

***Puesta a punto de metodologías de  
Biología Molecular y Celular para la  
caracterización de un modelo  
transgénico murino de Leucemia  
Linfoide Crónica***

Tesina de finalización de carrera-Licenciatura en Bioquímica

Unidad de Proteínas Recombinantes

Instituto Pasteur de Montevideo

Matilde Nin

Orientador: Dr. Pablo Oppezzo

# INDICE

---

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Leucemia Linfoide Crónica (LLC): características generales .....	5
1.2 Anomalías cromosómicas en LLC .....	7
1.3 TCL1: oncogén .....	9
1.3.1 Función biológica de TCL1 .....	11
1.4 Modelos murinos de Leucemia Linfoide Crónica.....	13
1.4.1 New Zealand murino .....	13
1.4.2Traf2DN/Bcl2 murino .....	15
1.4.3 APRIL: modelo murino .....	16
1.4.4 Modelos transgénico murino IgH-E $\mu$ -TCL1 .....	17
OBJETIVOS .....	20
Objetivo general .....	20
Objetivos específicos .....	20
i.Evaluación de la presencia del transgen TCL1 humano a nivel genómico por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR cuantitativa, qPCR). .....	20
ii.Estudios sobre la progresión de la LLC a través del análisis periódico por citometría de flujo en la sangre periférica y en el bazo de los ratones transgénicos. ....	20
iii. Evaluación a nivel de RNAm de la expresión del transgen TCL1 humano en los diferentes órganos linfoides secundarios. ....	20
MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
Soluciones y buffer utilizados.....	21
Anticuerpos .....	21
Ratones seleccionados.....	21
Extracción de ADN genómico a partir de colas .....	22
Clonado del gen de interés en un vector de secuenciado .....	22
Transformación y digestión con enzimas de restricción .....	23
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR cuantitativa; qPCR)25	
Eutanasia de ratones y extracción de órganos.....	27
Procesamiento del Bazo y Ganglios .....	28
Procesamiento de Sangre Periférica .....	28

Obtención de células mononucleares totales y evaluación por citometría de flujo .....	28
Extracción de ARN a partir de células mononucleares previamente purificadas, determinación de la concentración y pureza del ARN.....	30
Síntesis de ADNc (Retro Transcripción).....	30
Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y evaluación por electroforesis en gel.....	31
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
i.Evaluación del transgen TCL1 humano a nivel genómico por qPCR.....	34
ii. Evaluación del inicio y de la progresión de la LLC a través del análisis por citometría de flujo de la sangre de los ratones transgénicos .....	38
Caracterización del proceso de leucemización en los linfocitos B expresando el transgen TCL1 en SP.....	39
Caracterización del proceso de leucemización en los linfocitos B expresando el transgen TCL1 en Bazo. ....	40
<b>CONCLUSIONES Y PERPECTIVAS.....</b>	<b>43</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>44</b>

# RESUMEN

---

La Leucemia Linfóide Crónica es una hemopatía caracterizada por la acumulación lenta y progresiva de linfocitos B clonales en sangre, médula ósea y órganos linfoides. El objetivo de este trabajo consistió en poner a punto las técnicas necesarias para evaluar el desarrollo de la Leucemia Linfóide Crónica en el modelo transgénico E $\mu$ /TCL1.

A partir de 5 ratones F0 y por cruzamientos sucesivos se logra estabilizar la colonia y obtener además los controles negativos "littermate" con los cuales poner a punto las diferentes técnicas de evaluación de la progresión leucémica. Para poder discriminar entre los diferentes genotipos se estudió la expresión del transgen TCL1 a nivel genómico por qPCR. Para esto se realizó una extracción de ADN genómico a partir de las colas y una posterior caracterización de su expresión por PCR cuantitativa.

Los resultados muestran que el homocigota positivo contiene aproximadamente  $10^4$  número de copias del transgen TCL1, el heterocigota  $10^3$  número de copias y el homocigota negativo  $10^2$ . La evaluación del inicio y progresión de la LLC a través de citometría de flujo en sangre y en el bazo de los ratones transgénicos muestra que a los 5 meses hay un aumento de la población de IgM+/CD5+ y a los 10 meses se hace evidente la leucemización. El bazo se estudió a los 2 meses y a los 10 meses de edad, donde se observó un aumento significativo de la población de IgM+/CD5+. Finalmente, también estudiamos la expresión del transgen TCL1 a nivel de ARN mensajero en los diferentes órganos linfoides secundarios. Para ello realizamos PCR cuantitativa relativizando las medidas de expresión a un gen control (GAPDH). Los resultados muestran que el bazo es el órgano con mayor expresión del transgen TCL1, luego la sangre periférica y por último el ganglio linfático.

En suma podemos decir que el modelo transgénico fue caracterizado en su mayor parte cumpliéndose así con todos los objetivos planteados para esta pasantía.

# INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 Leucemia Linfoide Crónica (LLC): características generales

La Leucemia Linfoide Crónica de células B (LLC) es la leucemia con mayor prevalencia en adultos a nivel mundial, y su frecuencia en el Hemisferio Occidental llega al 25% del total de leucemias diagnosticadas (Dighiero et al., 2008). Recientes estudios realizados en Uruguay y Argentina muestran que a semejanza del resto de Europa occidental la tasa de incidencia de LLC en nuestro país oscila entre el 4-5/100.000 habitantes/año de la población adulta (media de edad 72 y un rango entre 35-90 años, en una relación aproximada de 2:1 en el hombre respecto a la mujer). Si bien existen evidencias sobre la importancia del factor genético asociado a esta neoplasia, como su baja frecuencia en países orientales o su fuerte asociación en ciertos grupos familiares, éste es a la fecha un tema no claramente dilucidado.

La LLC se caracteriza por la acumulación progresiva de linfocitos B monoclonales pequeños en sangre, médula ósea y órganos linfoides. Presentan un fenotipo particular, con expresión de ciertos antígenos que no son frecuentes en los linfocitos circulantes, como CD5 y CD23 (Chiorazzi et al., 2003; Keating et al., 2003). Otra característica de las células de LLC es la baja expresión de inmunoglobulina (Ig) en la superficie, que suele ser de isotipo IgM (Payelle-Brogard et al., 2002). En efecto, el diagnóstico de esta neoplasia se define como una linfocitosis absoluta mayor a  $5 \times 10^6$  células/L dada por linfocitos de aspecto maduro e inmunofenotipo CD19+ CD5+ CD23+ CD20+ CD22-, con baja expresión de Ig de superficie (Binet et al., 2006). Su curso clínico es altamente heterogéneo, con pacientes que presentan una enfermedad indolente y estable durante muchos años y otros en los que la enfermedad progresa relativamente rápido y requiere terapia antineoplásica en forma repetitiva (Binet et al., 2006; Del Giudice et al., 2005; Montillo et al., 2005). Expresado en frecuencias, aproximadamente un tercio de los pacientes nunca requerirá tratamiento, otro tercio progresará lentamente hacia una enfermedad más agresiva y el tercio

restante será tratado al momento mismo de diagnóstico. Los dos sistemas de clasificación de la LLC más usados y conocidos mundialmente son los estadios de Rai (Rai et al., 1975) y Binet (Binet et al., 1977). **Tabla 1.** Los mismos influyen directamente sobre el esquema de tratamiento de la enfermedad. Así, fue posible dividir a los pacientes en 3 grupos de pronósticos conocidos: bueno (Rai 0 y 1, Binet A), intermedio (Rai II y III, Binet B) y malo (Rai IV, Binet C).

Clasificación	Características	Sobrevida
<b>Rai</b>		
<i>Estadio 0</i>	-Linfocitosis en sangre y MO únicamente	12 años
<i>Estadio I</i>	-Linfocitosis y linfadenopatía	
<i>Estadio II</i>	-Linfocitosis y esplenomegalia o hepatomegalia	7 años
<i>Estadio III</i>	-Linfocitosis y anemia (Hb<110 g/L)	
<i>Estadio IV</i>	-Linfocitosis y trombocitopenia (plaquetas<100.10 <sup>9</sup> /L)	< 1 año
<b>Binet</b>		
<i>Estadio A</i>	-Menos de 3 sitios infiltrados <sup>1</sup> , Hb>100 g/L, plaquetas>100.10 <sup>9</sup> /L	9 años
<i>Estadio B</i>	-3 o más sitios infiltrados, Hb>100 g/L, plaquetas>100.10 <sup>9</sup> /L	5 años
<i>Estadio C</i>	-Hb<100 g/L o plaquetas < 100.10 <sup>9</sup> /L	2 años

**Tabla 1. Sistemas Rai y Binet de clasificación para los estadios de pacientes LLC.**

Rai y Binet son los sistemas de clasificación basados en parámetros clínicos y de laboratorio más difundido. Hb: Hemoglobina, MO: médula ósea. <sup>1</sup>Sitios infiltrados pueden ser: hígado, bazo y ganglios linfáticos inguinales, axilares y cervicales.

Esta clasificación, sin embargo, no permite pronosticar si un paciente del grupo bueno o intermedio va a progresar, ni de qué forma (Dighiero et al., 1998). En este sentido estudios realizados en los últimos años han demostrado que la heterogeneidad de la LLC a nivel clínico se correlaciona con heterogeneidad a nivel de la célula leucémica. Son numerosos los marcadores biológicos que se expresan en forma diferencial en las células leucémicas de pacientes de buen o mal pronóstico. Entre ellos se destaca la presencia o no de mutaciones

somáticas en la porción variable de la cadena pesada de la Ig clonal (IgVH) (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 1999). Los pacientes con IgVH no mutados presentan una enfermedad más agresiva. Las frecuencias estudiadas indican que la falta de mutaciones en los genes VH de la Ig del clon leucémico conducen a la muerte de 50% de los pacientes de 6 a 8 años después del diagnóstico, aún bajo tratamiento; mientras que los enfermos con IgVH mutadas presentan una enfermedad indolente con una media de sobrevida superior a los 20 años (Hamblin et al., 1999).

## **1.2 Anomalías cromosómicas en LLC**

Si bien en la LLC no se encuentran translocaciones específicas como ocurre en otras neoplasias hematológicas, diferentes estudios han encontrado asociación entre rearrreglos estructurales y/o cariotipos complejos con progresión de la enfermedad, menor sobrevida libre de tratamiento e inclusive escasa respuesta a la quimioterapia (Dohner et al., 2000). Estos estudios mostraron como anomalía más frecuente la delección de 13q, seguida de trisomía 12 y de las delecciones 11q y 17p. Estas anomalías fueron asimismo asociadas a diferentes características morfológicas y de evolución clínica, estableciéndose un modelo jerárquico de riesgo citogenético, donde las delecciones 17p y 11q constituyen las alteraciones de mayor agresividad.

La delección 13q14 se puede observar predominantemente en la forma indolente de la LLC y está asociada con bajos niveles de la expresión de ZAP70 y mutaciones en los genes de la región variable de las inmunoglobulinas (Calin et al., 2005). En contraste, la forma agresiva de la LLC presenta genes no mutados en la región variable de la inmunoglobulina y alta expresión de ZAP70 (Herling et al, 2006). Esta delección fue observada en linfomas de células de manto, en una menor frecuencia en mieloma múltiple, DLBCL, linfomas de células T maduras y en varios tumores sólidos (Avet-Loiseau H. et al.1999; Rosenwald A. et al. 1999). Esto indica que uno o más genes supresores de tumor en 13q14 son importantes en la iniciación y/o progresión de estas enfermedades.

La implicación patogénica de la trisomía 12 en LLC sigue sin resolverse (Winkler

D. et al. 2005). Aunque se propone que un proto-oncogen putativo (CLLU1) puede tener una elevada dosis de genes debido a la trisomía.

La delección 11q presenta una región crítica de 2-3 Mb ubicada entre 11q22.3-q23.1, que contiene varios genes entre los que se encuentra ATM (ataxia telangiectasia mutated) (11q22.3), siendo el gen crítico de esta alteración. Este gen codifica para una proteína serina-teorina quinasa, cuya actividad es inducida por roturas de doble cadena del ADN. La proteína ATM presenta una función importante en la protección de la integridad del genoma manteniendo la estabilidad telomérica, activando los mecanismos de reparación del ADN y regulando la apoptosis mediada por p53. La disminución de la expresión de ATM determina pérdida del control del ciclo celular y disfunción de p53 (Ditch and Paull, 2012). Particularmente en CLL, el 10-20% de los pacientes presentan dicha delección. La misma es una alteración frecuente, de aparición tardía y observada principalmente en individuos menores de 55 años, presentando un cuadro clínico con extensas adenopatías, enfermedad progresiva y de corta vida. Un subgrupo de pacientes puede además presentar una mutación en el alelo restante, lo cual llevará a la inactivación total del gen, situación que se encuentra asociada a expansión clonal y progresión de la enfermedad (Zenz et al., 2011).

La otra anomalía importante implicada en la progresión y resistencia al tratamiento en LLC es aquella que implica la pérdida del gen TP53, la delección 17p13.1. TP53 regula los mecanismos de estrés extra celular, activación oncogénica y daño al ADN, y permite que la célula reaccione adecuadamente frente a estos estímulos ya sea controlando el ciclo celular o mediante la inducción de apoptosis (Zenz et al., 2010). La delección 17p13.1 se observa en el 5-7% de pacientes con estadíos iniciales y en el 25-40% de los casos con enfermedad avanzada o refractaria. Su detección al igual que la delección del gen ATM resultan de gran importancia clínica, dada su asociación con mala evolución de la enfermedad, la corta sobrevida y la resistencia al tratamiento (Mohr et al. 2011).



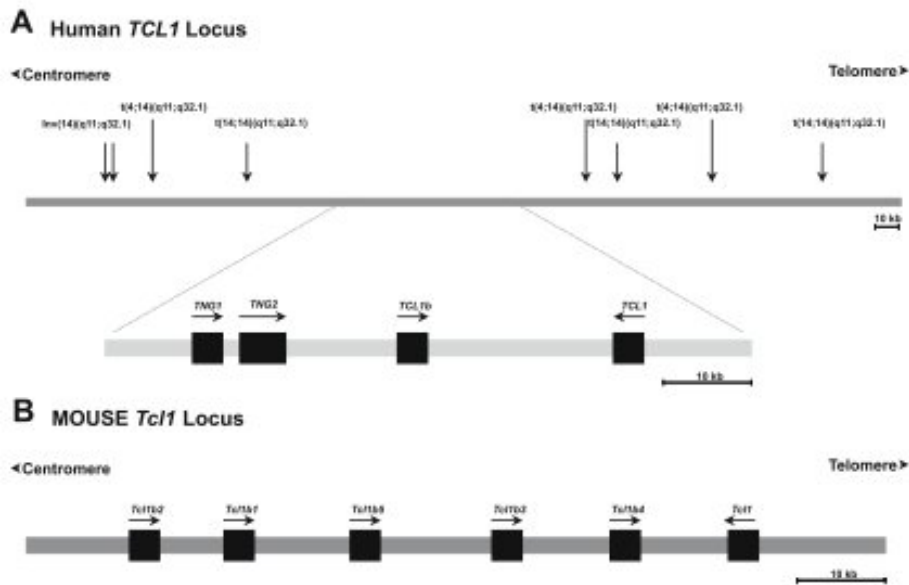
### 1.3 TCL1: oncogén

La aberración cromosomal más común asociadas a las leucemias de células T maduras es la 14q32.1. En este se encuentra el locus de TCL1 ( T cell leukemia/lymphoma) que contiene el oncogen TCL1, blanco de translocación e inversiones. Se observa con mayor frecuencia rearrreglos del locus TCL1 con el locus del TCR alfa/gama en 14q11 (Russo et al., 1989; Virgilio et al., 1993). Este rearrreglo incluyen inversiones  $inv(14)(q11;q32)$  y translocaciones  $t(14)(q11;32)$ . Dado que ambos loci están localizados en el mismo cromosoma, ambos rearrreglos cromosómicos son recíprocos. En el caso de la inversión  $inv(14)(q11;32)$  el rearrreglo del locus de TCL1 se juxtapone con el del receptor TCR alfa/gamma dando como resultado una anomalía en el cromosoma 14. La translocación  $t(14;14)(11q;q32)$  que resulta en la anomalía del cromosoma 14, contiene dos copias del locus de TCL1: la copia normal en la parte distal del cromosoma y una copia rearrreglada en la proximidad del segmento J del receptor TCR alfa/gamma. En ambos casos el locus TCL1 se juxtapone con los elementos regulatorios del receptor TCR, lo que hace posible que estos elementos sean responsables de la activación de TCL1 (Virgilio et al. 1994).

Especialmente,  $inv(14)(q11;q32)$  y  $t(14;14)(q11;q32)$  fueron observados no solo en pacientes con células T maduras leucémicas sino también en condiciones de pre leucemia (Narducci et al., 1995; Thick et al.1996). Esto sugiere que rearrreglos en el locus de TCL1 ocurre en etapas tempranas de la patogénesis de las células T leucémicas maduras y que la activación del locus de TCL1 es probablemente un suceso que causa el desarrollo de esta enfermedad.

En 1994 se aisló el gen TCL1 y varios años después se completó la caracterización del locus de TCL1 (Hallas et al. 1999; Pekarsky et al.1999) aislandose 3 genes más. El gen TCL1b está localizado 15kb centromérico de TCL1 con una orientación transcripcional opuesta (**Figura 1**; Pekarsky et al.1999). El gen *tcl1* incluye 4 exones que codifican un péptido de 114 aminoácidos (Virgilio et. al 1994). TCL1b también consiste en 4 exones pero codifican un polipéptido más largo de 128 aa. En forma interesante, *tcl1b* muestra un 60% de similitud con TCL1 a nivel aminoácidico (Pekarky et a. 1999). Por otro lado, la proteína de *tcl1* es también homólogo al producto de *Mtcp1*. El gen

Mtcp1 está localizado en Xq28 y se activa en casos raros de leucemias de células T maduras con la translocación t(X, 14) (q28; q11) (Stern et al. 1993; Madani et al. 1996). Por lo tanto el estudio del locus de Tcl1 resultó de la identificación de una nueva familia de proteínas de tcl1 conteniendo tres proteínas: tcl1, tcl1b, y Mtcp1.



**Figura 1. Organización genómica de locus TCL1 en humano y ratón.** A: Locus humano B: locus murino. *Flechas verticales*: representan puntos de quiebre del clonado 14q32.1 a partir de T-LLP/T-LLC.

El control de la expresión de la familia de TCL1 es crucial para la salud del organismo. Niveles bajos de TCL1 puede tener efectos perjudiciales en la reproducción y el desarrollo, mientras que niveles altos puede predisponer al cáncer (Narducci et al. 2002; Kang et al., 2005). Normalmente, la proteína Tcl1 humana se expresa en embriones tempranos y en tejidos fetales, en células germinales, y en células B y T tempranas (Virgilio et al., 1994; Narducci et al., 1997). También se han observado niveles altos de expresión de TCL1 en una variedad de tumores derivados de líneas celulares de linfocitos B que van desde pre-células B a células B maduras (Takizawa et. Al 1998; Narducci et al. 2000). Particularmente en lo que resulta a la LLC, ha sido descrito que la desregulación de TCL1 en células B leucémicas es responsable del desarrollo de la forma

agresiva de LLC. .

Se han realizado varios estudios sobre la familia de genes de tcl1 murino en el cromosoma 12. Gracias a ello se descubrió que el locus tcl1 murino contiene 6 genes: un gen tcl1 y 5 genes tcl1b (tcl1b1-5) localizados dentro del locus genómico de 80kb. Tcl1b codifica para proteínas homologas y estos 5 genes se expresan al menos a nivel de ARNm. Los 5 tcl1b y los ARNm son abundantes en oocitos murinos pero raramente en tejidos adultos y en líneas celulares linfoides. La proteína TCL1 murino muestra un 50% de homología con el TCL1 humano y se expresan en células B y T maduras así como en el bazo adulto y en el timo (Hallas et. Al 1999).

### **1.3.1 Función biológica de TCL1**

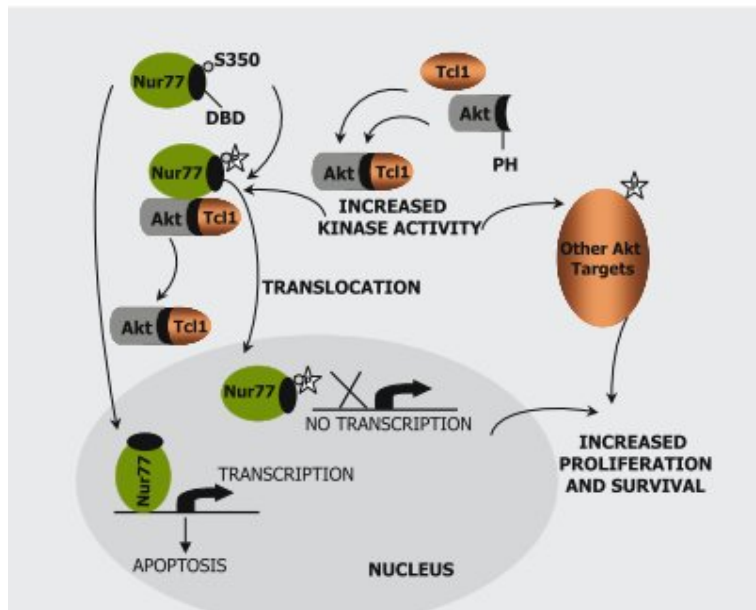
La función biológica de TCL1 no era conocida hasta varios años atrás cuando se encontró que TCL1 es también conocido por ser un coactivador de la oncoproteína AKT y de la vía de transcripción de NF- $\kappa$ B (Laine et al. 2000; Perasky et al. 2000).

La proteína quinasa AKT es un regulador central en varios procesos celulares, incluyendo proliferación y supervivencia de las células mamíferas. Una vez activado por señales recibidas del ambiente, la fosforilación de los residuos de serinas y treonina son blancos de proteínas que controlan estos procesos. Sin embargo, una señal de AKT fuerte o descontrolada también permite la progresión del tumor por la sobre expresión crucial de señales de la vía que regulan, por ejemplo, la supervivencia celular, translocación proteica y la progresión del ciclo celular (Chan et al.1999).

Experimentos de coimmunoprecipitación demostraron que TCL1 y AKT interactúan físicamente y el dominio PH de AKT es el responsable de esta asociación (Perkarsky et al. 2000). Un estudio reciente demostró que la dimerización de TCL1 está unido físicamente a AKT resultando en un complejo multimérico mostrando una aumento en la actividad de AKT (Laine et al. 2000; Perkarsky et al. 2000).

Varios blanco de fosforilación de AKT han sido reportados en los últimos tiempos. Ha sido importante detectar cuál de estos blanco afectado por la expresión de TCL1 es significativo en la patogénesis de la LLC-B.

En la **Figura 2** muestra una representación de la vía de TCL1-AKT-Nur77.



**Figura 2. Representación de la vía TCL1-AKT-Nur77.** TCL1 se une a AKT, aumentando su actividad quínica, y transloca parcialmente a AKT al núcleo. Los niveles de fosforilación de los blancos de AKT aumentan, resultando del aumento en la supervivencia celular y la resistencia a la apoptosis. Normalmente Nur77 funciona como un factor de transcripción, pero, cuando es fosforilado por Akt, ese no se puede unir al ADN y por lo tanto se inactiva.

Las variaciones en la expresión de TCL1 sugieren que los niveles de la proteína de éste podrían sufrir cambios cíclicos durante el crecimiento de células tumorales.

## 1.4 Modelos murinos de Leucemia Linfoide Crónica

### 1.4.1 New Zealand murino

Como se mencionado anteriormente las células LLC en general expresan CD5 en su superficie. Existen dos cepas de ratones donde la expansión de las células CD5+ se da de forma natural. Una de las cepas es la New Zealand blanco (NZW) (Hamano et al., 1998), donde en una fracción de los ratones más adultos esta expansión celular de B-1 CD5+ puede llegar a generar una enfermedad con características de LLC. La proliferación de las células B1 ha sido relacionada con la susceptibilidad de tres locis principales, que se encuentran en el cromosoma 17 y 13. La segunda cepa es la New Zealand negro (NZB), donde la expansión clonal de las células B inmunosupresoras se encuentran en el bazo de los ratones adultos. Esta expansión progresará en una LLC en la mayoría de los ratones mayores (Philips et al, 1992; Raveche, 1990). Estas dos cepas de ratón han proporcionado el link entre LLC y autoinmunidad.

En efecto, el híbrido F1 proveniente de la descendencia del retrocruzamiento NZBxNZW, desarrolla espontáneamente una enfermedad con características del Lupus Eritematoso Sistémico con glomerulonefritis causada por la deposición de IgM, por títulos altos de anti-DNA y anticuerpos anti-eritrocitos, comparados con las cepas paternas (Okada et al., 1990; Tokado et al., 1991).

En contraste, los híbridos NZBxNZW muestran baja incidencia de células B malignas comparadas con las cepas puras de NZB y NZW (Scaglione et al. 2007).

Estudios posteriores demostraron que el desarrollo tanto de LLC como enfermedades autoinmunes dependen de los haplotipos de MCH de los padres NZB, NZW y de sus progenitores. En consecuencia, la heterocigosis del MHC predispone una enfermedad tipo LES mientras que una homocigosis del MCH predispone una enfermedad tipo LLC.

Varios estudios llevados a cabo en ratones NZB y NZW han demostrado distintos roles de las citoquinas en el desarrollo de LES y LLC. En este sentido, Ramachandra y trabajadores (Ramachandra et al, 1996) mostraron que altos niveles de interleuquina 10 en NZB está relacionado con la transformación de

células B1. Conforme con el rol de IL-10 en LLC desarrollado en este modelo murino, el agotamiento de IL-10 ya sea por la delección dirigida del gen de IL-10 (Czarneski et al, 2004) o por la administración in vivo del antiseno de la IL-10 (Parker et al. 2000; Peng et al. 1995), retrasa e incluso evita el desarrollo de LLC. IL-5 es otro miembro de la familia de interluquina que parece jugar un rol importante como un switch del desarrollo de LES o LLC. Varios estudios (Herron et al. 1998; Kanno et al. 1992; Umland et al. 1989) muestran que las células B1 en el ratón F1 (NZBxNZW) son hipersensibles a IL-5. En efecto, la activación in vitro de estas células B1 con IL-5 resulta en la diferenciación de estas células a células de Mott (Jinag et al, 1997) y una sobre producción de IgM (Herron et al. 1998; Kanno et al. 1992; Umland et al. 1989) , sugiriendo fuertemente que la sobreproducción de IL-5 puede exacerbar la enfermedad.

La relevancia de las cepas del ratón New Zealand, y en particular la cepa NWB, como un modelo de LLC puede resumirse en las siguientes características: **1)** Es un modelo de aparición tardía de LLC de origen natural que se asemeja a la LLC humana; **2)** las células transformadas son B220<sup>low</sup>IgM<sup>high</sup>CD5<sup>+</sup>, expresan la cadena-zeta asociada a la proteína quinasa (ZAP)-70 y tienen secuencias germinales de Ig; **3)** las células transformadas muestran defectos en la reparación del ADN e inestabilidad cromosómica.; **4)** el ratón desarrolla características clínicas observadas en pacientes con LLC, como la anemia hemolítica autoinmune; y **5)** La LLC desarrollada en estos ratones puede ser trasplantado a ratones receptores, que lo hacen adecuados para estudios preclínicos (Scaglione et al. 2007). La identificación de genes que representan predisposición a la LLC y/o LES en estas cepas de ratón y también los factores extrínsecos que influyen el desarrollo tanto para LLC como para LES pueden ser un gran avance en la comprensión de los mecanismos que gobiernan la autoinmunidad y la tumorigenesis.

#### 1.4.2 Traf2DN/Bcl2 murino

Gracias a los descubrimientos de los roles de mir15a/16.1 en LLC se creó un importante vínculo entre las aberraciones genómicas y la alta expresión de los niveles de Bcl2 en la mayoría de los ejemplos de LLC. Este descubrimiento sugiere que la desregulación de Bcl2 puede ser una importante contribución en la patogénesis de LLC, especialmente en los pacientes indolentes que frecuentemente acompaña una delección en 13q14. Zapata y sus colaboradores (Zapata et al 2004) tomaron ventaja sobre dos modelos murinos desarrollados previamente, un modelo sobre expresando Bcl-2 en el sistema linfoide murino (Katsumata et al, 1992) y el otro modelo sobre expresando la isoforma de TRAF2 en la células B y T de ratón (Lee et al. 1997). El receptor TNF asociado al factor 2 (TRAF2) es miembro de una familia conservada de proteínas adaptadoras se unen al receptor de la familia TNF y media la activación de NFK $\beta$  y JNK mediante el factor necrótico tumoral (Chung et al 2002). Esta señal mediada por TNF conduce al aumento de la proliferación y supervivencia linfocítica (Haiat et al., 2006).

El ratón transgénico Bcl2 fue producido mediante el uso de una construcción que imita la translocación t(14,18) y la yuxtaposición del oncogén Bcl2 con el locus de la cadena pesada de Ig en 14q13, observadas en los linfomas foliculares humano. Este ratón no desarrolla ningún fenotipo humano pero muestra una expansión policlonal de células B y prolonga la sobre vida de estas células in vitro (Katsumata et al, 1992). En contraste con el simple transgénico, el doble transgénico TRAF2 DN/Bcl2 con el tiempo desarrolla esplenomegalia severa y en la mayoría de los animales desarrolla leucemia en células B similares a LLC con un recuento de células B en sangre de hasta 40 veces mayor de lo normal (Zapata et al 2004). Este ratón muere prematuramente a la edad de 6 a 14 meses, sin embargo Bcl2 o TRAF2DN simples transgénicos tiene una vida normal. Las células malignas eran B220+ CD5+, aunque un número bajo de ratones tuvieron células B en expansión de diferentes subtipos. Estas células muestran un aumento marcado en la sobre vida y fueron resistentes a la apoptosis inducido por agente quimioterapéuticos y glucocorticoides (Zapata et al 2004). Es interesante ver como las células B de TRAF2DN fueron también parcialmente resistente a la apoptosis inducidas por estas drogas, sugiriendo

que la inhibición funcional de TRAF2 puede proveer ventaja de supervivencia para estas células (Zapata et al 2004).

EL ratón TRAF2DN es en efecto un ratón deficiente de TRAF2. Las células B de TRAF2DN son deficientes para las activaciones de JNK y de la vía de NF- $\kappa$ B no canónica (NF- $\kappa$ B2). Semejante a los ratones Traf2DN y Traf2DN/Bcl-2, el ratón TRAF2-/- también tiene expansión de células B de la zona marginal (Pérez-Cacón et al., 2012). Además, las células B de este ratón son también deficientes en la activación de JNK, pero tienen una activación constitutiva de NF- $\kappa$ B2 y son más resistentes a la apoptosis. (Gardam et al., 2008; Grech et al., 2004).

Todos estos resultados sugieren que en el modelo murino Traf2DN/Bcl-2 de LLS/LLC, la deficiencia de Traf2 puede aumentar la resistencia a la apoptosis de un subconjunto de células B inducidas por miembros específicos de la familia TNF. Es también razonable la sobre activación de células B (por ejemplo, por antígeno), la ausencia de TRAF2 funcional puede directamente estimular las células B mediante vías alternativas de maduración, mientras que la sobre expresión de BCL-2 puede proteger estas células B de los estímulos apoptóticos involucrando vías intrínsecas y en última instancia promueven el desarrollo de neoplasias.

#### **1.4.3 APRIL: modelo murino**

Dado que NF- $\kappa$ B es un blanco “downstream” de TRAFs, es posible que la activación de NF- $\kappa$ B juegue un rol importante en la patogénesis de LLC-B. Un estudio reciente describió un modelo murino transgénico que expresaba específicamente APRIL (ligando inductor de la proliferación) bajo el control del promotor específico de células T Ick (Planelles et al., 2004). Dado que APRIL es una proteína secretada, su sobreexpresión en las células T causa niveles elevados de APRIL en suero. Por lo tanto APRIL trabaja sistemáticamente en estos transgénicos afectando la proliferación y la supervivencia de las células B (Planelles et al., 2004). APRIL y su estrecha relación con BAFF son dos miembros recientes de la superfamilia de TMF; expresándose exclusivamente en la mayoría de las células hematopoyéticas (Haiat et al., 2006). APRIL puede actuar como un estimulador de las células B y T in vitro, y su aplicación in vivo causa esplenomegalia debido a la expansión de células B (Haiat et al., 2006).



Ambos BAFF y APRIL muestran niveles altos de expresión en pacientes con varias células malignas incluyendo células linfoides grandes difusas, células del manto linfoides y LLC (Haiat et al., 2006). APRIL se une con mayor afinidad a dos receptores, BCMA (antígeno de célula B en maduración) y TACI (Haiat et al., 2006). BCM y TACI son miembros de la superfamilia de los receptores de TNF que interactúan con varios TRAFs y estimulan la vía NF- $\kappa$ B (Haiat et al., 2006). El transgénico murino APRIL no mostró alteraciones significativas en sus órganos linfoides (excepto un leve incremento de células B220+) hasta los 9 meses de edad (Planelles et al., 2004). Mediante citometría de flujo se observó una expansión significativa de células B220+ CD5+ en los nodos linfoides mesentéricos y en las placas de Peyer (Planelles et al., 2004). La incidencia y la severidad de estas alteraciones se incrementaron con el tiempo sugiriendo una expansión progresiva de células B CD5+ maduras. Esta expansión de células B maduras demostró un incremento importante en la sobrevivencia *in vitro* cuando se compara con los linfocitos B normales (Planelles et al., 2004). La expansión de células B220+ CD5+ fue observada en el 40% de los transgénicos. Generalmente, APRIL muestra un fenotipo mucho más leve que TCL1 o TRAF2dN/Bcl2 transgénicos. Transgenes APRIL muestran solo una leve expansión de células B del bazo, no desarrollan un recuento alto de glóbulos blancos y no mueren prematuramente por leucemia o linfoma (Planelles et al., 2004). Por lo tanto, es probable que April predisponga a las células B CD5+ a una transformación maligna, pero este evento también requiere un segundo golpe, como la sobreexpresión de Bcl2 o Tcl1.

#### **1.4.4 Modelos transgénico murino IgH-E $\mu$ -TCL1**

Bichi y colaboradores (Bichi et al., 2002) desarrollaron el modelo IgH-E $\mu$ -TCL1. En este modelo la expresión de TCL1 está bajo el control de el promotor Vh y en enhancers IgM-E $\mu$ , cuya actividad marca la expresión del transgen en células B maduras e inmaduras. Se puede observar como se amplían el bazo con una zona marginal superpoblada y el desarrollo de una población de células B expandidas B220 bajo IgM+CD5+. Esta expansión fue detectada en el 100% de los ratones a los 6 meses de edad, sin ninguna señal de la enfermedad (Bichi et al., 2002). Mediante citometría de flujo se observó una población con fenotipo homogéneo de CD5+ IgM+ expandida en la cavidad peritoneal empezando a los

2 meses de edad (44%) y se vuelve evidente en bazo (9%) a los 4 meses de edad y en la médula ósea a los 8 meses de edad (43%) (Bichi et al., 2002). A esta edad, los ratones transgénicos presentan un bazo ligeramente agrandado y un nivel celular alto en la cavidad peritoneal entre 50 a 100 veces mayor. Histopatología del bazo agrandado demuestra un incremento consistente en el tamaño de la zona marginal en la pulpa blanca. Cerca de los 13-18 meses de edad todos los ratones se vuelven visiblemente enfermos, presentando esplenomegalia y una marcada leucemia ( $180 \times 10^6$  células/ml) comparadas con el wt con  $2,8 \times 10^6$  células/ml.

Al igual que la forma más agresiva de CLL humana, la leucemia de ratones TCL1 utiliza los genes IGHV no mutadas, mostrando un uso sesgado de estos genes y estereotipia entre los casos del receptor de células B (BCR). También demostraron que estos BCR estereotipados reaccionaron con autoantígenos y antígenos que se encuentran en las membranas celulares bacteriana (Yan et al., 2006).

Neoplasias malignas secundarias también son complicaciones frecuentes en los pacientes con LLC-B (Robak, 2004) y son la causa más común de muerte en estos pacientes (Kyasa et al., 2004). Aumento del riesgo de neoplasias no hematológicas secundarias en pacientes con LLC-B tiene varias explicaciones, incluyendo la predisposición genética, deficiencia inmunológica, exposición a carcinógenos, y los efectos secundarios de los tratamientos terapéuticos (Perakh et al., 1999).

En el modelo murino LLC-B, el 25% de los cánceres secundarios fueron pilomatrixoma maligno, un tipo de cáncer de piel extremadamente rara en ratones. Hasta el momento, el modelo de E $\mu$ -TCL1 parece ser el único reportado que muestra la aparición de tumores malignos secundarios en ratones LLC-B-propensas (Zanesi et al., 2006).

Este modelo es usado como herramienta para el desarrollo de drogas preclínicas en LLC. En el 2006 Johnson y trabajadores (Johnson et al, 2006), demostraron que blancos terapéuticos relevantes como Bcl-2 , Mal-1 , Akt , PDK1, DNMT y p53wt se expresan en los linfocitos de este ratón transgénico y la sensibilidad de los agentes terapéuticos, in vitro son relevantes para el tratamiento de LLC

humano. Estudios in vivo utilizando ratones tcl1 transgénicos con leucemia establecida demostraron que el tratamiento con fludarabina resultó en reducción de células sanguíneas tumorales, en el tamaño del bazo, y en última instancia, una supervivencia prolongada. Los ratones Tcl1 impulsado por la LLC-B que ganaron inicialmente el beneficio clínico del tratamiento con fludarabina posteriormente se volvieron resistentes y, finalmente murieron de leucemia. Esta serie de estudios sugieren que el modelo transgénico murino de TCL1 es similar a la LLC-B humana, como también en su respuesta terapéutica y podría ser utilizado como una herramienta preclínica para evaluar nuevos fármacos para el tratamiento clínico de la LLC-B. La importancia de este modelo de ratón para el desarrollo de fármacos en la LLC-B es significativa, ya que hasta hace poco no se han descrito modelos animales adecuados para este propósito (Johnson et al, 2006).

Por otra parte, las células del ratón IgH-E $\mu$ -Tcl-1 fueron trasplantados en una ratón sinérgico para probar in vivo la eficacia de la rapamicina, un inhibidor farmacológico de la vía ATK/mTOR de la progresión de la enfermedad (Zanesis et al., 2006). El tratamiento con rapamicina prolongo significativamente la vida de todos los animales tratados comparados con los no tratados. Aunque, el efecto retardado de la rapamicina de los ratones con LLC fue relativamente corto y eventualmente, todos los ratones mueren de la enfermedad. Un enfoque similar fue también usado para mostrar la actividad anti-leucémica del disodio fosfatinib (R788), un inhibidor de Sky que bloquea la señal del BCR (Suljagic et al., 2010). El R788 efectivamente reduce la proliferación y la supervivencia de las células malignas sin afectar los linfocitos B normales (Suljagic et al., 2010).

Los diferentes modelos murino genéticamente modificados o cepas naturales que se describieron anteriormente han proporcionado información valiosa sobre los mecanismos moleculares que ayudan a comprender la transformación de LLC/LLS y su progresión. Sin embargo, al presente, el modelo transgénico E $\mu$ /TCL1 es el mejor modelo para emular una LLC humana progresora mediante la cual se evalúan diferentes terapias.

# OBJETIVOS

---

## Objetivo general

**Poner a punto las técnicas necesarias para evaluar el desarrollo de la Leucemia Linfóide Crónica (LLC) en el modelo transgénico E-mu /TCL1.**

## Objetivos específicos

**i. Evaluación de la presencia del transgen TCL1 humano a nivel genómico por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR cuantitativa, qPCR).**

Para evaluar la eficacia de la transgénesis (E-mu /TCL1) a nivel genómico, se utilizarán colas de los animales para confirmar la presencia del gen TCL1 mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

**ii. Estudios sobre la progresión de la LLC a través del análisis periódico por citometría de flujo en la sangre periférica y en el bazo de los ratones transgénicos.**

Para la verificación del aumento de células B CD5 positivas con fenotipo leucémico (CD5<sup>pos</sup> e IgM<sup>pos</sup>) por citometría de flujo, se utilizarán 2 anticuerpos conjugados a distintos fluoróforos, anti-CD5-PE y Anti-IgM-FITC.

**iii. Evaluación a nivel de RNAm de la expresión del transgen TCL1 humano en los diferentes órganos linfoides secundarios.**

Luego de la extracción de los órganos linfoides secundarios (bazo y ganglio) se realizará la técnica de Ficoll Hypaque para extraer las células mononucleares (PBMC - "peripheral blood mononuclear cells"-) utilizando Ficoll-Histopaque-1083 de Sigma-Aldrich. Posteriormente se procederá a la extracción de ARN para luego producir cDNA mediante la reacción de transcriptasa reversa. Por último se realizará qPCR para evaluar de los niveles de expresión de TCL1.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## **Soluciones y buffer utilizados**

### Tampón fosfato salino (PBS)

Solución preparada con NaCl 0,138M, KCl 0,027M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,078M y KHP04 0,015M; pH=7,4.

### Solución de Ficoll-Histopaque-1083

Para la purificación de células mononucleares de ratón se utilizó una solución isotónica de Ficoll Histopaque®-1083 de Sigma-Aldrich. Solución de polisucrosa y diatrizoato de sodio con una densidad de 1,077 g/l.

### Buffer de Lisis

Solución preparada con Proteínasa K de EUROBIO 100 µg/ml, 1M Tris pH 8, 5M NaCl, 0,5M EDTA pH 8, 10% SDS y H<sub>2</sub>O.

## **Anticuerpos**

Para los estudios de citometría se utilizaron los anticuerpos específicos CD5 marcado con ficoeritrina (PE) e IgM marcado con FITC, obtenidos de BioLegend.

## **Ratones seleccionados**

El modelo transgénico Emu/TCL1 fue obtenido del The Feinstein Institute for Medical Research, en colaboración con el grupo del doctor Nicholas Chiorazzi. A partir de estos ratones expandió la colonia en el bioterio del IPMÓNT. Con el objetivo de generar los respectivos controles negativos, se procedió a la cruce de un ratón F1 con un ratón B6 en el bioterio. Dicha cruce, F2, se cruzó entre sí para obtener así la F3, la cual proporcionó fuertemente el homocigota negativo para el TCL1 con el mismo background genético.

## **Extracción de ADN genómico a partir de colas**

Las biopsias de las colas de los ratones TCL1 y wt fueron realizados por el personal del bioterio del Instituto Pasteur según protocolo establecido por éste.

A cada cola se la coloca en nitrógeno líquido durante 1 minuto, luego se la trata con un mortero para obtener la mayor disgregación posible. Se las coloca en un tubo estéril de 1,5 ml y se le agrega a cada tubo 500µl buffer de lisis. Se las incuban a 37°C toda la noche, luego se añade 300µl de NaCl 5M saturado a cada tubo y se mezcla por inversión. Se deja reposar en hielo durante 10 minutos y se centrifuga a 9500 rpm a 10 minutos. Se remueve el sobrenadante a un tubo estéril que contiene EtOH 100% y se deja reposar 20 minutos a -20°C. Pasado los 20 minutos se centrifuga a 14000rpm a 10 minutos, se remueve el sobrenadante, se hacen dos lavados con EtOH 70% para eliminar las sales, se resuspende el ADN purificado y se almacena a -20°C.

## **Clonado del gen de interés en un vector de secuenciado**

El proceso de clonado implica un vector que aporta información necesaria para propagar el fragmento de ADN recombinante hacia la célula y presenta el ADN en cuestión.

Los vectores más comunes son los plásmidos. Estos tienen tres de las características deseables de un vector: pueden propagarse en forma independiente en el hospedador, son portadores de un tipo de marcador seleccionable y son capaces de recibir el fragmento de ADN recombinante.

En este trabajo se utilizó el plásmido pGEM®-T Easy Vector (Promega) que contiene timidina 3'-terminal en ambos extremos. La T- saliente en el sitio de inserción mejora la eficiencia de ligación de los productos de PCR porque previene la recircularización del vector y provee un saliente compatible para los productos de PCR generados por polimerasas como la Taq. Confiere resistencia a la ampicilina y el sitio múltiple de clonado está dentro del marco abierto de lectura del gen lacZ, que codifica para la β-galactosidasa. Una vez que el vector está dentro de la bacteria, el plásmido produce el fragmento α y la cepa de E. coli produce el fragmento ω, los dos fragmentos se completan, produciendo una β-galactosidasa funcional. Si las bacterias transformadas se inoculan en agar

con X-gal, las colonias presentan una coloración azul como resultado de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, indicando la complementación de la bacteria por el plásmido. Si en cambio al vector se le inserta un fragmento de ADN recombinante, las bacterias transformadas crecidas en un medio en agar con X-gal serán blancas. Esto es debido a que el inserto interrumpe el gen lacZ en el plásmido, por lo tanto el fragmento  $\alpha$  no se produce y ocasiona una  $\beta$ -galactosidasa no funcional.

Con el objetivo de obtener una curva de calibración para realizar la cuantificación del transgen TCL1 se purifico el producto amplificado de TCL1 a partir del gel de agarosa mediante el Kit de Purificación: Kit GFX PCR DNA and gel Band Purification (Amersham). Éste utiliza un agente caotrópico que desnaturaliza las proteínas, disuelve la agarosa y promueve la unión del DNA doble cadena a una matriz de fibra de Vidrio. Luego se procedió a la ligación del producto de PCR purificado con el pGEM-T easy mediante la enzima T4 DNA ligasa, los pasos y reactivos se realizaron según el protocolo proporcionado por PROMEGA.

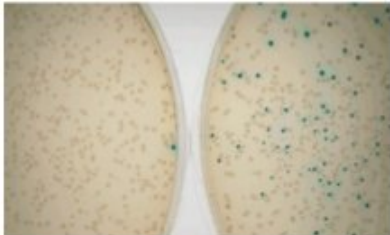
### **Transformación y digestión con enzimas de restricción**

La transformación permite la introducción de fragmentos de ADN foráneo en un organismo procarionta. Diversos tratamientos químicos o físicos que producen microporos en la célula, permite la introducción del DNA exógeno (transformación) de modo bastante eficiente. Uno de los métodos físicos es la electroporación, consistente en inducir la competencia mediante la aplicación de un pulso eléctrico muy breve e intenso. Solo un pequeño porcentaje de las células serán transformadas. Por lo tanto, las células deben ser sembradas en un medio selectivo para seleccionar las transformantes. Usualmente los plásmidos contienen un gen de resistencia a un antibiótico que permite esta selección. Sólo aquellas células que contengan el vector podrán crecer en el medio que contiene el antibiótico. Después de la transformación, las colonias bacterianas resultantes son analizadas mediante la digestión del vector por enzimas de restricción para determinar la presencia del fragmento (inserto) correcto o bien por PCR usando primers que flanquean el inserto. Las enzimas de restricción o endonucleasas de restricción son enzimas que reconocen

secuencias de ADN específicas y cortas, comúnmente palindrómicas (es decir, que la secuencia de nucleótidos en las dos cadenas complementarias de un segmento de ADN es la misma si se lee en la dirección 5' a 3'). Estas enzimas cortan el ADN de doble hebra en sitios específicos dentro o contiguo a ADN las secuencias de reconocimiento.

La transformación se realizó en bacterias E.coli de la cepa X L1-Blue y se obtuvo mediante electroporación. Estas cepas de E.coli presentan delección del operón Lac y un Episoma con el Gen Lac Z. Posteriormente se plaqueó el producto de la electroporación en placas conteniendo LB, X-Gal, IPTG y Ampicilina y se las incubó a 37°C por 24hrs. A las 24hrs se observó las colonias crecidas y se seleccionaron las colonias blancas. Para esto se las pico y se las agrego a un tubo que contenía LB y ampicilina. Se las incubó a 37°C 16hrs. Para poder extraer el plásmido del cultivo bacteriano se realizó una miniprep mediante el Kit GFX Micro Plasmid Prep Kit de Amersham. Dicho kit está diseñado para la extracción rápida de plásmidos de cultivo de E. Coli. Implica lisado alcalino de células y la adhesión del ADN a una matriz de fibra de vidrio. Los pasos y reactivos para la miniprep fueron proporcionados por el proveedor Amersham. Por último se realizó una digestión para confirmar el inserto. Para ello se utilizó las enzimas NcoI (Promega) y XhoI (Promega), estas enzimas son compatible, los pasos y reactivos se utilizaron según proveedor. Luego por PCR se confirmó el inserto liberado y el plásmido lineal. Se secuencio el plásmido para verificar que realmente el inserto era el gen TCL1.

Mediante el clonado y la transformación se logró cuantificar el número de copias de tcl1 por ml, pudiéndose construir una curva de calibración utilizada para discriminar la homocigosis de los ratones por qPCR.



**Figura 3. Imagen de colonias blancas y azules cultivadas en medio LB, X-gal, Ampicilina, IPTG. Colonias blancas: sin inserto, Colonias azules: con inserto.**



## **Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR cuantitativa; qPCR)**

La PCR cuantitativa es una técnica que permite amplificar secuencias específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN) más de un billón de veces y cuantificar una secuencia específica de ADN presente en la muestra biológica en estudio. La cuantificación del molde se logra mediante compuestos fluorescentes o fluoróforos que pueden proporcionar una detección de tipo no específica (como son los colorantes fluorescentes) o específica (como el caso de los cebadores y ondas fluorescentes). Dentro de los colorante fluorescentes el más utilizados es el SYBR GreenI que tiene la propiedad de unirse al ADN doble hebra de manera inespecífica, emitiendo hasta 1000 veces más fluorescencia cuando se encuentra unido al ADN que cuando está libre en solución . Por otro lado, el incremento de la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN doble hebra presente en el tubo de reacción y la misma se mide al final de la fase de extensión de la PCR. Su principal desventaja es la inespecificidad, ya que se une independientemente de la secuencia del ADN, pudiendo generar resultados falsos positivos al detectar ADN espurios como son por ejemplo los dímeros de cebadores de la reacción. Una forma de asegurar en estos casos la especificidad de la detección, es analizando las curvas de melting. Se puede lograr una mejor caracterización del producto de amplificación, sometiendo el mismo a una aumento de temperaturas para determinar la temperatura de disociación o melting point, características para cada producto, ya que depende de la longitud y composición nucleotídica del mismo. La presencia de dos o más picos, sugiere que se ha obtenido más de un amplificado y que el proceso de amplificación no fue específico para el ADN blanco.

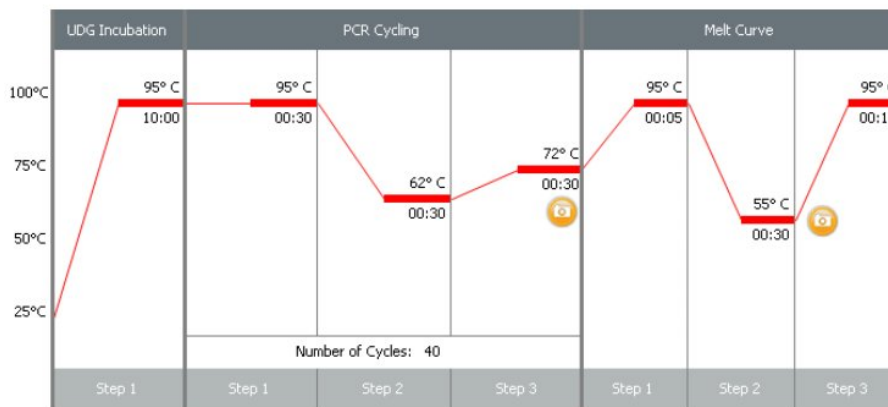
Durante la amplificación, la rapidez con que la señal fluorescente alcanza el nivel umbral (Threshold level), se correlaciona con la cantidad inicial de ADN blanco, permitiendo de esta manera poder cuantificarlo. El número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente alcance el nivel umbral, se conoce como Threshold cycle (Ct) y es el parámetro en el cual se fundamenta la cuantificación. A mayor Ct menor será la cantidad de ADN blanco o templado inicial.

Una de las ventajas fundamentales de la qPCR en relación con la PCR tradicional, es que en la primera de las mediciones se realizan en la etapa exponencial de la reacción donde en teoría, por cada ciclo de amplificación se acumula el doble del producto respecto al ciclo anterior, asumiendo una eficiencia del 100%. Por el contrario, en la PCR tradicional la detección de productos de amplificación se realiza en la fase plateau de la reacción, donde la misma ya se detuvo y hay degradación del producto. Por lo tanto, medidas realizadas en esta fase, no ofrecen resultados muy confiables en cuanto a la cantidad inicial del templado de la muestra. Un tipo de cuantificación es la absoluta, que se utiliza para cuantificar muestras desconocidas por interpolación a partir de una curva estándar, generada a partir de diluciones en serie de una muestra de concentración conocida del ADN blanco. La cuantificación relativa es utilizada para analizar cambios en la expresión de un gen en una muestra en relación a otra muestra de referencia, por ejemplo en respuesta a un tratamiento. Esas muestras de referencia contienen genes housekeeping los cuales normalmente no sufren cambio bajo las condiciones experimentales, sirviendo por lo tanto como estándares internos.

Primer	Secuencia	Tm
GAPDH Foward	5`atgccagtgagttccc 3`	62°C
GAPDH Reverse	5`ggtgctgagtatgtcgtgga 3`	62°C
TCL1 Foward	5`ggcagtcaccgaccc 3`	62°C
TCL1 Reverse	5`ggcctgctgcttctcgtc 3`	62°C

**Tabla 2. Resumen de primers utilizados.**

Para las qPCR se utilizó el SYBR Green Master de ROCHE, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los primers descritos en la Tabla 2 fueron seleccionados utilizando el programa Gene Runner v3.5 y el NTI VECTOR V10.0 (Invitrogen) para su análisis, optimizando variable como la Tm, ausencia de Hairpin loops, Loops internos y Dímeros con el fin de mejorar su eficiencia. Dichos primers fueron utilizados para las reacciones de qPCR.

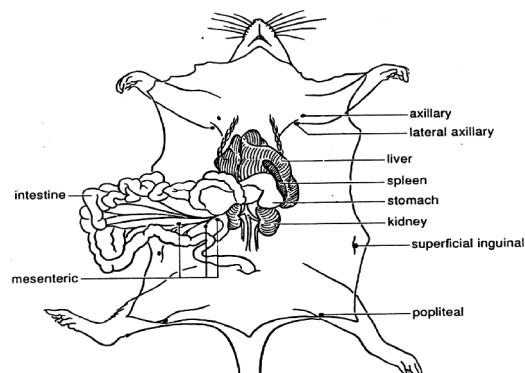


**Figura 4. Programa de qPCR utilizado.**

### **Eutanasia de ratones y extracción de órganos**

La eutanasia de los ratones TCL1 y wt se realizó en el bioterio del Instituto Pasteur, fue llevada a cabo por el personal del mismo mediante dióxido de carbono. Enseguida de la eutanasia del mismo se extrae la sangre periférica mediante punción cardíaca.

Para la extracción de los órganos se coloca al ratón boca arriba sobre un soporte. Mediante pinza se sujeta la piel ventral y se realiza una incisión longitudinal evitando la ruptura de los órganos. Se localiza el bazo, se extrae con pinzas cortando el tejido conectivo y se lo coloca en una placa de peyer con 1 ml de PBS. Luego se disecciona la parte axilar, se localizan los ganglios linfáticos, se extraen con pinzas y se los coloca en una placa de peyer con 1 ml de PBS.



**Figura 5: Esquema de órganos en una disección murina.**

## **Procesamiento del Bazo y Ganglios**

Se coloca el bazo en un Cell Strainer BD que se inserta en un tubo de 50 ml, mediante el embolo de la jeringa se presiona con movimientos circulares el bazo para su disgregación. A su vez se le agrega 1 ml de PBS gradualmente hasta llegar a 5 ml de PBS al Cell Strainer BD para facilitar la disgregación.

El mismo procedimiento se realiza para los ganglios.

## **Procesamiento de Sangre Periférica**

La sangre periférica obtenida mediante punción cardiaca se transfiere a un tubo de 2 ml y se lo diluye a la mitad con solución fisiológica, quedando como volumen final 2ml.

## **Obtención de células mononucleares totales y evaluación por citometría de flujo**

Para la obtención de células PBMC (del inglés peripheral blood mononuclear cell) de los órganos de ratón se realizó la técnica de Ficoll-Histopaque. El protocolo utilizado en este caso consistió en agregar el mismo volumen de Ficoll que contienen los órganos de los ratones (5ml para el ganglio y el bazo, 2 ml para la sangre periférica). A continuación se centrifuga a 23°C ,400g ,30 minutos (sin freno). Con pipeta se extrae la banda correspondiente a las células mononucleares, se sitúan formando un halo entre la capa superior de Ficoll y se las pasa a un tubo de 2ml. Luego se agregan 1ml de PBS y se centrifuga a 4°C, 5000rpm durante 1 minuto. Se descarta el sobrenadante en vaso bohemia con hipoclorito de sodio. Se lava con PBS 2 veces y se descarta el sobrenadante con el posterior agregado de 1 ml de medio de cultivo. Se realiza un conteo de células diluidas 1/30 y se coloca en un tubo de 1,5ml 1µl de células y 29 µl de medio de cultivo. Del total de células obtenidas, se extraen 10 millones, 5 millones se les agregan 1 ml de Trizol para la posterior extracción de ARN y a las 5 restantes se las reparte por parte iguales en tubos de 1,5 para luego ser marcadas con anticuerpos. El resto es almacenado a -80°C con DMSO (Dimetil sulfóxido).

Para la marcación por citometría de flujo se obtienen 3 alícuotas del producto de células extraídas del Ficoll. La primera se la incuba con Ac anti CD5 ficoeritrina

(PE) durante 30 minutos a 4°C con el fin de marcar la población de linfocitos T presentes para luego estudiarlas por el citómetro de flujo. La segunda se la incuba con Ac anti-IgM FITC durante 30 minutos a 4°C con el fin de marcar la población de linfocitos B presentes para luego estudiarlas por el citómetro de flujo. La tercera se incuba con Ac anti CD5-PE y Ac anti IgM-FITC con el fin de marcar la población de linfocitos B leucémicos para luego estudiarlas por el citómetro de flujo. A continuación se lava con PBS-BSA 0,5% para eliminar el Ac no unido y que quedo en solución, el lavado se realiza por triplicado.

El citómetro de flujo es un equipo capaz de medir componentes y propiedades de células y organelos celulares (partículas biológicas) que fluyen en una suspensión celular. Debido a las especiales características de los citómetros de flujo, la muestra a analizar debe encontrarse en forma de suspensión monodispersa. Para su análisis, las células en suspensión son forzadas a pasar, de una por vez, a través de un filamento muy delgado. Un haz de rayo láser incide en cada célula lo que resulta en la dispersión de la luz en distintas direcciones. Una serie de tubos multiplicadores (FM) detectan la luz dispersada brindando información acerca del tamaño, la granularidad complejidad células, como así también de la emisión de fluorescencia en el caso de que la célula haya unido un anticuerpo marcado con un fluorocromo. Para obtener información del tamaño y granularidad celular se utiliza la difracción frontal de la luz a 2°(forward scatter) cuyo valor es proporcional al tamaño celular y la dispersión de la luz a 90° (side scatter) cuyo valor es proporcional a la complejidad celular. Las intensidades de fluorescencia por otro lado se miden a diferentes longitudes de onda y de forma simultánea para cada una de las células.

En este ensayo se empleó la citomería de flujo como modo de seguimiento de la leucemización de los ratones en el tiempo, utilizándose anticuerpos específicos para la marcaciones de cada población celular; IgM (específico para linfocitos B) conjugado a FITC y CD5 (específico para linfocitos T normales y linfocitos B leucémicos) conjugado a ficoeritrina (PE).

## **Extracción de ARN a partir de células mononucleares previamente purificadas, determinación de la concentración y pureza del ARN**

Con el fin de extraer el ARN de las células mononucleares se utilizó el reactivo Trizol. El trizol es un reactivo monofásico comercial que incorpora una mezcla estable de fenol, isotiocianato de guanidinio (GuSCN), colorante y estabilizante que disuelve efectivamente ADN, ARN y proteínas en muestras de tejidos lisadas u homogeneizadas. Luego de adicionar el cloroformo y centrifugar, la mezcla se separa en tres fases: una fase acuosa conteniendo el ARN, una interface que tiene el ADN y una fase orgánica que contiene las proteínas. Cada componente puede ser aislado luego de separar las fases. Un ml de Trizol es suficiente para aislar ARN, ADN y proteínas de 50-100 mg de tejido, 5-10 x 10<sup>6</sup> células o 10 cm<sup>2</sup> de superficie de placa de cultivo para células que crecen en monocapa. Este procedimiento es muy efectivo en aislar ARN total de buena cantidad y en poco tiempo, pudiendo aislarse moléculas de ARN de todos los tipos entre 0,1 a 15kb de largo. Este ARN puede ser usado en Northern Blots, aislamiento de ARNm, clonado y PCR entre otros.

Para conocer la concentración del ARN total se midió la absorbancia de las muestras a 260nm y 280nm en espectrofotómetro. Una vez que se obtuvieron los valores de absorbancia de los distintos ARNs, a partir de la siguiente ecuación se puede conocer su concentración:

$$\text{Concentración de ARN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{Absorbancia } 260\text{nm}) \cdot (40)/1000$$

Sabiendo que 1 Densidad Óptica a 260nm (1 DO<sub>260</sub>) =40  $\mu\text{g}$  ARN. La relación de absorbancias 260/280 indica la pureza del ARN, considerándose las relaciones cercanas a 2.0 DO como óptima

### **Síntesis de ADNc (Retro Transcripción)**

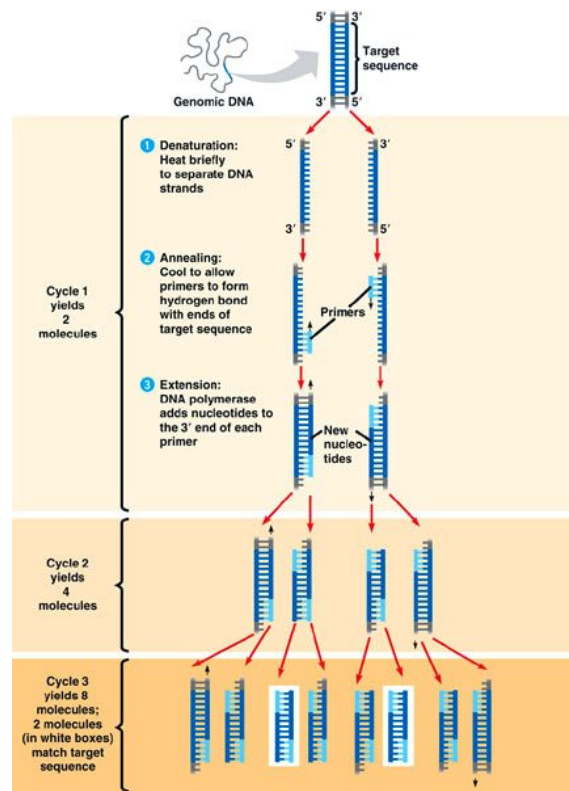
La finalidad de dicha técnica es obtener ADNc a partir del ARN extraído para poder utilizar dicho producto en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La cantidad de ARN utilizado para la RT fue siempre equivalente, para así poder realizar comparaciones en el grado de expresión. La técnica de retro transcripción consiste en la utilización de una enzima capaz de utilizar ARN simple hebra en presencia de un primer para sintetizar ADN complementario. La

enzima utilizada en los ensayos fue la Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT). Los pasos y reactivos para la reacción de retrotranscripción se siguieron de acuerdo al protocolo de la enzima proporcionado por Invitrogen, utilizando 1000ng de ARNm en cada reacción. Luego de finalizada la reacción el ADNc puede ser utilizado como molde para la amplificación en PCR.

### **Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y evaluación por electroforesis en gel**

La PCR es una técnica para la síntesis “in vitro” de secuencias específicas de ADN. Es una forma simple y muy rápida de multiplicar el ADN presente en diferentes muestras biológicas, obteniéndose millones de copias de una determinada secuencia de ADN. La PCR utiliza la enzima ADN polimerasa que dirige la síntesis de ADN a partir de sustratos desoxinucleóticos y actúa sobre una platilla de ADN monocatenario. La ADN polimerasa sintetiza ADN en dirección 5' a 3' y puede agregar nucleótidos en el extremo 3' de un oligonucleótido diseñado a medida. Por lo tanto, el ADN que se va a amplificar se desnaturaliza y los oligonucleótidos se unen con sus secuencias complementarias. En este momento se agregan a la reacción los sustratos de ADN polimerasa, desoxinucleóticos y la enzima extiende los dos cebadores. Esta reacción produce ADN bicatenario sobre la región de interés de ambas cadenas de ADN. De esta manera, en este primer ciclo de la reacción de PCR se obtiene dos copias bicatenarias del fragmento original de ADN.

Luego, el ADN se somete a otro ciclo de desnaturalización y síntesis con los mismos cebadores para obtener cuatro copias del fragmento evaluado. Por consiguiente, la realización de ciclos nuevos de desnaturalización y síntesis de ADN dirigida por el cebador amplifica la región entre los dos cebadores de forma geométrica (2, 4, 8, 16, 32, 64, etc). Entonces, un fragmento de ADN que primero estaba presente en cantidades muy escasas se amplifica hasta obtener una cantidad relativamente grande de ADN bicatenario.



**Figura 6. Esquema de la reacción de PCR.**

En los siguientes ensayos se utilizó la enzima Taq ADN polimerasa con los reactivos y condiciones establecidas por el proveedor (FERMENTAS). La taq ADN polimerasa es altamente termoestable extraída de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, lo cual la hace muy estable a temperaturas de 95°C, permitiendo llevar a cabo la reacción de PCR.

Los ciclos de reacción en el termociclador se establecieron de acuerdo al fragmento a amplificar y las propiedades de los Primers ( $T_m$ , %GC).

Se utilizó el siguiente programa:

<u>94°C-----5min</u>	} 30 repeticiones
95°C-----30 segundos	
62°C-----30 segundos	
<u>72°C-----30 segundos</u>	
72°C-----5 minutos	



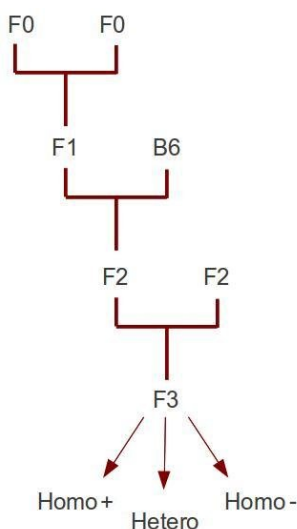
Una vez obtenido el producto de PCR se procede a su evaluación mediante la electroforesis en gel. Esta técnica es utilizada para la separación de moléculas de ADN en gel. Las moléculas lineales de ADN se separan de acuerdo con su tamaño cuando se someten a un campo eléctrico a través de una matriz de gel, que es un material poroso inerte. Las moléculas de ADN tienen carga negativa y al ser sometidas a un campo eléctrico migran a través del gel hacia el polo positivo. Los poros en la matriz de gel tamizan las moléculas de ADN de acuerdo con su volumen, por lo tanto las moléculas grandes migran con mayor lentitud, mientras que las moléculas de ADN más pequeñas lo hacen más rápido.

Una vez finalizada la electroforesis, es posible detectar las moléculas de ADN por medio de la tinción del gel con colorantes fluorescentes, como bromuro de etidio, que se une al ADN y se intercala entre las bases apiladas. Cada banda revela la presencia de una población de moléculas de ADN que poseen un tamaño específico. Las matrices de gel utilizadas pueden ser de dos tipos: la poliacrilamida y la agarosa. La poliacrilamida tiene una capacidad elevada de resolución pero solo puede separar las moléculas de ADN dentro de un intervalo de tamaño estrecho. La agarosa por otro lado tiene una capacidad resolutive menor que la poliacrilamida pero permite diferenciar moléculas de ADN que cuentan con decenas o incluso centenas de kilo pares de bases (Kb). En los ensayos se utilizó electroforesis horizontal en gel de agarosa con una concentración de entre 1,5 y 2.0% (según la extensión del fragmento) adicionado del colorante fluorescente Bromuro de Etidio (0,5 µg/ml) para resolver los productos de PCR.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## i. Evaluación del transgen TCL1 humano a nivel genómico por qPCR

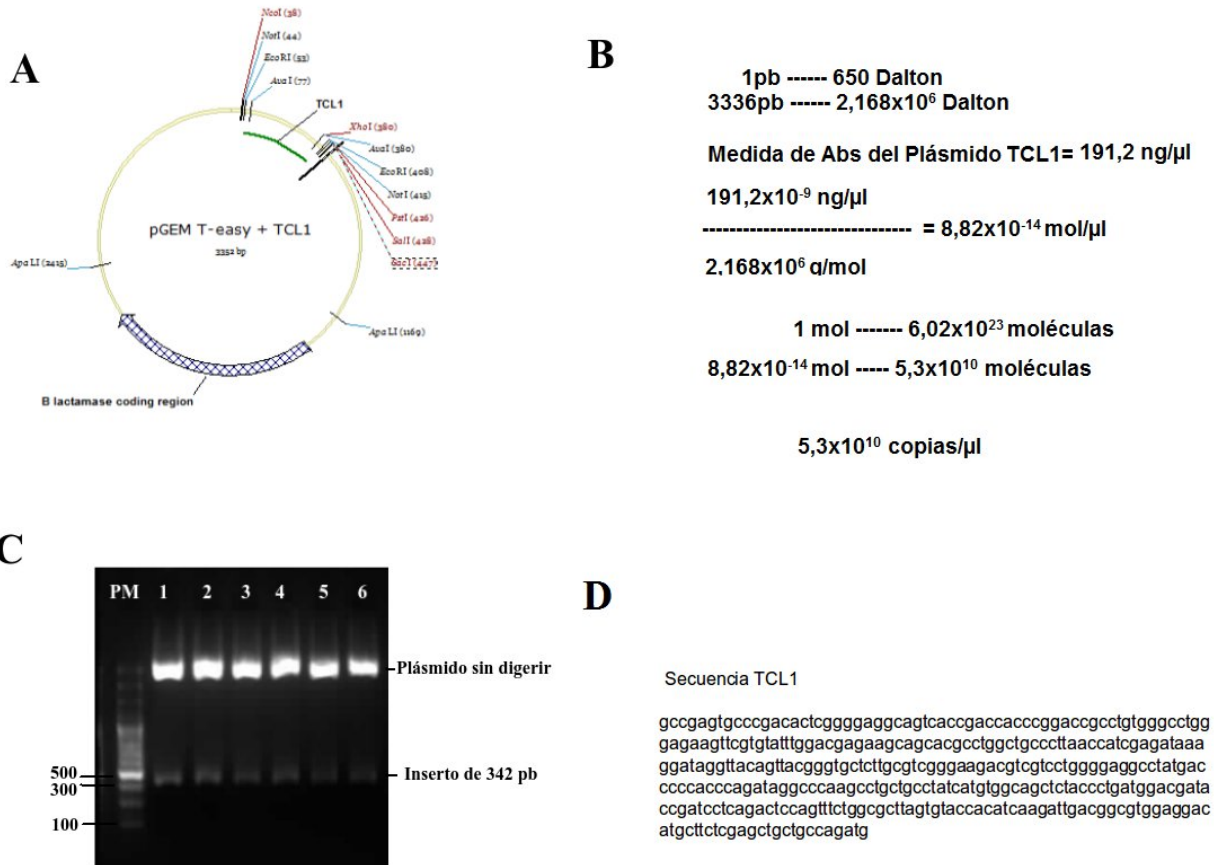
En la **Figura 7** se puede observar la organización de la colonia de TCL1 y las cruzas realizadas. Como se ha mencionado anteriormente se partieron de 5 ratones TCL1 obtenidos del The Feinstein Institute for Medical Research, en colaboración con el grupo del doctor Nicholas Chiorazzi. A partir de ellos se realizó la primera cruce F0xF0 con el fin de aumentar la colonia de TCL1, la segunda cruce F1xB6 generó el heterocigota para TCL1, ya que B6 es una cepa wt para TCL1 y a su vez comparte homología con el background genético de TCL1. La última cruce F2xF2 generó tres genotipos diferentes para TCL1; Homocigota positiva, Heterocigota y Homocigota negativo. Se puede concluir que se logró el objetivo de estabilizar la colonia TCL1, obteniendo el Homocigota negativo que fue fundamental para cumplir los objetivos de este trabajo.



	F0	F1	F2	F3
Hembras	2	2	6	10
Machos	3	5	7	8
Genotipos	Homocigota +	Homocigota +	Heterocigota	Heterocigota Homocigota + Homocigota -

**Figura 7. Organización de la colonia TCL1 y sus cruzas correspondientes.**

Para la colonia F3 se realizaron ensayos de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuyo objetivo fue discriminar los tres genotipos diferentes de esta colonia. Para ello se construyó una curva de calibración a partir de un plásmido que contenía el transgen TCL1. Como se describe en Materiales y Métodos el transgen TCL1 fue clonado con el plásmido p-GEM para luego ser transformado en células E.coli. Luego de la selección de las colonias, se extrajo el plásmido y se lo mandó secuenciar para confirmar la presencia del transgen TCL1. Una vez obtenido el plásmido purificado se calculó el peso de dicho plásmido con el inserto a partir de la cantidad de pares de bases que posee. Luego un alícuota de ese plásmido purificado es medida por absorbancia en un espectrofotómetro obteniéndose la cantidad de ADN plasmídico en ng/ml. De esta forma se pudo relacionar el número de copias con el volumen del plásmido purificado y así construir la curva de calibración. **Figura 8.B.** En la **Figura 8.A** se puede observar un esquema del plásmido con el inserto de TCL1 y las correspondientes enzimas de restricción subsiguientes al gen TCL1. Las enzimas NcoI y Xho fueron las elegidas para liberar el inserto TCL1, como se muestra en la **Figura 8.C** la liberación del inserto tuvo éxito en las colonias seleccionadas ya que se observa dos productos de amplificación. La banda de más peso molecular corresponde al plásmido lineal mientras que la banda de menor peso molecular corresponde al transgen TCL1. Luego se incide la banda más pequeña y se secuenciar, obteniendo la secuencia del transgen TCL1 **.Figura 8 D.**

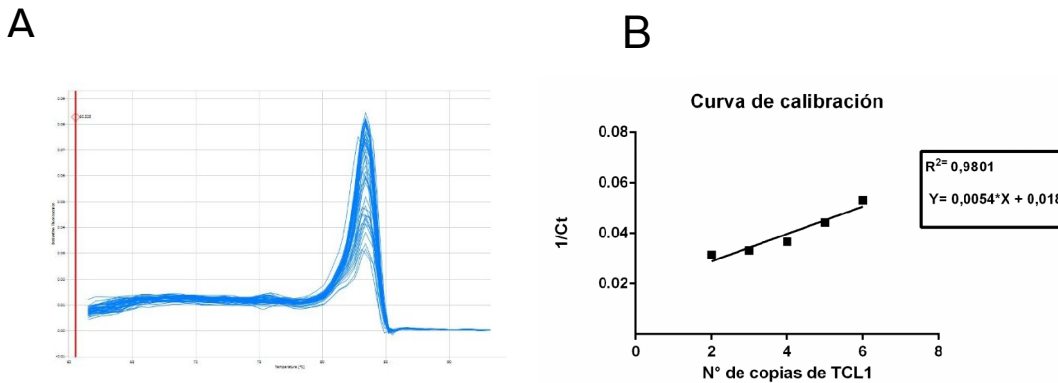


**Figura 8. A- Esquema del plásmido p-Gem y el transgen TCL1. B- Cálculos para la construcción de la curva de calibración. C- Amplificación del producto de corte con NcoI y Xho de las colonias 1, 2, 3, 4, 5 y 6. D- Secuencia del transgen TCL1**

Luego de la realización de la extracción de ADN genómico se realizó el ensayo de qPCR para lograr discriminar los diferentes genotipos de los ratones F3, utilizando el programa de qPCR **Figura 4** y los primers de TCL1 genómico detallados en la **Tabla 2** de la sección Materiales y Métodos. La metodología consiste en amplificar mediante la reacción de qPCR el transgen TCL1 de los ADN genómicos, lo cual se obtiene los correspondientes Ct y mediante la curva de calibración mencionada anteriormente se logra interpolar dichos Ct, obteniendo así los números de copias de gen TCL1 de cada ratón. Los ct de cada ratón y de la curva de calibración se determinaron con un "Threshold" de 0,233.

En la **Figura 9A** se muestra la gráfica de "melting" pudiéndose observar un solo pico entre 80°C-85°C, esto significa que la amplificación fue específica para el transgen TCL1. Además la curva de calibración se comporta como un modelo lineal debido a que se observa una tendencia lineal y muestra un  $R^2 = 0,98$ .

**Figura 9B**

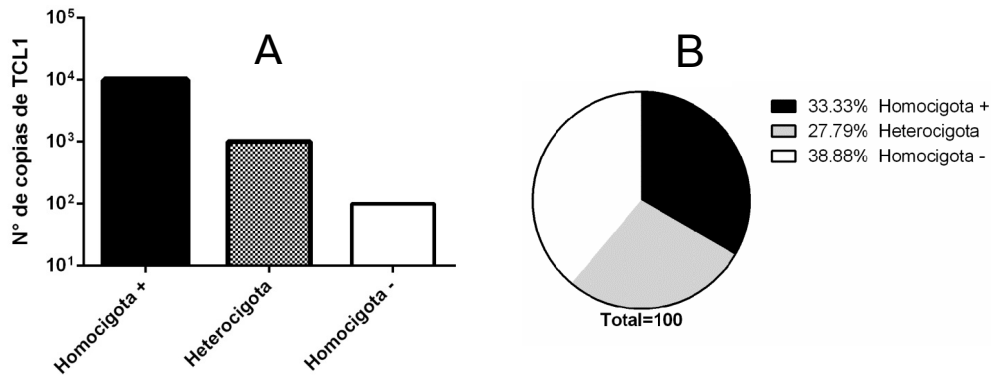


**Figura 9. A- Grafica de melting. B- Curva de calibración**

Una vez interpolado cada Ct en la curva de calibración se está en condiciones de iniciar la evaluación de las diferentes expresiones del gen TCL1 en los ratones F3.

Se considera Homocigota negativo un Ct mayor o igual a 31 correspondiente a un número de copias de TCL1 menor o igual a  $10^2$  mientras que un Heterocigota presenta un Ct entre 30-28 correspondiente a un número de copias de  $10^3$  y por último el homocigota positivo se encuentra en un rango de Ct entre 27-23 que corresponde a  $10^4$  número de copias de TCL1. **Figura 10.A**

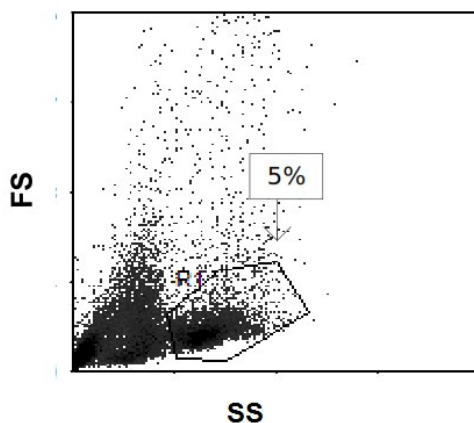
En la gráfica de la **Figura 10.B** se presenta los porcentajes de los diferentes genotipos de los ratones F3, 33,33% para el homocigota positivo, 27,79% para el heterocigota y 38,88% para el homocigota negativo.



**Figura 10: A-Gráfica del Número de copias en función de genotipo. B- Porcentaje de los diferentes genotipos de la colonia F3.**

## ii. Evaluación del inicio y de la progresión de la LLC a través del análisis por citometría de flujo de la sangre de los ratones transgénicos

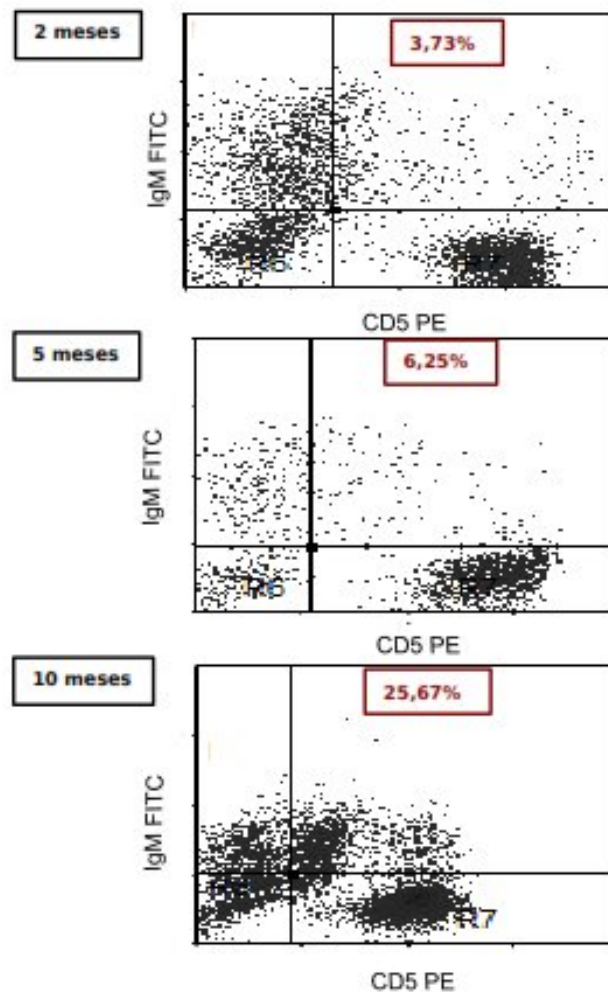
Una vez realizada la extracción de células mononucleares totales en Ficoll se tomó una alícuota y se pasó por el citómetro. El gráfico de la **Figura 11** muestra en su eje X el “Forward Scatter” el cual es un indicador de granularidad o complejidad celular y en el eje Y el “Side Scatter” indicador de tamaño. De acuerdo a estos índices se muestra un gate en la zona correspondiente a los linfocitos de aproximadamente un 5% de representación en el pool celular. A partir de dicho porcentaje de linfocitos se procedió a realizar las marcaciones correspondientes.



**Figura 11: Gráfico SSC vs FSC.** Se observa una ventana englobando al 5% de las células en la región correspondiente a linfocitos.

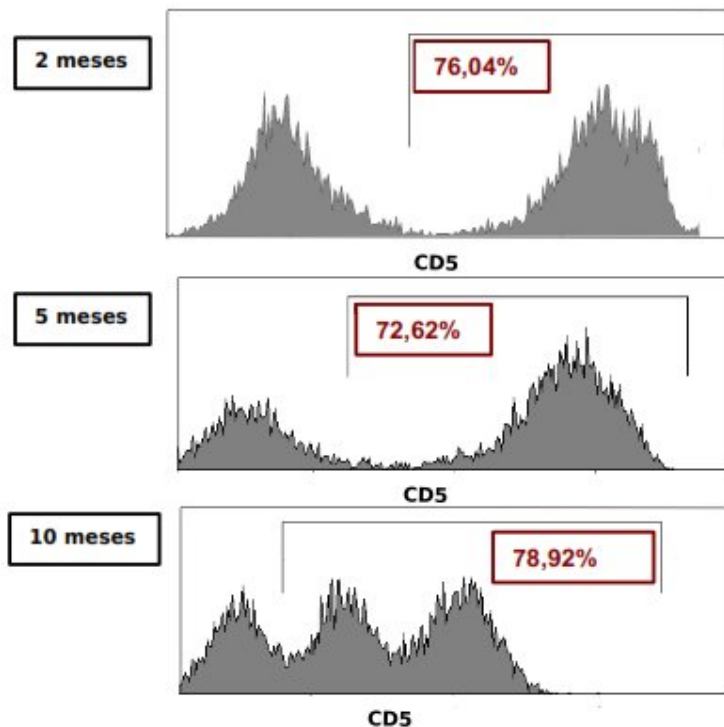
**Caracterización del proceso de leucemización en los linfocitos B expresando el transgen TCL1 en SP.**

Con el objetivo de estudiar el proceso de leucemización en sangre periférica se procedió a marcar la población linfocitaria con anticuerpos anti-CD5 y anti-IgM. Podemos observar que a los dos meses el porcentaje de IgMCD5+ es muy bajo, a los cinco meses empieza a aumentar y a los 10 meses se la leucemización se hace evidente con un porcentaje de IgMCD5+ de 25,67%. **Figura 12**



**Figura 12.** Marcación de IgM vs CD5 a los 2,5 y 10 meses de edad.

Lo mencionado anteriormente se puede confirmar analizando las poblaciones de CD5+ a los distintos meses. Existen 2 poblaciones bien definidas a los 10 meses, la población con mayor intensidad corresponden a los linfocitos T mientras que la otra corresponde a los linfocitos B leucémicos. Mientras que para los 2 y 5 meses esta última población no se encuentra presente. Con dichos resultados podemos concluir que a los 10 meses el ratón se encuentra en un estado leucémico avanzado. **Figura 13**



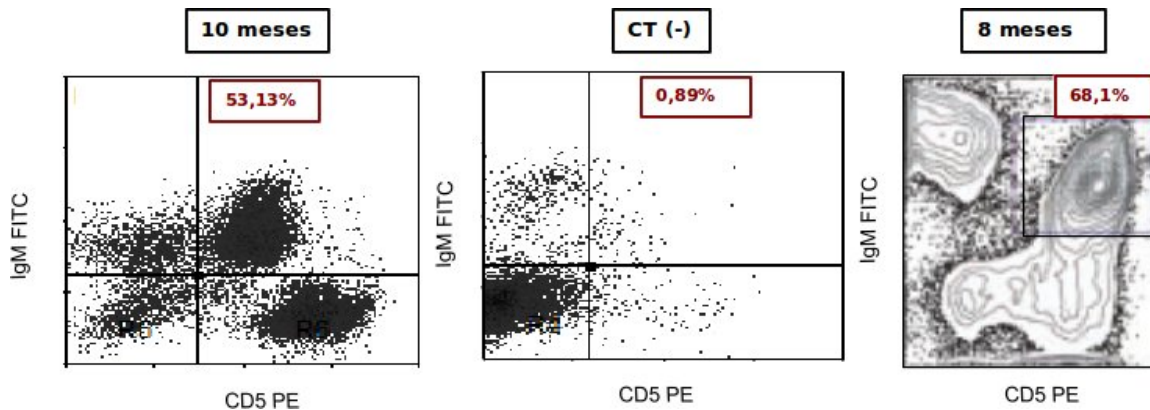
**Figura 13.** Niveles de expresión de CD5 a los 2,5 y 10 meses de edad en SP.

### **Caracterización del proceso de leucemización en los linfocitos B expresando el transgen TCL1 en Bazo.**

Teniendo en cuenta que a los 10 meses de edad el transgénico contiene una elevada cantidad de linfocitos B leucémicos se estudió la presencia de las células leucémicas en el bazo. En la **Figura 14** se puede observar que en dicho órgano a la edad de 10 meses hay gran cantidad de linfocitos B IgM+/CD5+,



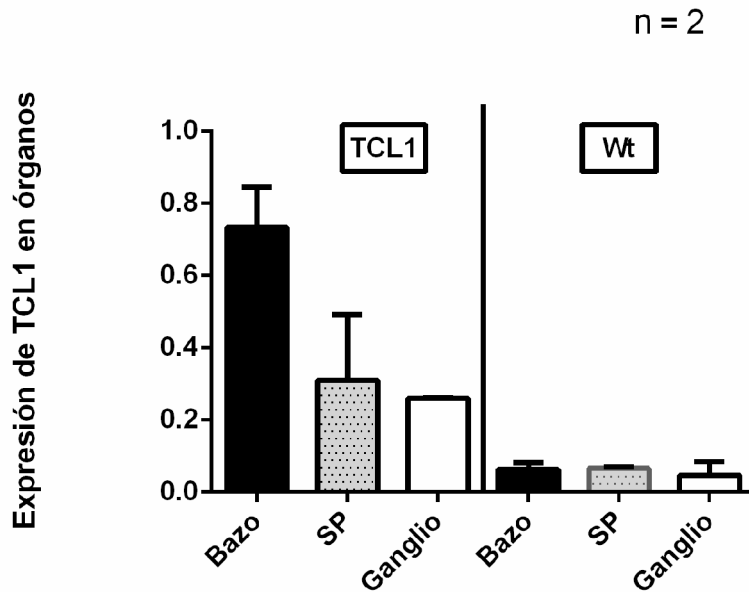
indicando que el desarrollo de la enfermedad se da en los diferentes órganos linfoides. Esto concuerda con lo visto por Bichi y colaboradores (Bichi et al., 2002) donde demuestran que a los 8 meses, a nivel del bazo, el ratón se encuentra en un estado leucémico avanzado.



**Figura 14. Marcación de IgM vs CD5 en el bazo para los ratones TCL1 y Wt a los 10 meses de edad. Ratones TCL1 a los 8 meses de edad, figura obtenida del artículo Bichi et al., 2002.**

Luego de la realización de la retrotranscripción se realizó una prueba de la calidad y cantidad de ADNc obtenido. Para ello los datos de expresión qPCR para los diferentes órganos son normalizados frente a los datos de expresión de un gen control o también llamado gen “housekeeping” de expresión constitutiva. Dicho gen es el Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), el cual es uno de los genes housekeeping más comúnmente utilizados en las comparaciones de expresiones génica.

La metodología consiste en amplificar mediante la reacción de qPCR los ADNc de las muestras a estudiar para el gen TCL1 y GAPDH y calcular el grado de expresión de cada órgano. Para ello se resta los Ct obtenidos por la amplificación del gen TCL1 con los Ct obtenidos por la amplificación de gen GAPDH. Se utilizó el programa de PCR **Figura 4** y los primers que se detallan en la **Tabla 2** de la sección de Materiales y Métodos. A continuación en la **Figura 15** se muestran los resultados de la expresión del transgen TCL1 normalizado con GAPDH para los diferentes órganos linfoides secundarios.



**Figura 15. Gráfica de la expresión del transgen TCL1 en los órganos linfoides secundarios.**

A pesar de que el número de muestras es relativamente bajo (n=2) pero asumiendo que estamos analizando un fenómeno ya descrito previamente podemos sugerir lo siguiente:

Hay un expresión mayor de transgen TCL1 en los ratones transgénicos TCL1 que en los ratones Wt. Además se puede observar que el bazo es el que contiene mayor expresión de transgen, luego la sangre periférica y por último el ganglio. Esto indica que hay una mayor infiltración de linfocitos B leucémicos en el bazo que en el resto de los órganos.

Otro dato que consolidó este resultado es la comparación del tamaño del bazo de los ratones TCL1 a los 10 meses con sus controles a la misma edad, en donde se observó un tamaño incrementado (3-5 veces) del bazo leucémico. (Dato no mostrado).

# CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

En el presente trabajo, mediante el empleo de diversas técnicas de Biología Molecular, Inmunología y Bioquímica se caracterizó en parte, el modelo transgénico murino TCL1 de LLC. Los resultados obtenidos permitieron demostrar que el proceso de leucemización tanto en sangre periférica como en órganos linfoides secundarios es similar al descrito previamente en Bichi et al. 2002. Gracias a esta caracterización previa, el laboratorio está en condiciones de poder utilizar dicho modelo en el estudio de esta patología. Diferentes proyectos están siendo llevados a cabo en el laboratorio dedicados al estudio de la progresión leucémica y su correlación con subpoblaciones tumorales con diferentes características de progresión y malignización oncológica, en donde el modelo caracterizado es de vital importancia.

# Bibliografia

---

- Avet-Loiseau, H., Li, J. Y., Morineau, N., Facon, T., Brigaudeau, C., Harousseau, J. L., Bataille, R. (1999). Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Intergroupe Francophone du Myélome. Blood*, 94(8), 2583–2589.
- Bichi R, Shinton SA, Martin ES, Koval A, Calin GA, Cesari R, Russo G, Hardy RR, Croce CM. 2002. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6955–6960.
- Binet J.L., Lepoprier M, Dighiero G, Charron D, D'Athis P, Vaugier G, Beral HM, Natali JC, Raphael M, Nizet B, Follezuou. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer*, 1977. 40(2): p. 855-64.
- Binet, J.-L., Caligaris-Cappio, F., Catovsky, D., Cheson, B., Davis, T., Dighiero, G., Rai, K. (2006). Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 107(3), 859–61.
- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. 2005. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353:1793– 1801.
- Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN (1999) AKT/PKB and other D3 phosphoinositide regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 68:965–1014.
- Chiorazzi, N., & Ferrarini, M. (2003). B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annual review of immunology*, 21, 841–894.
- Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H. 2002. All TRAFs are not created equal: Common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* 115:679–688.
- Haiat S, Billard C, Quiney C, Ajchenbaum-Cymbalista F, Kolb JP. 2006. Role of BAFF and APRIL in human B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* 118:281–292.
- Czarneski, J., Lin, Y.C., Chong, S., McCarthy, B., Fernandes, H., Parker, G., Mansour, A., Huppi, K., Marti, G.E., & Raveche, E. (2004). Studies in NZB IL-10 knockout mice of the requirement of IL-10 for progression of B-cell lymphoma. *Leukemia* 18, 597-606.
- Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., ... Chiorazzi, N. (2014). Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia: Presented in part at the 40th Annual Meeting of The American Society of Hematology, held in Miami Beach, FL, December 4-8, 1998., 1840–1847.
- Del Giudice, I., Morilla, A., Osuji, N., Matutes, E., Morilla, R., Burford, A., ... Catovsky, D. (2005). Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 104, 2124–2132.
- Dighiero, G., Maloum, K., Desablens, B., Cazin, B., Navarro, M., Leblay, R., ... Travade, P. (1998). Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. *French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. The New England journal of medicine* (Vol. 338, pp. 1506–1514).
- Dighiero, G., & Hamblin, T. J. (2008). Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*, 371(9617), 1017–1029.
- Ditch, S., & Paull, T. T. (2012). The ATM protein kinase and cellular redox signaling: beyond the DNA damage response. *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 37, pp. 15-22)
- Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Dohner, K., Bentz, M., and Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343, 1910-1916.

- Gardam, S., Sierro, F., Basten, A., Mackay, F., & Brink, R. (2008). TRAF2 and TRAF3 signal adapters act cooperatively to control the maturation and survival signals delivered to B cells by the BAFF receptor. *Immunity* 28, 391-401.
- Grech, A.P., Amesbury, M., Chan, T., Gardam, S., Basten, A., & Brink, R. (2004). TRAF2 differentially regulates the canonical and noncanonical pathways of NF-kappaB activation in mature B cells. *Immunity* 21, 629-642.
- Hamano, Y., Hirose, S., Ida, A., Abe, M., Zhang, D., Kodera, S., Jiang, Y., Shirai, J., Miura, Y., Nishimura, H., et al. (1998). Susceptibility alleles for aberrant B-1 cell proliferation involved in spontaneously occurring B-cell chronic lymphocytic leukemia in a model of New Zealand white mice. *Blood* 92, 3772-3779.
- Haiat S, Billard C, Quiney C, Ajchenbaum-Cymbalista F, Kolb JP. 2006. Role of BAFF and APRIL human B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* 118:281–292.
- Hallas C, Pekarsky Y, Itoyama T, Varnum J, Bichi R, Rothstein JL, Croce CM (1999) Genomic analysis of human and mouse TCL1 loci reveals a complex of tightly clustered genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14418–14423.
- Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G., & Stevenson, F. K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94(6), 1848–1854.
- Hazel TG, Nathans D, Lau LF (1988) A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8444–8448 .
- Herling M, Patel KA, Khalili J, Schlette E, Kobayashi R, Medeiros LJ, Jones D. 2006. TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. *Leukemia* 20:280–285.
- Herron, L.R., Coffman, R.L., Bond, M.W., & Kotzin, B.L. (1988). Increased autoantibody production by NZB/NZW B cells in response to IL-5. *J Immunol* 141, 842-848.
- Jiang, Y., Hirose, S., Hamano, Y., Kodera, S., Tsurui, H., Abe, M., Terashima, K., Ishikawa, S., & Shirai, T. (1997). Mapping of a gene for the increased susceptibility of B1 cells to Mott cell formation in murine autoimmune disease. *J Immunol* 158, 992-997.
- Johnson AJ, Lucas DM, Muthusamy N, Smith LL, Edwards RB, De Lay MD, Croce CM, Grever MR, Byrd JC. 2006. Characterization of the TCL-1 transgenic mouse as a preclinical drug development tool for human chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 108:1334–1338.
- Kang, S.-M., Narducci, M. G., Lazzeri, C., Mongiovi, A. M., Caprini, E., Bresin, A., Russo, G. (2005). Impaired T- and B-cell development in Tcl1-deficient mice. *Blood*, 105(3), 1288–1294.
- Kanno, K., Okada, T., Abe, M., Hirose, S., & Shirai, T. (1992). CD5+ B cells as precursors of CD5-IgG anti-DNA antibody-producing B cells in autoimmune-prone NZB/W F1 mice. *Ann N Y Acad Sci* 651, 576-578.
- Katsumata M, Siegel RM, Louie DC, Miyashita T, Tsujimoto Y, Nowell PC, Greene MI, Reed JC. 1992. Differential effects of Bcl-2 on T and B cells in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11376– 11380.
- Keating, M. J., Chiorazzi, N., Messmer, B., Damle, R. N., Allen, S. L., Rai, K. R., ... Kipps, T. J. (2003). Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program, 153–175.
- Laine J, Kunstle G, Obata T, Sha M, Noguchi M (2000) The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. *Mol Cell* 6:395–407.
- Lee SY, Reichlin A, Santana A, Sokol KA, Nussenzweig MC, Choi Y. 1997. TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity* 7:703–713.
- Madani A, Choukroun V, Soulier J, Cacheux V, Claisse JF, Valensi F, Daliphard S, Cazin B, Levy V, Leblond V, Daniel MT, Sigaux F, Stern MH (1996) Expression of p13MTCP1 is restricted

- to mature T-cell proliferations with t(X;14) translocations. *Blood* 87:1923–1927.
- Mohr, J., Helfrich, H., Fuge, M., Eldering, E., Buhler, A., Winkler, D., Volden, M., Kater, A.P., Mertens, D., Te Raa, D., et al. (2011). DNA damage-induced transcriptional program in CLL: biological and diagnostic implications for functional p53 testing. *Blood* 117, 1622-1632.
- Montillo, M., Hamblin, T., Hallek, M., Montserrat, E., & Morra, E. (2005). Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica*, 90, 391–399.
- Narducci MG, Virgilio L, Isobe M, Stoppacciaro A, Elli R, Fiorilli M, Carbonari M, Antonelli A, Chessa L, Croce CM (1995) TCL1 oncogene activation in preleukemic T cells from a case of ataxia-telangiectasia. *Blood* 86:2358–2364.
- Narducci, M. G., Pescarmona, E., Lazzeri, C., Signoretti, S., Lavinia, A. M., Remotti, D., ... Russo, G. (2000). Regulation of TCL1 expression in B- and T-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues. *Cancer research*, 60, 2095–2100.
- Narducci, M. G., Fiorenza, M. T., Kang, S.-M., Bevilacqua, A., Di Giacomo, M., Remotti, D., ... Russo, G. (2002). TCL1 participates in early embryonic development and is overexpressed in human seminomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 11712–11717.
- Okada, T., Abe, M., Takiura, F., Hirose, S., & Shirai, T. (1990). Distinct surface phenotypes of B cells responsible for spontaneous production of IgM and IgG anti-DNA antibodies in autoimmune-prone NZB x NZW F1 mice. *Autoimmunity* 7, 109-120.
- Parker, G.A., Peng, B., He, M., Gould-Fogerite, S., Chou, C.C., & Raveche, E.S. (2000). In vivo and in vitro antiproliferative effects of antisense interleukin 10 oligonucleotides. *Methods Enzymol* 314, 411-429.
- Payelle-Brogard, B., Magnac, C., Alcover, A., Roux, P., & Dighiero, G. (2002). Defective assembly of the B-cell receptor chains accounts for its low expression in B-chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*, 118(4), 976–985.
- Pérez-Chacón, G., Llobet, D., Pardo, C., Pindado, J., Choi, Y., Reed, J. C., & Zapata, J. M. (2012). TNFR-associated factor 2 deficiency in B lymphocytes predisposes to chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma in mice. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. □: 1950), 189(2), 1053–61.
- Peng, B., Mehta, N.H., Fernandes, H., Chou, C.C., & Raveche, E. (1995). Growth inhibition of malignant CD5+B (B-1) cells by antisense IL-10 oligonucleotide. *Leukemia research* 19, 159-167.
- Planelles L, Carvalho-Pinto CE, Hardenberg G, Smaniotto S, Savino W, Gomez-Caro R, Alvarez-Mon M, de Jong J, Eldering E, Martinez AC, Medema JP, Hahne M. 2004. APRIL promotes B-1 cell-associated neoplasm. *Cancer Cell* 6:399–408.
- Pekarsky Y, Hallas C, Isobe M, Russo G, Croce CM (1999) Abnormalities at 14q32.1 in T cell malignancies involve two oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2949–2951.
- Pekarsky Y, Koval A, Hallas C, Bichi R, Tresini M, Malstrom S, Russo G, Tschlis P, Croce CM (2000) Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3028–3033.
- Phillips, J.A., Mehta, K., Fernandez, C., & Raveche, E.S. (1992). The NZB mouse as a model for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 52, 437-443.
- Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N., & Pasternack, B. S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46(2), 219–234.
- Ramachandra, S., Metcalf, R.A., Fredrickson, T., Marti, G.E., & Raveche, E. (1996). Requirement for increased IL-10 in the development of B-1 lymphoproliferative disease in a murine model of CLL. *J Clin Invest* 98, 1788-1793.
- Raveche, E.S. (1990). Possible immunoregulatory role for CD5 + B cells. *Clin Immunol Immunopathol* 56, 135-150.
- Rawstron, A. C., Bennett, F. L., O'Connor, S. J. M., Kwok, M., Fenton, J. A. L., Plummer, M., ...

- Hillmen, P. (2008). Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, 359(6), 575–583.
- Rosenwald, A., Ott, G., Krumdiek, A. K., Dreyling, M. H., Katzenberger, T., Kalla, J., ... Müller-Hermelink, H. K. (1999). A biological role for deletions in chromosomal band 13q14 in mantle cell and peripheral t-cell lymphomas? *Genes, chromosomes & cancer*, 26(3), 210–214.
- Russo G, Isobe M, Gatti R, Finan J, Batuman O, Huebner K, Nowell PC, Croce CM (1989) Molecular analysis of a t(14;14) translocation in leukemic T-cells of an ataxia telangiectasia patient. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:602–606.
- Scaglione, B.J., Salerno, E., Balan, M., Coffman, F., Landgraf, P., Abbasi, F., Kotenko, S., Marti, G.E., & Raveche, E.S. (2007). Murine models of chronic lymphocytic leukaemia: role of microRNA-16 in the New Zealand Black mouse model. *Br J Haematol* 139, 645-657.
- Stern MH, Soulier J, Rosenzweig M, Nakahara K, Canki-Klain N, Aurias A, Sigaux F, Kirsch IR (1993) MTCP-1: a novel gene on the human chromosome Xq28 translocated to the T cell receptor alpha/delta locus in mature T cell proliferations. *Oncogene* 8:2475–2483 .
- Suljagic, M., Longo, P.G., Bennardo, S., Perlas, E., Leone, G., Laurenti, L., & Efremov, D.G. (2010). The Syk inhibitor fostamatinib disodium (R788) inhibits tumor growth in the Eμ-TCL1 transgenic mouse model of CLL by blocking antigen-dependent B-cell receptor signaling. *Blood* 116, 4894-4905.
- Takizawa, J., Suzuki, R., Kuroda, H., Utsunomiya, A., Kagami, Y., Joh, T., ... Seto, M. (1998). Expression of the TCL1 gene at 14q32 in B-cell malignancies but not in adult T-cell leukemia. *Japanese journal of cancer research* □: *Gann*, 89(7), 712–718.
- Thick J, Metcalfe JA, Mak YF, Beatty D, Minegishi M, Dyer MJ, Lucas G, Taylor AM (1996) Expression of either the TCL1 oncogene, or transcripts from its homologue MTCP1/c6.1B, in leukaemic and non-leukaemic T cells from ataxia telangiectasia patients. *Oncogene* 12:379–386.
- Tokado, H., Yumura, W., Shiota, J., Hirose, S., Sato, H., & Shirai, T. (1991). Lupus nephritis in autoimmune-prone NZB x NZW F1 mice and mechanisms of transition of the glomerular lesions. *Acta Pathol Jpn* 41, 1-11.
- Umland, S.P., Go, N.F., Cupp, J.E., & Howard, M. (1989). Responses of B cells from autoimmune mice to IL-5. *J Immunol* 142, 1528-1535.
- Virgilio L, Narducci MG, Isobe M, Billips LG, Cooper MD, Croce CM, Russo G (1994) Identification of the TCL1 gene involved in T-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12530–12534.
- Winkler, D., Schneider, C., Krober, A., Pasqualucci, L., Lichter, P., Dohner, H., & Stilgenbauer, S. (2005). Protein expression analysis of chromosome 12 candidate genes in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia*, 19(7), 1211–1215.
- Yan, X., Albesiano, E., Zanesi, N., Yancopoulos, S., Sawyer, A., Romano, E., ... Chiorazzi, N. (2006). B cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(31), 11713–8.
- Zapata JM, Krajewska M, Morse HC, 3rd, Choi Y, Reed JC. 2004. TNF receptor-associated factor. TRAF) domain and Bcl-2 cooperate to induce small B cell lymphoma/chronic lymphocytic leukemia in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:16600–16605.
- Zanesi, N., Aqeilan, R., Drusco, A., Kaou, M., Seignani, C., Costinean, S., Bortesi, L., La Rocca, G., Koldovsky, P., Volinia, S., et al. (2006). Effect of rapamycin on mouse chronic lymphocytic leukemia and the development of nonhematopoietic malignancies in Eμ-TCL1 transgenic mice. *Cancer Res* 66, 915-920.
- Zenz, T., Vollmer, D., Trbusek, M., Swardova, J., Benner, A., Soussi, T., Helfrich, H., Heuberger, M., Hoth, P., Fuge, M., et al. (2010). TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 24, 2072-2079.

Zenz, T., Mertens, D., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2011). Importance of genetics in chronic lymphocytic leukemia. *Blood reviews*, 25(3), 131–137.