
PRKCH	<i>Protein kinase C, eta</i>	Regula diferenciación de queratinocitos y receptores de células pre-B. Requerido para proliferación de glioblastoma y en células MCF7 prevención de apoptosis	16.91
PRRT3	<i>Proline-rich transmembrane protein 3</i>	No conocida hasta el momento	NA
SIPA1	<i>Signal-induced proliferation-associated1</i>	Activador de GTPasas Rap1 y Rap2 inducido por mitógeno.	NA
SPI1 /PU.1	<i>Spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1</i>	Activador transcripcional durante desarrollo mieloides y linfocito B	1.06
SPTBN4	<i>Spectrin, beta, non-erythrocytic 4</i>	Determinación de la forma celular, interacciona con actina y membrana plasmática	0.26
STARD10	<i>StAR-related lipid transfer (START) domain containing 10</i>	Trasfiere fosfolípidos. Rol metabólico en maduración de esperma o fertilización	3.92
TIAF1	<i>TGFB1-induced anti-apoptotic factor 1</i>	Inhibe efecto citotóxico de TNF-alfa y sobre-expresa TRADD, FADD, y RIPK1	0.40

NA: no se logró amplificación en LLC.

* Fold change de expresión evaluada por Q-PCR comparando células proliferantes (IgG^{pos}AID^{pos}) vs quiescentes (IgM^{pos} AID^{neg}) aplicando el cálculo 2^{-($\Delta\Delta Ct$)}. Los resultados son el promedio obtenido a partir de las poblaciones de 3 pacientes. Se utilizó la amplificación de GAPDH para normalizar la cantidad de ARNm.

Los valores menores a 1 indican sub-expresión población quiescente. En rojo se indican los genes sobre-expresado en población proliferante.

3.2.3 Estudio del estado de metilación de genes por el método del bisulfito

Teniendo el dato del microarreglo de islas CpG que los muestra como desmetilados en la población proliferante y los resultados de Q-PCR que evidencian una sobre-expresión a nivel de ARNm en esta sub-población, seleccionamos los genes *GIMAP1*, *GIMAP5* y *PRKCH* para verificar su estado de metilación por la técnica de ADN tratado con bisulfito.

Los genes *GIMAP* (*GTPase immune-associated proteins*) codifican para proteínas de unión a GTP muy conservadas en la evolución y que se expresan preferentemente en células hematopoyéticas y linfoides. *GIMAP5* es importante para la supervivencia en las últimas etapas de los timocitos del linaje $\alpha\beta$, especialmente del linaje CD8+ y de células T maduras en periferia (Schulteis et al. 2008; Barnes et al. 2010). También se ha evidenciado que *GIMAP5* es necesaria para la generación de señales de supervivencia a través del TCR (Yano et al. 2014). Por el contrario, *GIMAP1*, cuya expresión comienza en precursores hematopoyéticos, es esencial durante el desarrollo temprano de las células T (Saunders et al. 2010). Interesantemente, *GIMAP1* se encontró sobre-expresada en 5 líneas celulares murinas de cáncer linfóide pero su posible función no fue determinada (Saunders et al. 2009). Por su parte, *GIMAP5* y otros miembros de la familia son capaces de unirse a Bcl-2 y Bcl-xL, probablemente estabilizándolas y favoreciendo su función anti-apoptótica (Filén & Lahesmaa 2010; Yano et al. 2014).

Otro de los genes cuyo estado de metilación verificaremos es *PRKCH*. Este gen codifica para la proteína quinasa C ϵ ($PKC\epsilon$). La proteína quinasa C (PKC) es una familia de quinasas de serinas/treoninas que está compuesta por 10 proteínas. Debido a la variada distribución en tejidos así como a localización subcelular, las proteínas de la familia PKC regulan diversos procesos celulares y han mostrado ser blancos terapéuticos atractivos en muchos cánceres (Steinberg 2008). $PKC\epsilon$ ha mostrado tener un rol específico en la regulación de la apoptosis y ha sido asociada a la resistencia a drogas en cáncer de ovario, de mama y linfomas de Hodgkin (J. F. Beck et al. 1998; J. Beck et al. 1998; Abu-Ghanem et al. 2007).

Comenzando con los estudios de metilación, en primer lugar, utilizando el programa *Methyl Primer Express*, se identificaron las islas CpG de cada gen y se diseñaron cebadores específicos para la amplificación de estas regiones luego del tratamiento del ADN con bisulfito de sodio. El

bisulfito de sodio es un reactivo que transforma las citosinas no metiladas en uracilos, mientras que las citosinas metiladas se ven protegidas de la transformación. Por tanto, se produce un cambio de secuencia entre el ADN metilado y no metilado que puede ser detectado al secuenciar. La amplificación por PCR a partir de ADN tratado con bisulfito presenta ciertas dificultades técnicas, asociadas a la presencia de secuencias poly-T relativamente largas que disminuyen la eficiencia de la polimerasa y dificultan la puesta a punto de la PCR. Por tal motivo, las islas CpG de gran tamaño se amplificaron en tramos de 500pb aproximadamente. El producto de cada amplificación se clona y entre 5 a 10 clones son evaluados por secuenciación.

Estado de metilación del gen *PRKCH*

Mediante el análisis de secuencia del gen *PRKCH* se localizaron dos islas CpG. La primera de ellas se encuentra en el promotor, el primer exón y algunas bases del intrón 1, abarcando 1483pb. La segunda isla con 703pb, está localizada dentro del intrón 1 (Fig. 3.2.3.A). Las sondas destinadas a evaluar el gen *PRKCH* en el microarreglo de islas CpG están dirigidas a la primera de estas islas, teniendo en cuenta esta información se diseñaron 3 juegos de cebadores de modo tal de amplificar la isla CpG 1 en tres regiones (Fig. 3.2.3.A).

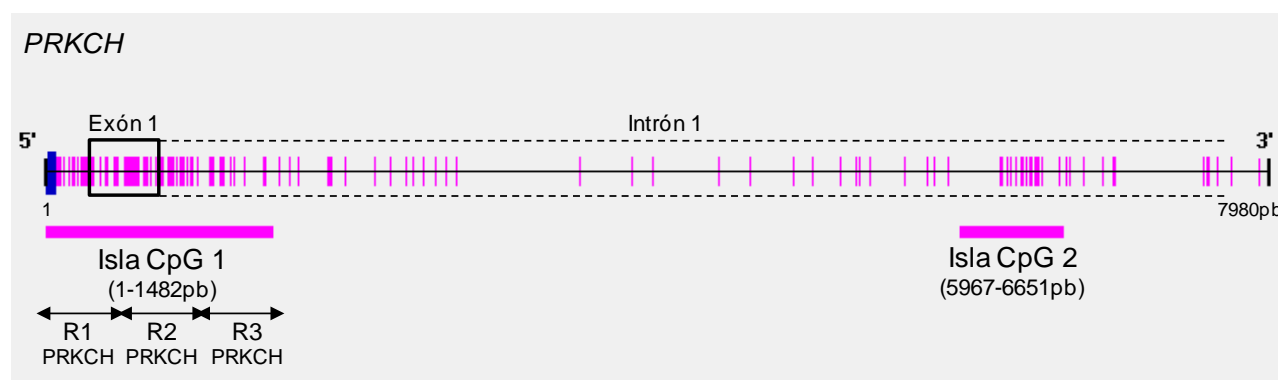


Figura 3.2.3.A. Esquema de localización de islas CpG del gen *PRKCH*. Las barras fucsia verticales indican la posición de los dinucleótidos CpG y las horizontales las islas CpG. Las flechas muestran las tres regiones (R1, R2 y R3) evaluadas por PCR y secuenciación de ADN tratado con bisulfito. La barra azul señala el sitio de inicio de la transcripción.

A pesar de que la amplificación de la región R1 y R2 no pudo ser analizada debido principalmente a los bajos rendimientos de la PCR, si pudimos amplificar, clonar y analizar la región R3 de la isla CpG 1. Los resultados, si bien preliminares, muestran un mayor porcentaje de dinucleótidos CpG metilados en la población quiescente (9.4%) mientras que se observa un menor porcentaje (2.5%) de dinucleótidos CpG metilados en la población proliferante (Fig. 3.2.3.B). Cuando se analizan las zonas implicadas en esta desmetilación diferencial, las mismas parecerían concentrarse en los primeros 5 dinucleótidos CpG. Sin embargo, necesitaríamos cubrir el resto de las regiones de la isla CpG y confirmar en un número mayor de pacientes estos resultados. El análisis de la secuencia que contiene los primeros 5 CpG de la región 3 evidenció un gran número de posibles sitios de unión de factores de transcripción (Anexo II), entre los cuales encontramos Sp1, C/EBPbeta, STAT4/5, FOXOP3, E2F-1, cMyb, GATA1 y PAX5.

Por otra parte, estudios de expresión de la proteína PKC η con anticuerpos específicos serán llevados a cabo sobre células de LLC de pacientes progresores e indolentes, para así concluir si este proceso epigenético junto con el aumento de la transcripción del ARNm de esta molécula confirmado en este trabajo tiene alguna relevancia biológica en la proliferación del clon tumoral.

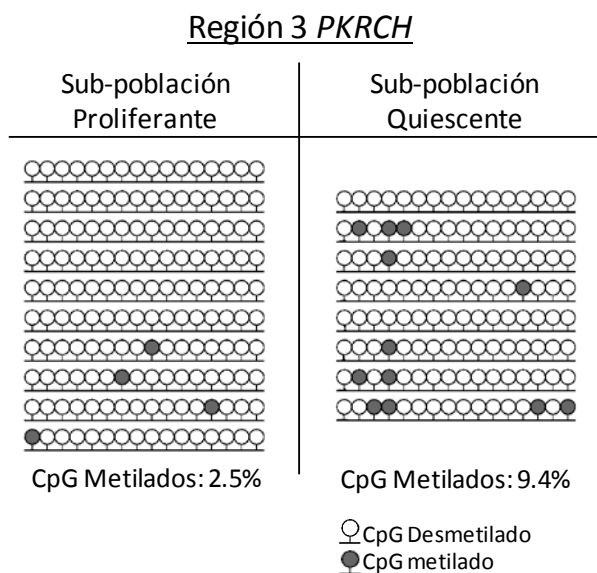


Figura 3.2.3.B. Representación gráfica del estado de metilación de la región 3 de la isla CpG1 del gen *PRKCH* en poblaciones proliferante y quiescente del clon tumoral de un paciente de LLC (#4). Cada línea representa un clon bacteriano en donde los círculos blancos y negros representan dinucleótidos CpG desmetilados y metilados respectivamente.

Estado de metilación de los genes GIMAP1 y GIMAP5

Los genes GIMAP1 y GIMAP5 están ubicados consecutivamente en el cromosoma 7 y ambos genes comparten la misma isla CpG de 1292pb, localizada en la región del intrón 1, exón 2 e intrón 2 de GIMAP1. La isla CpG de GIMAP1/5 se amplificó en dos fragmentos, región 1 (R1-GIMAP1/5) y región 2 (R2-GIMAP1/5)(Fig. 3.2.3.C).

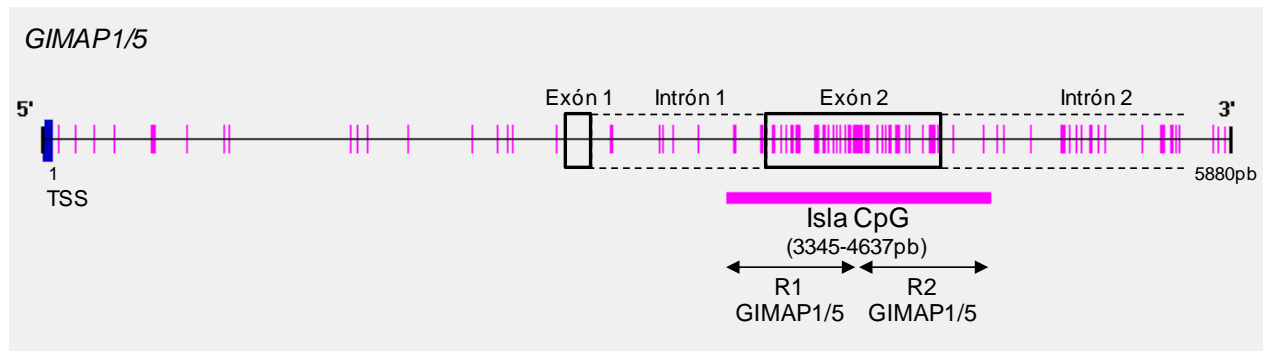


Figura 3.2.3.C. Esquema de localización de isla CpG de genes GIMAP1/5. Las barras fucsia verticales indican la posición de los dinucleótidos CpG y las horizontales las islas CpG. Las flechas muestran las regiones (R1 y R2) evaluadas por PCR y secuenciación de ADN tratado con bisulfito. La barra azul señala el sitio de inicio de la transcripción.

En una primera instancia se analizaron ambas regiones en las poblaciones proliferante y quiescente de un paciente NM de LLC. Como puede observarse en la figura 3.2.3.D, la secuenciación mostró que gran parte de los dinucleótidos CpG se encuentran metilados en estas regiones. Sin embargo al comparara los porcentaje de CpG desmetilados se observa una pequeña diferencia entre ambas poblaciones celulares en las dos regiones analizadas. Dado que los resultados no eran claros a favor de la hipótesis de una mayor desmetilación y en consecuencia una mayor transcripción de los genes GIMAP1 y GIMAP5, nos enfocamos en R1 en la cual encontrábamos el mayor porcentaje de desmetilación en la población proliferante, un 14% contra 8% en la población quiescente. Los estudios ampliados a un mayor número de pacientes muestran que esta región presenta un mayor porcentaje de desmetilación en la sub-población

proliferante en comparación con la población quiescente, de forma consistente en los cuatro pacientes analizados si bien las diferencias no son estadísticamente significativas (Fig. 3.2.3.E).

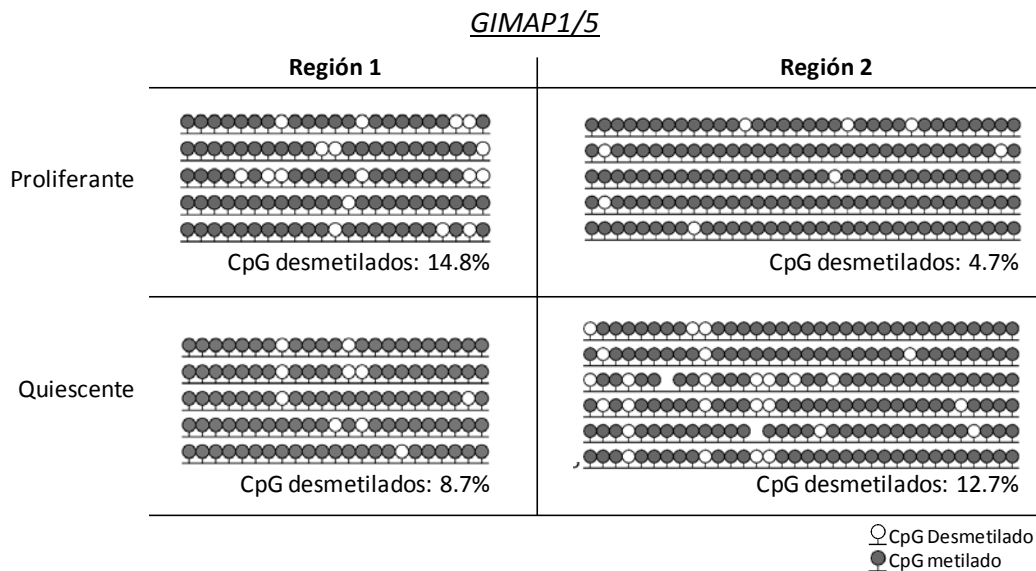
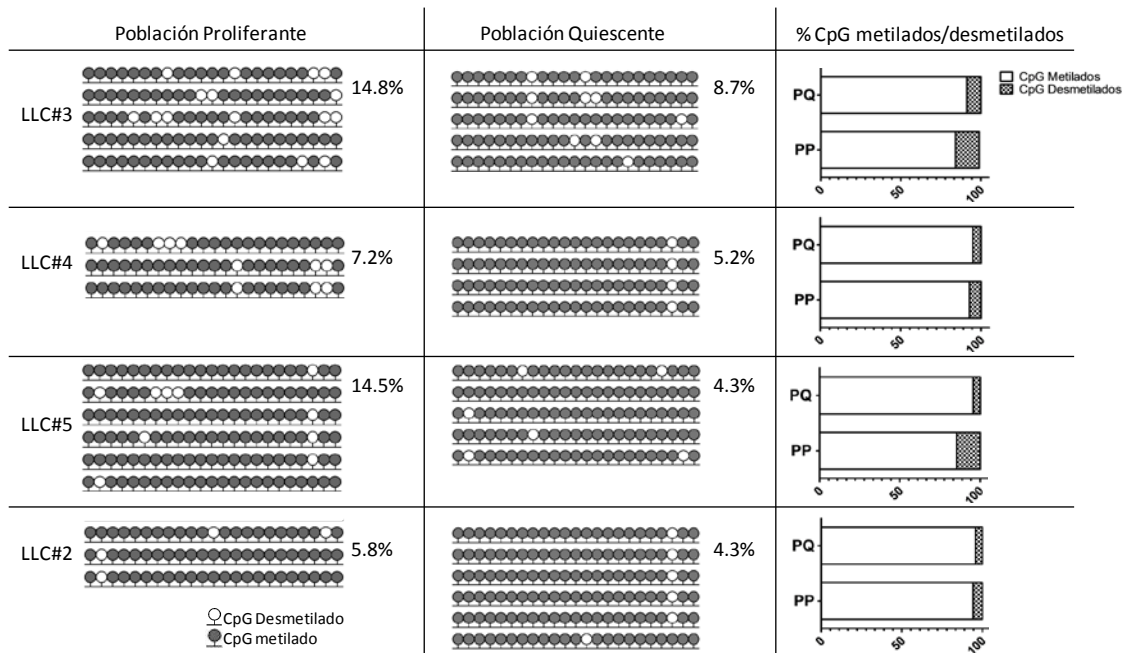


Figura 3.2.3.D. Representación gráfica del estado de metilación de región 1 y 2 de la isla CpG de los genes GIMAP1 y GIMAP5 en poblaciones proliferante y quiescente del clon tumoral de un paciente de LLC (#3). Cada línea representa un clon bacteriano en donde los círculos blancos y negros representan dinucleótidos CpG desmetilados y metilados respectivamente. La ausencia de círculo representa la falta de un dinucleótido CpG en esa posición.

Región 1 *GIMAP1/5*

A



B

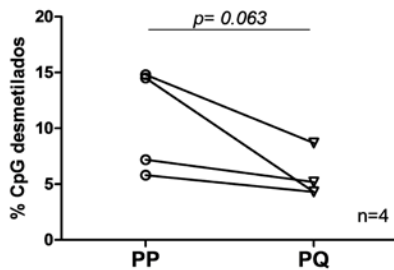


Figura 3.2.3.E. A) Representación gráfica del estado de metilación de la región 1 de la isla CpG de los genes *GIMAP1* y *GIMAP5* en poblaciones proliferante (PP) y quiescente (PQ) del clon tumoral de cuatro pacientes de LLC. Cada línea de círculos representa un clon bacteriano en donde los círculos blancos y negros representan dinucleótidos CpG desmetilados y metilados respectivamente. Los gráficos indican el porcentaje (%) de dinucleótidos CpG desmetilados (barras grises) y metilados (barras blancas) para cada población y paciente. **B)** Gráfico mostrando los porcentajes de CpG desmetilados en PP y PQ. Diferencias no significativas según análisis Wilcoxon signed rank test $p < 0.05$.

Evaluación de *GIMAP5* a nivel de proteína

Debido a los interesantes resultados obtenidos tanto a nivel de metilación como de transcripción entendemos que la evaluación de la expresión proteica de las *GIMAPs*, así como su posible rol en

la proliferación tumoral en la LLC vale la pena ser estudiada. En este sentido, se procedió a evaluar por citometría de flujo en una primera instancia la expresión de la proteína GIMAP5 en las poblaciones proliferante (IgG^{pos}) y quiescente (IgM^{pos}) del clon tumoral de LLC, dejando para una segunda instancia la molecular GIMAP1. En este sentido se marcó simultáneamente con anticuerpos anti-GIMAP5 y anti-IgG o anti-IgM según correspondiera las PBMC extraídas de distintos pacientes con LLC.

Nuestros resultados muestran un mayor nivel de expresión de GIMAP5 a nivel de proteína en la población proliferante (IgG^{pos}) en comparación con su contraparte quiescente (IgM^{pos}) en los cinco pacientes analizados. El análisis estadístico muestra un aumento significativo de GIMAP5 en la población proliferante (*Wilcoxon matched pairs test* p : 0.031). Por otra parte, también se observó que la gran mayoría de las células proliferantes expresan GIMAP5 (71% al 99%) mientras que el porcentaje de las células quiescentes del clon tumoral expresando esta proteína fue menor y con mayor variación (19% al 73%).

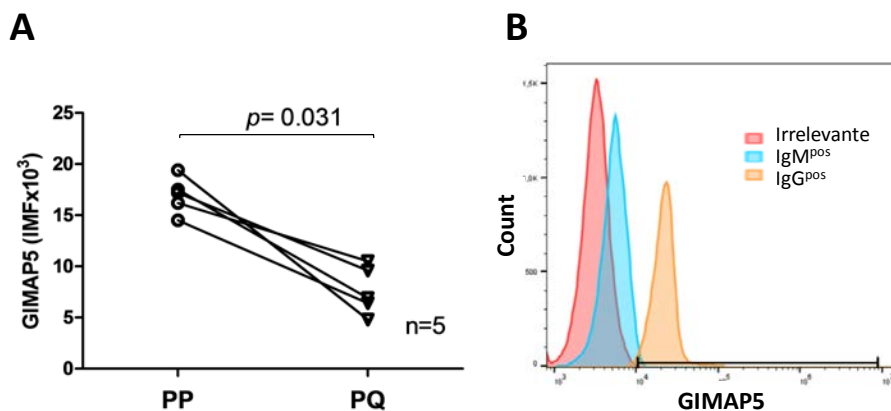


Figura 3.2.3.F. A) Expresión de proteína GIMAP5 evaluada por citometría de flujo en población proliferante (PP) y quiescente (PQ) del clon tumoral de cinco pacientes NM de LLC (#7-11 en tabla 5.1). IMF: intensidad media de fluorescencia. Aumento significativo de GIMAP5 según análisis Wilcoxon signed rank test $p < 0.05$. **B)** Histograma de GIMAP5 para PP (IgG^{pos}), PQ (IgM^{pos}) y control irrelevante.

3.3 Perfil proteómico de una población leucémica proliferante AID^{pos} y su contraparte quiescente AID^{neg}

Desde el comienzo de este trabajo de tesis nuestro laboratorio se ha centrado en la caracterización molecular de las sub-poblaciones AID^{pos} proliferante y AID^{neg} quiescente del clon tumoral de pacientes de LLC. En particular y como hemos visto a lo largo de este trabajo de tesis, hemos estudiado el perfil de metilación y utilizado datos de expresión diferencial de genes a nivel de ARNm para identificar moléculas que pudieran estar relacionadas a la proliferación tumoral. Dado que existen diversos mecanismos moleculares pos-transcripcionales que permiten o no a una molécula de ARNm traducirse a proteína, entendimos interesante estudiar las proteínas diferencialmente expresadas en ambas poblaciones. Nuestro principal objetivo en esta parte de la tesis es la de identificar moléculas funcionalmente relevantes en la célula tumoral que ayuden a entender la patogénesis de la enfermedad así como a identificar posibles blancos terapéuticos relacionados con la progresión oncológica.

Realizamos entonces un análisis proteómico de las sub-poblaciones proliferante y quiescente mediante electroforesis de geles de poliacrilamida en 2 dimensiones (2D-PAGE) y posterior análisis por espectrometría de masa. Estos estudios se llevaron a cabo en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Institut Pasteur de Montevideo.

Las proteínas totales de las sub-poblaciones del clon tumoral de LLC fueron extraídas a partir de la fracción orgánica del TRI-Reagent y resuspendidas directamente en el buffer de corrida del gel 2D con el objetivo de minimizar la pérdida de material. Las proteínas extraídas se cuantificaron utilizando el reactivo Bradford y se evaluaron por SDS-PAGE.

Se procedió entonces a analizar las proteínas de la población proliferante y su contraparte quiescente del clon tumoral de un paciente con LLC seleccionado por presentar una evolución muy agresiva de la enfermedad con estadio Binet C, linfocitosis mayor a 100.000 linfocitos/ μ l y una sobrevida libre de tratamiento menor a 2 años (LLC#1, Tabla 5.1).

Resueltos los problemas técnicos referidos a una alta concentración de albumina en las muestras obtenidas luego del aislamiento celular, lo que nos obligo a optimizar los geles 2D utilizando para

la primera dimensión tiras de gradiente de pH no lineal 3-11, pudimos llevar a cabo una migración del gel con buena resolución y densidad de “spots”. Se realizaron corridas replicadas con 250µg y 400µg de proteínas totales y se compararon los geles 2D entre la población proliferante y la población quiescente (Fig. 3.3.1).

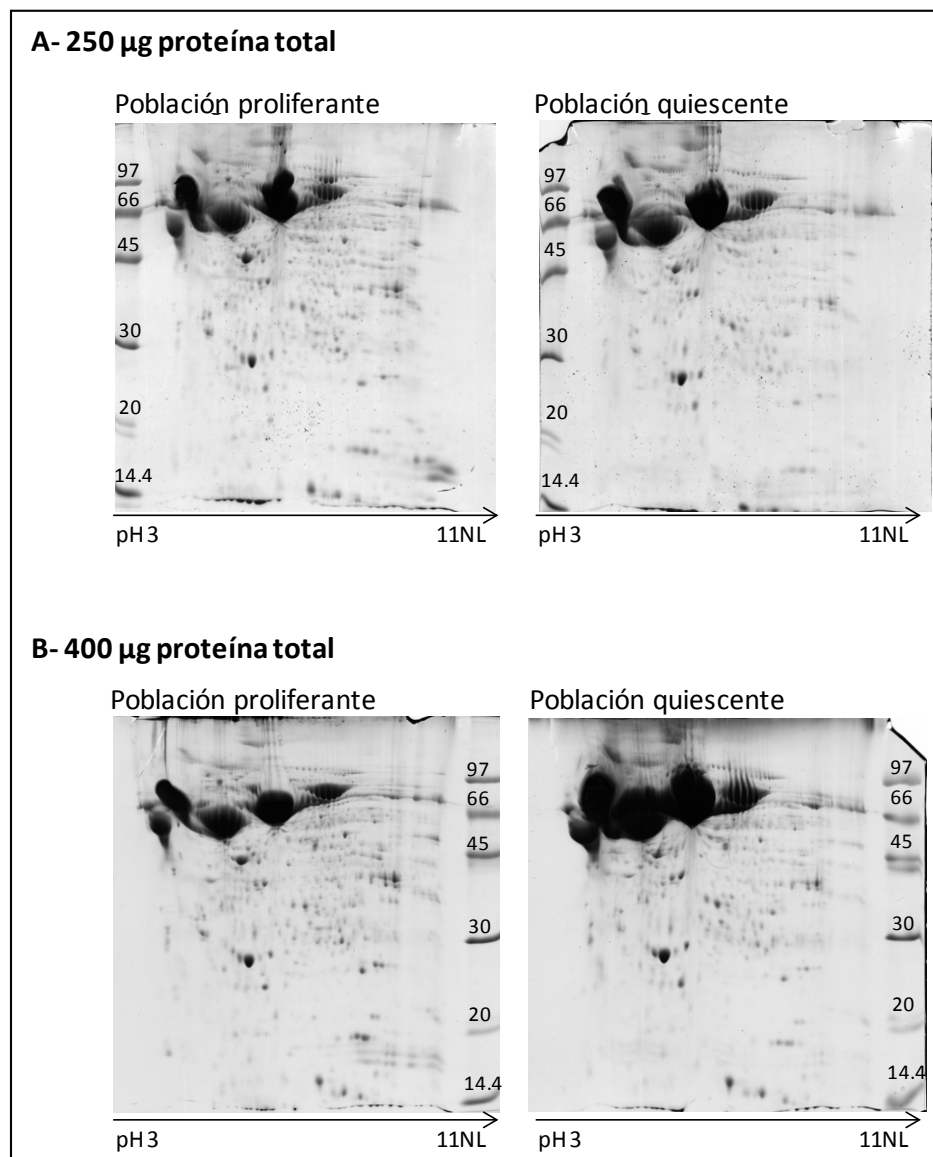
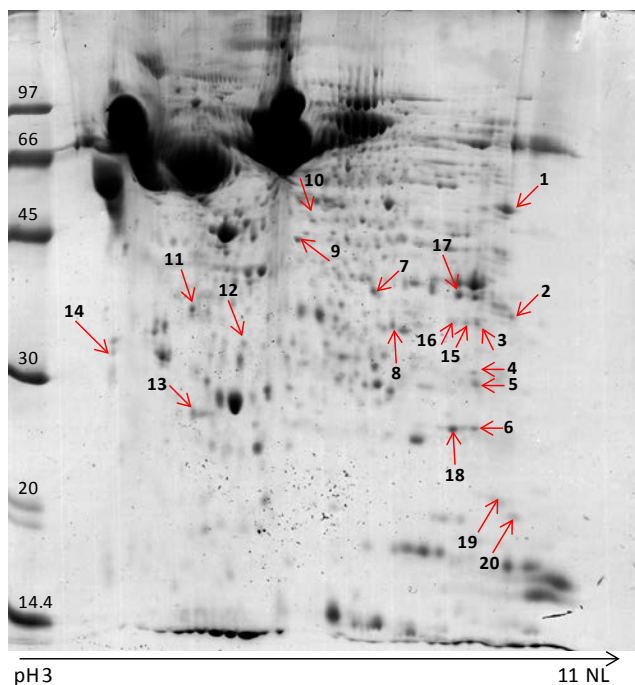


Figura 3.3.1. Análisis proteómico de poblaciones proliferante ($IgG^{D05}AID^{D05}$) y quiescente ($IgM^{D05}AID^{neg}$) de LLC sembrando dos cantidades de proteínas totales, 250 µg (A) y 400 µg (B). Los geles corresponden a 2D-PAGE de gradiente de pH 3-11 no lineal (NL) teñidos con azul de Coomassie coloidal.

El análisis de los resultados permite detectar 29 proteínas que parecerían estar diferencialmente expresadas en ambas sub-poblaciones. De estas proteínas, 20 estarían sobre-expresadas y 9 disminuidas en la población proliferante (Fig. 3.3.2). Luego de la escisión de la proteína del gel y el análisis por espectrometría de masa se identificaron 14 de estas proteínas (Tabla 3.3.1).

Población proliferantes



Población quiescente

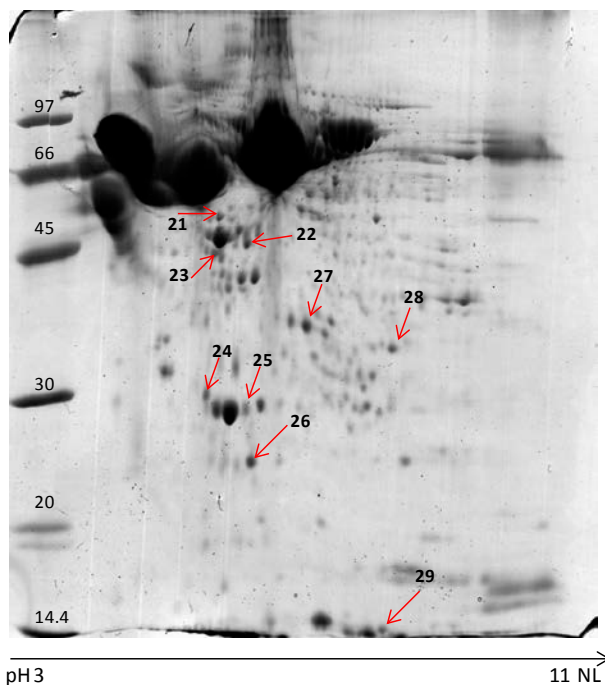


Figura 3.3.2. Proteínas diferencialmente expresadas en poblaciones proliferante ($\text{IgG}^{\text{pos}} \text{AID}^{\text{pos}}$) y quiescente ($\text{IgM}^{\text{pos}} \text{AID}^{\text{neg}}$) de LLC. Las flechas y números corresponden a los spots seleccionados como diferencialmente expresados para ser analizados por espectrometría de masa (#1-20 y #21-29 sobre-expresados en población proliferante y quiescente respectivamente). Los geles corresponden a 2D-PAGE de gradiente de pH 3-11 NL teñidos con Azul de Coomassie coloidal.

Tabla 3.3.1 Proteínas diferencialmente expresadas en sub-poblaciones IgG^{pos}AID^{pos} e IgM^{pos}AID^{neg} identificadas por 2D-PAGE y espectrometría de masa.

Símbolo	Nombre Entrez	Función	Ref. en Gel (N°)*	Expresión** en población IgG ^{pos} AID ^{neg}
ARPC2	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	Control de la polimerización de actina	8	Aumentada
AHCY1	Adenosylhomocysteinase isoform 1	Posible rol regulador en metilación de proteínas, controlando niveles de adenosylhomocysteine	10	Aumentada
ANXA5	Annexin V	Proteína anticoagulante. Rol potencial en transducción de señales, inflamación, crecimiento y diferenciación	11	Aumentada
CIRBP	Cold-inducible RNA-binding protein	Rol protector en estrés genotóxico. Activador traduccional	20	Aumentada
SAP18P	Sin3A-Associated Protein, 18kDa	Componente de complejos represores de transcripción y de splicing. Involucrado en modulación por splicing de <i>BCL2L1/Bcl-X</i>		
EEF1A1	Elongation factor 1 alpha	Síntesis de proteínas	1	Aumentada
GLO1	Glyoxalase I	Enzima del metabolismo del glutatión. Regulación de actividad transcripcional de NFkB inducida por TNF	13	Aumentada
HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	Procesamiento de pre-ARNm y otros aspectos de metabolismo y transporte de ARNm	17	Aumentada
CAPG	Capping Protein, Gelsolin-Like	Controla movimiento basado en actina de células no musculares	9	Aumentada
MDH1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic isoform 2	Ciclo del ácido cítrico. Rol en coordinación metabólica mitocondria/citoplasma	7	Aumentada
PRDX1	Peroxiredoxin 1	Rol protector antioxidante. Actividad antiviral. Efecto proliferativo relacionado con cáncer	18	Aumentada
VDAC1	Voltage-Dependent Anion Channel 1	Formación de canales en membrana externa mitocondrial y membrana plasmática. Rol en apoptosis celular	3 y 15	Aumentada
PSME2	Proteasome activator complex subunit 2	Ensamblaje de inmunoproteosoma, necesario para correcta presentación de antígenos	12	Aumentada
ACTA1	Aactin	Involucrada en varios tipos de movimiento celular	21	Disminuida
HBB	Hemoglobin beta chain	Transporte de oxígeno	29	Disminuida

*Número de referencia asignado en los geles de la figura 3.3.2.

** Expresión en población IgG^{pos}AID^{pos} respecto a población IgM^{pos}AID^{neg} según análisis de geles 2D-PAGE

Luego de un análisis bibliográfico detallado sobre las diferentes proteínas identificadas y queriendo focalizarnos en un par de proteínas para realizar estudios en mayor profundidad decidimos seleccionar las siguientes moléculas:

Proteína VDAC1:

VDAC1 es una proteína de la membrana mitocondrial externa involucrada en la regulación del intercambio de metabolitos, iones, nucleótidos, Ca^{2+} entre otras moléculas entre la mitocondria y el citosol (Vander Heiden et al. 1999). VDAC1 no solo juega un rol en la regulación metabólica y energética de la mitocondria, sino que también desempeña un papel importante en la apoptosis mediada por este organelo. Este rol en la apoptosis, lo desempeña participando en la liberación al citosol de proteínas mitocondriales pro-apoptóticas (Shoshan-Barmatz et al. 2010; Zaid et al. 2005) e interaccionando con proteínas reguladoras de la apoptosis, tales como Bcl-2, Bcl-xL (Abu-Hamad et al. 2009; Arbel et al. 2012; Arbel & Shoshan-Barmatz 2010). Proteínas que están sobre-expresadas en muchos cánceres, incluyendo LLC y que controlarían su capacidad de inducir apoptosis (Grobholz et al. 2002; Schimmer et al. 2003; Shoshan-Barmatz et al. 2014).

Se ha observado, que altos niveles de expresión de VDAC1 pueden conferir a la célula tumoral una ventaja selectiva facilitando los procesos dependientes de energía tales como proliferación e invasión (Abu-Hamad et al. 2006). No obstante, niveles aumentados de VDAC1 pueden volverse deletéreos si consideramos que esta es una molécula pro-apoptótica. En este sentido, se han desarrollaron péptidos basados en VDAC1 que son capaces de penetrar las células provocando que esta se vuelva un agente pro-apoptótico (Arzoine et al. 2008). Estos péptidos mostraron tener potencialidad terapéutico en la LLC (Prezma et al. 2013).

En nuestro análisis proteómico, VDAC1 fue identificada en dos de los spot analizados por espectrometría de masa (N°3 y 15). Los mismos se encuentran muy cercanos a un tercer spot (N°16) que no logró ser identificado. Este corrimiento en el punto isoeléctrico (PI) de los spots correspondientes a VDAC1 estaría indicando la presencia de modificaciones pos-traduccionales diferenciales entre la proteína. Si bien, mediante el análisis de espectrometría de masa se detectó una acetilación N terminal en ambas proteínas, con los péptidos obtenidos en el análisis no fue posible identificar modificaciones diferenciales entre ambas proteínas. Ha sido descrito que la

proteína VDAC1 puede ser fosforilada y acetilada (revisado en (Martel et al. 2014), cualquiera de estas dos modificaciones podría explicar el corrimiento del PI de los spot.

En este contexto es que nos proponemos investigar si la sobre-expresión de VDAC1, la cual podría estar facilitando la obtención de energía por parte de las células del clon tumoral que muestran una mayor proliferación, podría constituir un marcador tumoral que nos indique el nivel de actividad metabólica de las células de LLC. Por otra parte, nos parece interesante explorar si las posibles modificaciones postraduccionales de VDAC1 podrían estar asociadas con una actividad y/o estabilidad diferente de esta proteína en la población proliferante

Proteína GLO1:

GLO1 es una enzima que pertenece al sistema glioxalasa, el cual cataliza la conversión del metilglioxal al producto no tóxico D-lactato. Esta catálisis destoxifica el metilglioxal acumulado, el cual es un sub-producto de la bioquímica normal de la célula pero altamente tóxico para las proteínas celulares y los ácidos nucleicos (Masterjohn et al. 2013). La expresión de GLO1 se ha visto aumentada en tejidos tumorales con alta tasas metabólicas (Thornalley & Rabbani 2011). Estudios clínicos sugieren un rol de GLO1 en el crecimiento tumoral y progresión (Cheng et al. 2012; Fonseca-Sánchez et al. 2012). Recientemente, la vía glioxalasa está siendo considerada como blanco terapéutico para reducir la resistencia del cáncer a la quimioterapia (Sakamoto et al. 2000; Thornalley & Rabbani 2011) y de esta manera aumentar la eficiencia de las drogas anti-tumorales (Taniguchi et al. 2012).

Considerando la función y asociación de GLO1 con distintos tipos de células tumorales es que no planteamos la siguiente hipótesis: el aumento de la proteína GLO1 en las células proliferantes del clon tumoral, les permite a estas células mantener una alta tasa metabólica protegiéndolas del daño celular y apoptosis provocada por los compuestos tóxicos generados en este proceso. Por lo tanto, GLO1 podría ser un blanco terapéutico interesante enfocado en atacar aquellas células con mayor tasa de proliferación dentro del clon tumoral de LLC. Por otra parte, esta proteína podría constituir una medida indirecta del tamaño de la población de células proliferantes del clon tumoral, la cual está asociada con un mal pronóstico en la LLC.

Al momento hemos realizado PCR cuantitativa de GLO1 encontrando, en concordancia con los estudios proteómicos, una mayor expresión de ARNm en la población proliferante respecto a la quiescente (Fig.3.3.3).

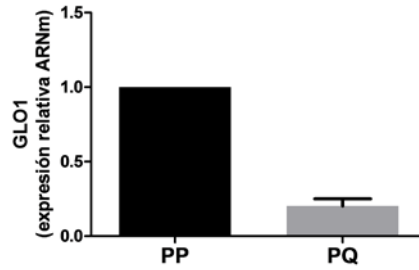


Figura 3.3.3. Expresión de ARNm de GLO1 en población quiescente (PQ) vs proliferante (PP) evaluada por Q-PCR en tres pacientes de LLC (#2, 7 y 6). La expresión se normalizó respecto a la amplificación de GAPDH y se calculó la expresión como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. La barra indica el desvío estándar.

4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1 Mecanismos moleculares responsables de la expresión anómala del marcador pronóstico LPL en pacientes con LLC con mal pronóstico

Dada la gran heterogeneidad en la evolución de los pacientes de LLC y la resistencia a la terapia que alguno de ellos presentan, la búsqueda de moléculas con potencialidad de ser buenos marcadores pronóstico es un tema de intensa investigación en la LLC. Entre las moléculas con valor pronóstico que han sido descritas con tales fines, el nivel de expresión del ARNm de *LPL* se ha consolidado como un excelente predictor de la evolución clínica. Si bien esta claramente demostrado que altos niveles de expresión de este gen se correlacionan con un mal pronóstico de la enfermedad, la función y los mecanismos que regulan dicha expresión en el clon leucémico aún no han sido dilucidados.

La regulación de genes supresores de tumores así como de genes que le dan una ventaja selectiva a las células tumorales puede darse a través de múltiples mecanismos. No obstante, la regulación mediante modificaciones epigenéticas ha mostrado jugar un rol importante en la tumorigénesis de muchos cánceres, incluida la LLC. En este sentido, los resultados generados en esta tesis, mostraron por primera vez que la expresión anómala de *LPL* en pacientes NM es debida a un proceso de desmetilación en la isla CpG localizada en el primer exón/intrón del gen *LPL*. Nuestros resultados evidencian que el nivel de metilación de esta región se correlaciona con el nivel de expresión de ARNm de *LPL* en los pacientes NM. Esto, junto con otros datos de sobre-expresión en la línea celular Daudi luego de desmetilar el gen *LPL* con 5-Aza-2'-deoxicitidina, confirman que la desmetilación del gen sería la responsable de la expresión de *LPL* en la LLC.

Teniendo en cuenta la buena correlación que se observó entre el nivel de metilación y transcripción del gen *LPL*, y alentados por el poder predictivo de la evolución clínica de este gen, nos planteamos estudiar las diferentes causas que podrían estar en el origen de esta metilación diferencial.

Dado la importancia de las señales que el microambiente celular puede enviarle al clon tumoral y la asociación de estas interacciones con la progresión leucémica (Burger et al. 2009), decidimos evaluar si diferentes tipos de señales (T-dependientes, T-independientes o antigénicas) eran capaces de desmetilar la región promotora del gen *LPL* e inducir así su expresión.

Nuestro trabajo en este sentido, muestra que señales T-dependientes (CD40L/IL-4) y estimulación a través del BCR son capaces de desmetilar la región promotora de *LPL* con el consecuente aumento de expresión. Estos resultados, fueron confirmados realizando cultivos con células T autólogas activadas, lo que valida el efecto observado con señales dependiente de células T sobre *LPL*. Interesantemente, dichos estímulos fueron capaces de promover la proliferación de las células de LLC, evaluada por Ki67, mientras que las señales T-independientes de inmunidad innata a través de los receptores "Toll like receptors" (TLRs) evaluadas fueron incapaces de reproducir estos resultados de proliferación celular, desmetilación y expresión de *LPL*.

En su conjunto, los resultados obtenidos en esta parte de la tesis (artículos n°1 y 2) permiten especular sobre la posible función que *LPL* estaría cumpliendo en las células B de LLC, un tema muy controversial al día de hoy. Algunas evidencias experimentales apuntan a que *LPL* estaría cumpliendo una función catalítica en el metabolismo lipídico. En este sentido, Pallasch y col. muestran que las células de LLC presentan más actividad lipasa que células B normales y que el tratamiento con el inhibidor de lipasas Orlistat, provoca la muerte por apoptosis de las células leucémicas, sugiriendo que cambios en la expresión de lipasas (incluida *LPL*) están relacionados con el desarrollo de la LLC (Pallasch et al. 2008). Esto es apoyado por los estudios que confirma una alta actividad de la vía de degradación de ácido grasos en células de LLC (Van't Veer et al. 2006) y que muestran que el silenciamiento de *LPL* disminuye la capacidad de la célula de LLC de oxidar ácidos grasos libres (Rozovski et al. 2015).

Sin embargo, contrariamente a lo antes descrito se ha observado que dentro de los pacientes de LLC los que presentan un perfil NM tienen menor actividad lipolítica, a pesar de tener altos niveles de expresión de *LPL* (Mansouri et al. 2010). Observaciones que fueron complementadas por el trabajo de Porpaczy y col., donde se muestra que la actividad enzimática de *LPL* en el suero

de pacientes de LLC es similar a la de donantes sanos (Porpaczy et al. 2013). Esto estaría en concordancia con la idea de que esta enzima estaría involucrada en otros procesos distintos al metabolismo lipídico. Tomando en consideración, que las células de LLC NM se caracterizan por ser más sensibles a la activación a través de receptores de superficie, se ha sugerido que LPL puede contribuir a la formación de “lipid rafts” que participan en la activación del linfocito B (Olivecrona et al. 1997). Por otra parte, en las células de LLC el heparán sulfato contribuye a estabilizar a LPL en la superficie celular y considerando su habilidad para crear puentes entre otras moléculas se ha sugerido que LPL podría participar en la migración celular o en la interacción con células dendríticas y estromales (Mansouri et al. 2010). Otra posibilidad, aún poco explorada, es que LPL pueda cumplir distintas funciones dentro de la célula de LLC. En este sentido, recientemente se mostró que el silenciamiento de *LPL* en células de LLC afecta la expresión de 5 genes, estando uno de ellos (STXBP3) involucrado en el metabolismo lipídico (Porpaczy et al. 2013).

Todas las hipótesis antes mencionadas pueden ser vislumbradas a la luz de nuestros resultados (Abreu et al. 2013b; Moreno et al. 2013). Desde nuestro punto de vista, es claro que la expresión de LPL está en estrecha relación con la presencia de la célula de LLC en un microambiente tumoral. Los datos de esta tesis, muestran como señales entregadas por este microambiente son capaces de activar la expresión de *LPL*. Situando la expresión de esta molécula en células que se encuentran proliferando y por ende necesitando recursos energéticos. Por otra parte, la función no catalítica de LPL es muy interesante, ya que su expresión en pacientes NM de LLC podría estar asociada con facilitar la interacción con células presentes en órganos linfoides. La expresión de esta proteína junto con integrinas como CD49d, moléculas anti-apoptóticas (Bcl2) así como quimioquinas (CCL3, CCL4, CXCL12) que se han evidenciado en sub-poblaciones proliferantes de LLC podrían ser responsables de un “loop” activador del clon tumoral.

En resumen, en este trabajo, comparando los patrones de metilación del gen *LPL* en pacientes NM y Mut de LLC, demostramos una clara asociación entre la expresión de *LPL* y un proceso de desmetilación de su isla CpG. Este proceso puede ser inducido en el clon leucémico por señales específicas del microambiente, como ser CD40L/IL-4 y anti-IgM, pero no por señales de

inmunidad innata entregadas a través de receptores TLR. En suma, estos resultados sugieren que un mecanismo epigenético, desencadenado por el microambiente, regula la expresión de *LPL* en las células de LLC.

4.2 Poblaciones leucémicas proliferante IgG^{pos}AID^{pos}, caracterización a nivel de metilación del ADN y expresión proteica

La observación de que las células de LLC se acumulan progresivamente *in vivo* pero mueren cuando se las cultiva *in vitro* sin ningún tipo de estimulación, resalta la importancia del microambiente tumoral en la habilidad de entregar señales que colaboran con la supervivencia y crecimiento del clon maligno. En este sentido es que se ha descrito que debe existir un equilibrio entre las células quiescentes en SP y las células en división que recientemente recibieron señales del microambiente de los centros proliferantes. El balance entre los dos compartimentos podría contribuir al curso clínico variable de los pacientes de LLC (Caligaris-Cappio, 2003).

Es así que hoy en día, diferentes grupos de investigación están estudiando distintas subpoblaciones con características proliferantes dentro del clon tumoral que están relacionadas con la progresión y el mal pronóstico en la LLC. Y que a su vez podrían ser responsables de la sobreexpresión de numerosos marcadores moleculares de agresividad tumoral en estos pacientes de LLC. En este sentido, trabajos previos de nuestro grupo describen una población proliferante dentro del clon tumoral que sobre-expresan la enzima AID además de moléculas relacionadas con proliferación y anti-apoptosis (Palacios et al., 2014; Palacios et al., 2010) y que está asociada a pacientes NM con una alta progresión de la enfermedad.

En estos trabajos se analizó también la expresión de ARNm y miRNAs de esta población proliferante en comparación con su contraparte quiescente, revelando que existen múltiples moléculas diferencialmente expresadas (Palacios et al., 2014). Dado que a la enzima AID, además de su capacidad mutagénica, se le ha adjudicado un rol en la desmetilación activa del ADN (revisado en (Ramiro & Barreto 2015) y teniendo en cuenta los resultados de regulación génica diferencial entre ambas poblaciones (AID^{pos} y AID^{neg}), consideramos de interés en este trabajo de tesis estudiar los perfiles de metilación en ambas sub-poblaciones tumorales del mismo paciente.

Análisis de Metilación de ADN

Los eventos epigenéticos han sido asociados con el desarrollo y progresión tumoral de muchos tipos de cáncer, pudiendo ocurrir tempranamente en el desarrollo del tumor y persistir durante el proceso maligno (Feinberg & Tycko 2004; Jones & Baylin 2002). Por lo tanto, la desregulación epigenética puede ser explorada como una herramienta poderosa en la clínica y como un nuevo enfoque para el diagnóstico precoz así como para la predicción de la evolución clínica (Belinsky 2004; Laird 2003; Harikrishnan et al. 2004). Una distinción importante entre las alteraciones genéticas y epigenéticas es la reversibilidad de estas últimas, haciendo de los cambios en la metilación del ADN, modificaciones de histonas y expresión de ARN no codificantes blancos atractivos para la terapéutica (Egger et al. 2004; Jones & Baylin 2007).

El análisis de metilación de ADN diferencial entre la población proliferante y quiescente llevado a cabo empleando microarreglos de islas CpG, permitió identificar 322 genes que estarían desmetilados exclusivamente en la población proliferante. Dentro de estos genes encontramos moléculas relacionados con citoesqueleto y crecimiento celular, metabolismo lipídico, señalización quinasas/fosfatasa y otros genes relacionados con distintos tipos de cáncer.

En una publicación reciente en el que emplean microarreglos, se lleva a cabo un extenso estudio comparativo de la metilación de ADN durante la evolución de pacientes de LLC con distintas características clínicas, así como de las células provenientes de SP y nódulos linfáticos (NL) (Cahill et al. 2013b). En este trabajo observan que, contrariamente a lo esperado, la metilación global del ADN fue similar entre las células provenientes de un compartimento quiescente (SP) y uno proliferativo (NL), encontrando diferencias solo a nivel intrapaciente que no fueron consistentes entre los distintos pacientes. Esto podría explicar el hecho de que en los microarreglos en que utilizamos ADN proveniente de un “pool” de pacientes no fue posible encontrar genes diferencialmente metilados, probablemente los distintos perfiles de metilación de cada paciente enmascaren las diferencias entre las poblaciones celulares estudiadas. Los resultados de Cahill y col. los llevaron a especular que la metilación de ADN de células de LLC de diferentes compartimentos está poco influenciada por factores del microambiente. Sin embargo, nuestros resultados mostraron un número considerable de genes diferencialmente metilados en las poblaciones analizadas. Debemos destacar que las células que nosotros aislamos como

proliferantes por “cell sorter” constituyen una población más homogénea que las células provenientes de un NL, lo cual probablemente nos permitió encontrar más diferencias. También debemos mencionar que los resultados generados en esta tesis respecto al efecto de estímulos proliferativos sobre el estado de metilación del gen *LPL*, es un ejemplo concreto de cómo las señales propias de un microambiente tumoral son capaces de afectar la metilación de un gen.

La comparación de los datos del microarreglo de islas CpG con datos generados por nuestro grupo sobre la expresión génica (microarreglos de ARNm) de las poblaciones quiescentes y proliferantes, nos permitió identificar 7 genes que estando desmetilados en la población proliferante se encontrarían diferencialmente expresados a nivel de ARNm. Este bajo número no sorprende, teniendo en cuenta que ya ha sido descrito que los análisis a gran escala de perfiles globales de metilación y expresión génica en LLC no tienen una buena correlación (Kulis et al. 2012; Martín-Subero et al. 2013). La verificación del nivel de expresión por Q-PCR mostró que *GIMAP1* (*GTPase, IMAP family member 1*), *GIMAP5* (*GTPase, IMAP family member 5*), *MYO1G* (*myosin IG*), *PRKCH* (*protein kinase C, eta*) y *STARD10* (*StAR-related lipid transfer (START) domain containing 10*) presentan una clara correlación entre el aumento del nivel de ARNm y la desmetilación del gen en el microarreglo de islas CpG.

Respecto a la confirmación del estado de metilación de alguno de estos genes por la técnica de secuenciación de ADN tratado con bisulfito, nuestros datos son preliminares y requieren en algunos casos ampliar el estudio a otras regiones génicas, a un mayor número de pacientes y probablemente a cambiar la aproximación técnica, realizando luego del tratamiento con bisulfito el análisis por secuenciado masivo. Esto nos permitirá ampliar el número de células estudiadas, sobre todo entendiendo que el perfil de metilación pocas veces es tan general como el que encontramos para el gen *LPL*.

La metilación en el gen PRKCH

Dentro de los genes que fueron evidenciados en el microarreglo de islas CpG como desmetilados en la población proliferante y que presentan mayor expresión a nivel de ARNm respecto a la población quiescente del clon tumoral de LLC encontramos a *PRKCH*. Este gen codifica para la proteína quinasa C eta (PKC η), un miembro de la familia PKC. Esta es una familia de quinasas de

serinas/treoninas que está compuesta por 10 isoformas, clasificadas como convencionales, nuevas y atípicas, según son activadas por fosfatidilinositol, diacilglicerol y/o Ca^{2+} . Estas proteínas se encuentran en el cruce de muchas vías de transducción de señal, también están implicadas con una amplia gama de receptores acoplados a proteínas G y otras respuestas celulares dependientes de factores de crecimiento. Debido a la variada distribución en tejidos así como a localización subcelular y los diversos procesos celulares que regulan, estas proteínas se han posicionado como blancos terapéuticos atractivos en muchos cánceres (revisado en (Steinberg 2008). La isoforma PKC η ha mostrado tener un rol específico en la regulación de la apoptosis y ha sido asociada a la resistencia a drogas en cáncer de ovario, de mama y linfomas de Hodgkin (J. F. Beck et al. 1998; J. Beck et al. 1998; Abu-Ghanem et al. 2007). En líneas celulares de cáncer de mama, la sobre-expresión de PKC η confiere protección contra la apoptosis impidiendo la activación de la quinasa JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (Rotem-Dai et al. 2009). Otro estudio realizado también con líneas celulares de cáncer de mama, mostró que PKC η actúa como un regulador negativo de la activación de AKT provocando la disminución de la proliferación, pero por otra parte tiene un efecto anti-apoptótico que prolonga la vida de las células (Shahaf et al. 2012). En línea con estos hallazgos, en células de glioblastoma, PKC η inhibe la apoptosis inducida por UV e irradiación-c a través del bloqueo de la activación de la caspasa 9 (Hussaini et al. 2002) y provoca una respuesta proliferativa al estímulo con PAM (*phorbol-12-myristate-13-acetate*) (Uht et al. 2007). En queratinocitos humanos, la activación inducida por UV de la caspasa 3 es reducida por la sobre-expresión de PKC η (Matsumura et al. 2003). Mientras que, la disminución de PKC η en las células de cáncer de pulmón A540 aumenta significativamente la actividad de la caspasa 3 y sensibiliza las células al paclitaxel y vincristina (Sonnemann, Gekeler, Ahlbrecht, et al. 2004). En cáncer de próstata, se ha demostrado que la disminución de la expresión de PKC η aumenta la apoptosis inducida por TRAIL a través del incremento de la actividad de la caspasa 3 y liberación de citocromo c (Sonnemann, Gekeler, Sagrauske, et al. 2004). Recientemente, la sobre-expresión de esta isoforma de PKC ha sido propuesta como un marcador de mal pronóstico en cáncer de pulmón (Krasnitsky et al. 2012).

Varios estudios muestran que en LLC se sobre-expresan ciertas isoformas de PKC y que la sobrevivencia de estas células es dependiente de la actividad PKC (Alkan et al. 2005; Barragán et al. 2003). La isoforma más estudiada en esta patología ha sido PKC β II, la cual está involucrada en la señalización a través del BCR en células de LLC (Abrams et al. 2007; zum Büschenfelde et al. 2010). Sin embargo, hasta el momento no hay ningún reporte sobre PKC η en esta leucemia. Varios inhibidores inespecíficos de PKC, así como inhibidores específicos de PKC β II y PKC δ , efectivamente inducen la muerte de las células de LLC, lo que muestra que la administración simultánea de estos inhibidores con otras drogas podría ser una estrategia terapéutica interesante para el tratamiento de esta patología (revidado en (Kazi et al. 2013)).

El estudio de metilación de *PRKCH* que realizamos, si bien necesita ser ampliado, evidencia una mayor metilación en la región 3 de la isla CpG 1 en la población quiescente respecto a la proliferante. Esta diferencia se concentra en los primeros 5 dinucleótidos CpG, región en la cual encontramos sitios de unión a factores de transcripción (FT), de gran importancia en la regulación del desarrollo y proliferación del linfocito B. Entre estos FT encontramos a Sp1, C/EBPbeta, STAT4/5, FOXOP3, E2F-1, cMyb, GATA1 y PAX5, todos ellos relacionados con distintos tipos de cáncer y alguno de los cuales han mostrado estar vinculados con la tumorigénesis de la LLC (Oppezzo, Dumas, et al. 2005; Ramiro & Barreto 2015). Estos resultados son alentadores en la hipótesis de que esta isoforma de PCK, poco estudiada en la LLC y que presenta altos niveles de expresión a nivel de ARNm en la población proliferante, pueda estar favoreciendo la proliferación o sobrevida de estas células. Por lo antes mencionado, nos planteamos ampliar el estudio de este gen a un número mayor de pacientes, intentando evaluar toda la isla CpG 1 a nivel de secuenciado masivo luego del tratamiento del ADN con bisulfito. Además de ello, la evaluación de la expresión de esta proteína en diferentes pacientes de LLC así como en diferentes órganos (Centros proliferantes y SP) será llevada a cabo con el objetivo de intentar comprender y ampliar los resultados obtenidos hasta el momento e intentar conocer la implicancia biológica de la expresión de esta molécula en la progresión del tumor.

La metilación en los genes GIMAP1/5

Los genes *GIMAP* (*GTPase immune-associated proteins*) codifican para proteínas de unión a GTP muy conservadas en la evolución y que se expresan preferentemente en células hematopoyéticas y linfoides. Se ha involucrado a miembros específicos de esta familia en el desarrollo de linfocitos y han sido asociados con enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Sin embargo, la función de estas proteínas continúa siendo poco comprendida tanto a nivel celular como molecular. GIMAP5 es importante para la supervivencia en las últimas etapas de los timocitos del linaje $\alpha\beta$, especialmente del linaje CD8⁺ y de células T maduras en periferia (Schulteis et al. 2008; Barnes et al. 2010) y también en la generación de señales de supervivencia a través del TCR (Yano et al. 2014). Por el contrario, GIMAP1, cuya expresión comienza en precursores hematopoyéticos, es esencial durante el desarrollo temprano de las células T (Saunders et al. 2010). Interesantemente, GIMAP1 se encontró sobre-expresada en 5 líneas celulares murinas de cáncer linfóide pero su posible función no fue determinada (Saunders et al. 2009).

GIMAP5 presenta un extremo carboxilo terminal corto hidrofóbico que puede promover su interacción con membranas biológicas. En efecto, se ha propuesto que esta proteína se encuentra asociada a la membrana de organelos celulares, incluyendo mitocondria y lisosomas, donde puede afectar la estabilidad de las proteínas de la familia Bcl-2 (Dahéron et al. 2001; Sandal et al. 2003).

Un estudio realizado en leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T), propone que la señalización a través de la vía NOTCH protege a estas células leucémicas de la apoptosis a través de la regulación positiva de la expresión de GIMAP5 (Chadwick et al. 2010). Es importante destacar que en LLC mutaciones en *NOTCH1* que producen una proteína constitutivamente activa, han sido correlacionadas con una menor supervivencia global, asociada a una mayor resistencia a la muerte celular del linfocito leucémico (Balatti et al. 2012; Fabbri et al. 2011; Puente et al. 2011).

En un trabajo reciente donde estudian mediante microarreglos de ADN los patrones de metilación de promotores génicos en pacientes de LLC en etapas tempranas, encontraron que la metilación de un fragmento correspondiente a *GIMAP5* está asociada negativamente con el tiempo libre de enfermedad (Ronchetti et al. 2013). Pero no ahondan en el estudio de la relevancia de este gen en la LLC.

El estudio de metilación de la isla CpG que comparten los genes *GIMAP1* y *GIMAP5* mostró que la región 1 de dicha isla presenta un menor porcentaje de dinucleótidos CpG metilados en la población proliferante respecto a su contraparte quiescente. Esta disminución en la metilación se correlaciona positivamente con un mayor nivel de expresión de ARNm de ambas moléculas en la población proliferante y con una mayor expresión de GIMAP5 a nivel de proteína. Teniendo en cuenta estos datos y las publicaciones que vinculan a esta molécula con NOTCH y proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl2, nos proponemos continuar con el estudio de esta molécula tratando de comprender cuál podría ser el rol biológico de su expresión aumentada en la proliferación tumoral de los pacientes progresores con LLC.

Estudio proteómico de las poblaciones proliferante y quiescente de la LLC

En paralelo a los estudios del metiloma de las poblaciones quiescente y proliferante en esta tesis realizamos también un análisis proteómico de las sub-poblaciones mencionadas. Los resultados obtenidos en esta parte de la tesis permitieron identificar 14 proteínas diferencialmente expresadas entre ambas poblaciones (12 de ellas aumentadas en la población proliferante y 2 disminuidas). Basándonos en la información bibliográfica disponible hasta el momento, planteamos proseguir los estudios de dos proteínas relacionadas con proliferación e inhibición de la apoptosis, GLO1 (*Glyoxalase I*) y VDAC1 (*Voltage Dependent Anion Channel 1*). Con el propósito de confirmar la sobre-expresión de estas moléculas en la población proliferante, nos planteamos utilizar citometría de flujo, lo cual nos permite discriminar ambas poblaciones celulares a partir de poco material celular.

VDAC1 (*Voltage Dependent Anion Channel 1*) es una proteína de la membrana mitocondrial externa involucrada en la regulación del intercambio de metabolitos, iones, nucleótidos, Ca^{2+} entre otras moléculas entre la mitocondria y el citosol (Vander Heiden et al. 1999). VDAC1 no solo juega un rol en la regulación metabólica y energética de la mitocondria, sino que también desempeña un papel importante en la apoptosis mediada por este organelo. Este rol en la apoptosis, lo desempeña participando en la liberación al citosol de proteínas mitocondriales pro-

apoptóticas (por ejemplo citocromo c, AIF y Smac/DIABLO) (Shoshan-Barmatz et al. 2010; Zaid et al. 2005) e interaccionando con proteínas reguladoras de la apoptosis, tales como Bcl-2, Bcl-xL (Abu-Hamad et al. 2009; Arbel et al. 2012; Arbel & Shoshan-Barmatz 2010) y hexoquinasa (HK) (Zaid et al. 2005; Abu-Hamad et al. 2009; Abu-Hamad et al. 2006). Proteínas que están sobre-expresadas en muchos cánceres, incluyendo LLC (Grobholz et al. 2002; Schimmer et al. 2003; Shoshan-Barmatz et al. 2014).

Se ha observado, que células tumorales con un descenso en los niveles de VDAC1 inducido por interferencia con ARN, muestran defectos en el crecimiento celular *in vivo* (Koren et al. 2010). A la inversa, altos niveles de expresión de VDAC1 pueden conferir a la célula tumoral una ventaja selectiva facilitando los procesos dependientes de energía tales como proliferación e invasión (Abu-Hamad et al. 2006). Es así que se ha propuesto a la sobre-expresión de VDAC1 como un factor pronóstico desfavorable en cáncer de pulmón de células no pequeñas (Grills et al. 2011). No obstante, niveles aumentados de VDAC1 pueden volverse deletéreos si consideramos que esta es una molécula pro-apoptótica. En las células cancerosas, la sobre-expresión de moléculas anti-apoptóticas como Bcl2, Bcl-XL y HK, las cuales interactúan con VDAC1, previene su actividad apoptótica. En este sentido, se han desarrollado péptidos basados en VDAC1 que son capaces de penetrar las células y unirse a estas proteínas anti-apoptóticas, interrumpiendo así su asociación con VDAC1 y provocando que esta última se vuelva un agente pro-apoptótico (Arzoine et al. 2008). Estos péptidos mostraron tener potencialidad terapéutico en la LLC (Prezma et al. 2013).

Ya ha sido bien establecido que la proteína VDAC1 puede ser blanco de modificaciones post-traduccionales en múltiples aminoácidos, tales como fosforilación y acetilación (revisado en (Martel et al. 2014). Si bien no se conoce la función de todas las modificaciones identificadas, se ha descrito que algunas de ellas afectan la actividad de la proteína, su estabilidad a través de la degradación por el proteosoma, su acumulación en organelos así como su interacción con otras proteínas (Martel et al. 2014). En nuestro caso, el estudio proteómico comparativo entre ambas poblaciones identificó dos spots que estarían sobre-expresados en la población proliferante y que corresponderían a la proteína VDAC1. Al verificar la posición de estas dos proteínas en el gel 2D se observa un corrimiento en el punto isoeléctrico (PI) entre los spots. Estas diferencias podrían

estar indicando una fosforilación y/o acetilación diferente de la proteína entre ambas poblaciones que podrían tener implicancias interesantes de ser estudiadas en más detalle.

Por su parte, GLO1 es una enzima que pertenece al sistema glioxalasa, el cual cataliza la conversión del metilglioxal al producto no tóxico D-lactato. Esta catálisis destoxifica el metilglioxal acumulado, el cual es un sub-producto de la bioquímica normal de la célula pero altamente tóxico para las proteínas celulares y los ácidos nucleicos (Masterjohn et al. 2013). La expresión de GLO1 se ha visto aumentada en tejidos tumorales con alta tasas metabólicas, donde la inhibición de la expresión de GLO1 lleva a la acumulación de glioxal y metilglioxal, induciéndose significativamente daño celular y la apoptosis (Thornalley & Rabbani 2011). Estudios clínicos mostraron que una expresión elevada de GLO1 esta significativamente asociada con invasión local, metástasis en nódulo linfático, estado patológico de cáncer gástrico (Cheng et al. 2012) y grado tumoral alto de cáncer de mama (Fonseca-Sánchez et al. 2012), sugiriendo un rol de GLO1 en el crecimiento tumoral y progresión. Apoyando esta idea, se ha observado que la ganancia de copias múltiples del gen GLO1 se asocia con resistencia a multidroga en quimioterapia antitumoral (Santarius et al. 2010). Además, GLO1 contribuye a la regulación de la expresión inducida por TNF de genes que responden a NFkB (de Hemptinne et al. 2009), que consecuentemente controlan la proliferación celular, angiogénesis, tumorigénesis e invasión tumoral (Jin et al. 2012). Recientemente, la vía glioxalasa está siendo considerada como blanco terapéutico para reducir la resistencia del cáncer a la quimioterapia (Sakamoto et al. 2000; Thornalley & Rabbani 2011) y de esta manera aumentar la eficiencia de las drogas anti-tumorales (Taniguchi et al. 2012).

En cuanto a los resultados obtenidos en esta tesis, si bien aún debemos confirmar el nivel de expresión a nivel de proteína de GLO1 en las sub-poblaciones, el aparente aumento de esta molécula en la población proliferante de LLC se condice con el hecho de que esta población, que está en activa proliferación según lo indican numerosos marcadores celulares, tendría una tasa metabólica mayor que su contraparte quiescente. Estudios adicionales relacionados a la biología de la LLC, su expresión y compartimentalización celular así como función, son necesarios para evaluar la potencialidad de esta molécula como blanco terapéutico en las células proliferantes de LLC.

A modo de resumen, el estudio desde el punto de vista de la metilación del ADN y de la expresión proteica de una sub-población leucémica proliferante en comparación con su contraparte quiescente del clon tumoral de la LLC, nos permitió identificar una serie de moléculas que podrían tener relevancia en la proliferación y resistencia a la apoptosis de estas células con características proliferantes. alguna de estas moléculas, podría establecerse como un marcador de una población proliferante presente en las LLC de mal pronóstico y por ende potencialmente ser usada en el pronóstico o terapia de la enfermedad.

Conclusiones finales:

Los resultados de esta tesis han aportado al conocimiento general de la biología de la LLC de la siguiente manera:

1. Identificando los mecanismos moleculares y las causas por las cuales se encuentra una expresión anómala del marcador pronóstico *LPL* en la LLC.
2. Demostrando por primera vez una asociación directa entre la expresión de *LPL* y la proliferación celular del clon leucémico. Esto sugiere una explicación sobre la asociación de la expresión anómala de *LPL* con la mala evolución clínica de los pacientes.
3. Identificando y seleccionando 5 genes diferencialmente expresados entre la población leucémica proliferante y quiescente con una correlación positiva entre desmetilación y transcripción. Tres de ellos (*PRKCH*, *GIMAP1* y *GIMAP5*) fueron seleccionados y están siendo estudiados en profundidad con el objetivo de aumentar los conocimientos biológicos sobre la proliferación del clon tumoral en la LLC.
4. Identificando 14 proteínas diferencialmente expresadas entre la población proliferante y quiescente. Dos de ellas, *GLO1* y *VDAC1* fueron seleccionadas como candidatos de estudio para ser incorporadas como posibles blancos terapéuticos de una población proliferante en la LLC.
5. Generando resultados explotables para continuar el estudio sobre la biología de las subpoblaciones proliferantes encontradas en pacientes con mala evolución clínica.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes de LLC

Los pacientes empleados fueron típicamente diagnosticados como LLC. Todos los pacientes son tratados en el Hospital Maciel de Montevideo y proporcionaron un consentimiento informado en conformidad con la regulación ética de Uruguay y la Declaración de Helsinki.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron aisladas por centrifugación en gradiente con Histopaque -1077 (Sigma) según indicaciones del proveedor e inmediatamente criopreservadas.

Tabla 5.1. Características clínicas de pacientes de LLC cuyas muestras de sangre fueron utilizadas en la presente tesis.

Paciente	Estadío Binet	Rearreglo VH	Recuento linfocitario/μl	AID	LPL	CD38	FISH
LLC#1	C	NM VH1-2*04	130.000	+	+	+	Del17p
LLC#2	B	NM VH4-34	120.000	+	+	+	ND
LLC#3	A	NM VH4-34*03	115.000	+	+	-	ND
LLC#4	A	NM VH3-7*1	98.000	+	+	-	SA
LLC#5	A	NM VH1-2*02	54.000	+	+	-	Del 13q
LLC#6	B	NM VH3-15*01	72.000	+	+	+	Del17p
LLC#7	A	NM VH2-5*10	35.000	+	+	+	SA
LLC#8	A	Mut VH3-23	85.000	+	+	-	SA
LLC#9	A	NM VH3-48*03	52.700	+	+	+	ND
LLC#10	B	NM VH3-11*01	175.700	+	-	ND	SA
LLC#11	A	NM VH1-69	111.000	+	-	+	SA

SA: sin alteraciones citogenética; ND: no determinado.

Aislamiento de poblaciones IgG^{pos} e IgM^{pos} por “cell sorter”

Las PBMC provenientes de pacientes de LLC fueron marcadas con anti-human IgM F(ab')₂ conjugado con ficoeritrina (PE) (Dako, North America Inc) y anti-human IgG F(ab')₂ conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Dako, North America Inc), utilizando una dilución 1/40 y 1/100 respectivamente e incubando por 45min. La purificación de poblaciones IgM^{pos} e IgG^{pos}+IgG^{pos}IgM^{pos} del clon tumoral de LLC se realizó utilizando el equipo MoFlo cell sorter (Beckman Coulter). Las células fueron recogidas en tubos de 15 ml conteniendo 2ml de suero fetal bovino y mantenidas en hielo. Luego de la purificación las células fueron lavadas 2 veces con 15ml de buffer fosfato salino (PBS) y resuspendidas en 800µl de TRI-Reagent (Sigma-Aldrich).

Extracción de ARN, ADN genómico y proteínas

A partir de las células resuspendidas en TRI-Reagent se extrajo el ARN, ADN genómico y proteínas según indicaciones del proveedor.

Síntesis de ADN copia y amplificación por RT-PCR y Q-PCR

La síntesis de ADN copia (ADNc) se realizó empleando la enzima M-MLV (Life Technologies) y oligo-dT como cebador. Para la amplificación de AID y GAPDH por RT-PCR se utilizaron la enzima *Taq DNA polymerase* (Life Technologies) y los primers AIDFw: GAGGCAAGAAGACTCTGG, AIDRev: GCGGTCCTCACAGAAGTAG, GAPDHFw: GGTGCTGAGTATGTCGTGGA y GAPDHRev: ATGCCAGTGAGCTTCCCGTT en un ciclo de 4min 95°C, 30x (20''95°C/30''62°C/30''72°C), 7min 72°C. Para las Q-PCR se utilizó el equipo *Eco Real-Time PCR System* (Illumina) y el kit *Kapa SYBR Fast qPCR Master Mix* (Kapa Biosystem) según indicaciones del proveedor. La secuencia de los cebadores y las temperaturas de annealing correspondientes se especifican en la tabla 5.2. Tanto en las RT-PCR como Q-PCR se normalizó la expresión respecto a GAPDH. Los cálculos de FoldChange de expresión entre las poblaciones proliferante y quiescente se obtuvieron calculando $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$

Tabla 5.2. Secuencia de cebadores y temperaturas de annealing utilizadas en Q-PCR

<i>Símbolo Gen</i>	<i>Secuencia Cebadores (5'-3')</i>	<i>Temperatura annealing (°C)</i>
<i>ACAP3</i>	ATGACCGTGGAGTTCGAGGA GTCTCCTTGAAGTCCGCACA	54/56/58/60
<i>CDK10</i>	CCGGAGTGTGAAGGAGTTTGAG ACGATGCACTTGACCTGAGC	58
<i>DNASE2</i>	ATGATCCCCTGCTGCTGGC GTGCCACGCATGGAAGAGTC	60
<i>GIMAP1</i>	ATGGGAGGAAGGAAGATGGC CCTGCTGGTCTGGGCGGTG	58
<i>GIMAP5</i>	ATGGGAGGATTCCAGAGGGG GGATCACCAGAAGCAGGACGT	58
<i>LRP8</i>	CTCTCCGGCTTCTGGCGCTGC CACAGGTGAAGTCACTGTCTGCAC	54/56/58/60
<i>MYO1G</i>	ATGGAGGACGAGGAAGGCC GTGCTTACTGGCTTCTGTCTC	58
<i>MYO1D</i>	ATGGCGGAGCAGGAGAGCCT GGTATGGCCGAATATACTG	54/56/58/60
<i>PLCB2</i>	ATGTCTGCTCAACCCTGTCC CCGTGAGTGTCTTCAGCAGGA	60
<i>PRKCH</i>	GTGAGCGTGGACCAGGTGCG ATTGATCTGGTGGACTCGCCT	60
<i>PRRT3</i>	CCTGCGTCCACAGATGACCT CAGGCTCTGGTTCCTCTGCT	54/56/58/60
<i>SIPA1</i>	TACAGGCGTGAAAATGGAAGG GGATGGTACTGGAGGCACATC	54/56/58/60
<i>SPI1 /PU.1</i>	ATGCTGATGGCGGGATGG CTTGAGCTGACTGTTGACAGTGG	60
<i>SPTBN4</i>	ATGGAGAAGCTGGCGGCCTCT TAATAGCCACGTCAGCGTTG	58
<i>STARD10</i>	ATGTCATCTCCATCTTACCCT TCAACCCCAAGCCTTCCCTC	58
<i>TIAF1</i>	ATGACCGTGGAGTTCGAGGA GTCTCCTTGAAGTCCGCACA	60

Análisis de metilación por secuenciación de ADN tratado con bisulfito de sodio

El tratamiento con bisulfito de sodio de 500µg de ADN genómico de cada muestra se llevó a cabo empleando el kit *MethylCode Bisulfite Conversion* (Life Technologies) siguiendo las

especificaciones del proveedor. Este ADN se utilizó como molde para la amplificación por PCR de las regiones de las islas CpG a analizar junto con cebadores diseñados para hibridar con este ADN modificado (Tabla 5.3). El ciclado utilizado consistió en 15min 95°C, 40x (30''95°C/30''X°C/1'72°C), 10min 72°C. El único parámetro que cambió entre las PCR fue la temperatura de annealing la cual se especifica en la tabla 5.2. La enzima utilizada fue *Taq DNA polymerase* (Life Technologies) y se agregó luego de 7 minutos a 95°C.

Los productos de amplificación se analizaron en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio y las bandas de PCR obtenidas se purificaron utilizando el kit *Nucleo Spin Extract II* (Macherey Nagel). Se procedió a ligar 3µl del purificado en pGEM-TEasy (Promega), con el producto de esta reacción se transformaron bacterias electrocompetentes XL-1Blue. Se seleccionaron entre 5 a 10 colonias de las cuales se extrajo el ADN plasmídico empleando el kit *Nucleo Spin Plasmid* (Macherey Nagel) que luego fue secuenciado.

El análisis de las secuencias para determinar los sitios metilados y no metilados se realizó con el programa BiQ-Analyzer (<http://big-analyzer.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>), el cual también permite obtener una visión gráfica de la información en un diagrama de “lollipops”.

Símbolo Gen Región Isla CpG	Secuencia Cebadores (5'-3')	Temperatura de annealing (°C)
<i>SPI1</i> <i>URE -17Kb</i>	GTTGGATATTTTTTTGAGGTTTGG TAAAACCTAAAACCTAAACCCA	59
<i>SPI1</i> <i>Promotor</i>	GTTGGATATTTTTTTGAGGTTTGG TAAAACCTAAAACCTAAACCCA	56
<i>TP73</i> <i>Promotor 2</i>	TTTTGTTGTTGGATTTAGTTAGT GGGGTTAGAGGTAGTTTTAGGT	58
<i>PRKCH</i> <i>Región 1</i>	GTTTGAAGGGACGGTCGGGTTTT TTAATCTTCTACTTAATACTAATCTAAC	55
<i>PRKCH</i> <i>Región 2</i>	GTTAGATTAGTATTAAGTAGAAGAT ACCCGACTTCCCGTTAAACCAAAC	50/55
<i>PRKCH</i> <i>Región 3</i>	GATTTTTTTTTAGGATAGCGGTTT AACAAAAACCCACACTACAAAACCTC	56
<i>GIMAP1/5</i> <i>Región 1</i>	TTTTAAGGGGAAGTTGGTTAAA ACCAAATCCTCCTCCTAATAA	55
<i>GIMAP1/5</i> <i>Región 2</i>	TTATTAGGAAGGAGGATTTGGT CCCTTAACCAAATTACCTCAA	55

Microarreglo de Islas CpG

Como primer paso se realizó un enriquecimiento de secuencias metiladas por inmunoprecipitación, siguiendo las especificaciones del protocolo *Microarray Analysis of Methylated DNA Immunoprecipitation Agilent* (http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/G4170-90012_Methylation_Protocol_v.2.2.pdf). Brevemente, el ADN genómico extraído se sonica con el objetivo de obtener fragmentos al azar. Los tiempos y condiciones de sonicado se optimizaron de manera tal de generar fragmentos de entre 200 a 1000kb. Estos fragmentos se desnaturalizan y son sometidos a una inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonar específico para citosinas metiladas (5mC) (Eurogentec, BI-MECY-1000). Luego de la incubación con este anticuerpo se utilizan esferas magnéticas conjugadas con anticuerpo anti-IgG de ratón (Life Technologies, 110-41) para unir el anticuerpo anti-5mC. El ADN no metilado que no fue reconocido por el anticuerpo anti-5mC es eliminado con el sobrenadante. Como paso final en la inmunoprecipitación se purifica el ADN empleando proteinasa K, la cual digiere los anticuerpos liberando el ADN que luego es purificado con columnas específicas para fragmentos pequeños de ADN. La eficiencia de la MeDIP se evalúa mediante PCR empleando cebadores específicos para genes que han sido descritos previamente como secuencias metiladas y no metiladas en humano (Mohn et. al., 2009). En la puesta a punto de la técnica, previo al procesamiento de las muestras de interés, se empleó ADN de pacientes M y NM de LLC y como controles se amplificó la isla CpG del gen HIST1H3B (“histone cluster 1, H3b”) como control negativo y la de ZAP-70 como control positivo, evidenciándose un correcto enriquecimiento en la fracción inmunoprecipitada respecto al ADN de partida.

Posteriormente, el ADN enriquecido y el ADN de partida (ADN input) se marcan con una sonda fluorescente cianina-5 (Cy5) y una sonda cianina-3 (Cy3) respectivamente. Estas dos muestras de ADN son utilizadas para hibridar el microarreglo de islas CpG (ver esquema Fig. 1).

La hibridación del microarreglo, los lavados y escaneo fueron realizados en la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo según protocolo Agilent antes mencionado.

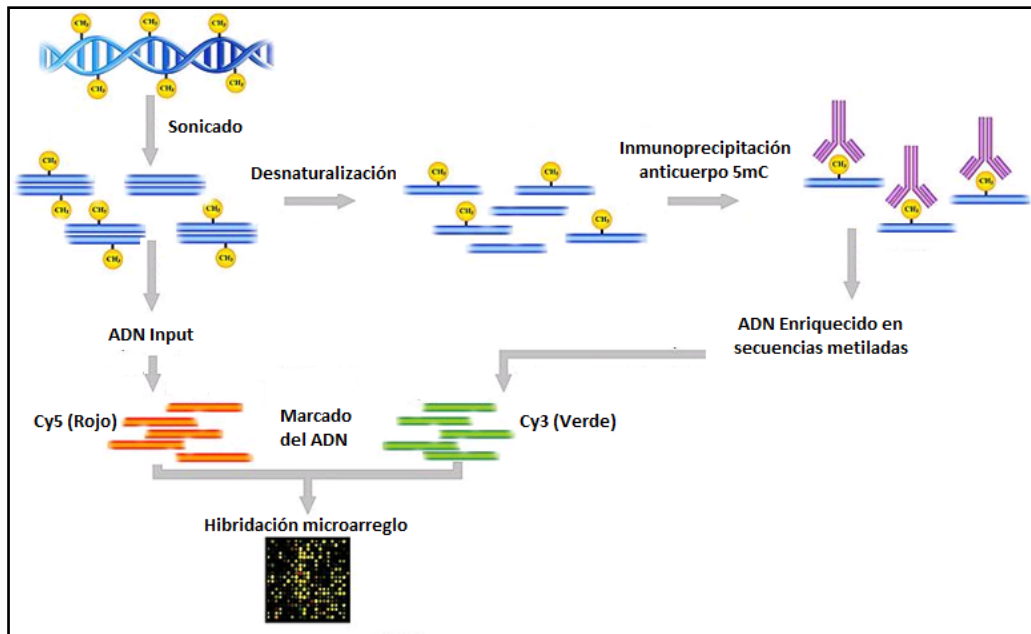


Figura 5.1. Esquema del flujo de trabajo del procedimiento inmunoprecipitación de ADN metilado seguido de hibridación de Microarreglo de Islas CpG

Análisis Bioinformático

En análisis bioinformático de los datos provenientes del microarreglo de islas CpG fue realizado por la Unidad de Bioinformática del Insitut Pasteur de Montevideo. Para el análisis de los microarreglos se utilizó el entorno R (Core-Team-R 2013). Se realizó un control de calidad estándar de los microarreglos utilizando los paquetes marray (Gentleman et al. 2004) y arrayQuality (Yang n.d.). Se controló que la distribución del background y de las dos señales no tuvieran artefactos a lo largo y ancho del array (manchas, aglomeraciones, etc) y que las señales entre arrays no fueran exesivamente diferentes. Para el análisis subsecuente se filtraron aquellas sondas que quedaron por debajo de los niveles de background.

Para la detección de las regiones enriquecidas en metilación en cada una de las muestras se utilizó el paquete Ringo (Paquet & Yang 2010). Ringo fue originalmente diseñado para el análisis de experimentos ChIP-chip en microarrays de NimbleGen pero puede ser utilizado para el análisis de experimentos ChIP-chip realizados con otras tecnologías. Para el análisis se siguieron los pasos especificados en el manual del paquete. El método de normalización seleccionado fue nimblgen. La anotación de las sondas fue revisada y se reanotaron según la versión de anotación del

genoma 2009 GRCh37/hg19. Luego de detectadas las regiones enriquecidas en metilación se seleccionaron aquellos genes que tienen regiones enriquecidos en metilación en una de las poblaciones celulares estudiada pero no se encuentra enriquecida en la otra población del paciente.

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en dos dimensiones (2D-PAGE)

Preparación de la muestra: Para cada muestra, se tomó el volumen correspondiente a 250 o 400µg de proteínas totales. Se agregó DTT 1M de manera que la concentración final en cada muestra sea 25 mM, IPG Buffer 3-11 NL a una concentración final de 0,5% y se llevó a un volumen final de 130µl con solución de rehidratación (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 2%, azul de bromofenol 0.002%).

Primera Dimensión (IEF): Las muestras se cargaron a tiras IPG Strips 3-11 NL, 7 cm, por rehidratación pasiva ON a temperatura ambiente en “reswelling tray”. La primera dimensión se realizó en “manifold”. Programa de IEF: 1) 300 V, 30 min, constante; 2) 1000 V, 30 min, en gradiente; 3) 5000 V, 80 min, en gradiente; 4) 5000 V, hasta 3500 Vh, constante.

Equilibración: Las tiras se incubaron 15 min a temperatura ambiente con agitación en Buffer de equilibración 1 (urea 6M, Tris 75 mM pH 8,8, glicerol 29,3 %, SDS 2 %, azul de bromofenol 0,002%) + DTT (10 mg/ml) seguido de 15 min a temperatura ambiente con agitación en Buffer de equilibración 2 (urea 6M, Tris 75 mM pH 8,8, glicerol 29,3 %, SDS 2 %, azul de bromofenol 0,002%) + IAA (25 mg/ml).

Segunda dimensión: SDS-PAGE 12,5 %, 10 x 10 x 0,1 cm. El gel se corrió 10 mA/gel, durante 15 min. y 20 mA/gel, hasta que el frente de corrida alcanza el borde del gel. Se empleó el marcador de peso molecular *Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare). La tinción del gel se realizó con Azul de Coomassie Coloidal

Análisis de GIMAP5 por citometría de flujo

Las PBMC fueron fijadas con 2.5% de paraformaldehído por 15min en hielo, lavadas dos veces con PBS e incubadas 10min con solución de permeabilización (PBS-P: PBS con 0.5% saponina, 4% suero fetal bovino, 1mM EDTA). Las células se incubaron por 30 min a 4°C según correspondiera

con 1/40 anti-human IgM F(ab')₂-PE (Dako, North America Inc) o 1/50 anti-human IgG F(ab')₂-FITC (Dako, North America Inc). Luego de dos lavados con PBS-P se incubó por 30min a TA con 1/500 anti-GIMAP5 (Abcam, ab74575), lavó con PBS-P e incubó por 30min 4°C con 1/1000 anti-conejo Cy5 (Invitrogen).

6 BIBLIOGRAFÍA

- Abrams, S.T. et al., 2007. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells is regulated by overexpressed active protein kinase C β 1. *Blood*, 109(3), pp.1193–201. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17003377> [Accessed June 28, 2013].
- Abreu, C. et al., 2013a. Methylation status regulates lipoprotein lipase expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 54(8), pp.1844–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23614796> [Accessed January 10, 2014].
- Abreu, C. et al., 2013b. Methylation status regulates lipoprotein lipase expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 54(8), pp.1844–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23614796>.
- Abu-Ghanem, S. et al., 2007. PKC ϵ expression contributes to the resistance of Hodgkin's lymphoma cell lines to apoptosis. *Cancer Biology and Therapy*, 6(9), pp.1375–1380.
- Abu-Hamad, S. et al., 2009. The VDAC1 N-terminus is essential both for apoptosis and the protective effect of anti-apoptotic proteins. *Journal of cell science*, 122(Pt 11), pp.1906–1916.
- Abu-Hamad, S., Sivan, S. & Shoshan-Barmatz, V., 2006. The expression level of the voltage-dependent anion channel controls life and death of the cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(15), pp.5787–5792.
- Alkan, S. et al., 2005. Survival role of protein kinase C (PKC) in chronic lymphocytic leukemia and determination of isoform expression pattern and genes altered by PKC inhibition. *American journal of hematology*, 79(2), pp.97–106. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15929099> [Accessed May 15, 2013].
- Alsagaby, S.A. et al., 2014. Proteomics-Based Strategies To Identify Proteins Relevant to Chronic Lymphocytic Leukemia.
- Amrein, P.C. et al., 2011. Phase II study of dasatinib in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(9), pp.2977–2986.
- Aoufouchi, S. et al., 2008. Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *The Journal of experimental medicine*, 205(6), pp.1357–1368.
- Arbel, N., Ben-Hail, D. & Shoshan-Barmatz, V., 2012. Mediation of the antiapoptotic activity of Bcl-xL protein upon interaction with VDAC1 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 287(27), pp.23152–23161.
- Arbel, N. & Shoshan-Barmatz, V., 2010. Voltage-dependent anion channel 1-based peptides interact with Bcl-2 to prevent antiapoptotic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 285(9), pp.6053–6062.
- Arzoine, L. et al., 2008. Voltage-dependent Anion Channel 1-based Peptides Interact with Hexokinase to Prevent Its Anti-apoptotic Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 284(6), pp.3946–3955. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M803614200>.

- Baer, C. et al., 2012. Extensive promoter DNA hypermethylation and hypomethylation is associated with aberrant microRNA expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Research*, 72(15), pp.3775–3785.
- Balatti, V. et al., 2012. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood*, 119(2), pp.329–331.
- Baliakas, P. et al., 2014. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, (April 2014), pp.1–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24943832>.
- Barnes, M.J. et al., 2010. Loss of T cell and B cell quiescence precedes the onset of microbial flora-dependent wasting disease and intestinal inflammation in Gimap5-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(7), pp.3743–3754.
- Barnidge, D.R. et al., 2005. Quantitative protein expression analysis of CLL B cells from mutated and unmutated IgVH subgroups using acid-cleavable isotope-coded affinity tag reagents. *Journal of Proteome Research*, 4(4), pp.1310–1317.
- Barragán, M. et al., 2003. Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 44(11), pp.1865–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14738137> [Accessed September 4, 2014].
- Beck, J. et al., 1998. Multiple gene expression analysis reveals distinct differences between G2 and G3 stage breast cancers, and correlations of PKC eta with MDR1, MRP and LRP gene expression. *British journal of cancer*, 77(1), pp.87–91.
- Beck, J.F. et al., 1998. Expression analysis of protein kinase C isozymes and multidrug resistance associated genes in ovarian cancer cells. *Anticancer research*, 18(2A), pp.701–705.
- Begleiter, A. et al., 1996. Chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia: mechanism of action. *Leukemia & lymphoma*, 23(3-4), pp.187–201.
- Beisiegel, U. & Heeren, J., 1997. Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) targeting of lipoproteins to receptors. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 56(2), pp.731–737.
- Belinsky, S.A., 2004. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nature reviews. Cancer*, 4(9), pp.707–717.
- Bergman, Y. & Cedar, H., 2013. DNA methylation dynamics in health and disease. *Nature Publishing Group*, 20(3), pp.274–281. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2518>.
- Berrebi, A. et al., 2010. The significance of elevated beta 2-microglobulin (b2-m) in chronic lymphocytic leukemia (CLL): Evidence of in vitro secretion following activation of CLL cells. *Leukemia Research*, 34(9), pp.248–249.
- Bhutani, N. et al., 2013. A critical role for AID in the initiation of reprogramming to induced pluripotent stem cells. *FASEB Journal*, 27(3), pp.1107–1113.
- Bhutani, N. et al., 2010. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature*, 463(7284), pp.1042–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027182>.
- Bianchi, S. et al., 2010. Immunoglobulin heavy chain V-D-J gene rearrangement and mutational status in Uruguayan patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 51(11), pp.2070–2078.

- Bilban, M. et al., 2006. Deregulated expression of fat and muscle genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia with high lipoprotein lipase expression. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 20(6), pp.1080–1088.
- Binet, J. et al., 1977. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: Prognostic significance. *Cancer*, 40(2), pp.855–64.
- Binet, J., 1999. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Haematologica*, 84, pp.96–7.
- Van Bockstaele, F. et al., 2007. Lipoprotein lipase mRNA expression in whole blood is a prognostic marker in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Chemistry*, 53(2), pp.204–212.
- Boyd, R.S. et al., 2003. Proteomic analysis of the cell-surface membrane in chronic lymphocytic leukemia: identification of two novel proteins, BCNP1 and MIG2B. *Leukemia*, 17(8), pp.1605–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12886250> [Accessed July 23, 2014].
- Bransteitter, R. et al., 2006. First AID (activation-induced cytidine deaminase) is needed to produce high affinity isotype-switched antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), pp.16833–16836.
- Brar, S.S., Watson, M. & Diaz, M., 2004. Activation-induced cytosine deaminase (AID) is actively exported out of the nucleus but retained by the induction of DNA breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), pp.26395–26401.
- Bryan, J. & Borthakur, G., 2010. Role of rituximab in first-line treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Therapeutics and clinical risk management*, 7, pp.1–11.
- Buhl, A.M. et al., 2011. Analysis of CLLU1 expression levels before and after therapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *European Journal of Haematology*, 86(5), pp.405–411.
- Buhl, A.M., Jurlander, J., Geisler, C.H., et al., 2006. CLLU1 expression levels predict time to initiation of therapy and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *European journal of haematology*, 76, pp.455–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16529606> [Accessed March 4, 2011].
- Buhl, A.M. et al., 2008. Identification of a gene on chromosome 12q22 uniquely overexpressed in chronic lymphocytic leukemia Identification of a gene on chromosome 12q22 uniquely overexpressed in chronic lymphocytic leukemia. , 107(7), pp.2904–2911.
- Buhl, A.M., Jurlander, J., Jørgensen, F.S., et al., 2006. Identification of a gene on chromosome 12q22 uniquely overexpressed in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 107(7), pp.2904–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339396> [Accessed March 8, 2011].
- Bulian, P. et al., 2014. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 32(9), pp.897–904.
- Burger, J. a et al., 2000. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*, 96(8), pp.2655–2663.
- Burger, J. a et al., 2009. The microenvironment in mature B-cell malignancies : a target for new treatment strategies Review article The microenvironment in mature B-cell malignancies : a target for new treatment strategies. , 114(16), pp.3367–3375.

- Burger, J. a, Burger, M. & Kipps, T.J., 1999. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*, 94(11), pp.3658–3667.
- Burger, J. a & Montserrat, E., 2012. Coming full circle: 70 years of chronic lymphocytic leukemia cell redistribution, from glucocorticoids to inhibitors of B cell receptor signaling. *Blood*, 121(9), pp.1501–1509. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23264597>.
- Burger, J. a., 2010. Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): From understanding the basics towards therapeutic targeting. *Seminars in Cancer Biology*, 20(6), pp.424–430. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.09.005>.
- Burger, J. a., 2012. Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape. *Current Opinion in Oncology*, 24(6), pp.643–649.
- Burger, J. a. & Gribben, J.G., 2014. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: Insight into disease biology and new targeted therapies. *Seminars in Cancer Biology*, 24, pp.71–81. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.08.011>.
- Bürkle, A. & Niedermeier, M., 2007. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. ..., 110(9), pp.3316–3325. Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/110/9/3316.full-text.pdf+html>.
- Zum Büschenfelde, C.M. et al., 2010. Recruitment of PKC-beta1 to lipid rafts mediates apoptosis-resistance in chronic lymphocytic leukemia expressing ZAP-70. *Leukemia*, 24(1), pp.141–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19907441> [Accessed June 28, 2013].
- Cahill, N. et al., 2013a. 450K-array analysis of chronic lymphocytic leukemia cells reveals global DNA methylation to be relatively stable over time and similar in resting and proliferative compartments. *Leukemia*, 27(1), pp.150–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22922567> [Accessed February 25, 2014].
- Cahill, N. et al., 2013b. 450K-array analysis of chronic lymphocytic leukemia cells reveals global DNA methylation to be relatively stable over time and similar in resting and proliferative compartments. *Leukemia*, 27(1), pp.150–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22922567> [Accessed January 8, 2014].
- Cahill, N. & Rosenquist, R., 2013. Uncovering the DNA methylome in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics*, 8(2), pp.138–148.
- Caligaris-Cappio, F., 2003. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 123(3), pp.380–388.
- Caligaris-Cappio, F. & Hamblin, T.J., 1999. B-cell chronic lymphocytic leukemia: A bird of a different feather. *Journal of Clinical Oncology*, 17(1), pp.399–408.
- Calin, G.A. et al., 2005. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, 353(17), pp.1793–1801.
- Calin, G.A. et al., 2004. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. , (9).
- Calissano, C. et al., 2009. In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 114(23), pp.4832–4842.

- Calissano, C. et al., 2011. Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 17(11-12), pp.1374–82. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3321822&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Calpe, E. et al., 2011. ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood*, 118(16), pp.4401–4410.
- Catovsky, D. & Murphy, R.L., 1995. Key issues in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *European journal of cancer*, 31A(13-14), pp.2146–2154.
- Chadwick, N. et al., 2010. Notch protection against apoptosis in T-ALL cells mediated by GIMAP5. *Blood cells, molecules & diseases*, 45(3), pp.201–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20817506> [Accessed August 13, 2013].
- Chan, a C. et al., 1992. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*, 71(4), pp.649–662.
- Chantepie, S.P. et al., 2010. ZAP-70 intron1 DNA methylation status: Determination by pyrosequencing in B chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research*, 34(6), pp.800–808.
- Chen, L. et al., 2008. ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. , 111(5), pp.2685–2692.
- Chen, S.S. et al., 2011. Silencing of the inhibitor of DNA binding protein 4 (ID4) contributes to the pathogenesis of mouse and human CLL. *Blood*, 117(3), pp.862–871.
- Cheng, W.-L. et al., 2012. Glyoxalase-I Is a Novel Prognosis Factor Associated with Gastric Cancer Progression. *PLoS ONE*, 7(3), p.e34352.
- Chiarle, R. et al., 2011. Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell*, 147(1), pp.107–119.
- Chim, C.S., Pang, R. & Liang, R., 2008. Epigenetic dysregulation of the Wnt signalling pathway in chronic lymphocytic leukaemia. *Journal of clinical pathology*, 61(11), pp.1214–1219.
- Chiorazzi, N., 2007. Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best practice & research. Clinical haematology*, 20(3), pp.399–413.
- Chiorazzi, N., 2012. Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2012, pp.76–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23233564>.
- Chiorazzi, N., Rai, K.R. & Ferrarini, M., 2005. Chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, 352(8), pp.804–815.
- Cimmino, A. et al., 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. , 103(7).

- Claus, R. et al., 2012. Quantitative DNA methylation analysis identifies a single CpG dinucleotide important for ZAP-70 expression and predictive of prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(20), pp.2483–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22564988> [Accessed June 28, 2013].
- Claus, R. et al., 2014. Validation of ZAP-70 methylation and its relative significance in predicting outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 124(1), pp.42–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24868078> [Accessed July 23, 2014].
- CLL Trialists' Collaborative Group, A., 1999. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. CLL Trialists' Collaborative Group. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(10), pp.861–868.
- Cochran, D. a E. et al., 2003. Proteomic analysis of chronic lymphocytic leukemia subtypes with mutated or unmutated Ig V(H) genes. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2(12), pp.1331–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557598> [Accessed August 17, 2010].
- Cols, M. et al., 2012. Stromal endothelial cells establish a bidirectional crosstalk with chronic lymphocytic leukemia cells through the TNF-related factors BAFF, APRIL, and CD40L. *Journal of immunology*, 188(12), pp.6071–83. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3370079&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Corcoran, M. et al., 2005. ZAP-70 methylation status is associated with ZAP-70 expression status in chronic lymphocytic leukemia Martin. *Haematologica*.
- Core-Team-R, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Cortellino, S. et al., 2011. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell*, 146(1), pp.67–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722948> [Accessed July 17, 2011].
- Crespo, M. et al., 2003. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, 348(18), pp.1764–1775.
- Dahéron, L. et al., 2001. Molecular cloning of lan4: a BCR/ABL-induced gene that encodes an outer membrane mitochondrial protein with GTP-binding activity. *Nucleic acids research*, 29(6), pp.1308–1316.
- Damle, R.N. et al., 2007. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood*, 110(9), pp.3352–3359.
- Damle, R.N. et al., 1999. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94(6), pp.1840–1847.
- Davids, M.S. & Brown, J.R., 2012. Targeting the B Cell Receptor Pathway in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 53(May), pp.1–23.
- Davids, M.S. & Burger, J. a, 2012. Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Open journal of hematology*, 3(S1), pp.1–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3404599&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Deaglio, S. & Malavasi, F., 2009. Chronic lymphocytic leukemia microenvironment: shifting the balance from apoptosis to proliferation. *Haematologica*, 94(6), pp.752–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2688562&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 28, 2013].
- Decker, T. et al., 2002. Cell cycle progression of chronic lymphocytic leukemia cells is controlled by cyclin D2, cyclin D3, cyclin-dependent kinase (cdk) 4 and the cdk inhibitor p27. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 16(3), pp.327–334.
- Dedeoglu, F. et al., 2004. Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NF- κ B. *International Immunology*, 16(3), pp.395–404.
- Demorest, Z.L., Li, M. & Harris, R.S., 2011. Phosphorylation directly regulates the intrinsic DNA cytidine deaminase activity of activation-induced deaminase and APOBEC3G protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(30), pp.26568–26575.
- Dighiero G, Hamblin, T.J., 2008. Chronic lymphocytic leukaemia. *Bailliere's clinical haematology*, 1(2), pp.449–491.
- Dighiero, G., 2005. CLL biology and prognosis. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, pp.278–284.
- Dighiero, G., 2003. Unsolved issues in CLL biology and management. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 17(May), pp.2385–2391.
- Döhner, H. et al., 2000. Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 343, pp.1910–1916.
- Dubovsky, J. a et al., 2013. Lymphocyte cytosolic protein 1 is a chronic lymphocytic leukemia membrane-associated antigen critical to niche homing. *Blood*, 122(19), pp.3308–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009233>.
- Duquette, M.L. et al., 2005. AID binds to transcription-induced structures in c-MYC that map to regions associated with translocation and hypermutation. *Oncogene*, 24(38), pp.5791–5798.
- Eagle, G.L. et al., 2015. Total Proteome Analysis Identifies Migration Defects as a Major Pathogenetic Factor in Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region (IGHV)-unmutated Chronic Lymphocytic Leukemia. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(4), pp.933–945. Available at: <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M114.044479>.
- Eden, A. et al., 2003. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5618), p.455.
- Efremov, D.G. et al., 1996. IgM-producing chronic lymphocytic leukemia cells undergo immunoglobulin isotype-switching without acquiring somatic mutations. *Journal of Clinical Investigation*, 98(2), pp.290–298.
- Egger, G. et al., 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990), pp.457–463.
- Fabbri, G. et al., 2011. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *The Journal of experimental medicine*, 208(7), pp.1389–1401.

- Fais, F. et al., 1996. Examples of in vivo isotype class switching in IgM+ chronic lymphocytic leukemia B cells. *Journal of Clinical Investigation*, 98(7), pp.1659–1666.
- Fasola, G. et al., 1984. Serum LDH concentration in non-Hodgkin's lymphomas. Relationship to histologic type, tumor mass, and presentation features. *Acta haematologica*, 72(4), pp.231–238.
- Feinberg, A.P. & Tycko, B., 2004. The history of cancer epigenetics. *Nature reviews. Cancer*, 4(2), pp.143–153.
- Filén, S. & Lahesmaa, R., 2010. GIMAP Proteins in T-Lymphocytes. *Journal of signal transduction*, 2010, p.268589. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3100574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 8, 2014].
- Fonseca-Sánchez, M.A. et al., 2012. Breast cancer proteomics reveals a positive correlation between glyoxalase 1 expression and high tumor grade. *International Journal of Oncology*, 41(2), pp.670–680.
- Foshay, K.M. et al., 2012. Embryonic Stem Cells Induce Pluripotency in Somatic Cell Fusion through Biphasic Reprogramming. *Molecular Cell*, 46(2), pp.159–170.
- Fraenkel, S. et al., 2007. Allelic “choice” governs somatic hypermutation in vivo at the immunoglobulin kappa-chain locus. *Nature immunology*, 8(7), pp.715–722.
- Franchini, D.M. et al., 2014. Processive DNA demethylation via dna deaminase-induced lesion resolution. *PLoS ONE*, 9(7).
- Fritz, E.L. et al., 2013. A comprehensive analysis of the effects of the deaminase AID on the transcriptome and methylome of activated B cells. *Nature immunology*, 14(7), pp.749–55. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3688651&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Fulci, V. et al., 2007. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 109(11), pp.4944–4951.
- Gattei, V. et al., 2008. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 111(2), pp.865–873.
- Gelmez, M.Y. et al., 2014. Analysis of activation-induced cytidine deaminase mRNA levels in patients with chronic lymphocytic leukemia with different cytogenetic status. *Leukemia & lymphoma*, 55(2), pp.326–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23662991>.
- Gentleman, R.C. et al., 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology*, 5(10), p.R80.
- Ghia, P. et al., 2003. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood*, 101(4), pp.1262–1269.
- Ghia, P., Chiorazzi, N. & Stamatopoulos, K., 2008. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: The role of antigen stimulation. *Journal of Internal Medicine*, 264(6), pp.549–562.
- Ghosh, A.K. et al., 2010. Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. , 115(9), pp.1755–1764.

- Ginaldi, L. et al., 1998. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *Journal of clinical pathology*, 51, pp.364–369.
- Glaum, M.C. et al., 2009. Toll-like receptor 7-induced naive human B-cell differentiation and immunoglobulin production. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(1).
- Gonzalez, D. et al., 2013. CLLU1 expression has prognostic value in chronic lymphocytic leukemia after first-line therapy in younger patients and in those with mutated IGHV genes. *Haematologica*, 98(2), pp.274–278.
- Gordon, M.S. et al., 2003. Somatic hypermutation of the B cell receptor genes B29 (Igbeta, CD79b) and mb1 (Igalpha, CD79a). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), pp.4126–4131.
- Görgün, G. et al., 2005. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *Leukemia*, 19(7), pp.1797–1805.
- Granziero, L. et al., 2001. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 97(9), pp.2777–2783.
- Grills, C. et al., 2011. Gene expression meta-analysis identifies VDAC1 as a predictor of poor outcome in early stage non-small cell lung cancer. *PloS one*, 6(1), p.e14635.
- Grobholz, R. et al., 2002. Bax, Bcl-2, fas and Fas-L antigen expression in human seminoma: correlation with the apoptotic index. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 110(10), pp.724–732.
- Guo, J.U. et al., 2011. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 145(3), pp.423–34. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3088758&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 17, 2011].
- Habib, O. et al., 2013. AID-coupled DNA Demethylation is Not Crucial for the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem cells and development*, 23(3), pp.1–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24083501>.
- Ten Hacken, E. & Burger, J. a., 2014. Microenvironment dependency in Chronic Lymphocytic Leukemia: The basis for new targeted therapies. *Pharmacology and Therapeutics*, 144(3), pp.338–348. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.07.003>.
- Hagemeister, F., 2010. Rituximab for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs*, 70(3), pp.261–272. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20166765>.
- Hajkova, P. et al., 2002. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mechanisms of Development*, 117(1-2), pp.15–23.
- Hale, G. et al., 1990. The CAMPATH-1 antigen (CDw52). *Tissue antigens*, 35(3), pp.118–127.
- Hallek, M. et al., 2008. 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. *Leukemia*, 22(12), pp.5446–5456.

- Hallek, M. et al., 1996. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leukemia & lymphoma*, 22(5-6), pp.439–447.
- Hallek, M., 2013. Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2013, pp.138–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24319175>.
- Hamblin, B.T.J. et al., 1999. Unmutated Ig VH Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 94(6), pp.1848–1854.
- Hamblin, T.J. et al., 2002. 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*, 99(3), pp.1023–1029.
- Hamblin, T.J., Davis, Z. a. & Oscier, D.G., 2008. Determination of how many immunoglobulin variable region heavy chain mutations are allowable in unmutated chronic lymphocytic leukaemia - Long-term follow up of patients with different percentages of mutations. *British Journal of Haematology*, 140(3), pp.320–323.
- Hancer, V.S. et al., 2011. Activation-induced cytidine deaminase mRNA levels in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 52(1), pp.79–84.
- Harikrishnan, K.N. et al., 2004. Expression analysis of the epigenetic methyltransferases and methyl-CpG binding protein families in the normal B-cell and B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Cancer Biology and Therapy*, 3(10), pp.989–994.
- Hasler, J., Rada, C. & Neuberger, M.S., 2011. Cytoplasmic activation-induced cytidine deaminase (AID) exists in stoichiometric complex with translation elongation factor 1 (eEF1A). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), pp.18366–18371.
- Hazan-Halevy, I. et al., 2010. STAT3 is constitutively phosphorylated on serine 727 residues, binds DNA, and activates transcription in CLL cells. *Blood*, 115(14), pp.2852–2863.
- Vander Heiden, M.G. et al., 1999. Bcl-x(L) prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Molecular Cell*, 3(2), pp.159–167.
- Heintel, D. et al., 2005. High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 19(7), pp.1216–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15858619> [Accessed January 9, 2012].
- De Hemptinne, V. et al., 2009. Phosphorylation on Thr-106 and NO-modification of glyoxalase I suppress the TNF-induced transcriptional activity of NF- κ B. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 325(1-2), pp.169–178.
- Herman, S.E.M. et al., 2011. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. , 117(23), pp.6287–6296.
- Hibbs, M.L. et al., 1995. Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell*, 83(2), pp.301–311.
- Hogenbirk, M. a et al., 2013. Differential programming of B cells in AID deficient mice. *PloS one*, 8(7), p.e69815. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3726761&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
[Accessed October 15, 2014].

- Howlader, N. et al., 2013. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/, based on November 2013 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2014. Available at: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/.
- Huang, Y. & Rao, A., 2014. Connections between TET proteins and aberrant DNA modification in cancer. *Trends in Genetics*, 30(10), pp.464–474. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.005>.
- Huemer, M. et al., 2014. AID induces intraclonal diversity and genomic damage in CD86 + chronic lymphocytic leukemia cells. *European Journal of Immunology*, 44(12), pp.3747–3757. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201344421>.
- Hussaini, I.M. et al., 2002. Protein kinase C-eta regulates resistance to UV- and gamma-irradiation-induced apoptosis in glioblastoma cells by preventing caspase-9 activation. *Neuro-oncology*, 4(1), pp.9–21.
- Ito, S. et al., 2004. Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), pp.1975–1980.
- Jin, H.R. et al., 2012. Cryptopleurine targets NF-κB pathway, leading to inhibition of gene products associated with cell survival, proliferation, invasion, and angiogenesis. *PLoS ONE*, 7(6).
- Johnson, S. et al., 1996. *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.*
- Jolly, C.J. & Neuberger, M.S., 2001. Somatic hypermutation of immunoglobulin ?? transgenes: Association of mutability with demethylation. *Immunology and Cell Biology*, 79(1), pp.18–22.
- Jones, P. a & Baylin, S.B., 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews. Genetics*, 3(6), pp.415–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042769>.
- Jones, P.A. & Baylin, S.B., 2007. The Epigenomics of Cancer. *Cell*, 128(4), pp.683–692.
- Kaderi, M.A. et al., 2011. LPL is the strongest prognostic factor in a comparative analysis of RNA-based markers in early chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 96(8), pp.1153–1160.
- Kanduri, M. et al., 2010. Differential genome-wide array-based methylation profiles in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 115(2), pp.296–305. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19897574> [Accessed October 18, 2010].
- Kanduri, M. et al., 2012. Distinct transcriptional control in major immunogenetic subsets of chronic lymphocytic leukemia exhibiting subset-biased global DNA methylation profiles. *Epigenetics*, 7(December), pp.1435–1442.
- Kantharidis, P. et al., 1997. Altered methylation of the human MDR1 promoter is associated with acquired multidrug resistance. *Clinical Cancer Research*, 3(11), pp.2025–2032.

- Kashuba, E. et al., 2013. Proteomic analysis of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukaemia reveals a possible role for kininogen. *Journal of proteomics*, 91, pp.478–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23938224> [Accessed July 16, 2014].
- Kater, A.P. et al., 2014. Dasatinib in combination with fludarabine in patients with refractory chronic lymphocytic leukemia: A multicenter phase 2 study. *Leukemia Research*, 38(1), pp.34–41. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2013.10.004>.
- Kazi, J.U., Kabir, N.N. & Rönstrand, L., 2013. Protein kinase C (PKC) as a drug target in chronic lymphocytic leukemia. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 30(4), p.757. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24174318> [Accessed July 10, 2014].
- Kienle, D. et al., 2010. Gene expression factors as predictors of genetic risk and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 95(1), pp.102–109.
- Kimby, E. et al., Surface immunoglobulin pattern of the leukaemic cell population in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) in relation to disease activity. *Hematological oncology*, 3(4), pp.261–269.
- Kinoshita, K. et al., 2001. A hallmark of active class switch recombination: transcripts directed by I promoters on looped-out circular DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), pp.12620–12623.
- Kinoshita, K. & Nonaka, T., 2006. The dark side of activation-induced cytidine deaminase: relationship with leukemia and beyond. *International journal of hematology*, 83(3), pp.201–207.
- Klein, I.A. et al., 2011. Translocation-capture sequencing reveals the extent and nature of chromosomal rearrangements in B lymphocytes. *Cell*, 147(1), pp.95–106.
- Kohli, R.M. & Zhang, Y., 2013. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502(7472), pp.472–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4046508&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kolset, O. & Salmivirta, M., 1999. Cell surface heparan sulfate proteoglycans and lipoprotein metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 56(14), pp.857–870.
- Koren, I., Raviv, Z. & Shoshan-Barmatz, V., 2010. Downregulation of voltage-dependent anion channel-1 expression by RNA interference prevents cancer cell growth in vivo. *Cancer biology & therapy*, 9(12), pp.1046–1052.
- Krajewski, S. et al., 1995. Immunohistochemical Analysis of Mcl-1 Protein in Human Tissues. *American Journal of Pathology*, 146(6), pp.1309–1319.
- Krasnitsky, E. et al., 2012. PKC η is a novel prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Anticancer Research*, 32(4), pp.1507–1513.
- Kriaucionis, S. & Heintz, N., 2009. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5929), pp.929–930.
- Kulis, M. et al., 2012. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. , (October).

- Kumar, R. et al., 2013. AID stabilizes stem-cell phenotype by removing epigenetic memory of pluripotency genes. *Nature*. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12299> [Accessed June 26, 2013].
- Kurtova, A. V. et al., 2009. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: Development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood*, 114(20), pp.4441–4450.
- Lagneaux, L. et al., 1998. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*, 91(7), pp.2387–2396.
- Laird, P.W., 2003. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature reviews. Cancer*, 3(4), pp.253–266.
- Landau, D.A. et al., 2014. Locally Disordered Methylation Forms the Basis of Intratumor Methylome Variation in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*, 26(6), pp.813–825. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610814004164>.
- Lanham, S. et al., 2003. Differential signaling via surface IgM is associated with V H gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. , 101(3), pp.1087–1093.
- Larijani, M. et al., 2005. Methylation protects cytidines from AID-mediated deamination. *Molecular immunology*, 42(5), pp.599–604. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607819> [Accessed August 16, 2010].
- Lee-Theilen, M. & Chaudhuri, J., 2010. Walking the AID tightrope. *Nature immunology*, 11(2), pp.107–109.
- Lennert, K. et al., 1978. Malignant Lymphomas Other than Hodgkin's Disease. In New York, pp. 119–129.
- Leporrier, M. et al., 2001. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood*, 98(8), pp.2319–2325.
- Leuenberger, M. et al., 2010. AID protein expression in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma is associated with poor prognosis and complex genetic alterations. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 23(2), pp.177–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898425> [Accessed December 1, 2014].
- Liso, V. et al., 2001. Evaluation of trisomy 12 by fluorescence in situ hybridization in peripheral blood, bone marrow and lymph nodes of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, pp.212–217.
- Liu, M. et al., 2008. Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature*, 451(7180), pp.841–845.
- Liu, T.-H. et al., 2006. CpG island methylation and expression of the secreted frizzled-related protein gene family in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer research*, 66(2), pp.653–658.
- Lombardo, L.J. et al., 2004. Discovery of N - (2-Chloro-6-methyl- phenyl) -2- (6- (4- (2-hydroxyethyl) - (BMS-354825) , a Dual Src / Abl Kinase Inhibitor with Potent Antitumor Activity in Preclinical Assays. *Journal of Medicinal Chemistry*, pp.6658–6661.

- Longo, P.G. et al., 2007. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 21(1), pp.110–120.
- Lutzny, G. et al., 2013. 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*, 23(1), pp.77–92. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3546417&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 28, 2013].
- Malavasi, F. et al., 2008. Evolution and Function of the ADP Ribosyl Cyclase / CD38 Gene Family in Physiology and Pathology. *Physiological Review*, 88, pp.841–886.
- Maloum, K. et al., 2009. IGHV gene mutational status and LPL/ADAM29 gene expression as clinical outcome predictors in CLL patients in remission following treatment with oral fludarabine plus cyclophosphamide. *Annals of Hematology*, 88(12), pp.1215–1221.
- Mansouri, M. et al., 2010. Lipoprotein lipase is differentially expressed in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia but displays invariably low catalytical activity. *Leukemia research*, 34(3), pp.301–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19709746> [Accessed January 9, 2012].
- Martel, C., Wang, Z. & Brenner, C., 2014. VDAC phosphorylation, a lipid sensor influencing the cell fate. *Mitochondrion*, 19, pp.69–77. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.07.009>.
- Martín-Subero, J.I., López-Otín, C. & Campo, E., 2013. Genetic and epigenetic basis of chronic lymphocytic leukemia. *Current opinion in hematology*, 20(4), pp.362–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23719185>.
- Marton, S. et al., 2008. Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 22(2), pp.330–338.
- Masterjohn, C. et al., 2013. Acute glutathione depletion induces hepatic methylglyoxal accumulation by impairing its detoxification to D-lactate. *Experimental Biology and Medicine*, 238(4), pp.360–369. Available at: <http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/1535370213477987>.
- Matsumura, M. et al., 2003. The η isoform of protein kinase C inhibits UV-induced activation of caspase-3 in normal human keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303(1), pp.350–356.
- Maul, R.W. & Gearhart, P.J., 2010. AID and somatic hypermutation. *Advances in Immunology*, 105(C), pp.159–191.
- McBride, K.M. et al., 2008. Regulation of class switch recombination and somatic mutation by AID phosphorylation. *The Journal of experimental medicine*, 205(11), pp.2585–2594.
- McBride, K.M. et al., 2004. Somatic hypermutation is limited by CRM1-dependent nuclear export of activation-induced deaminase. *The Journal of experimental medicine*, 199(9), pp.1235–1244.
- Messmer, B.T. et al., 2005. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Journal of Clinical Investigation*, 115(3), pp.755–764.
- Mohn, F. et al., 2009. Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP). *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 507, pp.55–64.

- Montamat-Sicotte, D. et al., 2013. Origins and consequences of AID expression in lymphoid neoplasms. *Current Immunology Reviews*, 9(2), pp.72–85.
- Montserrat, E., 2002. Current and developing chemotherapy for CLL. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 19 Suppl, pp.S11–S19.
- Montserrat, E. & Moreno, C., 2008. Chronic lymphocytic leukaemia: a short overview. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 19 Suppl 7(Supplement 7), pp.vii320–i325.
- Moreau, E. et al., 1997. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*, 108(4), pp.378–82.
- Moreno, P. et al., 2013. Lipoprotein lipase expression in unmutated CLL patients is the consequence of a demethylation process induced by the microenvironment. *Leukemia*, 27(3), pp.721–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22828442> [Accessed January 10, 2014].
- Morgan, H.D. et al., 2004. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: Implications for epigenetic reprogramming. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), pp.52353–52360.
- Moro, I. et al., 2009. Primer registro nacional de leucemias. In *XI Uruguayan Hematology Congress, 19–21 November*. Punta del Este-Uruguay.
- Moskalev, E. a et al., 2012. Concurrent epigenetic silencing of Wnt/beta-catenin pathway inhibitor genes in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *BMC Cancer*, 12(1), p.213. Available at: BMC Cancer.
- Muramatsu, M. et al., 1999. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *The Journal of biological chemistry*, 274(26), pp.18470–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10373455>.
- Nabel, C.S. et al., 2012. AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation. *Nature chemical biology*, (july), pp.1–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22772155> [Accessed July 13, 2012].
- Nikitin, E.A. et al., 2007. Expression level of lipoprotein lipase and dystrophin genes predict survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 48(5), pp.912–922.
- Niklas, N. et al., 2014. Qualifying high-throughput immune repertoire sequencing. *Cellular Immunology*, 288(1-2), pp.31–38. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.02.001>.
- Nüchel, H. et al., 2006. Lipoprotein lipase expression is a novel prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 47(6), pp.1053–1061.
- Oakes, C.C. et al., 2014. Evolution of DNA methylation is linked to genetic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer discovery*, 4(3), pp.348–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24356097> [Accessed April 29, 2014].
- Okazaki, I. et al., 2003. Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *The Journal of experimental medicine*, 197(9), pp.1173–1181.

- Okazaki, I. et al., 2002. The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts. *Nature*, 416(6878), pp.340–345.
- Okkenhaug, K. & Vanhaesebroeck, B., 2003. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nature reviews. Immunology*, 3(4), pp.317–330.
- Olivecrona, T. et al., 1997. Lipoprotein lipase: regulation and role in lipoprotein metabolism. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 56(2), pp.723–729.
- Oppezco, P. et al., 2003. Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood*, 101(10), pp.4029–4032.
- Oppezco, P., Dumas, G., et al., 2005. Different isoforms of BSAP regulate expression of AID in normal and chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, 105(6), pp.2495–2503.
- Oppezco, P. et al., 2002. Do CLL B cells correspond to naive or memory B-lymphocytes? Evidence for an active Ig switch unrelated to phenotype expression and Ig mutational pattern in B-CLL cells. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 16(12), pp.2438–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12454750> [Accessed January 9, 2012].
- Oppezco, P., Vasconcelos, Y., et al., 2005. The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 106(2), pp.650–657.
- Orthwein, A. et al., 2010. Regulation of activation-induced deaminase stability and antibody gene diversification by Hsp90. *The Journal of experimental medicine*, 207(12), pp.2751–2765.
- Palacios, F. et al., 2014. Activation of the PI3K/AKT pathway by microRNA-22 results in CLL B-cell proliferation. *Leukemia*, (January), pp.1–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24825182>.
- Palacios, F. et al., 2015. Dissecting chronic lymphocytic leukemia microenvironment signals in patients with unmutated disease: microRNA-22 regulates phosphatase and tensin homolog/AKT/FOXO1 pathway in proliferative leukemic cells. *Leukemia & Lymphoma*, (November 2014), pp.1–6. Available at: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2014.990900>.
- Palacios, F. et al., 2010. High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: Link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood*, 115(22), pp.4488–4496. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20233972> [Accessed July 15, 2012].
- Palacios, F. et al., 2012. Microenvironment Interactions in Chronic Lymphocytic Leukemia : A Delicate Equilibrium Linking the Quiescent and the Proliferative Pool.
- Pallasch, C.P. et al., 2008. Targeting lipid metabolism by the lipoprotein lipase inhibitor orlistat results in apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 22(3), pp.585–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18079738> [Accessed December 29, 2011].
- Paquet, A. & Yang, J.Y.H., 2010. arrayQuality: Assessing array quality on spotted arrays. R package version 1.44.0. <http://arrays.ucsf.edu/>.

- Pasqualucci, L. et al., 1998. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(20), pp.11816–11821.
- Patenaude, A.-M. et al., 2009. Active nuclear import and cytoplasmic retention of activation-induced deaminase. *Nature structural & molecular biology*, 16(5), pp.517–527.
- Patten, P.E.M. et al., 2008. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood*, 111(10), pp.5173–5181.
- Patten, P.E.M. et al., 2012. IGHV-unmutated and IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia cells produce activation-induced deaminase protein with a full range of biologic functions. *Blood*, 120(24), pp.4802–4811.
- Pei, L. et al., 2012. Genome-wide DNA methylation analysis reveals novel epigenetic changes in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics*, 7(6), pp.567–578.
- Pekarsky, Y. et al., 2006. Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Research*, 66(24), pp.11590–11593.
- Pepper, C. et al., 2007. Highly purified CD38+ and CD38- sub-clones derived from the same chronic lymphocytic leukemia patient have distinct gene expression signatures despite their monoclonal origin. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 21(4), pp.687–696.
- Perez-Chacon, G. et al., 2007. CD5 provides viability signals to B cells from a subset of B-CLL patients by a mechanism that involves PKC. *Leukemia research*, 31(2), pp.183–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16725198> [Accessed June 28, 2013].
- Pérez-Durán, P., De Yébenes, V.G. & Ramiro, A.R., 2007. Oncogenic events triggered by AID, the adverse effect of antibody diversification. *Carcinogenesis*, 28(12), pp.2427–2433.
- Perrot, A. et al., 2011. A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 118(4), pp.e1–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21602524> [Accessed July 10, 2014].
- Ponader, S. et al., 2014. Lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood*, 119(5), pp.1182–1189.
- Popp, C. et al., 2010. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature*, 463(7284), pp.1101–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20098412>.
- Porpaczy, E. et al., 2013. Lipoprotein lipase in chronic lymphocytic leukaemia - Strong biomarker with lack of functional significance. *Leukemia Research*, 37(6), pp.631–636. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2013.02.008>.
- Prezma, T. et al., 2013. VDAC1-based peptides: novel pro-apoptotic agents and potential therapeutics for B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cell death & disease*, 4(9), p.e809. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3789174&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 14, 2014].

- Puente, X.S. et al., 2011. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 475, pp.101–105.
- Puiggros, A., Blanco, G. & Espinet, B., 2014. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: Where we are and where we go. *BioMed Research International*, 2014.
- Queirós, a C. et al., 2014. A B-cell epigenetic signature defines three biological subgroups of chronic lymphocytic leukemia with clinical impact. *Leukemia*, (August), pp.1–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25151957> [Accessed September 18, 2014].
- Quesada, V., Ramsay, A.J. & Lopez-Otin, C., 2012. Chronic lymphocytic leukemia with SF3B1 mutation. *The New England journal of medicine*, 366, p.2530. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24615009>.
- Rahmatpanah, F. et al., 2009. Large-scale analysis of DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenomics*, 1(1), pp.39–61. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2872502&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> \n<http://doi/abs/10.2217/epi.09.10>.
- Rai, K., 1987. A critical analysis of staging in CLL. In R. Gale & K. Ra, eds. *Chronic Lymphocytic Leukemia: Recent Progress and Future Directions*. New York: Alan R. Liss, pp. 253–264.
- Rai, K. et al., 1975. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. , 46(2), pp.219–234.
- Rai, K. et al., 2008. DNA Demethylation in Zebrafish Involves the Coupling of a Deaminase , a Glycosylase , and Gadd45. *Cancer*, 135(7), pp.1201–1212.
- Rai, K.R. et al., 2000. *Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia.*,
- Ramiro, A.R. & Barreto, V.M., 2015. Activation-induced cytidine deaminase and active cytidine demethylation. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(3), pp.172–181. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000415000079>.
- Ramsay, A.D. & Rodriguez-Justo, M., 2013. Chronic lymphocytic leukaemia - the role of the microenvironment pathogenesis and therapy. *British Journal of Haematology*, 162(1), pp.15–24.
- Rangam, G. et al., 2012. Aid enzymatic activity is inversely proportional to the size of cytosine c5 orbital cloud. *PLoS ONE*, 7(8).
- Rassenti, L.Z. et al., 2008. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 112(5), pp.1923–1930.
- Raval, A. et al., 2007. Downregulation of Death-Associated Protein Kinase 1 (DAPK1) in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cell*, 129(5), pp.879–890.
- Raval, A. et al., 2005. TWIST2 demonstrates differential methylation in immunoglobulin variable heavy chain mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 23(17), pp.3877–3885.
- Rees-Unwin, K.S. et al., 2010. Ribosome-associated nucleophosmin 1: increased expression and shuttling activity distinguishes prognostic subtypes in chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*, 148(4), pp.534–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19961478> [Accessed August 17, 2010].

- Richardson, S.J. et al., 2006. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic. , 107(9), pp.3584–3592.
- Ronchetti, D. et al., 2013. Distinct Patterns of Global Promoter Methylation in Early Stage Chronic Lymphocytic Leukemia. , 00(July), pp.1–10.
- De Rooij, M.F.M. et al., 2012. The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 119(11), pp.2590–2594.
- Rosenwald, a et al., 2001. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*, 194(11), pp.1639–1647.
- Rossi, D. et al., 2008. CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 93(10), pp.1575–1579.
- Rossi, D. et al., 2012. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 119(12), pp.2854–2862.
- Rossi, D. et al., 2013. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. , 121(8), pp.1403–1412.
- Rossi, S. et al., 2010. MicroRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood*, 116(6), pp.945–952.
- Rotem-Dai, N. et al., 2009. PKC η confers protection against apoptosis by inhibiting the pro-apoptotic JNK activity in MCF-7 cells. *Experimental Cell Research*, 315(15), pp.2616–2623.
- Rozovski, U. et al., 2015. Aberrant LPL Expression, Driven by STAT3, Mediates Free Fatty Acid Metabolism in CLL Cells. *Molecular Cancer Research*, pp.713–745. Available at: <http://mcr.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1541-7786.MCR-14-0412>.
- Rush, L.J. et al., 2004. Epigenetic profiling in chronic lymphocytic leukemia reveals novel methylation targets. *Cancer research*, 64(7), pp.2424–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15059895>.
- Saad, A.A. et al., 2008. Prognostic value of lipoprotein lipase expression among egyptian B-chronic lymphocytic leukemia patients. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 20(4), pp.323–329.
- Sabag, O. et al., 2014. Establishment of methylation patterns in ES cells. *Nature structural & molecular biology*, 21(1), pp.110–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336222>.
- Sakamoto, H. et al., 2000. Glyoxalase I is involved in resistance of human leukemia cells to antitumor agent-induced apoptosis. *Blood*, 95(10), pp.3214–3218.
- Sampath, D. et al., 2012. Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 119(5), pp.1162–1172.
- Sandal, T. et al., 2003. Irod/Ian5: an inhibitor of gamma-radiation- and okadaic acid-induced apoptosis. *Molecular biology of the cell*, 14(8), pp.3292–3304.

- Santarius, T. et al., 2010. GLO1-A novel amplified gene in human cancer. *Genes, chromosomes & cancer*, 49(8), pp.711–725.
- Sasaki, H. & Matsui, Y., 2008. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nature reviews. Genetics*, 9(2), pp.129–140.
- Saunders, A. et al., 2009. Expression of GIMAP1, a GTPase of the immunity-associated protein family, is not up-regulated in malaria. *Malaria journal*, 8, p.53.
- Saunders, A. et al., 2010. Putative GTPase GIMAP1 is critical for the development of mature B and T lymphocytes. *Blood*, 115(16), pp.3249–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20194894> [Accessed August 13, 2013].
- Schimmer, A.D. et al., 2003. Bcl-2 and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Current treatment options in oncology*, 4(3), pp.211–218.
- Schroeder, H.W. & Dighiero, G., 1994. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today*, (6), pp.288–294.
- Schulteis, R.D. et al., 2008. Impaired survival of peripheral T cells, disrupted NK/NKT cell development, and liver failure in mice lacking Gimap5. *Blood*, 112(13), pp.4905–4914.
- Scielzo, C. et al., 2010. HS1 has a central role in the trafficking and homing of leukemic B cells. *Blood*, 116(18), pp.3537–3546.
- Scielzo, C. et al., 2005. HS1 protein is differentially expressed in chronic lymphocytic leukemia patient subsets with good or poor prognoses. *Journal of Clinical Investigation*, 115(6), pp.1644–1650.
- Scielzo, C. et al., 2006. ZAP-70 is expressed by normal and malignant human B-cell subsets of different maturational stage. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 20(4), pp.689–695.
- Seiffert, M. et al., 2010. Soluble CD14 is a novel monocyte-derived survival factor for chronic lymphocytic leukemia cells, which is induced by CLL cells in vitro and present at abnormally high levels in vivo V H gene usage. , 116(20), pp.4223–4230.
- Shachar, I. & Haran, M., 2011. The secret second life of an innocent chaperone: the story of CD74 and B cell/chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Leukemia & lymphoma*, 52(8), pp.1446–1454.
- Shahaf, G. et al., 2012. PKC η is a negative regulator of AKT inhibiting the IGF-I induced proliferation. *Experimental cell research*, 318(7), pp.789–99. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22305966> [Accessed August 13, 2013].
- Shahjahani, M. et al., 2015. Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis. *Cellular Oncology*. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13402-014-0215-3>.
- Shaknovich, R. et al., 2011. DNA methyltransferase 1 and DNA methylation patterning contribute to germinal center B-cell differentiation. , 118(13), pp.3559–3569.

- Shen, H.M. et al., 1998. Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5370), pp.1750–1752.
- Shimamoto, R. et al., 2014. Generation and characterization of induced pluripotent stem cells from aid-deficient mice. *PLoS ONE*, 9(4), pp.1–13.
- Shoshan-Barmatz, V. et al., 2010. Apoptosis is regulated by the VDAC1 N-terminal region and by VDAC oligomerization: Release of cytochrome c, AIF and Smac/Diablo. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1797(6-7), pp.1281–1291.
- Shoshan-Barmatz, V. et al., 2014. The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 in tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273614003757>.
- Sivina, M. et al., 2011. CCL3 (MIP-1 α) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia. , 117(5), pp.1662–1669.
- Sivina, M. et al., 2012. Stromal cells modulate TCL1 expression, interacting AP-1 components and TCL1-targeting micro-RNAs in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 26(8), pp.1812–1820. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2012.63>.
- Sonnemann, J., Gekeler, V., Sagrauske, A., et al., 2004. Down-regulation of protein kinase C α potentiates the cytotoxic effects of exogenous tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in PC-3 prostate cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 3(7), pp.773–781.
- Sonnemann, J., Gekeler, V., Ahlbrecht, K., et al., 2004. Down-regulation of protein kinase C η by antisense oligonucleotides sensitises A549 lung cancer cells to vincristine and paclitaxel. *Cancer Letters*, 209(2), pp.177–185.
- Srinivasan, L. et al., 2009. PI3 Kinase Signals BCR-Dependent Mature B Cell Survival. *Cell*, 139(3), pp.573–586. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.041>.
- Stach, D., 2003. Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels. *Nucleic Acids Research*, 31(2), p.2e–2. Available at: <http://www.nar.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/nar/gng002> [Accessed August 17, 2010].
- Stamatopoulos, B. et al., 2009. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification sion levels decreased significantly with progression from Binet stage A to C were significantly lower in poor p. *Blood*, 113(21), pp.5237–5245.
- Stanganelli, C. et al., 2013. Immunoglobulin gene rearrangements and mutational status in argentinian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*, 13(4), pp.447–457.e2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665144>.
- Steinberg, S.F., 2008. Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. , 88(4), pp.1341–1378.
- Stoeger, Z.M. et al., 1989. Production of autoantibodies by CD5-expressing B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*, 169(1), pp.255–268.
- Stilgenbauer, S. et al., 2002. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and. *Leukemia*, pp.993–1007.

- Storb, U. & Arp, B., 1983. Methylation patterns of immunoglobulin genes in lymphoid cells: correlation of expression and differentiation with undermethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(21), pp.6642–6646.
- Strathdee, G. et al., 2006. Promoter hypermethylation silences expression of the HoxA4 gene and correlates with IgVh mutational status in CLL. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 20(7), pp.1326–1329.
- Szánthó, E. et al., 2014. Serum thymidine kinase activity: Analytical performance, age-related reference ranges and validation in chronic lymphocytic leukemia. *PLoS ONE*, 9(3).
- Tahiliani, M. et al., 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5929), pp.930–935.
- Tamura, K. et al., 2001. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is rare, but the proportion of T-CLL is high in Japan. *European journal of haematology*, 67(3), pp.152–157.
- Taniguchi, H. et al., 2012. Targeting the Glyoxalase Pathway Enhances TRAIL Efficacy in Cancer Cells by Downregulating the Expression of Antiapoptotic Molecules. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(10), pp.2294–2300.
- Teng, G. et al., 2008. MicroRNA-155 Is a Negative Regulator of Activation-Induced Cytidine Deaminase. *Immunity*, 28(5), pp.621–629.
- Thornalley, P.J. & Rabbani, N., 2011. Glyoxalase in tumorigenesis and multidrug resistance. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22(3), pp.318–325.
- Tong, W.-G. et al., 2010. Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact. *Epigenetics*, 5(6), pp.499–508. Available at: <http://www.landesbioscience.com/journals/epigenetics/article/12179/> [Accessed February 23, 2012].
- De Toter, D. et al., 2006. Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, 107(9), pp.3708–3715.
- Tran, T.H. et al., 2010. B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress Aicda by overcoming the effects of silencers. *Nature immunology*, 11(2), pp.148–154.
- Uht, R.M. et al., 2007. The protein kinase C- η isoform induces proliferation in glioblastoma cell lines through an ERK/Elk-1 pathway. *Oncogene*, 26(20), pp.2885–2893.
- Van't Veer, M.B. et al., 2006. The predictive value of lipoprotein lipase for survival in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 91(1), pp.56–63.
- Voss, T. et al., 2001. Correlation of clinical data with proteomics profiles in 24 patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 91(2), pp.180–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11146442>.
- Vrhovac, B.R. et al., 1998. Prognostic Significance of the Cell Cycle Inhibitor p27. , pp.4694–4700.

- Wahlfors, J. et al., 1992. Genomic hypomethylation in human chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 80(8), pp.2074–2080.
- Walshe, C. a. et al., 2008. Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B cell antigen receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 283(25), pp.16971–16984.
- Wang, L. et al., 2011. SF3B1 and Other Novel Cancer Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 365, pp.2497–2506.
- Wang, Y.-H. et al., 2013. Expression levels of Lyn, Syk, PLC γ 2 and ERK in patients with chronic lymphocytic leukemia, and higher levels of Lyn are associated with a shorter treatment-free survival. *Leukemia & Lymphoma*, pp.1–6.
- Weiss, N., 1979. Geographical variation in the incidence of the leukemias and lymphomas. *Natl Cancer Inst Monogr*, 53, pp.139–142.
- Wu, S.C. & Zhang, Y., 2010. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(9), pp.607–620.
- Xu, W. et al., 2009. Expression level of lipoprotein lipase in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia and its correlation with other prognostic factors. *International journal of laboratory hematology*, 31(5), pp.552–559.
- Yamane, A. et al., 2011. Deep-sequencing identification of the genomic targets of the cytidine deaminase AID and its cofactor RPA in B lymphocytes. *Nature immunology*, 12(1), pp.62–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3005028&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 8, 2011].
- Yang, Y.H., with contributions from Agnes Paquet and Sandrine Dudoit. (2009). marray: Exploratory analysis for two-color spotted microarray data. R package version 1.44.0. <http://www.maths.usyd.edu.au/u/jeany/>.
- Yano, K. et al., 2014. Gimap3 and Gimap5 cooperate to maintain T-cell numbers in the mouse. *European Journal of Immunology*, 44(2), pp.561–572.
- De Yébenes, V.G. et al., 2008. miR-181b negatively regulates activation-induced cytidine deaminase in B cells. *The Journal of experimental medicine*, 205(10), pp.2199–2206.
- De Yébenes, V.G. & Ramiro, A.R., 2006. Activation-induced deaminase: light and dark sides. *Trends in Molecular Medicine*, 12(9), pp.432–439.
- Yoshikawa, K. et al., 2002. AID enzyme-induced hypermutation in an actively transcribed gene in fibroblasts. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5575), pp.2033–2036.
- Yu, L. et al., 2005. Global assessment of promoter methylation in a mouse model of cancer identifies ID4 as a putative tumor-suppressor gene in human leukemia. *Nature genetics*, 37(3), pp.265–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15723065>.
- Yuille, M.R. et al., 2001. TCL1 is activated by chromosomal rearrangement or by hypomethylation. *Genes Chromosomes and Cancer*, 30(4), pp.336–341.

- Zaid, H. et al., 2005. The voltage-dependent anion channel-1 modulates apoptotic cell death. *Cell death and differentiation*, 12(7), pp.751–760.
- Zan, H. & Casali, P., 2013. Regulation of Aicda expression and AID activity. *Autoimmunity*, 46(2), pp.83–101. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3762583&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Zenz, T. et al., 2009. miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 113(16), pp.3801–3808. Available at:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18941118.
- Zucchetto, A. et al., 2009. CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and cd49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Research*, 69(9), pp.4001–4009.
- Zucchetto, A. et al., 2006. CD49d in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlated expression with CD38 and prognostic relevance. *Leukemia*, 20(3), pp.523–523.
- Zucchetto, A. et al., 2013. CD49d is overexpressed by trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells: evidence for a methylation-dependent regulation mechanism. *Blood*, 122(19), pp.3317–21. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24068493>.

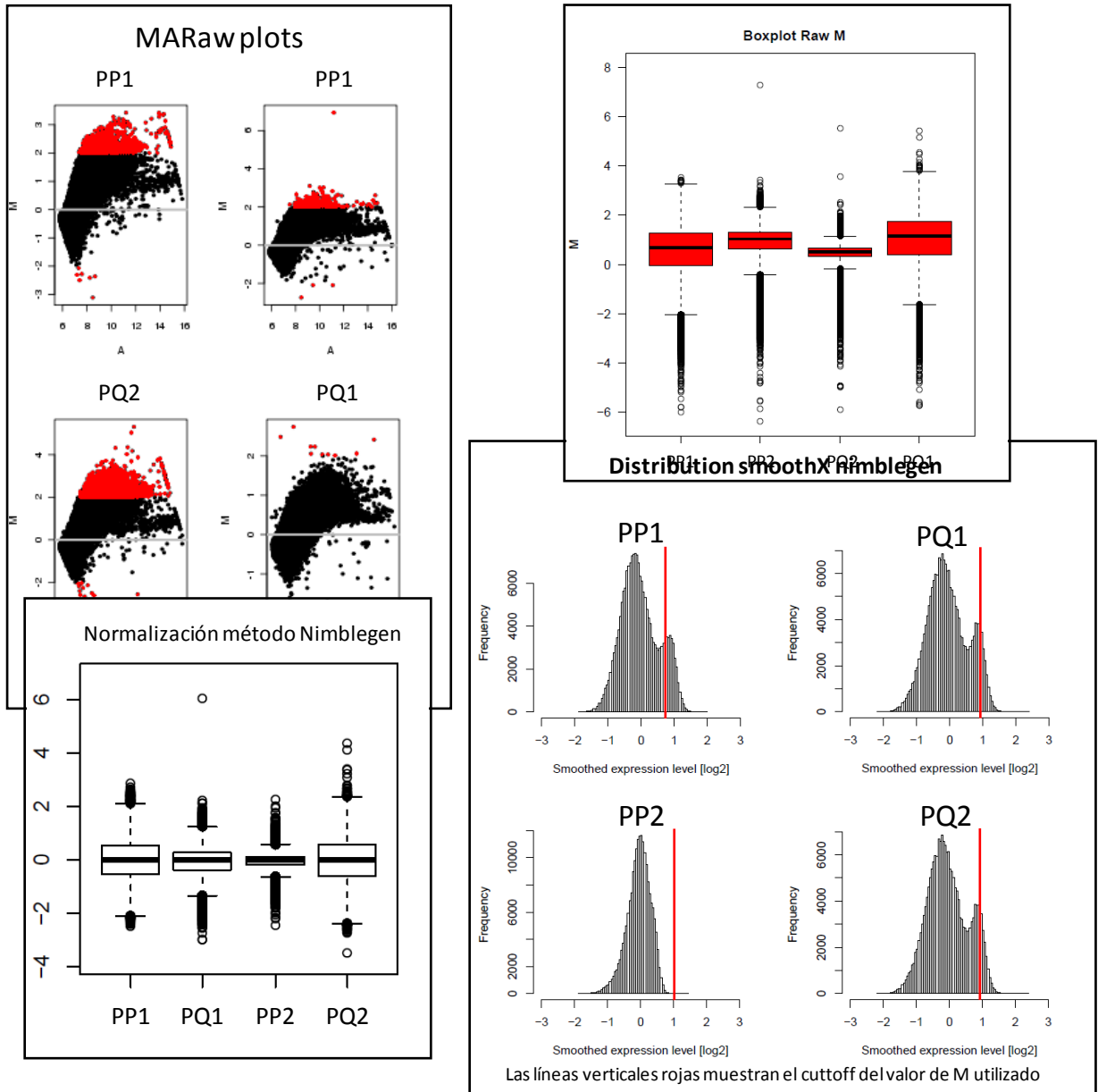
LISTA DE ABREVIATURAS

Ags	antígenos
AKT	serin-treonin quinasa AKT
ATM	ataxia telangiectasia
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BCR	receptor de célula B
BIRC3	baculovirus IAP conteniendo el repetido3
Btk	Bruton tirosin-quinasa
CD19	Cluster of Differentiation 19
CD20	Cluster of Differentiation 20
CD22	Cluster of Differentiation 22
CD23	Cluster of Differentiation 23
CD5	Cluster of Differentiation 5
CGs	centros germinales
CLL	Chronic Lymphocytic Leukaemia
CUL5	cullina 5
FOXO1	Forkhead box protein O1
Hb	Hemoglobina
IAP	inhibitor of apoptosis
Igs	Inmunoglobulinas
IL2	interleuquina 2
IL4	interleuquina 4
INFγ	interferon γ
KLH6	Kelch-like 6
LDH	lactato deshidrogenasa
LLC	Leucemias Linfocíticas Crónicas
MeDIP	Methylated DNA Immunoprecipitation
miRNAs	microRNAs
MYD88	diferenciación mielóide gen 88 de respuesta primaria,
NFκB	factor nuclear kappa B
NLC	nurse like cells
NPAT	proteína nuclear ataxia telangiectasia
p27	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B p27, Kip1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinases
PIP₂	fosfatidil-inositol (4, 5) bifosfato
PIP₃	fosfatidil-inositol (3, 4, 5) trifosfato
PLEKHG5	pleckstrin homology domain containing, family G
PPP2R1B	fosfatasa 2, subunidad reguladora A beta,
PTEN	fosfatasa y tensin homóloga deletado en el cromosoma 10
SF3B1	factor 3 de splicing, unidad B1, SF3B1
SP	sangre periférica
Survivina	baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5
TGM	transglutaminasa7
TLRs	Toll like receptors
TRAF2	TNF asociado al factor 2
TRAF3	TNF asociado al factor 3

ANEXO I

Análisis bioinformático del microarreglo de islas CpG.

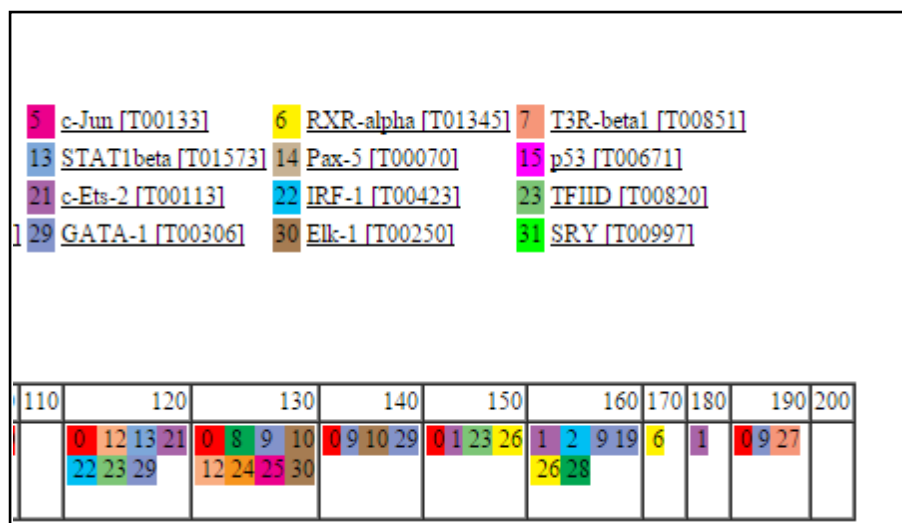
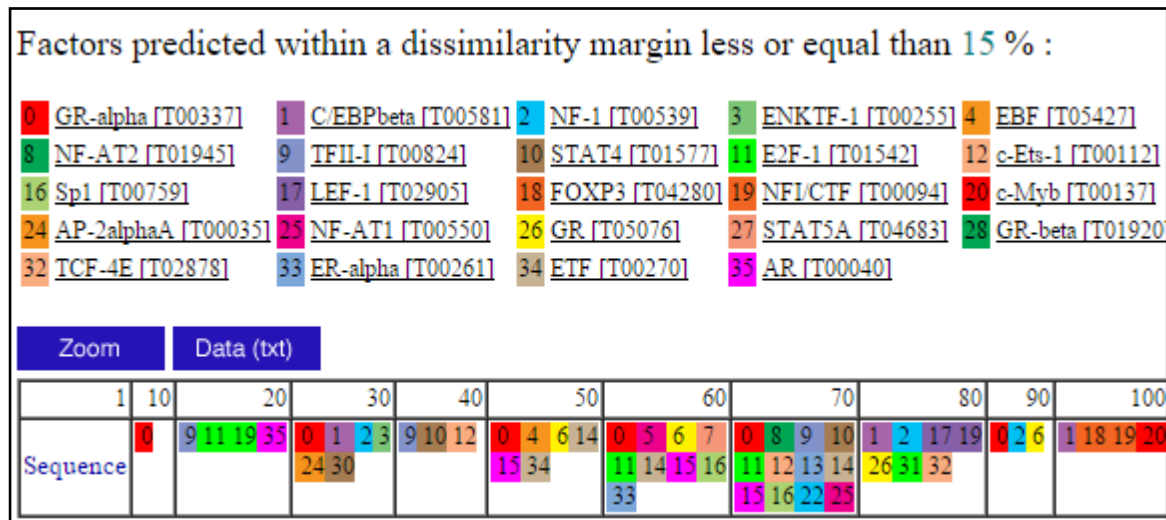
Imágenes correspondientes a algunos de los controles de calidad y evaluación de la distribución de las señales obtenidas. PP: población proliferante, PQ: población quiescente



ANEXO II

Posibles sitios de unión de factores de transcripción a región de 3 de isla CpG de gen *PRKCH*

Análisis de secuencias de los primeros 200pb de la región 3 de la isla CpG del gen *PRKCH* en busca de posibles sitios de unión de factores de transcripción Programa PROMO (http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3)



ANEXO III

Artículos científicos publicados en el período en que se desarrolló la tesis de Doctorado

1- HIGH EXPRESSION OF AID AND ACTIVE CLASS SWITCH RECOMBINATION MIGHT ACCOUNTS FOR A MORE AGGRESSIVE DISEASE IN UNMUTATED CLL PATIENTS: LINK WITH AN ACTIVATED MICROENVIRONMENT IN CLL DISEASE (2010)

Florencia Palacios^{1*}, Pilar Moreno^{1*}, Pablo Morande², Cecilia Abreu¹, Agustín Correa¹, Valentina Porro³, Ana Inés Landoni⁴, Raúl Gabus⁴, Mirta Giordano², Guillermo Dighiero⁵, Otto Pritsch⁶ and Pablo Oppezzo¹

¹Unit of Recombinant Protein, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay. ² Department of Immunology, Institute for Hematologic Research, National Academy of Medicine, Buenos Aires, Argentina. ³ Unit of Cellular Biology, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay. ⁴ Service of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Hospital Maciel, Montevideo, Uruguay. ⁵ Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay. ⁶ Unit of Protein Biophysics, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.

2- MICROENVIRONMENT INTERACTIONS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA: A DELICATE EQUILIBRIUM LINKING THE QUIESCENT AND THE PROLIFERATIVE POOL (2011)

Florencia Palacios¹, Cecilia Abreu¹, Pilar Moreno¹, Mirta Giordano², Romina Gamberale² and Pablo Oppezzo^{1,3}

¹Recombinant Protein Unit, Institut Pasteur de Montevideo, ²Department of Immunology, Institute for Hematologic Research, National Academy of Medicine, Buenos Aires, ³Department of Immunobiology, Faculty of Medicine, University of the Republic, Montevideo, Uruguay

3- ACTIVATION OF THE PI3K/AKT PATHWAY BY MICRORNA-22 RESULTS IN B-CLL CELL PROLIFERATION (2014)

Florencia Palacios¹⁻⁶; Cecilia Abreu¹; Daniel Prieto¹, Santiago Ruiz²; Pablo Morande¹, Tamara Fernández-Calero³; Hugo Naya³; Gabriela Libisch⁴; Carlos Robello⁴; Ana Inés Landoni⁵; Raúl Gabus⁵; Guillermo Dighiero⁵ and Pablo Oppezzo¹⁻⁶

¹Recombinant Protein Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay; ² Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable Uruguay; ³Bioinformatics Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay; ⁴Biology Molecular Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay; ⁵Service of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Hospital Maciel, Montevideo, Uruguay; ⁶Immunobiology Department, School of Medicine, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

4- HSP90 INHIBITORS DECREASE AID LEVELS AND ACTIVITY IN MICE AND IN HUMAN CELLS (2015)

Damien Montamat-Sicotte¹, Ludivine C Litzler^{1,2}, Cecilia Abreu³, Shiva Safavi^{1,4}, Astrid Zahn¹, Alexandre Orthwein¹, Markus Muschen⁵, Pablo Oppezzo³, Denise P Muñoz⁶ and Javier M Di Noia^{1,2,4,7}

¹Institut de Recherches Cliniques de Montreal, Montreal, Canada, ²Department of Biochemistry, Université de Montreal, Montreal, QC, Canada, ³Research Laboratory on Chronic Lymphocytic Leukemia, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, ⁴Department of Medicine, McGill University, Montreal, QC, Canada, ⁵UCSF Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center, San Francisco, USA ⁶UCSF Benioff Children's Hospital and Research Institute at Oakland, Oakland, USA ⁷Department of Medicine and Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

blood

2010 115: 4488-4496
Prepublished online March 16, 2010;
doi:10.1182/blood-2009-12-257758

High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease

Florencia Palacios, Pilar Moreno, Pablo Morande, Cecilia Abreu, Agustín Correa, Valentina Porro, Ana Ines Landoni, Raul Gabus, Mirta Giordano, Guillermo Dighiero, Otto Pritsch and Pablo Opezzo

Updated information and services can be found at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/115/22/4488.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections
[Immunobiology](#) (4796 articles)
[Lymphoid Neoplasia](#) (1130 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>



High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease

*Florencia Palacios,¹ *Pilar Moreno,¹ Pablo Morande,² Cecilia Abreu,¹ Agustín Correa,¹ Valentina Porro,³ Ana Ines Landoni,⁴ Raul Gabus,⁴ Mirta Giordano,² Guillermo Dighiero,⁵ Otto Pritsch,⁶ and Pablo Oppezio¹

¹Unit of Recombinant Protein, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; ²Department of Immunology, Institute for Hematologic Research, National Academy of Medicine, Buenos Aires, Argentina; ³Unit of Cellular Biology, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; ⁴Service of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Hospital Maciel, Montevideo, Uruguay; ⁵Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; and ⁶Unit of Protein Biophysics, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

Interaction of chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells with tissue microenvironment has been suggested to favor disease progression by promoting malignant B-cell growth. Previous work has shown expression in peripheral blood (PB) of CLL B cells of activation-induced cytidine deaminase (AID) among CLL patients with an unmutated (UM) profile of immunoglobulin genes and with ongoing class switch recombination (CSR) process. Because AID expression results from interaction with activated tissue mi-

croenvironment, we speculated whether the small subset with ongoing CSR is responsible for high levels of AID expression and could be derived from this particular microenvironment. In this work, we quantified AID expression and ongoing CSR in PB of 50 CLL patients and characterized the expression of different molecules related to microenvironment interaction. Our results show that among UM patients (1) high AID expression is restricted to the subpopulation of tumoral cells ongoing CSR; (2) this small subset

expresses high levels of proliferation, antiapoptotic and progression markers (Ki-67, *c-myc*, Bcl-2, CD49d, and CCL3/4 chemokines). Overall, this work outlines the importance of a cellular subset in PB of UM CLL patients with a poor clinical outcome, high AID levels, and ongoing CSR, whose presence might be a hallmark of a recent contact with the microenvironment. (*Blood*. 2010;115(22): 4488-4496)

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a heterogeneous disease following a variable course with survival ranging from months to decades. One-third of patients never require treatment and have a long survival; in another third, an initial indolent phase is followed by disease progression and treatment requirement; the remaining third exhibits an aggressive disease at the onset and needs immediate treatment.¹ The Rai² and Binet³ staging systems provided a foundation for the prognosis and design of therapeutic strategies. An unmutated (UM) profile of immunoglobulin (Ig) VH genes,^{4,5} as well as the presence of genetic lesions at chromosome 17p13, or at 11q23,⁶ constitute, to date, the poor prognosis indicators.⁷ In addition, in the last years, CD38 and ζ -associated protein 70 (ZAP-70) expressions have shown important prognostic information.⁸ However, neither Rai/Binet staging systems nor the molecular markers described to date are able to completely predict the progression of disease and/or explain the heterogeneous progression profile in the clinical course of CLL. One of the long-term goals of the hematologic community is to provide a molecular explanation for this marked clinical heterogeneity of CLL highlighted by the differential mutational profile.⁹

The traditional view has been that CLL is a disease deriving from an inherent defect in apoptosis, or programmed cell death in which, slowly proliferating B lymphocytes accumulate because of this diminished cell death. Increased expression of antiapoptotic Bcl-2 protein and blockade of tumoral CLL B cells in a G₀-G₁

phase support this observation. However, recent studies showed that CLL is a dynamic process which results from cells that proliferate and die, often at appreciable levels.¹⁰ These observations have turned the attention toward the occurrence of different subpopulations inside the tumoral clone in which a homeostatic balance exists in patients with stable lymphocyte counts and good clinical course or an imbalance in patients with rising lymphocyte counts and poor outcome. It is clear that most, if not all, proliferative events occur in the tissues where leukemic cells are able to exploit microenvironment interactions to avoid apoptosis and to acquire tumoral growing conditions.¹⁰

Activation-induced cytidine deaminase (AID), a B cell-restricted enzyme, is principally induced through the contact of T and B cells via CD40-CD40 ligand (CD40L) interactions and is required for somatic hypermutation (HMS) and class switch recombination (CSR) process.¹¹ The mutational activity of AID identifies this enzyme as the first genome mutator in humans with oncogenic potential.¹² Supporting this view, different works report that constitutive AID expression is associated with a loss in the target specificity and with lymphoproliferative disorders.^{12,13} Interestingly, in CLL disease we have described that AID is expressed in a percentage of patients with CLL with UM VH genes and with active CSR.¹⁴ Despite expression of a functional AID as assessed by an active CSR and mutations induced in the pre-switch μ region, CLL B cells in these patients did not succeed to achieve the process

Submitted December 4, 2009; accepted February 27, 2010. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, March 16, 2010; DOI 10.1182/blood-2009-12-257758.

*F.P. and P. Moreno contributed equally to this study.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2010 by The American Society of Hematology

of somatic hypermutation.¹⁴ Although clonal CSR has been described in CLL B cells long ago^{15,16} and different works have shown that this process occurs principally in patients with UM disease,^{14,17} the origin and the biologic implications of this subpopulation in the physiopathology of CLL remains elusive.

Inhibition of apoptosis may occur in vivo in pseudofollicles observed in the lymph nodes, and in the cell clusters described in the bone marrow. These pseudofollicles include in close contact with proliferating B cells increased numbers of CD4 T cells expressing CD40L, which is necessary for AID expression. These activated CD4 T cells could be recruited by tumor B cells through the expression of T cell-attracting chemokines such as CCL17 and CCL22¹⁸ and/or CCL3 and CCL4.¹⁹ Besides this, the CD38 and CD49d proteins appear to be important additional players interacting with nurse-like, stromal, and endothelial cells to complete the activation pathway within the proliferative centers.²⁰ Overall, these observations favor the view that certain cellular subsets in CLL could receive survival signals in the specific microenvironments, increasing their proliferative potential and consequently associated with a more aggressive disease.

Because AID expression in CLL is associated with ongoing CSR in patients with UM disease, we investigated the relation of AID expression, CSR process, and microenvironment activation in peripheral blood (PB) of patients with CLL with different clinical profiles. In this work we examined whether the small subset of tumoral cells with ongoing CSR is responsible for AID expression and whether this subpopulation could have an increased activated and proliferative potential related to the progression of the disease. Our results show that high expression of AID is almost exclusively restricted to the subpopulation of tumoral B cells having an active CSR process. This subset expresses higher levels of proliferation and antiapoptotic molecules such as Ki-67, *c-myc*, and Bcl-2. In addition, present are high levels of CD49d and CCL3/CCL4 chemokines, as well as a decreased expression of cell cycle inhibitor p27^{-kip1} compared with their quiescent counterpart IgM B cells. Finally, the presence of this subpopulation in patients with UM CLL is closely related to an aggressive course of the disease.

Methods

Patient samples

PB was obtained from 50 patients with a typical diagnosis of B-cell CLL (B-CLL), displaying, respectively an UM profile in 25 and a mutated (MUT) profile in 25 (Table 1). Among the patients with MUT disease with a median follow-up of 36 months (range, 6-240 months), 21 corresponded to stage A and 3 to stage C; 3 required treatment, and 2 among them died. With a median follow-up of 48 months (range, 3-108 months) there were 13 patients in stage A, 8 in stage B, and 4 in stage C in the UM group; 16 required treatment and 5 died. All patients were followed at the Hospital Maciel from Montevideo and provided an informed consent in accordance with the ethical regulations from Uruguay and the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Institutional Review Board of Institut Pasteur Montevideo. The diagnosis of B-CLL relied on cytologic features of mature lymphocytes and a characteristic phenotype (CD5⁺, CD23⁺, low expression of CD79b, and of surface immunoglobulin).

Phenotypic and functional studies of B cells

Blood collection was carried out in a period close to the diagnostic time for each patient as indicated in Table 1. The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by centrifugation on Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals) and immediately cryopreserved in liquid nitrogen. Phenotypic analysis of leukemic cells was performed with anti-CD19 phyco-

erythrin (PE), anti-CD5 fluorescein-isothiocyanate (FITC), anti-human μ chains F(ab')₂ conjugated with PE, and anti-human γ chains F(ab')₂ conjugated with FITC. Negative controls were performed by incubating the cells with irrelevant F(ab')₂ antibodies conjugated to PE or FITC. Forward and side scatters were used to gate out contaminating debris and the cells killed during the staining procedure. All antibodies were from Dako SA. Data were acquired, and analysis was performed with the use of a CyAn Flow Cytometer (Beckman Coulter).

Analysis of progression and proliferation markers by flow cytometry

PBMCs (1×10^6) obtained from patients with CLL were incubated for 30 minutes at 4°C with the antibody in phosphate-buffered saline buffer supplemented with 0.5% bovine serum albumin, washed twice, and analyzed by flow cytometry. Anti-CD49d conjugated with allophycocyanin antibody was obtained from BioLegend, and anti-CD38 conjugated with PE-Texas Red was obtained from Invitrogen. For intracellular detection of Bcl-2 and Ki-67 proteins, 1×10^6 PBMCs were fixed in phosphate-buffered saline 4% paraformaldehyde and permeabilized in the same buffer containing 0.5% saponin and 5% fetal bovine serum before the addition of the specific antibody (10 μ g/mL). After 45 minutes of incubation at 4°C, with anti-human Ki-67 Alexa Fluor 647 or anti-human Bcl-2 Alexa Fluor 647 the cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Negative isotype controls were performed by incubating the cells with irrelevant antibody in the same experimental conditions. Anti-Ki-67, anti-Bcl-2, and negative isotype control conjugated to Alexa Fluor 647 were obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. In all cases, expression of these CLL progression markers (CD49d and CD38) as well the proliferation and antiapoptotic markers (Ki-67 and Bcl-2) were analyzed in the different CLL B subsets (IgM⁺, IgG⁺, and IgM⁺/IgG⁺) with the use of Summit v4.3 from Dako.

Cell-sorting studies

Sorting experiments of B-CLL cells were performed with the use of the MoFlo cell sorter (Beckman Coulter) with the same antibodies described earlier to isolate the following 3 different populations of CLL B cells: (1) IgM⁺ subset expressing CD19⁺, CD5⁺, and IgM surface markers; (2) IgG⁺ subset expressing CD19⁺, CD5⁺, and IgG membrane proteins; and (3) IgM⁺/IgG⁺ subset corresponding to cells CD19⁺, CD5⁺ markers and expressing simultaneously IgM and IgG. In all cases, purity of isolated subpopulations was shown to be greater than 98% before flow cytometric evaluation.

Extraction and analysis of RNA transcripts by reverse transcription-PCR

RNA from total CLL B cells was isolated from 1 to 5×10^6 cells, and cDNA synthesis was performed as described.²¹ When RNA extraction was performed from isolated IgM⁺, IgG⁺, and IgM⁺/IgG⁺ subpopulations before cell sorter assays, the mirVana isolation kit (Applied Biosystems), rRNasin, RNase inhibitor (Promega), and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) were used to achieve a maximal performance in the mRNA extraction. Despite this care, the mRNA from the IgM⁺/IgG⁺ subset was only successfully performed in CLL 01, whereas this could not be successfully achieved in the other CLL cases, given the low amounts of cells showing the double marking. Amplifications of circular transcripts (CTs), AID, *c-myc*, p27^{-kip1}, and CCL3 and CCL4 chemokines were performed with an initial denaturation step at 95°C for 4 minutes, followed by 30 cycles of 1 minute at 95°C, 1 minute at 62°C, and 1 minute at 72°C and final elongation step at 72°C for 5 minutes. For gene expression analyses the used primers were as follows: for CTs (forward, 5'-GGC CCT TCC AGA TCT TTG AG-3', and reverse, 5'-CTC TCA GGA CTG ATG GGA AGC CCC G-3'), for AID (forward, 5'-GAG GCA AGA AGA CAC TCT GG-3', and reverse, 5'-CTA CTT CTG TGA GGA CCG C-3'), for *c-myc* (forward, 5'-CTT TGT GTG CCC CGC TCC AG-3', and reverse, 5'-GCG CTC AGA TCC TGC AGG TA-3'), for p27^{-kip1} (forward, 5'-AGG TGC GAG TGT CTA ACG GG-3', and reverse, 5'-GCG CAT TGC TCC GCT AAC CC-3'), for CCL3 (forward, 5'-GAC ACT GCA GCC CAC ATT CCG-3', and reverse, 5'-CCCCTCAGGCACTCAGCTCC-3'), and for

CCL4 (forward, 5'-CCA CCA ATA CCA TGA AGC TCT G-3', and reverse, 5'-CCT AAT ACA ATA ACA CGG CAC ATA A-3'). In the case of CTs the fragments obtained in polymerase chain reaction (PCR) amplification were transferred and hybridized with specific probes labeled for C μ and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) α -[32P] deoxycytidine-5'-triphosphate to increase the signal response.

Quantitative real-time PCR

For gene expression analyses of AID, we used Corbette Rotor Gene 6000 Real-Time PCR and the SYBR Green I dye. Primers used in this study were the same that for the reverse transcription (RT)-PCR analysis. Total RNA (1 μ g) was isolated from 5 \times 10⁶ B cells and retro-transcribed as described.²¹ One microliter from a 20- μ L cDNA reaction was used for AID and GAPDH amplification in a PCR reaction including 40 cycles of amplification (95°C for 20 seconds, 60°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds). Positive calibrator values were obtained from tonsil samples and from CD40L and interleukin-4 (IL-4)-activated CLL B cells. For this, kinetic studies of AID expression were made to evaluate the higher expression of mRNA before activation. Stimulation of CLL B cells was carried out in vitro by monolayer culturing of 1 \times 10⁶/mL fibroblast expressing recombinant soluble CD40L and IL-4 (1000 U/mL; PharMingen).

Statistical analyses

Expression of AID mRNA and Ki-67, Bcl-2, and CD49d proteins were compared between IgM⁺, IgM⁺/IgG⁺, and IgG⁺ subsets with the Mann-Whitney test. On finding significant differences across groups, a Bonferroni-like adjusted pairwise comparison was made to determine which groups differed from each another. The Spearman rank correlation coefficient was calculated to determine the strength of association between AID expression, percentage of clonal-related CSR, and progression-free survival (PFS). Variables with *P* values less than .05 were considered to be significant. Overall survival (OS) and PFS were calculated from Table 1 and used to perform the Kaplan-Meier method. All analyses were done with GraphPad Prism, Version 4.0 (GraphPad Software Inc).

Results

Analysis of AID expression in CLL B cells

To obtain a positive calibrator for the quantitative PCR we compared levels of AID expression between tonsil samples, Daudi cell line, and

B-CLL stimulated through CD40L and IL-4. Taking into account results from Guikema et al²² and our observations, we assumed that mRNA AID expression levels after CD40L/IL-4 activation are comparable to those of B cells in an activated microenvironment. In addition, values from PBMCs from 8 healthy donors were used as negative controls. In this context, we considered as having high AID expression (AID^{+/+}) those patients with CLL whose levels ranged between 80% and 100% of relative units of AID/GAPDH mRNA transcripts (Figure 1). Patients with an AID expression ranging between 40% and 80% and less than 40% of the positive control were considered as having low AID expression (AID⁺) or negative (AID^{neg}), respectively (Figure 1). According to these criteria, we analyzed the mRNA AID expression in 50 patients with CLL (UM = 25; MUT = 25). Results show that 6 of the 25 patients with UM CLL corresponded to group AID^{+/+}, 14 to AID⁺, and 5 to AID^{neg}. Interestingly, no AID^{+/+} expression could be detected among patients with a MUT profile, 7 patients displayed lower expression of AID (AID⁺), whereas no AID transcripts were found in the remaining 18 MUT CLLs. In summary, in our series, 80% of patients with UM disease express AID transcripts, whereas in MUT CLLs this only occurs in 28%. These results are close to those previously reported by Heintel et al.²³

Analysis of CSR fraction cells in CLL

The in vivo plasticity of CLL is further underscored by reports showing that IgM⁺ leukemic cells can give rise to clonally related IgG⁺ or IgA⁺ elements, possibly by ongoing in vivo CSR process in the proliferating centers.^{21,24} However, the implication of this activation and of this tumoral subpopulation in the physiopathology of CLL remains elusive as yet.

To better characterize the tumoral subset with ongoing CSR we studied CLL B cells with specific human antibodies (anti- μ , anti- γ , anti-CD5, and anti-CD19) from 50 patients and analyzed the clonal identity for cells with ongoing CSR. Results show the presence of IgG⁺ and IgG⁺/IgM⁺ subpopulations ranged from 0.5% to 8% in 44 of the 50 patients with CLL by cytometric assays (Table 1). In addition, we performed RT-PCR assays with

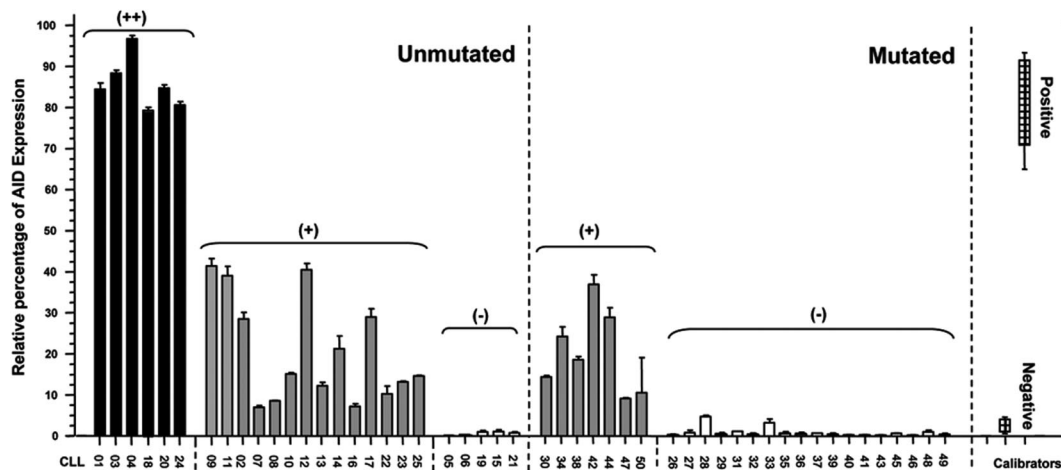


Figure 1. AID mRNA expression levels in patients with mutated and unmutated CLL. Quantitative PCR for AID and GAPDH as the endogenous control was performed on PBMCs from patients with MUT and UM CLL. CLL B cells stimulated with CD40L/IL-4, tonsil samples, and PBMCs from 8 healthy donors were used as positive and negative calibrators, respectively. By subtraction of the mean threshold cycle (Ct) triplicate AID measurements with the mean Ct from triplicate GAPDH measurements, the mean Δ Ct was calculated. The $\Delta\Delta$ Ct values were calculated with the mean Δ Ct of the 8 healthy donors and the 3 independently experiments of CLL B cells activated with CD40L/IL-4 as calibrators. AID negativity was defined by the absence of AID expression in duplicate analysis. The expression factor difference and range were calculated by the following formulas: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (mean factor difference); $2^{-(\Delta\Delta Ct - \Delta Ct SD)}$ and $2^{-(\Delta\Delta Ct + \Delta Ct SD)}$ (error bars indicate range factor difference). The factor difference conversion of the $\Delta\Delta$ Ct is depicted in the graph in relative percentages of AID expression.

Table 1. Clinical and molecular characterization of patients with CLL

CLL no.	Progression status	Binet stage	Lymphocyte count, $\times 10^3/\mu\text{L}$	CD38*	LPL	Diagnostic and blood collection	TFT, mo	A/D†	AID (Q-PCR)	Percentage of CSR‡	VDJ clonal identity	Mutational status§
1¶	Progressor	C	128.0	+	+	2000	9	D	+/+	8.2	Yes	UM
2	Progressor	B	80.0	+	+	1999	18	D	+	4.1	Yes	UM
3¶	Progressor	C	31.00	+	+	1998	6	D	+/+	5.4	Yes	UM
4¶	Progressor	B	105.00	+	+	2000	8	D	+/+	6.4	Yes	UM
5**	Indolent	A	20.00	+	+	1999	N/T	A	–	1.3	N/A	UM
6**	Progressor	B	32.50	–	+	2001	N/T	A	–	0.3	N/A	UM
7	Indolent	B	17.00	+	–	2000	N/T	A	+	2.7	Yes	UM
8	Progressor	A	70.00	–	–	2002	42	A	+	1.6	N/A	UM
9	Progressor	B	60.00	+	+	2005	12	A	+	4	Yes	UM
10	Indolent	A	10.00	+	+	1999	N/T	A	+	0.7	N/A	UM
11	Progressor	C	88.00	+	+	2001	15	A	+	3.8	Yes	UM
12	Progressor	B	54.00	+	+	2001	6	A	+	4.5	Yes	UM
13	Indolent	A	20.00	–	+	2005	54	A	+	1.3	No	UM
14	Indolent	A	7.00	+	+	2006	36	A	+	3.3	Yes	UM
15**	Indolent	A	20.40	+	+	2004	N/T	A	–	0.3	No	UM
16	Progressor	B	148.00	+	+	2005	3	A	+	1.4	No	UM
17	Progressor	A	54.50	–	+	2007	17	A	+	2.5	No	UM
18††	Indolent	A	15.00	+	+	2006	12	A	+/+	5.9	Yes	UM
19**	Indolent	A	11.00	+	+	2005	N/T	A	–	0.6	No	UM
20††	Progressor	C	220.00	+	+	2007	3	D	+/+	7.4	Yes	UM
21**	Indolent	A	8.90	+	–	2008	N/T	A	–	1.1	No	UM
22	Progressor	B	17.80	+	+	2008	11	A	+	3.5	Yes	UM
23	Indolent	A	28.00	–	+	2008	N/T	A	+	4.1	No	UM
24††	Progressor	A	80.00	+	+	2009	10	A	+/+	5.5	Yes	UM
25	Progressor	A	10.50	+	+	2005	N/T	A	+	1	N/A	UM
26**	Progressor	A	17.20	–	–	1999	N/T	A	–	0.9	N/A	Mut
27**	Progressor	A	14.00	–	–	2000	N/T	A	–	0.4	N/A	Mut
28**	Progressor	A	5.00	+	–	1989	N/T	A	–	0.6	No	Mut
29**	Progressor	A	11.60	+	–	2001	N/T	A	–	0.1	N/A	Mut
30	Progressor	A	18.00	–	–	1999	N/T	A	+	1.8	Yes	Mut
31**	Progressor	B	38.00	+	–	2000	N/T	D	–	0.5	N/A	Mut
32**	Indolent	A	47.60	–	–	2002	N/T	A	–	2.5	No	Mut
33**	Indolent	A	15.40	–	–	2006	N/T	A	–	0.8	No	Mut
34	Indolent	A	15.00	–	+	2007	N/T	A	+	0.5	N/A	Mut
35**	Indolent	A	10.20	–	+	2006	25	A	–	1.2	No	Mut
36**	Indolent	A	27.60	–	+	2007	N/T	A	–	0.4	N/A	Mut
37**	Indolent	A	15.00	–	–	2006	N/T	A	–	0.3	No	Mut
38	Indolent	A	12.80	–	+	2004	N/T	A	+	2.1	No	Mut
39**	Indolent	A	15.60	–	+	2006	N/T	A	–	0.5	No	Mut
40**	Indolent	A	12.00	–	+	1997	N/T	A	–	0.1	N/A	Mut
41**	Progressor	C	18.00	–	+	2007	6	D	–	1.0	N/A	Mut
42	Indolent	A	3.40	–	–	2008	N/T	A	+	1.7	Yes	Mut
43**	Indolent	A	28.40	–	+	2007	N/T	A	–	2.0	No	Mut
44	Indolent	A	8.00	–	–	2006	N/T	A	+	2.2	No	Mut
45**	Progressor	B	105.00	–	+	2007	12	A	–	2.0	No	Mut
46**	Indolent	A	2.47	–	–	2008	N/T	A	–	0.1	N/A	Mut
47	Indolent	C	5.00	–	–	2009	N/T	A	+	1.8	No	Mut
48**	Indolent	A	12.60	–	–	2008	N/T	A	–	2.1	No	Mut
49**	Indolent	A	5.80	–	–	2008	N/T	A	–	1.1	N/A	Mut
50	Indolent	A	11.50	–	–	2008	N/T	A	+	2.1	Yes	Mut

LPL indicates lipoprotein lipase; TFT, time from initial diagnosis to first treatment for clinical progression; A/D, alive/dead; CSR, class switch recombination; UM, unmutated; Mut, mutated; N/T, no treatment; and N/A, no amplification.

*Obtained results in cytometric assays, using a CD38 cutoff of 30%.

†Related to decease.

‡Percentage of IgG⁺ and IgM⁺/IgG⁺ CLL B cells by cytometric studies.

§Less than or equal to 2% difference from germline gene defined patients with UM disease, $\geq 2\%$ difference defines patients with MUT.

¶High AID expression and CSR $\geq 5\%$.

||Low AID expression and CSR $\leq 5\%$.

**No AID expression and CSR $\leq 2.5\%$.

specific familial VH genes and C γ primers and sequenced the obtained products to evaluate the correspondence with the tumoral clone. Amplifications were obtained for 36 of the 44 patients with CLL (72% of the 50 patients with CLL). However, an identical tumoral VH gene sequence was found in only 16 of these 36 CLLs, representing 32% of the total population (6 from the UM

AID^{+/+} CLL B cells, 7 from UM AID⁺ CLL B cells, and 3 from MUT AID⁺ CLL B cells; Table 1). Thus, CSR related to the tumoral clone ranged between 2.5% and 8.5% of the tumoral population among patients with UM disease. In contrast, unrelated tumoral CSR never exceeded 2% and is associated with low or no expression of AID mRNA (Table 1).

AID expression is mainly restricted to the subset of tumoral cells displaying an ongoing CSR

As reported by Cerutti et al²⁴ B cells with ongoing CSR are absent in normal PB and segregates within founder germinal center (GC) and GC B cells. By contrast, ongoing CSR has been described in the PB of patients with UM disease expressing AID constitutively.¹⁴ Because AID expression in CLL B cells is confined to a small subset²⁵ and results from signals received through interaction with microenvironment and CD4 T cells, we examined whether its expression is restricted to tumoral cells with ongoing CSR. To substantiate this possibility, we isolated by cell sorting cytometry the subsets expressing the different immunoglobulin isotypes within the tumoral clone in the 3 AID^{+/+} UM CLLs. Tumoral B cells expressing clonal membrane IgG (IgG⁺) or intracellular IgM and IgG (B cells in transition state, IgM⁺/IgG⁺) and the typical surface IgM (IgM⁺) were isolated with a greater than 98% purity as assessed by cytometric assays. A representative patient with CLL is shown in Figure 2A. Afterward, the mRNA was extracted, and RT-PCR was performed to determine CSR transcripts (Figure 2E), CTs, and AID expression in these different subsets. Because CTs are rapidly degraded by nucleases, it constitutes the specific molecular markers of ongoing CSR in B cells. Results from semiquantitative RT-PCR indicate that both subpopulations IgG⁺ and IgG⁺/IgM⁺ express CTs, confirming that ongoing CSR occurs in both subpopulations (Figure 2F). Finally, we found that AID expression is mainly restricted to the subpopulations IgG⁺ and IgG⁺/IgM⁺ (Figure 2G).

The subpopulation with high levels of AID and ongoing CSR displays an increased proliferative potential

Because AID is up-regulated after antigen activation and is the principal enzyme implicated in CSR, which occurs in GCs, we

determined the relationship between AID expression with different proliferation, antiapoptotic, and activation markers such as Ki-67, Bcl-2, and *c-myc*, respectively, in the 3 tumoral subpopulations (IgM⁺, IgG⁺, and IgM⁺/IgG⁺).

The cytometric assays from one representative patient for Ki-67 expression are depicted in Figure 3A. In addition, in the 6 patients studied, results show significantly increased expression of Ki-67 in the IgG⁺ and IgM⁺/IgG⁺ subsets compared with the IgM⁺ subpopulation (comparing IgM⁺ [mean = 92.25] with IgM⁺/IgG⁺ [mean = 150.8]; $P < .01$, Mann-Whitney test, and comparing IgM⁺ [mean = 92.25] with IgG⁺ [mean = 145.25]; $P \leq .01$, Mann-Whitney test; Figure 3A).

Expression of Bcl-2 protein is shown in Figure 3B in the same representative patient among the 6 studied. Significantly higher expressions were found comparing IgM⁺ (mean = 31.3) with IgM⁺/IgG⁺ (mean = 47.62) ($P \leq .01$, Mann-Whitney test). A more significant difference was found in the case of IgM⁺ with IgG⁺ subpopulations (IgM⁺: mean = 31.3; IgG⁺: mean = 49.75; $P < .01$, Mann-Whitney test), suggesting a more increased antiapoptotic profile for both IgG⁺ and IgM⁺/IgG⁺ than in the typically CLL IgM B cell (Figure 3B).

Because *c-myc* protein was observed in the highest amount at the proliferative B-lymphoblast stage and undetectable in plasma cells,²⁶ we evaluated at the RNA level *c-myc* expression in the 3 subpopulations. Results show higher expression of *c-myc* RNA in the IgG⁺ and IgM⁺/IgG⁺ subsets compared with the IgM⁺ tumoral counterpart (Figure 3C).

The cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{-kip1} promotes exit to cell cycle and is overexpressed in CLL B cells.²⁷ Therefore, we examined its expression at the mRNA level in the 3 isolated subpopulations. Semiquantitative RT-PCR results show a high

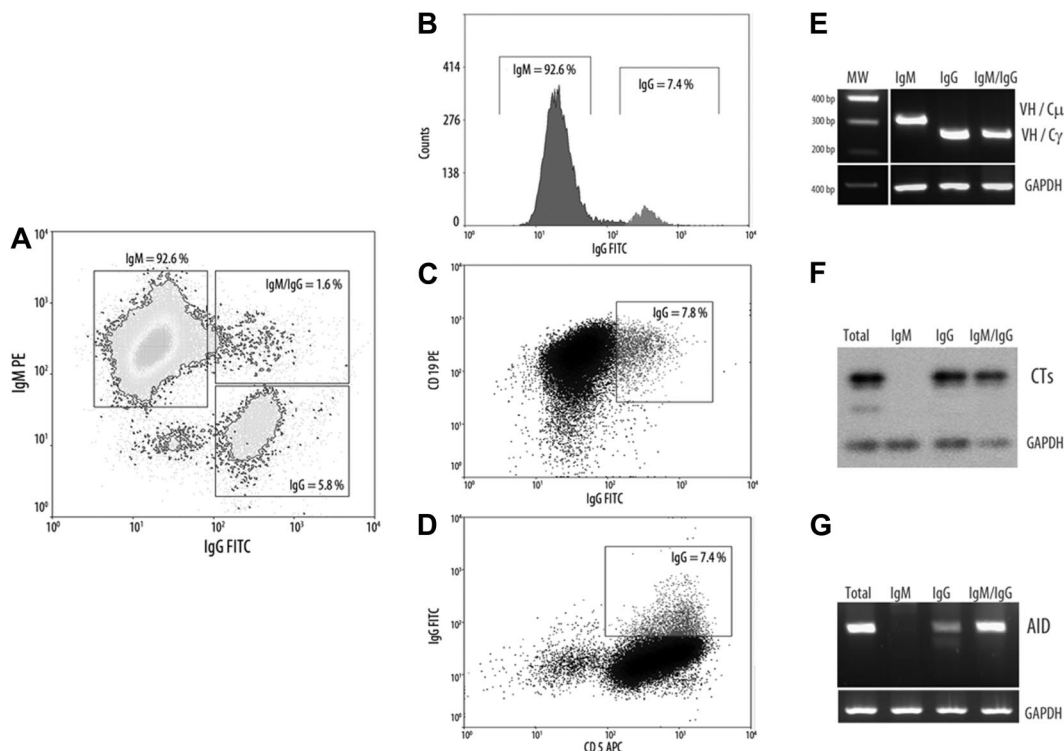


Figure 2. Characterization of CLL B cells with ongoing IgG CSR. (A-D) Representative flow cytometric profile from a patient with UM AID^{+/+} CLL. The 3 CLL B-cell subsets as well as the surface expression of CD5 and CD19 markers are depicted (IgM⁺, IgM⁺/IgG⁺, and IgG⁺). (E-G) Semiquantitative RT-PCR from the 3 cell sorter-isolated subpopulations. (E) Clonal isotype switch transcripts with tumor-related VH and C μ or C γ primers. (F) Amplification of CTs and subsequently hybridization with C μ probe encompassing 1-180 nt of the first C μ exon. (D) AID amplification from isolated CLL subsets. For all PCR analysis putative B-cell contamination between isolated subsets, moreover to cytometric purity analysis, was estimated by amplifying tumor-related VH-C μ inside the IgG⁺ subset and with VH-C γ inside the IgM⁺ subset. GAPDH was amplified in all cases as internal control.

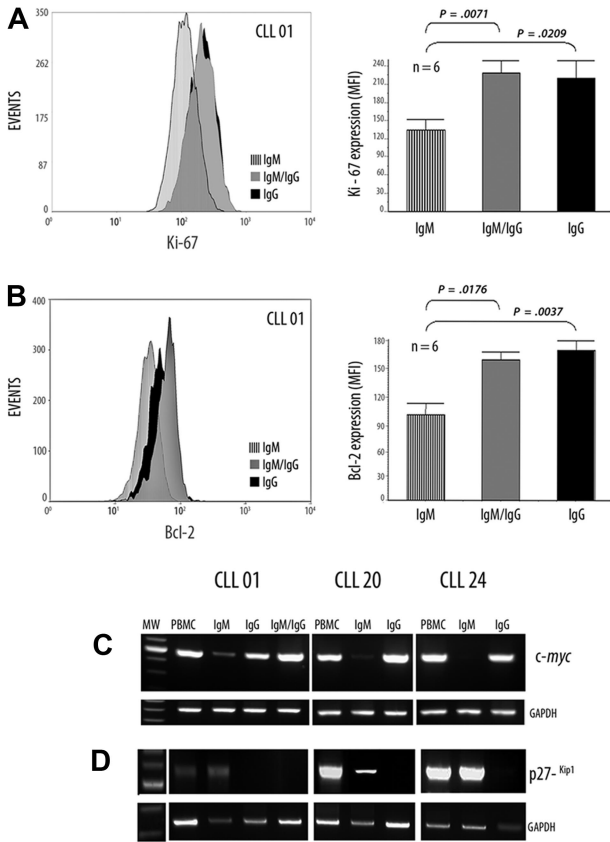


Figure 3. Differential expression of Ki-67, Bcl-2, *c-myc*, and *p27^{-Kip1}* in CLL B cells with ongoing IgG CSR and in their IgM counterpart. (A-B) Flow cytometric analysis, in a representative patient with UM CLL, showing the Ki-67 and Bcl-2 protein expressions, respectively. Values are mean \pm SE of mean fluorescence intensity (MFI) of, respectively, Ki-67 and Bcl-2 expression from 6 patients with UM CLL with high AID expression levels. (C-D) Semiquantitative RT-PCR from the cell sorter-isolated subpopulations with *c-myc*-specific primers (C) and with *p27^{-Kip1}*-specific primers (D) are depicted. GAPDH was amplified in all cases as internal semiquantitative control.

expression of *p27^{-Kip1}* in the IgM⁺ isolated subset; whereas no, or very weak, expression was found in both IgG⁺ and IgM⁺/IgG⁺ isolated subpopulations (Figure 3D). Taken together, these results outline the idea that IgG⁺ and IgM⁺/IgG⁺ subsets exhibit an activated phenotypic profile containing CLL B cells with increased proliferative and antiapoptotic potential.

AID^{+/+} subpopulation with ongoing CSR cells displays expression molecules resulting from proliferation center contact

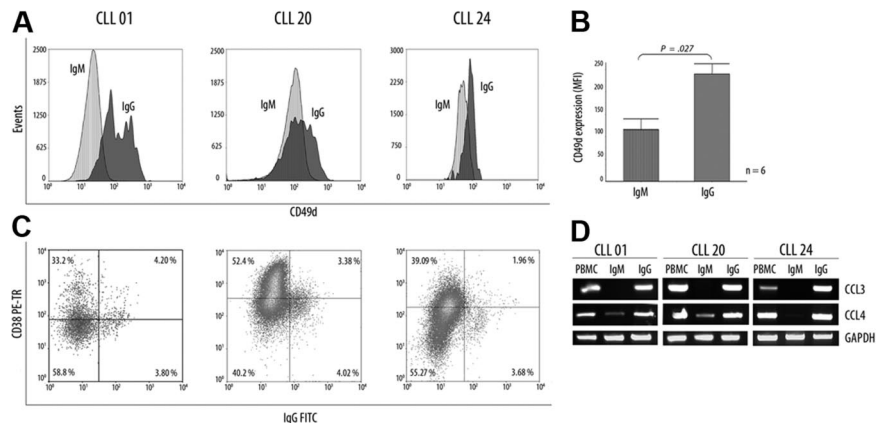
Expression of CD49d/ α 4-integrin has been associated with high levels of CD38 glycoprotein and expression of CCL3/CCL4

chemokines in progressive disease.²⁰ Because all these molecules appear to be important players in the survival of CLL B cells, we compared in the IgM⁺ and the IgG⁺ subpopulations the levels of protein expression for CD49d and CD38 markers. Results show that CLL B-cell IgG⁺ express increased membrane CD49d levels compared with its IgM⁺ counterpart (IgM⁺: mean = 115.8; IgG⁺: mean = 239.2; *P* < .01, Mann-Whitney test; Figure 4A). Interestingly, when the IgG⁺ subset was studied for CD38 expression in the 3 representative patients, only a fraction (< 50%) of this subpopulation was competent to express CD38 (Figure 4C). Finally, we evaluated CCL3 and CCL4 chemokine mRNA expression profiles in both subpopulations in the same 3 patients. Results show that transcripts for CCL3 are exclusively observed within the IgG⁺ subset, whereas higher levels of CCL4 transcripts were observed in this same subpopulation compared with its IgM⁺ counterpart. Overall, these results favor the view that the tumoral subset with ongoing CSR and high AID expression constitutes an activated subset expressing molecules associated with the progressive disease and that may result from a recent contact with proliferative centers.

High expression of AID and high percentage of clonal CSR in PBMCs delineate a subgroup with poor prognosis among patients with UM CLL

Significant differences concerning AID expression in the 3 subgroups (AID^{+/+}: mean = 1.58; AID⁺: mean = 1.40; AID^{neg}: mean = 1.22) were observed in patients with UM CLL after quantitative PCR analysis (*P* < .001, Mann-Whitney test; Figure 5A). As for the clonally related CSR process, the same 3 subgroups were also identified displaying significant differences between high clonally related CSR (mean = 6.36), low clonally related CSR (mean = 3.75), and not clonally related CSR (mean 0.72,) processes (*P* < .001, Mann-Whitney test; Figure 5B). Because our results suggest that CLL B cells with high expression of AID and high percentage of ongoing CSR correspond to an activated and proliferative subpopulation (see Figures 3-4), we speculated whether this subset could be associated with the disease progression. Thus, we segregated patients with UM CLL into 3 subgroups: subgroup I, AID^{+/+} with higher percentage of clonally related CSR (\geq 5%); subgroup II, AID⁺ and lower percentage of clonally related CSR; and subgroup III, AID^{neg} without clonally related CSR. Results show that among the 6 patients from subgroup I, all required treatment at 3, 6, 8, 9, 10, and 12 months. Four of these 6 patients died of causes related to disease at 6, 24, 72, and 84 months after diagnosis. Interestingly, all these patients displayed high values of AID expression and tumoral-related CSR with values higher than 5% (Table 1; Figure 5A-B). Subgroup II

Figure 4. Differential expression of CD49d, CCL3, and CCL4 chemokines in CLL B cells with ongoing IgG CSR and in their IgM counterpart. (A) Flow cytometric analysis from CD49d protein expression in 3 representative patients. Although increased levels of CD49d are found in the UM CLLs, expression values for this protein were always higher in the IgG⁺ subset than in their counterpart IgM⁺ subset. (B) Values are mean (\pm SE) for MFI of CD49d expression in the 6 patients with CLL with high AID expression levels. (C) Flow cytometric profiles of CD38 expression inside the IgG subset from 3 representative patients with CLL. Numbers in quadrants indicate percentages of cells. (D) CCL3 and CCL4 mRNA profile expressions in the different isolated subsets (IgM⁺ and IgG⁺) from the 3 representative patients with UM CLL.



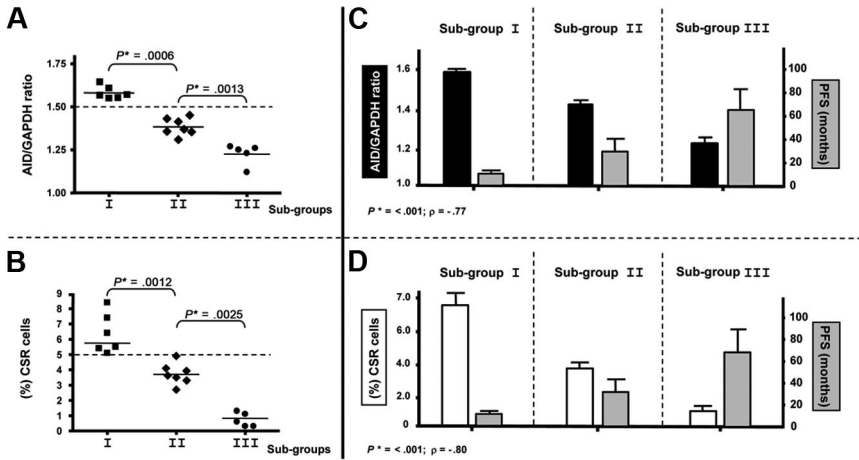


Figure 5. AID expression levels and high CSR segregate patients with UM CLL into 3 subgroups with different clinical progression. (A-B) Significant differences in *P* values in mRNA AID expression (A) and percentage of CLL B cells with clonally related CSR (B) allow us to segregate patients with UM disease into 3 different groups: subgroup I (6 patients) identified as AID^{+/+} and high clonal CSR ($\geq 5\%$), subgroup II (7 patients) identified as AID⁺ and low clonal CSR, and subgroup III (5 patients) identified as AID^{neg} without clonal CSR. Significant *P* values are shown (* $P \leq .001$, Mann-Whitney test). (C-D) Correlations of AID expression and PFS (C) and clonal CSR and PFS (D) for the 3 subgroups are plotted. Both analyses indicate a significant negative correlation; $P \leq .001$ considered significant (*) by Spearman rank test. $P < .001$ (Spearman rank coefficient $\rho = -0.77$) for AID expression correlated to PFS and $P < .001$ (Spearman rank coefficient $\rho = -0.80$) for clonal CSR linked to PFS.

contained 7 patients. Six of the 7 patients received treatment at 6, 11, 12, 15, 18, and 36 months, and 1 of them died at 70 months from disease-related causes. In subgroup III, the 5 patients failing to express AID, no tumoral CSR was found, and none of them received treatment and remain alive to date. To link a clinical poor outcome with high AID expression and high clonally related CSR, a Spearman rank correlation test was carried out. A significant negative correlation comparing the 3 subgroups was found between AID expression and PFS ($P < .001$; Spearman rank coefficient $\rho = -0.77$), as well as between CSR percentage and PFS ($P < .001$; Spearman rank coefficient $\rho = -0.80$; Figure 5C and 5D, respectively). Despite the low number of patients with CLL with clonally related CSR in the UM group, PFS and OS analyses were performed. Results showed significant differences for PFS analysis ($P = .007$) and low but still significant difference for OS analysis ($P = .021$; Figure 6A and 6B, respectively).

Among the patients with MUT disease, none of the 6 patients expressing low levels of AID required treatment, and all patients are alive with a mean time of follow-up of 36 months. Among the

19 patients with MUT disease failing to express AID transcripts, 3 required treatment at 6, 12, and 25 months, and 1 died of causes unrelated to CLL at 120 months without receiving previous treatment. Overall, these results outline the importance of the subset with ongoing high clonally related CSR and expressing high levels of AID among patients with UM disease and suggest that the analysis of this subpopulation could be important to identify a more aggressive form in CLL disease.

Discussion

Important progress resulting in high levels of clinical and even molecular remissions has been recently achieved in CLL treatment. However, CLL remains an incurable disease. Recently, compelling evidence suggests that crosstalk with accessory cells in specialized tissue microenvironments, such as the bone marrow and secondary lymphoid organs, favors disease progression by promoting malignant B-cell growth and drug resistance. Therefore, understanding the crosstalk between malignant B cells and their milieu could give us new keys into the cellular and molecular biology of CLL that can finally lead to novel strategies in the treatment of this disease. Nevertheless, we need a more proper knowledge about the signals received and/or transmitted by CLL B lymphocytes, interacting with T lymphocytes, and/or with stromal, endothelial, dendritic, and nurselike cells in the particular CLL microenvironment. The simple observation that CLL B cells progressively accumulate in vivo, but undergo apoptosis when cultured in vitro, draws attention to the microenvironment and its ability to deliver signals that may ensure the survival of malignant cells. Further, it is self-evident that the accumulated CLL B cells in the PB are constantly nourished by an upstream proliferation cell compartment. It is reasonable to assume that the balance between the 2 compartments may be at the basis of the highly variable clinical course of CLL, which may behave as a stable and indolent monoclonal lymphocytosis or as an aggressive disease.

In this study we attempted to provide additional evidence related to the importance of the microenvironment signals in the clinical course of CLL. For this, we analyzed a particular tumoral subpopulation displaying ongoing CSR^{17,28} and high AID expression in the PB of patients with UM CLL. Ongoing CSR process²⁴ and high expression of AID²⁹ are physiologically confined to the GC, a highly specialized and activated microenvironment originated during an immune response. However, in previous work, we demonstrated expression of AID in the PB of patients with UM CLL, which additionally displayed a subpopulation of tumoral cells with ongoing CSR.¹⁴ Because a subsequent work has shown that AID expression is restricted to a small proportion of the tumoral CLL clone,³⁰ the patients with UM disease with this subpopulation and high

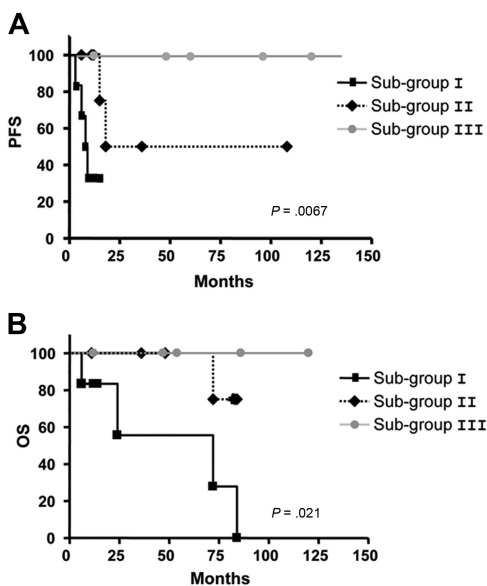


Figure 6. Kaplan-Meier curves based on AID and CSR expression in the 3 subgroups in patients with UM CLL comparing the PFS and OS. The Kaplan-Meier method was used to construct survival curves for PFS (A) and OS (B), and results were compared with the log-rank test Spearman. *P* values refer to the log-rank test. Subgroup I corresponds to UM CLL AID^{+/+} and CSR $\geq 5\%$; subgroup II to UM CLLs AID⁺ and low clonally related CSR, and subgroup III to UM CLL AID^{neg} and CSR not related to the tumoral clone.

expression of a potential mutator such as AID are interesting to study. Given this, we hypothesized that the subset with ongoing CSR could be responsible for AID expression and might correspond to a CLL in which an activated tumor microenvironment is present, being that this is responsible for a poorer clinical outcome. We speculated that this continuous activation might lead to a highly proliferative disease whose hallmark is the presence of this particular subset in the PB of this UM CLL.

Our results show that almost all mRNA AID expression is restricted to the subpopulation of tumoral cells with ongoing CSR. Furthermore, this subpopulation is clonally related to the tumoral IgM counterpart but expresses higher levels of Ki-67, *c-myc*, Bcl-2, CD49d, and CCL3/4 chemokines as well as lower levels of the cell-cycle inhibitory protein p27^{-kip1} and, more importantly, is associated with disease progression. Active CSR process is currently measured by the presence of switch circle or their transcribed chimeric I-C μ product referred as the CTs. Because they are rapidly degraded by nucleases, they constitute specific molecular markers of ongoing CSR. Our results show the presence of CTs in the tumoral subset IgM⁺/IgG⁺, which is a minor pool of CLL B cells in a transitional state of CSR. Interestingly, in the established IgG⁺ CLL B cells CTs were also identified, suggesting that at least some of them come out of an active CSR process. High expression of AID was observed in the IgM⁺/IgG⁺ and IgG⁺ subpopulations but not in their IgM⁺ counterpart. These results suggest that the subset with ongoing CSR is responsible for almost all AID expression and that this activation might have recently been triggered, in an activated CLL microenvironment. To clarify the importance of the microenvironment interactions with the different clinical progression of these patients with UM CLL, we asked, which is the stimulus for this constitutive expression and where does it occur? These interesting questions remain to be elucidated.

In this context, we have evaluated the expression of different key molecules implicated in cell-cycle regulation, proliferation, and tumoral progression. Higher expression of Ki-67, *c-myc*, Bcl-2, as well as the underexpression of the cell-cycle inhibitor p27^{-kip1}, was found among the tumoral subsets with ongoing CSR and high AID expression, compared with their IgM counterpart. The Ki-67 is a nuclear protein up-regulated in the G₁, S, G₂, and M phases of the cell cycle but absent in resting cells (G₀ phase).³¹ In addition, *c-myc* oncogene has been proposed to be expressed at a stage of differentiation in B cells. Studies of Larsson et al²⁶ show that CLL B cells could be induced to proliferate and differentiate, after in vitro incubation with 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. In this case the CLL B cells change from G₀ to G₁, and this process is accompanied by a dramatic increase in the expression of *c-myc*.²⁶ In our studies, both subpopulations (IgM⁺/IgG⁺ and IgG⁺) depicted significantly higher levels of Ki-67 and Bcl-2 protein and the *c-myc* mRNA, suggesting an activated state for these particular subsets of CLL B cells. Because some reports indicated that AID expression could vary during evolution of CLL disease,^{23,25} we have studied 2 patients (CLL 18 and 20) at 2 time points with a 2-year interval. Results showed no significant changes in AID, CSR, and Ki-67 expression, suggesting that the presence of IgM⁺/IgG⁺ and IgG⁺ subsets as well as AID expression are maintained during the course of the disease (data not shown).

Recent reports suggest that CD38 and CD49d molecules are negative prognostic factors in CLL and could be implicated in the molecular crosstalk between malignant B cells and their microenvironment.^{20,32} In addition, CCL3 and CCL4 chemokines have been identified to contribute to the recruitment of cells from the monocyte macrophage lineage in these important interactions with CLL B cells and stromal cells.^{19,20} Interestingly, our results in the IgG⁺ subsets show higher expression of CD49d protein and CCL3/4 mRNA than in the IgM⁺ tumoral subpopulation. These

results are in agreement with previous reports showing that these molecules are important players in the activation of CLL B cells interacting with their microenvironment.

With the use of a nonradioactive, stable isotopic labeling method to measure CLL kinetics, Messmer et al³³ demonstrated that B-CLL is not a static disease that results simply from accumulation of long-lived lymphocytes, but it is a dynamic process in which cells proliferate and die. Markers such as CD38 have been proposed as helping to identify the proliferative pool.³⁴ However, the fact that CD38 is expressed in a high percentage of tumoral cells in patients with UM disease and recent results from Calissano et al³⁵ fail to establish a strong correlation between the percentage of CD38⁺ proliferating cells in CLL clones and survival and disease progression indicate that CD38⁺ tumoral cells constitute a heterogeneous population, including a small fraction of cells with an increased proliferative potential. Results from Messmer et al³³ indicating that proliferating rates of CLL cells range from 0.08% to 1.7% suggest that, as in the case of CD38⁺ subset, not all the AID^{+/+} subpopulation with ongoing CSR correspond to cells in a state of active proliferation. Our results showing that only a fraction of tumoral cells displaying ongoing CSR coexpress CD38 support this last view. To our knowledge only one work has correlated AID and CD38 expression in CLL B cells.³⁶ Because a positive correlation was found, we can presume that this small CD38⁺ subset within the IgG⁺ B cells could be the same that express high levels of AID enzyme. Further studies isolating the tumoral IgG⁺ subset coexpressing CD38 from IgG⁺CD38⁻ cells are warranted.

Intriguingly, it is difficult to determine the precise role of these highly proliferating activated tumoral B cells. Because the presence of this subset is clearly associated with poor prognosis, it might have an adjuvant role in the maintenance of the CLL proliferative pool. However, given their increased proliferative potential, they should normally outnumber the IgM⁺ cells, but this is not the case. Thus, we could assume that these cells should undergo apoptosis once leaving the pseudofollicles. A recent work suggesting a link between AID expression and B-cell apoptosis in the GC favors this view.³⁷ In these conditions, the IgG⁺ subset could reflect the existence of an active microenvironment leading to permanent stimulation of the IgM⁺ pool, which would turn on the CSR machinery maintaining this IgG⁺ subset in the PB. If true, the hypothesis that in the UM subgroup stimulation of BCR takes place by an unknown autoantigen³⁸⁻⁴⁰ and that this is responsible for consecutive stimulations and is able to sustain survival/expansion signals in the tumoral clone results in an interesting issue highlighted by these results.

Finally, our results indicate that among UM CLLs exists a subgroup of patients identified by high levels of AID expression and ongoing clonally related CSR, which displays an even worse prognosis. These findings have been obtained in a retrospective series of patients with a short follow-up. Prospective studies in larger series of patients are needed to raise conclusive evidence to our results and to determine whether expression of the different C_H isotypes in tumoral cells should be routinely included in flow cytometric studies to better assess prognosis among patients with UM CLL.

Acknowledgments

We thank Michele Goodhardt for critical comments, Dr Hugo Naya for technical assistance in statistical analysis, and Mrs Ivana Faccini for helpful secretarial assistance.

This work was supported by the Lady Tata Memorial Trust and Fondo Clemente Estable (grant FCE_365).

Authorship

Contribution: F.P. and P. Moreno performed experiments and wrote the paper; P. Morande, C.A., A.C., and V.P. performed experiments and collected CLL samples; A.I.L. and R.G. performed clinical activities and data collection of patients with CLL; M.G., G.D., and O.P. contributed

to scientific design and revised the paper; and P.O. designed research, coordinated the study and data analysis, and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Oppezzo Pablo, Institut Pasteur de Montevideo, Unit of Recombinant Protein, Mataojo 2020, Montevideo (11400), Uruguay; e-mail: poppezzo@pasteur.edu.uy.

References

- Vasconcelos Y, Davi F, Levy V, et al. Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2003;21(21):3928-3932.
- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219-234.
- Binet JL, Leproprier M, Dighiero G, et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer*. 1977;40(2):855-864.
- 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;94(6):1848-1854.
- Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1840-1847.
- Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1910-1916.
- Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1017-1029.
- Moreno C, Montserrat E. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev*. 2008;22(4):211-219.
- Hamblin T. Chronic lymphocytic leukaemia: one disease or two? *Ann Hematol*. 2002;81(6):299-303.
- Chiorazzi N. Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20(3):399-413.
- Kinoshita K, Honjo T. Linking class-switch recombination with somatic hypermutation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(7):493-503.
- Okazaki IM, Hiai H, Kakazu N, et al. Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J Exp Med*. 2003;197(9):1173-1181.
- Perez-Duran P, de Yébenes VG, Ramiro AR. Oncogenic events triggered by AID, the adverse effect of antibody diversification. *Carcinogenesis*. 2007;28(12):2427-2433.
- Oppezzo P, Vuillier F, Vasconcelos Y, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display a dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood*. 2003;101(10):4029-4032.
- Kimby E, Mellstedt H, Björkholm M, Holm G. Surface immunoglobulin pattern of the leukaemic cell population in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) in relation to disease activity. *Hematol Oncol*. 1985;3(4):261-269.
- Stoehger ZM, Wakai M, Tse DB, et al. Production of autoantibodies by CD5-expressing B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 1989;169(1):255-268.
- Efremov DG, Ivanovski M, Batista FD, Pozzato G, Burrone OR. IgM-producing chronic lymphocytic leukemia cells undergo immunoglobulin isotype-switching without acquiring somatic mutations. *J Clin Invest*. 1996;98(2):290-298.
- Ghia P, Strola G, Granziero L, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4⁺, CD40L⁺ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol*. 2002;32(5):1403-1413.
- Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, et al. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurse-like cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood*. 2009;113(13):3050-3058.
- Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, et al. CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res*. 2009;69(9):4001-4009.
- Oppezzo P, Magnac C, Bianchi S, et al. Do CLL B cells correspond to naive or memory B-lymphocytes? Evidence for an active Ig switch unrelated to phenotype expression and Ig mutational pattern in B-CLL cells. *Leukemia*. 2002;16(12):2438-2446.
- Guikema JE, Rosati S, Akkermans K, et al. Quantitative RT-PCR analysis of activation-induced cytidine deaminase expression in tissue samples from mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood*. 2005;105(7):2997-2999.
- Heintel D, Kroemer E, Kienle D, et al. High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA is associated with unmutated IGHV gene status and unfavourable cytogenetic aberrations in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2004;18(4):756-762.
- Cerutti A, Zan H, Kim EC, et al. Ongoing in vivo immunoglobulin class switch DNA recombination in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol*. 2002;169(11):6594-6603.
- Albesiano E, Messmer BT, Damle RN, Allen SL, Rai KR, Chiorazzi N. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. *Blood*. 2003;102(9):3333-3339.
- Larsson LG, Schena M, Carlsson M, Sallstrom J, Nilsson K. Expression of the c-myc protein is down-regulated at the terminal stages during in vitro differentiation of B-type chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 1991;77(5):1025-1032.
- Sanhes L, Tang R, Delmer A, DeCaprio JA, Ajchenbaum-Cymbalista F. Fludarabine-induced apoptosis of B chronic lymphocytic leukemia cells includes early cleavage of p27kip1 by caspases. *Leukemia*. 2003;17(6):1104-1111.
- Oppezzo P, Dighiero G. What do somatic hypermutation and class switch recombination teach us about chronic lymphocytic leukaemia pathogenesis? *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;294:71-89.
- Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, et al. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem*. 1999;274(26):18470-18476.
- Albesiano E, Messmer BT, Damle RN, Allen SL, Rai KR, Chiorazzi N. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. *Blood*. 2003;102(9):3333-3339.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-322.
- Nuckel H, Switala M, Collins CH, et al. High CD49d protein and mRNA expression predicts poor outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Immunol*. 2009;131(3):472-480.
- Messmer BT, Messmer D, Allen SL, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest*. 2005;115(3):755-764.
- Damle RN, Temburni S, Calissano C, et al. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood*. 2007;110(9):3352-3359.
- Calissano C, Damle RN, Hayes G, et al. In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;114(23):4832-4842.
- Degan M, Zucchetto A, Bomben R, et al. Activation-induced cytidine deaminase and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2005;6(3):251-252.
- Zaheen A, Boulianne B, Parsa JY, Ramchandran S, Gommerman JL, Martin A. AID constrains germinal center size by rendering B cells susceptible to apoptosis. *Blood*. 2009;114(3):547-554.
- Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med*. 2008;264(6):549-562.
- Potter KN, Mockridge CI, Neville L, et al. Structural and functional features of the B-cell receptor in IgG-positive chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2006;12(6):1672-1679.
- Ghiotto F, Fais F, Valetto A, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2004;113(7):1008-1016.

Microenvironment Interactions in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Delicate Equilibrium Linking the Quiescent and the Proliferative Pool

F. Palacios¹, C. Abreu¹, P. Moreno¹,
M. Giordano², R. Gamberale² and P. Oppezzo^{1,3}

¹*Recombinant Protein Unit, Institut Pasteur de Montevideo,*

²*Department of Immunology, Institute for Hematologic Research, National Academy of
Medicine, Buenos Aires,*

³*Department of Immunobiology, Faculty of Medicine, University of the Republic,
Montevideo,
Uruguay*

1. Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the commonest form of leukemia in Europe and North America, and mainly, though not exclusively, affects older individuals. It has a very variable course, with survival ranging from months to decades [1]. It is a neoplastic disorder, characterized by progressive accumulation of monoclonal B lymphocytes, expressing CD5 and CD23 molecules and low amounts of surface membrane Ig and CD79b molecules [2]. About one-third of patients never requires treatment, has a long survival and dies of causes unrelated to CLL; in another third an initial indolent phase is followed by progression of the disease; the remaining third of patients has aggressive disease at the onset and requires early treatment [3]

Accumulation of mature B-cells that have escaped programmed cell death and undergone cell-cycle arrest in the G0/G1 phase is the hallmark of CLL [4]. In this leukemia elevated levels of the cyclin negative regulator p27^{Kip1} protein are found in a majority of patients [5]. Given the key role of this protein in cell cycle progression, the over-expression of p27^{Kip1} could account for the accumulation of CLL B-cells in early phases of the cell cycle. Furthermore, it has been postulated that the survival advantage of CLL lymphocytes is also due to aberrant over-expression of antiapoptotic Bcl-2 family proteins in general [6] and Bcl-2 and Mcl-1 proteins in particular [7]. Other members of the Bcl-2 family, such as anti-apoptotic proteins BCL-XL and BAG1 are overexpressed in CLL B-cells whereas proapoptotic proteins, such as BAX and BCL-XS, are underexpressed [4]. These antiapoptotic proteins sequester pro-apoptotic counterparts and a balance between both determines the fate of a cell. Additionally, the most consistent cytogenetic lesion in CLL is chromosomal deletions of 13q14, resulting in loss of microRNAs, miR-15a and miR-16-1. Expression of these microRNAs has been founded inversely correlated to Bcl-2 expression and thus, suggested that translocation 13q14 is associated to survival of CLL B-cells [8]. These observations establish anti-apoptotic Bcl-2 family proteins as key survival factors for CLL [9].

High expression of cyclin cell cycle negative regulator p27^{Kip1}, antiapoptotic molecules such as Bcl-2 or Mcl-1, and a characteristic non activated phenotype of CLL B- lymphocytes (low surface immunoglobulin (Ig) expression and absence of activated lymphocyte molecules) led to the assumption that CLL disease is a leukemia resulting from accumulation rather than from proliferation. However this traditional view that CLL is a disease deriving from an inherent defect in apoptosis has being called into question [10]. Recent studies suggest that CLL is a dynamic process, comprising leukemic cells that multiply and die at measurable rates. Furthermore, since CLL cells do not appear to be inherently immortal, patient's compromise does not occur from passive accumulation, but from active generation of subclones that over time develop dangerous genetic abnormalities which further change the birth/death ratios [10,11].

These observations have turned the attention towards the occurrence of different subpopulations inside the tumoral clone. It is clear that most, if not all, proliferative events occur in tissues where leukemic cells are able to exploit microenvironment interactions in order to avoid apoptosis and acquire tumoral growing conditions [12]. This concept is supported by reports showing that, despite their monoclonal origin, there are different subpopulations within clonal CLL B-cells [13,14 and 15].

These works which underline the presence of a proliferative B-cell subset within the tumoral clone, furnish new strength to the hypothesis that the microenvironment plays a central role in the maintenance and progression of this disease. Thus, upregulation of antiapoptotic proteins such as Survivin [16], Mcl-1, Bcl-2, as well as specific chemokines and cytokines in CLL (reviewed in [17]), like CCL2 [18], CCL3/CCL4 [19,20] CXCR4–CXCL12 [21], and IL-4 [22] among others, support a process of activation and reinforcement of the malignant cells by the microenvironment. These key interactions provide survival signals to the leukemic cells leading to the progression and treatment resistance of the tumoral clone. Therefore, the development and design of therapeutic agents with the goal of disrupting the crosstalk between malignant B cells and their microenvironment is an attractive novel strategy in the treatment of CLL, a heterogeneous disease that as yet remains incurable.

In this chapter we will compile the available evidence related to the main B-cell/microenvironment interactions responsible to maintain a CLL proliferative subset. We will discuss the present knowledge about the proliferative B-cell subsets and how they are preserved within the tumoral CLL clone.

2. Role of the microenvironment in CLL-B cell survival

All the physiological processes during which B-cells encounter their antigen (Ag) occur in specific anatomical sites so-called "specialized microenvironments". Germinal centers are the typical immunological picture of these activation places. In this environment B-cell stimulation is totally dependent on complex supportive interactions with both Ag-specific and Ag-non-specific accessory populations. T cells and a variety of different types of adherent cells, generally defined as 'stromal cells', are the main elements of this microenvironment.

In CLL disease, the proliferating compartment is represented by focal aggregates of proliferating polymphocytes and para-immunoblasts that give rise to the called pseudo-follicles or proliferation centres [23]. Pseudo-follicles are the histological CLL hallmark in lymph nodes (LN), splenic white pulp and bone marrow (BM) where they appear as

vaguely nodular areas never surrounded by a mantle zone. These areas are usually infiltrated with an important number of CLL B-cells that after interaction with T-cells and/or stromal/follicular dendritic cells, are able to express the proliferation marker Ki-67 and the progression disease molecules such as CD38 [24] and CD49d [25].

The general observation that CLL B-cells rapidly die by apoptosis after culture in the absence of accessory cells strongly indicate that CLL B-cells maintain their capacity to respond to selected external stimuli that confer to leukemic cells a growth advantage and an extended survival. Furthermore, numerous *in-vitro* evidence indicate a predominant role of the microenvironment in CLL cell survival [26].

T lymphocytes, the bone marrow stromal cells, and the follicular dendritic cells are involved in the natural history of the disease and appear to be major players in delivering key signals for the proliferation of tumoral clone and disease progression [27]. The exposure of malignant cell subclones to microenvironmental stimuli results in increased proliferation, a prerequisite for the occurrence of new genetic abnormalities that lead to the development of a more aggressive disease.

The pattern of tissue infiltration by CLL cells may be variable. More frequently, malignant cells are seen only or predominantly in the peripheral blood (PB) and the BM. In some instances a vast LN involvement is observed together with a modest PB involvement. These clinical observations point to the existence of mechanisms that selectively control the trafficking and homing of malignant lymphocytes to distinct microenvironments. One such mechanism might be accounted by chemokines and chemokine receptors. Recent data indicate that CLL cells may express specific sets of chemokine receptors and/or respond to specific chemokines produced by microenvironmental elements that selectively attract individual cells to explicit anatomical sites [17].

Chemokines constitute a growing family of chemotactic cytokines that are generally involved in leukocyte migration. According to a current classification based on their function, they are subdivided into three different groups: (1) the homeostatic chemokines regulating lymphocyte migration and homing processes under physiological conditions, (2) the inducible chemokines expressed during inflammation and (3) an overlapping group involved in both processes. Their expression can be induced by various stimuli, including growth factors and inflammatory cytokines. Besides these general aspects, chemokines are also associated to a variety of pathological processes. During tumourigenesis, they are known to play a crucial role informing and modifying the tumour stroma by inducing the infiltration of various hematopoietic cells (e.g. macrophages, natural killer (NK) cells, eosinophils, B and T lymphocytes) as well as fibroblasts and endothelial cells. They also contribute to the neovascularisation, the growth and the spreading of tumours [17].

2.1 Role of T-cells in the CLL microenvironment

The peripheral T-cell repertoire in CLL is significantly altered with a marked increase in oligoclonality in both CD4 and CD8 positive cells [28]. A multitude of *in-vitro* findings indicate that T lymphocytes are attractive candidates to play a role in the inhibition of the malignant B-cell apoptosis and to favour disease progression [29,30]. The weight of evidence points to a dialogue between malignant CLL B-cells and CD4^{pos} T-cells, based upon

bidirectional interactions that are regulated by adhesion molecules and chemokines and translate into the production of several cytokines by both cell types (reviewed by [26]). T-cell cytokines, including IL-4, IFN- γ , and IL-2 inhibit CLL B-cell apoptosis by upregulating Bcl-2 protein, reinforcing the concept that the ability of CLL cell to avoid apoptosis may be strongly influenced by external stimuli provided by the microenvironment [26].

Within pseudofollicular proliferation centers, proliferating leukemic lymphocytes are in contact with numerous CD3^{pos} T-cells, most of which are CD4^{pos}, and express CD40L, which can support the growth of CLL B-cells through CD40 ligation. CD40 is a member of the tumour necrosis factor (TNF) receptor superfamily that is expressed by B-cells, dendritic cells and monocytes [31]. The stimulation of CD40 and interleukin 4 (IL-4) rescues CLL B-cells from apoptosis and induces their proliferation [32]. Moreover, CD40 crosslinking on CLL B-cells induces up-regulation of CD80 and CD54 and turns nonimmunogenic CLL cells into effective T-cell stimulators [33]. Later studies of Granziero *et al.* have shown that this proliferative CLL B-cells activated through CD40 also express survivin, a member of the family protein of inhibitor of apoptosis, (IAPs) [16]. This protein is the only IAP whose expression is induced in CLL B-cells by CD40L. The survivin positive cells have an extended survival, an increased proliferative rate and retain Bcl-2 positivity.

It is unclear why and how CD4^{pos} T-cells that gather in CLL pseudo-follicles are activated. Under normal circumstances, CD4^{pos} T-cells that cooperate with B lymphocytes in primary follicles recognize the antigenic peptide in the context of MHC-II class molecules (peptide MHCII binds to T cell receptor, TCR). This interaction results in the transient up-regulation of CD40L. However, T-cells in CLL patients exhibit defective immunological synapse formation which may account for the defects in T-cell helper function seen in earlier studies [30]. Whatever causes their activation, CD40L^{pos} T-cells are in close physical contact with CD40^{pos} CLL within proliferation centers [24]; hence the physiological stimulus provided by CD40L is available to malignant B-cells. Subsequent research has shown that these activated CD4^{pos} T-cells tend to assemble in pseudo-follicles attracted by the chemokines, CCL17 and CCL22 [22] and CCL3 and CCL4 [19,20] produced by proliferating CLL B-cells themselves, (Figure 1A).

In regard to CCL17 and CCL22, it is interesting that leukemic cells purified from LN and BM, but not from PB, constitutively express mRNA for both of them. The CD40-crosslinking of PB CLL cells induces the expression of these chemokines at RNA level [22]. Of them, CCL22 is released and is capable of attracting activated CD4^{pos} /CD40L^{pos} T-cells, while CCL17 is released only when IL-4 is added to the *in-vitro* system [16] (Figure 1A).

3. Role of stromal cells in the CLL microenvironment

T cells are not the only active responsible partners for leukemic B-cells. A number of adherent accessory cells present in different microenvironments are gaining increasing attention in the last years in the CLL progression. It has been convincingly demonstrated that a direct physical contact between BM stromal cells and leukaemic cells extends the survival of CLL B-cell [34]. Stromal cells are key regulators of normal B lymphopoiesis. However, even if they are known to provide binding sites and growth factors to developing B-cells, the precise nature of ligand-receptor interactions are not fully known. The interest has been initially focused upon

adhesion molecules. *In-vitro*, it has been shown that malignant CLL B-cells interact with BM stromal cells via $\beta 1$ and $\beta 2$ integrins [34]. This binding rescues CLL cells from apoptosis and extends their lifespan, suggesting a potential mechanism for the preferential *in-vivo* accumulation and survival of CLL cells within the BM.

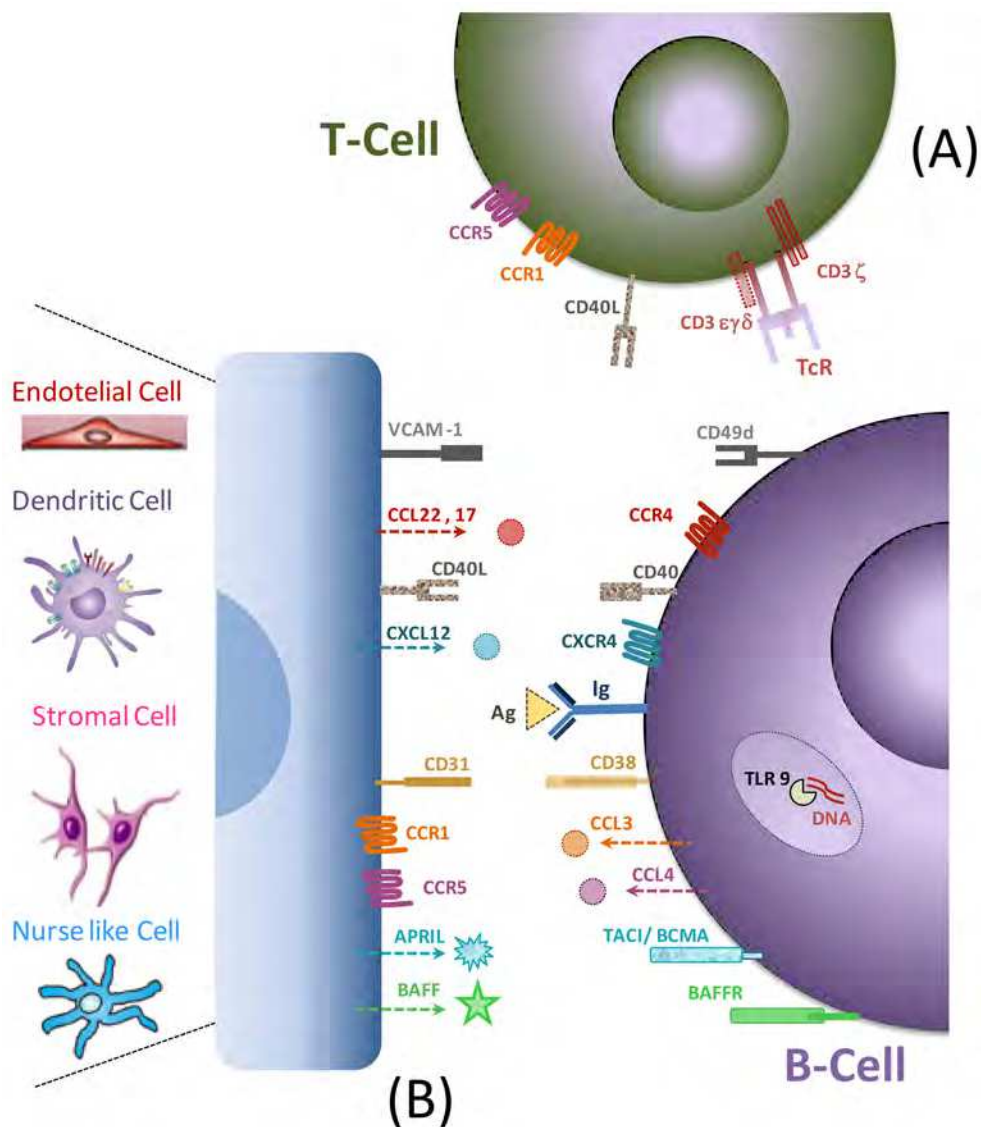


Fig. 1. The microenvironment stimuli on CLL B-cells . Main signaling interactions regulating the survival and the proliferation of leukemic clone. A) T-cells signals to CLL B-cells. B) Endothelial, dendritic and nurse like cells signals to CLL B-cells.

The PB of CLL patients has been shown to contain cells that *in-vitro* can differentiate into adherent nurse-like cells, endowed with the capacity of protecting the attached leukaemic B-cells from spontaneous apoptosis [21]. Blood-derived nurse cells protect CLL B-cells from apoptosis by utilizing a mechanism dependent on SDF-1 (CXCL12), a CXC chemokine that is constitutively secreted by BM stromal cells and regulates B lymphopoiesis upon binding its receptor CXCR4 (CD184). CXCR4 is consistently over expressed by CLL B-cells [21]. In this sense, a recent work of Vaisitti *et al.*, clearly shows that CD38 synergizes with the CXCR4 pathway supporting the working hypothesis that migration is a central step in disease progression and that expression of CD38 is correlated to this expression [35].

Using gene expression profiles comparing CD38^{pos}/CD49d^{pos} versus CD38^{neg}/CD49d^{neg} CLL B-cells, Zuchetto *et al.* [19] showed an over expression of the CCL3 and CCL4 chemokines in leukemic cells from the CD38^{pos}/CD49d^{pos} subset. CCL3 and CCL4 are up-regulated by CD38 engagement in CD38^{pos}/CD49d^{pos} CLL B-cells and also CCL3 was found to be expressed by CLL B-cells from bone marrow biopsies (BMB) of CD38^{pos}/CD49d^{pos} but not CD38^{neg}/CD49d^{neg} cases. High levels of CCR1 and, to a lesser extent, CCR5, the receptors for CCL3 and CCL4, were found in CLL-derived monocyte-macrophages. Consistently, CCL3 induced monocyte migration and CD68+ macrophage infiltration was particularly high in BMB from CD38^{pos}/CD49d^{pos} CLL B-cells. Conditioned media from CCL3-stimulated macrophages induced endothelial cells to express vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1), the CD49d ligand, likely through TNF- α over production. These effects were apparent in BMB from CD38^{pos}/CD49d^{pos} CLL, where lymphoid infiltrates were characterized by a prominent meshwork of VCAM-1+ stromal/endothelial cells. It appears that the CD31/CD38/ZAP-70 axis may represent a point of convergence of proliferative and migratory signals. CD38/CD31 interactions are followed by a marked upregulation of the semaphorin family member CD100, which in turn interacts with the plexin B1 ligand expressed by stromal cells and contributes to further sustain proliferation and survival of CLL B-cells [36].

Underlying the role of stromal cells in the CLL survival signals, a recent work of Zuchetto *et al.*, show that T-cells do not emerge as relevant players in CCL3/CCL4-driven dynamics in CLL BM microenvironment. Rather, this work proposes that CCL3/CCL4 chemokines preferentially target monocytes/macrophages, which are recruited by this/these chemokine/s, in the context of microenvironmental sites of CCL3/CCL4-producing CLL [19]. CCL3 and CCL4 are small (8-10 kDa), structurally related chemokines that, under normal conditions, are secreted by mature hematopoietic cells. Biologically, CCL3 and CCL4 have overlapping effects and act as potent chemoattractants for monocyte, macrophages, dendritic, T, and natural killer cells [37]. Highlighting the importance of the expression of these chemokines in CLL progression, a recent work of Sivina *et al.*, proposes CCL3 chemokine as a novel prognostic marker in CLL, suggesting that its evaluation might become useful for risk-assessment in patients with CLL [38] (Figure 1B).

Leukemic CLL B-cells are not only exposed to signals delivered by accessory, non-malignant cells in the lymphoid tissues, but they are also capable of sensing pathogen associated molecular patterns through a variety of membrane or cytosolic receptors. Toll-like receptors (TLR) are probably the best characterized. TLR7 and TLR9, which recognize single stranded RNA and bacterial DNA respectively, are virtually always expressed (Figure 1). Other evidence which reinforces the importance of the microenvironment on the survival of B-

cells came from Decker *et al.* These authors have been shown that stimulation of CLL B-cells with an analog of bacterial DNA (CpG -ODN) induces the expression of cyclin D2 and cyclin D3 and reduces the expression of p27-kip1 associated with cell cycling. Both cyclins were associated with cdk4, which is the catalytic partner of D-type cyclins in normal B cells. Moreover, immune complexes consisting of cyclin D2-cdk4 or cyclin D3-cdk4 were both functional and phosphorylated the RB protein *in-vitro* [39].

Finally, not only signals delivered by stromal cells appear to be essential in the microenvironment crosstalk with the leukemic B lymphocyte. Cytokine array and enzyme-linked immunosorbent assay studies revealed increased expression of soluble CD14 by monocytes in the presence of CLL B-cells. This work shows that monocytes help in the survival of CLL B-cells by secreting soluble CD14, which induces nuclear factor κ β activation in these cells [40].

Overall, these data provide a link between microenvironmental factors and the proliferation/apoptosis dilemma of CLL B-cells. CLL is now revealing itself to be an environment-dependent hematological malignancy. This idea could be in agreement with a model of selective survival of certain clonal submembers, which would receive survival signals in these particular lymphoid sites.

3.1 Other microenvironment soluble factors involved in CLL progression

Several works in the last years, display the importance of soluble factor regulating the balance between stability and progression of this disease. It is known that CLL B-cells themselves can secrete pro-angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin (Ang) which are involved in the formation of new blood vessels. These newly formed vessels are characterized by increased permeability, and thus contribute to disease dissemination [12]. CLL B-cells can also express receptors for some of these pro-angiogenetic factors, including VEGF receptors VEGFR1 and 2 as well as the Ang-receptor. Signaling through these receptors significantly prolongs cell survival [41]. Additionally, it has been described that thioredoxin (Trx) is expressed in LN of CLL patients and that this expression can increase the CLL survival clone. In this work, the authors found that adding Trx at CLL B-cells increased in a dose-dependent fashion the release of TNF- α , which has been suggested to be an autocrine growth factor for these cells. Secretion of TNF- α maintained Bcl-2, and diminish the apoptosis in the CLL B-cells. [42].

4. Proliferative pool in CLL

It is well established that CLL is a heterogeneous disease: some patients experience a slowly progressive clinical course, but most will eventually enter an advanced phase requiring repeated treatment. Different groups have suggested that cytoskeletal organization, cellular adhesion and the migratory potential of the leukemic clone regulate tissue distribution of CLL cells, possibly influencing a patient's outcome [43,44]. This highlights the significance of topographical issues in disease progression and provides convincing evidence that CLL B-cells with enhanced motility are associated with aggressive disease. Independent confirmation of these results comes from data generated in patients, showing that a

significant proportion of the leukemic clone proliferates and that proliferation occurs predominantly in lymphoid organs.

Messmer and col. clearly demonstrate that a proliferative compartment exists in CLL, [11] although major part probably resides in the solid tissues [14]. Further, it is self-evident that the accumulated CLL B-cells in the PB are constantly nourished by an upstream proliferation cell compartment. It is reasonable to assume that the balance between the two compartments may be at the bases of the highly variable clinical course of CLL, which may behave as a stable and indolent monoclonal lymphocytosis, or as an aggressive disease.

At present, two proliferative subsets related to disease progression has been described in CLL. Chiorazzi's group proposed that the subset CD38 positive/Ki67 positive CLL B-cells could be a proliferative pool in this disease [14]. Additionally a recent work of Palacios *et al.*, also describe a proliferative subset in UM CLL patients characterized by the presence of active class switch recombination process and anomalous expression of the Activation-Induced cytidine Deaminase (AID) enzyme [15].

4.1 Proliferative CD38 positive CLL B-cells

Despite the large number of surface markers described in the CLL, the expression of CD38 and its association with the disease has been intensively studied. CD38 is accepted as a dependable marker of unfavorable prognosis and as an indicator of activation and possibly proliferation of CLL cells at the time of analysis. Leukemic clones with higher numbers of CD38 positive cells are more responsive to BCR signaling and are characterized by enhanced migration. *In-vitro* activation through CD38 drives CLL proliferation and chemotaxis, via activation of a signaling pathway that includes ZAP-70 and ERK1/2. *In-vivo* interaction of CD38 with CD31, its cognate receptor, have an important role in cell-cell interactions activating survival pathways in normal and leukemic lymphocytes [45].

An important work of Chiorazzi's group highlights the cell-cycling status of CLL cells, focusing on those leukemic cells expressing CD38 [14]. In order to going deeper in this area Pepper *et al.* extended these observations by comparing gene profile of CD38^{pos} and CD38^{neg} CLL B-cells of a single patients. The results showed that CD38^{pos} CLL cells possess a distinct gene expression profile compared with their CD38^{neg} sub-clones. CD38^{pos} CLL B-cells relatively overexpress vascular endothelial growth factor (VEGF), which is associated with increased expression of the anti-apoptotic protein Mcl-1 [13]. Detailed characterization of the proliferating CLL B-cell convincingly demonstrated a close association between CD38 expression and increased percentages of Ki-67 and ZAP-70 positive cells, suggesting that CD38^{pos} clonal members are more highly activated and prone to enter the cell cycle than their negative counterpart [13].

However, further studies of the same laboratory failed to establish a strong correlation between the percentage of CD38^{pos} proliferating cells in CLL clones and survival and disease progression [46]. The fact that CD38 is expressed in a high percentage of tumoral cells in UM patients indicate that CD38^{pos} leukemic cells constitute a heterogeneous population including a small fraction of cells with an increased proliferative potential. Results from Messmer *et al.* show that leukemic CLL proliferating rates range from 0.08% to 1.7% [11] suggesting that not all CD38 positive cells, are proliferating.

The scenario outlined by these data indicates that the CD38^{pos} cells subpopulation involve a discrete and small subset of cells, also CD38 positive, that have recently exited a solid tissue, and have received freshly proliferation signals.

4.2 Proliferative AID positive CLL B-cells

Recent evidences from our group outline the importance of another cellular subset, characterized by an anomalous expression of the mutagenic molecule AID in a proliferative leukemic clone [15]. This protein is a B cell-restricted enzyme, induced principally through the contact of T and B-cells via CD40-CD40L interactions, despite that recent works also show that the innate immune response via TLR receptor is able to trigger their expression [47]. The physiological expression of this enzyme is responsible for somatic hypermutation (HMS) and class switch recombination (CSR) process in B lymphocytes [48]. However, the mutational activity of AID identifies this enzyme as the first genome mutator in humans with oncogenic potential [49]. Supporting this view, different works report that constitutive AID expression is associated with a loss in the target specificity and with lymphoproliferative disorders [49,50].

In the CLL disease we have reported that AID is anomalous expressed in the PB of some patients with UM VH genes, active CSR and clinical poor outcome [51]. Despite expression of a functional AID as assessed by an active CSR and mutations induced in the pre-switch region, CLL B-cells in these patients did not succeed to achieve the SHM process [52]. Although clonal CSR has been described in CLL B-cells long ago [53,54] and different works have shown that this process occurs principally in patients with UM disease [52,55], the origin and the biologic implications of this subpopulation in the physiopathology of CLL remain elusive.

Because AID expression in CLL is associated with ongoing CSR in patients with UM disease, we investigated the relation of AID expression, CSR process, and microenvironment activation in the PB of CLL patients with different clinical profiles. Our results show that high expression of AID is almost exclusively restricted to the subpopulation of tumoral B-cells having an active CSR process (IgG^{pos} CLL B-cells). This subset expresses high levels of proliferation and antiapoptotic molecules such as Ki-67, *c-Myc*, and Bcl-2. In addition, this particular subset of leukemic cells display high levels of CD49d and CCL3/CCL4 chemokines, as well as a decreased expression of cell cycle inhibitor p27^{-kip1} compared with their quiescent counterpart IgM B-cells. Finally, the presence of this subpopulation in patients with UM CLL is closely related to an aggressive course of the disease [15]. Additionally to this, over-expression of anti-apoptotic and proliferative molecules as well as expression of molecules implicated in the microenvironment interactions has also been established. Thus, this tumoral CLL subset appears to be a hallmark of a recent contact with an activated microenvironment exclusively found in UM CLL patients with a poor clinical outcome [15].

It is difficult to determine the precise role of these highly proliferating activated tumoral B-cells. Since the presence of this subset is clearly associated to poor prognosis, it might have an adjuvant role in the maintenance of the CLL proliferative pool. However, given their increased proliferative potential they should normally outnumber the IgM^{pos} cells and this is not the case. Thus, we could assume that these cells should undergo apoptosis

once leaving the pseudo-follicles. A recent work suggesting a link between AID expression and B-cell apoptosis in GC favour this view [56]. In these conditions, the IgG^{pos} subset could reflect the existence of an active microenvironment leading to permanent stimulation of the IgM^{pos} pool, which would be turn on the CSR machinery maintaining this IgG^{pos} subset in the PB. Alternatively, an adjuvant role in the maintenance of the CLL IgM proliferative pool by this subset could be considered. Recently, evidence indicates that outside the GC, there is a fraction of AID^{pos} B-cells subset of interfollicular large B-lymphocyte and in the thymic medullae of tonsils [57]. Interestingly, these AID positive B-cells ongoing CSR form prominent cytoplasmic extensions, lending them to a “dendritic cell-like” appearance [57]. In this respect, unpublished results from our laboratory indicate that *in-vitro* stimulation with CD40L/IL-4 not only induces B-cells to proliferate, but also activates lymphocytes to adopt a morphological aspect of “pseudo-dendritic” cells expressing B-cell markers. If the stimulation through CD40L or other stimulation molecules are able to induce these “pseudo-dendritic” cells to become efficient antigen presenting cells remains elusive yet. Whatever the case, the hypothesis that in the UM subgroup stimulation of BCR takes place by an unknown auto-antigen [27,58] and that this is responsible for consecutives stimulations sustaining survival/expansion signals in the tumoral clone, results an interesting issue highlighted by these results.

In this context, we hypothesize that the survival signals of this AID^{pos} CLL B-cells subset could be constitutively triggered by the recognition of an autoantigen present in LN and/or BM (figure 2). In order to explain, why an active AID^{pos} tumor clone is unable to carry out the SHM process, we propose that an unidentified cofactor of AID is absent in the AID^{pos}, UM CLL subset. The correct expression of both, AID and its cofactor, enables the leukemic clone to achieve the SHM process. Once mutated, the clone loses its ability to recognize the autoantigen and, consequently it loses the possibility to receive pro-survival and proliferative signals (figure 2 panel A). In contrast, the expression of AID in the absence of its cofactor prevents BCR mutations, allowing a persistent interaction of the leukemic cells with the autoantigen (figure 2 panel B). The positive signaling through the BCR together with pro-survival and proliferative factors from the microenvironment leads to the accumulation of CLL B-cells and the progression of the disease. The high proliferation rate, the over-expression of AID and other factors, could favor DNA translocations and oncogenic mutations finally associated with progressive and refractory disease (figure 2 panel B).

Inhibition of apoptosis may occur *in-vivo* in pseudo-follicles observed in the lymph nodes, and in the cell clusters described in the bone marrow. These pseudo-follicles include proliferating B-cells in close contact with increased numbers of CD4 T-cells expressing CD40L, which is necessary for AID expression. These activated CD4 T-cells could be recruited by tumor B-cells through the expression of T cell-attracting chemokines such as CCL17 and CCL22 [22] and/or CCL3 and CCL4 [20]. Besides this, the CD38 and CD49d proteins appear to be important additional players interacting with nurse-like cells, stromal, and endothelial cells to complete the activation pathway within the proliferative centers [19]. Overall, these observations favor the view that certain cellular subsets in CLL could receive survival signals in the specific microenvironments, increasing their proliferative potential and consequently associated with a more aggressive disease.

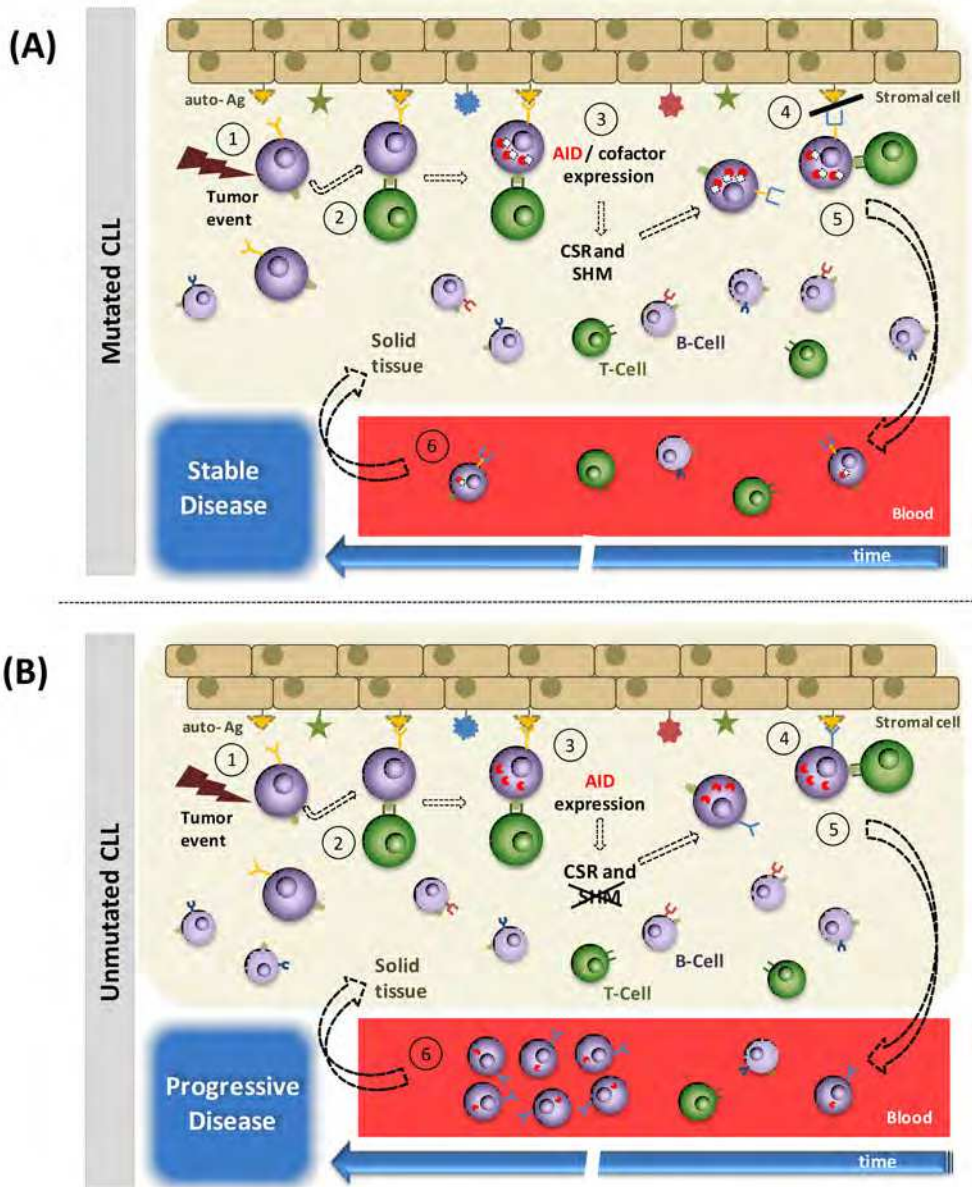


Fig. 2. Anomalous AID expression in UM CLL patients: potential role of autoantigen in the progression diseases.

The survival signals of the proliferative AID^{pos} CLL B-cells subset could be constitutively triggered by the recognition of an autoantigen (auto-Ag) present in LN and/or BM.

In the mutated cases we propose that after an unknown tumor event (1), the tumoral B-cell could recognize an auto-Ag through BCR and receive collaboration from other cells such as T follicular helper cells or antigen-presenting cell (APC) (2). At this level proliferation centers could be initiated and after this activation the tumor clone might trigger AID expression and its unknown partners in order to achieve SHM and CSR (3) Once mutated the VDJ regions of BCR, the leukemic clone loses its ability to recognize the auto-Ag (4) and, consequently also loses the possibility to receive survival and proliferative signals.

In UM patients, panel B, tumor event occurs in a B-cell (1), BCR of this leukemic cell recognizes the auto-Ag and is induced to proliferate with the help of another T-cells or APC. (2) The leukemic clone expresses AID and their partners, but not the specific cofactor necessary to achieve a correct SHM process (3). Constitutive AID expression in this scenario only is able to trigger CSR, but it cannot mutate the VDJ region of BCR (4). This persistent activation of the leukemic clone leads to the existence of this proliferative subset IgG^{pos}/AID^{pos}. The increasing number of these leukemic, switched cells in the proliferative centers leads to the leukemic cells extravasation to peripheral blood (5). These circulating cells might home to solid tissues eventually and thus, they would receive proliferation/survival signals again (6). Cycles of these last two events overtime, produce an increase in the number of proliferating AID^{pos} CLL B-cells (detectable in peripheral blood), which is considered as a hallmark of a proliferative and progressive leukemia.

5. Inflammation role in an activated CLL microenvironment

The relationship between antigen stimulation/inflammation and the natural history of CLL is not surprising considering that inflammation is involved in the initiation and progression of several chronic lymphoid malignancies of B-cell type [59].

Chronic inflammation and CLL are inter-related in many aspects. The malfunctioning of the immune system helps the first few cancer cells to establish into a full-fledged CLL. In comparison to normal B-cells, leukemic cells are rescued from apoptosis by bone-marrow stromal cells, signifying the selectivity of microenvironment for malignant cells. Compelling evidences show us that CLL progression is originated in an inflammatory microenvironment in which many cells (T-cells, stromal cells, monocytes, macrophage and dendritic cells) are all able to delivered survival signals supporting the tumoral clone. These microenvironmental responses are often brought about by the interplay of different chemokines, cytokines, transcriptional factors or post-translational modifications [9].

The inflammatory chemokines are expressed in inflamed tissues and signal for recruitment of neutrophils. On the other hand, homeostatic chemokines produced constitutively in distinct tissue microenvironments to sustain traffic of mature lymphocytes in lymphoid and nonlymphoid tissues [17]. Despite the protective function it has on the CLL B-cells through apoptosis inhibition this factor also allows the spontaneous migration of malignant cells towards BM stromal cells, suggesting that CLL B-cells may utilize this mechanism to infiltrate the BM [21]. SDF-1 and other chemokines such as CCL3 and CCL4 secreted proteins, appear to form a pro-survival circuitry by regulating leukocyte trafficking, extravagating into sites of tissue inflammation and maintaining extended lymphocyte survival [19].

Cytokines are signaling key mediators of inflammation or an immune response, involved in accelerating inflammation and also are present in high levels in CLL patients. They are classified as pro-inflammatory (IL1, IL6, IL15, IL17, IL23 and TNF- α [61,62]), or anti-inflammatory (IL4, IL10, IL13, transforming growth factor(TGF β) and TNF- α depending on their function in tumorigenesis [60]). Another work, recently performed by Schulz *et al.* [61] touch upon the issue of inflammatory cytokines and signaling pathways associated with CLL survival. Consistent with this possibility inflammatory cytokines genes are upregulated in this work. Among these genes chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) was shown to be induced in monocytes by the presence of CLL cells *in-vitro*.

In addition to chemokines and cytokines, the key mediators of inflammation-induced cancer include activation of transcription factors. There are a wide range of transcriptional factors that bind to the promoter region of target genes and activate transcription of these oncogenes. Aberrant expression of the transcription factors like MYC, STAT and NF- κ B are associated to inflammatory immune response but also in carcinogenesis and poor prognosis in CLL [62].

The fact that inflammatory receptors such as Toll-like receptors (TLR) can be engaged concomitantly with the BCR, it becomes reasonable to presume that TLR may also play a role in BCR co-stimulation of CLL cells. Indeed, bacterial lipopeptides protect CLL cells from spontaneous apoptosis mediated by TLR signaling [63]. On the other hand, post-translational modifications may affect the activity and longevity of the proteins anti- and pro-apoptotic proteins in an inflammatory microenvironment. Bcl-2 protein undergoes phosphorylation at sites Thr56, Thr69, Ser70, Thr74 and Ser87 in response to different stimuli [64]. Taken together, the extracellular signals from cytokines and chemokines, the contribution of transcriptional factors and post-translational modifications on anti-apoptotic proteins ultimately form a complex network to deliver microenvironmental support to the malignant cells [9].

6. Conclusion

Important progress resulting in high levels of clinical and even molecular remissions has been recently achieved in CLL treatment. However, CLL remains an incurable disease. Compelling evidence suggests that crosstalk with accessory cells in specialized tissue microenvironments, such as the BM and secondary lymphoid organs, favours disease progression by promoting malignant B-cell growth and drug resistance. We are starting to understand which genes, molecules and accessory cells are involved in CLL B-cell/microenvironment interactions and what roles they play. Nevertheless, we need a more proper knowledge about the signals received and/or transmitted by CLL B-lymphocyte, interacting with T lymphocytes, and/or with stromal, endothelial, dendritic and nurse-like cells in the particular CLL microenvironment. Therefore, understanding the crosstalk between malignant B-cells and their milieu could give us new keys in the cellular and molecular biology of CLL that can finally lead to novel strategies in the treatment of this disease.

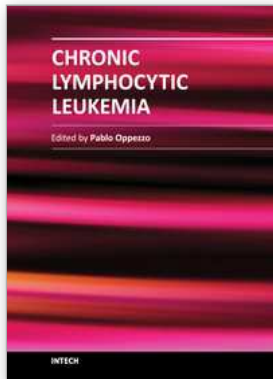
7. References

- [1] Dighiero, G. and Hamblin, T.J. (2008) Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 371 (9617), 1017-1029
- [2] Dighiero, G. (2003) Unsolved issues in CLL biology and management. *Leukemia* 17 (12), 2385-2391

- [3] Vasconcelos, Y. et al. (2003) Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 21 (21), 3928-3932
- [4] Caligaris-Cappio, F. and Hamblin, T.J. (1999) B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol* 17 (1), 399-408
- [5] Vrhovac, R. et al. (1998) Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood* 91 (12), 4694-4700
- [6] Krajewski, S. et al. (1995) Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am J Pathol* 146 (6), 1309-1319
- [7] Opferman, J.T. et al. (2003) Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 426 (6967), 671-676
- [8] Cimmino, A. et al. (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (39), 13944-13949
- [9] Chen, L.S. et al. (2010) Inflammation and survival pathways: chronic lymphocytic leukemia as a model system. *Biochem Pharmacol* 80 (12), 1936-1945
- [10] Chiorazzi, N. (2007) Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 20 (3), 399-413
- [11] Messmer, B.T. et al. (2005) In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 115 (3), 755-764
- [12] Deaglio, S. and Malavasi, F. (2009) Chronic lymphocytic leukemia microenvironment: shifting the balance from apoptosis to proliferation. *Haematologica* 94 (6), 752-756
- [13] Pepper, C. et al. (2007) Highly purified CD38+ and CD38- sub-clones derived from the same chronic lymphocytic leukemia patient have distinct gene expression signatures despite their monoclonal origin. *Leukemia* 21 (4), 687-696
- [14] Damle, R.N. et al. (2007) CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood* 110 (9), 3352-3359
- [15] Palacios, F. et al. (2010) High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood* 115 (22), 4488-4496
- [16] Granziero, L. et al. (2001) Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 97 (9), 2777-2783
- [17] Burger, J.A. (2010) Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): from understanding the basics towards therapeutic targeting. *Semin Cancer Biol* 20 (6), 424-430
- [18] Schulz, A. et al. (2010) Inflammatory cytokines and signaling pathways are associated with survival of primary chronic lymphocytic leukemia cells in vitro: a dominant role of CCL2. *Haematologica*
- [19] Zucchetto, A. et al. (2009) CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res* 69 (9), 4001-4009
- [20] Burger, J.A. et al. (2009) 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* 113 (13), 3050-3058
- [21] Burger, J.A. et al. (2000) Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 96 (8), 2655-2663

- [22] Ghia, P. et al. (2002) Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol* 32 (5), 1403-1413
- [23] Lennert, K. et al. (1978) Malignant Lymphomas Other than Hodgkin's Disease. *Springer-Verlag*, 119-129
- [24] Patten, P.E. et al. (2008) CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood* 111 (10), 5173-5181
- [25] Gattei, V. et al. (2008) Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111 (2), 865-873
- [26] Caligaris-Cappio, F. (2003) Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 123 (3), 380-388
- [27] Ghia, P. et al. (2008) Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med* 264 (6), 549-562
- [28] Rezvany, M.R. et al. (2003) Leukemia-associated monoclonal and oligoclonal TCR-BV use in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 101 (3), 1063-1070
- [29] Borge, M. et al. (2010) CXCL12-induced chemotaxis is impaired in T cells from ZAP-70-chronic lymphocytic leukemia patients. *Haematologica*
- [30] Ramsay, A.G. et al. (2008) Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest* 118 (7), 2427-2437
- [31] Grewal, I.S. and Flavell, R.A. (1998) CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 16, 111-135
- [32] Kitada, S. et al. (1999) Bryostatin and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 106 (4), 995-1004
- [33] Ranheim, E.A. and Kipps, T.J. (1993) Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med* 177 (4), 925-935
- [34] Lagneaux, L. et al. (1998) Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* 91 (7), 2387-2396
- [35] Vaisitti, T. et al. (2010) CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*
- [36] Deaglio, S. et al. (2008) CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target. *Trends Mol Med* 14 (5), 210-218
- [37] Menten, P. et al. (2002) Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 13 (6), 455-481
- [38] Sivina, M. et al. (2010) CCL3 (MIP-1{alpha}) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*
- [39] Decker, T. et al. (2002) Cell cycle progression of chronic lymphocytic leukemia cells is controlled by cyclin D2, cyclin D3, cyclin-dependent kinase (cdk) 4 and the cdk inhibitor p27. *Leukemia* 16 (3), 327-334
- [40] Seiffert, M. et al. (2010) Soluble CD14 is a novel monocyte-derived survival factor for chronic lymphocytic leukemia cells, which is induced by CLL cells in vitro and present at abnormally high levels in vivo. *Blood* 116 (20), 4223-4230
- [41] Letilovic, T. et al. (2006) Role of angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 107 (5), 925-934
- [42] Nilsson, J. et al. (2000) Thioredoxin prolongs survival of B-type chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 95 (4), 1420-1426

- [43] Stamatopoulos, B. et al. (2009) Gene expression profiling reveals differences in microenvironment interaction between patients with chronic lymphocytic leukemia expressing high versus low ZAP70 mRNA. *Haematologica* 94 (6), 790-799
- [44] Scielzo, C. et al. (2010) HS1 has a central role in the trafficking and homing of leukemic B cells. *Blood* 116 (18), 3537-3546
- [45] Malavasi, F. et al. (2011) CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood*
- [46] Calissano, C. et al. (2009) In vivo intra- and inter-clonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*
- [47] Glaum, M.C. et al. (2008) Toll-like receptor 7-induced naive human B-cell differentiation and immunoglobulin production. *J Allergy Clin Immunol*
- [48] Kinoshita, K. and Honjo, T. (2001) Linking class-switch recombination with somatic hypermutation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (7), 493-503.
- [49] Okazaki, I.M. et al. (2003) Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J Exp Med* 197 (9), 1173-1181.
- [50] Perez-Duran, P. et al. (2007) Oncogenic events triggered by AID, the adverse effect of antibody diversification. *Carcinogenesis* 28 (12), 2427-2433
- [51] Oppezzo, P. et al. (2005) Different isoforms of BSAP regulate expression of AID in normal and chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 105 (6), 2495-2503
- [52] Oppezzo, P. et al. (2003) Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display a dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood* 9, 9
- [53] Kimby, E. et al. (1985) Surface immunoglobulin pattern of the leukaemic cell population in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) in relation to disease activity. *Hematol Oncol* 3 (4), 261-269
- [54] Sthoeger, Z.M. et al. (1989) Production of autoantibodies by CD5-expressing B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Experimental Medicine* 169 (1), 255-268
- [55] Efremov, D.G. et al. (1996) IgM-producing chronic lymphocytic leukemia cells undergo immunoglobulin isotype-switching without acquiring somatic mutations. *J Clin Invest* 98 (2), 290-298.
- [56] Zaheen, A. et al. (2009) AID constrains germinal center size by rendering B cells susceptible to apoptosis. *Blood*
- [57] Moldenhauer, G. et al. (2006) AID expression identifies interfollicular large B cells as putative precursors of mature B-cell malignancies. *Blood* 107 (6), 2470-2473
- [58] Potter, K.N. et al. (2006) Structural and functional features of the B-cell receptor in IgG-positive chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 12 (6), 1672-1679
- [59] Caligaris-Cappio, F. (2011) Inflammation, the microenvironment and chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 96 (3), 353-355
- [60] Zenz, T. et al. (2010) From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 10 (1), 37-50
- [61] Schulz, A. et al. (2011) Inflammatory cytokines and signaling pathways are associated with survival of primary chronic lymphocytic leukemia cells in vitro: a dominant role of CCL2. *Haematologica* 96 (3), 408-416
- [62] Hazan-Halevy, I. et al. (2010) STAT3 is constitutively phosphorylated on serine 727 residues, binds DNA, and activates transcription in CLL cells. *Blood* 115 (14), 2852-2863
- [63] Muzio, M. et al. (2009) Expression and function of toll like receptors in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 144 (4), 507-516
- [64] Willmott, S. and Wagner, S.D. (2010) Post-transcriptional and post-translational regulation of Bcl2. *Biochem Soc Trans* 38 (6), 1571-1575



Chronic Lymphocytic Leukemia

Edited by Dr. Pablo Oppezzo

ISBN 978-953-307-881-6

Hard cover, 448 pages

Publisher InTech

Published online 10, February, 2012

Published in print edition February, 2012

B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) is considered a single disease with extremely variable course, and survival rates ranging from months to decades. It is clear that clinical heterogeneity reflects biologic diversity with at least two major subtypes in terms of cellular proliferation, clinical aggressiveness and prognosis. As CLL progresses, abnormal hematopoiesis results in pancytopenia and decreased immunoglobulin production, followed by nonspecific symptoms such as fatigue or malaise. A cure is usually not possible, and delayed treatment (until symptoms develop) is aimed at lengthening life and decreasing symptoms. Researchers are playing a lead role in investigating CLL's cause and the role of genetics in the pathogenesis of this disorder. Research programs are dedicated towards understanding the basic mechanisms underlying CLL with the hope of improving treatment options.

How to reference

In order to correctly reference this scholarly work, feel free to copy and paste the following:

F. Palacios, C. Abreu, P. Moreno, M. Giordano, R. Gamberale and P. Oppezzo (2012). Microenvironment Interactions in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Delicate Equilibrium Linking the Quiescent and the Proliferative Pool, Chronic Lymphocytic Leukemia, Dr. Pablo Oppezzo (Ed.), ISBN: 978-953-307-881-6, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/chronic-lymphocytic-leukemia/microenvironment-interactions-in-chronic-lymphocytic-leukemia-a-delicate-equilibrium-linking-the-qui>

INTECH

open science | open minds

InTech Europe

University Campus STeP Ri
Slavka Krautzeka 83/A
51000 Rijeka, Croatia
Phone: +385 (51) 770 447
Fax: +385 (51) 686 166
www.intechopen.com

InTech China

Unit 405, Office Block, Hotel Equatorial Shanghai
No.65, Yan An Road (West), Shanghai, 200040, China
中国上海市延安西路65号上海国际贵都大饭店办公楼405单元
Phone: +86-21-62489820
Fax: +86-21-62489821

ORIGINAL ARTICLE

Activation of the PI3K/AKT pathway by microRNA-22 results in CLL B-cell proliferation

F Palacios^{1,2}, C Abreu¹, D Prieto¹, P Morande¹, S Ruiz³, T Fernández-Calero⁴, H Naya⁴, G Libisch⁵, C Robello⁵, AI Landoni⁶, R Gabus⁶, G Dighiero⁶ and P Oppezzo^{1,2}

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by accumulation of clonal B cells arrested in G0/G1 stages that coexist, in different proportions, with proliferative B cells. Understanding the crosstalk between the proliferative subsets and their milieu could provide clues on CLL biology. We previously identified one of these subpopulations in the peripheral blood from unmutated patients that appears to be a hallmark of a progressive disease. Aiming to characterize the molecular mechanism underlying this proliferative behavior, we performed gene expression analysis comparing the global mRNA and microRNA expression of this leukemic subpopulation, and compared it with their quiescent counterparts. Our results suggest that proliferation of this fraction depend on microRNA-22 overexpression that induces phosphatase and tensin homolog downregulation and phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT pathway activation. Transfection experiments demonstrated that miR-22 overexpression in CLL B cells switches on PI3K/AKT, leading to downregulation of p27^{-Kip1} and overexpression of Survivin and Ki-67 proteins. We also demonstrated that this pathway could be triggered by microenvironment signals like CD40 ligand/interleukin-4 and, more importantly, that this regulatory loop is also present in lymph nodes from progressive unmutated patients. Altogether, these results underline the key role of PI3K/AKT pathway in the generation of the CLL proliferative pool and provide additional rationale for the usage of PI3K inhibitors.

Leukemia (2015) 29, 115–125; doi:10.1038/leu.2014.158

INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by accumulation of clonal mature B lymphocytes.¹ Recent evidence indicates that disease evolution could depend on the relative balance between an accumulative pool (quiescent fraction (QF)) and a smaller proliferative fraction (PF).² Proliferative events occur in lymph nodes (LN) and bone marrow (BM), where leukemic cells undergo favorable proliferative conditions through interaction with the microenvironment.

As several endogenous stimuli in CLL microenvironment were shown to activate different kinases, a variety of novel kinase inhibitors have been designed. In the case of CLL, these mainly include inhibitors of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and Bruton tyrosine kinase that have generated significant promise.^{3,4} Moreover, microRNAs play a key role in the pathogenesis and progression of human cancers.^{3,5} In CLL, a microRNA signature was found to be associated with prognosis and disease progression.⁴

QF and PF differ in terms of expression of several molecules, including CCL22,⁵ CCL3 or CCL4 chemokines, CD38 (ref.7) and CD49d⁸ progression markers, apoptosis regulators like Survivin⁹ or proliferation markers such as Ki-67 and c-myc¹⁰ as well as the p27^{-Kip1} (p27), a cell cycle regulator.^{10–11} Different CLL proliferative fractions have been isolated and characterized by studying different molecule markers like CD38 (ref.12) or CD5/CXCR4 molecules.¹³ We first reported that leukemic cells obtained from peripheral blood (PB) of progressive unmutated (UM) cases

express high levels of the mutagenic enzyme activation-induced cytidine deaminase (AID).¹⁴ As its expression results from signals received in activated secondary lymphoid organs, we investigated whether tumoral cells expressing AID in PB correspond to proliferative cells recently egressed from proliferating centers.¹⁴ Our results showed that AID expression is mainly restricted to a CLL subset ongoing class switch recombination process and, interestingly, that the presence of this subpopulation was associated with proliferative and anti-apoptotic expression markers and correlated with a poorer clinical outcome.^{10,15}

In this work, we characterized the genomic expression profile (GEP) of the PF and QF in the same patients and compared the global mRNA and microRNA expression between both subsets. Our results suggest that the proliferative behavior of this subpopulation appears to depend on microRNA-22 overexpression that, following phosphatase and tensin homolog (PTEN) downregulation, results in activation of the PI3K/AKT pathway. Finally, we propose that a similar regulatory loop could be present in the leukemic clone in proliferating centers of progressive UM CLL patients.

MATERIALS AND METHODS

Patient samples

PB was obtained from 22 patients with a typical CLL diagnosis (Matutes score of 4 or 5).¹⁶ Patients were segregated into the following. (1) The progressive group (12 patients) defined by UM immunoglobulin V_H gene

¹Recombinant Protein Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; ²Immunobiology Department, School of Medicine, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ³Department of Neurodevelopmental Biology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay; ⁴Bioinformatics Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; ⁵Molecular Biology Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay and ⁶Service of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Hospital Maciel, Montevideo, Uruguay. Correspondence: Dr P Oppezzo, Institut Pasteur de Montevideo, Unit of Recombinant Protein, Matajojo 2020, Montevideo 11400, Uruguay.

E-mail: poppezzo@pasteur.edu.uy

Received 29 January 2014; revised 6 May 2014; accepted 7 May 2014; accepted article preview online 14 May 2014; advance online publication, 10 June 2014

(IgV_H) profile, AID and lipoprotein lipase expression at the mRNA level and presence in PB of at least 2% of CLL B cells ongoing class switch recombination process to IgG, as previously shown by us.¹⁰ This progressive group was characterized clinically by highly progressive disease, rapid lymphocyte doubling time (1 year), lymphocytosis > to 50 000/mm³ and FCR treatment indicated before 3 years after CLL debut. Of these 12 patients, 4 (05, 06, 07 and 11 in Table 1) were studied following fludarabine and cyclophosphamide treatment (FC), at the moment of relapse. For the other 8 patients, the sample was obtained previous to any treatment. (2) The indolent group (10 patients) included mutated VH cases, negative for lipoprotein lipase and AID molecular markers and absence of IgG subset in PB. Regarding clinical data, these cases displayed a low lymphocytosis, low lymphocyte doubling time (> 2 years) and absence of treatment requirement after 5 years. Clinical and molecular characterization of all these patients is depicted in Table 1. LN samples were obtained from 3 UM CLL patients (numbers 07, 08 and 12, Table 1). All patients were followed at the Hospital Maciel from Montevideo and provided an informed consent according to the ethical regulations from Uruguay and the Helsinki Declaration.

MicroRNA and mRNA array

Microarray procedures. Total RNA used to perform the array for mRNA and microRNA on CLL B cells was isolated from 0.5–1 × 10⁶ cells using mirVana isolation kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). The mRNA analysis was performed using a 4 × 44K Whole Human Genome Oligo-Microarray (G4112F, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), in a two-color design interrogating 41 000 unique human genes. Upregulated and downregulated genes (showing *P* < 0.01) in PF relative to QF were used in an ontology analysis. Four biological dye swap replicates were performed. Microarray for miRNA analysis was performed using a 8 × 15K Human miRNA Microarray (G4470B, Agilent Technologies, Inc.), one-color platform containing 470 human miRNA probes according to the manufacturer's guidelines.

Microarray data analysis. Data analysis was accomplished using 'R'/Bioconductor (webmaster@bioconductor.org; Hosting provided by Fred Hutchinson Cancer Research Center).¹⁷ Probes were flagged for filtering considering saturation, signal above background and uniformity.

For microRNA and mRNA analysis, probes that had more than one replicate flagged were eliminated. Arrays were background corrected using normexp. Signal intensity was standardized across arrays via quantile normalization. Normalization was performed within and between arrays using Loess and Aquantile methods, respectively. Differential expression was assayed using the limma software and the ontology analysis conducted with GOHyperGAll function. Arrays analyses are available in GEO database (accession number GSE53270).

The mRNA and microRNA analysis expression by reverse transcription-PCR and quantitative PCR (Q-PCR). RNA isolation, reverse transcription-PCR and Q-PCR were carried out as previously described.¹⁰ Q-PCR evaluating fold change expression of mRNAs was performed in CLL samples (01–08 of Table 1) in order to confirm the GEP. For microRNAs, PCR analyses were performed as previously described.¹⁸ Array studies relating microRNA expression levels were assessed in four additional cases (04–08 CLLs in Table 1) to the samples used in the GEP study (01–04 in Table 1). The primers used for all reactions are provided in Supplementary Table S1.

Cell sorting studies and flow cytometry analysis

Isolation of CLL peripheral blood mononuclear cells from PB and LN, cytometry analysis and sorting experiments using the MoFlo cell sorter (Beckman Coulter, Buenos Aires, Argentina) were performed as previously described.¹⁰ The antibodies used are reported in Supplementary Table S2. In the case of the 12 progressive CLL patients, two fractions were isolated: one expressing exclusively membrane IgM (QF) and a minority fraction expressing either IgM plus IgG or exclusively IgG (PF). Purity of isolated subpopulations assessed by flow cytometry was > 98%. Isolated subsets were also evaluated for CD5 and Ki-67 expression markers, AID mRNA expression and clonal IgV_H rearrangement.

Confocal microscopy

This study was performed as previously described.¹⁹ Briefly, after incubation for 1 h at room temperature with mouse anti-human PTEN (1:20), rabbit anti-FOXO1a (1:100), goat anti-Survivin (1:100) or mouse anti-p27 (1:1600), washings were performed and incubation was then proceeded with anti-mouse Alexa 488 (1:2000), anti-rabbit Alexa 546

Table 1. Clinical and molecular characterization of CLL patients

CLL	Diagnostic date / Binet stage	Sample date / Binet stage	Lymphocyte count at sampling x 10 ³ /μl	VDJ rearrangement ^a	FISH ^b	CD38% ^c	LPL (Q-PCR)	AID (Q-PCR)	IgG ⁽⁺⁾ subset (%) ^d	IgG ⁽⁺⁾ /Ki-67 ⁽⁺⁾ subset (%)	Disease-related death
01	2002/A	2003/C	128	Um - VH1-02	del 11q	38	(+)	(+)	5.2	3.9	Yes
02	2000/B	2010/B	220	Um - VH1-69*01	del 17p	16	(+/-)	(+)	3.2	3.0	Yes
03	2009/A	2009/A	54	Um - VH2-5*10	Normal	46	(+)	(+)	3.8	3.0	Yes
04	2005/A	2010/B	72	Um - VH1-69*01	Normal	19.5	(+)	(+)	4.1	2.5	Alive
05	2009/A	2011/B	140	Um - VH2-5*10	del 17p	36	(+/-)	(+)	3.3	1.5	No
06	2008/B	2010/B	170	Um - VH3-48*03	del 11q	22.5	(+)	(+)	5.0	3.2	Yes
07	2010/B	2010/B	130	Um - VH3-30*04	Tris 12	45.5	(+)	(+)	3.7	3.0	Yes
08	2011/B	2011/C	48	Um - VH3-11*01	Normal	1.9	(+/-)	(+)	2.5	1.7	Yes
09	2011/A	2011/A	105	Um - VH1-2*02	Normal	2.8	(+)	(+)	2.4	0.5	Alive
10	2012/A	2012/A	130	Um - VH1-69*01	Normal	46.5	(+)	(+/-)	3.5	0.3	Alive
11	2012/B	2012/B	160	Um - VH1-69*01	Normal	26.2	(+)	(+/-)	2.2	0.7	Alive
12	2005/A	2012/C	98	Um - VH4-34	Normal	3.9	(+)	(+)	3.2	2.7	Yes
13	2011/A	2011/A	14	Mut - VH3-48*02	N/D	N/D	(-)	(-)	Neg	Neg	Alive
14	2011/A	2011/A	8.9	Mut - VH1-03	del 13q	4.5	(-)	(-)	Neg	Neg	Alive
15	2011/A	2012/A	12	Mut - VH4-59*01	Normal	N/D	(-)	(-)	Neg	Neg	Alive
16	2010/A	2011/A	54.3	Mut - VH3-9*01	Normal	14	(-)	(-)	Neg	Neg	Alive
17	2008/A	2010/A	24.2	Mut - VH1-18*1	Normal	7.8	(-)	(-)	Neg	Neg	Alive
18	2012/A	2012/A	10.0	Mut - VH4-59*1	Normal	3.5	(-)	(-)	Neg	Neg	Alive
19	2012/A	2012/A	26.7	Mut - VH1-2*04	del 13q	N/D	(-)	(-)	Neg	Neg	Alive
20	2012/B	2012/B	21.9	Mut - VH3-23	Normal	32	(-)	(-)	Neg	Neg	Yes
21	2012/A	2012/A	17.9	Mut - VH3-48*02	Normal	8.9	(-)	(-)	Neg	Neg	Alive
22	2010/A	2012/A	6.5	Mut - VH6-1*01	Normal	N/D	(-)	(-)	Neg	Neg	Alive

Abbreviations: AID, activation-induced cytidine deaminase; CLL, chronic lymphocytic leukemia; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; IgG immunoglobulin G; LPL, lipoprotein lipase; N/D, not determined; Neg, negative; Q-PCR, quantitative PCR. ^aUnmutated (UM) patients display < 2% difference with the germline gene, whereas ≥ 2% difference defines mutated (MUT) patients. ^bFISH studies. ^cResults observed by cytometry assays using CD38 cutoff of 30%. ^dIntracytoplasmic cytometry analysis of IgM and IgG subpopulations, Neg is ≤ to 1% of IgG⁽⁺⁾ CLL B cells.

(1:1000), anti-goat Alexa 633 (1:1000) and anti-mouse phycoerythrin, respectively, for 1 h at room temperature. Nuclear staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole or propidium iodide (0.1 μ g/ml) was performed. For antibody details see Supplementary Table S2.

The microRNA transfections and CLL B-cell stimulation. We transfected peripheral blood mononuclear cells of CLL patients with miR-22, antagomiR-22 or irrelevant miR conjugated to Cy3 fluorophore using lipofectamine 2000 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Peripheral blood mononuclear cells (2×10^6) were resuspended in Opti-MEM I (Invitrogen) and transfected with 50 nM of microRNA and 5 μ l/ml of lipofectamine. After 6 h, the cells were washed and cultured in RPMI-1640 media (Invitrogen) supplemented with 20% fetal bovine serum and evaluated by flow cytometry and/or confocal microscopy at 24 h for PTEN and p27 protein or 48 h for Survivin and Ki-67 molecules. Transfection efficiency was evaluated by flow cytometry analysis using a Cy3 fluorophore incorporated at the C3' position of the synthesized oligos (miR-22, antagomiR 22 and irrelevant miR, see Supplementary Table S1). Only experiments with highest transfection efficiency, ranged between 75 and 98%, were evaluated. Activation with human soluble CD40 ligand (Preprotech, Mexico City, Mexico) and interleukin-4 (IL-4; Preprotech) was performed for 4 days at 5 μ g/ml and 5 ng/ml, respectively. Samples were taken for RNA extraction, flow cytometry and confocal microscopy analysis.

Statistical analyses

Comparison of different mRNA gene expression from QF and PF of the same patient was evaluated by Q-PCR using either paired Wilcoxon signed rank test or two-tailed unpaired Student's *t*-test. For protein-level

evaluation of PTEN, AKT, pAKT^{Thr308}, FOXO1, Survivin, p27 and Ki-67, a paired Wilcoxon signed rank test was performed. Variables with P-values of <0.05 were considered to be significant. All analyses were done using GraphPad Prism, version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For microarray data analysis, statistical significance ($P \leq 0.05$) was calculated using Student's *t*-test followed by Benjamini–Hochberg false discovery rate correction on GeneSpring GX11.0.2 software (Agilent Technologies, Inc.).

RESULTS

Isolation of proliferative and quiescent CLL subsets in progressive UM CLL patients

Clinical and molecular characterization of CLL patients included in this study are provided in Table 1. Fluorescence in situ hybridization status in our cohort does not correspond to a classical series of CLL patients, as reported by Dohner *et al.*,²⁰ because our study focused in the comparison of highly progressive patients on one side and highly indolent patients on the other side. Eighty UM CLL cases were studied by flow cytometry to determine the frequency of the PF characterized by ongoing class switch recombination and AID mRNA expression. We found that 15% (12 out of 80 analyzed CLLs) exhibited this subpopulation, ranging between 1 and 3% of the total leukemic clone after surface Ig labeling. A representative case displaying the characterization of the QF and the PF is shown in Figure 1. The QF and the PF were defined as IgM⁺/CD5⁺/Ki-67^{low}/AID^{neg} and IgG⁺/CD5⁺/Ki-67^{high}/AID⁺,

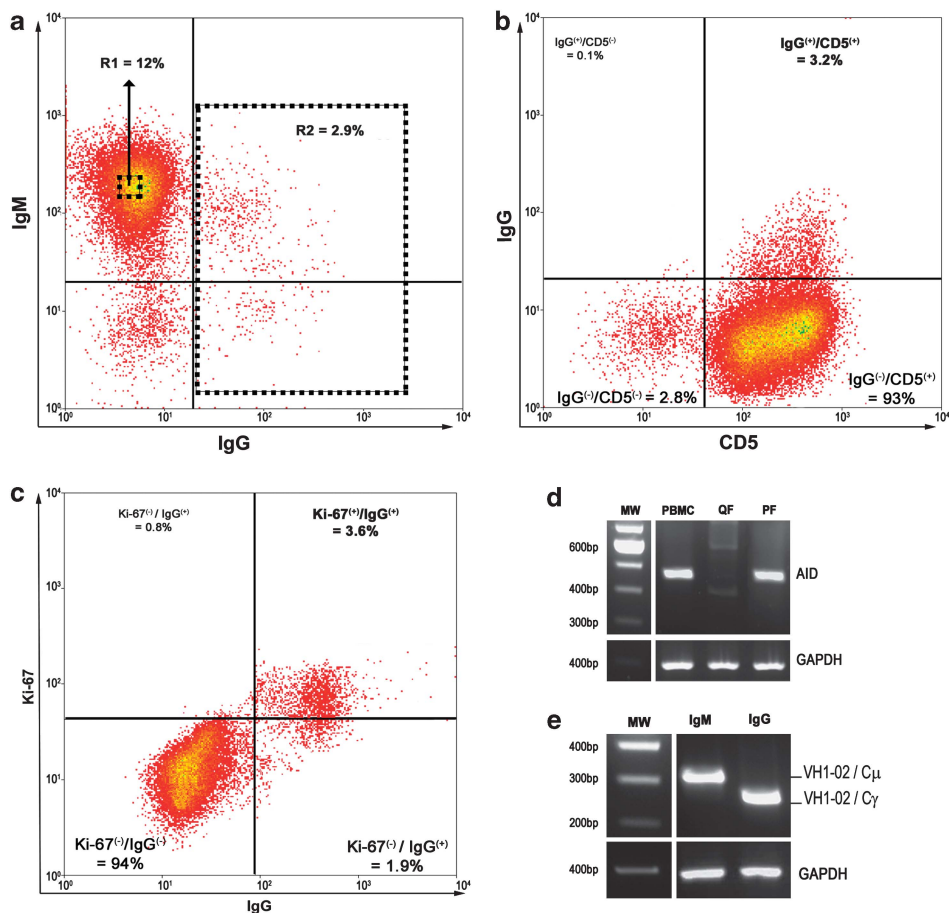


Figure 1. Proliferative and quiescent CLL fractions in a progressive UM CLL patient. (a–c) Representative flow cytometry profile from CLL patient number 03. (a) Surface expression of IgM and IgG CLL B cells and final sorter decision. R1 is positive IgM and R2 is positive IgG surface markers. (b) Surface expression of IgG/CD5 CLL B cells. (c) Intracytoplasmic expression of Ki-67 and IgG markers. (d) AID mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), quiescent and proliferative fractions of patient 03. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as internal control. It is shown that AID expression predominates within the proliferative subset. (e) CLL patient-specific μ and γ transcripts were amplified by reverse transcription-PCR (RT-PCR). The same clonal VH rearrangement was substantiated by sequence analysis.

respectively, and both present the same clonal IgV_H rearrangement (Figures 1a–e). Cell sorter decision to isolate IgM⁺ from IgG⁺ cells is depicted in Figure 1a. Finally, to fully characterize both subsets we carried out GEP of the mRNA and microRNA molecules expressed by them.

Transcriptome and miRNome analysis of the CLL proliferative fraction suggest a role for an activated PI3K/AKT pathway

To investigate the mechanisms involved in CLL proliferation, we evaluated the differential microRNA expression profiles of PF and QF isolated from four CLL cases (Table 1). Expression analysis of array studies followed by Student's *t*-test and Benjamini–Hochberg false discovery rate correction displayed six microRNAs as differentially expressed ($P \leq 0.05$). MicroRNAs, miR-22, miR-107 and miR-15b were overexpressed in the PF, whereas the microRNAs, miR-26a, miR-29a and miR-150 were downregulated (Figure 2a). The microRNAs upregulated in the PF were confirmed by Q-PCR in 8 CLL cases (CLLs 01–04 and 07–10; Figure 2b).

The mRNA GEP was also performed in the isolated PF and QF of patients 01–04 in Table 1. Our study showed a significant number of affected genes grouped in different clusters like cell activation, response to stimulus and stress and others (see Figure 2c). For a complete list of up- and downregulated genes in the PF, see Supplementary Table S3. After stringent quality control steps, we proceeded to perform gene ontology analysis to better define the different gene pathways involved in the PF. Despite the fact that these data were obtained in only four patients and they should be cautiously interpreted, the results showed that the PI3K/AKT pathway appeared to play a major role in this subset (Figure 2d and Supplementary Table S4). Among the most upregulated genes in the PF concerning PI3K/AKT pathway, we found classical cell cycle activators like Cyclin D2 (CCND2) and mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), key anti-apoptotic molecules like BCL2A1, Survivin and proteins implicated in cells proliferation and migration like FYN, Talin-1 and Paxillin. In addition, PF displays low expression of tumor suppressor genes like PTEN and cell cycle regulator genes as p27 and the transcription factor FOXO1 (Figure 2e). Q-PCR of these genes was performed in order to confirm GEP analysis (Supplementary Table S5).

Interestingly, recent evidence demonstrated that miR-22 controls the signaling kinetics of PTEN/AKT/FOXO1 pathway in human cell lines and regulates this cascade.²¹ As AKT pathway is a promising target for CLL treatment,²² we investigated the molecular mechanism of miR-22 overexpression and its putative consequences on the AKT signaling in CLL proliferation.

The miRNA-22 is associated with PTEN/AKT/FOXO1 pathway activation, Survivin overexpression and p27 downregulation

In this section we explored whether the proliferative behavior of the CLL PF could be associated to miR-22 overexpression and regulation of the PTEN/AKT/FOXO1 pathway. We evaluated PTEN expression at the mRNA and protein levels and the total AKT expression in its basal and phosphorylated form (pAKT^{Thr308}), which is a hallmark of the PI3K/AKT pathway activation. We also evaluated nuclear or cytosolic localization of the transcription factor FOXO1 and assessed Survivin and p27 protein expression levels.

Results showed that in the PF there is a threefold overexpression of miR-22 and PTEN mRNA and a twofold underexpression of PTEN mRNA when compared with its quiescent counterpart. Significant statistical differences are shown in Figure 3a. In line with these results, significantly increased PTEN protein is visualized on the CLL B cells corresponding to the QF when compared with the PF of six CLL cases. Figure 3a depicts these results for CLL 06 patient.

As PTEN is a natural negative regulator of PI3K signaling, we investigated the expression of AKT in its basal and phosphorylated forms. Results showed a significant increase of the pAKT^{Thr308} form in

the PF compared with their quiescent counterpart from seven patients. In contrast, no significant differences were found in both fractions from the same CLL cases when total AKT was analyzed. A representative case (CLL 02) after flow cytometry analysis of pAKT^{Thr308} is depicted in Figure 3b. As AKT activity is associated with nuclear export and cytosolic degradation of FoxO proteins,^{23,24} we investigated whether high phosphorylation of AKT should result in FOXO1 inactivation. Statistical analysis of total FOXO1 protein showed that cytoplasmic expression of FOXO1 in the PF is significantly increased when compared with the QF. As shown in Figure 3c, FOXO1 displays a homogeneous nuclear localization in the QF that contrasts with the predominant cytoplasmic localization in the PF.

In CLL, p27 (ref.25) and Survivin⁹ have been implicated in cell cycle arrest and survival, respectively. As both proteins are downstream of the PTEN/AKT/FOXO pathway,^{26,27} we reasoned that expression analysis of these molecules could help explain the differential behavior between quiescent and proliferative CLL subsets. Our results showed that p27 expression is mainly visualized in the QF (Figure 3d). In addition, microscopy studies of the Survivin molecule showed a clear expression of this apoptotic inhibitor in the PF that contrasted with low or absent expression of this molecule in the QF (Figure 3e).

Overall, these results suggest that the proliferative behavior of this PF may result from an activated PTEN/AKT/FOXO1 pathway that in turn switches on cell survival signals like Survivin expression and downregulates cell cycle arrest proteins like p27.

The miR-22 regulates PTEN, p27 and Survivin protein expression in CLL B cells

Previous results in CLL suggest that leukemic B cells from patients with progressive disease display stronger AKT pathway activation.²⁸ As the results presented above suggest that miR-22 could be implicated in CLL B-cell proliferation as well as in AKT activation, we investigated whether inhibition of miR-22 might result in upregulation of PTEN and p27 molecules. To examine this possibility, we first evaluated peripheral blood mononuclear cells of the 22 CLL cases (Table 1), the phosphorylation status of AKT on Thr³⁰⁸ and the PTEN expression levels by flow cytometry in CLL B cells (Figure 4a). This experiment was used to select the five extreme cases displaying highest phosphorylated AKT signals and lower PTEN expression (CLLs 01, 03, 04, 09 and 10 in Table 1) in order to proceed with the microRNA transfection assays. Our results showed that after antagomiR-22 transfection, PTEN protein levels were increased at similar expression values of indolent CLLs (Figure 4b). PTEN expression in a representative case transfected with the antagomiR-22 and the irrelevant microRNA control is shown in Figure 4c. We then evaluated the expression of p27 protein in PB from five progressive and five indolent CLL patients (first section of Figure 4d). Interestingly, after antagomiR-22 transfection of progressive CLL cases (01, 03, 04, 09 and 10 from Table 1), a significant increase in p27 protein level was observed when compared with untransfected and with irrelevant miR controls (Figure 4d). The p27 expression in a representative CLL sample is depicted in Figure 4f. Finally, we evaluated the assumption that miR-22 could also be implicated in Survivin expression through AKT pathway. To this aim, we first evaluated Survivin basal expression in the PB of indolent and progressive CLL cases. As previously described,⁹ only some responders to CD40 stimulation patients express Survivin in PB (first section Figure 4e). Then, we transfected CLL B cells from progressive cases (patients 01, 04, 08, 09 and 10 in Table 1), previously assessed as responders to CD40 ligand (CD40L; data not shown) and analyzed Survivin expression by confocal microscopy. Our results suggest that after transfection with miR-22, Survivin expression is upregulated at significant levels in the evaluated patients (Figure 4e). Upregulated Survivin displays a clear cytosolic localization, contrasting with low or no expression on irrelevant

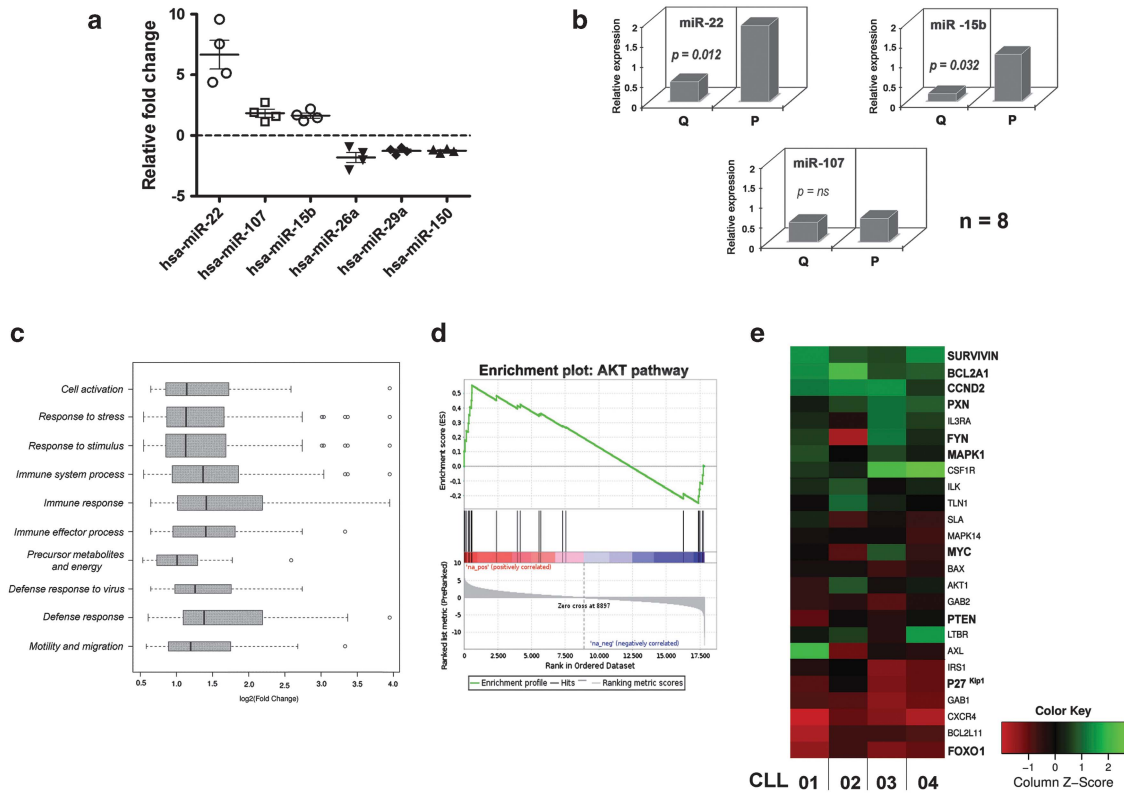


Figure 2. Comparative microRNA and mRNA gene expression analysis between proliferative and quiescent CLL fractions. **(a)** Differential microRNA expression of PF and QF. Relative fold change in the expression of miR-22, miR-15b, miR-107, miR-26a, miR-29a and miR-150 in the PF. **(b)** Q-PCR of miR-22, miR15b and miR-107 expression in PF and QF of CLL B cells isolated from patients 01–04 in Table 1. The miR-22 and miR-15b were significantly overexpressed in the proliferative fraction ($P = 0.012$ and $P = 0.032$, respectively, Wilcoxon matched pairs test), but no significant differences were found for miR-107. The miR-22 is the most differentially overexpressed when comparing the quiescent and the proliferative CLL fractions. **(c)** Analysis of mRNA expression profile. Ontology classes with an overrepresentation in our data set are shown. **(d)** Gene-set enrichment analysis (GSEA) for AKT pathway. Microarray data were analyzed using GSEA software to verify whether AKT gene set was significantly enriched in one of the phenotypes. AKT gene set was enriched in proliferative fraction with false discovery rate (FDR) < 0.01 . The X axis of the curve for enrichment scores includes 17 840 genes, with those better correlating with proliferative fraction on the left and those better correlating with quiescent fraction on the right. Each vertical blue line represents one of the AKT pathway genes. The left-to-right position of each line indicates the relative position of the gene expression value within the rank ordering of all genes. The cumulative enrichment score as a function of position in the gene list is shown in green, reaching a maximum enrichment at a score of 0.55. **(e)** Heatmap representing relative proliferative/quiescent gene expression levels for genes in the AKT pathway. Relative expression levels were obtained from microarray data analysis. Red represents low gene expression in PF relative to gene expression in quiescent cells, whereas green represents high gene expression in PF relative to gene expression in quiescent cells. Color scale is provided at the bottom of the figure. In bold are the genes whose expression level was confirmed by Q-PCR.

miR-transfected or untransfected CLL B cells (representative case in Figure 4f).

Altogether, these results indicate that miR-22 could play an important role in the proliferative behavior of CLL B cells by preventing PTEN tumor suppressor protein expression as well as the cell cycle inhibitor p27 and increasing Survivin expression.

CD40 engagement induces miR-22 expression, AKT activation, Survivin expression and CLL proliferation

To investigate the molecular mechanism that could trigger the PI3K/AKT cascade favoring CLL proliferation, we evaluated whether CD40L/IL-4 could be at the origin of this pathway through miR-22 overexpression. Thus, we stimulated CD40L responder patients (cases 01, 04, 09 and 10 in Table 1) with CD40L/IL-4 and evaluated miR-22, pAKT^{Thr308} and Survivin protein expression. Results showed that CD40L/IL-4 activation results in a miR-22-specific overexpression, whereas no or low effects were evidenced when miR1201 or miR15b expression were tested as controls (Figure 5a and Supplementary Figure S1). These studies also showed increased levels of the pAKT^{Thr308} and Survivin

protein compared with unstimulated samples (Figures 5b and c), suggesting that CD40 engagement switches on the PI3K/AKT pathway and Survivin expression in CLL.

To confirm the relevance of miRNA-22 upregulation on PTEN/AKT pathway and CLL proliferation, we investigated whether Ki-67 proliferation marker could be increased after miR-22 transfection on leukemic cells. Thus, purified leukemic cells from eight CLL patients, four indolent and four progressive patients responsive to CD40 stimulation (CLL 01, 04, 09, 10, 13, 16, 20 and 22 in Table 1) were stimulated with CD40L/IL4 following transfection with miR-22 and an irrelevant microRNA. Results showed a significant increase in Ki-67 expression following miR-22 transfection compared with the experimental controls (Figures 5d and e). Interestingly, transfection with miR-22 and CD40 engagement appears to act in a synergistic way resulting in increased amounts of Ki-67 expression that contrasts with the absence of effect with irrelevant microRNA transfection in CD40L/IL4-stimulated CLL B cells (Figures 5d and e). In addition, the results showed that the inhibition of miR-22 by AmiR-22 transfection during CD40L/IL4 stimulation decreased proliferation in CLL B cells. This evidence strongly supports the hypothesis that miR-22 contributes to CLL proliferation (Figure 5e). Although preliminary, these results

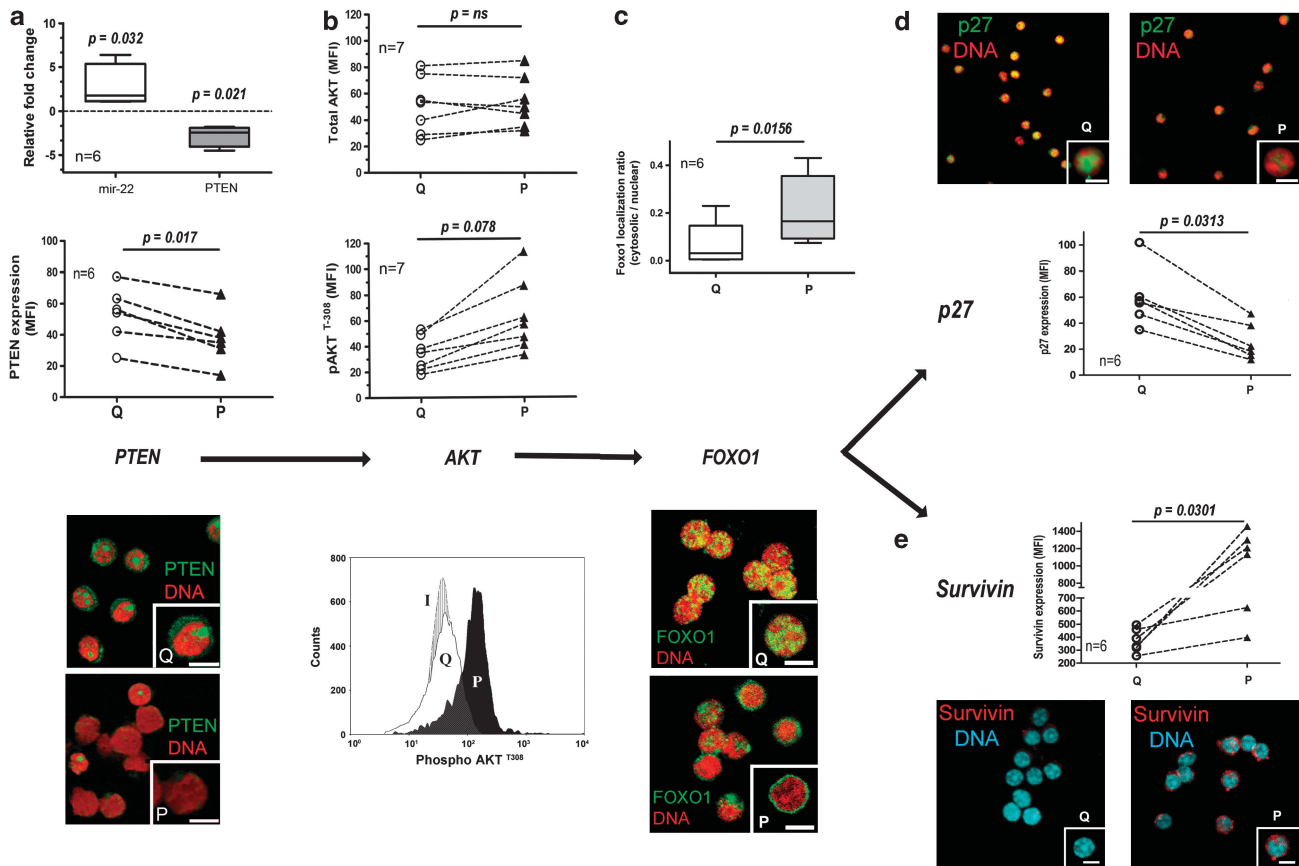


Figure 3. Characterization of miR22, PTEN, AKT and FOXO1 molecule expression levels in quiescent (Q) and proliferative (P) cells from progressive UM CLL cases. **(a)** The miR-22 and PTEN mRNA expression and PTEN protein levels. Fold change expression of miR-22 and PTEN mRNA in PF compared with QF was evaluated by Q-PCR in six CLL cases. The miR-22 is overexpressed in the PF (and PTEN mRNA is underexpressed (mean = 2.7 ± 1.2 , $P = 0.032$ and mean = -2.5 ± 0.6 , $P = 0.021$, respectively). PTEN protein expression in Q (open circle) and P (black triangle) cells from six CLL cases (01–06 in Table 1) evaluated by flow cytometry. It is shown that low expression of PTEN protein levels were observed in the PF when compared with their quiescent counterpart (41.3 ± 7.0 vs 52.8 ± 7.2 respectively, $P = 0.017$, Wilcoxon matched pairs test), MFIs, mean fluorescence intensities. Representative image of confocal microscopy showing PTEN expression in QF and PF from CLL 06. Scale bar: $5 \mu\text{m}$, green: PTEN and red: DNA. **(b)** Characterization of the phosphorylated status of AKT. Phosphorylated AKT form in Threonine 308 (pAKT^{Thr308}) and total AKT protein expression evaluated by flow cytometry in Q (open circle) and P (black triangle) from seven CLL cases (samples 01–07 in Table 1). Results showed a significant increase of the pAKT^{Thr308} form in the PF (mean = 62.86 ± 10.64) when compared with their quiescent counterpart (mean = 34.29 ± 5.0 ; $P = 0.078$, Wilcoxon matched pairs test). In contrast, no significant differences were found in both fractions when total AKT was analyzed (QF, mean = 51.24 ± 8.13 and PF, mean = 53.57 ± 7.28 ; $P = 0.657$, Wilcoxon matched pairs test). Representative pAKT^{Thr308} histogram from CLL 02 showing MFIs in the PF (black peak), QF (white peak) and isotype control (dashed peak) is shown. **(c)** Characterization of the cellular localization of FOXO1. Specific fluorescence intensity in nucleus and cytoplasm was measured in the isolated QF and PF of CLLs 01–04, 07 and 08. Between 100 and 200 cells were counted in each sample. Next, MFI for nucleus and cytoplasm was used to obtain cytosolic/nuclear ratio. The cytosolic/nuclear mean values between QF and PF were respectively, 0.070 ± 0.036 and 0.210 ± 0.056 ($P = 0.0156$, Wilcoxon matched paired test). This difference is depicted by confocal microscopy analysis from CLL 06, where it is shown that FOXO1 is mainly located in the nucleus in the QF and in the cytoplasm in the PF. Scale bar: $5 \mu\text{m}$, green: FOXO1 and red: DNA. **(d and e)** Characterization of p27 and Survivin molecule expression levels. The p27 and Survivin proteins were evaluated by flow cytometry in Q (open circle) and P (black triangle) from six CLL cases (samples 01–06 in Table 1). Statistical analysis of p27 demonstrated a lower expression of this marker in the PF (mean = 33.08 ± 5.4) when compared with the QF (mean = 64.44 ± 9.64 ; $P = 0.0313$, Wilcoxon matched pairs test). Statistical analysis of Survivin showed high expression levels of this survival marker in the PF, whereas low or no expression was found in the QF, (mean = 1145 ± 140.7 & mean = 399 ± 35.0 ; $P = 0.0301$, respectively; Wilcoxon matched pairs test). A representative microscopic analysis of p27 and Survivin expression in Q and P fractions is shown. Scale bar: $5 \mu\text{m}$. Green: p27 and red: DNA. Red: Survivin and cyan: DNA.

suggest that CD40 engagement could lead to CLL proliferation through miR-22 upregulation followed by PI3K/AKT activation and Survivin overexpression.

Proliferative behavior of CLL B cells from lymph nodes is associated with absence of PTEN expression, activation of PI3K/AKT pathway, downregulation of p27 and high expression of Survivin molecules

We assumed that the proliferative behavior of this PF resulted from downregulation of the PTEN molecule and activation of the PI3K/AKT pathway that in turn induced cell proliferation

underlined by downregulation of p27 and high expression of Survivin proteins. To examine this hypothesis, we studied three different LNs from UM and progressive CLLs by isolating Ki-67-positive and -negative fractions. Next, we evaluated PTEN expression, PI3K/AKT activation (pAKT^{Thr308}) and Survivin and p27 protein expression in both fractions.

The results showed 7–10% Ki-67 positive cells in the three analyzed LNs. Flow cytometry analysis confirmed that almost all of this Ki-67 subset corresponded to the leukemic CD5⁺/CD19⁺ B cells (data not shown). R1 and R2 depict the Ki-67-negative and the Ki-67-positive cells, respectively (Figure 6a). PTEN expression in

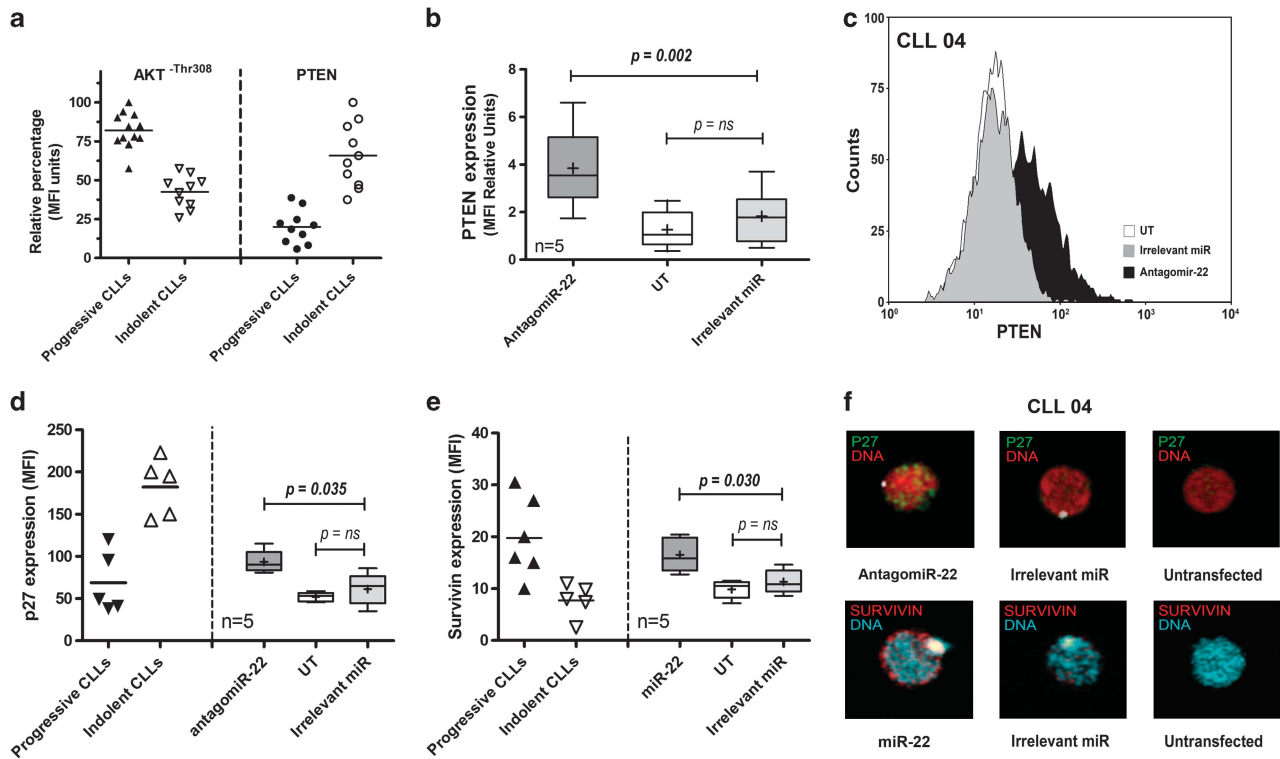


Figure 4. MiR-22 and antagomiR-22 transfection regulates PTEN, p27 and Survivin expression levels. **(a)** Higher phosphorylated AKT^{Thr308} levels are observed in 12 progressive cases (mean = 44 ± 6.6 obtained from samples 01–12 from Table 1) when compared with 10 indolent CLL cases (mean = 24 ± 4.8 obtained from samples 13–22; $P = 0.0059$) after evaluation by flow cytometry. MFIs, mean fluorescence intensities. **(b)** Lower PTEN protein expression is observed by flow cytometry in progressive CLL cases (01–10 from Table 1) when compared with indolent CLL cases (13–22 from Table 1). PTEN protein expression is also depicted after transfection with antagomiR-22, irrelevant miR and untransfected (UT) cells in five progressive CLL cases (01, 03, 04, 09 and 10 from Table 1) with low PTEN expression. Statistical analysis demonstrated a significant increase ($P = 0.002$) in PTEN expression following treatment of CLL B-cells with antagomiR-22 (mean = 3.84 ± 0.48), whereas no differences were observed when these same cells were transfected with irrelevant miR (mean = 1.67 ± 0.33) and with UT control (mean = 1.26 ± 0.23) that did not display significant differences between them ($P = 0.331$). **(c)** Representative histogram of PTEN expression in CLL B cells transfected with antagomiR-22, irrelevant miR and untransfected cells. **(d)** The p27 protein expression was evaluated by confocal microscopy in five progressive CLL cases (01, 03, 04, and 09 and 10 from Table 1) and in 5 indolent CLL cases (13–15 and 17–18 from Table 1). Statistical analysis confirmed that transfection with antagomiR-22 in patients 01, 03, 04, 09 and 10 from Table 1 resulted in overexpression of p27 protein compared with irrelevant and UT cells control ($P = 0.035$, mean = 93.4 ± 5.8 for antagomiR-22, mean = 61.4 ± 8.37 for irrelevant miR and mean = 52.1 ± 2.3 for UT cells). A typical immunoreactive pattern of p27 protein, similar to those observed for the quiescent fraction previously described in Figures 3 and 4, was found. **(e)** Survivin protein expression evaluated by confocal microscopy in six progressive CLL cases (01, 02, 04, 07, 10 and 12 from Table 1) and in five indolent CLL cases (13–15 and 17–18 from Table 1). Survivin protein expression after transfection with miR-22, irrelevant miR and UT cells of five progressive CLL cases (CLLs 01, 02, 04, 07 and 12). Survivin expression was upregulated at significant levels ($P = 0.030$, mean = 15.3 ± 1.2) when compared with those transfected with irrelevant miR (mean = 11.3 ± 1.0). No significant differences ($P = 0.093$) were found among irrelevant miR and UT cells. ($P = ns$), statistically nonsignificant data. **(f)** Confocal microscopy of Survivin (red), p27 (green) and transfected cell (miR-22, antagomiR-22 and Irrelevant miR, white) are depicted in a representative sample obtained from the CLL patient number 04 after transfection with antagomiR-22, miR-22, irrelevant miR and untransfected cells.

R1 exhibited a similar profile to that of the QF obtained from UM CLL patients, whereas low or no expression was found in fraction R2 (Figure 6b). In the three analyzed LNs, we found that the Ki-67-positive fraction was enriched in cells that express pAKT^{Thr308}, whereas the nonphosphorylated AKT form predominated in the Ki-67-negative fraction (Figure 6c). Interestingly and supporting our initial hypothesis, we found that the R2 fraction expresses high Survivin levels and low or absent p27 expression (Figures 6d and e, respectively).

Despite the fact that we could not study miR-22 expression in these samples because we were unable to obtain enough RNA, we could demonstrate that the PF from different LNs is also associated with low PTEN expression, PI3K/AKT activation, Survivin expression and p27 downregulation. Altogether, these results confirm the importance of the PI3K/AKT pathway in the proliferative subset of CLL and suggest that a similar regulatory

loop involving PTEN/AKT/FOXO1 pathway could be relevant in an *in vivo* scenario in these UM CLL patients.

DISCUSSION

PI3K signaling pathway is a key signaling molecule in the relationship between CLL cells and the microenvironment. It mediates the transmission of signals from membrane receptors such as B-cell receptor, CXCR4 and CD40.²⁹ The main negative regulator of the PI3K/AKT pathway is PTEN,³⁰ whereas another important protein family involved in the AKT signaling are the FoxO transcription factors. When PTEN is active and AKT activity suppressed, FoxO proteins are able to enter the nucleus and upregulate genes such as p27, promoting cell cycle arrest.^{21,31} Overexpression of miR-22 has been recently proposed to regulate the PTEN/AKT/FOXO1.²¹

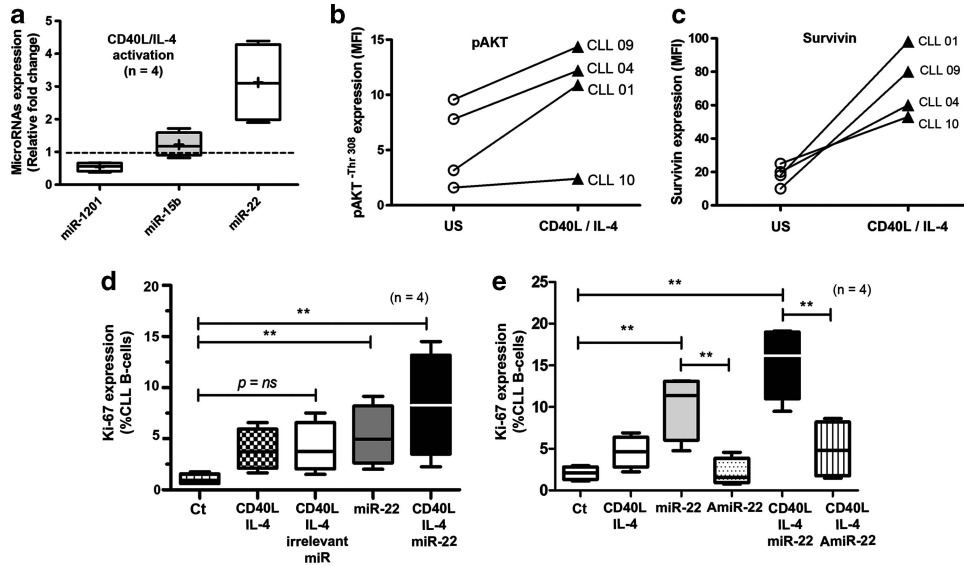


Figure 5. CD40 engagement induces miR-22 expression, activation of AKT pathway, Survivin expression and CLL proliferation. (a) The miR-1201, miR-15b and miR-22 fold change expression of CD40L/IL-4-stimulated cells from four CD40 responder patients (CLLs 01, 04, 09 and 10 in Table 1) compared with that of unstimulated ones. (b, c) The pAKT^{Thr308} and Survivin protein expression evaluated by flow cytometry and confocal microscopy respectively in the same unstimulated (US) and CD40L/IL-4-stimulated, CD40 responder patients. MFIs, mean fluorescence intensities. (d) Cell percentage expressing Ki-67 marker was evaluated by flow cytometry in CLL B cells from four indolent cases that respond to CD40 stimulation (13, 16, 20 and 22 in Table 1). Ki-67 expression was evaluated after CD40L/IL-4 stimulation, miR-22 transfection and stimulation with CD40L/IL-4 followed by miR-22 or irrelevant miR transfection. Ct, unstimulated and untransfected cells. (e) Ki-67 expression evaluated by flow cytometry in CLL B cells of four progressive cases. CD40 responder patients, CLLs 01, 04, 09 and 10 in Table 1, were evaluated for Ki-67 expression as proliferative marker. Percentage of positives Ki-67 CLL B cells was evaluated after CD40L/IL-4 stimulation, miR-22 transfection and miR-22 plus CD40L/IL-4 stimulation. In addition, antagomiR-22 transfection and antagomiR-22 plus CD40L/IL-4 stimulation were carried out as specificity controls. AntagomiR-22 = AmiR-22 (**)= statistically significant differences ($P < 0.05$).

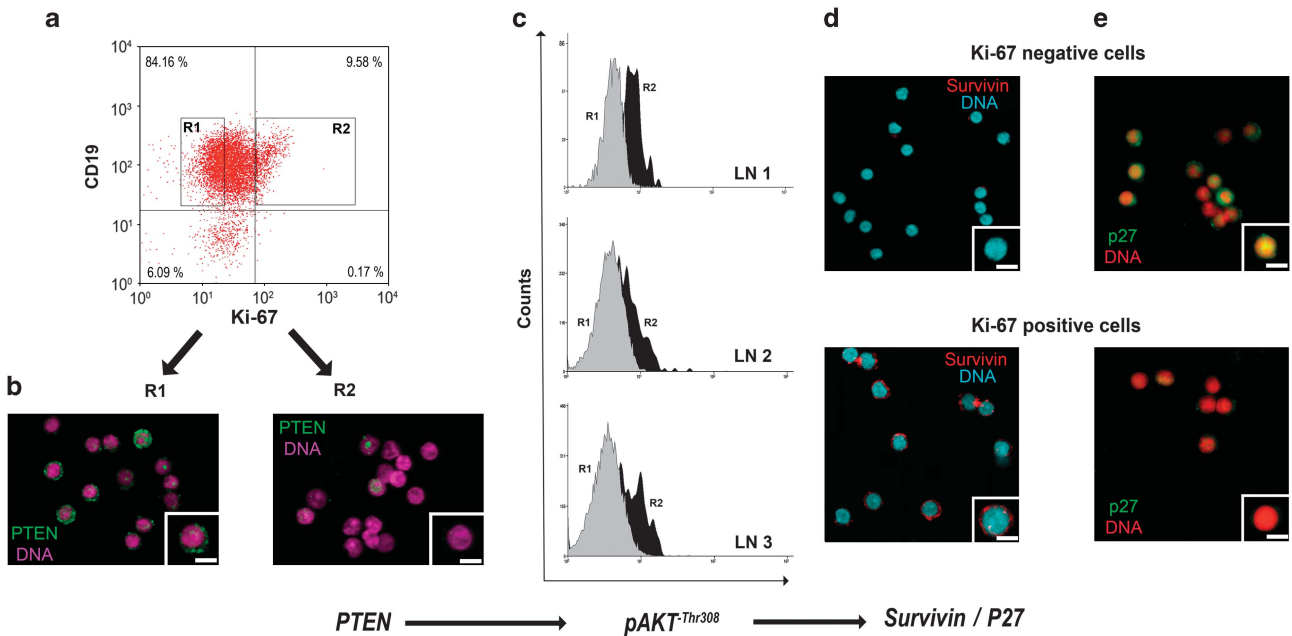


Figure 6. Isolation of Ki-67-positive and -negative fractions from B-cell CLL LNs highlight activation of PTEN/AKT cascade, Survivin expression and downregulation of p27 protein. (a) Representative dot plot of CD19 and Ki-67 protein expression in the LN of an UM CLL patient. R1 and R2 show the gates settled for the sorting of negative and positive Ki-67 cells. (b) PTEN protein expression evaluated by confocal microscopy in Ki-67-negative and -positive cells from a representative LN. Green: PTEN, magenta: DNA. Scale bar: 5 μ m. (c) Flow cytometry histograms depicting expression of pAKT^{Thr308} expression in Ki-67-negative (R1, gray) and Ki-67-positive (R2, black) CLL B cells. (d, e) Characterization of the expression levels of Survivin (left panels) and p27 (right panels) by confocal microscopy in the Ki-67-negative and Ki-67-positive CLL B cells from a representative LN. Scale bar: 5 μ m.

Understanding the crosstalk between malignant B cells and their milieu could give us new keys on the cellular and molecular biology of CLL.⁶ Our group succeeded in identifying a small PF

associated with a clinical poor outcome in a fraction of UM patients that is characterized by an active class switch recombination process and AID expression.¹⁰ The present work addresses the

genomic and the molecular characterization of this subset, provides novel information about the proliferative behavior of these leukemic cells and suggests that miR-22 plays a key role in the proliferation mediated by AKT pathway in CLL. Genomic characterization at the mRNA and microRNA levels of the PF showed that AKT signaling pathway is active in this leukemic subset and that miR-22 is the most overexpressed microRNA. As previous work suggested that miR-22 regulates the signaling kinetics of PTEN/AKT/FOXO1 pathway²¹ leading to tumor proliferation,^{32,33} we speculated whether a similar pathway could take place in the leukemic PF of these patients. Our results showed that upregulation of miR-22 is associated with low PTEN expression at the mRNA and protein levels, and the pAKT^{Thr308} form is increased in the PF compared with the QF of the same patients.

Recent work investigated PTEN/AKT signaling in CLL,^{34–36} but only few evidence concerning FoxO proteins expression in this leukemia is available.^{37,38} As cytoplasmic localization of FoxO proteins is a hallmark of AKT activity,²⁷ we proceeded to evaluate the FOXO1 protein localization in the PF and QF. As reported in other tumoral cells,^{23,39} our results clearly showed that FOXO1 protein was mostly translocated to the cytoplasmic compartment in the PF of UM patients. These results are in agreement with previous evidences linking miR-22 overexpression, inhibition of PTEN, PI3K/AKT pathway activation and cancer proliferation.⁴⁰ FoxO proteins are also associated with cell cycle arrest by downregulating the p27 protein.^{23,26,39,41} As mRNA array analysis displayed low and high expression of p27 and Survivin respectively (Figure 3), and as it has been described that p27 is overexpressed in the QF of CLL,^{10,11} we evaluated the differential expression pattern of these proteins as well as whether this expression was related with PTEN/AKT/FOXO1 pathway activation. Results showed that in the PF, p27 protein is downregulated and Survivin molecule overexpressed (Figure 5). Assuming that microenvironment interactions trigger Survivin expression⁹ and also downregulate p27 molecule,⁴² our results suggest that regulation of these two key molecules might be dependent on an activated PTEN/AKT/FOXO1 pathway and play an important role in the leukemic proliferation. Results from transfection experiments with miR-22 and its specific antagomiR favor the view that miR-22 expression could play a role in PI3K/AKT activation through PTEN downregulation and suggest that this pathway is responsible for Survivin overexpression and p27 downregulation. In this line, previous results from Shehata *et al.*³⁴ and Martins *et al.*⁴³ suggest that reconstitution of PTEN activity in CLL is able to counteract the anti-apoptotic and proliferative behavior of AKT signaling.

The proliferating centers from LN and BM support leukemic cell accumulation and favor tumor-growing conditions.² In this sense, our results suggest that, at least in part, CD40 engagement could be responsible for miR-22 overexpression, activation of PTEN/AKT/Survivin pathway and CLL B-cell proliferation. Supporting these remarks, some reports suggest that CD40L is responsible for the AKT activation signaling,^{44,45} whereas others have demonstrated that PI3K regulates Survivin through AKT activation.^{46–48} Altogether, these data confirm previous results⁹ showing that the proliferative behavior of some CLL B cells triggered by CD40 engagement is associated with Survivin and Ki-67 expression, but in addition propose that this proliferative potential is dependent on miR-22 overexpression and an activated PI3K/AKT pathway. Finally, the relevance of these data is supported by the *in vivo* results obtained from the LNs of three different UM and progressive CLL cases.

A recent study comparing gene expression profiling of PB to that of LN and BM tumoral cells identified LN as a key site for proliferation.⁴⁹ CLL cells in the LN showed upregulation of gene signatures (E2F, c-MYC and Ki-67 overexpression) indicating B-cell receptor and nuclear factor- κ B activation. The proliferative subset (IgG⁺, Ki-67⁺, AID⁺) described by our group displays very similar

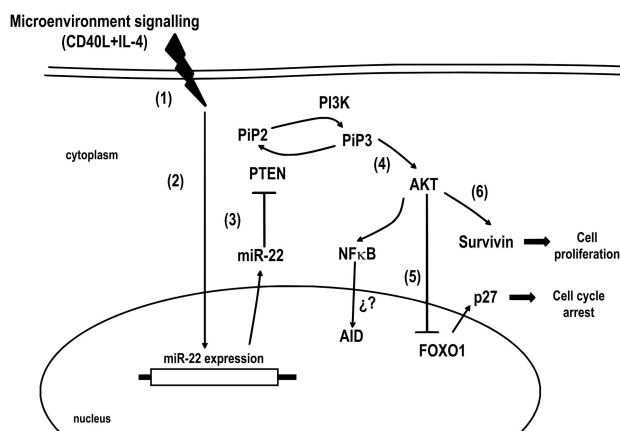


Figure 7. Hypothetical model proposed to explain the proliferative behavior of CLL subsets in UM progressive patients. (1, 2) The miR-22 expression is induced after CD40 engagement following interaction of B-cell CLL with the tumoral microenvironment of secondary lymphoid organs. (3) The miR-22 downregulates PTEN and the PI3K phosphorylates and converts PIP2 to PIP3 that recruits and activates PDK1. (4) PDK1 phosphorylates and activates the threonine protein kinase AKT (pAKT^{Thr308}) that inhibits the activities of the transcription factor FOXO1. (5) Inactivation of FOXO1 leads to downregulation of proteins involved in cell-cycle arrest like p27. (6) Activation of PI3K/AKT cascade triggers Survivin expression that contributes to cell progression and proliferation. AKT could also activate the NF- κ B cascade that in turn might induce AID expression in the proliferative subset of these UM progressive CLL patients.

markers to those found by Herishanu *et al.*⁴⁹ in LN from CLL patients, and unpublished results from our laboratory suggest that this tumoral subset could recently egress toward the PB from a proliferating center in LN or BM. A model aiming to explain the proliferative behavior origin of this PF from progressive UM CLL patients is depicted in Figure 7. In this model, microenvironment signaling triggered by T-dependent signals as CD40L + IL4 could be at the origin of miR-22 overexpression. However, our results cannot exclude the existence of other upstream regulators of this microRNA. In this model, we propose that miR-22 overexpression downregulates PTEN, allowing that PI3K phosphorylates and converts PIP2 to PIP3 that in turn recruits and activates PDK1. Activation of PDK1 phosphorylates and activates the threonine protein kinase AKT (pAKT-Thr308) that inhibits the activities of the transcription factor FOXO1. This inactivation of FOXO1 leads to downregulation of proteins involved in cell-cycle arrest like p27. Furthermore, activation of PI3K/AKT cascade triggers Survivin expression that contributes to cell progression and proliferation. These data are in agreement with recent reports supporting the idea that Survivin acts as a proliferative marker in different hematopoietic cells.^{50–52} Finally, it is also described that AKT activates the NF- κ B cascade that in turn might induce AID expression in this proliferative subset.

Recently, three works by Bar *et al.*,²¹ Liu *et al.*³² and Poliseno *et al.*³³ (reviewed in Xiong⁴⁰) have demonstrated that PTEN was a *bone fide* target of miR-22 and that overexpression of this cascade could lead to cell proliferation via PI3K/AKT pathway. The fact that this microRNA is only expressed in this small PF could explain why its overexpression was not previously reported in CLL.^{4,53} Previous work suggests that optimal B-cell proliferation requires PI3K/AKT pathway activation (reviewed in Rodon *et al.*⁵⁴). However, activation of the PTEN/AKT/FOXO1 cascade by overexpression of miR-22 triggered by CD40 engagement, which in turn regulates p27 and Survivin molecules in CLL, constitutes a novel and original contribution of this work.

Taken together, our data sustain the model of CLL B-cell growth/proliferation and provide conclusive evidence on the role

of microenvironment interactions in the induction of the proliferative pool in CLL. They also underline the physiological importance of maintaining a stringent regulation of the PI3K/AKT pathway and suggest that Survivin overexpression and p27 downregulation are two faces of the same coin that could play a key role in CLL proliferation. Finally, we propose a new proliferative mechanism involving the regulatory loop miR-22/PDEN/AKT/FOXO1 pathway that could be relevant in the maintenance of the CLL proliferative subset in progressive and UM CLL patients.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from ANII: Fondo Clemente Estable (FCE-7273) and Fondo Maria Viña (FMV-7323). This work was partially funded by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina, FOCEM (MERCOSUR Structural Convergence Fund), COF 03/11 and CYTED Program. We thank Dr Alfonso Cayota for his help in the microRNA technologies, the Cell Biology Unit of the Institut Pasteur de Montevideo for their technical assistance in cell sorting analysis and Mrs Ivana Faccini for her helpful assistance with the manuscript correction. We also thank the patients with CLL for their cooperation and help in providing invaluable blood samples for this work.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FP, CA, DP, PM and SR performed experiments and collected CLL samples; TF-C, HN, GL and CR performed microarrays and statistical analysis; ANL, GD and RG performed clinical activities and data collection of CLL patients; PO and GD contributed to scientific design and revised the paper; PO and FP designed research, coordinated the study and data analysis and wrote the paper.

REFERENCES

- Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2008; **371**: 1017–1029.
- Caligaris-Cappio F, Bertilaccio MT, Scielzo C. How the microenvironment wires the natural history of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Cancer Biol* 2013; **24**: 43–48.
- Cho WC. MicroRNAs in cancer - from research to therapy. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1805**: 209–217.
- 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; **353**: 1793–1801.
- Ghia P, Strola G, Granziero L, Geuna M, Guida G, Sallusto F *et al*. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4⁺, CD40L⁺ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 1403–1413.
- Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 2009; **114**: 3367–3375.
- Pepper C, Ward R, Lin TT, Brennan P, Starczynski J, Musson M *et al*. Highly purified CD38⁺ and CD38⁻ sub-clones derived from the same chronic lymphocytic leukemia patient have distinct gene expression signatures despite their monoclonal origin. *Leukemia* 2007; **21**: 687–696.
- Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, Bomben R, Dal Bo M, Marconi D *et al*. CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res* 2009; **69**: 4001–4009.
- Granziero L, Ghia P, Circosta P, Gottardi D, Strola G, Geuna M *et al*. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; **97**: 2777–2783.
- Palacios F, Moreno P, Morande P, Abreu C, Correa A, Porro V *et al*. High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood* 2010; **115**: 4488–4496.
- Sanchez-Beato M, Saez AI, Martinez-Montero JC, Sol Mateo M, Sanchez-Verde L, Villuendas R *et al*. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 in lymphoid tissue: p27KIP1 expression is inversely proportional to the proliferative index. *Am J Pathol* 1997; **151**: 151–160.
- Damle RN, Temburni S, Calissano C, Yancopoulos S, Banapour T, Sison C *et al*. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood* 2007; **110**: 3352–3359.
- Calissano C, Damle RN, Marsilio S, Yan XJ, Yancopoulos S, Hayes G *et al*. Intracloonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Mol Med* 2011; **17**: 1374–1382.
- Oppezzo P, Vuillier F, Vasconcelos Y, Dumas G, Magnac C, Payelle-Brogard B *et al*. Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display a dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood* 2003; **9**: 9.
- Oppezzo P, Dumas G, Lalanne AI, Payelle-Brogard B, Magnac C, Pritsch O *et al*. Different isoforms of BSAP regulate expression of AID in normal and chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2005; **105**: 2495–2503.
- Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH *et al*. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994; **8**: 1640–1645.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S *et al*. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004; **5**: R80.
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT *et al*. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**: e179.
- Moreno P, Abreu C, Borge M, Palacios F, Morande P, Pegazzano M *et al*. Lipoprotein lipase expression in unmutated CLL patients is the consequence of a demethylation process induced by the microenvironment. *Leukemia* 2013; **27**: 721–725.
- Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L *et al*. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1910–1916.
- Bar N, Dikstein R. miR-22 forms a regulatory loop in PTEN/AKT pathway and modulates signaling kinetics. *PLoS One* 2010; **5**: e10859.
- Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ, Heerema NA, Zhao W, Flynn JM *et al*. Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* 2010; **116**: 2078–2088.
- Stahl M, Dijkers PF, Kops GJ, Lens SM, Coffey PJ, Burgering BM *et al*. The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol* 2002; **168**: 5024–5031.
- Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 2000; **404**: 782–787.
- Vrhovac R, Delmer A, Tang R, Marie JP, Zittoun R, Ajchenbaum-Cymbalista F. Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood* 1998; **91**: 4694–4700.
- Chakrabarty A, Bhola NE, Sutton C, Ghosh R, Kuba MG, Dave B *et al*. Trastuzumab-resistant cells rely on a HER2-PI3K-FoxO-survivin axis and are sensitive to PI3K inhibitors. *Cancer Res* 2013; **73**: 1190–1200.
- Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 2005; **24**: 7410–7425.
- Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Petlickovski A, Pelosi M, Chiusolo P *et al*. 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**: 110–120.
- 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; **111**: 846–855.
- Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 184–192.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS *et al*. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; **96**: 857–868.
- Liu L, Jiang Y, Zhang H, Greenlee AR, Yu R, Yang Q. miR-22 functions as a micro-oncogene in transformed human bronchial epithelial cells induced by anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide. *Toxicol In Vitro* 2010; **24**: 1168–1175.
- Poliseno L, Salmena L, Riccardi L, Fornari A, Song MS, Hobbs RM *et al*. Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation. *Sci Signal* 2010; **3**: ra29.
- Shehata M, Schnabl S, Demirtas D, Hilgarth M, Hubmann R, Ponath E *et al*. Reconstitution of PTEN activity by CK2 inhibitors and interference with the PI3-K/Akt cascade counteract the antiapoptotic effect of human stromal cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010; **116**: 2513–2521.
- Lupp S, Gumhold C, Ampofo E, Montenarh M, Rother K. CK2 kinase activity but not its binding to CK2 promoter regions is implicated in the regulation of CK2alpha and CK2beta gene expressions. *Mol Cell Biochem* 2013; **384**: 71–82.
- Zou ZJ, Zhang R, Fan L, Wang L, Fang C, Zhang LN *et al*. Low expression level of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten predicts poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013; **54**: 1159–1164.

- 37 Xie L, Ushmorov A, Leithauser F, Guan H, Steidl C, Farbinger J *et al*. FOXO1 is a tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2012; **119**: 3503–3511.
- 38 Essafi M, Baudot AD, Mouska X, Cassuto JP, Ticchioni M, Deckert M. Cell-penetrating TAT-FOXO3 fusion proteins induce apoptotic cell death in leukemic cells. *Mol Cancer Ther* 2011; **10**: 37–46.
- 39 Ho WC, Pikor L, Gao Y, Elliott BE, Greer PA. Calpain 2 regulates Akt-FoxO-p27(Kip1) protein signaling pathway in mammary carcinoma. *J Biol Chem* 2012; **287**: 15458–15465.
- 40 Xiong J. Emerging roles of microRNA-22 in human disease and normal physiology. *Curr Mol Med* 2012; **12**: 247–258.
- 41 Koff A. How to decrease p27Kip1 levels during tumor development. *Cancer Cell* 2006; **9**: 75–76.
- 42 Frenquelli M, Muzio M, Scielzo C, Fazi C, Scarfo L, Rossi C *et al*. MicroRNA and proliferation control in chronic lymphocytic leukemia: functional relationship between miR-221/222 cluster and p27. *Blood* 2010; **115**: 3949–3959.
- 43 Martins LR, Lucio P, Silva MC, Anderes KL, Gameiro P, Silva MG *et al*. Targeting CK2 overexpression and hyperactivation as a novel therapeutic tool in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010; **116**: 2724–2731.
- 44 Benson RJ, Hostager BS, Bishop GA. Rapid CD40-mediated rescue from CD95-induced apoptosis requires TNFR-associated factor-6 and PI3K. *Eur J Immunol* 2006; **36**: 2535–2543.
- 45 Tai YT, Li X, Tong X, Santos D, Otsuki T, Catley L *et al*. Human anti-CD40 antagonist antibody triggers significant antitumor activity against human multiple myeloma. *Cancer Res* 2005; **65**: 5898–5906.
- 46 Zhao P, Meng Q, Liu LZ, You YP, Liu N, Jiang BH. Regulation of survivin by PI3K/Akt/p70S6K1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **395**: 219–224.
- 47 Asanuma H, Torigoe T, Kamiguchi K, Hirohashi Y, Ohmura T, Hirata K *et al*. Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Res* 2005; **65**: 11018–11025.
- 48 Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, Kalb RG, O'Connor DS, Li F *et al*. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J Biol Chem* 2000; **275**: 9102–9105.
- 49 Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B *et al*. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; **117**: 563–574.
- 50 Fukuda S, Singh P, Moh A, Abe M, Conway EM, Boswell HS *et al*. Survivin mediates aberrant hematopoietic progenitor cell proliferation and acute leukemia in mice induced by internal tandem duplication of Flt3. *Blood* 2009; **114**: 394–403.
- 51 Li C, Yan Y, Ji W, Bao L, Qian H, Chen L *et al*. OCT4 positively regulates Survivin expression to promote cancer cell proliferation and leads to poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2012; **7**: e49693.
- 52 Martinez A, Bellosillo B, Bosch F, Ferrer A, Marce S, Villamor N *et al*. Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. *Am J Pathol* 2004; **164**: 501–510.
- 53 Marton S, Garcia MR, Robello C, Persson H, Trajtenberg F, Pritsch O *et al*. Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis. *Leukemia* 2008; **22**: 330–338.
- 54 Rodon J, Dienstmann R, Serra V, Taberero J. Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; **10**: 143–153.

Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

HSP90 inhibitors decrease AID levels and activity in mice and in human cells

*Damien Montamat-Sicotte*¹, *Ludivine C Litzler*^{1,2}, *Cecilia Abreu*³,
Shiva Safavi^{1,4}, *Astrid Zahn*¹, *Alexandre Orthwein*¹, *Markus Müschen*⁵,
*Pablo Oppezso*³, *Denise P Muñoz*⁶ and *Javier M Di Noia*^{1,2,4,7}

¹ Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Canada

² Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

³ Research Laboratory on Chronic Lymphocytic Leukemia, Instituto Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

⁴ Department of Medicine, McGill University, Montréal, QC, Canada

⁵ UCSF Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center, San Francisco, USA

⁶ UCSF Benioff Children's Hospital and Research Institute at Oakland, Oakland, USA

⁷ Department of Medicine and Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montréal, Canada

Activation induced deaminase (AID) initiates somatic hypermutation and class switch recombination of the Ig genes in antigen-activated B cells, underpinning antibody affinity maturation and isotype switching. AID can also be pathogenic by contributing to autoimmune diseases and oncogenic mutations. Moreover, AID can exert noncanonical functions when aberrantly expressed in epithelial cells. The lack of specific inhibitors prevents therapeutic applications to modulate AID functions. Here, we have exploited our previous finding that the HSP90 molecular chaperoning pathway stabilizes AID in B cells, to test whether HSP90 inhibitors could target AID *in vivo*. We demonstrate that chronic administration of HSP90 inhibitors decreases AID protein levels and isotype switching in immunized mice. HSP90 inhibitors also reduce disease severity in a mouse model of acute B-cell lymphoblastic leukemia in which AID accelerates disease progression. We further show that human AID protein levels are sensitive to HSP90 inhibition in normal and leukemic B cells, and that HSP90 inhibition prevents AID-dependent epithelial to mesenchymal transition in a human breast cancer cell line *in vitro*. Thus, we provide proof-of-concept that HSP90 inhibitors indirectly target AID *in vivo* and that endogenous human AID is widely sensitive to them, which could have therapeutic applications.

Keywords: Activation induced deaminase (AID). Antibody response. Class switch recombination. HSP90 inhibitors. Leukemia



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Introduction

The humoral immune response generates high affinity antibodies to neutralize invading antigens, as well as different classes of

antibodies (IgM, IgG, IgA, IgE) that impart specialized biological functions. Both these characteristics of the antibodies require the enzyme Activation Induced Deaminase (AID) [1]. AID underpins antibody affinity maturation by introducing point mutations over the V region of the Ig genes in antigen-activated B cells, via the mechanism of somatic hypermutation (SHM) [2]. B cells harboring mutations resulting in higher affinity antibodies are selected

Correspondence: Dr. Javier M Di Noia
e-mail: javier.di.noia@ircm.qc.ca

during the germinal center reaction [3]. AID also initiates the DNA breaks that trigger class switch recombination (CSR), a rearrangement that replaces the *Igh* exons encoding for IgM for those encoding another isotype [1, 4].

Affinity maturation and isotype switching play important roles in autoimmune diseases and AID can thereby contribute to pathogenesis. AID levels correlate with pathogenic autoantibodies in mouse autoimmune arthritis [5] and MRL^{lpr/lpr} mice, a model of systemic lupus erythematosus (SLE) in which AID function contributes to nephritis [6–8]. Human patients with rheumatoid arthritis and SLE also show higher levels of AID and this is associated to a worst disease [9, 10]. In this context, AID inhibition could be therapeutic but no specific inhibitor is available.

AID has oncogenic side effects that are intrinsically associated with the mechanisms of SHM and CSR. AID overexpression is oncogenic [11, 12] but normal levels of AID can also mutate and induce chromosomal translocations affecting oncogenes and tumor suppressors [13, 14]. AID is most likely etiological in the GC-derived B-cell neoplasms diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt's lymphoma (BL) [14, 15]. AID is also expressed in non GC-derived hematological malignancies such as chronic myelogenous leukemia (CML) [16], B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) [17, 18] and, chronic lymphocytic leukemia (CLL) [19–21]. In these leukemia, AID favors disease progression and correlates with poorer outcome [16, 17, 22–24]. Hence, also in this context, AID inhibition could have therapeutic value [25].

Some human epithelial cancers express AID [26], albeit it only seems to produce substantial numbers of mutations in neoplasms of B-cell origin [27]. Nevertheless, AID could still contribute to the progression of certain epithelial cancers through noncanonical functions such as DNA demethylation and transcriptional regulation [28]. Indeed, low levels of AID expression can influence epigenetic reprogramming of pluripotent cells and alter the gene expression profile in human fibroblasts [28, 29]. We have shown that AID is necessary for the cytokine-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in mammary epithelial cell lines: ZR75.1 breast cancer cells depleted of AID fail to upregulate genes required for the EMT and lose metastatic characteristics i.e.: the ability to invade and migrate under EMT-inducing conditions [30]. While the mechanism/s of these noncanonical functions of AID are unknown and their biological relevance is controversial, these evidences indicate that AID has at least the capacity to influence gene expression in certain settings [28]. Thus, inhibiting AID expressed in epithelial malignancies could also have therapeutic value.

Multiple mechanisms regulate AID to permit optimal antibody diversification while minimizing pathological side-effects [31, 32]. Controlling AID protein stability is an important regulatory instance [31]. We have shown that AID interacts with HSP90 and that treating human and mouse B-cell lines with HSP90 inhibitors leads to ubiquitin-dependent proteasomal degradation of endogenous and transfected AID in the cytoplasm [33]. Since 90% of AID is cytoplasmic [34], inhibiting the HSP90 molecular chaperoning pathway causes a dose-responsive decrease in the cellular AID levels through protein destabilization, and reduces SHM and CSR in vitro [33, 35]. HSP90 inhibitors show promising

clinical activity against various cancers [36, 37] and have gone through security, toxicity and bioavailability tests in animals and humans; providing a practical possibility for targeting AID in vivo. It is also important to determine whether they affect AID and the antibody response to better evaluate the outcome of those clinical trials. Here, we provide evidence that AID protein levels and activity can be reduced in vivo by the HSP90 inhibitor 17-DMAG, currently in clinical trials [38–41]. We additionally show that AID levels in normal and cancerous human B cells, as well as the noncanonical functions of AID in epithelial cells, are sensitive to HSP90 inhibition.

Results

The HSP90 inhibitor 17-DMAG reduces AID levels in vivo

AID is not constitutively expressed in B cells but induced in the GC [42]. Naïve B cells display a wide repertoire of random antibody specificities and only a few respond to any given antigen [3]. Thus, only ~2–4% of the splenic B cells express AID after immunization, which is not sufficient for analyzing AID protein levels by western blot. To circumvent this limitation, we used the reporter mouse model AID-GFPtg, which carries a bacterial artificial chromosome including the whole mouse *Aicda* locus with GFP knocked-in as an in-frame C-terminal fusion [42]. AID-GFPtg mice have been extensively characterized: AID-GFP displays identical gene expression regulation and tissue specificity than endogenous AID and complements AID-deficiency [42, 43]. This mouse line allows directly monitoring AID-GFP in primary B cells by flow cytometry, with the MFI of GFP being proportional to the protein levels. We have shown that human AID and AID-GFP are similarly sensitive to the HSP90 inhibitors geldanamycine and its derivative 17-AAG, while GFP itself is insensitive [33]. In AID-GFPtg mice, the mouse AID-GFP protein, which is 2.5-fold more abundant than endogenous AID, was sensitive to 17-AAG (Fig. 1A), without affecting *Aicda* mRNA levels (Supporting Information Fig. 1A). For in vivo work, we used the 17-AAG analog 17-DMAG, of identical mechanism of action [36], because it is water soluble, shows low toxicity, and has better bioavailability than 17-AAG when administered orally, with widespread tissue distribution [38].

We immunized AID-GFPtg mice with 4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl-Chicken Gamma Globulin (NP-CGG) and three days later administered 50 mg/kg of 17-DMAG by gavage twice a day, for two days. Analysis of splenic cells showed that AID-GFP levels were reduced by ~40% in the 17-DMAG-compared to the vehicle-treated mice, as judged by the MFI of GFP⁺ B cells (Fig. 1B and supporting information Fig. 1B). This 17-DMAG dose and regime slightly reduced the proportion of B cells found in the spleen (Fig. 1C) but indicated that it was possible to consistently decrease AID levels in vivo through HSP90 inhibition. We repeated the experiment using 20 mg/kg 17-DMAG administered only once, daily. While two days treatment did not significantly reduce AID-GFP levels (data not shown), by

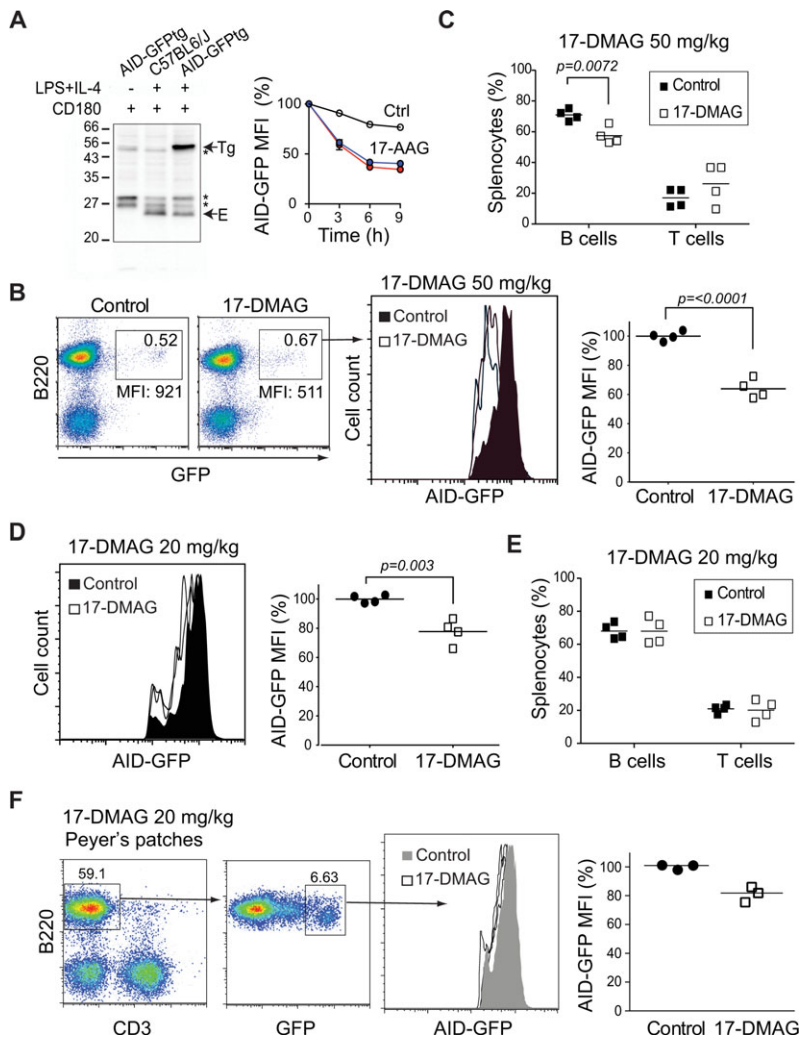


Figure 1. HSP90 inhibition reduces AID levels in germinal center B cells. **A. Left,** Western blot probed with an anti-AID antibody recognizing both endogenous AID (E) and AID-GFP (Tg) in C57BL/6J or AID-GFPtg splenic B cells activated with anti-CD180, which induces proliferation, with and without IL-4 and LPS, which induce AID expression. Asterisks indicate nonspecific bands that serve as loading controls. One representative blot out of two experiments is shown. **Right,** Purified naïve B cells from AID-GFPtg mice were stimulated with LPS + IL-4 and 48 h later (t0) treated with DMSO (Ctrl) or 2 μ M (blue) or 8 μ M (red) 17-AAG. The level of AID-GFP was determined by flow cytometry at various time points and plotted normalized to t0=100%. Means + SEM of two mice each from a single experiment are plotted. **B.** AID-GFPtg mice were treated with 50 mg/kg 17-DMAG or water twice a day for 2 days starting at day 3 postimmunization with 100 μ g of NP-CGG and splenocytes analyzed at day 5 postimmunization. **Left:** One representative flow cytometry dot plot is shown. **Middle,** overlapping histograms of GFP MFI of B220+ GFP+ cells. **Right,** MFI values normalized to the average MFI of control mice set as 100% for four mice from two independent experiments. Each dot represents one mouse, bars show means. **C.** The proportion of B and T cells in the spleen of the four mice from (B) was determined by flow cytometry. Each dot represents one mouse, bars show means. **D.** Splenic cells from AID-GFPtg mice that were immunized with 25 μ g NP-CGG and 72 h later treated with 20 mg/kg 17-DMAG or water vehicle, once daily. AID-GFP levels were determined by flow cytometry at day 11 postimmunization as in (B). **Left:** One representative histogram out of two independent experiments is shown. **Right:** MFI values normalized to the average MFI of control mice set as 100% for four mice from two independent experiments. Each dot represents one mouse, bars show means. **E.** The proportion of B and T cells in the spleen of the four mice from (D) was determined by flow cytometry. Each dot represents one mouse, bars show means. **F.** Flow cytometry analysis of AID-GFP levels in Peyer's patches B cells from three mice from (D). (B–F) Statistically significant differences are indicated by *p*-values from unpaired two-tailed Student's *t*-test ($\alpha=0.05$).

day 11, this regime reduced the MFI of AID-GFP in immunized mice by 22% (Fig. 1D) without affecting the levels of B220, IgH, or IgL in the same cells (Supporting information Fig. 1C), nor the proportion of splenic B or T cells compared to control mice (Fig. 1E). We also saw a consistent decrease in AID-GFP levels in B cells from chronic GC in the Peyer's patches of the three mice we analyzed for that purpose at day 11 of this regime (Fig. 1F), indicating that 17-DMAG is distributed to other lymphoid tissues as well. This regime showed no signs of toxicity when continued for up to 20 days (data not shown). We conclude that daily oral doses of 17-DMAG at 20 mg/kg can reduce the level of AID protein in mice, without affecting the proportion of splenic B and T cells and is suitable for prolonged treatments.

HSP90 inhibition in vivo reduces AID physiological function

We asked whether the decrease in AID levels caused by HSP90 inhibition in vivo would be sufficient to reduce its biological activ-

ity. To determine the efficiency of isotype switching in vivo, we measured the levels of NP-specific IgG1 production by ELISA in the primary response at day 8 postimmunization [44] of the AID-GFPtg mice that had been immunized with NP-CGG and treated daily with 20 mg/kg 17-DMAG or vehicle from day 3 postimmunization (Fig. 2A, same mice as in Fig. 1D–F). AID-GFPtg mice treated with 17-DMAG showed significantly lower titers of anti-NP-specific IgG1 (Fig. 2B), without affecting the levels of total serum IgG (data not shown). The reduction in anti-NP IgG1 in these mice coincided with decreased AID-GFP levels while B- and T-cell populations were unaffected (Fig. 1D and E). The effect of 17-DMAG was not restricted to AID-GFPtg mice; treating immunized C57BL/6J mice led to a similar decrease in total anti-NP-specific IgG1 titers (Fig. 2C and D). In contrast, anti-NP IgM titers were not significantly different, serving as control of similar immunization levels in all mice and showing that 17-DMAG did not cause a general depression in the antibody response; i.e. antigen-specific IgM was unaffected and even showed an upwards trend (Fig. 2D), as it would be expected from inhibiting CSR. B- and T-cell populations in C57BL/6J were unaffected by

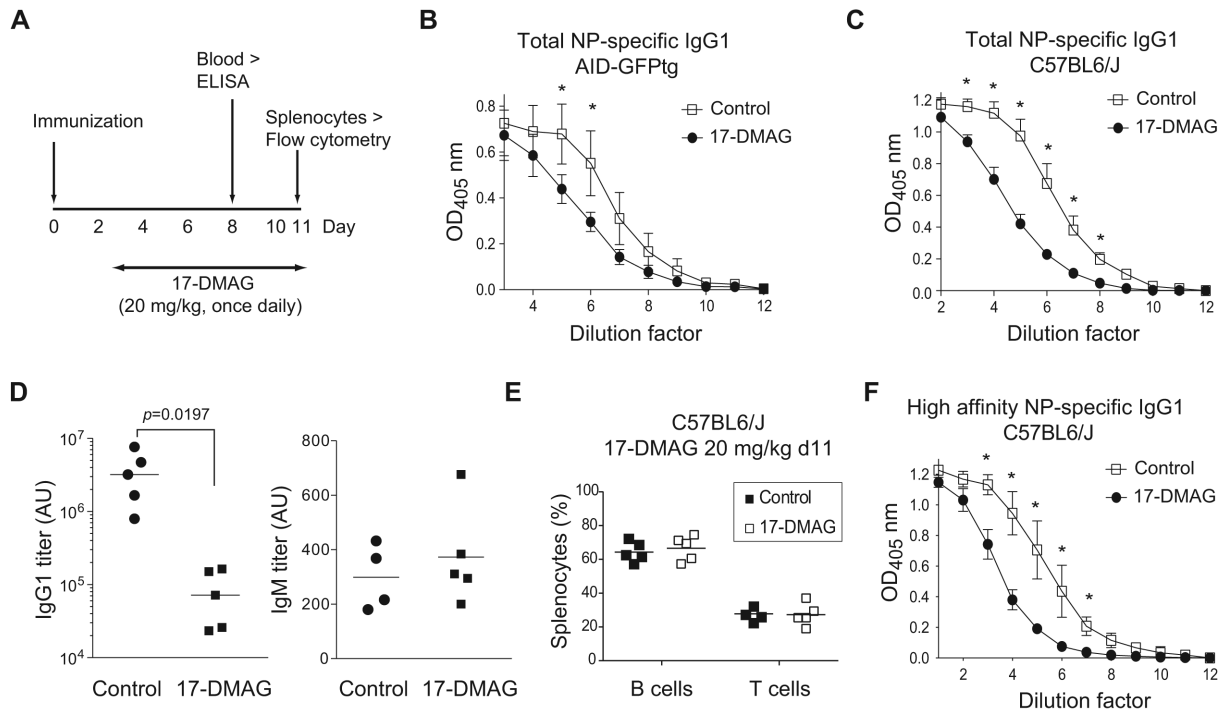


Figure 2. HSP90 inhibitors reduce isotype switching in vivo. A. Scheme of the experiments. B. AID-GFPtg mice were immunized with 25 μ g NP-CGG and treated with 17-DMAG or water as in (A), and total anti-NP-specific IgG1 in the serum was measured by ELISA at day 8 using NP₂₅-BSA for capture. The mean \pm SD of the OD values for four mice per group compiled from two experiments are plotted at various dilutions. C. C57BL/6 mice were immunized, treated, and analyzed as in (A,B) and total anti-NP-specific IgG1 was measured by ELISA at day 8. The mean \pm SD of the OD values for 4–6 mice per group compiled from 2 experiments are plotted at various dilutions. D. Titers of total anti-NP IgG1 and anti-NP IgM in arbitrary units (AU) were calculated as the dilution factor for OD₅₀ for the mice from (C) mice from ELISA curves performed as in (C). Each dot represents a mouse from 4–6 mice per group compiled from 2 experiments, bars show means. Statistically significant differences are indicated by *p*-values from unpaired two-tailed Student's *t*-test ($\alpha=0.05$). E. The proportion of B and T cells in the spleen of the mice from (C) was determined by flow cytometry. Each dot represents one mouse out of 4–5 mice from two independent experiments, bars show means. F. High affinity anti-NP-specific IgG1 was measured in the serum of the mice from (C) by ELISA using NP₄-BSA for capture. The mean \pm SD of the OD values for 4–6 mice per group compiled from 2 experiments are plotted at various dilutions. (B, C, F) Control and 17-DMAG curves were significantly different by Wilcoxon test ($p<0.05$). Individual dilutions were compared by *t*-test corrected for multiple comparisons by the Holm–Sidak method. Asterisks denote significant differences ($p<0.05$).

20 mg/kg 17-DMAG at day 11 postimmunization (Fig. 2E). The level of high-affinity anti-NP IgG1 was also reduced (Fig. 2F). We did not detect a significant effect on their affinity using the NaSCN ELISA method (data not shown), which is not surprising since the antibody response against NP is clonally restricted and high affinity can be achieved through a single point mutation [44, 45]. We conclude that oral administration of 17-DMAG is sufficient to significantly reduce CSR in vivo, at least in part by reducing AID protein levels.

Targeting of AID in a leukemia model by HSP90 inhibition

To ask whether HSP90 inhibition would also affect AID in leukemic cells, we used a B-ALL model in which BM cells from donor mice are transformed in vitro by the oncogenic kinase BCR-ABL1 and transplanted into recipient mice, which develop leukemia within 4–6 weeks. AID is an important disease progression factor in this model [17]. We cultured BM cells from either WT or *Aicda*^{-/-}

mice with IL-7 and Flt3L to promote differentiation to the B-cell lineage and infected them with a retroviral vector encoding BCR-ABL1^{p210} and GFP as marker (Fig. 3A). The presence of BCR-ABL1 induced the expression of AID in WT BM cells to \sim 10% of the mRNA levels present in cytokine-activated splenic B cells (Fig. 3B). We transplanted the transformed cells into lymphocyte-deficient NOD.Rag1KO.IL2R γ CKO (NRG) mice and followed up the development of clinical signs. Mice were sacrificed when paralyzed or moribund and analyzed. Leukemia derived from *Aicda*^{-/-} BM cells was significantly less aggressive than leukemia derived from WT BM cells (Fig. 3C), indicating that the relatively low AID expression detected in WT cells was sufficient to cause a more aggressive disease in this model. Leukemic cells were of B-cell lineage, as shown by B220 expression, and were found in multiple organs including blood, BM, spleen, and brain (Fig. 3D and Supporting Information Fig. 2). Importantly, leukemic cells derived from WT BM continued to express low levels of AID at the time of euthanasia (Fig. 3E). Treatment with 17-DMAG for 20 days significantly increased the survival of mice with AID⁺ leukemia (Fig. 3C). We expected that 17-DMAG would also improve survival of mice bearing *Aicda*^{-/-}

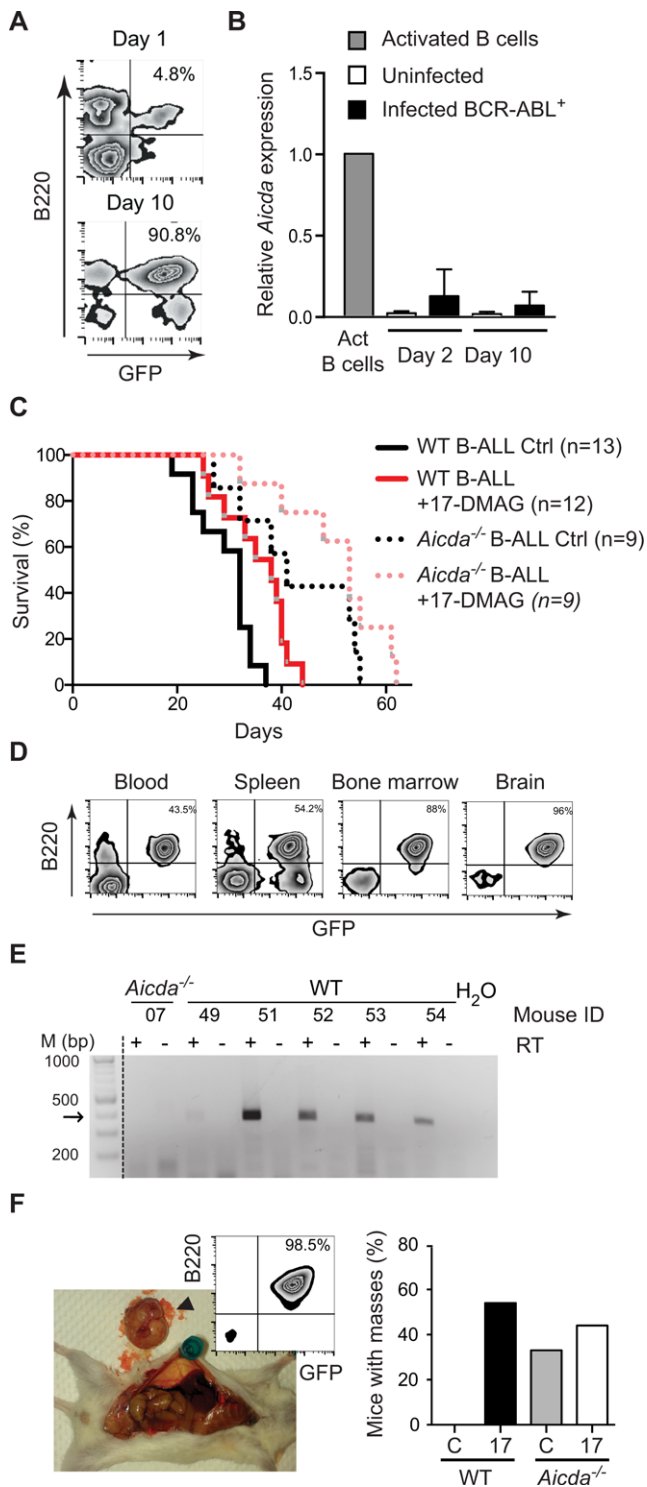


Figure 3. HSP90 inhibition delays AID+ B-ALL in mice. A, B. BM cells from C57BL6/J mice were cultured with IL-7 and Flt3L and infected with a retrovirus encoding BCR-ABL1-ires-GFP. A. Cells were stained with anti-B220 and analyzed by flow cytometry for GFP expression at days 1 and 10 postinfection. One representative plot out of three independent experiments is shown. B. *Aicda* expression levels were determined by qRT-PCR and normalized to *Hprt* expression within each sample. Results are shown relative to *Aicda* expression in mouse splenic B cells activated for 24 h with LPS and IL-4. Means + SEM of 2 samples per time point from two independent experiments are shown. C. Overall survival of NRG mice transplanted with C57BL6/J (WT) or *Aicda*^{-/-} BM

leukemia because HSP90 is required for cell growth [37] and we indeed observed such a trend (Fig. 3C). However, the difference with the untreated mice did not reach statistical significance suggesting that the effect of 17-DMAG on *Aicda*^{-/-} leukemia was relatively less robust than on the WT leukemia. Moreover, upon necropsy, we noticed that NRG mice transplanted with *Aicda*^{-/-} leukemia developed visible masses, typically one at the MLN or close to the spine or two symmetrical masses in the legs, which were not found in mice with WT leukemia in these experiments (Fig. 3F). Flow cytometry showed that these masses were just a local accumulation of leukemic GFP⁺ cells (Fig. 3F). We posit that since *Aicda*^{-/-} leukemia is less aggressive, it simply allowed time for the formation of the masses we observed. Interestingly, treating the NRG mice bearing WT leukemia with 17-DMAG led to the appearance of similar masses (Fig. 3F). We conclude that AID⁺ leukemia are at least equally sensitive to HSP90 inhibitor and that the destabilizing effect of 17-DMAG on AID could also produce qualitative changes, in this case, visible as masses that seem to correlate with a relatively more benign disease.

Human AID is sensitive to HSP90 inhibition in normal and cancerous B cells

To complement our preclinical analysis of AID destabilization by HSP90 inhibition, we tested the sensitivity of AID to HSP90 inhibition in normal and cancerous human B cells. We analyzed B cells freshly isolated from tonsils or PBMCs from six healthy donors, which were activated with CD40L and IL-4 to induce AID expression. AID protein levels were reduced by 30–80% by the treatment with 17-AAG (Fig. 4A). To analyze the sensitivity of AID to HSP90 inhibition in human malignancies, we first analyzed three BL B-cell lines that constitutively express AID. AID protein was reduced by ~30–50% by 17-AAG in these BL lines when analyzed by either western blot or intracellular staining and flow cytometry (Fig. 4B). We then tested freshly isolated leukemic cells from three CLL patients, which expressed AID upon activation with IL-4 and CD40L. In each case, intracellular staining

cells 24 h after being infected with BCR-ABL1-ires-GFP retroviruses as in (A). Mice from each group were treated with either water (Ctrl) or 17-DMAG. Curves were compared by the Mantel-Cox long rank test: WT Ctrl versus WT 17-DMAG ($p=0.0055$); WT Ctrl vs *Aicda*^{-/-} Ctrl ($p=0.0035$); *Aicda*^{-/-} Ctrl vs *Aicda*^{-/-} 17-DMAG ($p=0.1875$). The graph compiles n mice from three independent experiments. D. Flow cytometry plots showing the proportion of B220⁺ GFP⁺ (i.e. BCR-ABL1⁺) cells in different organs from one representative transplanted NRG mouse. Results for all mice are shown in Supporting Information Fig. 2. E. One representative agarose gel out of two independent experiments to detect *Aicda* mRNA by RT-PCR, with (+) or without (-) reverse transcriptase, in *Aicda*^{-/-} or WT leukemia extracted from randomly chosen NRG mice from (C). The arrow indicates the expected size of the PCR product. F. All NRG mice transplanted with BCR-ABL1-transformed BM were analyzed by necropsy. Left: One representative photograph of a mass in a mouse with *Aicda*^{-/-} leukemia out of 18 mice analyzed. The inset shows the flow cytometry analysis of the cells in the tumor. Right: The bars graph shows the proportion of mice treated with vehicle (C) or 17-AAG (17) showing masses of GFP⁺ cells at necropsy compiled from the two experiments with 9–13 mice per group.

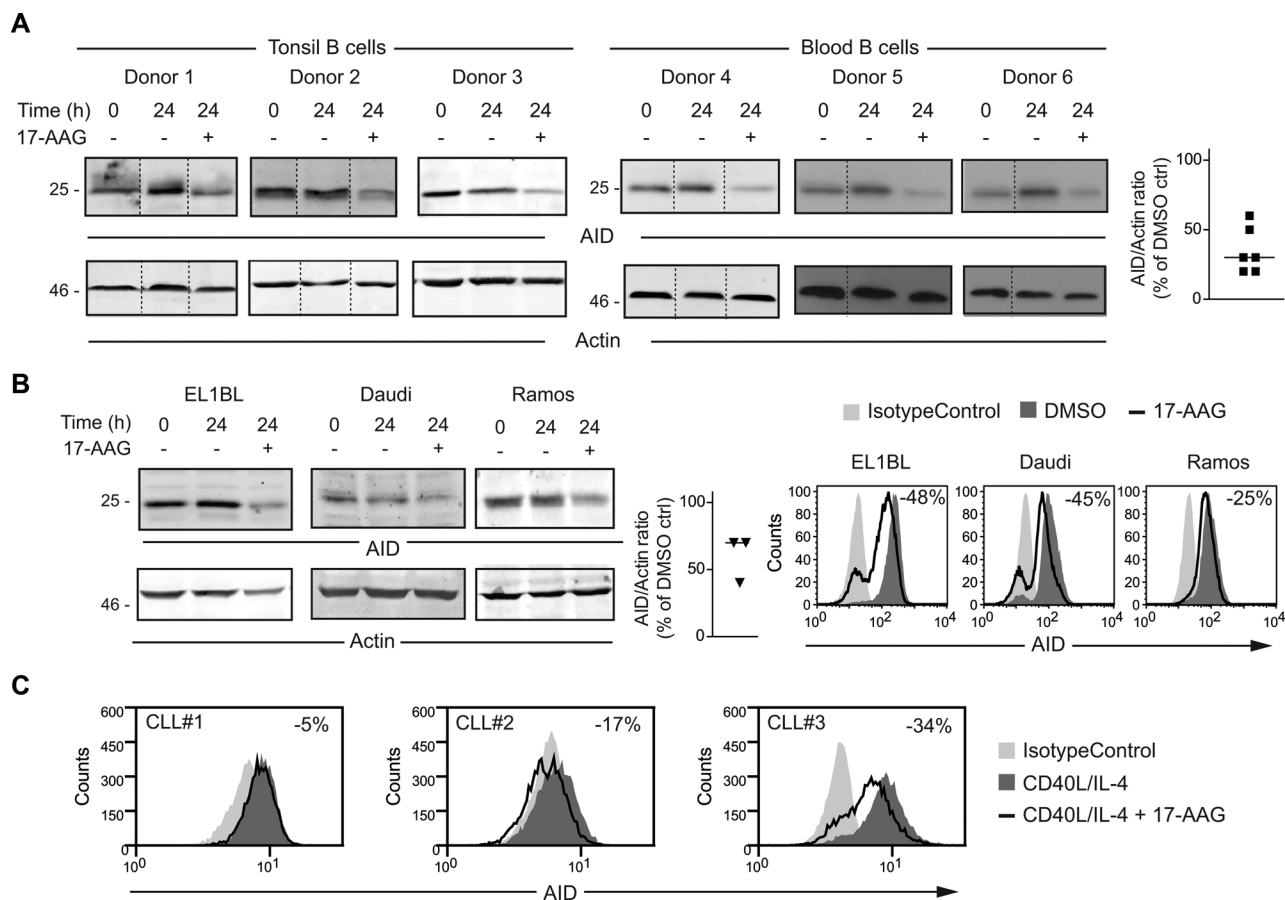


Figure 4. Human AID is sensitive to HSP90 inhibition in normal and transformed B cells. **A.** Human B cells were purified from blood or tonsils, activated with IL-4 and sCD40L and 3 days later (t_0) treated with $2 \mu\text{M}$ 17-AAG (+) or DMSO (-) for 24 h and analyzed by western blot using anti-AID and β -actin as loading control. The experiment was performed with six different donors; one representative blot of each is shown. Right, AID to actin ratio in treated cells is plotted as % of the same ratio in the corresponding untreated sample, as determined by densitometry. **B.** BL cell lines EL1BL, Daudi and Ramos that constitutively express endogenous AID were treated with $8 \mu\text{M}$ 17-AAG for 24 h and AID levels analyzed by Western blot, as in (A) including densitometry of each sample (Left) or by intracellular staining and flow cytometry, with the reduction (%) in AID levels after treatment with 17-AAG indicated for each sample (Right). One representative out of two independent experiments is shown for each technique. **C.** AID levels were analyzed by intracellular staining and flow cytometry in PBMCs from three CLL patients activated with IL-4 and sCD40L and 3 days later treated with $8 \mu\text{M}$ 17-AAG or DMSO for 24 h. The reduction (%) in AID levels after treatment with 17-AAG indicated for each sample. One representative plot from each patient is shown.

and flow cytometry showed that 17-AAG decreased AID protein levels, albeit to a lesser extent than in the BL lines (Fig. 4C). We have previously demonstrated that HSP90 inhibitors destabilized endogenous and overexpressed human AID protein [33]. However, in CLL cells, HSP90 inhibition reduces NF- κ B-mediated transcription [40], which induces *AICDA* [46]. We therefore asked whether HSP90 inhibitors might also affect *AICDA* transcription. We found that 17-AAG decreased AID mRNA levels in two CLL samples but not in CLL#2 and it actually increased them in the BL cells (Supporting Information Fig. 3A). Treatment with 17-AAG did not significantly change *Aicda* mRNA levels in mouse B cells after 48 h, despite clearly decreasing CSR and AID protein levels (Supporting Information Fig. 3B and C). We conclude that AID in human B cells is broadly sensitive to HSP90 inhibition through protein destabilization; although in some CLL cases there could also be a contribution from gene repression or mRNA destabilization.

HSP90 inhibition prevents AID-dependent EMT in a human breast cancer cell line

To assay the effect of HSP90 inhibition on an AID noncanonical function (i.e. transcriptional regulation), we used the human breast cancer cell line ZR75.1, in which we have previously shown that cytokine-induced EMT is dependent on AID expression [30]. ZR75.1 cells express very low but detectable levels of AID mRNA, which increase ~ 7 -fold after treatment with TNF- α [30]. We eliminated inducible AID expression through a specific shRNA (AIDkd) (Fig. 5A), which completely abolishes the EMT in these cells [30]. Here, we show that treating AID-proficient ZR75.1 cells with 17-AAG had the same effect than AID ablation. Treatment with 17-AAG decreased the basal transcription levels of mesenchymal factors Vimentin (*VIM*) and N-cadherin (*CDH2*), and key EMT transcription factors Slug (*SNAI2*), *ZEB1* and *ZEB2* (Fig. 5B) without affecting the expression of E-cadherin (*CDH1*) and Snail

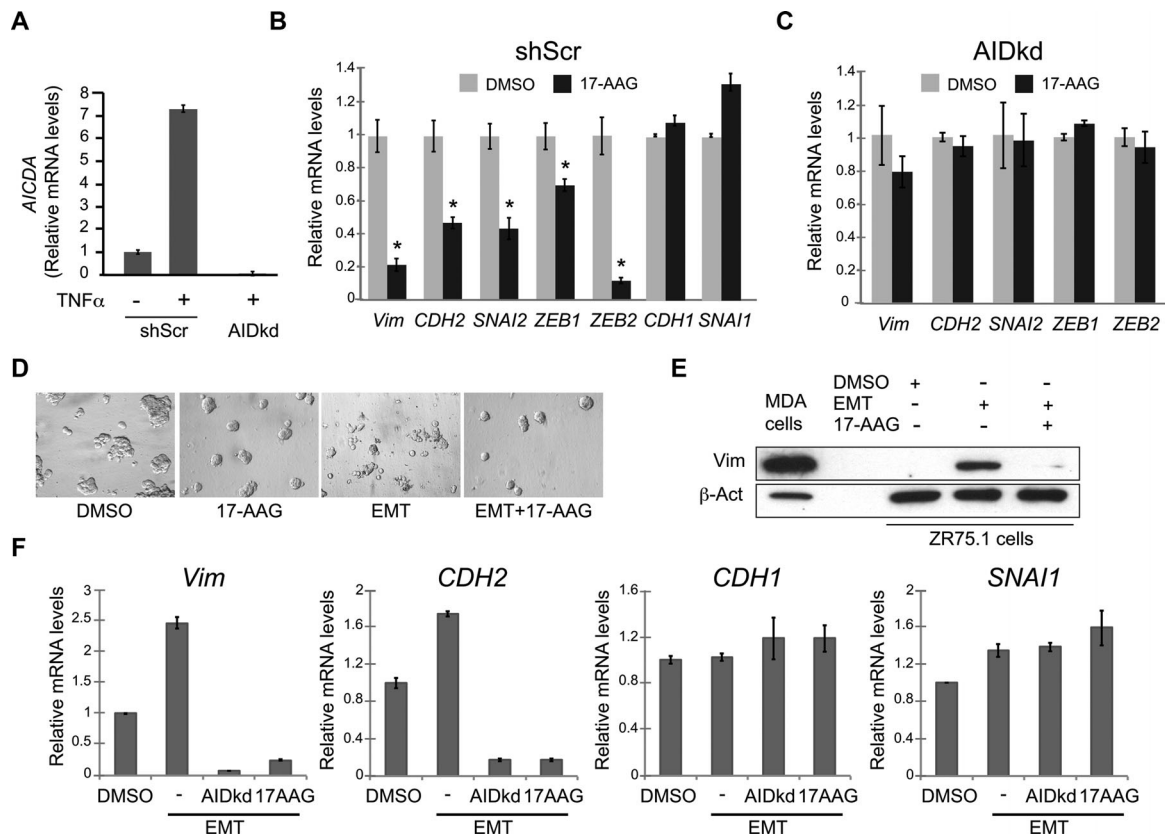


Figure 5. HSP90 inhibition prevents AID-dependent epithelial to mesenchymal transition. **A.** *AICDA* mRNA levels were measured by qRT-PCR in ZR75.1 cells expressing shRNA control (shScr) or shRNA against AID (AIDkd). $\text{TNF-}\alpha$ (50ng/ml) was used to induce *AICDA*. Bars show mean + SD out of 3–4 samples for each condition from ≥ 3 independent experiments. **B.** Relative mRNA levels of various genes measured by qRT-PCR in ZR75.1 cells untreated or treated with 1 μM 17-AAG for 72 h. Expression of mesenchymal markers *VIM* and *CDH2*, and transcription factors *SNAI2* (Slug), *ZEB1*, and *ZEB2* (*: $p < 0.0005$ *VIM*, *CDH2*, and *ZEB2*; $p < 0.005$ *SNAI2* and *ZEB1*) and, *CDH1* (E-cadherin) and *SNAI1* (Snail) were measured. Results are expressed as fold change relative to the levels seen in cells treated with DMSO. Bars show mean + SD out of 3–5 samples for each gene from ≥ 3 independent experiments. Expression was normalized to *GAPDH* and *HPRT1*. **C.** Relative mRNA levels of EMT markers and transcription factors in ZR75.1 AIDkd cells, untreated or treated with 1 μM 17-AAG for 72 h were measured and plotted as in (B). Bars show mean + SD out of 3–5 samples for each gene from ≥ 3 independent experiments. Expression was normalized to *GAPDH* and *HPRT1*. **D.** Bright field images (20X) of ZR75.1 cells treated with vehicle (DMSO) or 1 μM 17-AAG and/or $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{TGF-}\beta$ to induce the EMT (indicated as EMT). Treatment with 17-AAG decreases cell scattering at baseline and in EMT-inducing conditions, similarly to the effect we previously reported for AID knockdown in both conditions [30]. One representative image out of three independent experiments performed is shown. **E.** Expression of Vimentin assessed by western blot in whole cell extracts of ZR75.1 cells, treated with DMSO, EMT inducers ($\text{TNF-}\alpha$ and $\text{TGF-}\beta$) and/or 17-AAG as indicated, or MDA-MB-231 breast cancer cells (as a positive control). β -actin was used as loading control. One representative blot out of three independent experiments performed is shown. **F.** *VIM*, *CDH2*, *CDH1*, and *SNAI1* mRNA levels measured by qRT-PCR in vehicle-treated ZR75.1 cells (DMSO) or EMT induced in the presence or absence of either shRNA targeting AID (AIDkd) or the HSP90 inhibitor 17-AAG. Bars show mean + SD out of 3–5 samples per gene from ≥ 3 independent experiments. Expression was normalized to *GAPDH* and *HPRT1*. **A–C, F.** Differences in gene expression were compared by paired two-tailed t-test (assuming unequal variance, $\alpha = 0.05$).

(*SNAI1*) (Fig. 5B), which are not reduced by AID knockdown [30]. Furthermore, treating AID-deficient ZR75.1 cells with 17-AAG did not change the expression of EMT factors (Fig. 5C), indicating that an important part of the effect of 17-AGG was by targeting AID. Since AID knockdown blocks the EMT [30], we asked whether 17-AAG would do the same. We induced the EMT in ZR75.1 cells with $\text{TNF}\alpha$ and $\text{TGF}\beta$ and at the same time inhibited HSP90. Consistent with the results shown above, 17-AAG treatment abolished the EMT similarly to AID knockdown, as shown by cell morphology as well as by its ability to prevent the upregulation of the mesenchymal markers Vimentin (*VIM*) and N-cadherin (*CDH2*) (Fig. 5D–F). Once again, in EMT-inducing conditions, 17-AAG did not affect the expression of genes that are not affected

by AID knockdown (Fig. 5F). These results strongly suggest that HSP90 inhibition targets AID in human epithelial cells and can prevent its noncanonical functions.

Discussion

We have previously demonstrated that AID stability depends on the HSP90 molecular chaperoning pathway in vitro [33, 35]. Herein we determined the feasibility of using HSP90 inhibitors to destabilize AID in vivo in mice. This strategy could provide a useful alternative to pharmacologically target AID, until clinically apt specific inhibitors can be developed. Since HSP90 inhibitors

are being actively pursued [36, 37], our results also establish AID as a relevant target to consider in (pre)clinical trials.

Administering the HSP90 inhibitor 17-DMAG to AID-GFPtg mice at doses similar to those tested in human patients [39, 41] reduced the expression of AID protein in GC B cells from the spleen and Peyer's patches. At 20 mg/kg, 17-DMAG was tolerated for up to 20 days without affecting splenic lymphocyte populations or the expression of B220 and surface IgM, indicating that no major immunosuppression through B-cell or T-cell depletion occurs. Furthermore, the decrease in AID-GFP protein was accompanied by a significant reduction in isotype switching of the antibody response elicited after immunization. The small number of B cells that normally express AID in immunized mice is insufficient to test the effect of HSP90 inhibitors on endogenous AID by western blot. However, 17-DMAG reduced the titers of total and high-affinity antigen-specific antibodies in C57BL6/J mice to a similar extent than in AID-GFPtg mice. Our results demonstrate that HSP90 inhibition can be used to blunt the production of switched antibodies *in vivo*, and that a substantial part of that effect is through destabilizing AID. This demonstration that AID is a target of HSP90 inhibition should be considered when anticipating possible side effects and interactions of HSP90 inhibitors in the clinic; although we posit that it would rather be one of their benefits. AID destabilization could also have therapeutic applications for autoimmune diseases. In fact, HSP90 inhibitors reduced the levels of anti-dsDNA antibodies and proteinuria, a consequence of antibody deposition in the kidneys in the MRL^{lpr/lpr} mouse model of SLE [47]. Our results strongly suggest that part of the mechanism behind this action is AID destabilization. Indeed, the effect of HSP90 inhibitors on MRL^{lpr/lpr} mice [47] mimics the effect of genetically ablating AID [6] or reducing AID dosage by using *Aicda*^{+/-} mice in the MRL^{lpr/lpr} background [8]. Since complete AID deficiency is also associated to autoimmune manifestations because of defects in tolerance [48], a partial reduction of AID levels could balance the benefits of reducing AID without causing additional pathologies.

We analyzed AID in cancer cells in mice as well as in human samples. Cancer cells rely on HSP90 to stabilize mutated and overexpressed oncoproteins [49], can overexpress HSP90 [37] and may express a form of HSP90 more sensitive to inhibition [50]. For these reasons, HSP90 inhibitors constitute a promising therapy for multiple cancers [36, 37]. Continued AID expression in lymphoma and leukemia can contribute to disease progression and hence be a relevant target of HSP90 inhibitors [25]. Indeed, AID expression correlates with poor outcome in CLL [19, 22–24], B-ALL [17], and CML [16]. Here, we show that 17-DMAG increases survival in a B-ALL mouse model in which AID clearly confers increased aggressiveness. *Aicda*^{-/-} leukemia was also susceptible to the inhibitors, which was not unexpected because they would destabilize multiple HSP90 clients that are important for cell proliferation [49, 51]. However, we expected that AID⁺ leukemia might be more affected than *Aicda*^{-/-} leukemia. Although this was the case in our experiment, the difference between the groups was modest. In hindsight, the kinetics of this B-ALL model are probably too fast to reveal large differential effects. Chronic models, probably in combination with a selectable marker of AID action,

such as imatinib resistance [16], would need to be developed to further test our proposed strategy. We verified *Aicda* induction in BM cells due to enforced expression of BCR-ABL1, but AID levels were too low to be detected by western blot in the leukemic cells. Nevertheless, an effect on AID could be indirectly inferred from the development of masses that were found in mice bearing either *Aicda*^{-/-} leukemia or WT leukemia treated with 17-DMAG, but not in untreated mice with WT leukemia. Of course, this result is not conclusive but it does suggest that 17-DMAG can change the quality of the leukemia, making it more benign, in a similar way to AID-deficiency.

To extend our analysis to human AID, we analyzed primary and tissue culture cells representing the spectrum of AID expression in humans. Despite inter-individual variation, we show that AID protein levels are sensitive to similar doses of HSP90 inhibitors in normal B-cells and BL-cell lines, and perhaps less in CLL cell samples. This might be ascribed to variable HSP90 amounts, as it has been shown to happen in lymphomas [52] and CLL cells, which express >3-fold more HSP90 protein than WT leukocytes [53]. We also show that HSP90 inhibition abolishes cytokine-induced EMT in the epithelial breast cancer cell line ZR75.1 by preventing the upregulation of genes that are crucial for the cells to gain mobility and invasiveness. While HSP90 inhibition surely affects additional targets in these cells, it is again very suggestive that treatment with 17-AAG mirrors the effect achieved by AID knockdown [30].

In conclusion, the fact that HSP90 inhibitors had similar quantitative and qualitative effects to AID ablation in multiple settings supports our hypothesis that a substantial part of their effect is achieved by destabilizing AID. It is possible that HSP90 inhibitors at low doses are effective in chronically reducing AID levels, thereby delaying its pathogenicity in relevant chronic diseases, while minimizing toxicity issues of the current regimes [37]. For example, HSP90 inhibition might help reducing switched pathogenic antibodies in SLE patients [48]. In CML patients, AID underpins resistance to the BCR-ABL1 inhibitor imatinib [16] and adjunctive therapy with HSP90 inhibitors could delay this ability of AID, as we have shown to be possible *in vitro* [33]. Adjunctive therapy could also reduce clonal diversity in CLL patients and help chemotherapy [25]. In this sense, retrospective analysis of clinical trials of HSP90 inhibitors for CML and CLL [40, 54], cross-referencing response to AID status, could be informative. Our demonstration that HSP90 inhibitors can decrease AID levels *in vivo* as well as in human cancer samples, suggest a possible mechanism of action to explain in part the clinical utility of these drugs.

Material and methods

Mice

C57BL6/J and NRG mice were from Jackson labs (Bar Harbor, ME). AID-GFPtg mice [42], a gift of Dr R Casellas (NCI, Bethesda, MD) and *Aicda*^{-/-} mice [1], a gift of Dr T Honjo (Kyoto University, Japan), were in C57BL6/J background. Mice were kept

under specific pathogens free conditions. All experiments were approved by the Animal protection committee at the IRCM, protocol 2011–24, according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

HSP90 inhibitors

17-AAG (LC laboratories A-6880) dissolved in DMSO and 17-DMAG (LC laboratories D-3440) dissolved in water were aliquoted and stored at -20°C . Mice were administered 17-DMAG in 0.2 mL of water (or water control) by gavage using a 22G feeding needle. Immunized mice were treated with 20 mg/kg, from day 3 postimmunization daily, until sacrificed (day 11 p.i.) for measuring antibody responses. Transplanted NRG mice were treated from day 5 posttransplantation with 20 mg/kg for 20 days, monitored daily until reaching an endpoint. Human cells were treated as indicated in Results.

Measuring antibody responses

Mice were immunized with NP₁₈-CGG (Biosearch Technologies) in Inject Alum adjuvant (Thermo Scientific) intraperitoneally. Antibody titers were measured by ELISA as described [44]. Briefly, ELISA plates were coated with 100 μl of 50 mg/mL NP₂₆-BSA, for capturing total anti-NP antibodies, or NP₄-BSA, for capturing high affinity anti-NP antibodies. Serial dilutions of mouse serum were loaded in duplicate wells and incubated overnight at 4°C . IgG1 was detected using 50 μl of biotin-anti-IgG1 for 2 h followed by 50 μl of HRP-streptavidin for 1 h and visualized using 2,2'-Azinobis(3-ethybenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma), and OD read at 405 nm.

B-ALL mouse model

A retroviral vector encoding BCR-ABL1^{p210}-ires-GFP was transfected into the ecotropic packaging cell line PLAT-E and 24 h later supplemented with 10 mM sodium butyrate (Sigma) to augment viral production. The supernatant was collected 24 h later, concentrated using Vivaspin 20 (GE Healthcare) and used to infect BM cells. BM cells were isolated from the long bones of C57BL6/J or *Aicda*^{-/-} mice and cultured in StemSpan medium (StemCell technologies) for 48 h with 50 ng/mL Flt3L and 10 ng/mL of rIL-7 (PeproTech). Pelleted BM cells were resuspended in 0.2 mL of concentrated viral supernatant containing 8 mg/mL polybrene (Sigma) and incubated for 2 h before adding 1 mL of StemSpan medium with cytokines, spinning for 30 min at $600 \times g$ and then incubating overnight in 6-well plates. One million cells were then injected in the tail vein of sublethally irradiated (5 Gy) NRG mice. The visible efficiency of infection at the time of injection was typically 5%. Mice were monitored daily and sacrificed when moribund or reaching one of the endpoints (paralysis, rapid loss of weight, ataxia, lack of cleaning, general posture, visible masses).

Cells from the BM, blood, spleen, brain, and visible masses were isolated using a 70 μm filter and analyzed by flow cytometry or cultured for 48 h in complete IMDM media at $2 \times 10^6/\text{mL}$ in six well plates for RNA isolation.

Human cells and samples

Peripheral blood was collected from healthy donors at the IRCM and B cells purified from PBMCs as described [33]. Human tonsils were obtained from donors undergoing preprogrammed tonsilectomy at the otorhinolaryngology service at the Ste-Justine Hospital (Montreal). Lymphocytes were obtained by crushing the tonsil through a 70 μm filter, washed with RPMI and purified using Lymphoprep (Axis-Shield). All work was approved by the ethics committees at Ste-Justine Hospital and at IRCM (certificate 2011–18). CLL samples were obtained from patients followed at the Hospital Maciel (Montevideo) that have signed an informed consent in accordance with the ethical regulations from Uruguay and the Helsinki Declaration. PBMCs were isolated by centrifugation on Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich, USA) and cryopreserved in liquid nitrogen. Purified B cells and CLL samples were activated with 5 ng/mL human IL-4 (PeproTech) and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ recombinant sCD40L (PeproTech) for 72 h before treating with 2 mM 17-AAG for 24 h. Human BL cell lines were a gift of Dr M Neuberger (Cambridge, UK) and cultured in complete RPMI medium.

RT-PCR

RNA isolated using TRIzol (Life Technologies) was reverse transcribed with ProtoScriptTM M-MuLV Taq RT-PCR kit (New England Biolabs). End-point PCR to amplify 389 bp of mouse AID from cDNA was performed for 35 cycles [94°C 20 sec, 55°C 2 min, 68°C 1 min] using Taq DNA polymerase. Quantitative PCR using SYBR select master mix (Applied Biosystems) was performed and analyzed in a ViiATM 7 machine and software (Life technologies). Mouse AID was amplified using primers OJ844 (GCCACCTTCGCAACAAGTCT) and OJ845 (CCGGGCACAGTCATAGCAC) for a 137 bp product for 40 cycles [95°C 15 sec, 60°C 1min] and normalized to *Hprt*, amplified with OJ1008 (CCTTCATGACATCTC-GAGCAAGT) and OJ1009 (CCGAGGATTTGGAAAAAGTGTT). A 133 bp product of *AICDA* mRNA from BL B-cell lines was amplified using OJ1225 (GCAATAAGAACGGCTGCCAC) and OJ1226 (ACATGTCGGGCACAGTCGTA), normalized to *GAPDH* amplified with primers OJ1010 (TGACAACCTTTGGTATCGTGAAGG) and OJ1011 (AGGGATGATGTTCTGGAGAGCC), as above. AID mRNA in stimulated PBMCs from CLL patients was measured in a Corbett Rotor Gene 6000 Real-Time PCR machine using primers fwd (GAGGCAAGAAGACACTCTGG) and rev (GCGTCTCACA-GAAGTAG) for 40 cycles [95°C 10 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec] and normalized to *GAPDH*. Relative expression levels were obtained by calculating the $\Delta\Delta\text{Ct}$ values using ΔCt of Ramos cell line as a calibrator.

EMT analysis

ZR75.1 cells stably expressing an shRNA targeting human AID or scrambled control have been described [30]. ZR75.1 cells were incubated with 1 μ M 17-AAG (Sellek Chemicals) for 72 h in basal conditions or for 72 h prior to and during the induction of the EMT. Total RNA was reversed transcribed using Superscript III (Invitrogen) and mRNA levels of AID and EMT factors analyzed as described [30].

Flow cytometry and western blot

Lymphocytes were stained with anti-B220-allophycocyanin and anti-CD3-phycoerythrin (BD pharmingen). Leukemic cells from NRG mice were stained with anti-CD19-biotin (BD Biosciences) followed by anti-biotin- phycoerythrin-Vio770 (Miltenyi Biotech) and/or anti-B220-allophycocyanin (BD Biosciences). Dead cells were excluded using PI. Results were acquired using a BD LSR I (BD biosciences) and analyzed using FlowJo. For intracellular detection of human AID PBMCs or BL cells were fixed with PBS 4% paraformaldehyde and permeabilized with PBS 0.5% saponin 4% FBS before adding mAb anti-AID (clone EK2 5G9, Cell Signaling Technology) followed by anti-Rat IgG Alexa Fluor 488 (Cell Signaling). Negative isotype controls were performed accordingly. In western blots, endogenous human AID was detected using the same antibody. Endogenous mouse AID was detected using mAb anti-AID (ebioscience, cat#14-5959-82 at 1:250 in 2.5% BSA). Densitometry was performed using ImageJ (NIH).

Acknowledgements: We thank R Casellas, T Honjo and K Podsypanina, for reagents, Dr P Arcand from the otorhinolaryngology service at Ste-Justine Hospital and Dr P Laroche and nurse M Gauthier from IRCM clinic for facilitating the access to tonsil and blood samples. We thank M Cawthorn, M Laprise, M-C Lavallée and J Dussureault for technical assistance with mice. This work was funded by a grant from The Cancer Research Society to JMDN and National Institutes of Health Grant 5K22CA163969-02 and a Pink Pumpkin Patch Grant to DPM. JMDN holds a Canada Research Chair tier 2.

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflicts of interest.

References

- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. and Honjo, T., Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 2000. **102**: 553–563.
- Di Noia, J. M. and Neuberger, M. S., Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* 2007. **76**: 1–22.
- Rajewsky, K., Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 1996. **381**: 751–758.
- Stavnezer, J., Guikema, J. E. J. and Schrader, C. E., Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* 2008. **26**: 261–292.
- Hsu, H.-C., Wu, Y., Yang, P., Wu, Q., Job, G., Chen, J., Wang, J. et al., Overexpression of activation-induced cytidine deaminase in B cells is associated with production of highly pathogenic autoantibodies. *J. Immunol.* 2007. **178**: 5357–5365.
- Jiang, C., Foley, J., Clayton, N., Kissling, G., Jokinen, M., Herbert, R. and Diaz, M., Abrogation of lupus nephritis in activation-induced deaminase-deficient MRL/lpr mice. *J. Immunol.* 2007. **178**: 7422–7431.
- Zan, H., Zhang, J., Ardeshtna, S., Xu, Z. and Park, S.-R., Casali, P., Lupus-prone MRL/faslpr/lpr mice display increased AID expression and extensive DNA lesions, comprising deletions and insertions, in the immunoglobulin locus: concurrent upregulation of somatic hypermutation and class switch DNA recombination. *Autoimmunity*. 2009. **42**: 89–103.
- Jiang, C., Zhao, M. L. and Diaz, M., Activation-induced deaminase heterozygous MRL/lpr mice are delayed in the production of high-affinity pathogenic antibodies and in the development of lupus nephritis. *Immunology*. 2009. **126**: 102–113.
- Xu, X., Hsu, H. C., Chen, J., Grizzle, W. E., Chatham, W. W., Stockard, C. R., Wu, Q. et al., Increased expression of activation-induced cytidine deaminase is associated with anti-CCP and rheumatoid factor in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.* 2009. **70**: 309–316.
- White, C. A., Seth Hawkins, J., Pone, E. J., Yu, E. S., Al-Qahtani, A., Mai, T., Zan, H. et al., AID dysregulation in lupus-prone MRL/Fas(lpr/lpr) mice increases class switch DNA recombination and promotes interchromosomal c-Myc/IgH loci translocations: modulation by HoxC4. *Autoimmunity*. 2011. **44**: 585–598.
- Okazaki, I.-M., Hiai, H., Kakazu, N., Yamada, S., Muramatsu, M., Kinoshita, K. and Honjo, T., Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J. Exp. Med.* 2003. **197**: 1173–1181.
- Robbiani, D. F., Bunting, S., Feldhahn, N., Bothmer, A., Camps, J., Deroubaix, S. and McBride, K. M. et al., AID produces DNA double-strand breaks in non-Ig genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations. *Mol. Cell*. 2009. **36**: 631–641.
- Liu, M., Duke, J. L., Richter, D. J., Vinuesa, G. G., Goodnow, C. C., Kleinstein, S. H. and Schatz, D. G., Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature*. 2008. **451**: 841–845.
- Ramiro, A. R., Jankovic, M., Eisenreich, T. R., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T. et al., AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell*. 2004. **118**: 431–438.
- Pasqualucci, L., Bhagat, G., Jankovic, M., Compagno, M., Smith, P., Muramatsu, M., Honjo, T. et al., AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet.* 2008. **40**: 108–112.
- Klemm, L., Duy, C., Iacobucci, I., Kuchen, S., Levetzow von, G., Feldhahn, N., Henke, N. et al., The B Cell Mutator AID Promotes B Lymphoid Blast Crisis and Drug Resistance in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*. 2009. **16**: 232–245.
- Gruber, T. A., Chang, M. S., Sposto, R. and Müschen, M., Activation-Induced Cytidine Deaminase Accelerates Clonal Evolution in

- BCR-ABL1-Driven B-Cell Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res.* 2010. **70**: 7411–7420.
- 18 Feldhahn, N., Henke, N., Melchior, K., Duy, C., Soh, B. N., Klein, F., Levetzow von, G. et al., Activation-induced cytidine deaminase acts as a mutator in BCR-ABL1-transformed acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Exp. Med.* 2007. **204**: 1157–1166.
- 19 Oppezzo, P., Vuillier, F., Vasconcelos, Y., Dumas, G., Magnac, C., Payelle-Brogard, B., Pritsch, O. et al., Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood.* 2003. **101**: 4029–4032.
- 20 McCarthy, H., Wierda, W. G., Barron, L. L., Cromwell, C. C., Wang, J., Coombes, K. R., Rangel, R. et al., High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) and splice variants is a distinctive feature of poor-prognosis chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2003. **101**: 4903–4908.
- 21 Albesiano, E., Messmer, B. T., Damle, R. N., Allen, S. L., Rai, K. R., Chiorazzi, N., Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. *Blood.* 2003. **102**: 3333–3339.
- 22 Palacios, F., Moreno, P., Morande, P., Abreu, C., Correa, A., Porro, V., Landoni, A. I. et al., High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood.* 2010. **115**: 4488–4496.
- 23 Huemer, M., Rebhandl, S., Zaborsky, N., Gassner, F. J., Hainzl, S., Weiss, L., Hebenstreit, D. et al., AID induces intracлонаl diversity and genomic damage in CD86(+) cells in chronic lymphocytic leukemia. *Eur. J. Immunol.* 2014.
- 24 Patten, P. E. M., Chu, C. C., Albesiano, E., Damle, R. N., Yan, X.-J., Kim, D., Zhang, L. et al., IGHV-unmutated and IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia cells produce activation-induced deaminase protein with a full range of biologic functions. *Blood.* 2012. **120**: 4802–4811.
- 25 Montamat-Sicotte, D., Palacios, F., Di Noia, J. M. and Oppezzo, P., Origins and Consequences of AID Expression in Lymphoid Neoplasms. *Current Immunological Reviews.* 2013. **9**: 72–85.
- 26 Marusawa, H., Takai, A. and Chiba, T., Role of activation-induced cytidine deaminase in inflammation-associated cancer development. *Adv. Immunol.* 2011. **111**: 109–141.
- 27 Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, SAJR, Behjati, S., Biankin, A. V., Bignell, G. R. et al., Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* 2013. **500**: 415–421.
- 28 Ramiro, A. R. and Barreto, V. M., Activation-induced cytidine deaminase and active cytidine demethylation. *Trends Biochem. Sci.* 2015. DOI:10.1016/j.tibs.2015.01.006.
- 29 Isobe, T., Song, S.-N. J., Tiwari, P., Ito, H., Yamaguchi, Y. and Yoshizaki, K., Activation-induced cytidine deaminase auto-activates and triggers aberrant gene expression. *FEBS Lett.* 2013. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.06.028.
- 30 Muñoz, D. P., Lee, E. L., Takayama, S., Coppé, J.-P., Heo, S.-J., Boffelli, D., Di Noia, J. M. et al., Activation-induced cytidine deaminase (AID) is necessary for the epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013. **110**: E2977–86.
- 31 Orthwein, A. and Di Noia, J. M., Activation induced deaminase: how much and where? *Semin. Immunol.* 2012. **24**: 246–254.
- 32 Vuong, B. Q. and Chaudhuri, J., Combinatorial mechanisms regulating AID-dependent DNA deamination: interacting proteins and post-translational modifications. *Semin. Immunol.* 2012. **24**: 264–272.
- 33 Orthwein, A., Patenaude, A.-M., Affar, E. B., Lamarre, A., Young, J. C. and Di Noia, J. M., Regulation of activation-induced deaminase stability and antibody gene diversification by Hsp90. *J. Exp. Med.* 2010. **207**: 2751–2765.
- 34 Pasqualucci, L., Guglielmino, R., Houldsworth, J., Mohr, J., Aoufouchi, S., Polakiewicz, R., Chaganti, R. S. K. et al., Expression of the AID protein in normal and neoplastic B cells. *Blood.* 2004. **104**: 3318–3325.
- 35 Orthwein, A., Zahn, A., Methot, S. P., Godin, D., Conticello, S. G., Terada, K. and Di Noia, J. M., Optimal functional levels of activation-induced deaminase specifically require the Hsp40 DnaJ1. *EMBO J.* 2012. **31**: 679–691.
- 36 Taldone, T., Gozman, A., Maharaj, R. and Chiosis, G., Targeting Hsp90: small-molecule inhibitors and their clinical development. *Curr Opin Pharmacol.* 2008. **8**: 370–374.
- 37 Neckers, L. and Workman, P., Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin. Cancer Res.* 2012. **18**: 64–76.
- 38 Egorin, M. J., Lagattuta, T. F., Hamburger, D. R., Covey, J. M., White, K. D., Musser, S. M. and Eiseman, J. L., Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 707545) in CD2F1 mice and Fischer 344 rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2002. **49**: 7–19.
- 39 Kummar, S., Gutierrez, M. E., Gardner, E. R., Chen, X., Figg, W. D., Zajack-Kaye, M., Chen, M. et al., Phase I trial of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG), a heat shock protein inhibitor, administered twice weekly in patients with advanced malignancies. *Eur. J. Cancer.* 2010. **46**: 340–347.
- 40 Hertlein, E., Wagner, A. J., Jones, J., Lin, T. S., Maddocks, K. J., Towns, W. H., Goettl, V. M. et al., 17-DMAG targets the nuclear factor-kappaB family of proteins to induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia: clinical implications of HSP90 inhibition. *Blood.* 2010. **116**: 45–53.
- 41 Pacey, S., Wilson, R. H., Walton, M., Eatock, M. M., Hardcastle, A., Zetterlund, A., Arkenau, H.-T. et al., A phase I study of the heat shock protein 90 inhibitor alvespimycin (17-DMAG) given intravenously to patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 2011. **17**: 1561–1570.
- 42 Crouch, E. E., Li, Z., Takizawa, M., Fichtner-Feigl, S., Gourzi, P., Montano, C., Feigenbaum, L. et al., Regulation of AID expression in the immune response. *J. Exp. Med.* 2007. **204**: 1145–1156.
- 43 Teng, G., Hakimpour, P., Landgraf, P., Rice, A., Tuschl, T., Casellas, R. and Papavasiliou, F. N., MicroRNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase. *Immunity.* 2008. **28**: 621–629.
- 44 Zahn, A., Daugan, M., Safavi, S., Godin, D., Cheong, C., Lamarre, A. and Di Noia, J. M., Separation of Function between Isotype Switching and Affinity Maturation In Vivo during Acute Immune Responses and Circulating Autoantibodies in UNG-Deficient Mice. *J. Immunol.* 2013. **190**: 5949–5960.
- 45 Cumano, A. and Rajewsky, K., Structure of primary anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) antibodies in normal and idiotypically suppressed C57BL/6 mice. *Eur. J. Immunol.* 1985. **15**: 512–520.
- 46 Dedeoglu, F., Horwitz, B., Chaudhuri, J., Alt, F. W. and Geha, R. S., Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *Int. Immunol.* 2004. **16**: 395–404.

- 47 Shimp, S. K., Chafin, C. B., Regna, N. L., Hammond, S. E., Read, M. A., Caudell, D. L., Rylander, M. et al., Heat shock protein 90 inhibition by 17-DMAG lessens disease in the MRL/lpr mouse model of systemic lupus erythematosus. *Cell. Mol. Immunol.* 2012. **9**: 255–266.
- 48 Diaz, M., Activation-induced deaminase in immunity and autoimmunity: introduction. *Autoimmunity.* 2013. **46**: 81–82.
- 49 Whitesell, L. and Lindquist, S. L., HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2005. **5**: 761–772.
- 50 Kamal, A., Thao, L., Sensintaffar, J., Zhang, L., Boehm, M. F., Fritz, L. C. and Burrows, F. J., A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature.* 2003. **425**: 407–410.
- 51 McClellan, A. J., Xia, Y., Deutschbauer, A. M., Davis, R. W., Gerstein, M. and Frydman, J., Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell.* 2007. **131**: 121–135.
- 52 Valbuena, J. R., Rassidakis, G. Z., Lin, P., Atwell, C., Georgakis, G. V., Younes, A., Jones, D. et al., Expression of heat-shock protein-90 in non-Hodgkin's lymphomas. *Mod. Pathol.* 2005. **18**: 1343–1349.
- 53 Dempsey, N. C., Leoni, F., Ireland, H. E., Hoyle, C. and Williams, J. H. H., Differential heat shock protein localization in chronic lymphocytic leukemia. *J. Leukoc. Biol.* 2010. **87**: 467–476.
- 54 Peng, C., Brain, J., Hu, Y., Goodrich, A., Kong, L., Grayzel, D., Pak, R. et al., Inhibition of heat shock protein 90 prolongs survival of mice with BCR-ABL-T315I-induced leukemia and suppresses leukemic stem cells. *Blood.* 2007. **110**: 678–685.

Abbreviations: 17-AAG: 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin · 17-DMAG: 17-(Dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin · AID: activation induced deaminase · B-ALL: B-cell acute lymphoblastic leukemia · BL: Burkitt's lymphoma · CLL: chronic lymphocytic leukemia · CML: chronic myelogenous leukemia · CSR: class switch recombination · NP-CGG: 4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl-Chicken Gamma Globulin · EMT: epithelial to mesenchymal transition · SHM: somatic hypermutation · SLE: systemic lupus erythematosus · HSP90: heat shock protein 90 kDa

Full correspondence: Dr. Javier M Di Noia, 110 Av des Pins Ouest, Montréal, QC, H2W 1R7, Canada.

Fax: +1 514-987-5528

E-mail: javier.di.noia@ircm.qc.ca

Current address: Damien Montamat-Sicotte, The Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, Canada.

Current address: Alexandre Orthwein, Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, Mount Sinai Hospital, 600 University, Toronto, ON, M5G 1×5, Canada.

Received: 8/1/2015

Revised: 26/3/2015

Accepted: 25/4/2015