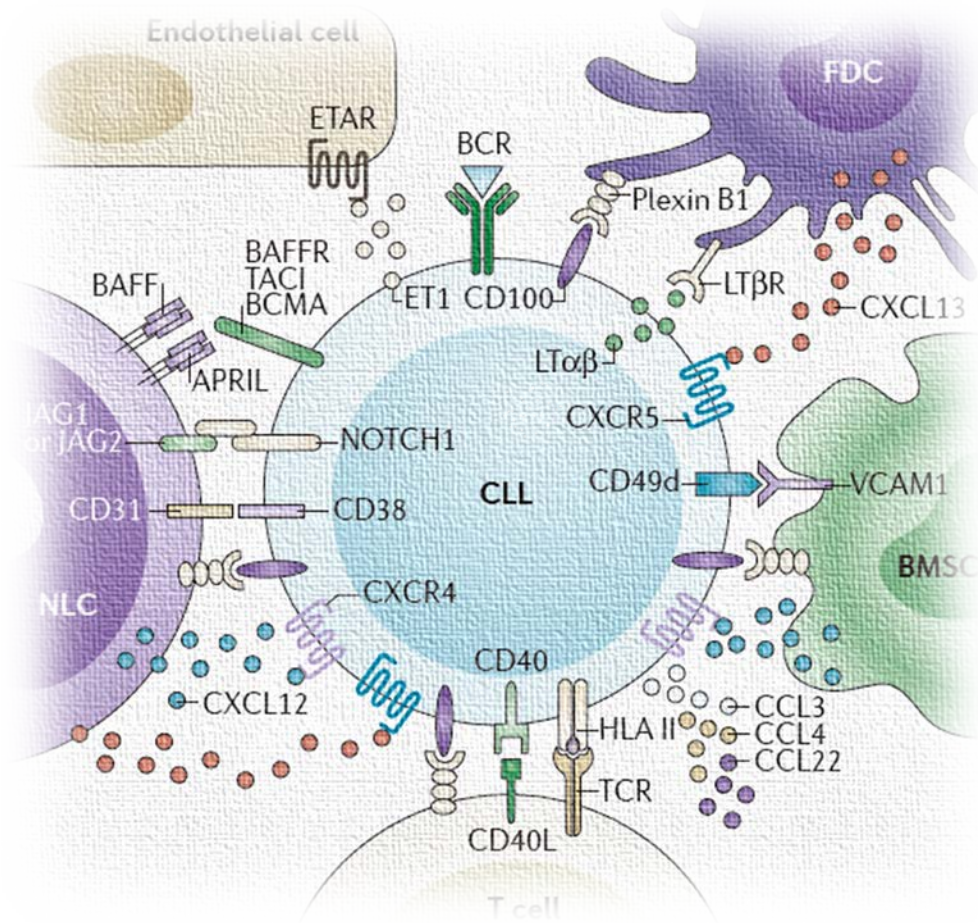


# Implicancias de la enzima AID en la mutagénesis y evolución clonal durante la progresión de la Leucemia Linfoide Crónica



**LIC. NOÉ SEIJA**

**Laboratorio de Investigación en Leucemia Linfoide Crónica**

**Institut Pasteur de Montevideo**

**Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas – Universidad de la República**

**TESIS DE MAESTRÍA**

**PROGRAMA DE DESARROLLO DE CIENCIAS BÁSICAS**

**IMPLICANCIAS DE LA ENZIMA AID EN LA MUTAGÉNESIS Y EVOLUCIÓN  
CLONAL DURANTE LA PROGRESIÓN DE LA LEUCEMIA LINFOIDE  
CRÓNICA.**

**LIC. NOÉ SEIJA**

**TUTOR: PABLO OPPEZZO**

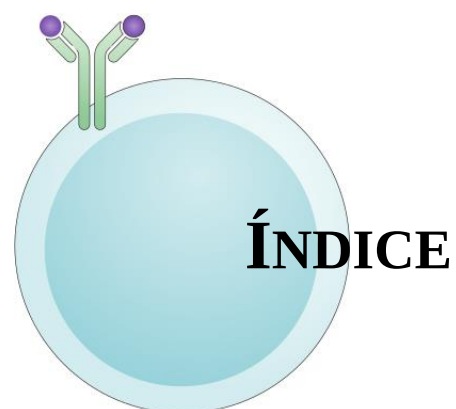
**CO-TUTOR: PABLO MORANDE**

**TRIBUNAL**

**DRA. MÓNICA MARÍN**

**DR. MARCELO HILL**

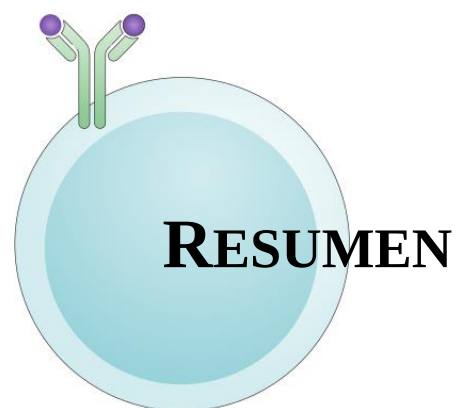
**DR. SERGIO BIANCHI**



<b><u>RESUMEN</u></b>	<b>6</b>
<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>9</b>
<b>LINFOCITO B</b>	<b>10</b>
LINFOCITO B Y SISTEMA INMUNE	10
DIVERSIDAD DEL BCR	11
<b>DEAMINASA INDUCIDA POR ACTIVACIÓN (AID)</b>	<b>12</b>
REACCIÓN DEL CENTRO GERMINAL	12
MECANISMO DE ACCIÓN DE AID	13
ROL ONCOGÉNICO DE AID	16
<b>LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA (LLC)</b>	<b>18</b>
GENERALIDADES	18
DESARROLLO Y EVOLUCIÓN	19
MICROAMBIENTE TUMORAL Y PROLIFERACIÓN	21
IMPLICANCIAS AID EN LA LLC	23
<b><u>OBJETIVOS</u></b>	<b>26</b>
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
<b><u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	<b>28</b>
MUESTRAS DE PACIENTES	29
EXTRACCIÓN RNA Y SÍNTESIS DE CDNA	29
PCR DE AID Y GAPDH	29
PURIFICACIÓN POR MACS	30
EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	30
SECUENCIADO MASIVO DE EXOMA	31
BÚSQUEDA DE VARIANTES Y <i>SIGNATURES</i>	31
SECUENCIADO CONFIRMATORIO	32
<b><u>RESULTADOS</u></b>	<b>35</b>
<b>SELECCIÓN DE PACIENTES Y WES</b>	<b>36</b>
SELECCIÓN DE PACIENTES	36
DETECCIÓN DE VARIANTES SOMÁTICAS	37
<b>BÚSQUEDA DE SIGNATURE Y SELECCIÓN DE MUTACIONES</b>	<b>39</b>
OCURRENCIA DE VARIANTES SOMÁTICAS	39
DETERMINACIÓN DE <i>SIGNATURES</i> MUTACIONALES	40

---

SELECCIÓN DE MUTACIONES PARA VALIDACIÓN	43
<b>SECUENCIADO CONFIRMATORIO</b>	<b>47</b>
ELABORACIÓN DE LIBRERÍAS	47
VALIDACIÓN DE MUTACIONES SELECCIONADAS	48
<b><u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</u></b>	<b>54</b>
OTROS APORTES REALIZADOS	61
<b><u>AGRADECIMIENTOS</u></b>	<b>63</b>
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>65</b>
<b><u>ANEXO 1</u></b>	<b>75</b>
<i>CAPÍTULO: THE ANTIGEN RECEPTOR AS A DRIVER OF B-CELL LYMPHOMA DEVELOPMENT AND EVOLUTION</i>	76
<b><u>ANEXO 2</u></b>	<b>100</b>
<i>ARTÍCULO: S100-A9 PROTEIN IN EXOSOMES FROM CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA CELLS PROMOTES NF-<math>\kappa</math>B ACTIVITY DURING DISEASE PROGRESSION</i>	101



## RESUMEN

La Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) es la leucemia más frecuente en adultos de países occidentales. Se caracteriza por la acumulación en sangre periférica, médula ósea y ganglios linfáticos secundarios, de linfocitos B maduros neoplásicos. Su evolución clínica presenta una gran heterogeneidad observándose evoluciones sustancialmente diferentes; desde pacientes que no requieren tratamiento durante su vida, pasando por los que responden favorablemente a la terapia anti-tumoral y logran controlar su progresión, hasta aquellos que se vuelven reincidentes y/o refractarios a las terapias disponibles. Por esta razón es que hasta el momento dicha neoplasia, pese a los avances ocurridos en los últimos años a nivel pronóstico y terapéutico, sigue siendo considerada incurable.

Una explicación a las diversas evoluciones clínicas que presenta dicha enfermedad es la gran complejidad molecular entorno a su etiología y su posterior evolución. En efecto, a diferencia de otras neoplasias su origen no es asociable a una única alteración molecular que conduzca al proceso tumoral. Por el contrario, la profundización en el conocimiento de la LLC ha permitido concebir su surgimiento y evolución como un proceso dinámico donde el linfocito B tumoral acumula progresivamente distintas alteraciones mutacionales, cromosómicas y epigenéticas que determinan la agresividad de esta neoplasia.

Asimismo, contrariamente a la perspectiva inicial de la LLC como un desorden caracterizado por la acumulación pasiva de linfocitos en el tiempo producto de una evasión de la apoptosis, en los últimos años se ha establecido que las células leucémicas son capaces de proliferar. Dicha proliferación ocurre a nivel de pseudofolículos en los ganglios linfáticos, así como también en una pequeña población de sangre periférica emergente de éstos. En estos sitios ocurren interacciones esenciales para la progresión de la LLC, entre las células leucémicas y las de su microambiente tumoral, que conducen a una activación y consecuente proliferación celular de los linfocitos B neoplásicos.

Una característica del linfocito B activado, es la expresión de la Citidina Deaminasa Inducida por Activación (AID), la cual es capaz de deaminar de forma específica residuos de citosina del DNA dentro de locus de Inmunoglobulinas y conducir a los procesos de Hipermutación Somática (SHM) y Recombinación de Cambio de Clase (CSR) claves para la producción de anticuerpos de alta afinidad durante una respuesta inmune. El fenotipo activado con capacidad proliferante de la célula leucémica también se caracteriza por la expresión de AID. Sin embargo, a diferencia de una respuesta inmune, en el contexto de la LLC ocurre una expresión mantenida en el tiempo de AID que puede conducir a la introducción de nuevas mutaciones pro-oncogénicas a causa de su actividad *off-target*.

El objetivo de este trabajo es entonces el de identificar cuáles son las mutaciones *off-target* generadas por AID durante el proceso de la progresión leucémica para poder comprender algunas de las causas tanto de la evolución clonal como de la refractariedad al tratamiento en esta leucemia

Para la evaluación de la actividad mutagénica pro-tumoral de AID durante la progresión de la LLC se realizó un secuenciado masivo de exoma (WES) a dos grupos de 5 pacientes de mal pronóstico cuya principal diferencia fuera la expresión de AID en el clon tumoral. Para el estudio se analizaron dos tiempos de la enfermedad: al debut y durante la evolución de la misma.

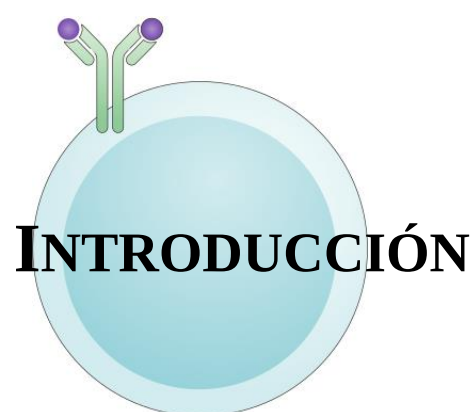
El análisis de las variantes somáticas en los grupos secuenciados permitió identificar una mayor cantidad de mutaciones en los pacientes AID<sup>+</sup> con respecto a los AID<sup>-</sup>. Asimismo, dentro del grupo AID<sup>+</sup> la carga mutacional resultó ser mayor al debut y disminuir durante la progresión de la enfermedad. Por otro lado, la búsqueda de signatures mutacionales en los cuatro grupos permitió la correcta identificación de variantes somáticas asociadas a la actividad mutagénica de AID.

Dentro del grupo AID+ fueron identificadas mutaciones originadas por AID tanto al debut como en la progresión de dichos pacientes, en genes de gran importancia para la progresión tumoral. Dichas mutaciones fueron seleccionadas para su validación mediante un segundo secuenciado masivo gen específico sobre 15 pacientes de mal pronóstico que expresan AID durante su progresión.

Los resultados del secuenciado realizado sobre la cohorte de validación, permitieron detectar mutaciones altamente recurrentes producidas por AID sobre genes determinantes de la progresión de la LLC tales como: **CD38** (87%), **SF3B1** (47%), **POT1** (20%) y **NOTCH1** (7%). Asimismo, fue posible la validación de mutaciones con altas frecuencias sobre genes de relevancia biológica para la progresión de la enfermedad cuyo impacto en la LLC será evaluado en estudios posteriores.

Por otro lado, otras contribuciones realizadas durante este trabajo permitieron la identificación de la proteína S100-A9 como un nuevo factor de relevancia durante la progresión de la LLC capaz conducir a la proliferación del clon tumoral mediante la activación de la vía de NF- $\kappa$ B, constituyendo de esta forma a su vez un elemento adicional del microambiente tumoral que permite explicar la expresión mantenida de AID en el tiempo característica de pacientes progresivos de LLC.





# 1. LINFOCITO B

## 1.1 LINFOCITO B Y SISTEMA INMUNE

A lo largo de la evolución los organismos han desarrollado el Sistema Inmune (SI) cuya función principal es brindar protección contra los agentes patógenos que puedan ingresar al mismo y causar daño o enfermedad. La primera línea de defensa constituyen las barreras físicas (piel, mucosas) y químicas (defensinas) que impiden su simple acceso. De una forma menos general, se encuentra el **Sistema Inmune Innato (SII)** formado por las proteínas del sistema del Complemento, y células circulantes o residentes en tejidos con diversas funciones tales como: monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, entre otras. Dichas células presentan tanto a nivel de membranas como del citoplasma, receptores de reconocimiento de patrones que permiten discriminar patrones moleculares asociados a patógenos (**PAMPs**, del inglés) como también al daño celular que éstos pueden producir (**DAMPs**, del inglés) con el propósito general de mediar una rápida respuesta para su pronta eliminación del organismo(Boehm, 2011).

Sin embargo, dada la generalidad de la detección y protección ofrecida por el SII, aunque imprescindible, muchas veces no logra ser suficiente para la correcta eliminación de los patógenos. En dicho contexto, es posible distinguir otra rama de la inmunidad, presente en vertebrados, el **Sistema Inmune Adaptativo (SIA)**. Cómo su nombre lo indica, representa la forma más sofisticada de defensa del organismo y se constituye por dos tipos celulares: los **Linfocitos B (LB)** y los **Linfocitos T (LT)**. Dichas células tienen la capacidad de reconocer de una forma exquisitamente específica a un patógeno en particular y montar una respuesta adaptada al mismo, que permita (en forma concertada con el SII) la eliminación del patógeno en cuestión(Boehm, 2011).

Para llevar a cabo el reconocimiento específico, los linfocitos B y T presentan respectivamente los receptores de superficie denominados **BCR y TCR**, del inglés. Dichas proteínas, poseen la particularidad de que su secuencia génica no se encuentra codificada en la línea germinal del DNA. Esto implica que ambas moléculas se generan por medio del proceso de **Recombinación Somática (SR)**, del inglés) que supone la combinación de diferentes segmentos génicos del DNA en una secuencia final distinta a la original, teniendo como resultado la generación de receptores con una capacidad de reconocimiento prácticamente ilimitada, dada la enorme diversidad de resultados posibles(Cooper, 2015).

Toda molécula capaz de ser reconocida por dichos receptores es denominada **antígeno**, y la interacción del antígeno con su receptor específico permite la activación del linfocito en cuestión. En el caso del LB, una vez activado, cambia su fenotipo para convertirse rápidamente en una maquinaria dedicada a la producción de grandes cantidades de anticuerpos o **Inmunoglobulinas (Ig)**. Dicha molécula, es la verdadera responsable de llevar a cabo las funciones efectoras conocidas como **inmunidad humoral**, tales como: neutralización de virus y toxinas, eliminación de bacterias extracelulares, eliminación de células infectadas o malignas mediante citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC, del inglés)(LeBien and Tedder, 2008).

## 1.2 DIVERSIDAD DEL BCR

El proceso de generación del BCR se encuentra estrechamente asociado al desarrollo del LB, en efecto, la correcta producción del mismo es la señal que le posibilita proseguir al linfocito con su linfopoyesis. El LB se origina en la médula ósea a partir de un **precursor linfoide común**, el cual deriva a su vez de un progenitor multipotencial generado a partir de una **célula madre hematopoyética pluripotencial** (Cooper, 2015).

En lo que refiere al BCR, éste se encuentra formado por la unión de dos cadenas pesadas (**IgH**, del inglés) con dos cadenas livianas (**IgL**, del inglés). Ambas cadenas se caracterizan por poseer una región constante IgH y otra variable (**IgV**, del inglés), siendo ésta última la responsable de interactuar con el antígeno. En tal sentido, no es casual que dicha región es la modificada por la **SR** y por lo tanto la de mayor diversidad. La región variable de las IgH o **IgVH** es formada a partir de la recombinación de tres familias de segmentos génicos: **V** (de variable), **D** (de diversidad) y **J** (de unión) mientras que la **IgVL** es formada por la combinación de segmentos V y J únicamente. Por el contrario, las regiones constantes, son el resultado de un único segmento génico, siendo además, en el caso de las IgH, la responsable de la mayor parte de las funciones efectoras de las **Ig** debido a la interacción de estas con los **Receptores Fc (FcR)**. La particularidad de dichas regiones es que debido a que existe más de una variante, la presencia de una u otra en la molécula en la estructura final del anticuerpo es la que determina el tipo de función efectora (de Villartay, Fischer and Durandy, 2003).

La primera cadena en producirse es la IgH, en el primer estadio de desarrollo del LB o **pro-B**. En esta etapa se produce la recombinación somática llevada a cabo por un complejo multiproteico que abarca las recombinasas **RAG1 y RAG2**. El mismo es secuencial y de un alelo a la vez, dónde primero se recombinan uno de los 23 segmentos D con uno de los 6 segmentos J, para posteriormente recombinar con cualquiera de los 38 segmentos V. La gran variedad de cadenas distintas que pueden generarse producto de la SR de dichos segmentos es uno de los componentes que contribuyen a la diversidad del BCR, pudiéndose generar por dicho proceso aproximadamente  $1.9 \times 10^9$  anticuerpos distintos. Asimismo, existe un proceso adicional de remoción y agregado de nucleótidos en las regiones de unión entre los distintos segmentos recombinados, donde la enzima **Terminal deoxynucleotidil Transferasa (TdT)** cumple un rol fundamental agregando nucleótidos que no se encuentran en la secuencia germinal del ADN, aumentando a  $10^{11}$  la cantidad de moléculas distintas posibles de generarse (de Villartay, Fischer and Durandy, 2003).

Una vez obtenido un rearrreglo productivo de la cadena IgH, tiene lugar la etapa **pre-B** del desarrollo, en donde es expresado un **pre-BCR** con una cadena liviana sustituta proporciona las señales de sobrevivencia necesarias para pasar por sucesivas etapas de replicación antes de recombinar los genes correspondientes a la cadena IgL. Este proceso permite que una misma molécula IgH, se combine con distintas IgL, aumentando así aún más la diversidad en la región variable (LeBien and Tedder, 2008).

Por último, existe un evento adicional modificador del BCR, a nivel del **LB maduro**, el proceso de **Hipermutación Somática (SHM**, del inglés), que a diferencia de lo ya descrito, no se comparte con los LT. El mismo supone el agregado de mutaciones puntuales en la región variable de las Inmunoglobulinas, en un contexto de LB activado por diversas interacciones como ser: BCR-antígeno, Receptores *Toll-like* (**TLR**, del inglés)-ligando y CD40-CD40L, entre otras interacciones que ocurren durante una respuesta inmune y que tiene como molécula principal a la enzima conocida como **Deaminasa Inducida por Activación (AID**, del inglés) (Chaudhuri *et al.*, 2014).

## 2. DEAMINASA INDUCIDA POR ACTIVACIÓN (AID)

### 2.1 REACCIÓN DEL CENTRO GERMINAL

Durante una respuesta inmune ocurre la activación del SII, la que a su vez conduce a un proceso inflamatorio, responsable de transportar células y antígenos hacia los ganglios linfáticos y propiciar la activación del SIA.

Una de las señales desencadenantes de la activación del LB es la interacción del BCR con su antígeno correspondiente. Para su completa activación el LB debe recibir una segunda señal proporcionada (principalmente) por un tipo de LT activado conocido como **folicular** o **T<sub>FH</sub>** a partir de una sinapsis inmunológica entre ambos, mediada por varias interacciones dónde se destaca la de **CD40L** (del LT) con **CD40** (del LB) (Basso and Dalla-Favera, 2015; De Silva and Klein, 2015).

Una vez establecida dicha interacción en la región intrafolicular del ganglio, ocurre una rápida proliferación celular seguida por la formación de un foco primario de plasmablastos secretores de anticuerpos. Sin embargo, algunos LB activados no siguen este camino sino que retornan hacia la zona folicular para continuar proliferando y conducir a la **reacción del centro germinal (CG)**.

El centro germinal constituye un microambiente de activa proliferación y muerte celular, en dónde es posible distinguir una **zona oscura** (denominada así por su alta densidad celular) compuesta por células estromales y **centroblastos** (LB que exhiben una alta tasa de proliferación celular y baja expresión del BCR). Rodeando dicho centro proliferante, se encuentra la **zona clara**, compuesta principalmente por **centrocitos** que exhiben una menor tasa replicativa pero mayor expresión del BCR que los centroblastos. Asimismo, en dicha zona se encuentran las **células dendríticas foliculares (FDC)**, del inglés) y los **T<sub>FH</sub>**, necesarios para aportar las señales de sobrevivencia (De Silva and Klein, 2015).

La formación del CG tiene como principal resultado la generación de LB con una mayor afinidad en su BCR, los cuales se diferenciarán a células plasmáticas y LB de memoria. Esta maduración en la afinidad es gracias a la actividad mutagénica iniciada por **AID** durante el proceso de **SHM**, por el cual se introducen mutaciones puntuales en la región **Ig<sub>v</sub>**. Estas mutaciones se reflejan en gran medida, en cambios en la secuencia aminoacídica del BCR. Concretamente la mayor actividad de AID se detecta en ciertas zonas del **IgV** que codifican para las **Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR)**, del inglés) del BCR. Esto no es casual, si se tiene en cuenta que dichas regiones comprenden los aminoácidos que interaccionan directamente con el antígeno, por lo cual la sustitución de alguno de éstos tendrá un impacto directo en la afinidad del BCR por éste. Cabe mencionar que AID también actúa en las regiones “**pre-Switch**” regiones ricas en nucleótidos GC, ubicadas antes de cada gen de cadena pesada, y que en estos casos conduce a la **Recombinación de Cambio de Clase (CSR)**, del inglés) que implica el cambio del isotipo original del anticuerpo (IgM) a otros como IgA, IgE e IgG con distintas funciones efectoras (Chandra, Bortnick and Murre, 2015).

El proceso de mutagénesis mencionado trae aparejado consigo una estricta **selección**, a fin de evitar, en un contexto proliferativo, la rápida propagación de LB con mutaciones deletéreas. La selección tiene lugar en la zona clara, luego de que el LB experimenta SHM en la zona oscura y aumenta la expresión de su BCR (ahora con el IgV mutado). En dicha zona, se encuentran las **FDC** que son capaces de atrapar al antígeno sobre su superficie y mantenerlo libre de degradación por largos períodos en forma

de **inmunocomplejos** del tipo **antígeno-anticuerpo-complemento**. Esta exposición de los antígenos permite su interacción con el BCR de los LB generados (De Silva and Klein, 2015).

En este contexto, los distintos LB producidos en la zona oscura, compiten por los antígenos expuestos por las FDC, dónde solo aquellos que tengan una alta afinidad, serán capaces de quitárselos a las FDC para procesarlos y presentar el antígeno en forma de péptidos en el **Complejo Mayor de Histocompatibilidad II (MHC-II)**. El complejo péptido-MHC-II media la interacción con el  $T_{FH}$ , y como resultado de esta ésta, el  $T_{FH}$  provee de señales de supervivencia al LB, mediante la unión de **CD40L** con **CD40**. En forma análoga, aquellos LB cuyo BCR exhiba una baja afinidad producto de la SHM, serán ineficientes para presentar antígenos y por lo tanto no recibirán los estímulos de los  $T_{FH}$  conduciéndose así a su muerte celular por apoptosis. A su vez, cabe señalar que el LB seleccionado vuelve a la zona oscura para repetir este proceso de selección sucesivas veces con el objetivo de aumentar la afinidad del BCR por el antígeno en cuestión (De Silva and Klein, 2015).

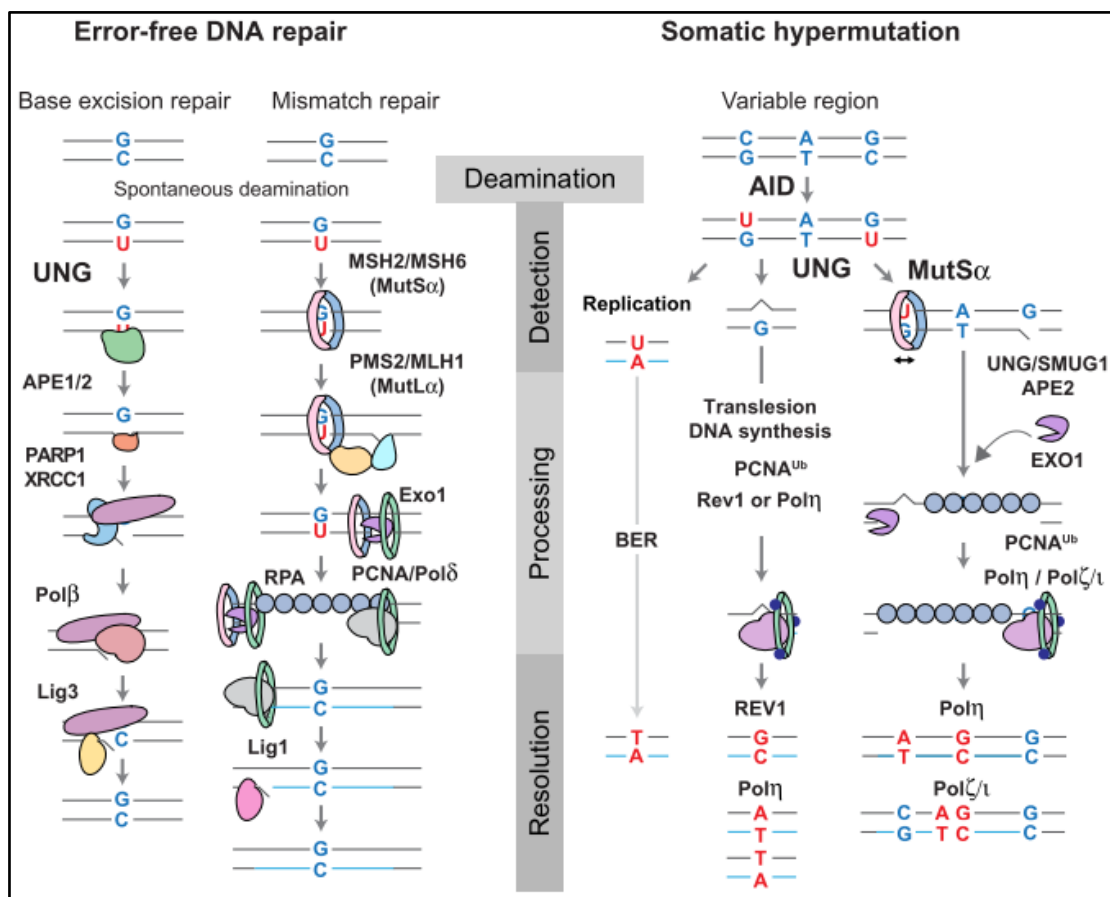
## 2.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE AID

La enzima Citidina Deaminasa Inducida por Activación o AID, originalmente fue descubierta como un factor sobreexpresado en una línea B murina de linfoma (CH12F3) al ser inducido el proceso de **CSR** (Muramatsu *et al.*, 1999). Posteriormente, sería determinado que ratones deficientes para AID son incapaces de realizar **CSR** y **SHM**, así como también que humanos con mutaciones en este gen presentan severos defectos para realizar dichos procesos, como es el caso del síndrome Hiper IgM, primer enfermedad humana que fuera asociada a AID y que deja en claro su rol esencial en estos procesos (Revy *et al.*, 2000). AID pertenece a la familia de deaminasas de polinucleótidos **APOBEC** que tienen como característica la capacidad de deaminar citosinas a uracilos tanto en DNA como RNA (Di Noia and Neuberger, 2007). En particular AID presenta una gran homología con **APOBEC-1**, el componente catalítico de un complejo de edición del RNA de la Apolipoproteína B, razón por la cual se ha propuesto la posibilidad de su acción a nivel de RNA, sin embargo, hasta el momento, en condiciones *in vivo* solo ha mostrado ejercer su actividad a nivel de DNA (Methot and Di Noia, 2017).

Para que AID pueda actuar y deaminar los residuos de Citidina, es necesario que el DNA se encuentre en la forma de simple hebra (**ssDNA**, del inglés), por lo cual los genes blancos deben presentar una activa transcripción, de modo que la doble hebra se encuentre temporalmente desplegada (Di Noia and Neuberger, 2007). Asimismo, se ha visto que AID tiene preferencia por deaminar en ciertos sitios conocidos como **hot-spots**, dónde las citosinas se encuentran dentro de una secuencia cuyo consenso se define como **WRCY** (dónde  $W=A/T$  y  $R=A/G$  e  $Y=C/T$ ). Dichos sitios lógicamente se hallan más concentrados tanto en la región **IgV** y como en las distintas regiones pre-Switch. Esta secuencia preferencial se encuentra directamente relacionada con la estructura de AID, en particular con la de un **loop** denominado **de especificidad** ubicado dentro de su sitio catalítico y conservado dentro de la familia de las APOBEC. Más allá de dicha preferencia, como se describirá más adelante, el proceso mutagénico ocasionado a AID puede llevar no solo a mutaciones en el par C:G, sino también en el A:T mediante una vía indirecta (Methot and Di Noia, 2017).

El proceso de SHM puede ser visto como en dos etapas, dónde la primera consiste en la deaminación de AID y la segunda el camino tomado para reparar la mutación producida, siendo posible seguir la vía conocida como **Reparación por Escisión de Base (BER)** o la de **Reparación por Despareamiento de Bases (MMR)**, asociándose cada una a distintos tipos de mutaciones. Cabe mencionar que ambas vías actúan de forma normal y concertadamente para reparar fielmente las

mutaciones que ocurren en el DNA, pero que, por razones aún no del todo esclarecidas, durante el proceso de SHM siguen vías no canónicas que conducen a la producción de mutaciones. De igual manera, la evidencia sugiere que durante la SHM, las vías canónicas no se encuentran del todo ausentes sino que existe un equilibrio entre la reparación libre de errores y la mutagénica (Blanc and Davidson, 2003; Methot and Di Noia, 2017). Asimismo un tercer desenlace posible es que ninguna de las vías mencionadas reparen el par U:G previo a la replicación del ADN, haciendo que durante ésta, el U sea leído como T y se produzca una transición a un par T:A en el sitio original (**Figura1**).



**Figura 1. Mecanismos de Hipermutación Somática provocada por AID.** A la izquierda se describen las vías canónicas de la Reparación por escisión de base (BER) o de mal apareamiento (MMR) que suponen la restauración de la citosina originalmente deaminada por AID. Mientras que a la derecha se observan los procesos ocurridos durante la SHM que conducen a la generación de mutaciones descritas en el texto tanto por la simple replicación y posterior reparación, o por las vías no canónicas de BER y MMR. Notar que en gris se indica la hebra madre y en celeste la hebra hija generada luego de la replicación del ADN. Figura adaptada de Methot & Di Noia, 2017.

**La vía BER:** Uno de los posibles caminos a seguir a partir del uracilo producido por AID es removerlo, lo cual es el desencadenante de la vía BER, siendo necesaria en este paso la **Uracil-DNA glicosilasa (UNG)** para generar un sitio abásico en esa posición. El camino habitual libre de errores conduciría al reclutamiento de la endonucleasa **APE** que cliva el DNA produciendo una mella y conduce al reclutamiento de proteínas accesorias (XRCC1) del tipo “*scaffold*” para permitir la actividad de una DNA **Polimerasa β** (de alta fidelidad) que junto a una Ligasa repararán fielmente la mutación (Krokan and Bjørås, 2013).

Sin embargo, por razones no del todo esclarecidas aún, pero que se atribuyen a una ubiquitinación diferencial en el **Antígeno Nuclear de Células en Proliferación** o **PCNA**, ocurre un reclutamiento de

Polimerasas de “*by-pass*” (capaces de actuar en presencia de lesiones en el ADN) tales como **REV1**, **Polη**, las cuales además de poder replicar el DNA en presencia de un sitio abásico, tienen las características de ser poco procesivas y propensas a error, conduciendo a la generación de mutaciones (Moldovan, Pfander and Jentsch, 2007). Tal es el caso de la Deoxicidil Transferasa **REV1**, que coloca una citosina opuesta al sitio abásico al replicar la hebra nueva, y por lo tanto conduce a una mutación del tipo **C → G**. De forma análoga si reclutada es ahora la **Polη**, ésta suele introducir T o A opuestas al sitio abásico, llevando a mutaciones **C → A** o **C → T**, respectivamente (**Fig. 1**).

**La vía MMR:** Así como el uracilo puede ser reconocido como una base foránea al DNA y ser removido mediante la vía BER, también puede ser reconocido como un mal apareamiento y ser reparado por la vía de MMR. La vía canónica consiste en el reconocimiento del par U:G por el complejo **MutSa** (MSH2/MSH6), prosigue con el reclutamiento del complejo **MutLa** (MLH1/PMS2) y el clivaje por parte de la endonucleasa (**PMS2**) en la posición 5' del par U:G. La mella producida recluta a la exonucleasa **EXO1** que degrada en sentido 5' → 3' eliminando una sección del DNA que incluye el desapareamiento. Luego dicho sitio se rellena mediante la **Polδ** (de alta fidelidad) en complejo con **PCNA** (Jiricny, 2013). La vía mutagénica observada durante la SHM, es similar en etapas iniciales, pero sin embargo debido al PCNA ubiquitinado ocurre el reclutamiento de polimerasas de baja fidelidad como: **Polη**, **Pol ζ**, y **Polι**, siendo la primera la más predominante. La acción de **Polη** resulta en mutaciones a nivel del par C:G inicialmente blanco de AID (como en BER) produciendo el cambio **C → A**. Sin embargo, también pueden ocurrir mutaciones a nivel de los pares A:T cercanos. Es de notar que, este tipo de mutación no es directamente ocasionado por AID sino que es debido a la acción de las polimerasas propensas a introducir nucleótidos erróneamente (Di Noia and Neuberger, 2007; Methot and Di Noia, 2017) (**Fig. 1**).

De esta forma, al igual que en el caso de las mutaciones en el par C:G se definiera un *hot-spot* del tipo **WRCY** en la hebra líder (o **YGRW** en la complementaria); se ha determinado que también existe un *hot-spot* a nivel de las mutaciones derivadas del par A:T, con la secuencia consenso **WA** o **TW** en cada hebra respectivamente. Sin embargo, es de destacar que mientras las mutaciones producidas en el par C:G ocurren con similar frecuencia en ambas cadenas, en el caso de A:T existe un sesgo claro hacia las mutaciones generadas a partir de A y no de T (Spencer and Dunn-Walters, 2005). Esto posiblemente se deba a que mientras la primera se asocia a AID y su capacidad de mutar indistintamente en ambas cadenas mientras que el segundo proceso mutacional, parece encontrarse asociado a la maquinaria transcripcional y por lo tanto a la hebra utilizada como molde para ésta (Neuberger *et al.*, 2005).

Brevemente, en lo referente al otro proceso que involucra a AID ocurrido en los LB durante su pasaje por el CG, la **recombinación de cambio de clase** o **CSR**, implica el cambio de la región constante de la cadena pesada y sigue etapas similares a las descritas en la SHM. La CSR ocurre entre las regiones pre-**switch** de las cadenas pesadas (como por ej.: **Sα**, **Sμ**, o **Sγ**), ricas en repetidos del tipo (GAGCT)<sub>n</sub>(GGGGGT). Dichos repetidos al ser transcriptos provocan un detenimiento de la RNA polimerasa permitiendo el acceso de AID y a su vez forman estructuras denominadas **cuádruplex-G** que guían a AID hacia dicho sitio. Luego mediante la actividad concertada de **UNG** y una endonucleasa llamada **APE1** se producen cortes de doble hebra en el DNA, permitiendo la recombinación mediante una maquinaria de reparación de dichos cortes (**DSBR**) lo que conduce al cambio de clase (Methot and Di Noia, 2017).

## 2.2 ROL ONCOGÉNICO DE AID

Existen diversos mecanismos de regulación de AID, cuyo objetivo general es mantener controlada de modo de reducir al mínimo su posible actividad en genes fuera del locus Ig. Los niveles de regulación pueden ser: **transcripcionales**, mediada por diversos factores de transcripción inducibles ante estímulos particulares como **NF-kB, PAX5, STAT6, IRF4 y FOXO1** (Gonda *et al.*, 2003; Dedeoglu *et al.*, 2004; Klein *et al.*, 2006; Dengler *et al.*, 2008); **post-transcripcionales**, con la acción de microRNAs (miRs) como los **miR-155** y **miR-181b** que disminuyen su expresión (de Yébenes *et al.*, 2008; Dorsett *et al.*, 2008); como también **post-traduccionales**, por medio de la quinasa **PKA** y la fosforilación en la Ser38 conduciendo a un aumento en su actividad (Pasqualucci *et al.*, 2006). Asimismo, existe un nivel más fino de regulación, que refiere a su **estabilidad y compartimentación**: en estado estacionario cerca del **90%** de AID se encuentra en el citoplasma. Esto es debido a varias razones, por un lado AID es activamente exportada hacia el citoplasma; por otro, en el citoplasma se asocia a chaperonas que la estabilizan durante su plegamiento (**HSP90**) o que la retienen en el citoplasma (**eEF1A**) prolongando su vida media (Methot *et al.*, 2015). Mientras que en el núcleo AID es degradada rápidamente mediante la acción de un activador del proteasoma (**REGγ**) y una ubiquitin ligasa hasta el momento desconocida (Uchimura *et al.*, 2011).

Pese a los diversos e interconectados mecanismos de regulación que contribuyen a mantener la actividad de AID circunscripta a los procesos de SHM y CSR, la interrogante de si dicha función puede ser ejercida fuera del locus Ig y afectar a otras regiones del genoma (conocida como **actividad off-target**) surgió hace varios años. En efecto, distintos estudios han demostrado que AID es capaz de unirse a cientos de genes en el genoma fuera del locus Ig pero sólo deaminar algunos de éstos (el porqué de esto último sigue siendo una cuestión aún no esclarecida) (Liu *et al.*, 2008; Casellas *et al.*, 2016).

La actividad *off-target* de AID se ha asociado a diversos tipos de neoplasias originadas a partir del LB; en efecto, no es casual que el **80%** de los **linfomas no Hodgkinianos**, (neoplasias generadas a partir de Linfocitos) ocurre a nivel del LB (Methot and Di Noia, 2017). Antes de profundizar en el rol oncogénico de AID debido a su actividad *off-target*, es oportuno señalar que recientemente se ha postulado un posible rol fisiológico de ésta, gracias a la determinación de actividad de AID en **LB autorreactivos** de la médula ósea. Mediante ensayos de silenciamiento específico en un modelo murino ha sido posible demostrar que AID (en conjunto con las proteínas **RAG**) contribuye a la **tolerancia central**, mediante la inducción de **apoptosis** en LB que presentan BCR con autorreactividad (reconocimiento de antígenos propios) (Cantaert *et al.*, 2015).

Es posible asociar la inestabilidad genómica típica del LB a la actividad de AID. Diversos estudios han probado su participación en translocaciones cromosómicas que involucran al locus Ig y que conducen a procesos tumorales. Tal es el caso de los linfomas provenientes de **LB maduros** con las translocaciones: c-myc/Ig<sub>H</sub> (**Burkitt**), BCL-2/ Ig<sub>H</sub> (**Folicular**) o BCL-1/ Ig<sub>H</sub> (**de células de manto**), BCL-6/Ig<sub>H</sub> (**difuso de células B grandes**), entre otros. Dichas translocaciones implican una desregulación en la expresión de oncogenes producto de su yuxtaposición con los potentes *enhancers* del locus Ig, llevando a procesos oncogénicos (Küppers and Dalla-Favera, 2001). Estudios mediante silenciamientos de AID en ratones y líneas celulares han permitido demostrar que dichas translocaciones se deben a la acción esta enzima (Ramiro *et al.*, 2004).

Recientemente se ha determinado que la mayor actividad *off-target* de AID se observa en regiones de cromatina descondensada bajo la regulación de dominios conocidos **super-enhancers**.



Dichas regiones del genoma presentan una gran actividad transcripcional y epigenética producto de la concatenación e interacción en el espacio de *enhancers*, posible gracias a la topología que toma el DNA en éstas. La hipótesis es que una vez que AID es reclutada hacia dichos sitios, es capaz de deaminar varios elementos que presentan en común sus altos niveles de transcripción (Casellas *et al.*, 2016).

Dentro de los genes blanco por AID asociados a **linfomas de células B** se encuentran varios oncogenes (**BCL6**, **PAX5**, **CD79A**, **PIM1**, **CD95** y **MYC**) (Reiniger *et al.*, 2006; Feldhahn *et al.*, 2007.) y genes supresores de tumor (**RHOH**) (Montamat-Sicotte *et al.*, 2013). Asimismo, su actividad *off-target* ha sido detectada en leucemias como la Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL), en y la **Leucemia Linfoide Crónica (LLC)** en particular en casos con una evolución más agresiva (Albesiano *et al.*, 2003; Hardianti *et al.*, 2005).

A su vez, la expresión de AID en la LLC, como será descrito más adelante, ha sido también asociada a alteraciones cromosómicas presentes en pacientes con mal pronóstico (deleciones cromosómicas como **del17p**, **del11q**) (Leuenberger *et al.*, 2010; Patten *et al.*, 2012). Sin embargo hasta el momento no hay evidencia directa de que AID sea la responsable de éstas (Gelmez *et al.*, 2014).

### 3. LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA (LLC)

#### 3.1 GENERALIDADES

La Leucemia Linfocítica Crónica o LLC es un tipo de **linfoma no Hodgkiniano** caracterizado por la acumulación progresiva de pequeños linfocitos B (LB) maduros, clonales y neoplásicos en **la sangre periférica (SP)**, médula ósea y **órganos linfoides secundarios**, provocando linfocitosis, linfadenopatías y esplenomegalia. Es la leucemia de adulto más frecuente en los países occidentales, afectando principalmente a individuos mayores de 50 años (Dighiero and Hamblin, 2008).

En lo que refiere a su epidemiología, en países occidentales como Estados Unidos, durante el año 2016 se registraron aproximadamente 19.000 casos nuevos de LLC, con un promedio de edad de diagnóstico entre 70-72 años y un factor de riesgo cercano al doble para hombres sobre mujeres, el cual se incrementa con la edad (Miller *et al.*, 2016). La incidencia varía según las regiones geográficas así como la composición étnica de la población. En países occidentales oscila entre 3,5/100.000/año (Estados Unidos) y 6/100.000/año (Reino Unido). En lo que refiere a Uruguay, se observan valores semejantes de incidencia de **5,2/100.000/año** con una edad promedio de diagnóstico de 70 para hombres y 74 para mujeres (Bezares F.; and Slavutsky I., 2009; Bianchi *et al.*, 2010).

Existen distintos factores que contribuyen con su etiología, destacándose a nivel del LB neoplásico las **mutaciones** y **alteraciones cromosómicas**. En los últimos años, han cobrado notoriedad asimismo el rol del **microambiente tumoral** con particular foco en células estromales, linfocitos T y células “*nurse-like*” (o nodrizas), cuya interacción con los LB en ganglios linfáticos resulta ser de vital importancia durante la progresión de la enfermedad (Burger and Gribben, 2014).

La progresión de dicha enfermedad es **sumamente heterogénea** observándose pacientes con una leucemia agresiva que requieren tratamiento desde su diagnóstico como también aquellos con una LLC indolente que nunca deberán ser tratados. Si bien existe una amplia gama de abordajes terapéuticos, como, quimioterapia, inmunoterapia así como drogas inhibitorias de la señalización del BCR o apoptosis, en la actualidad no existe un tratamiento que permita la completa remisión de la enfermedad en todos los casos, por lo cual dicha neoplasia sigue considerándose incurable (Bianchi, Dighiero and Pritsch, 2012; Kipps *et al.*, 2017).

Para su correcto diagnóstico clínico es necesario determinar una linfocitosis en sangre de al menos  $5 \times 10^9/L$  de linfocitos B maduros y con cierto inmunofenotipo, cuyas principales características principales se resumen como: expresión de marcadores de LB (**CD19, CD20 y CD23**) cómo también de **CD5**, normalmente expresado en LT; así como también una baja expresión del **BCR, CD79 $\beta$ , CD20 y CD22** con respecto a la población de LB normales (Dighiero and Hamblin, 2008).

Desde un punto de vista molecular los pacientes de LLC pueden ser divididos en dos grupos principales con evoluciones clínicas diferentes en función de la presencia de ciertas aberraciones cromosómicas y del tipo de BCR expresado por el LB leucémico. En tal sentido, los pacientes las células leucémicas que presenta una secuencia de la región **IgV<sub>H</sub>** idéntica a la germinal, es decir un **IgV<sub>H</sub> No Mutado (NM)** así como también deleciones cromosómicas que abarquen los genes supresores de tumores TP53 y/o ATM se asocian a un mal pronóstico y una enfermedad **progresiva**. Por el contrario, los pacientes con un **IgV<sub>H</sub>** distinto a la secuencia germinal o **IgV<sub>H</sub> Mutado (M)** y un cariotipo normal o otras aberraciones como la deleción 13q, presentan un buen pronóstico y una enfermedad **indolente**.

Tal como ocurre para otras neoplasias, es posible asociar la agresividad de la LLC con el estadio de diferenciación de la célula leucémica original, dónde en los pacientes **IgV<sub>H</sub>-NM** la enfermedad se origina de un LB leucémico menos diferenciado, que no ha pasado por la reacción del centro germinal ni experimentado SHM. Análogamente, en los pacientes **IgV<sub>H</sub>-M** el clon tumoral proviene de un LB más diferenciado, que ha pasado por los procesos de CG e incluso en algunos casos presenta CSR de IgM a IgG (Kipps *et al.*, 2017).

Corresponde hacer la precisión de no confundir el perfil mutacional de la región **IgV<sub>H</sub>** (fisiológico), que refleja el posible origen celular de la leucemia, con las mutaciones que pueden ocurrir en el genoma durante la evolución de la LLC. En efecto, pacientes con **IgV<sub>H</sub>-NM** presentan mayores mutaciones somáticas fuera del locus Ig (Fabbri and Dalla-Favera, 2016).

### 3.2 DESARROLLO Y EVOLUCIÓN

La naturaleza de la predisposición genética a la LLC es todavía desconocida. En lo que refiere a las **alteraciones cromosómicas**, dado que no se tratan de alteraciones constantes en todos los pacientes, sigue sin estar claro si constituyen eventos iniciales u ocurren durante la evolución de la enfermedad. En tal sentido, mediante el abordaje de técnicas como hibridación fluorescente in situ (**FISH**) se ha determinado que cerca del **80%** de los pacientes con LLC presentan al menos una de las cuatro alteraciones cromosómicas siguientes: las deleciones **del13q**, **del11q**, **del17p** o la **trisomía 12**. La **del13q** se observa en más del **50%** de los pacientes, se asocia con un buen pronóstico y comprende la región del cluster de genes DLEU2, miR-15 y miR-16 que regulan la expresión de proteínas antiapoptóticas (como **BCL2**) y de progresión del ciclo celular. La **del11q** se encuentra en el **18%** de los pacientes y se asocia a la supresión del gen **ATM**, una proteína clave para la reparación a los daños del DNA, mientras que la **del17p** se encuentra en el **7%** de los casos y supone la pérdida del gen supresor de tumores **TP53**. En lo que refiere a la trisomía 12, su implicancia patogénica en la LLC no es del todo clara, sin embargo, se ha propuesto que es capaz de ocasionar una elevada dosis genética de un posible proto-oncogén (CLLU1). El profundo impacto que la pérdida de TP53 y ATM ocasiona sobre mecanismos celulares responsables de la prevención de procesos tumorales, posee su correlato clínico en dónde las deleciones **17p** y **11q** se asocian a un mal pronóstico e incluso a resistencia al tratamiento (Döhner *et al.*, 2000; Winkler *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2010; Bianchi, Dighiero and Pritsch, 2012).

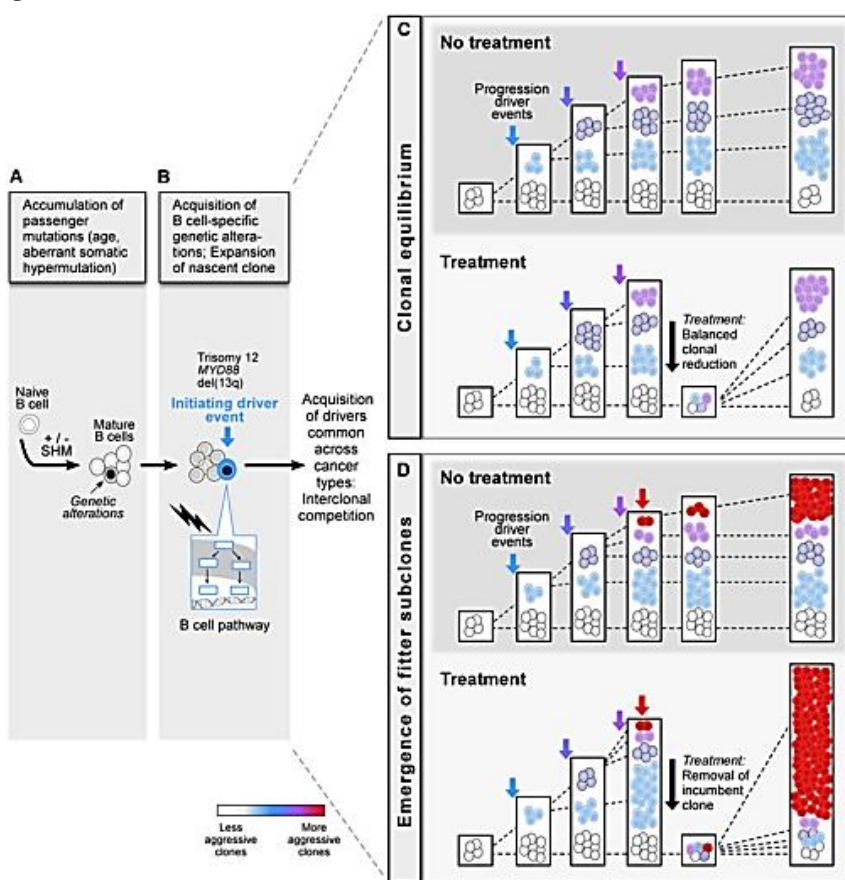
Un gran avance en la búsqueda de mutaciones que sean determinantes en el surgimiento y/o evolución de la LLC, ha sido posible con el advenimiento de las técnicas de secuenciación masiva (**NGS**) mediante estudios de **WGS** y **WES** (*Whole Genome/Exome Sequencing*) que suponen el secuenciado del genoma y de las regiones exónicas, respectivamente. Éstas han permitido determinar que una contribución importante a la heterogeneidad de la LLC se finca en la alta diversidad de mutaciones somáticas que pueden estar presentes en los LB leucémicos.

Dichos estudios, han permitido definir mutaciones recurrentes en genes asociados a diversos procesos tales como: reparación del daño al ADN (**TP53** y **ATM**), procesamiento del ARN mensajero (**SF3B1** y **XPO1**), modificación de la cromatina (**HIST1H1E**, **CH2**, **ZMYM3**), señalización por **WNT**, señalización por **NOTCH1** y procesos inflamatorios (**MYD88**).

Existen dos estudios pioneros que han representado un gran avance en la determinación mutaciones somáticas por WGS y WES (Puente *et al.*, 2011; Landau *et al.*, 2015). En ambos se analizaron más de 500 pacientes, pero de distintas características, mientras en uno fueron estudiados pacientes antes

y luego del tratamiento; en el otro se fueron seleccionados pacientes en estadios tempranos de la LLC o incluso pacientes con Linfocitosis Monoclonal B (un desorden linfoproliferativo muy emparentado a la LLC y que en muchos casos evoluciona hacia ésta). En el primero *Landau y col.*, identificaron como más frecuentes y de mayor relevancia en la **progresión** las mutaciones en **SF3B1** (21%), **ATM** (15%), **TP53** (7%), **NOTCH1** (6%) y **BIRC3** (4%). Mientras que en el segundo *Puente y col.*, reportaron como las mutaciones más frecuentes en **NOTCH1** (12,6%), **ATM** (11%), **BIRC3** (8,8) y **SF3B1** (8,6%).

Sumado a la heterogeneidad de mutaciones que han sido descritas en la LLC las técnicas de NGS han contribuido a vislumbrar un nivel más de complejidad, el de la **heterogeneidad intratumoral**, esto es, la presencia de mutaciones en un subgrupo de LB leucémicos que se diferencian del clon original, definidas como **mutaciones subclonales**. Esta característica es propia de muchos cánceres, en dónde debe considerarse la evolución del tumor como proceso competitivo y de continua interacción entre las distintas clonas. En tal sentido, se ha determinado que la presencia de ciertas mutaciones somáticas en genes como **MYD88** o alteraciones cromosómicas como la **trisomía 12** o la **del13q** se encuentran en



**Figura 2. Modelo de la transformación y evolución clonal de la LLC.** Partiendo de una acumulación progresiva de mutaciones (A) ocurre la transformación tumoral (B) y posterior diversificación subclonal, teniendo dos escenarios, uno de equilibrio, sin clonas con mutaciones o alteraciones agresivas (C) y otro donde una tipo subclonal agresivo se impone e incluso resulta resistente al tratamiento, provocando la reincidencia de la LLC y refractariedad al tratamiento (D). (Figura extraída de Landau et al 2013)

oncológico. Estos tipos de mutaciones, por el momento en que ocurren serán de carácter **clonal**, con la diferencia que las últimas se tratan de las recurrentes en la LLC. Posteriormente, en una tercera etapa ocurre una expansión de las **mutaciones subclonales** en el tiempo, en dónde el *fitness* ante factores

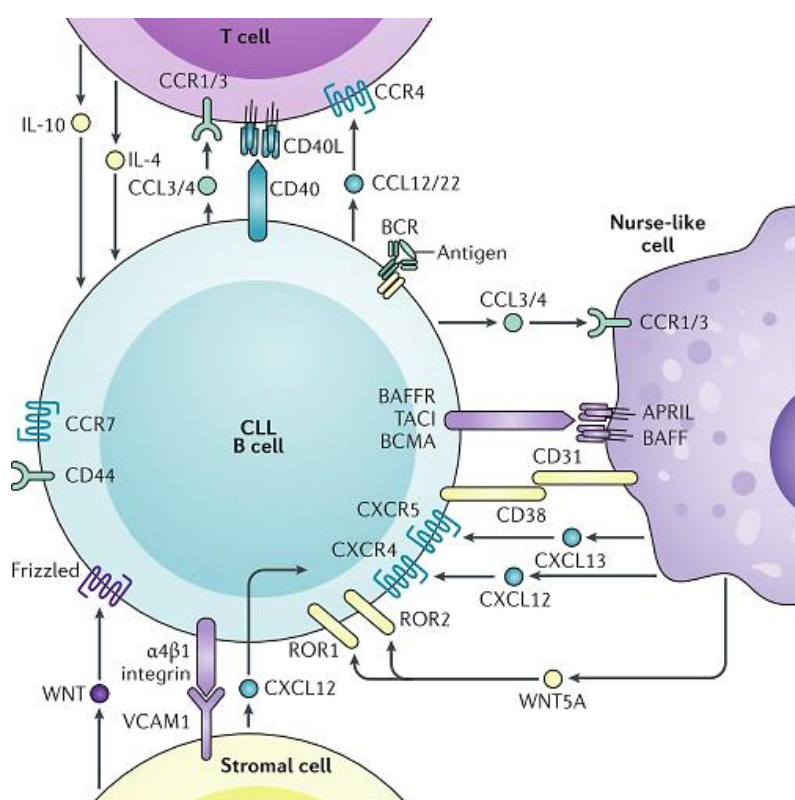
en todas las clonas de un paciente, sugiriendo que las mismas ocurren en etapas tempranas de la enfermedad. Por el contrario, mutaciones en **NOTCH1**, **TP53** o **SF3B1** así como la **del17p**, son típicamente detectadas en una pequeña fracción de las células leucémicas. Estos hallazgos dejan en manifiesto la acción de un mecanismo de **evolución clonal** durante el desarrollo de la LLC que resulta clave explicar los procesos de mayor agresividad de la leucemia y refractariedad al tratamiento (Landau et al., 2013).

En consonancia con lo anterior, se ha propuesto que la evolución de la LLC puede dividirse en **tres etapas**, en una inicial, previa a la transformación tumoral se acumulan mutaciones proporcionalmente con el envejecimiento hasta que, en una segunda etapa, se producen ciertas mutaciones claves y ocurre la transformación hacia el proceso

intrínsecos (como proliferación y supervivencia celular) y extrínsecos (como competición inter-clonal y tratamiento), conducen a la **selección** y **expansión** de éstas dentro del pool clonal. En el contexto de una enfermedad considerada hasta el momento incurable, resulta interesante considerar el efecto que puede ejercer el tratamiento sobre dicha heterogeneidad intratumoral. En tal sentido, en base a los aportes brindados por *Landau et al.*, ha sido posible determinar dos clases de escenarios en la evolución. En el primero, en ausencia de **mutaciones subclonales drivers** (de riesgo) se observa un **equilibrio clonal en el tiempo** donde los tamaños relativos de cada tipo subclonal se mantiene estable, pudiéndose eventualmente imponer alguno como dominante. Por el contrario, en presencia de eventos **subclonales drivers** que confieran una mayor aptitud a cierta clona sobre el resto (ej. mutaciones o la **del17p**), la acción citotóxica del tratamiento propiciará las condiciones ideales para que ésta se expanda ante la eliminación de las clonas menos resistentes. De esta forma el tratamiento proporciona una **presión selectiva externa** que permite el rápido crecimiento de un tipo subclonal, reflejándose en una mayor agresividad de la LLC y resistencia al tratamiento (**Fig. 2**) (*Landau et al.*, 2013).

### 3.2 MICROAMBIENTE TUMORAL Y PROLIFERACIÓN

Un elemento estrechamente asociado al proceso de evolución clonal y por ende al curso que



**Figura 3. El microambiente tumoral en la LLC.** La célula leucémica recibe diversos estímulos de supervivencia y proliferación por parte de las células del microambiente tumoral: MSC, NLC y LT. Las mismas se detallan en el texto. Figura adaptada de Kipps et al, 2017.

tomará la enfermedad es la interacción de las células B leucémicas con el **microambiente tumoral** que las rodea. La relevancia del microambiente queda de manifiesto en los diversos estudios realizados que prueban que células leucémicas extraídas de pacientes no son capaces de mantenerse vivas por sí solas en condiciones *in vitro*. Pese a tratarse de células tumorales, si éstas no son cultivadas con señales de supervivencia externas, tales como **CD40L** o co-cultivo con células estromales, las mismas no sólo no proliferan sino que ni siquiera sobreviven demasiado tiempo (*Panayiotidis et al.*, 1996; *Burger et al.*, 2000). Esto no es casual, dado que en el contexto de la LLC los linfocitos leucémicos reciben señales de **supervivencia y proliferación** en tejidos linfoides por parte de células no B, en estructuras celulares

denominadas **pseudofolículos** o **centros proliferantes**, por asemejarse a los ya descritos centros germinales. El LB leucémico llega a dicho sitio por un gradiente de quimioquinas (principalmente

CXCL12) en donde establece contacto con diversas células no B: **células estromales mesenquimales (MSC)**, **células nurse-like (NLC)** y **Linfocitos T**.

Las **MSC** son cruciales durante la linfopoyesis B así como durante la formación de los centros germinales. En el contexto de la LLC, se ha visto que son responsables de guiar al LB hacia el centro proliferante mediante la secreción de **CXCL12**, así como también de favorecer la supervivencia celular por la secreción de factores inductores de la vía **WNT** reconocidos por receptores como **ROR1** o **ROR2** o receptores de la familia **Frizzled**. De igual manera las **NLC** son capaces de atraer al LB también mediante **CXCL12**, siendo a su vez ellas atraídas hacia él por medio de **CLL3** y **CLL4**. Las **NLC** proveen de señales de proliferación y supervivencia por factores como **BAFF** (Factor de Activador de LB), **APRIL** (Ligando Inductor de Proliferación), así como también por la interacción de **CD31** con **CD38**. En lo que refiere a los **LT**, éstos son reclutados activamente por el LB al igual que las **NLC** por **CLL3** y **CLL4**. Cuando éstos se encuentran activados expresan **CD40L** capaz de interactuar con **CD40**, que como ha sido mencionado, constituye una señal de activación y supervivencia para el LB. Asimismo el **LT** es capaz de secretar varias citoquinas, siendo la más relevante en la LLC la **IL-4**, capaz de generar distintos efectos en la célula leucémica, entre ellos un aumento de los niveles del **BCR** así como también una inducción en la expresión **AID** (**Fig. 3**) (Dedeoglu *et al.*, 2004; Burger and Gribben, 2014; Kipps *et al.*, 2017).

En función de lo mencionado, y contrario a la consideración de antaño de que la LLC se trata de una enfermedad de lenta y progresiva acumulación de LB producto de una evasión de la apoptosis, ha surgido una nueva concepción que tiene en cuenta la importancia de la activa proliferación de los LB leucémicos. La misma, como se mencionara tiene lugar principalmente en los ganglios linfáticos donde el LB interactúa con las células de microambiente tumoral. En efecto, ha sido demostrado que a nivel de ganglios linfáticos de pacientes de LLC ocurre una sobreactivación tanto de la vía de señalización del **BCR** como de la vía canónica de **NF-κB**, las cuales se asocian a una mayor expresión de marcadores de proliferación como **Ki-67** (Herishanu *et al.*, 2011). Como se mencionara en el primer capítulo, el **BCR** provee de una señal esencial para la supervivencia del LB. Ciertos autores, han propuesto que la activación constitutiva del mismo podría darse por presencia de auto-antígenos o por antígenos ambientales. Independientemente de cuál es la señal que activa al **BCR**, la relevancia de su función en la LLC ha sido ratificada por el éxito de terapias que inhiben la señalización por el **BCR**, entre ellas el **Ibrutinib** o el **Idelalisib** que tienen como blanco la **BTK** (Tirosina Quinasa de Bruton) y la **PI3K** (Fosfatidil-3 Quinasa) esenciales en la vía de señalización del **BCR** (Kil *et al.*, 2012; de Rooij *et al.*, 2015). El rol del **BCR** y la enzima **AID** en el desarrollo y evolución de neoplasias asociadas al LB ha sido abordado durante este trabajo de tesis y reflejado en el capítulo “*The Antigen Receptor as a Driver of B-Cell Lymphoma Development and Evolution*” (**Anexo 1**).

Si bien los eventos mencionados de proliferación ocurren a nivel de los pseudofolículos en los ganglios, dado que los LB se encuentran continuamente circulando entre sistema sanguíneo y linfático, fue posible mediante experimentos con agua deuterada, determinar la presencia de una fracción de LB en SP capaces de proliferar. En efecto, la fracción proliferante fue distinguida por expresar bajas cantidades de **CXCR4** y altas de **CD5** (**CXCR4<sup>low</sup>/CD5<sup>high</sup>**), mientras que la población quiescente de LB se distingue con el inmunofenotipo inverso **CXCR4<sup>high</sup>/CD5<sup>low</sup>**. Si se tiene en cuenta que el **CXCL12** liberado por las **MSC** y **NLC** en los centros proliferantes induce una menor expresión de **CXCR4** en el LB, puede concebirse a la sangre periférica como el reflejo de un momento de la enfermedad donde coexisten células proliferantes emergentes de los ganglios linfáticos junto con una población mayoritaria de células

quiescentes que exhiben dicho fenotipo debido a la ausencia de estímulos del microambiente (Calissano *et al.*, 2011).

En consonancia con lo anterior, al mismo tiempo fue observado que pacientes con **IgV<sub>H</sub>-UM** de mal pronóstico presentan una de fracción de LB en sangre periférica que exhiben marcadores **anti-apoptóticos** y de **proliferación** (Ki-67, c-myc, Bcl-2, entre otros), y que a su vez presentan una alta expresión de **AID** y una activa **CSR** de IgM a IgG. Es más que probable que dicha población proliferante también tenga su origen en las distintas interacciones descritas con el microambiente tumoral activado a nivel de los pseudofolículos. Asimismo permite explicar la asociación previamente reportada de un mal pronóstico con niveles la expresión **AID** en sangre periférica (Oppezzo *et al.*, 2003; Palacios *et al.*, 2010).

Más aún, un estudio posterior contribuyó a afianzar el concepto de que **AID** se encuentra expresada en LB de sangre periférica que provienen de los centros proliferantes, al determinar su expresión en células leucémicas con altos niveles de **CD86** y bajos de **CXCR4** (**CD86<sup>hi</sup>/CXCR4<sup>low</sup>**). Dicha población se superpone a su vez con la mencionada de **CXR4<sup>low</sup>/CD5<sup>high</sup>** con el agregado de **CD86**, un marcador de activación que se encuentra típicamente sobreexpresado en los LB activados del centro germinal (Huemer *et al.*, 2014).

Por lo tanto, las tres poblaciones proliferantes descritas en la LLC, presentan características en común, que dejan en claro que durante la progresión de la enfermedad ocurren dos procesos íntimamente relacionados: **1) la interacción de las células leucémicas con un microambiente que provee de señales de sobrevivencia y proliferación, 2) la expresión activa de AID en la LLC fuera de su rol fisiológico.**

### 3.3 IMPLICANCIAS DE AID EN LA LLC

Además de la ya descrita asociación de **AID** con las poblaciones proliferantes, su implicancia en la LLC ha sido extensamente abordada a partir de que su expresión fuese detectada en esta neoplasia (Albesiano *et al.*, 2003), y luego confirmada en estudios posteriores (Oppezzo *et al.*, 2003; Pasqualucci *et al.*, 2004; Guikema *et al.*, 2005). En tal sentido, se ha determinado que la LLC representa un escenario singular en dónde la expresión de **AID** en las células leucémicas presenta una disociación entre los procesos de **SHM** y **CSR**. En efecto, ha sido observado que pacientes con **IgV<sub>H</sub>-NM** no muestran evidencia alguna de **SHM** a pesar de la expresión de **AID**. Sin embargo, distinto es lo que ocurre a nivel las regiones pre-Switch, dónde es posible encontrar mutaciones de **AID** así como también actividad de **CSR** en dichas células leucémicas (Oppezzo *et al.*, 2003).

Estudios posteriores permitieron a su vez asociar la expresión de **AID** no solo al **IgV<sub>H</sub>-NM**, sino también a las aberraciones de mal pronóstico en la LLC, las delecciones en 17p y 11q, situando de esta forma su niveles de expresión como una nueva característica distintiva de mal pronóstico dentro de la LLC (Heintel *et al.*, 2004; Leuenberger *et al.*, 2010; Patten *et al.*, 2012). En la búsqueda de un mecanismo que permitiese explicar los distintos niveles de expresión de **AID** detectados en la LLC, unos años más tarde Oppezzo y col. serían capaces de demostrar una asociación de los mismos, con la presencia de distintas isoformas de la **Proteína Activadora Específica de la Célula B** (BSAP, del inglés) que se encuentra codificada por el gen **PAX5**. En efecto, altos niveles de la proteína completa o *full-length* se correlacionan con altos niveles de expresión de **AID**, mientras que por el contrario una isoforma careciente del exón 8 (**PAX5/ΔEx8**) se asocia a ausencia de **AID** y **CSR** en las células de LLC (Oppezzo *et al.*, 2005).

Por otro lado, en función de la observación de las distintas isoformas de AID que fuese reportada en la LLC (Oppezzo *et al.*, 2003), estudios posteriores profundizaron en este aspecto, permitiendo hipotetizar que la posible disociación entre los procesos de SHM y CSR en la LLC podría deberse a la inhibición de la SHM debido a la presencia de variantes de splicing de AID en los pacientes IgV<sub>H</sub>-NM (Marantidou *et al.*, 2010; Rebhandl *et al.*, 2014)

Una de las preguntas que surgiera a partir de los distintos estudios mencionados que revelan la expresión de AID en la LLC es si su presencia puede asociarse con la detección de mutaciones *off-target*. En tal sentido, el ambicioso trabajo realizado en el año 2013 por Alexandrov y col. se propuso determinar **la firma o signature** de las mutaciones somáticas observadas en distintos tipos de cánceres, entre ellos la LLC. Detrás del concepto de *signature* se encuentra el propósito de asociar cierta mutación o grupo de mutaciones, con el proceso (endógeno o exógeno) que las produce. Para dicho objetivo, se analizaron más de 4 millones de mutaciones somáticas o pequeñas inserciones o deleciones (indels) en alrededor de 7000 muestras de 30 cánceres distintos obteniéndose un total de 21 *signatures* correctamente validadas.

Para el análisis, se tuvo en cuenta por un lado el tipo de sustitución introducida, por ejemplo: C → A, C → G, etc.; cómo también el contexto nucleotídico en el entorno inmediato a cada mutación, esto es, la base en la **posición 5' y 3'**. Dicha consideración resulta en un total de **96 mutaciones distintas**, permitiendo de esta forma diferenciar entre sustituciones iguales, pero que ocurren en distintos contextos de secuencia (Alexandrov *et al.*, 2013).

Siguiendo esta estrategia, en la LLC se pudieron determinar tres tipos de *signatures* mutacionales: **Signature 1B** asociada al envejecimiento que se caracteriza por la transición C → T, producida por la deaminación espontánea de la 5-Metilcitosina en un contexto **NCG**; **Signature 2** asociada por los autores a la actividad de las deaminasas de la familia **APOBEC** que consiste en C → T y C → G en un contexto **TCN** y por último la **Signature 9** vinculada a **AID**. Como se describiera previamente, uno de los posibles resultados tras la acción de AID es la introducción de mutaciones a nivel de los pares A:T por la **Polη**. En efecto, la *Signature 9* se caracteriza por la transversión A → C en un contexto **AAN** y **TAN**. Es de destacar, que de los 30 cánceres, únicamente la LLC presentó una firma atribuible inequívocamente a AID (Alexandrov *et al.*, 2013).

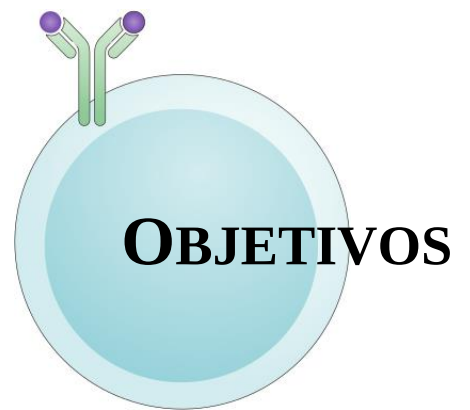
Un estudio posterior profundizó aún más en la determinación de la *signature* mutacional asociada a AID en la LLC. Para ello realizaron un análisis de WGS de pacientes con una **citogenética normal** o presentando la **del13q**, ambas asociadas a un buen pronóstico, en el entendido de obtener información de los procesos que expliquen por qué la LLC es más indolente en estos pacientes (Kasar *et al.*, 2015). En dicho trabajo y basándose en la estrategia descrita por Alexandrov y col., fueron capaces de reconocer dos tipos de *signature* asociadas a AID: **canónica** y **no canónica**. La *signature canónica* representa el cambio introducido directamente por AID a nivel del **hotspot WRCY** con las sustituciones C → G o C → T (ya descrito), mientras que la *signature no canónica* fue definida como A → C en el contexto **WA** siendo equivalente por lo tanto a la **Signature 9** de Alexandrov. En dicho trabajo, la intersección de datos de genómica y transcriptómica permitió determinar que a su vez ambas *signatures*, canónica y no canónica, se encuentran asociadas a genes con alta actividad transcripcional, reafirmando la correspondencia entre dichas mutaciones y AID. Asimismo, del análisis de la clonalidad de las mutaciones, se desprendió que interesantemente las mutaciones no canónicas de AID resultaron ser las más clonales indicando por lo tanto un surgimiento más temprano en la enfermedad, mientras que las canónicas parecen ser eventos subclonales y por lo tanto más tardíos (Kasar *et al.*, 2015).



---

Las contribuciones realizadas por Alexandrov et al. y Kasar et al., permitieron la elaboración de una estrategia que permite inferir la actividad AID en la LLC a partir del análisis de las mutaciones somáticas encontradas.

Sin embargo, si bien en el trabajo de Kasar y col. fueron determinadas mutaciones con *signature* de AID en genes asociados a procesos tumorales dado, que dicho estudio fuese realizado sobre muestras de pacientes indolentes, la relevancia del impacto de dichas mutaciones en la progresión de la LLC es discutible. Por lo tanto, un **estudio que profundice en el impacto de la actividad mutagénica de AID en pacientes con mal pronóstico y durante la progresión de la enfermedad sigue siendo necesario.**



## OBJETIVO GENERAL

Dada la gran importancia de AID en los procesos oncogénicos así como su posible vinculación con un peor pronóstico clínico, el objetivo de este trabajo es el de determinar la existencia o no de mutaciones *off-target* con una signature de la enzima AID durante la progresión de la Leucemia Linfocítica Crónica.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### 1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y SECUENCIADO DE EXOMA (WES)

Para la realización del objetivo general, se seleccionarán dos grupos de cinco pacientes de LLC con IgV<sub>H</sub>-NM, con expresión o no de la enzima AID a nivel de ARNm y presencia de población proliferante mayor o menor al 2% en SP. Asimismo para la determinación del impacto de la expresión de AID en el tiempo se tomarán muestras al debut de la enfermedad así como durante la evolución de la misma en ambos grupos. Finalmente el ADN de estos pacientes será purificado para llevar a cabo el secuenciado masivo de su exoma.

### 2. BÚSQUEDA DE SIGNATURE Y SELECCIÓN DE MUTACIONES

A partir de los datos obtenidos del WES, se realizará la detección de mutaciones somáticas así como la búsqueda de las distintas *signatures* mutacionales. Se seleccionarán aquellas atribuibles a la firma o *Signature* de AID. Luego, se compararán las mutaciones detectadas entre los grupos AID<sup>+</sup> y AID<sup>-</sup> en los distintos tiempos, para seleccionar las mutaciones fijadas durante la progresión en los pacientes AID<sup>+</sup> de mal pronóstico.

### 3. SECUENCIADO CONFIRMATORIO GEN ESPECÍFICO

Con los genes seleccionados se realizará un secuenciado masivo confirmatorio gen-específico en una cohorte mayor. Se prepararán y secuenciarán librerías formadas a partir de las regiones génicas conteniendo las mutaciones seleccionadas las cuales serán posteriormente elegidas para futuros estudios funcionales.



## MUESTRAS DE PACIENTES

Las PBMC (Células Mononucleares de Sangre Periférica) de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica son aisladas a partir de 20mL de sangre periférica heparinizada. Todas las muestras utilizadas durante este trabajo provienen de pacientes atendidos en los servicios de Hematología del Hospital Maciel y Hospital de Clínicas (ASSE, MSP) que proveyeron de su consentimiento informado de acuerdo a las regulaciones éticas de Uruguay y de la Declaración de Helsinki. A partir de la sangre se realiza una centrifugación en gradiente de densidad empleando para ello el reactivo *Ficoll-Histopaque* (Sigma, 107771). El gradiente establecido a partir de la centrifugación permite la obtención de una banda nítida conteniendo las PBMC. Las mismas son aisladas y contabilizadas siendo utilizadas para experimentos posteriores así como la determinación de rutina del perfil mutacional de la región codificante para el IgV<sub>H</sub> del BCR del clon tumoral.

Brevemente para la determinación perfil mutacional del IgV<sub>H</sub> del paciente de LLC se realiza una PCR a partir del cDNA de PBMC con *primers* dirigidos a secuencias consenso de la región *framework* 1 del V<sub>H</sub> y los genes J<sub>H</sub> tal de forma de obtener el rearrreglo utilizado por el BCR del clon tumoral, tal como se describe en Pritsch y col. 1999. Posteriormente los productos de PCR son purificados y de forma directa o mediante el clonado en un vector, su secuencia es determinada mediante secuenciación de Sanger. Las secuencias son posteriormente analizadas utilizando las bases de datos IgBLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)) o ImMunoGeneTics (IMGT, <http://www.imgt.org>), para la determinación de su porcentaje de identidad con respecto a la secuencia de DNA germinal. Si el porcentaje de identidad es menor al **98%** se considera como **IgV<sub>H</sub>-Mutado**, de lo contrario, el paciente es considerado como **IgV<sub>H</sub>-No Mutado**.

## EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA

Para la detección de los niveles de expresión de los genes AID y GAPDH así como para el perfil mutacional IgV<sub>H</sub> se realizó la extracción de RNA a partir de 5x10<sup>6</sup> PBMC utilizando el reactivo TRIzol (Ambion, 15596026) y siguiendo el procedimiento descrito por Chomczynski y col.(Chomczynski, 1993)

Posteriormente el RNA extraído es cuantificado por Absorbancia a 260nm y para la síntesis de cDNA son utilizados 500ng del mismo y empleando la retro-transcriptasa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus, Invitrogen, 28025) siguiendo el protocolo y utilizando los reactivos indicados por el fabricante (oligo dT, Buffer de la enzima y DTT).

## PCR DE AID Y GAPDH

La amplificación de AID fue realizada a partir de 2µL del cDNA obtenido, mediante una PCR utilizando la Taq. Polimerasa (Invitrogen, 18038) con los reactivos correspondientes (MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y oligos) en un termociclador (Applied Biosystem 2720). Los *primers* utilizados fueron, **Forward:** 5'-GAG GCAAGAAGA CAC TCT GG-3', **Reverse:** 5'-CTA CTT CTG TGA GGA CCG C-3' y las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62° y 1 minuto a 72°C; y un paso de extensión final a 72°C por 5 minutos(Palacios *et al.*, 2010).

Por otro lado, la PCR de GAPDH fue realizada con iguales cantidades de cDNA pero utilizando otro tipo de ciclado: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de: 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 62° y 1 minuto a 72°C; y un paso de extensión final a 72°C por 5 minutos. Los *primers*

utilizados fueron *Forward: 5'GGT GCT GAG TAT GTC GTG GA 3'* y *Reverse: 5'ATG CCA GTG AGC TTC CG TT 3'*

Para la evaluación de los productos se emplearon geles de agarosa al 1.5% (Ultra pura de Invitrogen, 16500) teñidos con el agente intercalante del DNA Bromuro de Etidio (Eurobio, GEPBET02) utilizando el peso molecular *100bp DNA Ladder* con un rango de 100-2000pb (Invitrogen, 15628) y posterior visualización en un transiluminador (Carestream, Gel Logic 112).

## PURIFICACIÓN DE CD19+ Y CD3+ POR MACS

Como método para el aislamiento de las células tumorales y no tumorales necesarias para la realización del secuenciado masivo se procedió a realizar la técnica de separación celular MACS (*Magnetic Activated Cell Sorter*) de Miltenyi Biotec, que se basa en la separación magnética de las células de interés mediante la utilización de *MicroBeads* capaces de detectar cierto tipo de molécula de manera específica. En este caso, para la purificación de células tumorales se procedió a la utilización de *Microbeads CD19+* (130-050-301) molécula de superficie presente en los Linfocitos B mientras que para la purificación de células no tumorales se utilizó las específicas para *CD3+* (130-050-101).

La técnica fue realizada tal como se detalla en su protocolo; brevemente se realiza la incubación de las células (en todos los casos partiendo de  $100 \times 10^6$  de PBMC) con las *MicroBeads*, pequeñas nano-partículas recubiertas por anticuerpos que detectan de forma específica su molécula blanco (en este caso, CD19 o CD3). Luego de la incubación, las células marcadas se encuentran asociadas a dichas partículas, permitiendo su separación magnética al pasar a través de una columna bajo la acción de un campo magnético fuerte. Esto es, las células positivas para CD19 o CD3 quedan retenidas en la columna, mientras que el resto de las células resultan eluidas, luego la columna es quitada del campo magnético y las células positivamente seleccionadas son eluidas.

Es oportuno indicar que si bien la purificación de células CD19+ no permite discriminar los linfocitos B tumorales de los normales, puesto que ambos expresan dicha molécula, dado que en todos los casos se tratan de pacientes progresivos con su  $IgV_H$  No Mutado, el porcentaje de linfocitos B normales en dichos pacientes es menor al 2% en sangre periférica, no afectando los resultados posteriores. Asimismo, la contribución de sus polimorfismos dentro del grupo tumoral en el WES realizado, resulta descartada dado la existencia de los controles de células CD3+ de cada paciente.

## EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

Una vez aisladas las células tumorales de los pacientes, con sus respectivos controles se procedió a la extracción de su DNA genómico. Para ello fue utilizado el kit de extracción Quick-DNA (Zymo Research, D4068) siguiendo los pasos indicados en el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, el sistema consiste en un primer paso de lisado de las células en presencia de un buffer de lisis conteniendo a su vez Proteinasa K para la degradación de las proteínas presentes. Posteriormente se incubó con un buffer de unión que es pasado por una columna que al ser centrifugada es capaz de retener el DNA libre de contaminación de RNA. Luego le siguen pasos de lavado y posterior elución del DNA purificado.

Posterior a su extracción el DNA fue cuantificado mediante el Nanodrop 1000 (Thermo) a partir de la absorbancia a 260nm y su integridad fue evaluada en un gel de agarosa al 0.8%. Utilizando el marcador de peso molecular *GeneRuler 1kb* con el rango de 250-10000pb (Thermo, #SM0311).

## SECUENCIADO MASIVO DE EXOMA

El WES (*Whole Exome Sequencing*) representa una estrategia eficiente para selectivamente secuenciar las regiones codificantes (exones) del genoma humano con el propósito de la detección de variantes raras en la población pero asociadas con determinada enfermedad. Dado que el exoma constituye el 2.5% aproximadamente del genoma, permite un abaratamiento de los costos así como también del tiempo requerido. La forma de hacer esto consiste en la captura de los fragmentos de DNA mediante el uso de sondas de oligonucleótidos y de esta forma lograr un enriquecimiento de todas las secuencias exónicas anotadas, tanto codificantes como no codificantes. Los DNA genómicos a secuenciar fueron agrupados en los pools según las características de los pacientes, como se describe en la sección **Resultados** y posteriormente fueron enviados a la compañía **LC Sciences** para la realización del WES.

Concretamente para la realización del secuenciado se procede a la fragmentación del DNA y posterior construcción de las librerías, es decir al agregado de adaptadores (secuencias cortas que permiten la hibridación de los fragmentos a la celda de flujo donde se realiza la secuenciación). Luego la captura de los exones es realizada utilizando el kit **SureSelect V5+UTR** (*Agilent Technologies*) y siguiendo los pasos indicados por el fabricante se realiza el secuenciado en la plataforma de secuenciación **Miseq** (Illumina) permitiendo la secuenciación de las regiones exónicas codificantes más las regiones UTR reguladoras entorno a las mismas.

El secuenciado obtenido tuvo una cobertura promedio de las zonas *target* de 100X en todos los grupos, es decir cada nucleótido de las secuencias obtenidas fue leído un promedio de 100 veces. Asimismo, el largo promedio de cada lectura o *reads* de extremos pareados fue de 101pb. El análisis de calidad de los datos obtenidos así como su posterior mapeo contra el genoma de referencia fue realizado por la misma compañía. El análisis de las secuencias para la identificación de la calidad de los *reads* obtenidas y filtrado de las secuencias de mala calidad (con un valor del parámetro de calidad Q menor a 20) es realizado con el software FASTQC. Luego se realiza el mapeo de las secuencias contra el genoma de referencia, en este caso el genoma humano de referencia utilizado fue el GRCh38, el genoma más ensamblado de forma más completa hasta el momento (Jain *et al.*, 2018). Dicho alineamiento es realizado con el software BWA (*Burrows-Wheeler-Aligner*) teniendo como resultado la generación de archivos con el formato SAM (*Sequence Alignment Map*) (Li and Durbin, 2009) que contienen la información del mapeo de las secuencias que constituyen el punto de partida para la búsqueda de las mutaciones somáticas.

## BÚSQUEDA DE VARIANTES Y SIGNATURES MUTACIONALES

La búsqueda de variantes fue realizada siguiendo los lineamientos definidos por el GATK (*Genome Analysis Toolkit*), un conjunto de herramientas bioinformáticas diseñadas por el *Broad Institute* (Cambridge, Massachusetts) para la detección sistemática de variantes somáticas a partir de datos obtenidos de secuenciado masivo (McKenna *et al.*, 2010). Partiendo entonces de los archivos de mapeo, se utilizó el software *VarScan*, desarrollado para la búsqueda de mutaciones somáticas a partir de secuenciado masivo, con el cual se realiza un análisis pareado de las secuencias tumorales con su correspondiente muestra normal de forma de determinar con un alto nivel de certeza las variantes únicamente tumorales (Koboldt *et al.*, 2012).

El descubrimiento de las *signatures* mutacionales así como su contribución dentro de cada muestra fue realizado con el paquete de *SomaticSignatures* del software libre R como parte del proyecto *Bioconductor* (Gehring *et al.*, 2015). Para dicha búsqueda se procede al diseño de un algoritmo que de una matriz de factorización no negativa basada en estadística de inferencia Bayesiana la cual permite la actualización de la probabilidad de la hipótesis en función de la evidencia o información disponible. Esto supone que se realiza una búsqueda de las *signatures* previamente determinadas sobre el espectro mutacional de las muestras, determinando de una forma no supervisada si la mutación analizada corresponde o no a una *signature* mutacional del cáncer. Teniendo en cuenta que la determinación de las *signatures* requiere de la determinación del tipo de mutación así como la información del contexto nucleotídico de la misma siendo estratificadas en 96 sustituciones posibles. De acuerdo a cómo fuese descrito por Kasar y col. la *signature* de AID canónica (**c-AID**) se compone por la sustitución de C→T dentro del motivo WRCY (W=A/T, R=purinas (A/G), Y= pirimidinas (C/T)) en la hebra líder, mientras que en la complementaria fue definida como G→A en el contexto YGRW. Por otro lado, la *signature* no canónica (**nc-AID**) fue definida como A→C en el motivo WA para la hebra líder y T→G en el motivo TW en la hebra complementaria (Kasar *et al.*, 2015).

Una vez definidas las mutaciones de interés las mismas fueron corroboradas manualmente mediante el software de visualización para datos de secuenciado masivo IGV (*Integrative Genomic Viewer*) que permite observar la información contenida en los archivos de mapeo comparándola contra el genoma de referencia humano GRCh38 (Robinson *et al.*, 2011).

## SECUENCIADO CONFIRMATORIO

Para la validación de las mutaciones seleccionadas se realizó una biblioteca de amplicones obtenidos mediante la amplificación por PCR de las regiones genómicas de una extensión de ~500pb conteniendo las distintas mutaciones.

Para ello previamente se realizó la purificación de células tumorales (IgM+CD5+) y normales (IgM<sup>-</sup>) mediante la técnica de **FACS** (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) que sigue el mismo principio que el MACS, sólo que en lugar de realizarse manualmente es utilizado un citómetro de flujo capaz de separar las células en función de que presenten o no marcación específica por los anticuerpos utilizados que se encuentran conjugados a un fluoróforo.

Partiendo de  $100 \times 10^6$  PBMC por cada paciente se realizó una marcación sobre células vivas utilizando una dilución 1/50 en PBS conteniendo 0.5% de Seroalbúmina Bovina (Sigma, A7906) del anticuerpo anti-IgM humano conjugado a Ficoeritrina (PE) (Jackson Immuno Research, 709-546-098) y 1/10 del anticuerpo anti-CD5 humano conjugado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante 30 minutos a 4°C. Luego fueron realizados los lavados con PBS-BSA 0.5% y posteriormente las células fueron procesadas en el clasificador celular BD FACSAria™ Fusion del Servicio de Biología Celular del Institut Pasteur de Montevideo. Por otro lado, en el caso de la evaluación de la población proliferante IgM/IgG de los pacientes, se realizó marcación con el anticuerpo anti-IgG humano conjugado a FITC (Jackson Immuno Research, 709-546-096) en las mismas condiciones que el anti-IgM. Siendo posteriormente adquirido en el citómetro de flujo CyAN ADP (Beckham Coulter, CA). Los datos fueron analizados en el software *Summit* provisto por la misma compañía.

Una vez purificadas las células tumorales y normales de los 15 pacientes seleccionados para la validación se realizó la extracción de su DNA genómico como fuese descrito, evaluándose nuevamente su integridad mediante un gel de agarosa al 0.8%.



Las oligos diseñados para cada uno de los genes seleccionados fueron diseñados de forma tal de tener un único tipo de ciclado el cual fue realizado con la Taq. Polimerasa Phusion de alta fidelidad elaborada de forma recombinante en el laboratorio, la cual presenta una tasa de error 50 veces menor que las Polimerasas convencionales dado que presenta una actividad exonucleasa correctora de errores 3' → 5'. El ciclado utilizado fue el siguiente: Desnaturalización inicial 98°C a 30 segundos seguido de 25 ciclos de: 98° durante 10 segundos, 64° durante 30 segundos y 72° durante 30 segundos; por ultimo una extensión final a 72° durante 5 minutos. Los oligos utilizados se resumen en la **Tabla 1**, los mismos contienen la secuencia específica para el gen de interés más el agregado de una secuencia adaptadora en el extremo 5' de cada primer (en los *primers* Forward el adaptador es: 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG 3' y en los *primers* Reverse: 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG 3'), necesaria para el posterior indexado de los amplicones en una segunda PCR.

**Tabla 1. Secuencia de los oligos utilizados para secuenciado confirmatorio.** Los oligos fueron diseñados mediante el software libre *FastPCR* (Kalendar *et al.*, 2017) y posteriormente verificados mediante la utilización de la herramienta online del NCBI PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para corroborar que no amplifican secuencias inespecíficas dentro del genoma humano. Las secuencias corresponden al *primer* sin el adaptador mencionado.

Gen	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
<b>NOTCH1</b>	GGTTCGAAGAAGATGCTCCAGCAA	TGAGCCAAGTCTGACGTCCCTCA
<b>SF3B1</b>	ATCCTCGTGGTCATTGAACCGCT	GTGTCTCGCTTGCCAGGACTTCT
<b>ATM</b>	CAGTGGAGGTTAACATTCATCAAGA	TGAGCTTTTCCACACTGCCA
<b>POT1</b>	CCTGTACTGTAAACCACTCAAGGATTCT GGA	CAGTGTGAACATATGGCACCTTTGGAC
<b>PAX5</b>	CTGAGGCTTTGCTGGTCCTCAGAT	AGGATTGCAAAGCACCGTACAATGTC
<b>IL4R</b>	GCATTGTGGCCCCGGCTAACAGA	GCATCTCGGGTTCTACTTCTCCAG
<b>IL4R (3'UTR)</b>	CACATACATGAGGGTCTCTTAGGTGCA	GCAAAACATGCCTTGGGCAGTTACA
<b>IL21</b>	TGTACGATCGGGCCTAAGC	GTTACCCGTTCAAGCACTG
<b>BCL2</b>	GTTGGGCAACAGAGAACCATCCCT	CCCCTGCCAAATCTTCGGAGAC
<b>CD38</b>	AGACGGAAGCCTTTTTCCCA	CAACCTCACAGCACTGTTGGA
<b>IL4</b>	TGCTGATTGGCCCCAAGTGACT	GAGATGGTGCCAGATAGGTACTIONACCT
<b>ROR1</b>	CAGGTGTGGACTACCGGGGA	AACTGTGCTCTGAAGGGCTGG
<b>IKZF1 (M1)</b>	CACTGTGAGTTTTGTAGTGTC	GAAGACCTAAAGCTGTACTGGA
<b>IKZF1 (M2)</b>	GCAGTATCAAGGCTGACTTGT	GGAAAGGGCAAAGCAGTTTGA
<b>FAT1</b>	GATTCCCAGACAGTTAAGCAATGGGGA	CTCAAGTCATTTGTATCCAGCACCTGC
<b>CDH12</b>	TGGTTTATCTGCCAACAAGAG	AAGGTGGAGATCAGAAAGTGT
<b>ST6GAL1</b>	ACTGTAGTTTGCAGACATGCTC	GTCCCTACTAAAGGCAGGAAGG
<b>TMEM176A</b>	TGAGTGGAATCTAGCCATGCCTC	TACTCAGGAGGGGACATGAAGC
<b>IL17A</b>	TCAAGACTGAACACCGACTAAGGT	GGCGAAAATGGTTACGATGTG
<b>IL17RA(M1)</b>	GTCTACTGATGAGGCCAGATCCA	GAGGATGCTCTTACCAGGCAC
<b>IL17RA(M2)</b>	GGATTATAGGCTGAGCCCACC	GGATCCTCTGTCCGACACAGTT
<b>IL17RC</b>	CTTGGGTCTTCTAGGGCACT	TGTAATGCCTGGTACTGAAGGGTT
<b>IL17RE</b>	CCCACCTGGGAAGAATTCCCT	AGGTCTGACTTCCCAGGTTACC
<b>TLR10</b>	CCTTGCCCTACTCCCCAAGATTGA	CAGTCGTTGAAGGCTTGGGACCAA
<b>FUT2 (NS)</b>	CAGGATCCCCTGGCAGAACTACC	AATCTTTGGCAGGTGAGCCCTCAA
<b>FUT2 (3'UTR)</b>	GGAGTCTTGCTGCATCCCCCA	GGACTTGGATGCATGCCAGCT

<b>CASP7</b>	CAGATGTTTGCTCTCTGAGCACACC	GACTGAAGTAGAGTTCCTTGGTGAGCA
<b>TMEM177</b>	CTACGCCTTCTCCCAGGATTCT	TGGTGTCTGCACAAGCTGGAA

Luego de realizar las PCR, los resultados fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5%. Los productos fueron purificados para la realización de la segunda PCR de indexado. La purificación se llevo a cabo mediante la purificación de los productos de PCR siguiendo el protocolo del kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen, 28106) permitiendo así la eliminación de la mayor cantidad de dímeros de *primers*.

Posteriormente se realizaron pooles con los productos de PCR purificados, formándose dos pooles por cada paciente conteniendo las amplificaciones de los genómicos tumorales versus los normales. Luego se procedió al indexado de la librería utilizando los índices provistos por el kit para secuenciación *NEXTERA XT DNA Library Preparation* (Illumina, FC-131-1024). Básicamente consiste en una segunda PCR en dónde los *primers* corresponden a los índices que presentan una secuencia complementaria a la de los adaptadores utilizados en la primer PCR, permitiendo así, mediante combinación de los distintos índices disponibles en el kit la indexación de forma inequívoca de los amplicones tumorales y normales de cada paciente. Posterior a dicho paso se realiza un paso de purificación utilizando las perlas magnéticas *AMPure XP* disponibles en el kit mencionado que permiten la eliminación de dímeros de *primers* y fragmentos pequeños de DNA. Posteriormente la librería purificada fue cuantificada mediante fluorescencia mediante el fluorómetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) y siguiendo los pasos indicados por el fabricante se procedió a la secuenciación en la plataforma Miseq (Illumina) de la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo.

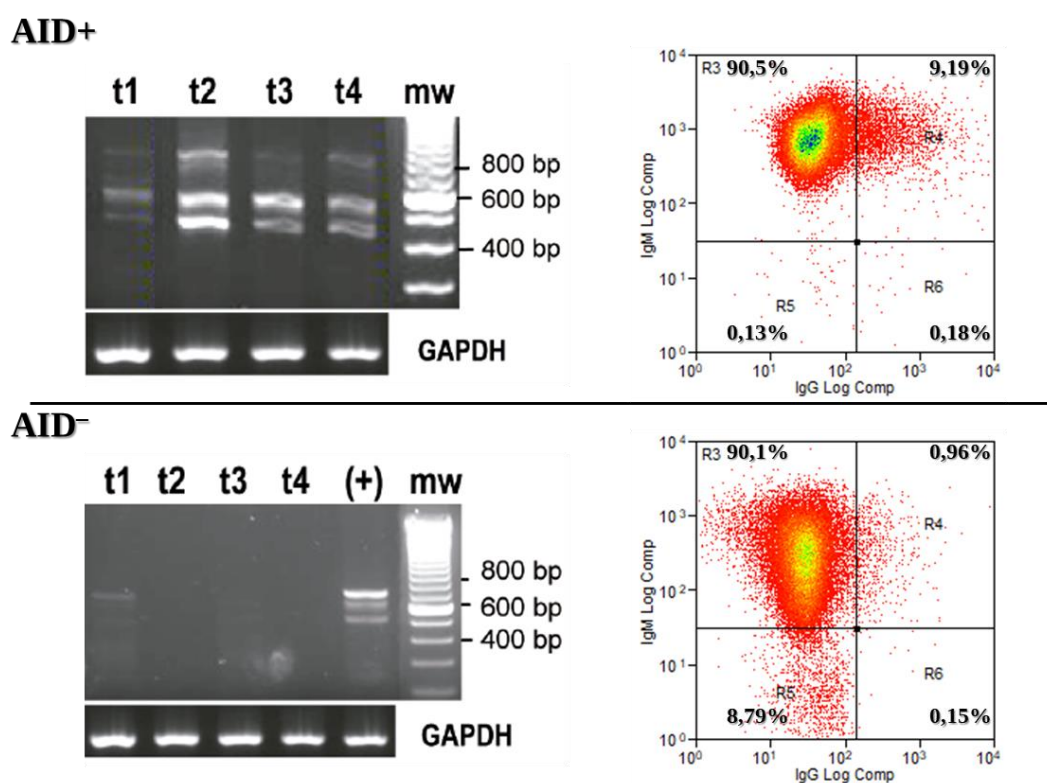
La información obtenida fue analizada inicialmente mediante el software *FASTQC*, al igual que como fuese descrito para el WES, luego utilizando la plataforma web para análisis bioinformáticos de uso libre Galaxy Project se realizó el filtrado y alineamiento de los datos. Para el filtrado o *trimming* se utilizó la herramienta de *Stickle* de forma de eliminar los *reads* de mala calidad y únicamente continuar el análisis con los *reads* que posean un valor de  $Q > 30$ . Posteriormente mediante la utilización la herramienta Bowtie2 se realizó el alineamiento de las secuencias contra el genoma de referencia humano GRCh38(Afgan *et al.*, 2016). Posteriormente para la visualización de las mutaciones fue utilizado nuevamente el software *Integrative Genome Viewer*. Asimismo, para la posterior elaboración de las gráficas y análisis estadísticos se utilizó el programa *GraphPad Prism 6.0* (GraphPad Software, San Diego, CA).



# 1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y WES

## 1.1 SELECCIÓN DE PACIENTES

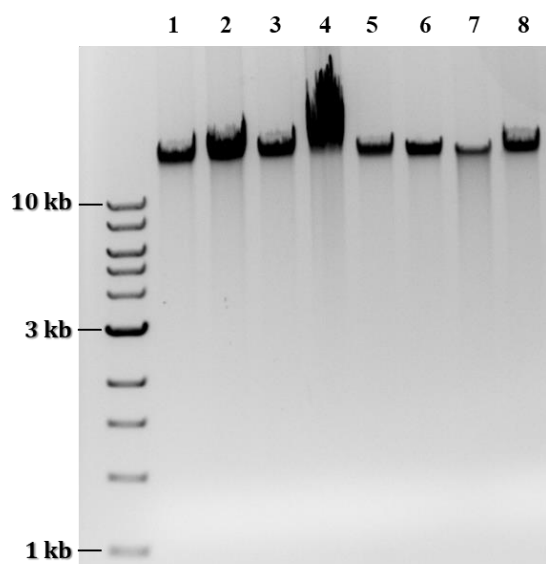
Dado que objetivo principal es la determinación de alteraciones genéticas que sean debidas a AID que contribuyan con la progresión de la LLC, la selección de los pacientes no es una cuestión menor. Teniendo en cuenta la gran heterogeneidad clínico-molecular observada dentro de la LLC, para la realización del WES fueron definidos dos grupos de pacientes, ambos con  $IgV_H$ -No Mutado pero cuya principal diferencia es la expresión de AID en el tiempo, así como la presencia de población proliferante IgM/IgG en sangre periférica (**Fig. 4**).



**Figura 4. Selección de pacientes progresivos en función de la expresión de AID en el tiempo.** Los pacientes fueron divididos en dos grupos: **AID+**, con expresión de AID en el tiempo detectada por PCR y con un porcentaje de células proliferantes IgM/IgG en sangre periférica mayor al 2% (panel superior). Por el contrario, en el grupo **AID-** se encuentran pacientes sin expresión de AID ni presencia de población proliferante en SP (panel inferior). Se ilustran un paciente representativo de los dos grupos formados. Las distintas bandas observadas para AID corresponden a isoformas previamente reportadas (Oppezzo et al, 2003). Se utilizó como control de carga en la PCR la expresión del gen constitutivo GAPDH.

En función de lo mencionado fueron seleccionados 5 pacientes **AID+** y 5 pacientes **AID-** siendo agrupados como: **AID+** al tiempo del debut (**AID+ td**), **AID+** durante la progresión (**AID+ dp**), **AID-** al debut (**AID- td**) y **AID-** durante su evolución (**AID- 4de**). Las muestras durante la evolución fueron tomadas luego del tratamiento. Para la realización del WES fueron aisladas las células leucémicas  $CD19+$ , así como células  $CD3+$  como control de las variantes polimórficas propias de cada paciente.

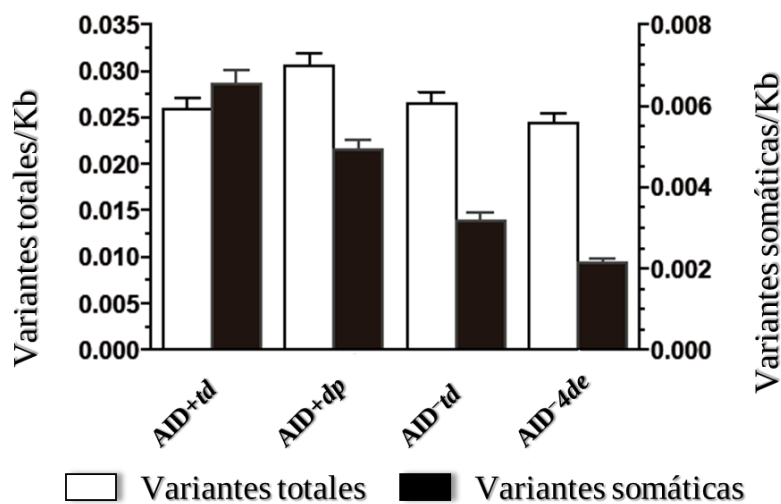
Posteriormente fue purificado su ADN genómico y su integridad fue evaluada en un gel de agarosa antes ante de la realización del WES (**Fig. 5**)



**Figura 5. Integridad de los pools de DNA genómico para WES.** El gel corresponde a los pools antes de secuenciar. Orden de siembra: del 1 al 4 genómico de CD19+ de los grupos: AID+ td, AID+ dp, AID- td, AID- 4de; del 5 al 8 los respectivos controles de cada grupo, de células CD3+.

## 1.2 DETECCIÓN DE VARIANTES SOMÁTICAS

Luego de realizar el secuenciado masivo de exoma, se procedió a la detección de las mutaciones somáticas (descrita en Materiales y Métodos) de cada una de las muestras tumorales con su correspondiente par de muestra normal. El promedio de la frecuencia de variantes somáticas entre todos los grupos fue de **4.0±1.9 por Mb** (con un rango entre 2 y 6.5), lo cual se ajusta a estudios previos de WES en LLC (Landau *et al.*, 2013; Kasar and Brown, 2016).

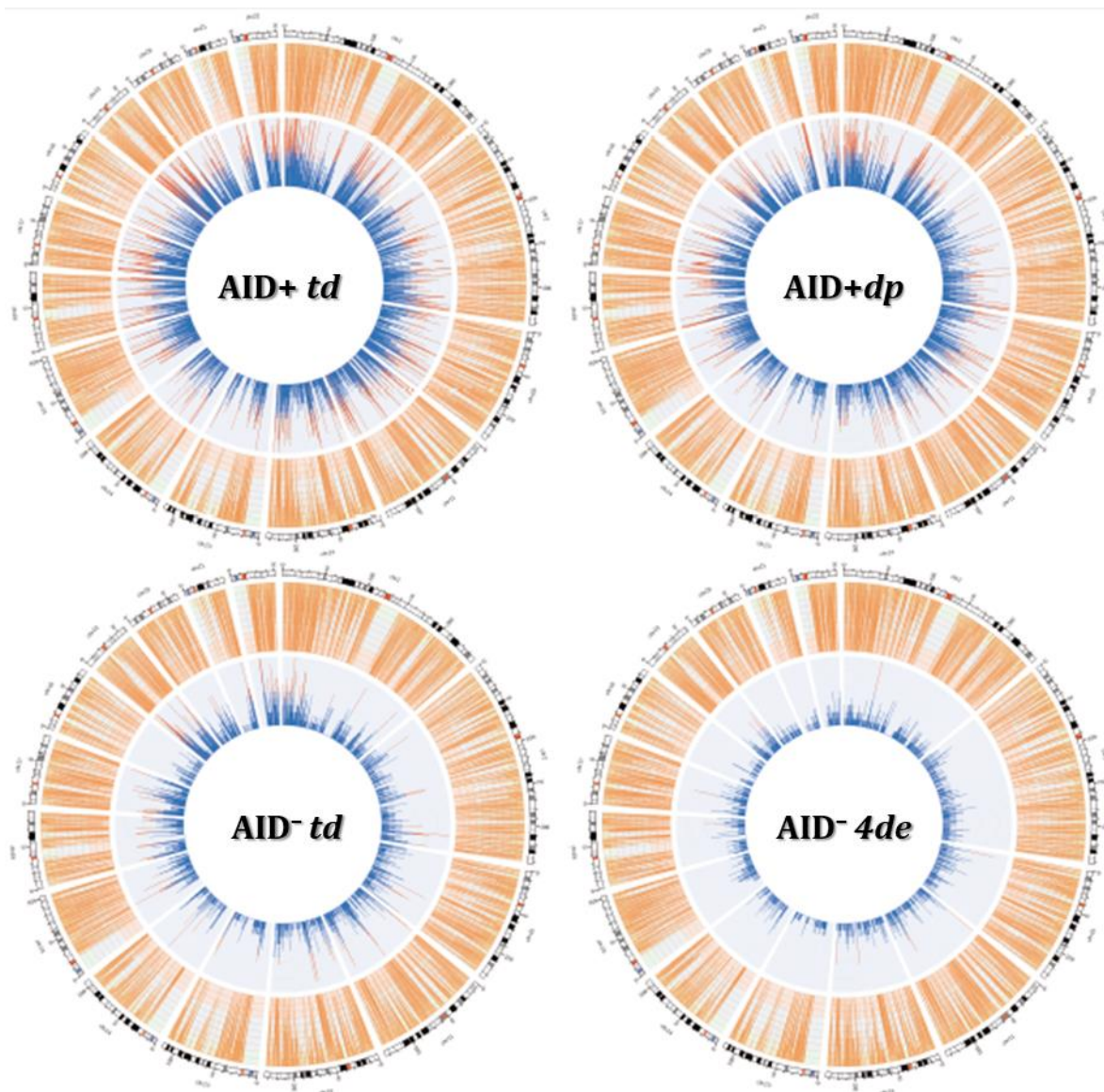


**Figura 6. La carga mutacional es mayor en muestras AID+ y desciende con el tiempo.** Las frecuencias de las variantes totales, que incluyen variaciones polimórficas no varían significativamente con el tiempo (blanco). Mientras que sí se observa una disminución en las variantes somáticas con el tiempo para ambos grupos (negro).

En consonancia con la hipótesis de partida, al analizar los distintos grupos de estudio se observa una mayor carga de mutaciones somáticas en las muestras AID+ con respecto a las AID-, independientemente del tiempo. Sin embargo resultó sorprendente encontrar un descenso en la cantidad de mutaciones en las muestras de los pacientes AID+ al tiempo de la progresión al compararlos con el mismo grupo al debut. (Fig. 6).

El resultado obtenido puede ser explicado como una consecuencia de la **evolución clonal**, donde a partir del universo de mutaciones generadas al inicio de la enfermedad, las mutaciones que favorecen el *fitness* de la célula leucémica sean fijadas durante la evolución mientras que aquellas mutaciones que poseen efecto neutro o deletéreo sean perdidas. Bajo esta hipótesis es esperable determinar un menor número de mutaciones durante la evolución de la enfermedad, pero que posiblemente tengan un impacto directo para la progresión de la LLC.

Además de evaluar la frecuencia de las variantes se evaluó la densidad de las mutaciones (**Fig. 7**). Los gráficos obtenidos representan la distribución de las variantes a largo de los distintos cromosomas.



**Figura 7. Densidad mutacional entre los distintos grupos AID<sup>+</sup> y AID<sup>-</sup>.** Los gráficos obtenidos mediante el software de visualización *Circos* permiten integrar las mutaciones con su posición dentro de los distintos cromosomas. El círculo externo (naranja) representa la densidad de variantes totales (somáticas y polimórficas), mientras que el círculo interno representa la densidad de variantes somáticas, en azul se representa la densidad esperada según la bibliografía y en rojo los sitios dónde la densidad de las muestras analizadas es mayor a lo esperado.

Si se conectan ambos resultados, puede observarse claramente que una mayor frecuencia de variantes somáticas (en AID<sup>+</sup>) se corresponde con una mayor cantidad de sitios exómicos con alta densidad de mutaciones. Es decir, una mayor carga mutacional en las muestras AID<sup>+</sup> se condice con un genoma homogéneamente más alterado, conduciendo a un proceso tumoral más agresivo. Interesantemente, este gráfico también pone en evidencia la mayor cantidad de mutaciones en los pacientes AID<sup>+</sup> al debut que en la progresión reforzando la hipótesis de la fijación de mutaciones que permitan la supervivencia del clon tumoral, antes mencionada.

## 2. BÚSQUEDA DE SIGNATURE Y SELECCIÓN DE MUTACIONES

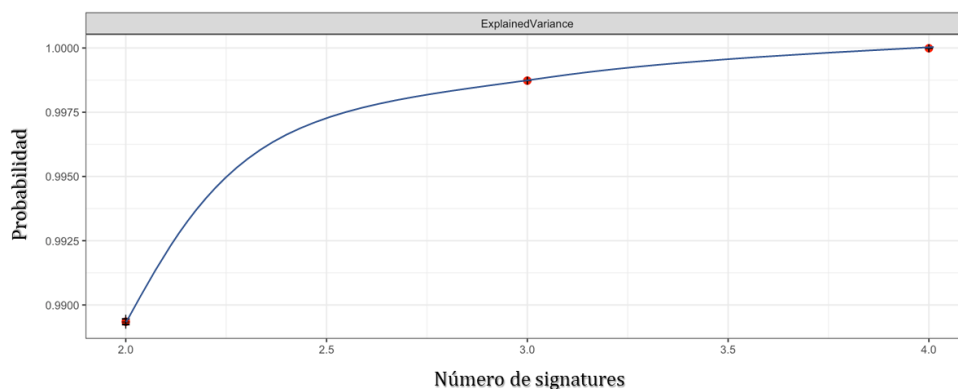
### 2.1 OCURRENCIA DE VARIANTES SOMÁTICAS

Para el análisis de las variantes somáticas encontradas en los distintos grupos, se siguió el algoritmo de búsqueda no supervisado definido previamente por Kasar y colaboradores, mediante el cual para la inferencia de patrones mutacionales se construye una Matriz de Factorización No Negativa (NMF) asignando probabilidades de acuerdo a la teoría Bayesiana (descripción en Materiales y Métodos). El algoritmo utilizado tiene en cuenta no solo el tipo de variante de nucleótido sino también el contexto de tri-nucleótido, esto es: las bases inmediatamente adyacentes a la mutación, tal como se describiera previamente. Por lo tanto, considerando dicha información la búsqueda resulta en una matriz de 96 sustituciones posibles. La ocurrencia de las distintas mutaciones a lo largo del exoma, conocido también como **espectro de variantes somáticas**, de los 4 grupos definidos se representa en la **Figura 8**. Del mismo se desprende que la ocurrencia de las distintas mutaciones se mantiene homogénea entre los distintos grupos.



**Figura 8.** La ocurrencia de mutaciones (espectro de variantes somáticas) es homogénea entre los distintos grupos. Se observan histogramas de frecuencia par las distintas mutaciones detectadas en el contexto de tri-nucleótido. Cada uno de las 6 columnas indica el tipo de mutación (C → A, C → G, etc.), a su vez, dentro de éstas se distinguen los 16 contextos nucleotídicos posibles para cada tipo de mutación (base 5'– base 3'). Las filas representan los cuatro grupos secuenciados, de arriba hacia abajo AID<sup>-</sup>td, AID<sup>-</sup>4de, AID<sup>+</sup>td, AID<sup>+</sup>dp.

El análisis del espectro somático de todos los grupos determinó que el número óptimo de *signatures* mutacionales que explican la totalidad de las variantes somáticas es de cuatro. Entendiéndose por *signature*, como fuese mencionado, al vínculo entre el tipo de mutación y el proceso molecular asociado a su origen (**Fig. 9**).



**Figura 9.** La descomposición del espectro somático indica que las variantes pueden agruparse en 4 *signatures*. Dicha determinación fue realizada mediante una matriz de factorización no negativa (NMF) (ver materiales y métodos).

## 2.2 DETERMINACIÓN DE SIGNATURES MUTACIONALES

Aplicando entonces el algoritmo de búsqueda descrito, se determinó la presencia de **4 Signatures** (**S1, S2, S3 y S4**) dominantes dentro del *landscape* mutacional de las muestras de LLC, las cuales se encuentran resumidas en la **Tabla 2**. En lo que refiere a la *signatures 1 y 2* se encuentran asociadas ambas al envejecimiento y son análogas a las **1A y 1B** descritas por Alexandrov y col., encontradas en la mayor parte de los cánceres entre ellas la LLC (Alexandrov *et al.*, 2013). En lo que refiere a **S3**, la misma fue reconocida en muestras de cáncer por Alexandrov y col. como *Signature R1*. Sin embargo, en dicho estudio los autores indican que no fue posible asociarla a un proceso molecular en particular dado la poca cantidad de mutaciones encontradas con dicha *signature* dentro de las muestras analizadas. Por último, la *Signature 4* incluye las ya descritas por Kasar y col., como **canónica** (directamente atribuibles a la deaminación de AID sobre la Citosina) como la **no canónica**, a nivel de los pares A:T debido a las mutaciones introducidas por polimerasas propensas a error como Pol $\eta$  durante la reparación de las mutaciones.

**Tabla 2. Resumen de las cuatro Signatures determinadas dentro de la muestras de LLC.**

Las dos primeras se agrupan dentro procesos ligados al envejecimiento; la tercera, si bien ha sido detectada en cáncer, no ha sido asociada a ningún proceso molecular en particular y la cuarta corresponde a la actividad de AID. Notar que para S4 sólo se representan los cambios en la **hebra líder**, existiendo las mutaciones **complementarias** en la otra hebra.

**Siglas:** **c-AID:** *Signature* canónica de AID, **nc-AID:** *Signature* no canónica de AID, **R:** A/G, **Y:** C/T.

	<b>Signature 1 y 2</b>	<b>Signature 3</b>	<b>Signature 4</b>	
<b>Mutación</b>	C → T y C → G	T → G	C → T C → G	A → C
<b>Contexto nucleotídico</b>	N <u>C</u> G	G <u>T</u> G	R <u>C</u> Y	W <u>A</u> N
<b>Descripción/ proceso asociado</b>	Envejecimiento	Aún no validada	c-AID	nc-AID

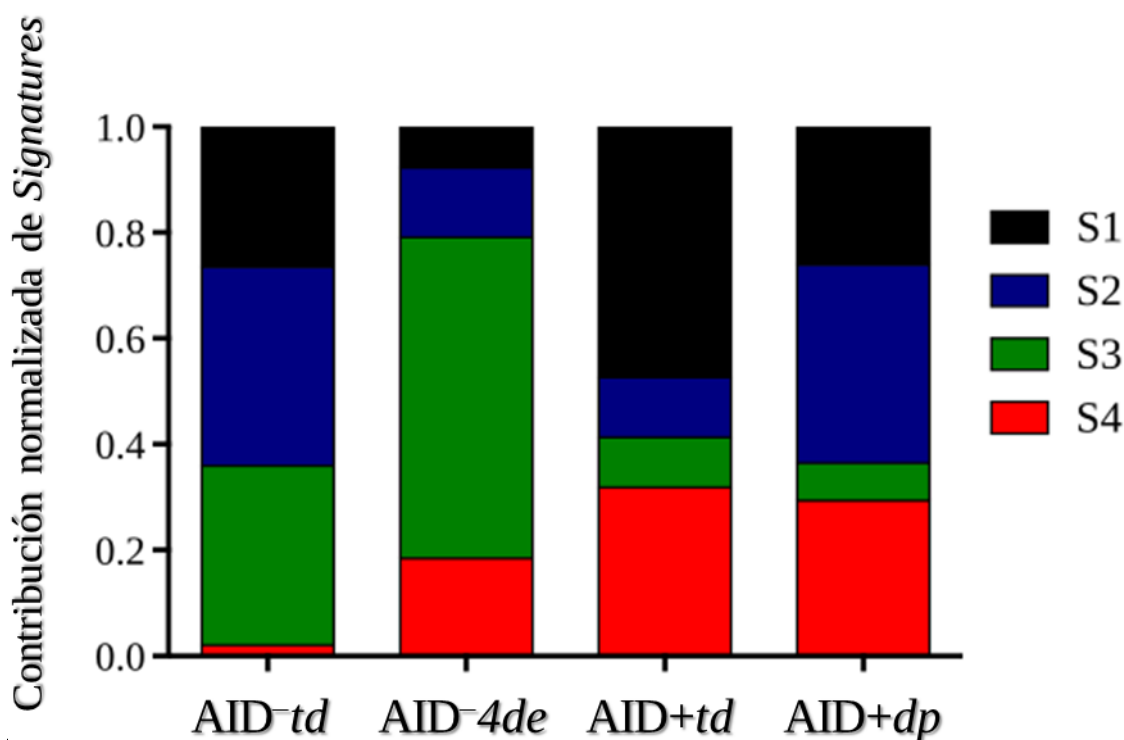


Una vez determinadas las cuatro *signatures* dominantes dentro de las muestras de LLC se analizó la contribución de cada una dentro de los distintos grupos analizados (**Fig. 10**).

El resultado obtenido es coherente en líneas generales teniendo en cuenta las características de cada grupo, a excepción del grupo AID<sup>-</sup> en la evolución (AID<sup>-</sup>4yr). Es decir, mientras se observa un aumento de las *Signatures* asociadas al envejecimiento en las AID<sup>+</sup>dp con respecto a AID<sup>+</sup>td, ocurre lo opuesto entre las muestras AID<sup>-</sup> con una menor contribución de S1 y S2 en la evolución.

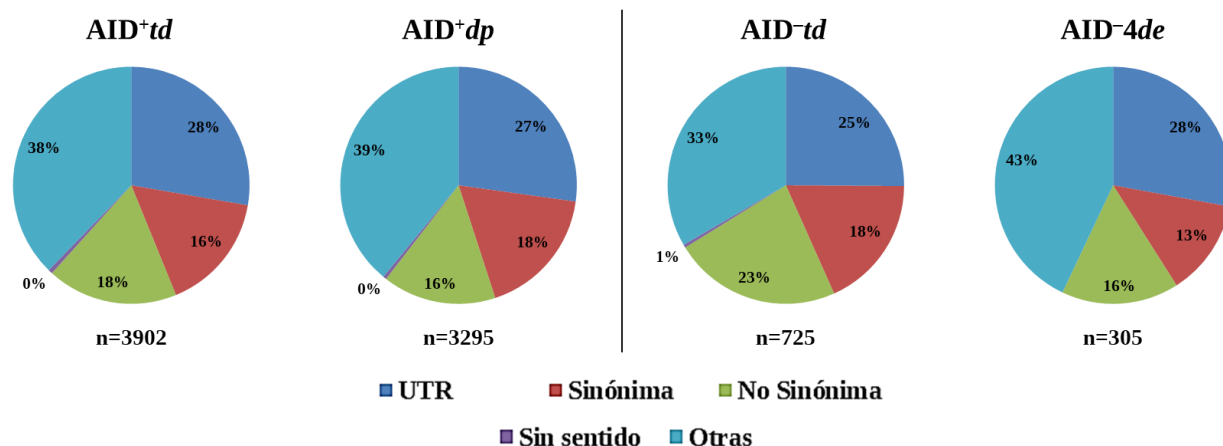
Por otro lado, resulta concordante que las muestras AID<sup>+</sup> presenten una mayor contribución de S4, asociada a la actividad de ésta; sin embargo, resulta interesante que también haya sido encontrada, aunque en menor medida, también dentro del grupo de los AID<sup>-</sup>, lo que sin duda deja en evidencia que en algún momento del transcurso de la enfermedad AID pudo encontrarse activa ejerciendo su actividad mutagénica.

En lo que refiere a S3, su contribución es minoritaria en los grupos AID<sup>+</sup>, mientras que resulta más preponderante en los AID<sup>-</sup> alcanzando casi un 60% de contribución en el grupo AID<sup>-</sup>4yr. Si bien no es posible inferir la clonalidad a partir de los resultados, dado que son pooles y no muestras individuales, es posible suponer que el proceso asociado a la generación de S3 parece dominar el *landscape* mutacional de las muestras AID<sup>-</sup> luego del tratamiento, resultando muy interesante la realización de estudios posteriores que profundicen en el tema.



**Figura 10.** La contribución de las *Signatures* dentro de los grupos se asocia en gran parte a las características de los cuatro grupos. Luego de determinadas las 4 *Signatures* dominantes dentro de las muestras de LLC, se determinó la ocurrencia de cada una dentro de los grupos. Siendo S1 y S2, *Signatures* asociadas al envejecimiento, S3, *Signature* de validación pendiente y S4 la asociada a la mutagénesis canónica y no canónica de AID.

Haciendo foco ahora en el tipo de variantes **asociadas a AID** (*Signature 4*), es posible determinar mutaciones de distinta índole, encontrándose entre las más relevantes las ubicadas en regiones regulatorias como en **5'UTR o 3'UTR** (regiones no traducidas del mRNA implicadas en regulación de la transcripción génica), como también aquellas que afectan directamente la secuencia codificante de la proteína: mutaciones no sinónimas (cambio de aminoácido) y mutaciones sin sentido (truncamiento de la proteína producto de la inserción de un codón stop). El resumen de los tipos de mutaciones asociadas a **AID** en los cuatro grupos se encuentra resumido en la **Figura 11**.



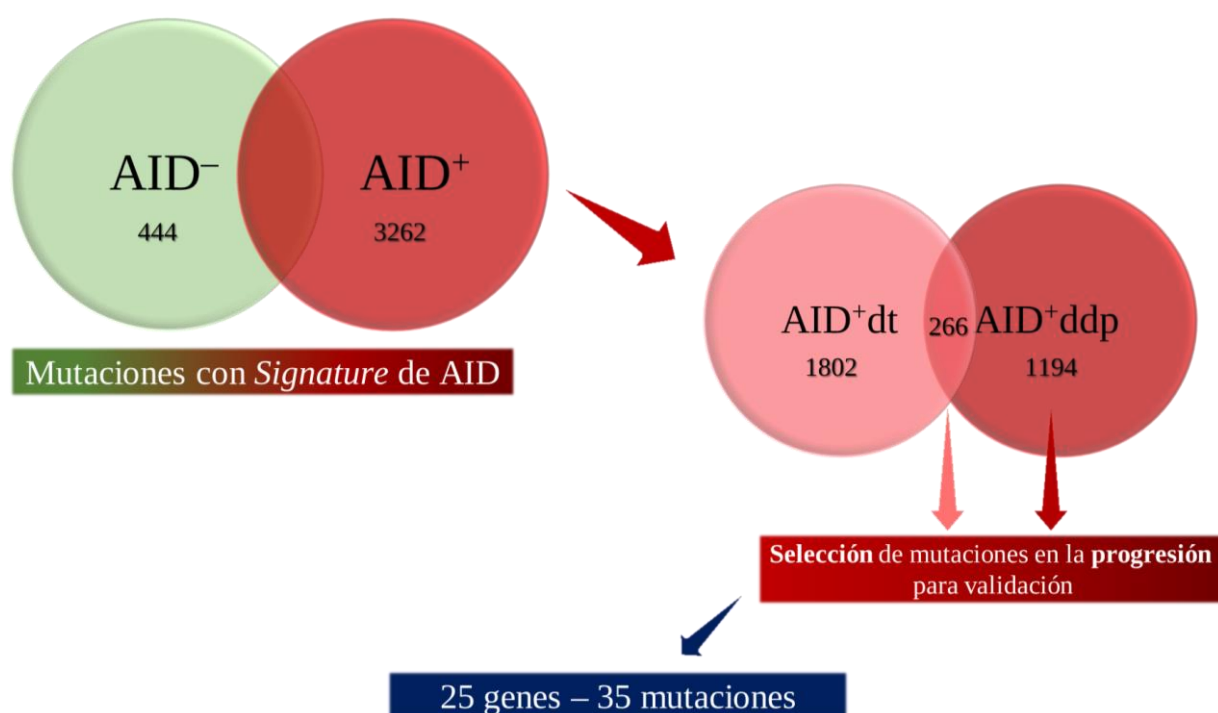
**Figura 11. La distribución de los tipos de mutaciones asociados a AID es homogénea entre los cuatro grupos.** Los tipos principales de mutaciones encontrados fueron: a nivel de 3' o 5' UTR (azul), sinónimas (rojo), no sinónimas (verde), sin sentido o *stopgain* (violeta). Dentro de "Otras" (celeste), se encuentran variantes en regiones intrónicas, intergénicas y variantes que afectan sitios de RNAs no codificantes y de splicing. Debajo de cada grupo se indica el total de mutaciones comprendidas.

Como se desprende de la **Figura 11**, la distribución de los tipos de mutaciones es homogénea entre los cuatro grupos, con una mayor representación de las mutaciones en regiones **UTR** sobre las variantes no sinónimas y con una pequeña contribución de mutaciones sin sentido. Resulta interesante observar que en todos los casos, cerca del 40% de las mutaciones ocurren en regiones involucradas al splicing y RNAs no codificantes (nc-RNAs). Este resultado resulta coherente con reportes previos que indican AID es la única enzima de las familias de las APOBEC que tiene preferencia por mutar genes de RNAs pequeños no codificantes (Taylor, Wu and Rada, 2014). Dichas mutaciones también pueden tener implicancias directas en la progresión de la LLC, resultando incitante el desarrollo de futuras investigaciones que profundicen en su impacto. Recordar que la LLC fue la primera enfermedad en ser asociada con alteraciones de microRNAs (Calin *et al.*, 2002), siendo incluso posteriormente vinculadas a la progresión y proliferación celular, como la descrita recientemente a nivel del miR-22, en la población proliferante AID+ IgM/IgG (Palacios *et al.*, 2015). Asimismo tener en cuenta que diversas alteraciones de splicing han sido vinculadas a un mal pronóstico, tanto por mutaciones *drivers* en el componente del spliceosoma **SF3B1**, como por detección directa mediante estudios masivos de RNA-seq en pacientes **IgV<sub>H</sub>-NM** (Liao *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).

## 2.3 SELECCIÓN DE MUTACIONES PARA VALIDACIÓN

Dado que el propósito buscado es la identificación de genes diferencialmente alterados durante la progresión de la LLC por causa de AID, para proseguir el análisis fueron seleccionadas las mutaciones **regulatorias (UTR), no sinónimas y sin sentido**, encontradas exclusivamente en los **grupos AID+** con *Signature 4*.

A su vez, para la selección final de las mutaciones a validar se tuvieron en cuenta por un lado aquellas identificadas simultáneamente en ambos grupos **AID+td** y **AID+dp** por entenderse que son mutaciones relevantes para el proceso tumoral dado que son mantenidas durante la progresión. Por otro lado también fueron seleccionadas mutaciones presentes únicamente en el grupo **AID+dp** que se encontrasen en genes que según la bibliografía presentan un vínculo con la progresión de la LLC. La estrategia seguida se encuentra esquematizada en la **Figura 12**.



**Figura 12. Estrategia de selección de mutaciones en la progresión debidas a AID.** Partiendo de mutaciones **no sinónimas, en UTR y sin sentido**, que presentan la *Signature* de AID, fueron solo tenidas en cuenta las determinadas en el grupo definido como AID<sup>+</sup>. Dentro del grupo formado, solo fueron seleccionadas aquellas que se encontraban en la progresión, tanto desde etapas tempranas de la enfermedad (es decir en AID<sup>+</sup>dt) cómo únicamente en el grupo AID<sup>+</sup>ddp. Los números indican la cantidad de mutaciones con *Signature 4*, excluyendo del análisis las mutaciones sinónimas y las agrupadas como “otras”.

Como se mencionara el WES realizado, fue hecho a partir de pooles y no de muestras de pacientes individuales. Si bien esto impide contar con información de cada paciente, dada la gran heterogeneidad de la LLC, la existencia del pool permite reducir la posibilidad de observar eventos que constituyan falsos positivos, puesto que las mutaciones que resultan identificadas con alta confianza constituyen las variantes más representativas dentro del pool de 5 pacientes. Igualmente, para una contar con la dimensión real del alcance de los resultados obtenidos, las mutaciones de interés fueron seleccionadas para ser específicamente secuenciadas en una cohorte mayor de pacientes de forma

individual. Por tal motivo, se realizó una selección de **35 mutaciones**, distribuidas en **25 genes** que se resumen en la **Tabla 3**.

**Tabla 3. Selección de genes con Signature de AID para validación.** Resumen de las mutaciones seleccionadas para la posterior validación. Gran parte de las mutaciones se encuentran en grupo **AID+ddp** siendo algunas encontradas simultáneamente en el tiempo del debut. La tasa de mutación representa el porcentaje de las secuencias o *reads* con la mutación con respecto a las secuencias totales para el grupo **AID+ddp**. Los genes han sido distinguidos con colores según los grupos descritos en el texto.

**Siglas:** **NS:** Mutación No Sinónima, **Stop:** Mutación *Stopgain* o Sin Sentido; **c-AID:** canónica de AID; **nc-AID:** no canónica de AID; **M1 y M2:** Mutación 1 y 2 respectivamente.

Nro.	Gen	Mutación	Tipo de mutación	Tasa de mutación	Muestra		Signature	
					AID+dt	AID+ddp	c-AID	nc-AID
1	<b>NOTCH1</b>	C>T	UTR3	45%		+		
2	<b>SF3B1 (M1)</b>	C>G	NS	20%		+		+
	<b>SF3B1 (M2)</b>	G>A	NS	13%		+		+
3	<b>ATM</b>	C>G	Stop	12%		+		+
4	<b>POT1</b>	C>T	UTR3	32%		+		
5	<b>PAX5</b>	C>T	UTR3	10%		+		+
6	<b>IL4R</b>	C>T	NS	48%		+		
	<b>IL4R</b>	C>T	NS	43%		+		+
	<b>IL4R</b>	C>G	UTR3	25%		+		+
7	<b>IL21</b>	C>T	UTR3	20%		+		+
8	<b>BCL2</b>	C>G	UTR3	14%		+		+
9	<b>CD38</b>	C>T	UTR3	57%	+	+		+
10	<b>IL4</b>	C>T	UTR5	53%	+	+		+
11	<b>ROR1</b>	G>A	UTR3	50%	+	+		+
12	<b>IKZF1 (M1)</b>	G>A	UTR3	27%		+		
	<b>IKZF1 (M2)</b>	T>G	UTR3	27%		+		+
13	<b>FAT1</b>	C>T	NS	34%		+		+
14	<b>CDH12</b>	C>T	UTR3	11%		+		+
15	<b>ST6GAL1</b>	G>A	UTR3	27%		+		+
16	<b>TMEM176A</b>	C>G	UTR3	94%		+		+
	<b>TMEM176A</b>	G>C	UTR3	46%		+		+
17	<b>NLRP4</b>	G>A	NS	41%	+	+		+
18	<b>IL17A</b>	C>T	UTR3	12%		+		+
19	<b>IL17RA(M1)</b>	G>A	UTR3	100%		+		+
	<b>IL17RA(M2)</b>	C>T	UTR3	16%		+		+
20	<b>IL17RC</b>	C>T	NS	93%	+	+		+
21	<b>IL17RE</b>	G>A	NS	94%	+	+		+
22	<b>TLR10</b>	T>G	NS	63%		+		+
	<b>TLR10</b>	T>G	NS	64%		+		+
	<b>TLR10</b>	C>T	NS	50%		+		+
23	<b>FUT2 (NS)</b>	G>A	NS	59%	+	+		+
	<b>FUT2</b>	T>G	UTR3	11%	+	+		+
	<b>FUT2</b>	G>A	Stop	89%	+	+		
24	<b>CASP7</b>	C>G	NS	32%	+	+		+
25	<b>TMEM177</b>	C>T	Stop	18%		+		+

Los genes seleccionados pueden agruparse en 3 grandes categorías:

**1) Genes *drivers* en la LLC:** en esta categoría se encuentran aquellos genes sugeridos previamente por los estudios genómicos en cohortes grandes de pacientes (más de 500) como: **NOTCH1**, **SF3B1**, **ATM** y **POT1**(Puente *et al.*, 2011; Landau *et al.*, 2015). **NOTCH1** es un receptor transmembrana implicado en resistencia a apoptosis y constitutivamente activado en pacientes progresivos y refractarios al tratamiento en la LLC, siendo reportado a su vez que mutaciones en el 3'UTR conducen a su activación(Larrayoz *et al.*, 2017). La mutación *stopgain* encontrada en **ATM** resulta en un truncamiento de la proteína en el exón 35 de los 66 que la componen; como se mencionara, su supresión se encuentra asociada a un mal pronóstico(Austen *et al.*, 2005). **SF3B1** es un componente esencial del spliceosoma, cuyas mutaciones se asocian a una mayor agresividad de la LLC y menor sobrevida, en particular las mutaciones aquí determinadas han sido previamente reportadas dentro de pacientes progresivos de LLC (Landau *et al.*, 2013). **POT1** forma parte de un complejo responsable de la protección de los telómeros, y si bien las mutaciones encontradas en la LLC se asocian a una disminución de su actividad y a un posible aumento de la inestabilidad genómica, su sobreexpresión resulta en una mayor actividad de la Telomerasa, esencial para la sobrevida celular(Baumann and Price, 2010; Ramsay *et al.*, 2013).

**2) Genes *off-target* de AID:** entendiendo por los genes que han sido validados como blancos de la actividad promiscua de AID fuera de locus Ig, y que por lo tanto validan el hecho de asociar la *Signature 4* con la actividad de AID, dichos genes son **PAX5**, **IL4R**, **IL21** y **BCL2** (Yamane *et al.*, 2011; Correia *et al.*, 2015).

**3) Genes *a explorar* en la LLC:** En dicho grupo se encuentran genes que son relevantes en la fisiopatología de la LLC, pero cuyas alteraciones genéticas dentro de la progresión de la LLC aún no ha sido explorada, o en su defecto genes cuyas funciones los asocian a cierto proceso tumoral. Teniendo en cuenta las características de los genes, puede hacerse una subdivisión de este grupo en tres:

a) Genes asociados a la LLC: como es el caso de **CD38** (relevante marcador de mal pronóstico en la LLC, asociado a proliferación(Pepper *et al.*, 2007; Vaisitti *et al.*, 2015)), **IL4** (capaz de inducir aumento de sobrevida y expresión del BCR en el LB(Aguilar-Hernandez *et al.*, 2016)), **ROR1** (asociado al mal pronóstico, su expresión aumentada se asocia a una mayor sobrevida del LB(Cui *et al.*, 2016)), **IKZF1** (mutado en la LLC y siendo también asociadas sus alteraciones a la Leucemia Linfoblástica Aguda(Boer *et al.*, 2016; Burns *et al.*, 2018)), **FAT1** (gen cuyas mutaciones se asocian a refractariedad al tratamiento en la LLC(Messina *et al.*, 2014)), **CDH12** (cadherina asociada a proliferación celular en otros tipos de cánceres y que se encuentra mutada por AID en la LLC(Ma *et al.*, 2016; Burns *et al.*, 2018)), **ST6GAL1** (gen de resistencia a drogas en líneas celulares leucémicas(Ma *et al.*, 2014)).

b) Genes de relevancia inmunológica: como por ejemplo **TMEM176A** (proteína transmembrana de funciones inmunorregulatorias que se encuentra aumentada en linfomas(Condamine *et al.*, 2010; Cuajungco *et al.*, 2012)), los genes **IL17A**, **IL17RA**, **IL17RC**, **IL17RE** (vía con diversos efectos en el cáncer pero poco estudiada a nivel de la LLC, reportándose un aumento de Th17 e IL17A en pacientes de LLC con respecto a individuos y una aparente asociación entre éstos con un mejor pronóstico de la enfermedad(Hus *et al.*, 2013)) y el receptor **TLR10** (receptor tipo Toll expresado en la LLC y que presenta mutaciones asociadas al cáncer(Chen *et al.*, 2007; Muzio *et al.*, 2009)).

c) Genes asociados al cáncer: entre ellos se encuentra el gen **FUT2**, el cual posee varias alteraciones, entre ellos una *stopgain*, (Fucosil Transferasa cuya baja expresión se ha visto asociada a la transición epitelio-mesénquima y metástasis en cáncer(Sakuma, Aoki and Kannagi, 2012)); **CASP7** (Caspasa efectora de la apoptosis cuyas mutaciones constituyen un factor de riesgo en ciertos tipos de cánceres(Shi *et al.*, 2015)) y **TMEM177** (de la familia de TMEM176A, proteína cuyos bajos niveles se asocian a un aumento en la capacidad respiratoria a nivel de la mitocondria(Lorenzi *et al.*, 2018)).

De las 35 mutaciones **seleccionadas**, las encontradas en regiones **regulatorias** (UTR) representan el **54%**, las **No Sinónimas** el **40%** y las **Sin Sentido** el **6%**. La lógica seguida para su selección, además de estar basada en la bibliografía entorno a mutaciones en el cáncer y relevancia en la LLC, es la de si el tipo mutación es coherente con la posible alteración en la función fisiológica del gen y por lo tanto su contribución al proceso tumoral.

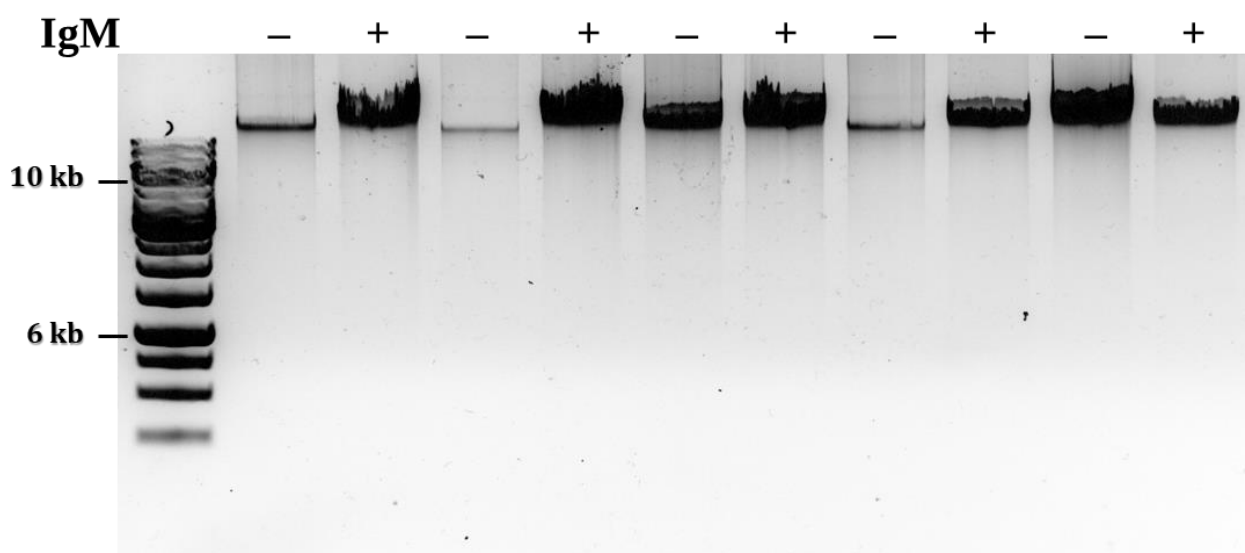
Por ejemplo, para los genes cuya sobreexpresión o disminución resulta oncogénica se tuvieron en cuenta principalmente mutaciones a nivel de los UTR, dado su involucramiento en la regulación de la expresión génica, producto de la interacción de dichas regiones con mircoRNAs y proteínas reguladoras de la traducción; misma lógica fue aplicada en el caso de mutaciones *stopgain* que suponen la formación de una proteína trunca y la consecuente pérdida de función de la misma. Por otro lado, para el caso de los receptores u otras proteínas cuya alteración en la estructura pueden ejercer en un cambio en su función fueron seleccionadas mayoritariamente mutaciones no sinónimas (Matoulkova *et al.*, 2012).

### 3. SECUENCIADO CONFIRMATORIO GEN ESPECÍFICO

#### 3.1 ELABORACIÓN DE LIBRERÍAS

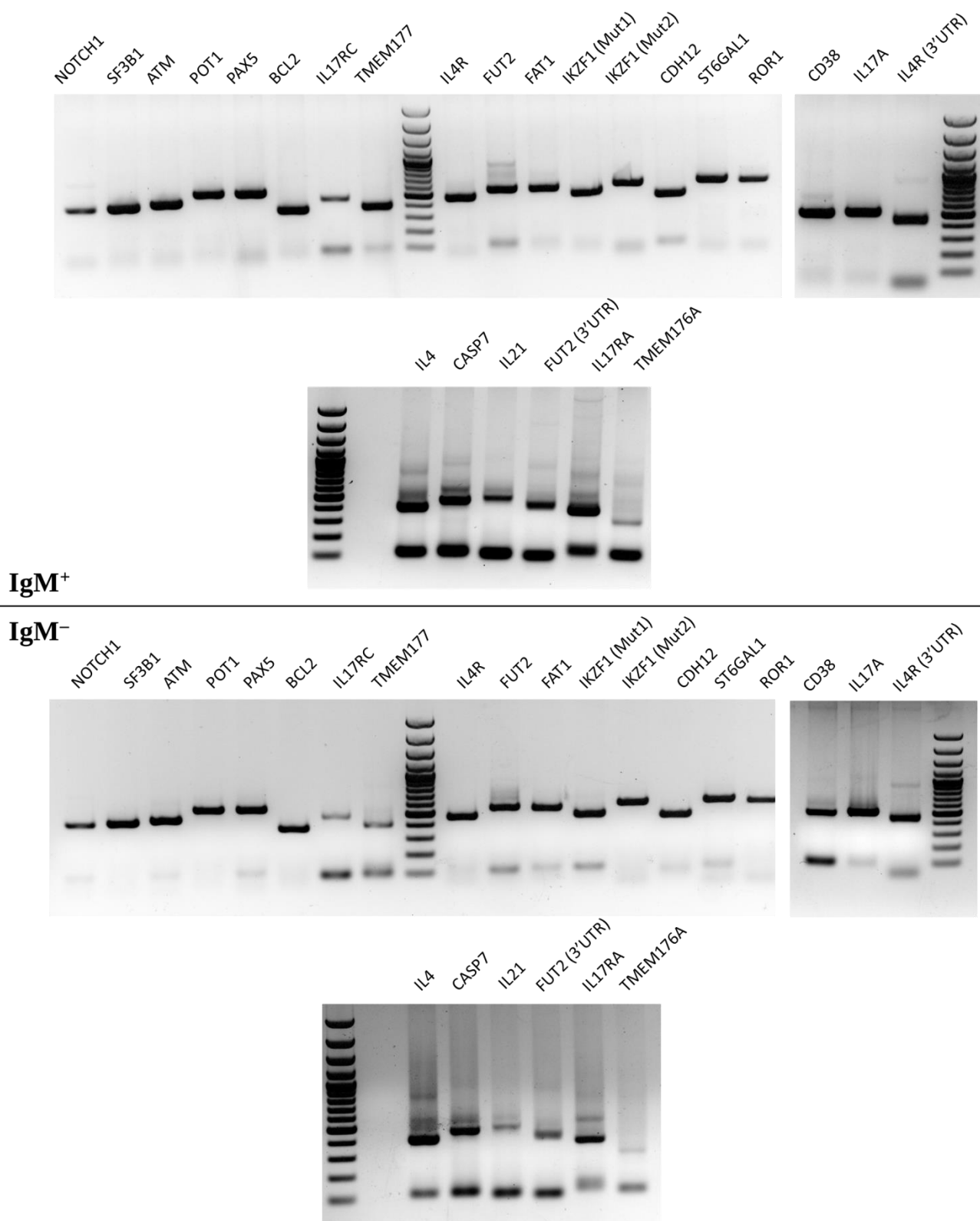
Una vez seleccionados los 25 genes (Tabla 3), se procedió a realizar un **segundo secuenciado masivo en la cohorte de validación**, con el objetivo de secuenciar, en lugar del exoma, una librería de fragmentos conteniendo las regiones circundantes a cada una de las mutaciones seleccionadas. Esta estrategia (descrita en materiales y métodos) se basa en la amplificación mediante una PCR del segmento genómico conteniendo las mutaciones y un posterior paso de indexado de cada uno de los segmentos generados.

Para la validación fueron seleccionados **15 pacientes** progresivos durante la progresión (equivalentes al grupo **AID+dp** inicialmente secuenciado) siendo sus células leucémicas purificadas mediante la FACS (*Fluorescence-Activated cell sorting*) partir de una marcación **IgM<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>** y tomando como control las células **IgM<sup>-</sup>**. Posteriormente fue purificado su genoma y su integridad fue corroborada nuevamente en un gel de agarosa (**Fig. 13**).



**Figura 13. Integridad de DNA genómico para segundo secuenciado confirmatorio.** Se visualiza gel de agarosa sembrado con el DNA genómico extraído en 5 pacientes representativos de los 15 seleccionados. Para cada uno de los pacientes fue evaluada la integridad de genómico tumoral **IgM<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>** y de su contraparte de células no tumorales **IgM<sup>-</sup>**

Una vez comprobada la integridad del genómico a utilizar, fueron realizadas las correspondientes PCR para cada uno de los genes en las 30 muestras (15 tumorales y 15 normales). Los oligos para cada PCR fueron diseñados de forma tal de amplificar un fragmento con un tamaño en el entorno de **500pb**, lográndose amplificar todos los genes con excepción de los genes **IL17RE**, **TLR10** y **NLRP4** para los cuales no fue posible obtener producto en las cantidades requeridas para continuar con las etapas siguientes. En la **Figura 14** se visualizan geles de agarosa representativos de las amplificaciones realizadas para un paciente, tanto a partir del genómico **IgM<sup>+</sup>** como del **IgM<sup>-</sup>**. Una vez realizadas todas las PCR los productos fueron purificados y agrupados en dos pools por paciente (correspondiente a las tumorales y normales) para ser indexados mediante una segunda PCR de forma de poder distinguir las secuencias posteriormente generadas en el secuenciado de forma inequívoca.



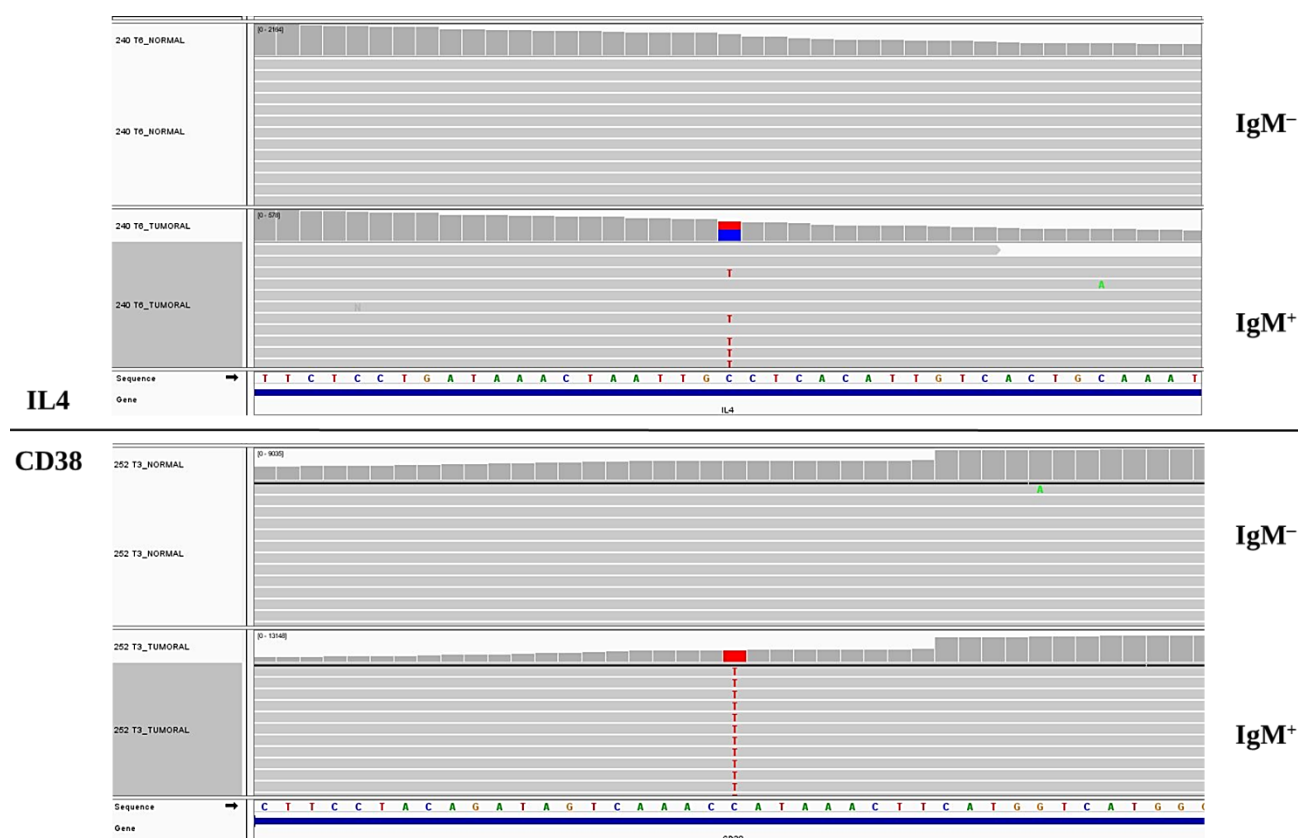
**Figura 14. Amplificación exitosa en 22 de los 25 genes seleccionados para la validación.** Visualización de los productos de PCR de cada uno de los genes a validar en geles de agarosa. Para los casos en los que hay más de una mutación por gen, fueron indicadas con 3'UTR para diferenciarlas de las no sinónimas. En el panel superior se encuentran las PCR realizadas sobre el genómico tumoral **IgM<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>** y en el panel inferior el de su contraparte de células no tumorales **IgM<sup>-</sup>**.



### 3.2 VALIDACIÓN DE MUTACIONES SELECCIONADAS

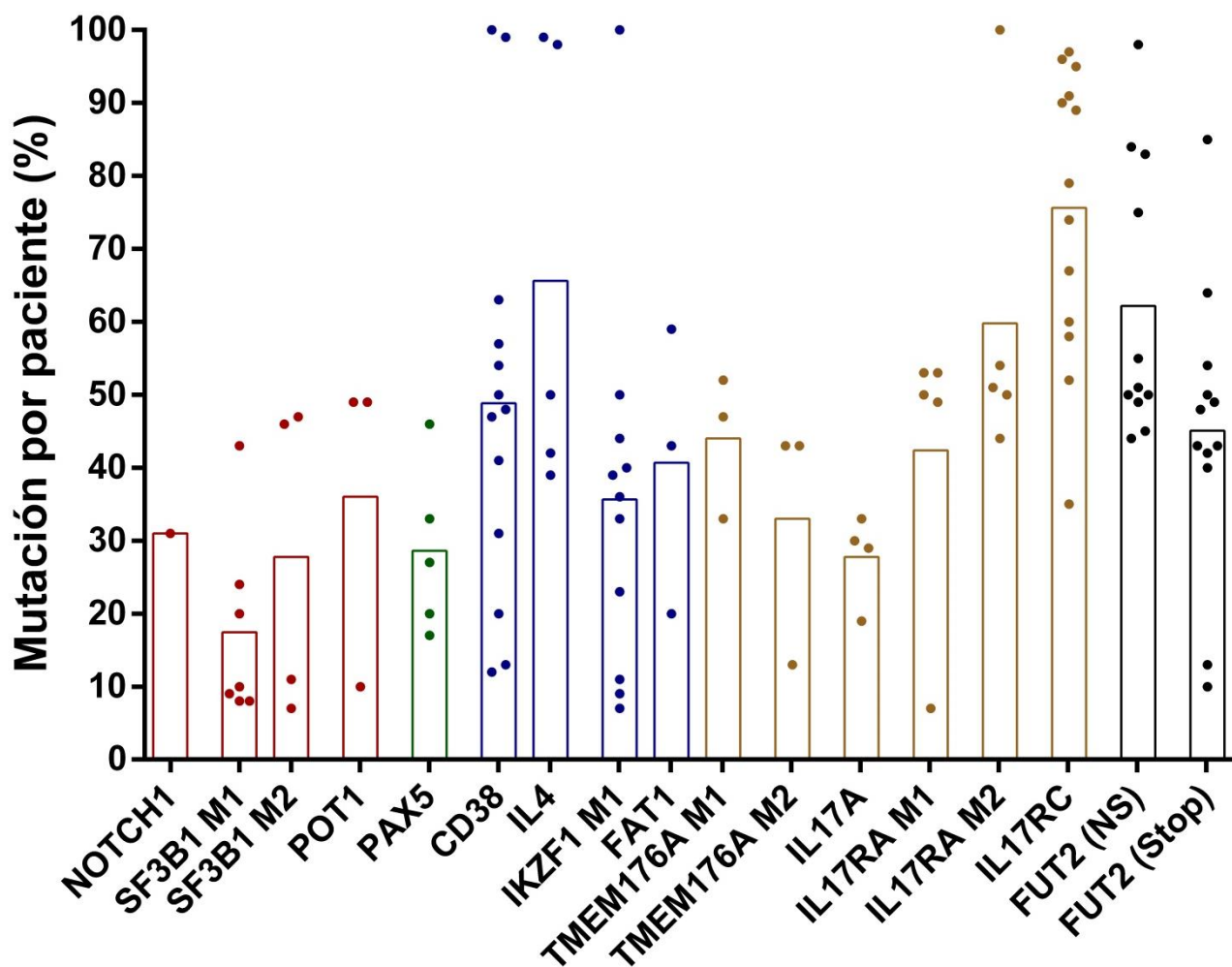
Una vez obtenidas las librerías se procedió a realizar el secuenciado masivo de las mismas. En esta etapa surgieron inconvenientes de índole técnico y de tiempo que resultaron en la realización del secuenciado de un modo distinto al inicialmente planteado: en lugar de realizarse una secuenciación con un alcance de **250x250** desde cada extremo de los fragmentos (lo que equivale en una lectura total de 500pb, mismo tamaño de la librería) el estudio fue realizado finalmente con un kit de **200x100**. Si bien algunas de las mutaciones no pudieron ser cubiertas por el sistema empleado la mayoría de ellas pudieron ser secuenciadas y correctamente validadas. Se obtuvieron lecturas de buena calidad y con un nivel de cobertura (cantidad de lecturas en la posición de la mutación) muy profundo desde **20X** en algunos casos hasta más **1000X** en la gran mayoría.

Para la determinación de las mutaciones se normalizó la contribución de la muestra normal a la tumoral de cada paciente, posteriormente, se consideró como presencia de mutación valores **mayores o iguales al 10%** de secuencias mutadas con respecto al total de secuencias. En la **Figura 15** se ilustra de forma representativa la detección de mutaciones para dos genes (**IL4** y **CD38**) en dos de los 15 pacientes.



**Figura 15. Los genes se encuentran mutados con diversas tasas de mutación.** Ilustración obtenida a partir del software IGV (*Integrative Genomics Viewer*) en donde se observa el alineamiento de los reads para dos genes distintos **IL4** (panel superior) y **CD38** (panel inferior) en dos pacientes distintos. En cada uno de los paneles se muestra a su vez las secuencias obtenidas de muestras normales (IgM<sup>-</sup>) versus tumorales (IgM<sup>+</sup>). En gris se representan los distintos *reads* obtenidos para dicha posición y en rojo se indica la mutación con respecto a la secuencia de referencia (mutación C → T en ambos casos) con una tasa de mutación del 42% para IL4 y 100% para CD38.

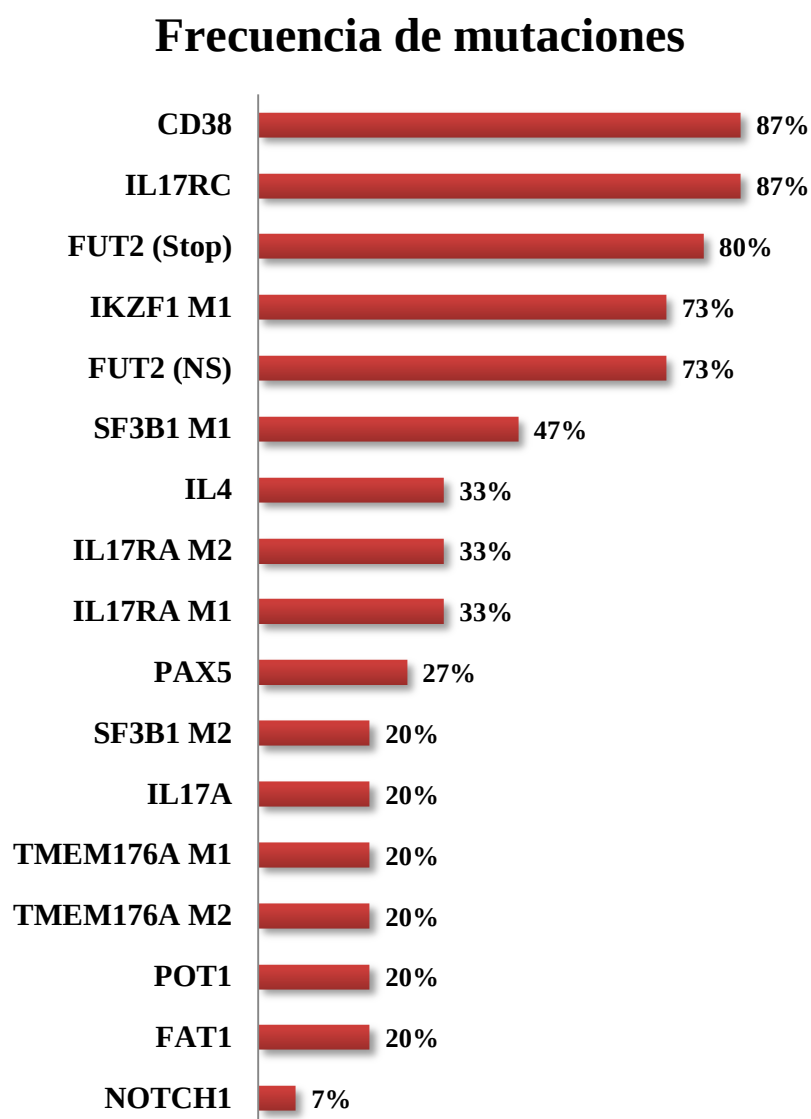
De esta forma, se detectaron mutaciones en **13** de los **17** genes secuenciados con distinto porcentaje de mutación dentro de cada paciente, con valores desde el **10% hasta 100%** de secuencias mutadas como se resume en la **Figura 16**. Las mutaciones en **IL4R (3'UTR)**, **CDH12**, **BCL2** y **ATM** **no fueron identificadas** en ninguno de los 15 pacientes analizados.



**Figura 16.** Los genes validados presentan distinta tasa de mutación dentro de cada paciente. Los puntos representan muestras consideradas como positivas para cada mutación ( $\geq 10\%$  de *reads* mutados), con el correspondiente valor de porcentaje de secuencias mutadas. Los colores en el gráfico hacen referencia a la agrupación de genes asignada en la **Tabla 3**.

Como se desprende de la **Figura 16**, los genes estudiados presentan distintas tasas de mutación entre los pacientes, destacándose genes como **IL4**, **IL17RC**, **FUT** (ambas mutaciones) y **CD38** por porcentajes muy altos de secuencias mutadas. A su vez, algunos genes parecen distribuirse en dos grupos con distinto grado de mutación, tal es el caso de **SF3B1**, **IL17A**, **IL17RA** (mutación 1) y **FUT2** (mutación *stopgain*); para otros genes, como **POT1**, **TMEM176A** (ambas mutaciones) y **FAT1** es difícil establecer una tendencia en la distribución de los datos dado el poco número de pacientes con la mutación.

Dejando de lado ahora las tasas de mutación observadas, y considerando únicamente la **ocurrencia** de las mutaciones entre los 15 pacientes (o frecuencia), es posible determinar las frecuencias de éstas dentro de la cohorte analizada, las cuales se resumen en la **Figura 17**.



**Figura 17.** La frecuencia de las mutaciones muestra a CD38, IL17RC y FUT2 como los genes más mutados. Ocurrencia de las mutaciones dentro del grupo de los 15 pacientes, ordenadas de mayor a menor, no se tuvieron en cuenta para el gráfico las mutaciones que no fueron validadas (IL4R (3'UTR), CDH12, BCL2 y ATM).

Teniendo en cuenta la heterogeneidad clínico/molecular característica de los pacientes de LLC donde las mutaciones consideradas como "mutaciones drivers" en la LLC (NOTCH1, SF3B1, ATM, POT1) por el momento en ninguno de los casos superan el 20 % de los pacientes, estos resultados son sumamente interesantes. Si bien es cierto que la cohorte de validación utilizada tiene un sesgo claro hacia la selección de los pacientes más progresivos, porcentajes mayores el 50% subrayan una gran importancia para aquellos genes encontrados por encima de este punto de corte.

El secuenciado confirmatorio permitió entonces la correcta **validación de 17 mutaciones** de las detectadas y seleccionadas originalmente durante la progresión de la LLC por presentar la *Signature* de AID. El compendio de todos los resultados obtenidos a partir de la selección de genes y posterior secuenciación se detallan en la Tabla 4. Estos resultados, como se discutirá a continuación, representan por primera vez un nexo directo entre la actividad mutagénica *off-target* de AID y la progresión de la Leucemia Linfoide Crónica.

**Tabla 4. Resumen de los genes validados con *Signature* de AID.** La gran mayoría de las mutaciones fueron exitosamente validadas en el segundo secuenciado masivo. Notar que la tasa de mutación en el WES original representa el porcentaje de secuencias mutadas en el pool AID+ddp mientras que en el secuenciado de validación es la media entre los distintos pacientes mutados. Los genes son presentados en el mismo orden que la Tabla 3.

**Siglas:** **Tipo mut.:** Tipo de mutación; **NA:** Mutación No Analizada en el segundo secuenciado. **2do. Sec.:** Segundo secuenciado confirmatorio; **NS:** Mutación No Sinónima, **Stop:** Mutación *Stopgain* o Sin Sentido; **c-AID:** canónica de AID; **nc-AID:** no canónica de AID; **M1** y **M2:** Mutación 1 y 2 respectivamente.

Nro.	Gen	Tipo mut.	Tasa de mutación (WES)	Validación			Tasa de mutación (2do. Sec.)	Frecuencia (2do. Sec.)
				Si	No	NA		
1	<b>NOTCH1</b>	UTR3	45%	+			31%	7%
2	<b>SF3B1 (M1)</b>	NS	20%	+			17%	47%
	<b>SF3B1 (M2)</b>	NS	13%	+			28%	20%
3	<b>ATM</b>	Stop	12%		+		0%	-
4	<b>POT1</b>	UTR3	32%	+			36%	20%
5	<b>PAX5</b>	UTR3	10%	+			29%	27%
6	<b>IL4R</b>	NS	48%			+	-	-
	<b>IL4R</b>	NS	43%			+	-	-
	<b>IL4R</b>	UTR3	25%		+		0%	-
7	<b>IL21</b>	UTR3	20%			+	-	-
8	<b>BCL2</b>	UTR3	14%		+		0%	-
9	<b>CD38</b>	UTR3	57%	+			49%	87%
10	<b>IL4</b>	UTR5	53%	+			66%	33%
11	<b>ROR1</b>	UTR3	50%			+	-	-
12	<b>IKZF1 (M1)</b>	UTR3	27%	+			36%	73%
	<b>IKZF1 (M2)</b>	UTR3	27%			+	-	-
13	<b>FAT1</b>	NS	34%	+			41%	20%
14	<b>CDH12</b>	UTR3	11%		+		0%	-
15	<b>ST6GAL1</b>	UTR3	27%			+	-	-
16	<b>TMEM176A</b>	UTR3	94%	+			44%	20%
	<b>TMEM176A</b>	UTR3	46%	+			33%	20%
17	<b>NLRP4</b>	NS	41%			+	-	-
18	<b>IL17A</b>	UTR3	12%	+			28%	20%
19	<b>IL17RA(M1)</b>	UTR3	100%	+			42%	33%
	<b>IL17RA(M2)</b>	UTR3	16%	+			60%	33%
20	<b>IL17RC</b>	NS	93%	+			76%	87%
21	<b>IL17RE</b>	NS	94%			+	-	-
22	<b>TLR10</b>	NS	63%			+	-	-
	<b>TLR10</b>	NS	64%			+	-	-
	<b>TLR10</b>	NS	50%			+	-	-
	<b>FUT2 (NS)</b>	NS	59%	+			76%	73%

---

23	<b>FUT2</b>	UTR3	11%		+	-	-
	<b>FUT2</b>	Stop	89%	+		45%	<b>80%</b>
24	<b>CASP7</b>	NS	32%		+	-	-
25	<b>TMEM177</b>	Stop	18%		+	-	-

---



**DISCUSIÓN Y  
CONCLUSIONES**

La determinación de los factores que conducen a la progresión de la Leucemia Linfocítica Crónica constituye un campo de intensa investigación desde hace años. Pese a ello todavía es mucho lo que resta por descubrir y ciertas cuestiones siguen resultando enigmáticas hasta el momento. Empero, gracias al avance vertiginoso de ciertas áreas del conocimiento tales como la proteómica, transcriptómica y genómica que proveen de gran cantidad de información, cada vez se profundiza más en la complejidad de los procesos moleculares que determinan el rumbo de la LLC.

En tal sentido, los estudios realizados a nivel genómico han permitido reconocer que las diferencias observadas a nivel clínico de la enfermedad se correlacionan con la presencia de *landscapes* genéticos distintos entre los pacientes. En consonancia con lo anterior, en la actualidad se ha podido asociar a una LLC con un IgV<sub>H</sub>-NM de mal pronóstico alteraciones en ciertos genes denominados **drivers** debido a su rol clave en la progresión y reincidencia de la enfermedad (Puente *et al.*, 2011; Landau *et al.*, 2015). Asimismo, la gran sensibilidad de las técnicas de NGS ha permitido identificar variantes menos representadas, denominadas **mutaciones subclonales**. Su denominación deriva del hecho que estas mutaciones se encuentran en distintos grupos de células tumorales que se diferencian a partir de la clona leucémica original. Por lo tanto, la mayor comprensión en los procesos que ocurren durante la evolución de LLC ha permitido establecer que una característica clave para la progresión tumoral es la **inestabilidad genética**. Esta es la responsable de la generación de distintas subclonas con un repertorio variado de alteraciones durante el transcurso de la enfermedad, las cuales, en función de su impacto funcional y por lo tanto de su contribución hacia transformación tumoral más agresiva, resultarán seleccionadas y expandidas en el tiempo definiendo el concepto de **evolución clonal** y permitiendo explicar fenómenos tales como la refractariedad al tratamiento y reincidencia, tan frecuentes dentro de los pacientes progresivos con LLC.

Un proceso clave que contribuye a la inestabilidad genética del Linfocito B es la actividad de **AID** y su capacidad de introducir mutaciones en genes fuera de locus de Inmunoglobulinas, su blanco fisiológico inicialmente descrito. Si bien AID se encuentra finamente regulada y su expresión resulta restringida a la reacción del centro germinal, esto no ocurre en muchas neoplasias de linfocitos B. En particular, en la LLC su expresión es detectada a nivel de las células leucémicas de sangre periférica y de forma mantenida en el tiempo en pacientes IgV<sub>H</sub>-NM progresivos (Oppezzo *et al.*, 2003). Dicha expresión, posiblemente ocurra como resultado de la constante estimulación que recibe el LB leucémico desde **el microambiente tumoral** que lo rodea, principalmente en los **centros germinales** de ganglios linfáticos, estructuras asociadas a la progresión en la LLC. Dicha inferencia es coherente con la determinación de que los tres grupos de **células proliferantes** descritos en la LLC (IgM/IgG, CXCR4<sup>low</sup>/CD5<sup>high</sup> y CD86<sup>high</sup>/CXCR4<sup>low</sup>) tienen en común la manifestación de un fenotipo de linfocito B activado y consecuentemente la expresión de AID (Palacios *et al.*, 2010; Huemer *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito surge entonces la interrogante: ¿es posible que la actividad de AID derive en la generación de mutaciones que contribuyan a la progresión tumoral en los pacientes IgV<sub>H</sub>-NM que la expresan de forma anómala?

Dado que la actividad mutagénica de AID sigue ciertos patrones en lo que refiere al tipo de secuencias mutadas y el tipo de variantes introducidas, su participación dentro del **landscape mutacional** puede ser distinguida con respecto a otros procesos mutagénicos. Sin embargo, en el contexto del cáncer, donde muchos procesos alteran el ADN simultáneamente, la diferenciación de la firma de AID de los demás mecanismos moleculares no es tarea sencilla. En tal sentido, en un icónico estudio realizado por Alexandrov y col., se desarrolló por primera vez un algoritmo de búsqueda bayesiano para determinar la

presencia de *signatures* mutacionales en el cáncer a partir de datos de NGS. El mismo se basa no sólo en la consideración del tipo de variante detectada, sino en el contexto nucleotídico en el cual son encontradas las mutaciones. El concepto de *signature* surge de la intersección de dicha información con la de los distintos procesos mutagénicos reportados en el cáncer, haciendo posible así inferir, a partir de las variantes somáticas detectadas el proceso por el cual han sido generadas. En efecto, en dicho estudio el análisis dicho de muestras de LLC determinó que la ***signature de AID*** surge como distintiva de la LLC y linfomas de linfocitos B, dos tipos de neoplasias asociadas a desregulaciones de AID.

Consecuentemente, unos años más tardes la aplicación de la misma estrategia perfeccionada le permitió a Kasar y col. identificar en el genoma de pacientes de LLC indolentes las ***Signatures canónica y no canónica de AID***, reafirmando así el concepto de AID como un nuevo factor moldeador del *landscape* genético en la LLC.

Dada la ausencia de un abordaje que profundice en el rol mutagénico de AID durante la progresión de la LLC surgió la inquietud de, utilizando el algoritmo mencionado determinar qué es lo que ocurre en los pacientes  $IgV_H$ -NM que expresan de manera anómala la enzima AID en SP. Para ello se decidió realizar el secuenciado masivo del exoma sobre dos grupos de pacientes  $IgV_H$ -NM cuya diferencia fuese la expresión de AID en el tiempo. Por lo tanto, definidos estos dos grupos se realizó el análisis en dos momentos de la enfermedad distintos, al debut y durante la evolución de la misma, luego del primer tratamiento.

Del análisis inicial del secuenciado se desprende que la carga de mutaciones somáticas entre las muestras resultó coherente con a la biología de los cuatro grupos, es decir, se observa una mayor carga en los grupos **AID+** con respecto a los **AID<sup>-</sup>**. De manera interesante los resultados muestran que la cantidad de mutaciones descienda durante la evolución. Esto podría atribuirse a la acción de un posible mecanismo de eliminación de las células leucémicas que expresen altas cantidades de AID, tal como fuese determinado en los linfocitos B autorreactivos (Cantaert *et al.*, 2015).

Asimismo recientemente ha sido descrito el rol deletéreo que puede presentar AID, al desencadenar la pérdida abrupta de los telómeros en células que carecen de expresión de UNG (Cortizas *et al.*, 2016). En efecto, dicho trabajo demuestra que AID es capaz de mutar las regiones sub-telómericas y en ausencia de UNG, conducir a rupturas de doble hebra que suponen la pérdida completa de los telómeros y posterior inducción de apoptosis, constituyendo un mecanismo de auto-regulación de las células **AID+**. Sin embargo, dado que los niveles de expresión de UNG en las células leucémicas no han sido explorados, la relevancia de dicho mecanismo en la LLC debe ser evaluado.

Por otro lado, al realizar la búsqueda de las *Signatures* mutacionales por el algoritmo descrito, se determinó la presencia de cuatro procesos dominantes en el *landscape* de las muestras analizadas: **S1** y **S2**: *signatures* de envejecimiento, **S3**: *signature* previamente reportada por Alexandrov y col. en el cáncer pero de asignación pendiente (Alexandrov *et al.*, 2013) y **S4**: *signature* canónica y no canónica de AID. Las *signatures* determinadas a partir de este estudio, coinciden con lo previamente encontrado en las muestras de LLC lo que le confiere validez a la búsqueda realizada; la única excepción es la *Signature S3*, la cual, sin duda constituye un aspecto interesante a profundizar dado su gran contribución en el grupo **AID<sup>-</sup>**. En función del claro aumento de ésta durante la evolución de los **AID<sup>-</sup>**, quizás pueda estar indicando la acción de un nuevo mecanismo molecular mutagénico no descrito desatado en respuesta al tratamiento cuyas implicancias en la fisiopatología de la enfermedad deberían ser exploradas.



En cuanto a las *signatures* de envejecimiento, si bien se observó un aumento de éstas durante la progresión de los AID<sup>+</sup> el fenómeno opuesto fue visto entre los AID<sup>-</sup>. Si bien esto puede ser en un principio intrigante, observaciones similares han sido encontradas al analizar dichas *signatures* y su correlación con el tiempo (Alexandrov *et al.*, 2015). De dicho estudio se desprende que si bien las mismas son sistemáticamente determinadas en neoplasias ligadas al envejecimiento como la LLC, su tasa de mutación es muy variable entre distintas muestras dado su dependencia a otras variables biológicas además del tiempo, como por ejemplo la maquinaria de reparación del DNA y la proliferación celular. Teniendo en cuenta que a su vez el tiempo transcurrido entre el debut y la evolución de los pacientes no es lo suficientemente prolongado, no resulta sorprendente observar variabilidad en la contribución de dicha *signature* en función del tiempo.

En lo que refiere a la *signature* asociada a AID, se encontró sobrerrepresentada en los grupos AID<sup>+</sup> con respecto a los AID<sup>-</sup> lo cual se encuentra en directa consonancia con el criterio de selección de pacientes tomado. El aporte de S4, aunque minoritario, entre los grupos AID<sup>-</sup> puede interpretarse como una evidencia indirecta de la actividad de AID en algún momento puntual durante el transcurso de la enfermedad. Sin embargo, si bien el impacto sobre los genes alterados por AID en estos pacientes tendría que ser probado, dado el pequeño número de mutaciones no parece ser tan determinante como en los pacientes AID<sup>+</sup>.

La distribución de los **tipos de mutaciones** dentro de la *Signature* de AID mostró un patrón homogéneo pero interesante, puesto que en todos los grupos, cerca del 40% de las mutaciones se encontraron en regiones intergénicas conteniendo regiones con RNAs no codificantes o con sitios de splicing cercanas a las secuencias codificantes. Si bien esto puede resultar en un principio de discutible relevancia, ha sido previamente demostrado que AID presenta como blancos *off-target* distintos microRNAs y RNAs pequeños no codificantes, destacándose el miR-142 como uno de los más mutados, incluso en la LLC y cuya alteración se asocia a una pérdida de función del mismo, como ocurre en el Linfoma Difuso de Células Grandes (DLBCL) (Yamane *et al.*, 2011; Kwanhian *et al.*, 2012). En efecto, como fuese observado por Taylor y col., AID es capaz de mutar genes que abarcan nc-RNA incluso con una mayor preferencia que por los genes que codifican para mRNAs, siendo atribuible este fenómeno al enriquecimiento de secuencias *hot-spot* de AID en dichas regiones (Taylor, Wu and Rada, 2014). Por otro lado, es sabido de la relevancia que tienen dentro de la LLC los miRs, tales como los mencionados miR-15 y miR-16 por sus implicancias anti-apoptóticas. Sin embargo, no son los únicos con un impacto en la LLC, tal es el caso miR-22 cuya sobreexpresión se asocia al fenotipo proliferante de la población IgM/IgG, que como se mencionara expresa AID (Palacios *et al.*, 2015). En función de esto, el análisis de dichas mutaciones en estudios posteriores podría permitir nuevas asociaciones entre la desregulación de ciertos miRs durante la progresión de la LLC con la actividad mutagénica de AID.

El otro conjunto de mutaciones con mayor representación dentro de la *Signature* de AID, son las mutaciones encontradas a nivel de los **UTR**. Dichas regiones constituyen fragmentos no traducidos del mRNA que ejercen importantes efectos regulatorios sobre la expresión génica, afectando procesos como la estabilidad/degradación del mRNA, localización subcelular, exportación nuclear y eficiencia en la traducción. Debido a que la región 5'UTR es dónde se posicionan los factores de inicio de la traducción su alteración se encuentra más restringida que la del 3'UTR siendo esta última el sitio preferencial de unión de los miRs, no obstante lo anterior ambas regiones pueden ser *target* de miRs. Diversos estudios han probado que los miRs ejercen su regulación en conjunto con las proteínas conocidas como Argonautas formando un complejo denominado miRNP o miRgonauta. El reconocimiento del miR por su mRNA blanco es mediado por un apareamiento del tipo Watson-Crick de 2 a 8 nucleótidos entre un

segmento 5' del miR con una región del mRNA conocida como "**seed**". Dada la pequeña extensión del **seed**, la alteración de tan solo un nucleótido producto de una mutación puede conducir tanto a pérdida como a aparición de uniones entre miRs y mRNAs.

El efecto mayoritario de los miRs luego de su unión suele ser la **represión de la expresión génica**, su acción puede ocurrir previo al inicio de la traducción o durante la misma, mediante diversos mecanismos: **a)** degradación del mRNA por reclutamiento de proteínas como exonucleasas y endonucleasas; **b)** bloqueo de la unión de factores de inicio de la traducción; **c)** bloqueo de la unión de factores de la elongación de la traducción; **d)** interferencia con los ribosomas mediante la inhibición de su unión o inducción de su disociación y **e)** secuestro del mRNA hacia sitios discretos del citoplasma impidiendo su traducción (Matoulkova *et al.*, 2012; Orang, Safaralizadeh and Kazemzadeh-Bavili, 2014).

Pese a las diversas formas que los miR conducen al descenso de la expresión también ha sido visto que en ciertas condiciones y en interacción con otras proteínas son capaces de inducir un **aumento de la expresión génica**. Dicha variación parece estar asociado el estadio celular, en efecto, se ha visto que en células quiescentes en estadio G0 los miR pueden ejercer efectos represivos mientras que en células proliferantes en donde se expresan otro tipo de proteínas Argonautas pueden ejercer el efecto opuesto, incluso sobre el mismo gen (Orang, Safaralizadeh and Kazemzadeh-Bavili, 2014).

En función de lo anteriormente descrito, el impacto que pueden ejercer en la expresión génica las mutaciones introducidas por **AID** a nivel de los **UTR** durante la progresión de la LLC representa un aspecto de profundo interés. En tal sentido, fueron seleccionadas y validadas mutaciones presentes en la progresión en genes de relevancia para la biología del linfocito leucémico, tales como: **CD38 (87%)**, **IKZF1 (73%)**, **PAX5 (27%)**, **POT1 (20%)** y **NOTCH1 (12%)**.

**CD38** es una proteína multifuncional cuya expresión en membrana permite la adhesión celular pero que a su vez presenta una actividad enzimática catalizando la formación de dos mensajeros funcionalmente distintos del  $Ca^{2+}$ . Su estudio en la LLC se remonta al año 1999 cuando Damle y col. proponen como marcador pronóstico, los niveles de expresión en células leucémicas de CD38 siendo asociado su alta expresión a pacientes progresivos con  $IgV_H$ -NM (Damle *et al.*, 1999). Posteriormente otros estudios determinaron que su expresión no es dependiente del  $IgV_H$  sino del estadio de la enfermedad, lo que resulta en su aumento durante la progresión. Asimismo, estudios *in vitro* han determinado que al interactuar con su ligando **CD31** promueve la proliferación y supervivencia de las células leucémicas, así como también la inducción de **CD100** un receptor de supervivencia capaz de interactuar con **Plexina 1** y acentuar el efecto del eje CD38-CD31. Si se considera que las señales de CD31 y Plexina 1 son provistas por **NLC** y por **MSC**, respectivamente, queda manifiesto el rol de clave de CD38 para conducir a la activación de las células leucémicas ante estímulos provenientes del microambiente tumoral. Más aún, un estudio posterior estableció que los niveles de CD38 varían en función del compartimento celular, observándose su mayor expresión en células proliferantes dentro de los pseudofolículos donde tienen lugar las interacciones mencionadas. Asimismo, en este mismo estudio se logró precisar que los altos niveles de CD38 en los centros proliferantes se encuentran asociados a la señal de **CD40L** provista por los **linfocitos T** (Patten *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta que CD40L induce la expresión de AID, y conectando esto a un estudio previo que correlacionara altos niveles de CD38 con expresión de AID en la LLC (Degan *et al.*, 2005); surge la siguiente interrogante con respecto a la mutación encontrada en el 87% de los pacientes progresivos analizados:

¿Es posible que la presencia de AID promovida por señales del microambiente tumoral activado conduzca a la mutación en el 3'UTR de CD38 y que esto, mediante por ejemplo, la pérdida de unión de un miR, resulte en la observada sobreexpresión de CD38 tanto en células AID+ como durante la progresión de la LLC?

Un razonamiento análogo pero en el sentido inverso puede ser realizado para el caso de las mutaciones en el factor de transcripción **IKZF1**. Estudios previos han asociado la disminución en los niveles de expresión de dicho gen con un peor pronóstico en Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)(Mullighan *et al.*, 2009). Asimismo, un reciente estudio en la LLC que compara el *landscape* mutacional entre pacientes IgV<sub>H</sub>-M y IgV<sub>H</sub>-NM ha reforzado los hallazgos encontrados, dada la determinación que dentro del grupo IgV<sub>H</sub>-NM **hay un aumento de mutaciones en regiones no codificantes y regulatorias en diversos genes como IKZF1 y PAX5 con la Signature de AID**(Burns *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta ese trabajo más los resultados aquí mostrados todo apunta a que AID presenta a dichos genes como blanco de su actividad *off-target* en pacientes IgV<sub>H</sub>-NM. El impacto de dichas mutaciones debe ser evaluado en profundidad. En función del impacto de ambos genes en la biología del linfocito es posible que los procesos desatados a raíz de las mutaciones tengan implicancias caminos opuestas en la regulación de su expresión. En el caso de **IKZF1** las mutaciones podrían suponer la generación de nuevos sitios de unión para miRs que sean resulten en una inhibición de su expresión. Por el contrario, la evidencia entorno a **PAX5** como factor inductor de la expresión de AID permiten cuestionarse acerca de una posible retroalimentación positiva entre ambas proteínas. Como fuese demostrado altos niveles de la forma *full-length* de PAX5 conducen a la sobreexpresión de AID en pacientes IgV<sub>H</sub>-NM(Oppezzo *et al.*, 2005), restando por comprobar si los altos niveles de PAX5 asociados a AID son explicables por su acción mutagénica a nivel del 3'UTR de PAX5.

En lo que refiere a la mutación confirmada en el **20%** de los casos de **POT1** su impacto no es tan claro, esto es debido a que dada su capacidad de reclutar la Telomerasa hacia los Telómeros y contribuir a la inmortalidad replicativa, ciertos estudios han asociado su sobreexpresión con un peor pronóstico en el cáncer(Kondo *et al.*, 2004). Sin embargo, las mutaciones encontradas en la LLC apuntan a una disrupción de su función y a una consecuente disfunción telomérica y ocurrencia de aberraciones cromosómicas frecuentes en pacientes progresivos(Ramsay *et al.*, 2013). Por lo que, el impacto de dicha mutación y por ende de la expresión de POT1 en la progresión de la LLC debe ser más profundizado.

En base a un reporte reciente que profundiza en el rol de las mutaciones en **NOTCH1**, la consecuencia de la mutación encontrada puede ejercer un mecanismo distinto a las previamente descritas. En el estudio en cuestión, ha sido esclarecido que mutaciones a nivel del **3'UTR** en el Exón 34 conducen a la generación de un sitio nuevo de splicing y por ende de una forma alterada de la proteína que presenta una activación constitutiva favoreciendo así la sobrevida y resistencia a apoptosis del linfocito B. Curiosamente, si bien la mutación aquí presentada no se encuentra dentro de las informadas, se localiza muy próxima a las mismas, pudiendo tratarse quizás de una nueva variante del *cluster* de mutaciones que conducen a la activación constitutiva de **NOTCH1**. Por otro lado, pese a que la mutación presenta una frecuencia baja del 7% en la cohorte analizada, es coherente con la frecuencia ya descrita de mutaciones en el 3'UTR de NOTCH1 dónde se observa en un 2% de los pacientes, lo cual es lógico si se tiene en cuenta el sesgo hacia pacientes progresivos que presenta la cohorte de validación empleada. Pese a su baja frecuencia, presenta una fuerte correlación con parámetros clínicos de mal pronóstico y refractariedad al tratamiento, indicando la relevancia que estas alteraciones para la progresión de la LLC(Larrayoz *et al.*, 2017).

El otro grupo de mutaciones encontradas con la *signature* de AID han sido las mutaciones no sinónimas y *stopgain*. Sin duda dentro de este grupo las de mayor impacto clínico en la LLC son las encontradas en el gen *driver* **SF3B1**, dadas la gran asociación entre su alteración y la progresión de la enfermedad. Como se mencionara, **SF3B1** forma parte del spliceosoma, complejo responsable del procesamiento de los mRNA. Dada la relevancia y generalidad de dicho mecanismo en las células eucariotas, es lógico pensar el gran impacto que puede presentar su perturbación. En efecto, se ha reportado que el impacto de las mutaciones en **SF3B1** en LB leucémicos y en líneas celulares con expresión ectópica del gen mutado, produce alteraciones en varios procesos celulares como reparación del daño al DNA, mantenimiento de telómeros y señalización de la vía NOTCH(Wang *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta que las mutaciones aquí encontradas han sido previamente reportadas en la LLC, este estudio es una evidencia de peso hacia una idea original y de mucho peso en la fisiopatología de la LLC que permite asociar la expresión de AID con las mutaciones en uno de los genes más frecuentemente alterados en la LLC aportando una evidencia más del impacto pro-tumoral de su expresión anómala.

En consonancia con lo anterior, la variante no sinónima **FAT1** puede conducir a la refractariedad al tratamiento. **FAT1** es un gen supresor de tumor que regula la proliferación celular, y el cual ha sido encontrado recurrentemente mutado pacientes de LLC refractarios al tratamiento con Fludarabina(Messina *et al.*, 2014). Dichas mutaciones encuentran en el exón 2. Sorprendentemente, la mutación encontrada en el 20% de los pacientes se encuentra en el mismo exón alterando aminoácidos muy cercanos a los informados.

Los otros dos grupos de mutaciones que fueron encontradas de forma recurrente en la cohorte de validación son las que afectan el gen **FUT2** y los genes de la vía de **IL17**. En el caso de **FUT2**, la mutación *stopgain* supone el truncamiento en la mitad de la secuencia proteica, a nivel del Trp<sup>154</sup>. Si bien es muy poco lo que se sabe de dicha proteína en el cáncer, el hecho de que fuese identificada con una tasa de mutación del 89% en el WES original y una frecuencia del 80% en la validación permite deducir que puede tratarse de una alteración relevante hasta el momento desconocida. Lo que es sabido es que dicha familia de proteínas, además de fucosilar el antígeno de Lewis relacionado al sistema ABO, es capaz de mediar procesos de adhesión celular y metástasis tumoral(Chen *et al.*, 2017). Por otro lado, la alteración de los patrones de glicosilación en las células tumorales ha sido y es un tema ampliamente profundizado en el cáncer(Kim, Yoo and Ko, 2009).

Por último, en lo que concierne a las mutaciones en el grupo de **IL17** (IL17A, IL17RA e IL17RC), poco es lo que se sabe sobre su implicancia en la LLC. Como se mencionara, ciertos estudios previos indican que los pacientes con peor pronóstico presentan menores niveles en sangre periférica de IL17A y Th17 (los linfocitos T responsables de su mayor producción). Si bien esto puede ser efectivamente así, en primer lugar es sabido que los linfocitos B también son capaces de producir IL17A ante ciertos estímulos(Vazquez-Tello *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta a su vez que altos niveles de IL17A han sido reportados en la LLA y que los mismos son capaces de inducir la proliferación de los linfocitos B mediante la vía de AKT(Bi *et al.*, 2016) y que a su vez dicha vía se encuentra activada en las células proliferantes en la LLC, podría plantearse la hipótesis mecanismo autócrino de proliferación dependiente de IL-17. Es decir, en el contexto de los pseudofolículos dónde el linfocito leucémico recibe diversos estímulos desde células del microambiente, las mutaciones observadas pueden conducir no solo a un aumento de IL17 sino del complejo receptor de IL17R (formado por IL17RA e IL17RC) siendo posible así una auto-inducción de proliferación y a su vez, a un rápido agotamiento de dicha interleucina que se condice con los reportes de su disminución a nivel de sangre periférica de pacientes progresivos.

---

En resumen, las diversas mutaciones validadas con signature de AID a nivel de genes **drivers** y **de relevancia fisiopatológica** en la LLC tales como **CD38**, **SF3B1**, **NOTCH1** y **POT1** constituyen el primer estudio que establece un **vínculo directo** entre la expresión anómala de AID y la **progresión de la Leucemia Linfóide Crónica** en pacientes IgV<sub>H</sub>-NM. Asimismo deja abierta la posibilidad para futuras investigaciones que profundicen en los procesos desatados a partir de las mutaciones determinadas, tanto en los genes mencionados como en otros menos explorados en la LLC.

---

## OTROS APORTES REALIZADOS

En el marco de la búsqueda de diferentes **factores determinantes de la progresión en la LLC** que se desarrolla en el grupo de trabajo donde se llevó a cabo esta tesis, se ha realizado en paralelo al trabajo aquí presentado un trabajo adicional publicado en *Blood* en el año 2017. Este trabajo estuvo focalizado en la evaluación proteómica de exosomas circulantes en el suero de pacientes progresivos durante el transcurso de la enfermedad. El manuscrito publicado se presenta como el **Anexo 2**, y no es tratado en detalle en esta tesis por razones de espacio. Sin embargo, a continuación se realiza un breve resumen del mismo, centrado en los principales resultados y las hipótesis que se desprenden de este trabajo. Aquí, la expresión anómala de la enzima AID y su rol en el proceso de mutaciones "off target" en la LLC, es asociada a través de un factor de transcripción como NF-κB el cual es activado por la molécula S100A9 encontrada específicamente en los exosomas séricos de pacientes no mutados al tiempo de la progresión.

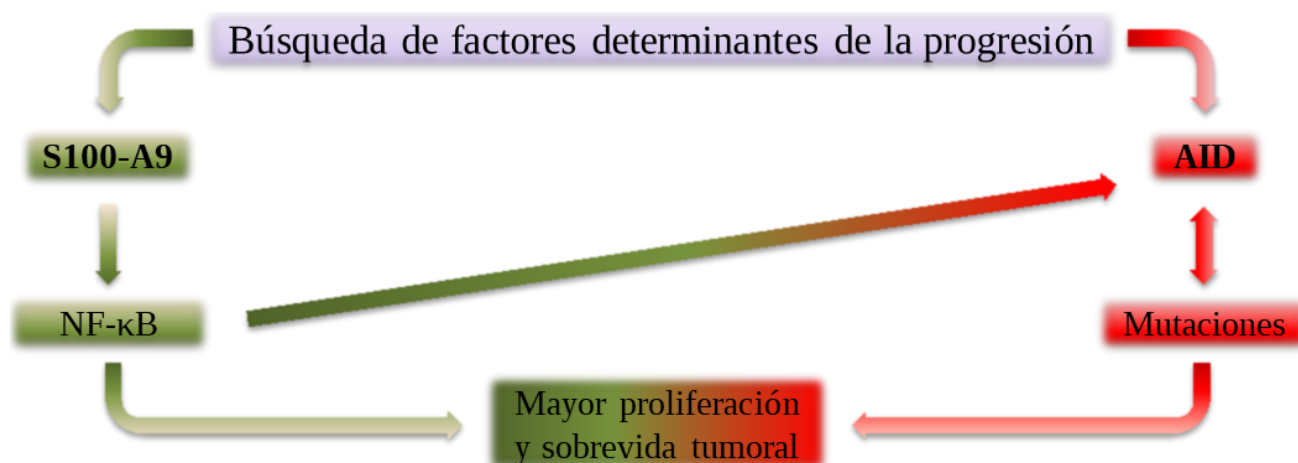
Los **exosomas** son pequeñas nano-vesículas de origen endosomal con un diámetro entre 40-100nm capaces de mediar comunicación intercelular debido al transporte de proteínas, lípidos y RNA en su interior. Asimismo, su presencia se ha asociado con la progresión tumoral y metástasis (Kahlert and Kalluri, 2013; Atay and Godwin, 2014).

De la evaluación realizada del contenido proteómico de **exosomas de plasma** durante la progresión de la LLC fue identificada **S100A9** como una de las proteínas aumentadas en exosomas durante la progresión. **S100A9** presenta varias funciones que conducen a procesos tales como reclutamiento leucocitario, crecimiento tumoral y metástasis. Asimismo ha sido descrito recientemente que es capaz de unirse al receptor **EMMPRIN** y conducir a la activación de la vía de **NF-κB** (Hibino *et al.*, 2013).

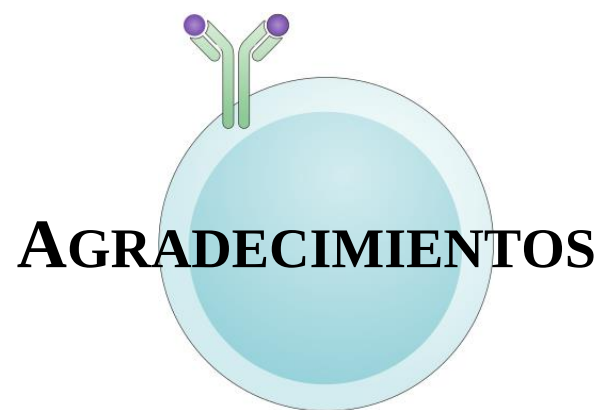
En base a los estudios realizados en dicho trabajo, **S100A9** surge como un nuevo factor capaz de contribuir con la progresión tumoral mediante la inducción de la vía canónica de **NF-κB**. Los resultados obtenidos sugieren a su vez que esto podría ocurrir mediante su unión al receptor **EMMPRIN**, cuya expresión se encuentra aumentada en células leucémicas durante la progresión.

Ahora bien, como fuese mencionado previamente una de las posibles regulaciones de **AID** es a nivel transcripcional, mediante ciertos factores de transcripción que son capaces de inducir su expresión ante ciertos estímulos; resultando muy interesante que **NF-κB** se encuentra entre los factores capaces de inducir la expresión de AID en el linfocito B (Dedeoglu *et al.*, 2004; Gourzi, Leonova and Papavasiliou, 2007).

De esta manera conectando todos los resultados obtenidos en esta tesis así como en función del conocimiento entorno a esta enfermedad, se puede concebir a la progresión de la LLC como un proceso de estimulación continua del linfocito B leucémico por parte de las señales recibidas del microambiente tumoral, sumándose ahora **S100A9** a la intrincada red de interacciones de la célula tumoral con el microambiente.. Dichos estímulos tienen sobre todo efectos activadores sobre los linfocitos B tumorales, lo que se traduce en un aumento de la proliferación y sobrevida celular, así como también en la inducción de AID. Una vez inducida la expresión de AID esto puede traducirse en la introducción de nuevas mutaciones que conduzcan a la generación de subclonas tumorales más agresivas capaces de expandirse y seleccionarse en el tiempo por el mecanismo de evolución clonal, permitiendo explicar a su vez procesos tales como la reincidencia y refratariedad al tratamiento tan frecuentes dentro de los pacientes progresivos. De esta manera la identificación de **S100A9** y **AID** como nuevos factores determinantes del proceso tumoral, permite posicionarlos como posibles blancos terapéuticos a evaluar en un futuro dentro de la progresión de la Leucemia Linfocítica Crónica (Fig.18).



**Figura 18. Integración de los dos proyectos realizados en esta tesis para la búsqueda de factores que contribuyan con la progresión de la LLC.** Del lado izquierdo se encuentra el nuevo eje reportado por primera vez en la LLC de **S100A9** siendo capaz de inducir la activación de la vía de **NF-κB** durante la progresión de la LLC, el cual es capaz de conducir a una mayor proliferación y sobrevida del clon tumoral (Anexo 2). La expresión de **NF-κB**, además de reflejarse en una mayor proliferación es capaz de conducir a la expresión de **AID**. Tal como se desprende del análisis de los resultados aquí presentados, la expresión de **AID** en pacientes progresivos de LLC tiene como consecuencia la introducción de nuevas mutaciones *off-target* en diversos genes vinculados a procesos como regulación de la proliferación celular, sobrevida, resistencia a la apoptosis, refratariedad al tratamiento, entre otros, que en definitiva contribuyen al desarrollo de un cuadro clínico desfavorable dentro de dicha enfermedad.



La realización de esta Tesis no hubiese sido posible sin la participación de muchas personas a lo largo de los últimos años, quisiera agradecer en particular:

A **Pablo**, por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por haberme formado y guiado en mis primeros pasos en el mundo de la investigación desde hace ya cuatro años. Como también, por haber contribuido a la concreción de la gran apuesta que estoy por comenzar tan lejos de aquí.

A **Cecilia**, por ser mi fiel compañera y mi sostén; por el apoyo inquebrantable desde ya varios años y por estar dispuesta ahora a iniciar una nueva aventura a mi lado.

A los **miembros del Tribunal**, por haber aceptado a evaluar en tan poco tiempo este trabajo.

A mi **padre**, por siempre estar, más allá de la distancia, y por sentar las bases de mi personalidad y percepción del mundo.

A los compañeros del laboratorio, los que están y los que estuvieron: **Angi, Ceci, Clau, Colo, Dani, María Elena, Natalia, Pablito y Sandra**, por sus enseñanzas, su compañerismo y por tantos momentos compartidos que siempre quedarán en mi memoria.

A **Julieta y Marcelo**, por su aporte invaluable de conocimientos bioinformáticos.

A **Gonzalo Greif**, por su colaboración en la realización y análisis de los experimentos de secuenciado masivo realizados.

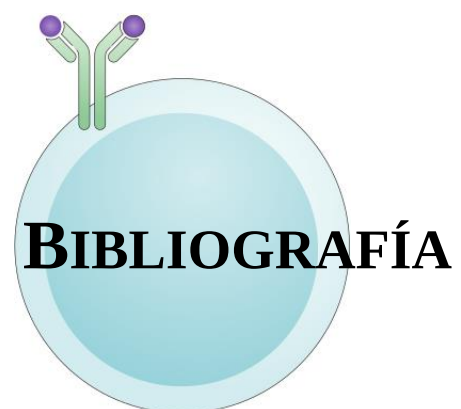
A **Sabina Victoria**, por su gran ayuda y disposición en los experimentos de *sorting* celular.

A los **compañeros de la cátedra de Inmunobiología**, con quienes he aprendido tanto y compartido muchas experiencias formativas.

Y a **todos aquellos**, amigos y colegas que en mayor o menor medida contribuyeron con la discusión de resultados, con material para los experimentos, con transmisión de conocimiento o con simplemente brindarme su amistad y su tiempo compartiendo distintos momentos durante este camino de la vida.

A todos, simplemente...gracias!





- Afgan, E. *et al.* (2016) 'The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 44(W1), pp. W3–W10. doi: 10.1093/nar/gkw343.
- Aguilar-Hernandez, M. M. *et al.* (2016) 'IL-4 enhances expression and function of surface IgM in CLL cells.', *Blood*. American Society of Hematology, 127(24), pp. 3015–25. doi: 10.1182/blood-2015-11-682906.
- Albesiano, E. *et al.* (2003) 'Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone', *Blood*, 102(9), pp. 3333–3339. doi: 10.1182/blood-2003-05-1585.
- Alexandrov, L. B. *et al.* (2013) 'Signatures of mutational processes in human cancer.', *Nature*, 500(7463), pp. 415–21. doi: 10.1038/nature12477.
- Alexandrov, L. B. *et al.* (2015) 'Clock-like mutational processes in human somatic cells.', *Nature genetics*. Europe PMC Funders, 47(12), pp. 1402–7. doi: 10.1038/ng.3441.
- Atay, S. and Godwin, A. K. (2014) 'Tumor-derived exosomes: A message delivery system for tumor progression.', *Communicative & integrative biology*, 7(1), p. e28231. doi: 10.4161/cib.28231.
- Austen, B. *et al.* (2005) 'Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL.', *Blood*, 106(9), pp. 3175–82. doi: 10.1182/blood-2004-11-4516.
- Basso, K. and Dalla-Favera, R. (2015) 'Germinal centres and B cell lymphomagenesis', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 15(3), pp. 172–184. doi: 10.1038/nri3814.
- Baumann, P. and Price, C. (2010) 'Pot1 and telomere maintenance.', *FEBS letters*. NIH Public Access, 584(17), pp. 3779–84. doi: 10.1016/j.febslet.2010.05.024.
- Bezares F.; and Slavutsky I. (2009) 'Leucemia Linfática Crónica. Las neoplasias linfoides.', pp. 27–48.
- Bi, L. *et al.* (2016) 'Increased Th17 cells and IL-17A exist in patients with B cell acute lymphoblastic leukemia and promote proliferation and resistance to daunorubicin through activation of Akt signaling.', *Journal of translational medicine*. BioMed Central, 14(1), p. 132. doi: 10.1186/s12967-016-0894-9.
- 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. doi: 10.3109/10428194.2010.522283.
- Bianchi, S., Dighiero, G. and Pritsch, O. (2012) *Chronic Lymphocytic Leukemia*. Edited by P. Oppezzo. InTech. doi: 10.5772/1156.
- Blanc, V. and Davidson, N. O. (2003) 'C-to-U RNA editing: mechanisms leading to genetic diversity.', *The Journal of biological chemistry*, 278(3), pp. 1395–8. doi: 10.1074/jbc.R200024200.
- Boehm, T. (2011) 'Design principles of adaptive immune systems', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 11(5), pp. 307–317. doi: 10.1038/nri2944.
- Boer, J. M. *et al.* (2016) 'Prognostic value of rare IKZF1 deletion in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: an international collaborative study', *Leukemia*. Nature Publishing Group,

30(1), pp. 32–38. doi: 10.1038/leu.2015.199.

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. 2655–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11023495> (Accessed: 21 March 2018).

Burger, J. A. and 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*. Elsevier Ltd, 24, pp. 71–81. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.08.011.

Burns, A. *et al.* (2018) ‘Whole-genome sequencing of chronic lymphocytic leukaemia reveals distinct differences in the mutational landscape between IgHVmut and IgHVunmut subgroups’, *Leukemia*. Nature Publishing Group, 32(2), pp. 573–573. doi: 10.1038/leu.2017.311.

Calin, G. A. *et al.* (2002) ‘Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), pp. 15524–9. doi: 10.1073/pnas.242606799.

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(December), pp. 1374–82. doi: 10.2119/molmed.2011.00360.

Cantaert, T. *et al.* (2015) ‘Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression in Human B Cell Precursors Is Essential for Central B Cell Tolerance’, *Immunity*. Elsevier, 43(5), pp. 884–895. doi: 10.1016/j.immuni.2015.10.002.

Casellas, R. *et al.* (2016) ‘Mutations, kataegis and translocations in B cells: Understanding AID promiscuous activity’, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 16(3), pp. 164–176. doi: 10.1038/nri.2016.2.

Chandra, V., Bortnick, A. and Murre, C. (2015) ‘AID targeting: Old mysteries and new challenges’, *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd, 36(9), pp. 527–535. doi: 10.1016/j.it.2015.07.003.

Chaudhuri, J. *et al.* (2014) ‘Biological function of activation-induced cytidine deaminase (AID)’, *Biomedical Journal*, 37(5), p. 269. doi: 10.4103/2319-4170.128734.

Chen, C. T. *et al.* (2017) ‘FUT2genetic variants as predictors of tumor development with hepatocellular carcinoma.’, *International journal of medical sciences*. Ivyspring International Publisher, 14(9), pp. 885–890. doi: 10.7150/ijms.19734.

Chen, Y.-C. *et al.* (2007) ‘Association between Toll-Like Receptor Gene Cluster (TLR6, TLR1, and TLR10) and Prostate Cancer’, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 16(10), pp. 1982–1989. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0325.

Chomczynski, P. (1993) ‘A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples.’, *BioTechniques*, 15(3), pp. 532–4, 536–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7692896> (Accessed: 31 December 2014).

Condamine, T. *et al.* (2010) ‘Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells.’, *Journal of leukocyte biology*, 88(3), pp. 507–15. doi: 10.1189/jlb.1109738.

Cooper, M. D. (2015) ‘The early history of B cells’, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 15(3), pp. 191–197. doi: 10.1038/nri3801.

- Correia, C. *et al.* (2015) 'BCL2 mutations are associated with increased risk of transformation and shortened survival in follicular lymphoma.', *Blood*. American Society of Hematology, 125(4), pp. 658–67. doi: 10.1182/blood-2014-04-571786.
- Cortizas, E. M. *et al.* (2016) 'UNG protects B cells from AID-induced telomere loss', *The Journal of Experimental Medicine*, 213(11), pp. 2459–2472. doi: 10.1084/jem.20160635.
- Cuajungco, M. P. *et al.* (2012) 'Abnormal accumulation of human transmembrane (TMEM)-176A and 176B proteins is associated with cancer pathology', *Acta Histochemica*, 114(7), pp. 705–712. doi: 10.1016/j.acthis.2011.12.006.
- Cui, B. *et al.* (2016) 'High-level ROR1 associates with accelerated disease progression in chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*. American Society of Hematology, 128(25), pp. 2931–2940. doi: 10.1182/blood-2016-04-712562.
- 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. 1840–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477712> (Accessed: 13 January 2015).
- Dedeoglu, F. *et al.* (2004) 'Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB.', *International immunology*, 16(3), pp. 395–404. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978013> (Accessed: 6 January 2015).
- Degan, M. *et al.* (2005) 'Activation-Induced Cytidine Deaminase and CD38 Expression in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia', *Clinical Lymphoma and Myeloma*, 6(3), pp. 251–252. doi: 10.1016/S1557-9190(11)70400-0.
- Dengler, H. S. *et al.* (2008) 'Distinct functions for the transcription factor Foxo1 at various stages of B cell differentiation', *Nature Immunology*, 9(12), pp. 1388–1398. doi: 10.1038/ni.1667.
- Dighiero, G. and Hamblin, T. J. (2008) 'Chronic lymphocytic leukaemia.', *Lancet*, 371(9617), pp. 1017–29. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60456-0.
- Döhner, H. *et al.* (2000) 'Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia.', *The New England journal of medicine*, 343(26), pp. 1910–6. doi: 10.1056/NEJM200012283432602.
- Dorsett, Y. *et al.* (2008) 'MicroRNA-155 Suppresses Activation-Induced Cytidine Deaminase-Mediated Myc-Igh Translocation', *Immunity*, 28(5), pp. 630–638. doi: 10.1016/j.immuni.2008.04.002.
- Fabbri, G. and Dalla-Favera, R. (2016) 'The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 16(3), pp. 145–162. doi: 10.1038/nrc.2016.8.
- Feldhahn, N. *et al.* (2007) 'Activation-induced cytidine deaminase acts as a mutator in BCR-ABL1-transformed acute lymphoblastic leukemia cells.', *The Journal of experimental medicine*, 204(5), pp. 1157–66. doi: 10.1084/jem.20062662.
- Gehring, J. S. *et al.* (2015) 'SomaticSignatures: inferring mutational signatures from single-nucleotide variants: Fig. 1.', *Bioinformatics*, 31(22), p. btv408. doi: 10.1093/bioinformatics/btv408.
- 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*. Taylor & Francis, 55(2), pp. 326–330. doi: 10.3109/10428194.2013.803225.
- Gonda, H. *et al.* (2003) ‘The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression.’, *The Journal of experimental medicine*, 198(9), pp. 1427–37. doi: 10.1084/jem.20030802.
- Gourzi, P., Leonova, T. and Papavasiliou, F. N. (2007) ‘Viral induction of AID is independent of the interferon and the Toll-like receptor signaling pathways but requires NF-kappaB.’, *The Journal of experimental medicine*, 204(2), pp. 259–65. doi: 10.1084/jem.20061801.
- Guikema, J. E. J. *et al.* (2005) ‘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*, 105(7), pp. 2997–2999. doi: 10.1182/blood-2004-09-3473.
- Hardianti, M. S. *et al.* (2005) ‘Presence of somatic hypermutation and activation-induced cytidine deaminase in acute lymphoblastic leukemia L2 with t(14;18)(q32;q21)’, *European Journal of Haematology*, 74(1), pp. 11–19. doi: 10.1111/j.1600-0609.2004.00338.x.
- Heintel, D. *et al.* (2004) ‘High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA is associated with unmutated IGVH gene status and unfavourable cytogenetic aberrations in patients with chronic lymphocytic leukaemia’, *Leukemia*, 18(4), pp. 756–762. doi: 10.1038/sj.leu.2403294.
- Herishanu, Y. *et al.* (2011) ‘The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia.’, *Blood*. American Society of Hematology, 117(2), pp. 563–74. doi: 10.1182/blood-2010-05-284984.
- Hibino, T. *et al.* (2013) ‘S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis.’, *Cancer research*, 73(1), pp. 172–83. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3843.
- Huemer, M. *et al.* (2014) ‘AID induces intraclonal diversity and genomic damage in CD86(+) chronic lymphocytic leukemia cells.’, *European journal of immunology*. Wiley-Blackwell, 44(12), pp. 3747–57. doi: 10.1002/eji.201344421.
- Hus, I. *et al.* (2013) ‘Th17/IL-17A Might Play a Protective Role in Chronic Lymphocytic Leukemia Immunity’, *PLoS ONE*. Edited by D. Unutmaz. Public Library of Science, 8(11), p. e78091. doi: 10.1371/journal.pone.0078091.
- Jain, M. *et al.* (2018) ‘Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads’, *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 36(4), pp. 338–345. doi: 10.1038/nbt.4060.
- Jiricny, J. (2013) ‘Postreplicative Mismatch Repair’, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), pp. a012633–a012633. doi: 10.1101/cshperspect.a012633.
- Kahlert, C. and Kalluri, R. (2013) ‘Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis.’, *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 91(4), pp. 431–7. doi: 10.1007/s00109-013-1020-6.
- Kalendar, R. *et al.* (2017) ‘FastPCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis’, *Genomics*. Academic Press, 109(3–4), pp. 312–319. doi: 10.1016/J.YGENO.2017.05.005.
- Kasar, S. *et al.* (2015) ‘Whole-genome sequencing reveals activation-induced cytidine deaminase signatures during indolent chronic lymphocytic leukaemia evolution’, *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 6, p. 8866. doi: 10.1038/ncomms9866.

- Kasar, S. and Brown, J. R. (2016) 'Mutational landscape and underlying mutational processes in chronic lymphocytic leukemia', *Molecular & Cellular Oncology*, 3(4), p. e1157667. doi: 10.1080/23723556.2016.1157667.
- Kil, L. P. *et al.* (2012) 'The role of B cell receptor stimulation in CLL pathogenesis.', *Current pharmaceutical design*, 18(23), pp. 3335–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22591389> (Accessed: 21 March 2018).
- Kim, Y.-S., Yoo, H. and Ko, J. (2009) 'Implication of Aberrant Glycosylation in Cancer and Use of Lectin for Cancer Biomarker Discovery', *Protein & Peptide Letters*, 16(5), pp. 499–507. doi: 10.2174/092986609788167798.
- Kipps, T. J. *et al.* (2017) 'Chronic lymphocytic leukaemia', *Nature Reviews Disease Primers*, 3(C11), p. 17008. doi: 10.1038/nrdp.2017.8.
- Klein, U. *et al.* (2006) 'Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination', *Nature Immunology*, 7(7), pp. 773–782. doi: 10.1038/ni1357.
- Klein, U. *et al.* (2010) 'The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia.', *Cancer cell*, 17(1), pp. 28–40. doi: 10.1016/j.ccr.2009.11.019.
- Koboldt, D. C. *et al.* (2012) 'VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing', *Genome Research*, 22(3), pp. 568–576. doi: 10.1101/gr.129684.111.
- Kondo, T. *et al.* (2004) 'Expression of POT1 is associated with tumor stage and telomere length in gastric carcinoma.', *Cancer research*, 64(2), pp. 523–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744765> (Accessed: 3 April 2018).
- Krokan, H. E. and Bjørås, M. (2013) 'Base excision repair.', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(4), p. a012583. doi: 10.1101/cshperspect.a012583.
- Küppers, R. and Dalla-Favera, R. (2001) 'Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 20(40), pp. 5580–5594. doi: 10.1038/sj.onc.1204640.
- Kwanhian, W. *et al.* (2012) 'MicroRNA-142 is mutated in about 20% of diffuse large B-cell lymphoma', *Cancer Medicine*. Wiley-Blackwell, 1(2), p. 141. doi: 10.1002/CAM4.29.
- Landau, D. A. *et al.* (2013) 'Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia.', *Cell*. Elsevier, 152(4), pp. 714–26. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.019.
- Landau, D. A. *et al.* (2015) 'Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse', *Nature*, 526(7574), pp. 525–530. doi: 10.1038/nature15395.
- Larrayoz, M. *et al.* (2017) 'Non-coding NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia; their clinical impact in the UK CLL4 trial', *Leukemia*. Nature Publishing Group, 31(2), pp. 510–514. doi: 10.1038/leu.2016.298.
- LeBien, T. W. and Tedder, T. F. (2008) 'B lymphocytes: how they develop and function.', *Blood*. American Society of Hematology, 112(5), pp. 1570–80. doi: 10.1182/blood-2008-02-078071.
- Leuenerger, 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*. Nature Publishing Group, 23(2), pp. 177–186. doi: 10.1038/modpathol.2009.156.
- Li, H. and Durbin, R. (2009) ‘Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform’, *Bioinformatics*, 25(14), pp. 1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324.
- Liao, W. *et al.* (2015) ‘Gene expression and splicing alterations analyzed by high throughput RNA sequencing of chronic lymphocytic leukemia specimens’, *BMC Cancer*, 15(1), p. 714. doi: 10.1186/s12885-015-1708-9.
- Liu, M. *et al.* (2008) ‘Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation’, *Nature*, 451(7180), pp. 841–845. doi: 10.1038/nature06547.
- Lorenzi, I. *et al.* (2018) ‘The mitochondrial TMEM177 associates with COX20 during COX2 biogenesis.’, *Biochimica et biophysica acta*, 1865(2), pp. 323–333. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.11.010.
- Ma, H. *et al.* (2014) ‘Reversal Effect of ST6GAL 1 on Multidrug Resistance in Human Leukemia by Regulating the PI3K/Akt Pathway and the Expression of P-gp and MRP1’, *PLoS ONE*. Edited by A. Rishi, 9(1), p. e85113. doi: 10.1371/journal.pone.0085113.
- Ma, J. *et al.* (2016) ‘Cadherin-12 enhances proliferation in colorectal cancer cells and increases progression by promoting EMT’, *Tumor Biology*, 37(7), pp. 9077–9088. doi: 10.1007/s13277-015-4555-z.
- Marantidou, F. *et al.* (2010) ‘Activation-induced cytidine deaminase splicing patterns in chronic lymphocytic leukemia’, *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 44(4), pp. 262–267. doi: 10.1016/j.bcmd.2009.12.005.
- Matoulkova, E. *et al.* (2012) ‘The role of the 3’ untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells’, *RNA Biology*, 9(5), pp. 563–576. doi: 10.4161/rna.20231.
- McKenna, A. *et al.* (2010) ‘The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data.’, *Genome research*, 20(9), pp. 1297–303. doi: 10.1101/gr.107524.110.
- Messina, M. *et al.* (2014) ‘Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia chemorefractoriness’, *Blood*, 123(15), pp. 2378–2388. doi: 10.1182/blood-2013-10-534271.
- Methot, S. P. *et al.* (2015) ‘Consecutive interactions with HSP90 and eEF1A underlie a functional maturation and storage pathway of AID in the cytoplasm.’, *The Journal of experimental medicine*. The Rockefeller University Press, 212(4), pp. 581–96. doi: 10.1084/jem.20141157.
- Methot, S. P. and Di Noia, J. M. (2017) *Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination*. 1st edn, *Advances in Immunology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.ai.2016.11.002.
- Miller, K. D. *et al.* (2016) ‘Cancer treatment and survivorship statistics, 2016’, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(4), pp. 271–289. doi: 10.3322/caac.21349.
- Moldovan, G.-L., Pfander, B. and Jentsch, S. (2007) ‘PCNA, the maestro of the replication fork.’, *Cell*. Elsevier, 129(4), pp. 665–79. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.003.
- Montamat-Sicotte, D. *et al.* (2013) ‘Origins and Consequences of AID Expression in Lymphoid Neoplasms’, *Current Immunology Reviews*, 9(2), pp. 72–85. doi: 10.2174/15733955113099990007.

- Mullighan, C. G. *et al.* (2009) 'Deletion of *IKZF1* and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 360(5), pp. 470–480. doi: 10.1056/NEJMoa0808253.
- 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> (Accessed: 6 March 2018).
- Muzio, M. *et al.* (2009) 'Expression and function of toll like receptors in chronic lymphocytic leukaemia cells.', *British journal of haematology*, 144(4), pp. 507–16. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07475.x.
- Neuberger, M. S. *et al.* (2005) 'Somatic hypermutation at A·T pairs: polymerase error versus dUTP incorporation', *Nature Reviews Immunology*, 5(2), pp. 171–178. doi: 10.1038/nri1553.
- Di Noia, J. M. and Neuberger, M. S. (2007) 'Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation.', *Annual review of biochemistry*, 76(1), pp. 1–22. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.061705.090740.
- 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. 4029–32. doi: 10.1182/blood-2002-10-3175.
- Oppezco, P. *et al.* (2005) 'Different isoforms of BSAP regulate expression of AID in normal and chronic lymphocytic leukemia B cells.', *Blood*, 105(6), pp. 2495–503. doi: 10.1182/blood-2004-09-3644.
- Orang, A. V., Safaralizadeh, R. and Kazemzadeh-Bavili, M. (2014) 'Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation', *International Journal of Genomics*, 2014(June 2013). doi: 10.1155/2014/970607.
- 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. doi: 10.1182/blood-2009-12-257758.
- Palacios, F. *et al.* (2015) 'Activation of the PI3K/AKT pathway by microRNA-22 results in CLL B-cell proliferation', *Leukemia*, 29(1), pp. 115–125. doi: 10.1038/leu.2014.158.
- Panayiotidis, P. *et al.* (1996) 'Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells *in vitro*', *British Journal of Haematology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 92(1), pp. 97–103. doi: 10.1046/j.1365-2141.1996.00305.x.
- Pasqualucci, L. *et al.* (2004) 'Expression of the AID protein in normal and neoplastic B cells.', *Blood*. American Society of Hematology, 104(10), pp. 3318–25. doi: 10.1182/blood-2004-04-1558.
- Pasqualucci, L. *et al.* (2006) 'PKA-mediated phosphorylation regulates the function of activation-induced deaminase (AID) in B cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(2), pp. 395–400. doi: 10.1073/pnas.0509969103.
- Patten, P. E. M. *et al.* (2008) 'CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment.', *Blood*. American Society of Hematology, 111(10), pp. 5173–81. doi: 10.1182/blood-2007-08-108605.



- 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*. American Society of Hematology, 120(24), pp. 4802–11. doi: 10.1182/blood-2012-08-449744.
- Pepper, C. *et al.* (2007) 'Highly purified CD38<sup>+</sup> and CD38<sup>-</sup> 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, pp. 687–696. doi: 10.1038/sj.leu.2404587.
- Puente, X. S. *et al.* (2011) 'Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia', *Nature*, 475(7354), pp. 101–105. doi: 10.1038/nature10113.
- Ramiro, A. R. *et al.* (2004) 'AID Is Required for c-myc/IgH Chromosome Translocations In Vivo', *Cell*, 118(4), pp. 431–438. doi: 10.1016/j.cell.2004.08.006.
- Ramsay, A. J. *et al.* (2013) 'POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia', *Nature Genetics*, 45(5), pp. 526–530. doi: 10.1038/ng.2584.
- Rebhandl, S. *et al.* (2014) 'Alternative splice variants of AID are not stoichiometrically present at the protein level in chronic lymphocytic leukemia', *European Journal of Immunology*, 44(7), pp. 2175–2187. doi: 10.1002/eji.201343853.
- Reiniger, L. *et al.* (2006) 'Richter's and prolymphocytic transformation of chronic lymphocytic leukemia are associated with high mRNA expression of activation-induced cytidine deaminase and aberrant somatic hypermutation.', *Leukemia*, 20(6), pp. 1089–95. doi: 10.1038/sj.leu.2404183.
- Revy, P. *et al.* (2000) 'Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2).', *Cell*, 102(5), pp. 565–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007475> (Accessed: 9 April 2018).
- Robinson, J. T. *et al.* (2011) 'Integrative genomics viewer', *Nature Biotechnology*, 29(1), pp. 24–26. doi: 10.1038/nbt.1754.
- de Rooij, M. F. M. *et al.* (2015) 'Ibrutinib and idelalisib synergistically target BCR-controlled adhesion in MCL and CLL: a rationale for combination therapy', *Blood*, 125(14), pp. 2306–2309. doi: 10.1182/blood-2014-12-619163.
- Sakuma, K., Aoki, M. and Kannagi, R. (2012) 'Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced epithelial-mesenchymal transition.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(20), pp. 7776–81. doi: 10.1073/pnas.1111135109.
- Shi, T.-Y. *et al.* (2015) 'CASP7 variants modify susceptibility to cervical cancer in Chinese women', *Scientific Reports*, 5(1), p. 9225. doi: 10.1038/srep09225.
- De Silva, N. S. and Klein, U. (2015) 'Dynamics of B cells in germinal centres', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 15(3), pp. 137–148. doi: 10.1038/nri3804.
- Spencer, J. and Dunn-Walters, D. K. (2005) 'Hypermutation at A-T Base Pairs: The A Nucleotide Replacement Spectrum Is Affected by Adjacent Nucleotides and There Is No Reverse Complementarity of Sequences Flanking Mutated A and T Nucleotides', *The Journal of Immunology*, 175(8), pp. 5170–5177. doi: 10.4049/jimmunol.175.8.5170.
- Taylor, B. J. M., Wu, Y. L. and Rada, C. (2014) 'Active RNAP pre-initiation sites are highly

mutated by cytidine deaminases in yeast, with AID targeting small RNA genes.’, *eLife*. eLife Sciences Publications, Ltd, 3, p. e03553. doi: 10.7554/eLife.03553.

Uchimura, Y. *et al.* (2011) ‘REG- $\gamma$  associates with and modulates the abundance of nuclear activation-induced deaminase.’, *The Journal of experimental medicine*. Rockefeller University Press, 208(12), pp. 2385–91. doi: 10.1084/jem.20110856.

Vaisitti, T. *et al.* (2015) ‘The enzymatic activities of CD38 enhance CLL growth and trafficking: implications for therapeutic targeting’, *Leukemia*, 29(2), pp. 356–368. doi: 10.1038/leu.2014.207.

Vazquez-Tello, A. *et al.* (2012) ‘IL-17A and IL-17F Expression in B Lymphocytes’, *International Archives of Allergy and Immunology*, 157(4), pp. 406–416. doi: 10.1159/000329527.

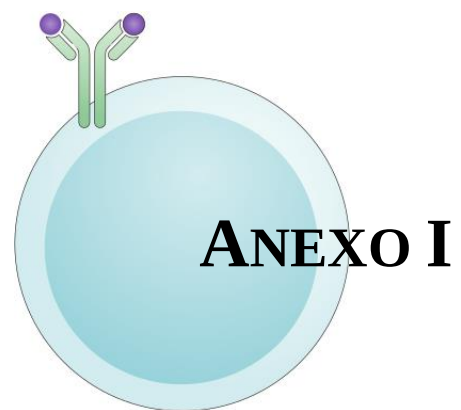
de Villartay, J.-P., Fischer, A. and Durandy, A. (2003) ‘The mechanisms of immune diversification and their disorders’, *Nature Reviews Immunology*, 3(12), pp. 962–972. doi: 10.1038/nri1247.

Wang, L. *et al.* (2016) ‘Transcriptomic Characterization of SF3B1 Mutation Reveals Its Pleiotropic Effects in Chronic Lymphocytic Leukemia’, *Cancer Cell*, 30(5), pp. 750–763. doi: 10.1016/j.ccell.2016.10.005.

Winkler, D. *et al.* (2005) ‘Protein expression analysis of chromosome 12 candidate genes in chronic lymphocytic leukemia (CLL)’, *Leukemia*, 19(7), pp. 1211–1215. doi: 10.1038/sj.leu.2403778.

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*. Nature Publishing Group, 12(1), pp. 62–69. doi: 10.1038/ni.1964.

de Yébenes, V. G. *et al.* (2008) ‘miR-181b negatively regulates activation-induced cytidine deaminase in B cells.’, *The Journal of experimental medicine*. The Rockefeller University Press, 205(10), pp. 2199–206. doi: 10.1084/jem.20080579.



---

# The Antigen Receptor as a Driver of B-Cell Lymphoma

## Development and Evolution

---

Julieta Sepulveda, Noé Seija, Pablo Opezzo and

Marcelo A. Navarrete

Additional information is available at the end of the chapter

---

Author Queries	
<b>[AQ1]</b>	Please reword the caption of Fig. 1 without color words as readers of print will only see black and white figures.
<b>[AQ2]</b>	Please provide the reference “Sepulveda J., manuscript in preparation” in the list and cite it in the text, or delete it from the text.
<b>[AQ3]</b>	Please provide partlabels A–C in Figure 2 artwork as they were mentioned in the caption.
<b>[AQ4]</b>	Please check the sentence “A finding that has...” for clarity.
<b>[AQ5]</b>	Please provide the volume, issue, and page range in Refs. [32, 35, and 36].
<b>[AQ6]</b>	Please check the author and initials in Ref. [45].
<b>[AQ7]</b>	Please provide the issue and page range in Ref. [98].
<b>[AQ8]</b>	Please provide the page range in Ref. [112].
<b>[AQ9]</b>	Kindly provide text citation for Table 2.

06

## Abstract

07

The expression of a functional antigen receptor is necessary for cell survival of normal B lymphocytes and most B-cell neoplasms alike. When the genetic modifications of the B-cell receptor locus fail to produce a functional antigen receptor or result in deleterious mutations of a previously expressed receptor, the affected B cell will undergo apoptosis. The three physiological mechanisms that generate the B-cell receptor, VDJ recombination, somatic hypermutation, and class switch recombination, can induce double-strand DNA breaks and can specifically contribute to lymphomagenesis. On the other hand, the B-cell receptor activation and signaling pathways, which provide strong survival and proliferation signals to normal B cells, can support the growth and evolution of malignant lymphocytes. As a result, an otherwise structurally normal B-cell receptor can behave, from the functional perspective, as a true oncogene. In this chapter, we provide an in-depth discussion of the most recently discovered recurrent mechanisms involving the B-cell receptor in lymphoma pathogenesis. The discussion is structured around two major topics: (1) the genetic mechanisms that create a functional antigen receptor and their errors leading to oncogenic events, and (2) the pathogenic activation of the B-cell receptor signaling cascade. Finally, we will briefly comment on novel emerging therapies targeting the B-cell receptor at different levels.

08

09

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

**Keywords:** lymphoma, B-cell receptor, activation-induced deaminase (AID), somatic hypermutation, class switch recombination, lymphomagenesis, pathogenesis, oncogenesis

23

---

## 1. Introduction

26

27

28

The immune system has evolved with the primary purpose of eliminating or at least controlling invading pathogens. In contrast to innate immunity, the adaptive immune system relies

01 for this task on recognition of the pathogen through antigen-specific receptors. In the case of  
02 B cells, these receptors are membrane-bound or soluble immunoglobulins that engage soluble  
03 or surface-bound antigens.

04 Hallmarks of the adaptive immune system related to the B-cell receptor are: (1) continu-  
05 ous presence of an extremely broad repertoire of antigen receptors; (2) rapid activation and  
06 expansion of cells whose particular receptors recognize a given antigen, and (3) maintenance  
07 of a memory of every immune response that has taken place in order to react even more effi-  
08 ciously upon re-exposure to the evoking antigen [1].

09 The immune system has, therefore, developed unique molecular mechanisms to generate vir-  
10 tually unlimited numbers of antigen receptors with different specificities. These mechanisms  
11 are V, D, and J recombination of immunoglobulin gene segments, class switch recombination,  
12 and somatic hypermutation (SHM). Since these events involve genome editing, they entail  
13 intrinsic oncogenic risk [2].

14 The expression of a functional B-cell receptor (BCR) on the cell surface after successful com-  
15 pletion of VDJ recombination distinguishes precursor from mature B cells, and correspond-  
16 ingly precursor cell from mature B-cell lymphomas.

17 Upon antigen recognition, B cells can undergo antibody affinity maturation through SHM,  
18 a genetic mechanism that permits antibody diversification. SHM is mediated by activation-  
19 induced deaminase (AID), an enzyme physiologically expressed in the germinal center. AID  
20 converts C:G base pairs in immunoglobulin genes into U:G mismatches. Repair of these muta-  
21 tions creates almost random point mutations [2–4].

22 Signals generated by the BCR govern the development, function, and survival of normal B  
23 cells. However, its ability to efficiently activate anti-apoptotic and proliferation pathways can  
24 be adopted by malignant B-cell, and even become essential for their survival [5].

25 In the current chapter, the discussion is structured around two major pathogenic mecha-  
26 nisms: (1) genetic mechanisms that create a functional antigen receptor and their errors  
27 leading to oncogenic events, and (2) pathogenic activation of the B-cell receptor signaling  
28 cascade.

## 29 **2. Major B-cell receptor–related lymphomagenic mechanisms**

### 30 **2.1. Genetic mechanisms that create a functional antigen receptor and their errors** 31 **leading to oncogenic events**

32 Three unique genetic mechanisms operate sequentially in various stages of B-cell develop-  
33 ment to generate a functional antigen receptor: VDJ recombination, class switch recombi-  
34 nation (CSR), and somatic hypermutation (SHM). Errors during these events may lead to  
35 lymphomagenesis.

01 2.1.1. *V(D)J recombination*

02 In the germ line DNA configuration, the antigen receptor gene loci contain discontinuous, non-  
03 functional V, D, and J segments. Committed B lymphocyte precursor cells create functional  
04 immunoglobulin heavy and light chain genes through VDJ recombination and VJ recombina-  
05 tion, respectively [6]. The V(D)J recombination starts at the pro-B cell stage by activation of  
06 recombination-activating genes (RAG) 1 and 2. The first step is the DJ joining in the IgH locus  
07 followed by the joining of V segments to DJ, resulting in the rearrangement of the  $\mu$ -chain  
08 ( $\mu$ H). The  $\mu$ H paired with a surrogate light chain (SLC) is expressed on the cell membrane as  
09 a part of a structure known as pre-B-cell receptor.

10 In pre-B cells, RAG1/2 expression results in the recombination of the kappa light chain. A suc-  
11 cessful rearrangement will induce RAG downregulation; otherwise, RAG will start a second  
12 rearrangement of the light chain [7].

13 During V(D)J recombination, a successful rearrangement of the heavy chain will suppress  
14 the rearrangement of the second allele, a process known as allelic exclusion. In the case of  
15 Ig-Kappa chains, if neither of both alleles generates a productive receptor the process will  
16 continue with the rearrangement of the Ig-Lambda locus [8].

17 V(D)J recombination can be divided into two phases: the cleavage phase and the joining phase.  
18 In the cleavage phase, RAG1/2 creates double-strand breaks (DSB) at recombination signal  
19 sequences (RSS), which are located at the start of each antigen receptor gene segment. RSS  
20 is composed by a heptamer, a spacer sequence (12–23 nucleotides) and a nonamer sequence.  
21 RAG acts on RSS by introducing a nick between the coding sequence and the heptamer [9]. At  
22 each of the two remaining ends, called the coding ends, the two strands of DNA are joined to  
23 form a hairpin structure. The Artemis nuclease nicks the hairpin, whose ends are then joined  
24 by non-homologous end joining (NHEJ) [10]. The recombination process activates the DNA  
25 damage response (DDR), a system that detects any signal of DNA damage. The action of DDR  
26 may result in DNA repair or induction of apoptosis [11].

27 2.1.2. *Class switch recombination*

28 Class switch recombination (CSR) is a process that replaces the default  $C\mu$  exons with exons  
29 from a downstream constant chain ( $C\alpha$ ,  $C\epsilon$ , or  $C\gamma$ ), resulting in a change from IgM expressed  
30 by naïve B cells to expression of one of the downstream isotypes IgA, IgG, IgE.

31 CSR occurs by intrachromosomal deletion and recombination events between two different  
32 switch (S) regions localized upstream of each constant region in the IgH locus. S regions are  
33 GC-rich with a high frequency of the WGCW (A/T-G-G-A/T) motif, which is a target of acti-  
34 vation-induced deaminase (AID) activity. CSR has two phases: (1) the break at the donor and  
35 acceptor S regions, and (2) the ligation process between distal breaks [12].

36 The recombination is initiated by AID, an enzyme that deaminates cytosines into uracil at the  
37 donor and acceptor S regions. Subsequently, the base excision repair (BER) pathway creates a  
38 single strand break (SSB) that is processed to double strand breaks (DSB) by mismatch repair

01 (MMR). After the formation of DSBs in the S regions (donor and acceptor), these S regions are  
02 recombined by non-homologous end joining (NHEJ) [13].

03 During normal B-cell development, the DNA repair pathways (BER and MMR) reduce the  
04 effect of off-target AID activity. However, several external factors like cellular stress, hypoxia,  
05 and viral infections; or intrinsic factors such as alterations in repair pathways may change the  
06 outcome of AID-induced lesions [14].

### 07 *2.1.3. V(D)J recombination, class switch recombination, and neoplastic transformation*

08 One evident deviation of the normal V(D)J recombination and CSR processes is the possi-  
09 bility of rearrangements between segments belonging to different genes. In fact, reciprocal  
10 chromosomal translocations are the most common recurrent genetic anomalies in lymphoid  
11 malignancies and the newly formed junctions generated in most human lymphoid transloca-  
12 tions have the canonical features of NHEJ [15].

13 One paradigmatic example is follicular (FL), a lymphoid neoplasm characterized by the  
14 t(14;18)(q32;q21) translocation that juxtaposes the anti-apoptotic proto-oncogene BCL2 to the  
15 immunoglobulin heavy chain locus [16]. The functional result of this translocation is consti-  
16 tutive transcriptional upregulation of BCL2. Although this translocation is considered the  
17 founding event in FL pathogenesis, t(14;18)-positive B cells can be detected in many healthy  
18 individuals [17]. Therefore, this genetic event alone seems insufficient to cause lymphoma.

19 The t(11;14)(q13;q32) translocation, a hallmark of mantle cell lymphoma (MCL), results in the  
20 overexpression of cyclin D1 and also appears to be a V(D)J-mediated translocation [18]. As  
21 in FL, the sole constitutive overexpression of this cell cycle regulator is insufficient to explain  
22 malignant transformation.

23 Whereas the t(14;18) or t(11;14) translocations result from a mistake during V(D)J recom-  
24 bination, some translocations involve the IgH class switch regions in a failed CSR event.  
25 Translocations at the IgH class switch regions seem to depend on AID activity and commonly  
26 involve c-MYC and BCL-6 [19]. BCL6 is the most commonly rearranged gene in activated  
27 B cell (ABC) diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and c-MYC rearrangements can be  
28 observed in Burkitt lymphoma (BL) and DLBCL.

29 BCL6 is a proto-oncogene encoding a transcriptional repressor expressed during B cell differen-  
30 tiation in germinal centers. A block in the normal downregulation of BCL6, through its translo-  
31 cation with more than 20 possible partner genes, might favor differentiation arrest, continuous  
32 cell proliferation, survival, and genetic instability [20]. BCL6 also suppresses the activity of the  
33 tumor suppressor gene TP53, which allows BCL6-expressing cells to escape apoptosis [21].

34 The c-MYC gene at 8q24 is involved in three translocations observed in DLBCL, most com-  
35 monly t(8;14) (q24;q32), and less often t(2;8) (p12;q24) and t(8;22) (q24;q11) [21]. In the t(8;14)  
36 (q24;q32) translocation, also observed in BL, the gene segments from the IgH locus are joined  
37 with various regions around and within the c-MYC proto-oncogene [22]. As a result, IgH  
38 regulatory elements are misplaced upstream, of the c-MYC proto-oncogene [23].



01 Four recurrent translocations, t(1;14)(p22;q32), t(3;14)(p14.1;q32), t(11;18)(q21;q21), and  
02 t(14;18)(q32;q21), have been described in marginal zone B-cell lymphomas of MALT type.  
03 The two latter translocations involve the MALT1 gene. These translocations seem to occur as  
04 a result of illegitimate V(D)J-mediated recombination [22, 24].

#### 05 2.1.4. Somatic hypermutation (SHM)

06 Somatic hypermutation (SHM) is the biological underlying mechanism for the generation of  
07 the secondary antibody repertoire. AID is the single enzyme that is responsible for the initia-  
08 tion of this process [25].

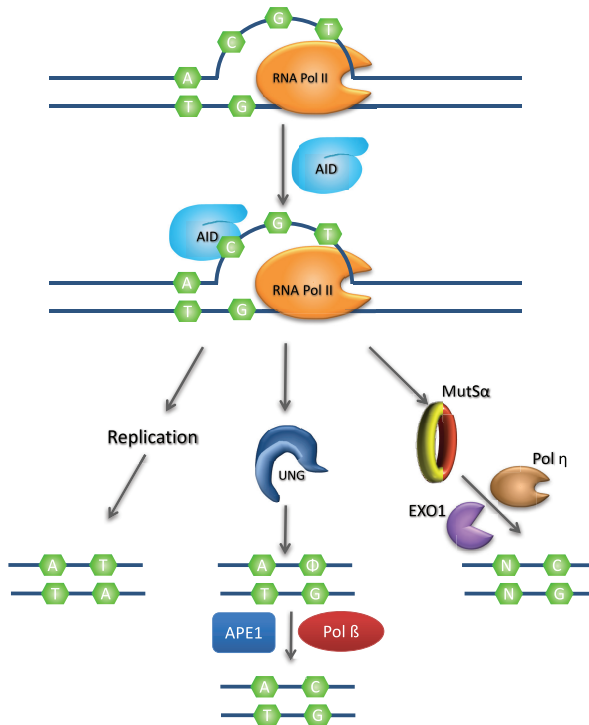
09 SHM is a post-rearrangement diversification process that introduces point mutations in the  
10 variable regions of the Ig loci, which can alter the antibody binding to its cognate antigen.  
11 AID acts enzymatically as a cytosine deaminase that converts cytosine to uracil. Uracil is  
12 mutagenic when paired with guanosine, this U:G mismatch triggers error-prone DNA repair  
13 in B cells. SHM results in a mutation rate of circa 1 mutation/1000 bp per cell generation.  
14 This mutation frequency is a million-fold higher than spontaneous mutation rate in somatic  
15 cells [26]. Highly selected antibodies with neutralizing activity against influenza virus can  
16 accumulate 30–40 mutations, and broadly neutralizing antibodies against HIV more than 100  
17 mutations [27, 28].

18 AID acts on a single strand, thus its activity is probably generated during at transcription  
19 bubbles (**Figure 1**). Once AID produced deamination of dC to dU the error-prone process-  
20 ing begins. First AID-catalyzed uracils in the DNA are recognized by either the uracil-DNA  
21 glycosylase (UNG)—triggering the base excision repair (BER) pathway—or by the mismatch  
22 recognition heterodimer MutS $\alpha$ —initiating the mismatch repair (MMR) pathway. In BER,  
23 UNG binds to the U:G mispair and produces an abasic site, then this site is cleaved by the apu-  
24 rinic/apyrimidinic endonuclease (APE1), which removes the abasic site nucleotide and the  
25 DNA polymerase Pol $\beta$  resynthesizes the DNA strand [29]. In the MMR pathway, the proteins  
26 MSH2 and MSH6 bind to the U:G mismatch and recruit DNA Pol $\eta$ , a low fidelity polymerase,  
27 that introduces error during nucleotide synthesis [30].

28 The processing of uracils by BER and MMR may result in different outcomes. The introduced  
29 uracils may (1) be replaced by another nucleotide, (2) expose DNA to further mutations in its  
30 vicinity like mutations at A:T pairs or (3) can be converted into DNA DSBs. The latter seems  
31 to be necessary for CSR.

32 Because of its mutagenic potential, SHM has multiple layers of regulation and competition  
33 between alternative pathways that define the level of SHM [31]. There is also increasing evi-  
34 dence that epigenetic factors, such as DNA methylation and post-translational histone modi-  
35 fications play major roles in regulating SHM [32]. Its implications in lymphoma development  
36 remain elusive.

37 When SHM affect off-target genes, it is referred to as aberrant SHM. Aberrant SHM can be  
38 mainly detected in FL, BL, DLBCL, and CLL [33–35]. This topic has been extensively reviewed  
39 elsewhere [36–39].



01 **Figure 1. Molecular mechanism of somatic hypermutation (SHM).** AID (light blue shape) requires a single strand to  
 02 **initiates the SHM process.** Transcription by RNA polymerase II (RNA Pol II, orange oval) exposes the single-stranded  
 03 **DNA template for AID.** AID deaminates a cytosine to create a uracil (indicated in red), which can then be processed in  
 04 **different ways.** Replication over the uracil results in C to T or G to A transition mutations. Processing by uracil DNA  
 05 **glycosylase (UNG, blue shape) generates an abasic site (Φ) that is cleaved by the apurinic/apyrimidinic endonuclease**  
 06 **(APE1), which removes this site and then Polβ resynthesizes the DNA.** Recognition of the U-G mismatch by MutSα  
 (yellow and red torus) followed by the action of Exo1 (purple shape) and Polη (brown oval) spreads mutations (indicated  
 as “N”) to surrounding A-T nucleotides. UNG and Msh2/Msh6 can also act in the context of high fidelity base excision  
 repair (BER) and mismatch repair (MMR) pathways, which results in error-free repair.

AQ1

02 We have recently described that, in IgM expressing FL, the mutation load of the Ig genes can  
 03 be described as a function of the AID expression level. In contrast, in FL cases that underwent  
 04 class switch recombination (i.e., IgG expressing lymphomas) AID expression and SHM of  
 05 immunoglobulin genes are dissociated [40, 41]. The distinctive patterns induced by SHM may  
 06 also have implications for the clinical evolution of the disease [42].

01 AID expression is detected in a tumor subset in the peripheral blood of CLL patients [43, 44].  
 02 These cases display the dissociation between CSR and SHM, an observation that resembles  
 03 our findings in FL. Our data also suggest that functional AID expression in CLL correlates  
 04 with a distinctive genomic landscape and disease evolution [45].

05 Analysis of whole genome and whole exome sequencing data classified by the trinucleotide  
 06 context of single nucleotide variants in so-called mutation signatures can help to elucidate  
 07 underlying mutagenic mechanisms in tumor samples [46]. Our data indicate that the muta-  
 08 tional landscape of both CLL and FL seems to be strongly shaped by AID activity. In FL,  
 09 AID-induced mutations are mainly restricted to canonical AID hotspots and CpG methyla-  
 10 tion-dependent mutagenesis sites. In strong contrast, both canonical and non-canonical AID  
 11 motifs seem to contribute to the mutational landscape of CLL (Sepulveda J, manuscript in  
 12 preparation).

AQ2

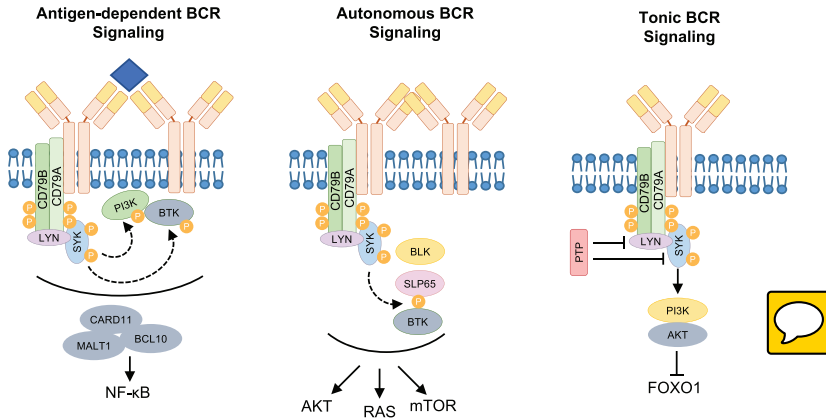
13 SHM may not only contribute to lymphomagenesis by acting on oncogenes and proto-onco-  
 14 genes, but also may provide adaptive advantages. As suggested by our data, BCR editing  
 15 through SHM may allow FL cells to escape from immunosurveillance [47–49].

## 16 2.2. Pathogenic activation of the B-cell receptor signaling cascade

17 Antibody molecules, when expressed on the cell surface, constitute the binding moiety of a  
 18 molecular complex known as B-cell antigen receptor (BCR). Signals from the BCR regulate  
 19 the development and function of B cells. However, the ability of the BCR signaling pathway  
 20 to induce cell survival and proliferation could be adopted and distorted by malignant cells.

21 The BCR immunoglobulin consists of a heavy chain and a light chain, whereas its precur-  
 22 sor, the pre-BCR, consists of a heavy chain and a surrogate light chain. The transmembrane  
 23 domain of the heavy chains anchors the BCR to the cell membrane, where each BCR molecule  
 24 associates with the signaling subunit. The signaling subunit is constituted by a heterodimer  
 25 of Ig $\alpha$  (CD79A) and Ig $\beta$  (CD79B) [50]. Within their cytoplasmic tails, Ig $\alpha$  and Ig $\beta$  harbor 2  
 26 conserved tyrosine residues as part of a 26 amino acid-long sequence, also referred to as  
 27 an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) [51]. Phosphorylation of ITAM  
 28 through kinases, such as Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase (LYN), B-lymphoid  
 29 kinase (BLK), or spleen tyrosine kinase (SYK), marks the first step in signal transduction from  
 30 the BCR to the nucleus [52]. SYK in conjunction with PI3K recruits Burton's tyrosine kinase  
 31 (BTK). Upon activation of the BCR pathway, BTK binds to PIP3 and attaches to the plasma  
 32 membrane [53]. These events contribute to BCR-induced calcium release, cell proliferation,  
 33 and activation of the NF- $\kappa$ B pathway (Figure 2A) [54].

34 In pre-B cells, the BCR signaling cascade is activated through autonomous signaling, a mech-  
 35 anism that relies on the structural conformation of the pre-BCR which is constituted by a  
 36 heavy chain and a surrogate light chain [55, 56]. While pre-B cells rely on autonomous BCR  
 37 signaling, immature and mature B-cells receive two types of signals from their BCRs: the  
 38 antigen-dependent, and the antigen-independent "tonic" signals. The antigen-dependent sig-  
 39 nal is generated by binding of an external antigen to the BCR and results in the clustering and



01 **Figure 2.** BCR signals generated in malignant and normal B cells. (A) Tonic signaling: random and transient disruptions in the equilibrium between positive regulators of BCR signaling, such as the CD79a/CD79b heterodimer, LYN and SYK, and negative regulators, such as the various phosphatases (PTP), could generate a tonic antigen-independent BCR signal characterized by increased activity of the PI3K/AKT pathway. (B) Aggregation of neighboring BCRs in polyreactive receptors initiates a cell-autonomous BCR signal in the absence of an external antigen. (C) The binding of the cognate antigen induces aggregation of neighboring BCRs that initiate the classical antigen-dependent BCR signal (see text for details).

AQ3

02 activation of a signaling complex that transmits the signal inside the cell. In contrast, the tonic  
03 signal occurs in the absence of external ligands (**Figure 2**) [57, 58].

04 Current evidence indicates that all three, tonic, autonomous, as well as antigen-dependent  
05 BCR signaling, are used by different B-cell lymphoid neoplasms. Activation may occur  
06 through physiological mechanisms such as antigen interaction or by pathological mecha-  
07 nisms such as mutations in genes acting downstream the signaling cascade. The relative con-  
08 tribution of these types of signals varies across different B-cell neoplasms and is currently  
09 subject to debate.

10 *2.2.1. Antigen-driven BCR activation and lymphomagenesis*

11 The hypothesis that antigenic stimulation can contribute to the development of B-cell malig-  
12 nancies was proposed over half a century ago [59]. There is growing indirect and direct evi-  
13 dence suggesting that antigen recognition may have a role in the pathogenesis of chronic  
14 lymphocytic leukemia (CLL), follicular lymphoma (FL), marginal zone lymphoma (MZL) of  
15 the spleen, and MZL of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type.

16 Indirect evidence for the role of antigen stimulation includes the association between certain  
17 lymphoma subtypes and specific infections and autoimmune diseases, as well as the iden-  
18 tification of an antigen selection footprint in the BCR; i.e., a bias in gene usage and positive

01 selection of somatic mutations in the complementarity determining regions [40, 42, 49, 60, 61].  
02 More direct evidence for the role of antigen stimulation and BCR activation in lymphomagen-  
03 esis is based on the identification of BCR reactivity toward foreign or auto-antigens, and the  
04 induction of intracellular BCR signaling in primary lymphoma cells in response to specific  
05 antigens [62–64].

06 Although several bacterial and viral infections have been associated with the development  
07 different lymphoma types, direct demonstration of lymphoma development due to infectious  
08 agent-derived antigenic stimulation remains limited.

09 *Helicobacter pylori* infection is associated with gastric MZL of MALT-type. This association  
10 relies on epidemiological, biological, molecular, and clinical data [41, 65–69]. Indeed, since the  
11 initial evidence of the association between *H. pylori* infection with the development of gastric  
12 MALT lymphoma [66], *H. pylori* eradication has established as the first-line therapy for this  
13 lymphoma [70, 71]. It has been demonstrated that MALT lymphoma B cells exhibit polyre-  
14 active surface BCR immunoglobulins. Direct stimulation by specific alloantigens (including  
15 *H. pylori* sonicate) and autoantigens recognized by these surface antibodies leads to the pro-  
16 liferation of tumor cells [72]. *H. pylori* infection may also induce aberrant AID expression fol-  
17 lowed by accumulation of mutations in tumor-related genes, suggesting a link between BCR  
18 activation and AID expression [73]. Nevertheless, a direct link to the activation of the BCR  
19 signaling pathway remains elusive.

20 *Chlamydia psittaci* infection is associated with ocular adnexal extranodal marginal zone lym-  
21 phomas (OAEMZLs) [74]. These neoplasms express a biased repertoire of mutated surface  
22 immunoglobulins suggesting, which suggests that antigen receptors have been subject to  
23 clonal selection. In OAEMZL patients, local monocytes and macrophages are the carriers of  
24 *Chlamydia psittaci*, and lymphomas seem to preferentially arise in organs primarily exposed  
25 to antigens [75].

26 Certain lymphomas, such as splenic marginal zone lymphoma (SMZL), are associated with  
27 *hepatitis C virus* (HCV) infection. Current evidence suggests that a subset of HCV-associated  
28 lymphomas originate from B cells that were initially activated by the HCV-E2 protein, sug-  
29 gesting that this subgroup of lymphomas arise as an expansion of HCV-reactive B cells [76].  
30 Consistently, antiviral treatment results in complete responses in about 75% of HCV positive  
31 lymphoma patients, whereas no responses are seen in HCV negative patients [77]. Altogether,  
32 this data suggest that antigen-dependent BCR activation may be the driver of lymphomagen-  
33 esis for some SMZL cases; and removal of the antigen can lead to clinical remission in these  
34 patients.

35 Several viral, bacterial, and fungal antigens may bind specific BCRs on chronic lymphocytic  
36 leukemia (CLL) cells [78–80]. Moreover, CLL cells in the lymph node contain increased levels  
37 of activated SYK and express genes upregulated in response to BCR activation [81]. In addi-  
38 tion, the observation of a reversible down-modulation of surface IgM expression on CLL cells  
39 also supports the idea of chronic antigen stimulation [82].

40 In follicular lymphoma (FL), the BCR is characterized by abnormal N-linked glycosylation.  
41 The mannosylated variable regions of FL immunoglobulins bind to recombinant lectin

01 domains of the mannose receptor and dendritic-cell-specific intercellular adhesion molecule-  
 02 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), which results in stimulation of FL cells [83]. It has also  
 03 been demonstrated that V-region mannosylation conferred the ability of B cells to be activated  
 04 by soluble bacterial lectins from common opportunistic pathogens such as *Pseudomonas aeru-*  
 05 *ginosa* or *Burkholderia cenocepacia* while disrupting the initial receptor specificity for potential  
 06 autoantigens [63].

07 The source of the antigen is not necessarily derived from an external pathogen as it has also  
 08 been shown to derive from self-antigens. CLL BCRs can react with many different self-anti-  
 09 gens, including antigens released by apoptotic cells [84, 85]. In addition, BCR derived from  
 10 CLL patients can bind to a conserved epitope within the second framework region (FR2) of  
 11 their own BCR [86]. About 26% of FL cases recognize autoantigens, and the interaction with  
 12 certain self-antigens such as myoferlin can induce BCR-mediated signaling *in vitro* [64]. It  
 13 has also been demonstrated that interaction of the BCR of ABC DLBCL with a self-antigen is  
 14 essential for the survival of these lymphoma cells. This interaction may explain the microclu-  
 15 sters observed in the plasma membrane of ABC DLBCL cells [5, 87].

#### 16 2.2.2. Tonic B-cell receptor signaling and lymphomagenesis

17 The tonic B-cell receptor signaling (BCR) is thought to provide an antigen-independent con-  
 18 stitutive baseline signal essential for B cell survival and development [57, 88]. Although the  
 19 detailed molecular mechanisms regulating tonic signaling remain to be defined, current evi-  
 20 dence highlights the central role of the SYK tyrosine kinase and the balance between BCR-  
 21 associated SYK activation and protein tyrosine phosphatase (PTP)-mediated SYK inhibition  
 22 [52, 89]. The tonic signaling transmitted via SYK appears to activate the phosphatidylinositol  
 23 3-kinase (PI3K)/AKT/mTOR pathway [90]. The inhibition of the tonic BCR signal results in  
 24 increased activation of FOXO1 and increased expression of its target genes, including the pro-  
 25 apoptotic BCL2 family member, BCL2L11, and the cell-cycle inhibitor p27 [91].

26 Evidence about the use of tonic antigen-independent type of BCR signaling by malignant B  
 27 cells is reported for Burkitt lymphoma (BL) and germinal center B diffuse large B-cell lym-  
 28 phoma (GCB-DLBCL) [92, 93].

29 In BL, PI3K signals promote the survival and proliferation of BL cells [94]. One study dem-  
 30 onstrated by quantitative phosphoproteomics, in which phosphorylation events in tonic BCR  
 31 signaling differ from those induced by BCR engagement in BL cells [95].

32 In DLBCL, BCR signaling differs between the germinal center B-cell (GCB) subtype, which is  
 33 insensitive to Bruton's tyrosine kinase inhibition by ibrutinib, and the activated B-cell (ABC)  
 34 subtype [96]. As recently reported, the replacement of antigen-binding regions of the BCR has  
 35 no effect on BCR signaling in GCB-DLBCL cell lines, which supports the hypothesis of the  
 36 use of tonic BCR signaling by this DLBCL subtype [93]. Unlike antigen-driven BCR signaling,  
 37 tonic BCR signaling requires specific phosphorylation of CD79A. A finding that has implica-  
 38 tions for targeted therapy of DLBCL [93].

AQ4

01 *2.2.3. Autonomous signaling and lymphomagenesis*

02 Autonomous antigen-independent, BCR signaling is a survival mechanism characteristic of  
03 the pre-B-cell receptor [56, 97]. However, immature and mature B cells with BCRs, that recog-  
04 nize multiple self-antigens, may also induce autonomous signaling and selective expansion  
05 of B cell in a manner comparable to the pre-BCR [55]. This functional similarity between auto-  
06 reactive BCRs and the pre-BCR suggests that recognition of self-antigens might not only play  
07 a role in the positive selection of early B cells, but also could contribute to lymphomagenesis  
08 [86, 98–100].

09 Autonomous signaling has been proposed as a novel oncogenic mechanism in chronic  
10 lymphocytic leukemia (CLL) and diffuses large B-cell lymphoma (DLBCL) [86, 99, 100].  
11 BCR, derived from both mutated and unmutated CLL cases, expressed in a cellular system  
12 designed to measure BCR signaling cascade activation, show signaling properties that are  
13 equivalent to those of the pre-BCR [86]. This striking signaling property is dependent on the  
14 antigen-binding site of the clonal BCR and an internal motif in framework region 2, a part of  
15 the structural BCR backbone [101].

16 The gene expression profile of activated B-cell (ABC) type of DLBCL resembles that of mature  
17 B cells upon stimulation via their B-cell receptor (BCR). In up to 30% of ABC DLBCL cases,  
18 this signature can be explained by gain-of-function mutations in CD79A, CD79B, or CARD11  
19 [102]. However, in patients without CARD11 mutations activation of the BCR may occur  
20 through autonomous signaling. We have recently demonstrated the presence of autonomous  
21 BCR activity in 72% of non-GCB DLBCL, including primary mediastinal DLBCL [99, 100].  
22 This finding may provide a complementary or alternative explanation to the characteristic  
23 gene expression signature of ABC DLBCL.

24 These findings in CLL and DLBCL support the concept of the BCR acting as a true oncogene,  
25 despite being structurally normal and solely characterized by this autonomous signaling  
26 property.

27 *2.2.4. Mutations in the BCR signaling cascade*

28 In addition to the natural activation, BCR signaling can be induced by acquired mutations.

29 Different ABC DLBCL cases carry diverse activating mutations in the BCR pathway (**Table 1**).  
30 Mutations of a critical tyrosine residue in the ITAM of CD79B increase the signaling response  
31 by interfering with activation of LYN. In this subset of ABC DLBCL cells, PI3K and BTK sig-  
32 naling remain essential for NF- $\kappa$ B activation [103]. About 10% of ABC DBCL cases show acti-  
33 vating mutations of CARD11, a key protein that connects BCR activation to NF- $\kappa$ B signaling.  
34 This mutation is sufficient to intrinsically activate survival signaling in the malignant B cells  
35 and obviates the need for upstream BCR signaling [102]. Loss of function mutations in the  
36 tumor suppressor A20 contributes to NF- $\kappa$ B pro-survival signaling have also been described  
37 in ABC DLBCL and CLL cases [104, 105].

	Errors in VDJ recombination	Errors in class switch recombination	Resulting event
Mantle cell lymphoma	t(11;14)(q13;q32)		Cyclin D1 overexpression
Follicular lymphoma	t(14;18)(q32;q21)		BCL2 overexpression
Marginal zone lymphoma of MALT type	t(11;18)(q21;q21), t(14;18)(q32;q21)		MALT1 dysregulation
GCB-diffuse large B-cell lymphoma		t(8;14)(q24;q32), t(2;8)(p12;q24), t(8;22)(q24;q11)	c-MYC overexpression
ABC-diffuse large B-cell lymphoma		BCL6 rearrangement—multiple partner genes	BCL6 dysregulation
Burkitt lymphoma		t(8;14)(q24;q32)	c-MYC overexpression

**Table 1.** Recurrent translocations and their link to V(D)J recombination or class switch recombination in mature B-cell neoplasms.

02 Although germinal center B (GCB) DLBCL seems independent of BCR signaling, still may  
03 require intrinsic activation of the PI3K pathway (**Table 1**). Some germinal center B (GCB)  
04 DLBCLs display activating mutations in the PIK3CA domain of PI3K [106].

05 Another example of a transition from a dependence on extrinsic BCR activation to intrinsic  
06 activation has been described in MALT lymphomas. In advanced cases, the t(11;18) chromo-  
07 somal results in a fusion transcript of API2-MALT1 and the t(1;14) leads to overexpression of  
08 BCL10 under the control of the Ig heavy chain locus. Consequently, MALT1/BCL10/CARD11  
09 complex activates the classical NF- $\kappa$ B pathway (**Figure 2A**) [107].

10 Burkitt lymphoma (BL) seems dependent upon tonic BCR survival signaling through PI3K  
11 but not upon the NF- $\kappa$ B pathway. The hallmark of BL is a translocation of MYC to the Ig  
12 heavy chain locus. However, MYC has strong pro-apoptotic effects and requires activation  
13 of pro-survival signaling through the PI3K pathway. In BL activation of PI3K resembles  
14 the tonic signaling in normal resting B cells [94, 95]. Consistently, BL cells are sensitive to  
15 genetic knockdown of CD79A or SYK and pharmacologic inhibition of PI3K, however, are not  
16 affected by knockdown of BTK [94].

17 In follicular lymphoma, at least half of the patients show evidence of mutations in the inter-  
18 connected BCR and CXCR4 signaling pathways such as mutations in CD79B, CARD11,  
19 CXCR4, SYK, BTK, and HVCN1 [3, 108]. Considering the unique characteristics of the BCR in  
20 this lymphoma type, such as high hypermutation rates, distinctive selection patterns, manno-  
21 sylation of the antigen binding site and autoantigen binding, the understanding of the precise  
22 interplay between the tumor dependence on a functional BCR and the presence of this recur-  
23 rent mutation requires further investigation [3, 40, 42, 47].

24 In CLL there is evidence for mutations in BTK and PLC $\gamma$ 2 that may confer resistance to BTK  
25 inhibition [109]. Despite the general consensus on the absence of somatic mutation on both  
26 CD79A and CD79B in CLL, one study has reported mutations in CD79B [110].



	Antigen-dependent BCR signaling	Tonic BCR signaling	Autonomous BCR signaling	Recurrent mutations in the signaling pathway
Chronic lymphocytic leukemia	++	+	+++	BTK, PLC $\gamma$ 2
Follicular lymphoma	+	-	-	CD79B, CARD11, CXCR4, SYK, BTK
Marginal zone lymphoma of MALT type	++	-	-	MALT1
GCB-diffuse large B-cell lymphoma	-	++	-	PI3K, PTEN
ABC-diffuse large B-cell lymphoma	-	+	++	ITAM, CARD11, NF-kB dependent
Burkitt lymphoma	-	++	-	NF-kB independent

The estimated relative contribution of antigen-dependent, tonic, and autonomous BCR signaling to the pathogenesis is represented as follows: [++] = major contribution, [+] = potential contribution, [-] = no evidence of contribution or minor contribution to pathogenesis.

**Table 2.** Pathogenic activation of the B-cell receptor signaling cascade.

**AQ9**

### 02 3. Therapeutic implications

03 In malignancies, in which chromosomal translocations result in the constitutive overexpression of oncogenes, the use of targeted therapy in these oncogenes represents a very attractive concept. One example is venetoclax, a highly potent and selective oral BCL-2 antagonist. 04 Venetoclax has proven to be highly active in patients with CLL, FL, and MCL [111]. 05

06 The link between antigen-driven BCR activation and lymphomagenesis immediately suggest that the identification and elimination of the putative antigen could result in tumor regression. 07 The induction of complete remission of gastric MZL by antibiotic therapy aimed to eradicate 08 *H. pylori* represents a paradigmatic example of this idea [69]. However, the identification of 09 cognate foreign antigens has been extremely difficult. Another therapeutic concept is the idea 10 of disrupting the interaction of the BCR with its antigen by the generation of anti-idiotypic 11 antibodies. Despite promising results in early phase clinical trials, phase III studies failed 12 to show a substantial benefit of this approach when used as consolidation therapy [48, 112]. 13

14 The evident dependence of B-cell lymphomas on the BCR signaling pathway establishes BCR 15 signaling blockade as a rational and disease-specific therapeutic approach. This strategy has 16 the potential to block all three BCR signaling mechanisms: antigen-dependent signaling, tonic 17 signaling, and autonomous signaling. 18

19 The BCR signal can be blocked by specific inhibitors of essential tyrosine kinases of the signaling 20 cascade such as BTK [113] or SYK [114, 115], or by blocking integration point of signals 21 originating from cell surface receptors. PI3K $\delta$  represents one of this integration points and 22 idelalisib, a small molecular PI3K $\delta$  inhibitor has shown clinical efficacy in CLL and FL [116, 117].

01 Ibrutinib, a BTK inhibitor has demonstrated durable clinical responses in relapsed/refractory  
02 CLL patients, including those with the high-risk del(17p) cytogenetic abnormality. Durable  
03 clinical responses have also been demonstrated MCL and DLBCL [96, 113]. Several oral SYK  
04 inhibitors, including fostamatinib, entospletinib, and cerdulatinib, are being assessed in clinical  
05 trials [118].

06 All these new drugs share a pattern of response resulting in nodal reduction and increased  
07 lymphocytosis. This phenomenon may reflect unique properties such as micro-environment  
08 modulation, and activity on the proliferative pools existing in the bone marrow and lymph  
09 nodes [73, 119].

#### 10 **4. Conclusion and perspective**

11 The understanding of lymphomagenesis remains essential for the development of novel therapeutic  
12 strategies. Both the errors in the genetic mechanisms that create a functional BCR and  
13 the pathogenic activation of the BCR signaling cascade have a clearly established role in B-cell  
14 lymphoma pathogenesis.

15 AID, an essential enzyme for the generation of the BCR, seems to play an important role in  
16 origin and progression of B-cell neoplasms. AID may also be involved in both mechanisms:  
17 the BCR origin and the BCR activation. Its study as a therapeutic target certainly deserves  
18 further research.

19 Novel technologies, such as next-generation sequencing, are helping to depict the complex  
20 genomic landscape of lymphoid malignancies. Recent developments, not only are enabling  
21 the identification of the underlying mutagenic mechanisms, but also the ongoing determination  
22 of "targetable" genetic aberrations is currently pushing forward the development of  
23 molecularly driven targeted therapeutics.

24 Current developments may change the natural history of this group of diseases in the near  
25 future. Nevertheless, further progress still depends on our ability to understand and integrate  
26 knowledge on the B-cell biology, the evolving tumor dynamics, clonal heterogeneity, and  
27 microenvironment interaction.

#### 28 **Author details**

29 Julieta Sepulveda<sup>1,2</sup>, Noé Seija<sup>3</sup>, Pablo Oppezco<sup>3</sup> and Marcelo A. Navarrete<sup>4\*</sup>

30 \*Address all correspondence to: m.a.navarrete@me.com

31 1 Department of Hematology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

32 2 Faculty of Health Sciences, University of Magallanes, Punta Arenas, Chile

33 3 Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay

34 4 School of Medicine, University of Magallanes, Punta Arenas, Chile

01 **References**

- 02 [1] Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system.  
03 *Nature Immunology*. 2015;**16**(4):343-353
- 04 [2] Gazumyan A et al. Activation-induced cytidine deaminase in antibody diversification  
05 and chromosome translocation. *Advances in Cancer Research*. 2012;**113**:167-190
- 06 [3] Navarrete MA, Oppezco P. The pathogenesis of follicular lymphoma, beyond apoptosis  
07 resistance. *Translational Cancer Research*. 2017;**6**:S529-S532
- 08 [4] Kenter AL et al. AID hits the jackpot when missing the target. *Current Opinion in Immu-*  
09 *nology*. 2016;**39**:96-102
- 10 [5] Young RM et al. Survival of human lymphoma cells requires B-cell receptor engagement  
11 by self-antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*  
12 *of America*. 2015;**112**(44):13447-13454
- 13 [6] Carsetti R. The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance  
14 between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment. *The*  
15 *Journal of Experimental Medicine*. 2000;**191**(1):5-8
- 16 [7] Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells.  
17 *The Journal of Experimental Medicine*. 1993;**177**(4):1009-1020
- 18 [8] Vettermann C, Schlissel MS. Allelic exclusion of immunoglobulin genes: Models and  
19 mechanisms. *Immunological Reviews*. 2010;**237**(1):22-42
- 20 [9] van Gent DC, Ramsden DA, Gellert M. The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23  
21 rule in V(D)J recombination. *Cell*. 1996;**85**(1):107-113
- 22 [10] Ma Y et al. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent  
23 protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*.  
24 2002;**108**(6):781-794
- 25 [11] Bredemeyer AL et al. ATM stabilizes DNA double-strand-break complexes during V(D)J  
26 recombination. *Nature*. 2006;**442**(7101):466-470
- 27 [12] Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recom-  
28 bination. *Annual Review of Immunology*. 2008;**26**:261-292
- 29 [13] Petersen S et al. AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and  
30 mutations at sites of class switching. *Nature*. 2001;**414**(6864):660-665
- 31 [14] Liu M et al. Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermuta-  
32 tion. *Nature*. 2008;**451**(7180):841-845
- 33 [15] Lieber MR. Mechanisms of human lymphoid chromosomal translocations. *Nature*  
34 *Reviews. Cancer*. 2016;**16**(6):387-398
- 35 [16] Tsujimoto Y et al. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms  
36 result from mistakes in VDJ joining. *Science*. 1985;**229**(4720):1390-1393

- 01 [17] Tellier J et al. Human t(14;18)positive germinal center B cells: A new step in follicular  
02 lymphoma pathogenesis? *Blood*. 2014;**123**(22):3462-3465
- 03 [18] Vogt N et al. The molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *Leukemia & Lym-*  
04 *phoma*. 2017;**58**(7):1530-1537
- 05 [19] Lu Z et al. BCL6 breaks occur at different AID sequence motifs in Ig-BCL6 and non-Ig-  
06 BCL6 rearrangements. *Blood*. 2013;**121**(22):4551-4554
- 07 [20] Lenz G. Insights into the molecular pathogenesis of activated B-cell-like diffuse large  
08 B-cell lymphoma and its therapeutic implications. *Cancers (Basel)*. 2015;**7**(2):811-822
- 09 [21] Lossos IS. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Clinical*  
10 *Oncology*. 2005;**23**(26):6351-6357
- 11 [22] Du MQ. MALT lymphoma: Genetic abnormalities, immunological stimulation and  
12 molecular mechanism. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*. 2017;**30**(1-2):13-23
- 13 [23] Neri A et al. Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved  
14 in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt lymphoma.  
15 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.  
16 1988;**85**(8):2748-2752
- 17 [24] Murga Penas EM et al. The t(14;18)(q32;q21)/IGH-MALT1 translocation in MALT lym-  
18 phomas contains templated nucleotide insertions and a major breakpoint region similar  
19 to follicular and mantle cell lymphoma. *Blood*. 2010;**115**(11):2214-2219
- 20 [25] Methot SP, Di Noia JM. Molecular mechanisms of somatic hypermutation and class  
21 switch recombination. *Advances in Immunology*. 2017;**133**:37-87
- 22 [26] Tiller T et al. Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. *Immunity*. 2007;**26**(2):205-213
- 23 [27] Klein F et al. Somatic mutations of the immunoglobulin framework are generally  
24 required for broad and potent HIV-1 neutralization. *Cell*. 2013;**153**(1):126-138
- 25 [28] Wrammert J et al. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against  
26 influenza virus. *Nature*. 2008;**453**(7195):667-671
- 27 [29] Wu X, Stavnezer J. DNA polymerase beta is able to repair breaks in switch regions  
28 and plays an inhibitory role during immunoglobulin class switch recombination. *The*  
29 *Journal of Experimental Medicine*. 2007;**204**(7):1677-1689
- 30 [30] Delbos F et al. Contribution of DNA polymerase eta to immunoglobulin gene hypermu-  
31 tation in the mouse. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005;**201**(8):1191-1196
- 32 [31] Maul RW, Gearhart PJ. AID and somatic hypermutation. *Advances in Immunology*.  
33 2010;**105**:159-191
- 34 [32] Klymenko T et al. Lamin B1 regulates somatic mutations and progression of B-cell  
35 malignancies. *Leukemia*. 2017. AQ5

- 01 [33] Pasqualucci L et al. Expression of the AID protein in normal and neoplastic B cells.  
02 Blood. 2004;**104**(10):3318-3325
- 03 [34] Koning MT et al. Template-switching anchored polymerase chain reaction reliably  
04 amplifies functional lambda light chain transcripts of malignant lymphoma. *Leukemia*  
05 & *Lymphoma*. 2014;**55**(5):1212-1214
- 06 [35] Koning MT et al. ARTISAN PCR: Rapid identification of full-length immunoglobulin  
07 rearrangements without primer binding bias. *British Journal of Haematology*. 2016
- 08 [36] Green MR et al. Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and  
09 progression of follicular lymphoma. *Blood*. 2013
- 10 [37] Lossos IS, Levy R. Mutation analysis of the 5' noncoding regulatory region of the BCL-6  
11 gene in non-Hodgkin lymphoma: Evidence for recurrent mutations and intraclonal het-  
12 erogeneity. *Blood*. 2000;**95**(4):1400-1405
- 13 [38] Pasqualucci L et al. AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis.  
14 *Nature Genetics*. 2008;**40**(1):108-112
- 15 [39] Pasqualucci L et al. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-  
16 cell lymphomas. *Nature*. 2001;**412**(6844):341-346
- 17 [40] Scherer F et al. Isotype-switched follicular lymphoma displays dissociation between acti-  
18 vation-induced cytidine deaminase expression and somatic hypermutation. *Leukemia &*  
19 *Lymphoma*. 2016;**57**(1):151-160
- 20 [41] Hu Q et al. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and *Helicobacter*  
21 *pylori* infection: A review of current diagnosis and management. *Biomarker Research*.  
22 2016;**4**:15
- 23 [42] Scherer F et al. Selection patterns of B-cell receptors and the natural history of follicular  
24 lymphoma. *British Journal of Haematology*. 2016;**175**(5):972-975
- 25 [43] Oppezio P et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display disso-  
26 ciation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood*. 2003;  
27 **101**(10):4029-4032
- 28 [44] Palacios F et al. High expression of AID and active class switch recombination might  
29 account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: Link with an acti-  
30 vated microenvironment in CLL disease. *Blood*. 2010;**115**(22):4488-4496
- 31 [45] Seija N, PDSMP, Uriepero A, Navarrete MA, Oppezio P. Unraveling CLL progression in AQ6  
32 unmutated patients: Linking functional AID expression with disease evolution. In: XVII  
33 International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia; New York. 2017
- 34 [46] Alexandrov LB et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;  
35 **500**(7463):415-421

- 01 [47] Strothmeyer AM et al. Comparative analysis of predicted HLA binding of immuno-  
02 globulin idiotype sequences indicates T cell-mediated immunosurveillance in follicular  
03 lymphoma. *Blood*. 2010;**116**(10):1734-1736
- 04 [48] Navarrete MA et al. Upfront immunization with autologous recombinant idiot-  
05 ype Fab fragment without prior cyto reduction in indolent B-cell lymphoma. *Blood*.  
06 2011;**117**(5):1483-1491
- 07 [49] Papaioannou D et al. Evidence for idiotype-directed immunosurveillance is restricted  
08 to follicular lymphoma and attributable to somatic hypermutation. *Haematologica*.  
09 2015;**100**(4):e143-e146
- 10 [50] Schamel WW, Reth M. Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen recep-  
11 tor. *Immunity*. 2000;**13**(1):5-14
- 12 [51] Reth M. Pillars article: Antigen receptor tail clue. *Nature*. 1989. 338: 383-384. *Journal of*  
13 *Immunology*. 2014;**192**(9):4015-4016
- 14 [52] Rolli V et al. Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive  
15 feedback loop. *Molecular Cell*. 2002;**10**(5):1057-1069
- 16 [53] Murayama K et al. Crystal structure of the Bruton's tyrosine kinase PH domain with phos-  
17 phatidylinositol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;**377**(1):  
18 23-28
- 19 [54] Niemann CU, Wiestner A. B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma develop-  
20 ment and evolution. *Seminars in Cancer Biology*. 2013;**23**(6):410-421
- 21 [55] Kohler F et al. Autoreactive B cell receptors mimic autonomous pre-B cell receptor sig-  
22 naling and induce proliferation of early B cells. *Immunity*. 2008;**29**(6):912-921
- 23 [56] Meixlsperger S et al. Conventional light chains inhibit the autonomous signaling capac-  
24 ity of the B cell receptor. *Immunity*. 2007;**26**(3):323-333
- 25 [57] Monroe JG. ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes.  
26 *Nature Reviews. Immunology*. 2006;**6**(4):283-294
- 27 [58] Rickert RC. New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell  
28 malignancies. *Nature Reviews. Immunology*. 2013;**13**(8):578-591
- 29 [59] Dameshek W, Schwartz RS. Leukemia and auto-immunization—Some possible relation-  
30 ships. *Blood*. 1959;**14**:1151-1158
- 31 [60] Agathangelidis A et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic  
32 leukemia: A molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood*.  
33 2012;**119**(19):4467-4475
- 34 [61] Ottensmeier CH et al. Analysis of VH genes in follicular and diffuse lymphoma shows  
35 ongoing somatic mutation and multiple isotype transcripts in early disease with changes  
36 during disease progression. *Blood*. 1998;**91**(11):4292-4299

- 01 [62] Krysov S et al. Surface IgM of CLL cells displays unusual glycans indicative of engage-  
02 ment of antigen *in vivo*. *Blood*. 2010;**115**(21):4198-4205
- 03 [63] Schneider D et al. Lectins from opportunistic bacteria interact with acquired variable-  
04 region glycans of surface immunoglobulin in follicular lymphoma. *Blood*. 2015;**125**(21):  
05 3287-3296
- 06 [64] Sachen KL et al. Self-antigen recognition by follicular lymphoma B-cell receptors. *Blood*.  
07 2012;**120**(20):4182-4190
- 08 [65] Doglioni C et al. High incidence of primary gastric lymphoma in northeastern Italy.  
09 *Lancet*. 1992;**339**(8797):834-835
- 10 [66] Parsonnet J et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *The New England*  
11 *Journal of Medicine*. 1994;**330**(18):1267-1271
- 12 [67] Wundisch T et al. Long-term follow-up of gastric MALT lymphoma after *Helicobacter*  
13 *pylori* eradication. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society*  
14 *of Clinical Oncology*. 2005;**23**(31):8018-8024
- 15 [68] Sena Teixeira Mendes L, Attygalle DA, Wotherspoon CA. *Helicobacter pylori* infection  
16 in gastric extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue  
17 (MALT) lymphoma: A re-evaluation. *Gut*. 2014;**63**(9):1526-1527
- 18 [69] Cheung DY. *Helicobacter pylori* eradication therapy, the reasonable first line therapy for  
19 gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma irrespective of infection status  
20 and disease stages. *Gut Liver*. 2016;**10**(5):659-660
- 21 [70] Zucca E et al. Gastric marginal zone lymphoma of MALT type: ESMO clinical practice  
22 guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2013;**24**(Suppl 6):  
23 vi144-vi148
- 24 [71] Szanto I et al. Regression of gastric MALT lymphoma after eradication of *Helicobacter pylori*  
25 infection followed by endoscopic ultrasound. *Orvosi Hetilap*. 2000;**141**(26):1455-1458
- 26 [72] Craig VJ et al. Gastric MALT lymphoma B cells express polyreactive, somatically  
27 mutated immunoglobulins. *Blood*. 2010;**115**(3):581-591
- 28 [73] Matsumoto Y et al. *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-  
29 induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nature Medicine*. 2007;**13**(4):470-476
- 30 [74] Ferreri AJ et al. Evidence for an association between *Chlamydia psittaci* and ocular adnexal  
31 lymphomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;**96**(8):586-594
- 32 [75] Ponzoni M et al. Chlamydia infection and lymphomas: Association beyond ocu-  
33 lar adnexal lymphomas highlighted by multiple detection methods. *Clinical Cancer*  
34 *Research*. 2008;**14**(18):5794-5800
- 35 [76] Quinn ER et al. The B-cell receptor of a hepatitis C virus (HCV)-associated non-Hodgkin  
36 lymphoma binds the viral E2 envelope protein, implicating HCV in lymphomagenesis.  
37 *Blood*. 2001;**98**(13):3745-3749

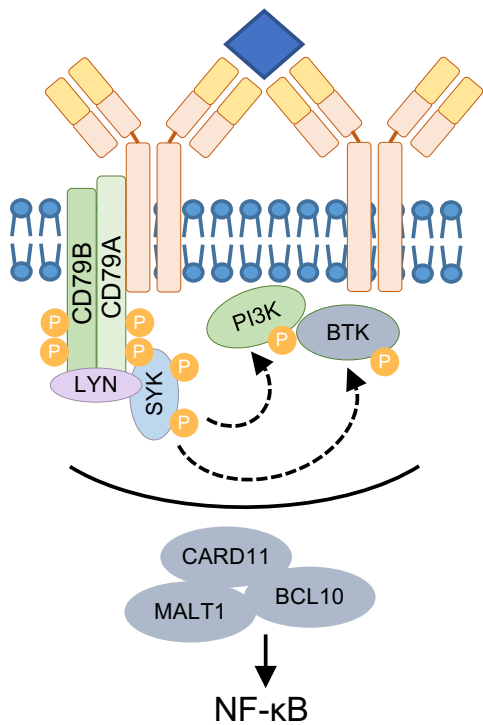
- 01 [77] Gisbert JP et al. Systematic review: Regression of lymphoproliferative disorders after  
02 treatment for hepatitis C infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2005;**21**(6):  
03 653-662
- 04 [78] Steininger C et al. Recombinant antibodies encoded by IGHV1-69 react with pUL32, a phos-  
05 phoprotein of cytomegalovirus and B-cell superantigen. *Blood*. 2012;**119**(10):2293-2301
- 06 [79] Hoogeboom R et al. A mutated B cell chronic lymphocytic leukemia subset that recog-  
07 nizes and responds to fungi. *The Journal of Experimental Medicine*. 2013;**210**(1):59-70
- 08 [80] Lanemo Myhrinder A et al. A new perspective: Molecular motifs on oxidized LDL,  
09 apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies.  
10 *Blood*. 2008;**111**(7):3838-3848
- 11 [81] Hoellenriegel J et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits  
12 B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia.  
13 *Blood*. 2011;**118**(13):3603-3612
- 14 [82] Mockridge CI et al. Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of  
15 CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood*. 2007;**109**(10):4424-4431
- 16 [83] Coelho V et al. Glycosylation of surface Ig creates a functional bridge between human  
17 follicular lymphoma and microenvironmental lectins. *Proceedings of the National*  
18 *Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;**107**(43):18587-18592
- 19 [84] Herve M et al. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-  
20 reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *The Journal of*  
21 *Clinical Investigation*. 2005;**115**(6):1636-1643
- 22 [85] Chu CC et al. Many chronic lymphocytic leukemia antibodies recognize apoptotic cells  
23 with exposed nonmuscle myosin heavy chain IIA: Implications for patient outcome and  
24 cell of origin. *Blood*. 2010;**115**(19):3907-3915
- 25 [86] Duhren-von Minden M et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-inde-  
26 pendent cell-autonomous signalling. *Nature*. 2012;**489**(7415):309-312
- 27 [87] Davis RE et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma.  
28 *Nature*. 2010;**463**(7277):88-92
- 29 [88] Monroe JG. Ligand-independent tonic signaling in B-cell receptor function. *Current*  
30 *Opinion in Immunology*. 2004;**16**(3):288-295
- 31 [89] Chen L et al. Protein tyrosine phosphatase receptor-type O truncated (PTPROt) regu-  
32 lates SYK phosphorylation, proximal B-cell-receptor signaling, and cellular prolifera-  
33 tion. *Blood*. 2006;**108**(10):3428-3433
- 34 [90] Srinivasan L et al. PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell*.  
35 2009;**139**(3):573-586
- 36 [91] Szydowski M et al. FOXO1 activation is an effector of SYK and AKT inhibition in tonic  
37 BCR signal-dependent diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2016;**127**(6):739-748



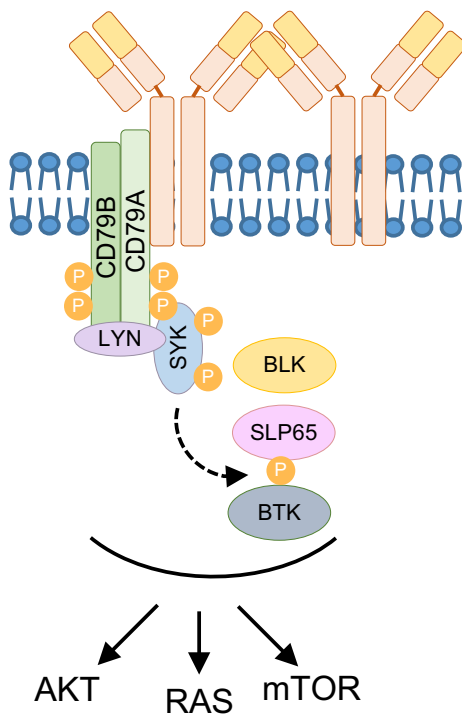
- 01 [92] Walter R et al. HSP90 promotes Burkitt lymphoma cell survival by maintaining tonic  
02 B-cell receptor signaling. *Blood*. 2017;**129**(5):598-608
- 03 [93] Havranek O et al. Tonic B-cell receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma.  
04 *Blood*. 2017;**130**(8):995-1006
- 05 [94] Schmitz R et al. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural  
06 and functional genomics. *Nature*. 2012;**490**(7418):116-120
- 07 [95] Corso J et al. Elucidation of tonic and activated B-cell receptor signaling in Burkitt's lym-  
08 phoma provides insights into regulation of cell survival. *Proceedings of the National*  
09 *Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;**113**(20):5688-5693
- 10 [96] Wilson WH et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell  
11 lymphoma. *Nature Medicine*. 2015;**21**(8):922-926
- 12 [97] Ohnishi K, Melchers F. The nonimmunoglobulin portion of lambda5 mediates cell-  
13 autonomous pre-B cell receptor signaling. *Nature Immunology*. 2003;**4**(9):849-856
- 14 [98] Koning MT et al. Autonomous, antigen-independent B-cell receptor signalling as a AQ7  
15 novel pathogenetic mechanism in non-GCB DLBCL. *Cancer Research*. 2016;**76**
- 16 [99] Koning MT et al. Antigen-independent, autonomous B-cell receptor signaling as a  
17 dominant candidate oncogenic mechanism in ABC DLBCL. *Blood*. 2016;**128**(22):778
- 18 [100] Koning MT et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma exhibits autonomous  
19 BCR signaling and responds to the second generation BTK inhibitor Acalabrutinib.  
20 *Blood*. 2016;**128**(22):4171
- 21 [101] Binder M et al. CLL B-cell receptors can recognize themselves: Alternative epitopes and  
22 structural clues for autostimulatory mechanisms in CLL. *Blood*. 2013;**121**(1):239-241
- 23 [102] Lenz G et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma.  
24 *Science*. 2008;**319**(5870):1676-1679
- 25 [103] Kloo B et al. Critical role of PI3K signaling for NF-kappaB-dependent survival in a  
26 subset of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *Proceedings of the*  
27 *National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;**108**(1):272-277
- 28 [104] Philipp C et al. Mutation analysis of the TNFAIP3 (A20) tumor suppressor gene in  
29 CLL. *International Journal of Cancer*. 2010;**128**(7):1747-1750
- 30 [105] Wenzl K et al. Higher incidence of the SNP Met 788 Ile in the coding region of A20 in  
31 diffuse large B cell lymphomas. *Tumour Biology*. 2016;**37**(4):4785-4789
- 32 [106] Abubaker J et al. PIK3CA mutations are mutually exclusive with PTEN loss in diffuse  
33 large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2007;**21**(11):2368-2370
- 34 [107] Akyuz N et al. MALT1 sequencing analyses in marginal zone B-cell lymphomas reveal  
35 mutations in the translocated MALT1 allele in an IGH-MALT1-positive MALT lym-  
36 phoma. *Leukemia & Lymphoma*. 2017;**58**(10):2480-2484

- 01 [108] Krysiak K et al. Recurrent somatic mutations affecting B-cell receptor signaling path-  
02 way genes in follicular lymphoma. *Blood*. 2017;**129**(4):473-483
- 03 [109] Woyach JA et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibru-  
04 tinib. *The New England Journal of Medicine*. 2014;**370**(24):2286-2294
- 05 [110] Payelle-Brogard B et al. Analysis of the B-cell receptor B29 (CD79b) gene in familial  
06 chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;**94**(10):3516-3522
- 07 [111] Davids MS. Targeting BCL-2 in B-cell lymphomas. *Blood*. 2017;**130**(9):1081-1088
- 08 [112] Schuster SJ, Neelapu SS, Gause BL, Muggia FM, Gockerman JP, Sotomayor EM, Winter AQ8  
09 JN, Flowers CR, Stergiou AM, Kwak LW. Idiotype vaccine therapy (BiovaxID) in fol-  
10 licular lymphoma in first complete remission: Phase III clinical trial results. *Journal of*  
11 *Clinical Oncology*. 2009;**27**(18s)
- 12 [113] Byrd JC et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia.  
13 *The New England Journal of Medicine*. 2013;**369**(1):32-42
- 14 [114] Friedberg JW et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clini-  
15 cal activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*.  
16 2010;**115**(13):2578-2585
- 17 [115] Chen L et al. SYK inhibition modulates distinct PI3K/AKT-dependent survival path-  
18 ways and cholesterol biosynthesis in diffuse large B cell lymphomas. *Cancer Cell*.  
19 2013;**23**(6):826-838
- 20 [116] Furman RR et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia.  
21 *The New England Journal of Medicine*. 2014;**370**(11):997-1007
- 22 [117] Barrientos JC. Idelalisib for the treatment of indolent non-Hodgkin lymphoma: A  
23 review of its clinical potential. *OncoTargets and Therapy*. 2016;**9**:2945-2953
- 24 [118] Liu D, Mamorska-Dyga A. Syk inhibitors in clinical development for hematological  
25 malignancies. *Journal of Hematology & Oncology*. 2017;**10**(1):145
- 26 [119] Oppezzo P, Dighiero G. Role of the B-cell receptor and the microenvironment in chronic  
27 lymphocytic leukemia. *Blood Cancer Journal*. 2013;**3**:e149

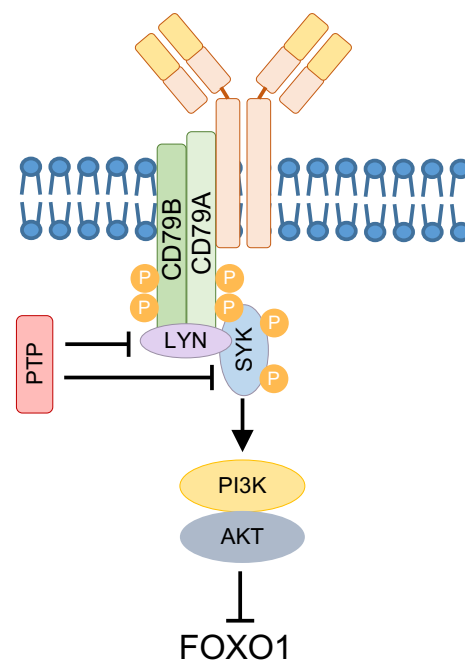
### A) Antigen-dependent BCR Signaling

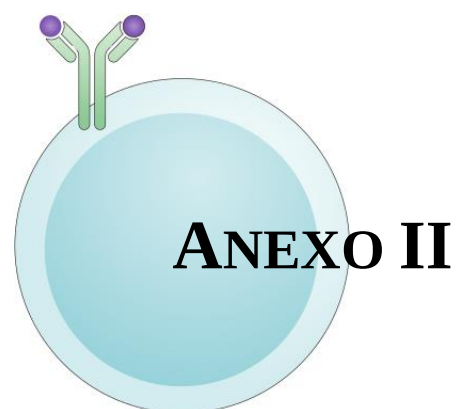


### B) Autonomous BCR Signaling



### C) Tonic BCR Signaling





## LYMPHOID NEOPLASIA

# S100-A9 protein in exosomes from chronic lymphocytic leukemia cells promotes NF- $\kappa$ B activity during disease progression

Daniel Prieto,<sup>1,\*</sup> Natalia Sotelo,<sup>1,\*</sup> Noé Seija,<sup>1,2,\*</sup> Sandra Sernbo,<sup>1</sup> Cecilia Abreu,<sup>1</sup> Rosario Durán,<sup>3</sup> Magdalena Gil,<sup>3</sup> Estefanía Sicco,<sup>4</sup> Victoria Irigoín,<sup>5</sup> Carolina Oliver,<sup>5</sup> Ana Inés Landoni,<sup>6</sup> Raúl Gabus,<sup>6</sup> Guillermo Dighiero,<sup>6</sup> and Pablo Oppezzo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Laboratory on Chronic Lymphocytic Leukemia, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; <sup>2</sup>Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; <sup>3</sup>Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable & Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; <sup>4</sup>Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión, Facultad de Ciencias; <sup>5</sup>Cátedra de Hematología, Hospital de Clínicas, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; and <sup>6</sup>Hospital Maciel, Administración Servicios de Salud del Estado, Ministerio de Salud, Montevideo, Uruguay

## Key Points

- Plasma-derived exosomes from patients with CLL exhibit different protein cargo compositions depending on disease status and progression.
- S100-A9 protein is overexpressed and S100-A9 cargo in exosomes activates NF- $\kappa$ B pathway in patients with CLL during disease progression.

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is an incurable disease characterized by accumulation of clonal B lymphocytes, resulting from a complex balance between cell proliferation and apoptotic death. Continuous crosstalk between cancer cells and local/distant host environment is required for effective tumor growth. Among the main actors of this dynamic interplay between tumoral cells and their microenvironment are the nano-sized vesicles called exosomes. Emerging evidence indicates that secretion, composition, and functional capacity of exosomes are altered as tumors progress to an aggressive phenotype. In CLL, no data exist exploring the specific changes in the proteomic profile of plasma-derived exosomes from patients during disease evolution. We hereby report for the first time different proteomic profiles of plasma exosomes, both between indolent and progressive CLLs as well as within the individual patients at the onset of disease and during its progression. Next, we focus on the changes of the exosome protein cargoes, which are found exclusively in patients with progressive CLL after disease progression. The alterations in the proteomic cargoes underline different networks specific for leukemia progression related to inflammation, oxidative stress, and NF- $\kappa$ B and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway activation. Finally, our results suggest a

preponderant role for the protein S100-A9 as an activator of the NF- $\kappa$ B pathway during CLL progression and suggest that the leukemic clone can generate an autoactivation loop through S100-A9 expression, NF- $\kappa$ B activation, and exosome secretion. Collectively, our data propose a new pathway for NF- $\kappa$ B activation in CLL and highlight the importance of exosomes as extracellular mediators promoting tumor progression in CLL. (*Blood*. 2017;130(6):777-788)

## Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) develops through accumulation of malignant B cells that circulate in the blood and are continuously supported by microenvironment signals within the bone marrow and secondary lymphoid organs.<sup>1</sup> Exchange between primary tumor cells and their microenvironment represents bidirectional crosstalk, in which the tumor clone is not only being supported by the microenvironment but also modulating it to maintain and promote its own survival.<sup>2,3</sup>

Among the main actors in the dynamic and reciprocal interplay between tumor cells and their microenvironment are extracellular vesicles (EVs).<sup>4</sup> They represent an important mode of intercellular communication, serving as vehicles for transfer between cellular membranes, proteins, lipids, and RNA. EVs include microvesicles (MVs), which shed directly from the plasma membrane with a diameter of 100 to 1000 nm,<sup>5</sup> and exosomes, which are conformed by

nano-sized vesicles of endosomal origin of 40 to 100 nm in diameter.<sup>6</sup> Similar to MVs, exosomes are directly associated with oncogenic reprogramming,<sup>7</sup> tumor progression,<sup>8</sup> metastasis,<sup>9</sup> and therapy refractoriness.<sup>10</sup>

In CLL, the total number of MVs in plasma is greater than in healthy donors, and *in vitro* studies have demonstrated that MVs could mediate AKT activation in bone marrow stromal cells.<sup>11</sup> Regarding CLL exosomes, recent work has demonstrated that they could induce an inflammatory phenotype through a transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts and activation of key signaling pathways such as AKT and/or NF- $\kappa$ B.<sup>12</sup> Although microRNAs and proteomic profiles of exosomes have been described,<sup>12,13</sup> proteomic analysis of primary exosomes throughout CLL evolution has not been fully performed. Furthermore, the direct implications of changes occurring in

Submitted 20 February 2017; accepted 29 May 2017. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, 8 June 2017; DOI 10.1182/blood-2017-02-769851.

\*D.P., N. Sotelo, and N. Seija contributed equally to this work.

The online version of this article contains a data supplement.

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.

© 2017 by The American Society of Hematology

exosome protein cargoes throughout CLL evolution and their role during disease progression remain unknown.

We hereby report a comprehensive analysis involving the proteomic characterization of exosomes from patients with indolent or progressive CLL at the onset of disease and during disease evolution. We examined whether there is a differential proteomic profile from exosomes throughout CLL evolution and focused on the different pathways and proteins that could be implicated in disease progression. We found that S100-A9 protein is only present in exosomes of patients with progressive disease at the time of progression and that this protein is specifically overexpressed by leukemic cells at this stage. Finally, we demonstrate that exosomes carrying S100-A9 are able to activate the NF- $\kappa$ B pathway in primary CLL cells, suggesting that the leukemic clone could generate an autoactivation loop through S100-A9 expression, exosome secretion, and NF- $\kappa$ B activation.

Together, these results show the importance of exosomes in cell-to-cell communication during CLL evolution and suggest that exosomes with S100-A9 protein cargo could be one of the mechanisms responsible for the activation of the NF- $\kappa$ B pathway during disease progression.

## Materials and methods

### Clinical samples

Plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected in a prospective study from 34 patients with typical CLL diagnoses. Five age-matched healthy donors (HDs) were included as control samples. Patients were segregated into 2 groups: (1) progressive disease, defined by lymphocyte doubling time <6 months, treatment required within 3 years, activation-induced cytidine deaminase/lipoprotein lipase expression, and >2% of CLL B cells with ongoing class-switch recombination process in peripheral blood (PB), as described by Palacios et al,<sup>14</sup> and (2) indolent disease, defined by lymphocyte doubling time >4 years, no treatment required after 4 years, absence in PB (<1%) of CLL B cells with ongoing class-switch recombination process to immunoglobulin G (IgG), and absence of activation-induced cytidine deaminase expression. All samples were obtained at disease onset and after 4 years during disease evolution or after treatment in those with progressive disease. All patients were observed at Hospital Maciel and at the Haematology Department of Clinical Hospital in Montevideo. They provided informed consent according to the ethical regulations of Uruguay and the Helsinki Declaration.

### Exosome isolation

Patients' plasmas were diluted 1:2 in phosphate-buffered saline and centrifuged (10 minutes at 400 g, then 20 minutes at 2000 g) to remove cell debris and larger vesicles. Next, centrifugation at 10 000 g for 60 minutes at 4°C was performed to separate MVs. Exosomes were isolated by ultracentrifugation (120 minutes at 100 000 g at 4°C) followed by floatation on Optiprep cushion (Axis-Shield; 17%) for 120 minutes at 100 000 g at 4°C to remove nonexosomal protein complexes. After washing, exosomes were suspended in phosphate-buffered saline and subjected to NanoSight analysis (Malvern Instruments, Inc., Westborough, MA).

### Proteomic analysis

Peptides were separated by nano-high-performance liquid chromatography (EASY 1000; Thermo Fisher) fitted with a reverse-phase column (50 cm  $\times$  75  $\mu$ m ID, PepMap RSLC C18; Thermo Fisher) using a linear gradient (acetonitrile, 0.1%; formic acid, 5%-55% in 75 minutes). Peptide analysis was carried out via an LTQ Velos (Thermo Fisher) in a data-dependent acquisition mode (top 10) with a dynamic exclusion list of 45 seconds. Data analysis was performed using PatternLab for proteomics software (version 3.2.0.3).<sup>15,16</sup> Raw files were searched against a *Homo sapiens* target-decoy database using the Comet search engine (PatternLab). The approximate area proportional Venn

diagram module was used to perform comparisons between different progression times and determine proteins uniquely identified in each situation.<sup>16</sup> Exosomal protein data sets were subjected to functional enrichment analyses using FunRich software.<sup>17</sup> The mass spectrometry proteomic data have been deposited in the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the data set identifier PXD005941.

### Flow cytometry, western blot, confocal microscopy, and reverse-transcription polymerase chain reaction

Isolation of PBMCs from patients with CLL and HDs, as well as cytometry analysis (flow cytometry) and immunoblot, was performed as described.<sup>18,19</sup> Antibodies used in this work are described in supplemental Table 1, available on the *Blood* Web site. Flow cytometry analysis was performed with R/Bioconductor<sup>20</sup> packages or FlowJo (TreeStar, Ashland, OR) or Summit software (Beckman Coulter, CA). Microscopy analysis was performed as previously described,<sup>21</sup> with antibodies listed in supplemental Table 1. RNA isolation and reverse-transcription polymerase chain reaction were carried out as described by Oppezio et al.<sup>22</sup> Primers used for the amplification of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) isoforms and the full-length S100-A9 are provided in supplemental Table 2.

### In vitro analysis

Purification of CD19<sup>+</sup> cells from patients with CLL and activation with anti-IgM (Jackson ImmunoResearch) were performed as described by Moreno et al.<sup>23</sup> Exosome activation on CLL cells was performed with PBMCs ( $5 \times 10^6$ ) cultured in RPMI 1640, 10% fetal bovine serum and incubated for 90 minutes with exosomes (30  $\mu$ g/mL total protein). For blocking experiments, exosomes were preincubated with 1  $\mu$ g/mL of anti-human S100-A9 (R&D Systems, Minneapolis, MN) or Human IgG Isotype Control (Thermo Fisher) for 1 hour at 4°C. Recombinant human S100-A9 protein (rhS100-A9; MyBiosource, San Diego, CA) was incubated with CLL PBMCs as described in supplemental Table 1.

### Statistical analysis

Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean of at least 3 independent experiments. Differences between groups were analyzed using the Mann-Whitney test or 1-way analysis of variance (Student *t* test);  $P < .05$  was considered statistically significant. Analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). For proteomic assays, false-discovery rate correction was performed using GeneSpring GX11.0.2 software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA); cutoff of enrichment analyses in FunRich software was kept as default ( $P < .05$ ) after Bonferroni correction.

## Results

### Characterization of patients with CLL and plasma-derived exosomes

To determine the clinical relevance of circulating exosomes in patients with CLL, we isolated and characterized exosomes from the plasma of a working cohort composed of: (1) group A, comprising 5 patients with progressive disease, with samples obtained at the time of diagnosis during stable disease (Prog-dt) and later during disease progression (Prog-ddp) but before treatment, and (2) group B, consisting of 5 patients with indolent disease, with samples obtained at diagnosis (Ind-dt) and after 4 years of follow-up without disease evolution (Ind-4years). Rationale of the study, clinical statement, and molecular characterization of patients with CLL are provided in Table 1.

Isolated particles presented bona fide characteristics of exosomes, with size ranging from 40 to 100 nm and a typical profile confirmed by NanoSight and electron microscopy (Figure 1A). Additionally, different protein migration patterns were visualized between exosomes

**Table 1. Clinical and molecular characterization of patients with CLL**

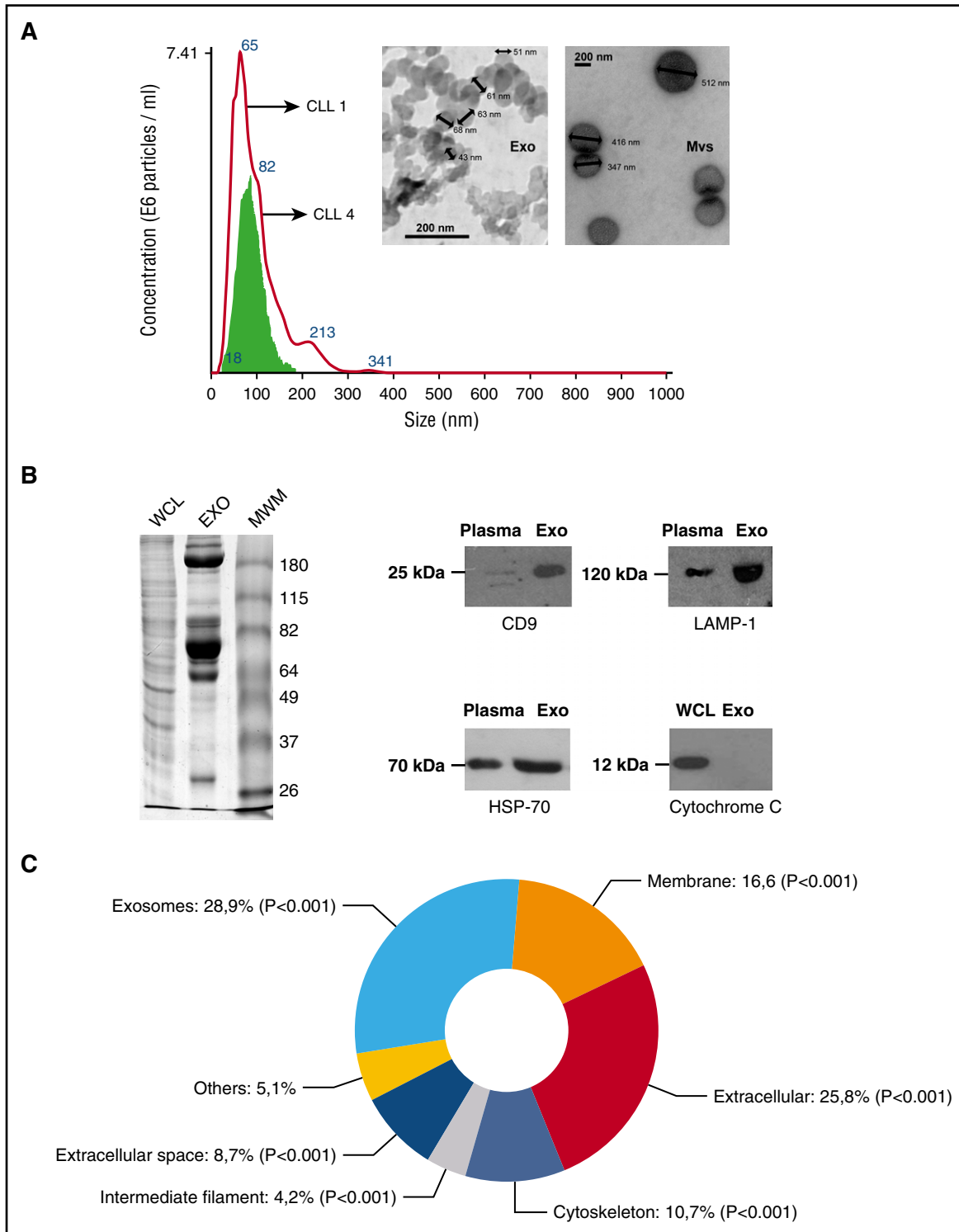
Study rationale	Patient No.	CLL samples at time of disease onset (subgroups Prog-dt and Ind-dt)				CLL samples during disease progression or after 4 y of follow-up (subgroups Prog-ddp and Ind-4years)				TFT, months	IgVH status <sup>‡</sup>			
		Binet stage	LC, x 10 <sup>3</sup> / $\mu$ l	Clinical disease status	FISH	AID/LPL* CSR, % <sup>†</sup>	Binet stage	LC, x 10 <sup>3</sup> / $\mu$ l	Clinical disease status			FISH	AID/LPL* CSR, % <sup>†</sup>	
		Binet stage	LC, x 10 <sup>3</sup> / $\mu$ l	Clinical disease status	FISH	AID/LPL* CSR, % <sup>†</sup>	Binet stage	LC, x 10 <sup>3</sup> / $\mu$ l	Clinical disease status			FISH	AID/LPL* CSR, % <sup>†</sup>	
Study cohort (progressive patients)	1	A	19.0	Ind.	Normal	(+/+)	2.5	B	74.00	Prog.	del17p	(+/+)	2.0	UM
	2	A	28.0	Ind.	del11q	(+/+)	2.1	B	162.0	Prog.	del11q	(+/+)	2.9	UM
	3	A	23.00	Ind.	del13q/del11q	(+/+)	2.8	C	120.0	Prog.	del13q/del11q	(+/+)	3.1	UM
	4	A	35.00	Ind.	del11q	(+/+)	4.1	C	164.0	Prog.	del11q	(+/+)	5.5	UM
	5	A	15.90	Ind.	Normal	(+/+)	3.8	C	220.0	Prog.	Normal	(+/+)	4.2	UM
Study cohort (indolent patients)	6	A	27.70	Ind.	Normal	(-/-)	1.2	A	19.64	Ind.	Normal	(-/-)	0.9	Mut
	7	A	24.60	Ind.	Normal	(-/-)	0.02	A	34.55	Ind.	Normal	(-/-)	0.5	Mut
	8	A	14.70	Ind.	del13q	(-/-)	1.1	A	12.50	Ind.	del13q	(+/+)	1.2	Mut
	9	A	8.25	Ind.	del13q	(-/-)	0.8	A	14.490	Ind.	del13q	(-/-)	0.3	Mut
	10	A	18.00	Ind.	Normal	(-/-)	1.5	A	20.00	Ind.	Normal	(-/-)	1.8	Mut
Validation cohort (progressive patients)	11	A	26.20	Ind.	del13q	(+/-)	1.5	C	183.0	Prog.	del13q	(+/-)	2.2	UM
	12	A	19.45	Ind.	Normal	(-/+)	0.5	B	112.0	Prog.	del17p	(+/+)	2.5	UM
	13	A	40.20	Ind.	del13q	(+/+)	1.2	B	98.00	Prog.	del11q	(+/+)	2.2	UM
	14	A	18.30	Ind.	del13q/del11q	(+/+)	1.6	C	178.00	Prog.	del13q/del11q	(+/+)	3.1	UM
	15	A	20.26	Ind.	del17p	(-/+)	1.8	B	154.00	Prog.	del17p	(+/+)	2.3	UM
	16	A	10.58	Ind.	del11q	(+/+)	0.5	B	120.0	Prog.	del11q	(+/+)	1.8	UM
	17	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	77.00	Prog.	del11q	(+/+)	3.6	UM
	18	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	161.00	Prog.	del13q	(+/-)	2.9	UM
	19	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	72.0	Prog.	del11q	(+/+)	4.4	UM
	20	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	900.0	Prog.	Normal	(+/+)	1.2	UM
21	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	110.0	Prog.	del13q	(-/+)	4.4	UM	
Validation cohort (indolent patients)	22	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	97.00	Prog.	Normal	(+/+)	2.5	UM
	23	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	N/A <sub>(1)</sub>	65.00	Prog.	Normal	(+/+)	1.5	UM
	24	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	15.60	Ind.	Normal	(-/+)	0.6	Mut
	25	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	8.90	Ind.	tris12	(-/-)	0.5	Mut
	26	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	9.92	Ind.	Normal	(-/-)	0.07	Mut
	27	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	15.00	Ind.	Normal	(-/-)	0.05	Mut
	28	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	7.00	Ind.	del13q	(-/+)	1.5	Mut
	29	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	11.60	Ind.	del13q	(+/-)	1.1	Mut
	30	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	14.70	Ind.	tris12	(-/-)	2.1	Mut
	31	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	22.20	Ind.	Normal	(-/+)	1.8	Mut
	32	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	11.60	Ind.	Normal	(-/-)	0.6	Mut
	33	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	17.50	Ind.	Normal	(-/-)	0.7	Mut
	34	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	N/A <sub>(2)</sub>	19.90	Ind.	del13q	(-/-)	1.1	Mut

AID, activation-induced cytidine deaminase; CSR, class-switch recombination; FISH, fluorescence in situ hybridization; LC, lymphocyte count; LPL, lipoprotein lipase; Mut, mutated; N/A<sub>(1)</sub>, not applicable (refers to patients with progressive disease whose samples were not collected at disease onset); N/A<sub>(2)</sub>, not applicable (refers to analyzed samples collected from indolent patients after 4 years of follow-up); N/T, not treated (refers to patients who did not receive any treatment at 4-year follow-up); TFT, time from initial diagnosis to first treatment for clinical progression; UM, unmutated.

\*AID and LPL expression were assessed by quantitative polymerase chain reaction, as described by Prieto et al.<sup>21</sup>

†Percentage of proliferative fraction expressing Igm<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup> evaluated by cytometry studies, as described by Palacios et al.<sup>14</sup>

‡ $\pm$  2% difference from germline gene defined UM patients;  $\geq$  2% difference defined Mut patients.

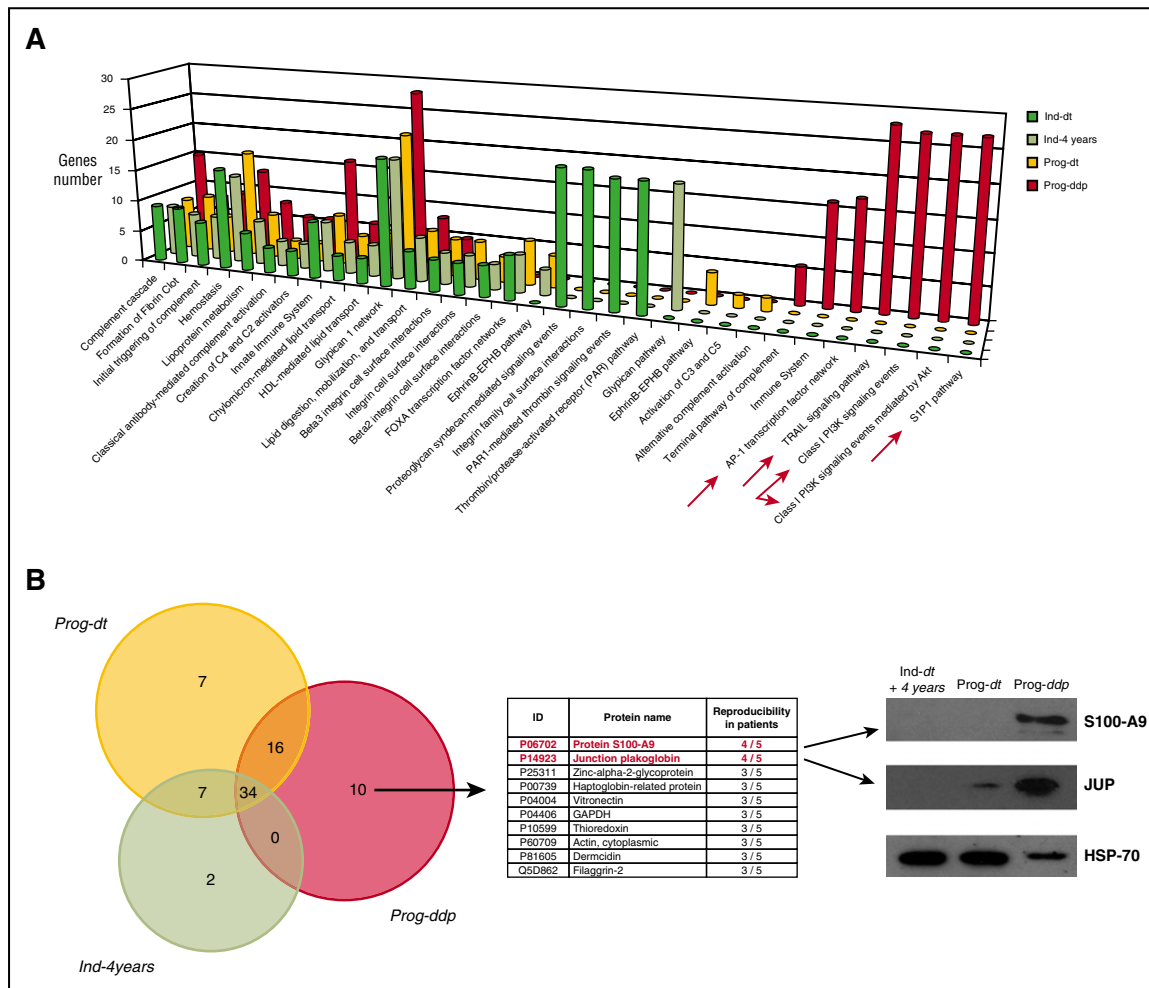


**Figure 1. Characterization and proteomic analysis of CLL plasma-derived exosomes.** (A) Electron microscopy and NanoSight analysis of exosomes (Exo) purified from CLL plasmas. Comparative electron micrographs of MVs and exosomes from the same patient are depicted. Blue numbers indicate size of main peaks. (B) Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblot characterization of plasma-derived exosomes. After protein quantification, exosomes were lysed in Laemmli buffer to perform SDS-PAGE and immunoblot. Different migration profiles in SDS-PAGE of exosome fractions and immunoblot with specific monoclonal antibodies against typical exosome proteins were used to validate the quality of our isolation technique. The proteins identified were tetraspanin CD9, heat shock protein HSP-70, and lysosomal marker LAMP-1. These were compared with the plasma of the same patient at the same disease time. Cytochrome C was also evaluated comparing whole-cell lysate (WCL) with plasma-derived exosomes of the same patient. (C) Subcellular localization of the proteins present in the plasma-derived exosomes purified of the different subgroups was analyzed by FunRich software. MWM, molecular-weight marker.

and whole-cell lysate of the same patients, whereas classical exosome markers such as CD9, HSP-70, and Lamp-1<sup>24</sup> were enriched in the exosome fraction. In turn, cytochrome C was

absent, excluding contamination with apoptotic bodies (Figure 1B). Component enrichment analysis of the different exosome fractions showed mainly exosome proteins, which indicates that the





**Figure 2. Proteomic analysis of plasma-derived exosomes during CLL evolution.** (A) Molecular networks associated with proteins identified in plasma-derived exosomes during CLL evolution. The PPI networks were elucidated using the interaction model of FunRich software with the Vesiclepedia database, which focuses on statistically significant enriched genes and particular biological pathways in each subgroup. Different and specific networks according to the number of genes associated with the functions in the Prog-ddp subgroup are marked by red arrows: (1) Leukemic cell infiltration of secondary lymphoid organs, highlighted by genes related to the receptor sphingosine 1-phosphate (S1P1) pathway ( $P = 2.24e-4$ ); (2) tumor proliferation network, involving genes of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT kinase pathway ( $P = 2.24e-4$ ); (3) survival and apoptosis network, involving genes implicated in the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) pathway; and (4) inflammation and oxidative stress networks, with genes involved in the AP-1 transcription factor pathway ( $P = 1.43e-4$ ). (B) Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis of CLL exosome proteins. LC-MS/MS data analysis was performed in accordance with the recently published PatternLab for proteomics 4.0 software (<http://www.patternlabforproteomics.org>) protocol for data analysis.<sup>16</sup> The PatternLab approximately area-proportional Venn diagram module was used for pinpointing proteins exclusively identified in 1 biological condition. For the exosome protein-enriched sample, the analysis only considered proteins present in at least 3 of 5 patients for each biological condition. Junction plakoglobin (JUP) and S100-A9 (proteins in red font) were confirmed by specific monoclonal antibodies in immunoblot analysis. Plasma-derived exosomes were obtained from 10 patients (20 samples) corresponding to the 4 different subgroups (5 patients each) and subjected to 12% polyacrylamide gel (SDS-PAGE) electrophoresis. Representative immunoblots of both proteins at the different disease times are depicted. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HDL, high-density lipoprotein.

procedures used for isolation and purification are reproducible and reliable (Figure 1C).

**Proteomic profiling of plasma-derived exosomes during CLL evolution**

Considering all patients and conditions, liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of CLL exosomes resulted in the identification of 138 proteins in group A and 136 proteins in group B, with at least 2 mapping peptides per sequence. Among the 138 proteins in the progressive group, 99 (62%) were shared by the 2 subgroups (Prog-dt and Prog-ddp), whereas 39 proteins were differentially expressed: 10 in Prog-dt and 29 in Prog-ddp. Regarding indolent CLLs, among the 136 proteins, 84 (61%) were shared between both subgroups (Ind-dt and Ind-4years), and 52 proteins were differentially

identified: 12 in Ind-dt and 40 in Ind-4years (supplemental Data 1, including tables and Venn diagram). The protein-protein interaction (PPI) network offers a conceptual framework to better understand the functional organization of the proteome and, in this case, to deepen the insight into the protein cargoes of plasma exosomes during CLL evolution. Selection of the 20 most significant PPI networks from each subgroup (Ind-dt, Ind-4years, Prog-dt, and Prog-ddp) and further comparison among them allowed us to highlight a total of 32 different biological pathways (Figure 2A; supplemental Data 2). Many of these pathways were shared among progressive and indolent CLLs, but some of them were found exclusively within a determined subgroup (Figure 2A). Focusing on the PPI networks derived from the proteins present in exosomes during disease progression (Prog-ddp subgroup), we found interesting pathways associated with inflammation and cancer progression, such as S1P1 pathway, class I PI3K

signaling events, tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand signaling pathway, and AP-1 transcription factor network (Figure 2A).

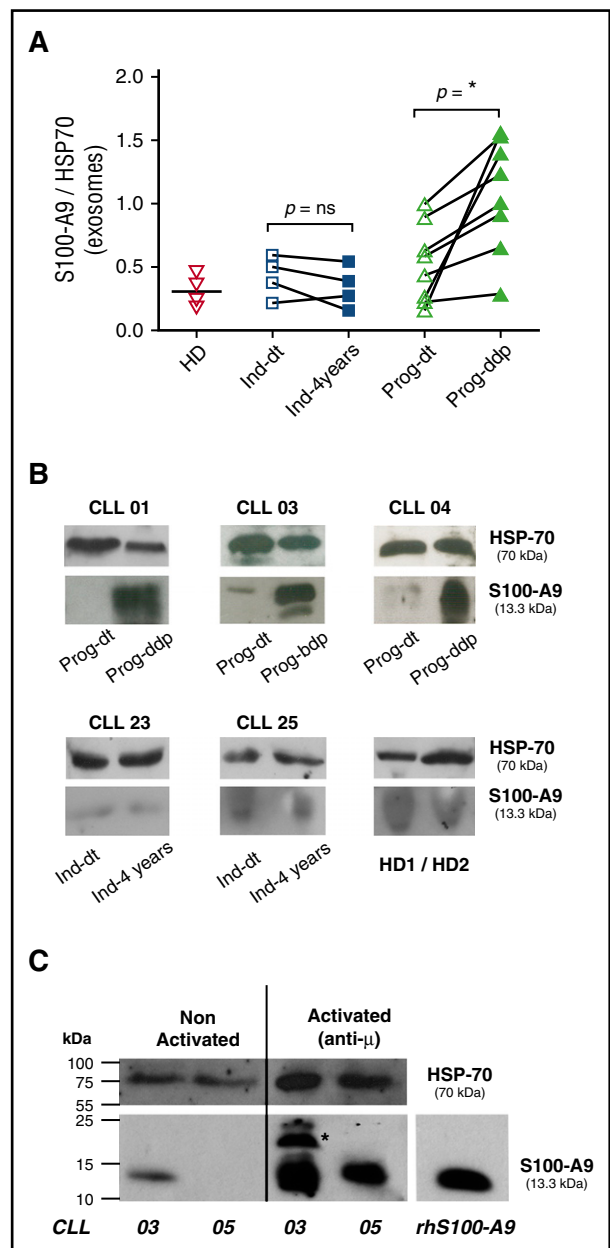
To select the proteins relevant to disease progression, we focused on the proteins that remained differentially present in the Prog-ddp subgroup. To this aim, we performed a comparative analysis between Ind-4years, Prog-dt, and Prog-ddp. The PatternLab for Proteomics software Venn diagram module pinpointed proteins uniquely identified in each subgroup. Considering proteins present in at least 3 patients per class, only 34 proteins were shared among the 3 subgroups; 2 were only found in the Ind-4years patients, 7 in Prog-dt, and 10 in Prog-ddp (Figure 2B; supplemental Data 3). Among the 10 proteins detected exclusively in the Prog-ddp subgroup, the 2 most represented (4 of 5 patients) were S100 calcium binding protein A9 (S100-A9) and JUP (Figure 2B). To confirm these results, we performed immunoblot analysis in the CLL exosomes of the 10 patients at the different disease points included in the proteomic analysis. Our results confirmed the presence of these 2 proteins in 5 of 5 patients for S100-A9 and 4 of 5 patients for JUP, whereas none or very low presence of these proteins was detected in the samples before progression or in indolent CLLs. A representative case for each protein is depicted in Figure 2C. Interestingly, both proteins are involved in cancer progression. S100-A9 is an activator of the NF- $\kappa$ B pathway<sup>25</sup> and has been associated with inflammatory networks,<sup>25</sup> and JUP is implicated in the activation of Wnt pathway.<sup>26,27</sup>

#### Plasma-derived exosomes with increased levels of S100-A9 are found in patients with progressive disease after disease progression and released by CLL cells

S100-A9 and the complex S100-A8/A9 are key factors leading to inflammatory cell recruitment, tumor growth, and metastasis.<sup>4,28</sup> Our proteomic and immunoblotting analysis identified S100-A9 as 1 of the proteins specifically present in the plasma exosomes of the Prog-ddp subgroup. To confirm these results, we performed immunoblot analysis in the validation cohort (Table 1). As depicted in Figure 3A, 7 of the 8 samples showed a significant increase of S100-A9 cargo in CLL exosomes at the time of disease progression (mean, 1.12 and 0.51, respectively; Mann-Whitney test,  $P = .010$ ;  $n = 8$ ). In contrast, no significant differences were found within the indolent group, (Ind-dt: mean, 0.44; Ind-4years: mean, 0.33; Mann-Whitney test,  $P = .657$ ;  $n = 4$ ). In turn, S100-A9 levels from HDs (mean, 0.31) seemed similar to those observed in indolent and Prog-dt CLL samples. Representative cases of CLL patients from the different subgroups at both evolution times and from HDs are depicted in Figure 3B. To evaluate whether CLL cells are able to release S100-A9<sup>+</sup> exosomes, we performed in vitro assays with CD19<sup>+</sup> cells from patients with progressive disease progression. Our results showed that after anti-IgM incubation, CLL cells are able to release exosomes carrying S100-A9, as evidenced by immunoblot analysis (Figure 3C). Overall, these findings validate proteomic analysis concerning the specific presence of S100-A9 during disease progression and suggest that these exosomes originate at least in part from CLL cells.

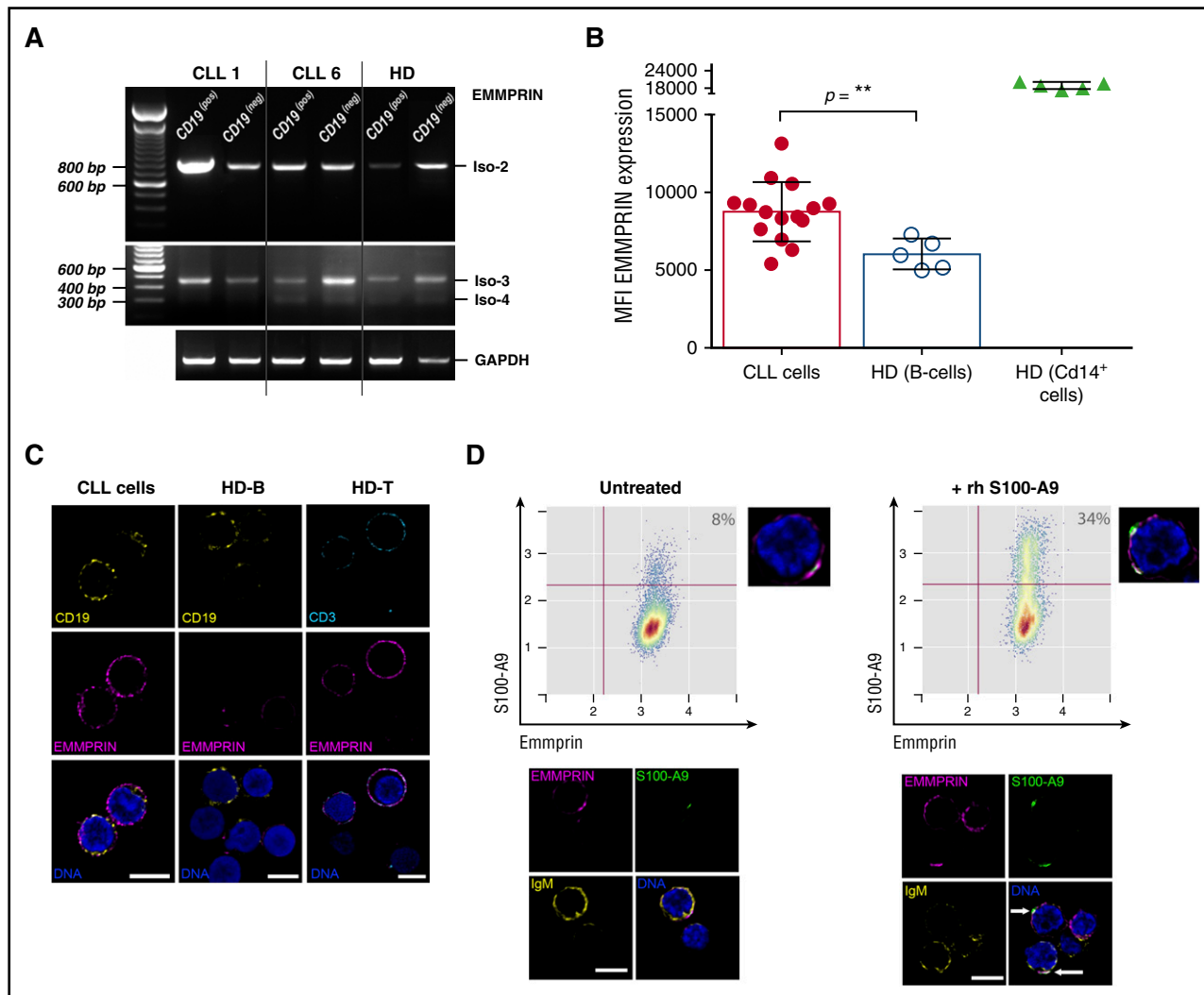
#### S100-A9 receptor EMMPRIN is expressed in leukemic cells and binds S100-A9 in vitro

EMMPRIN is a multifunctional transmembrane protein that regulates cell proliferation and migration and promotes cancer progression.<sup>29</sup> Because it has been shown that S100-A9 is able to bind EMMPRIN, thus mediating inflammation and cancer proliferation,<sup>28</sup> we investigated the expression levels of this protein and its ability to bind S100-



**Figure 3. CLL plasma-derived exosomes show increased levels of S100-A9 protein and are released by CLL cells.** (A-B) S100-A9 quantification from plasma-derived exosomes between the different subgroups; immunoblot analysis was performed after exosome protein separation. A total of 50  $\mu$ g of exosome protein from the different samples was transferred onto nitrocellulose and developed with specific anti-S100-A9 monoclonal antibody. HSP-70 protein was visualized as internal charge control. Values of S100-A9 were normalized to those of HSP-70 accordingly. Results showed that S100-A9 protein was significantly higher in the plasma exosomes at the time of disease progression, whereas no or low presence of this protein was found in the exosomes of the Prog-dt subgroup, the indolent group, or the matched HDs. \* $P < .05$ . (C) Release of S100-A9<sup>+</sup> exosomes by CLL cells; in vitro analysis was performed with CD19<sup>+</sup> cells (100 exp<sup>10</sup> lymphocytes incubated O.N. with anti-IgM 15  $\mu$ g/ml). AIM V medium 10 mL was collected and exosomes purified as previously described in Material and Methods. Results showed that CLL cells release exosomes carrying S100-A9 protein to the culture medium after incubation with anti-IgM. \*S100-A9 homodimer. Immunoblot analysis was performed as described. ns, not significant.

A9 protein in CLL cells. Our results showed that EMMPRIN messenger RNA (mRNA) isoform 2 but not isoform 1 was expressed in the leukemic clone, whereas low mRNA levels of isoforms 3 and 4 were found (Figure 4A). Concerning EMMPRIN protein levels,



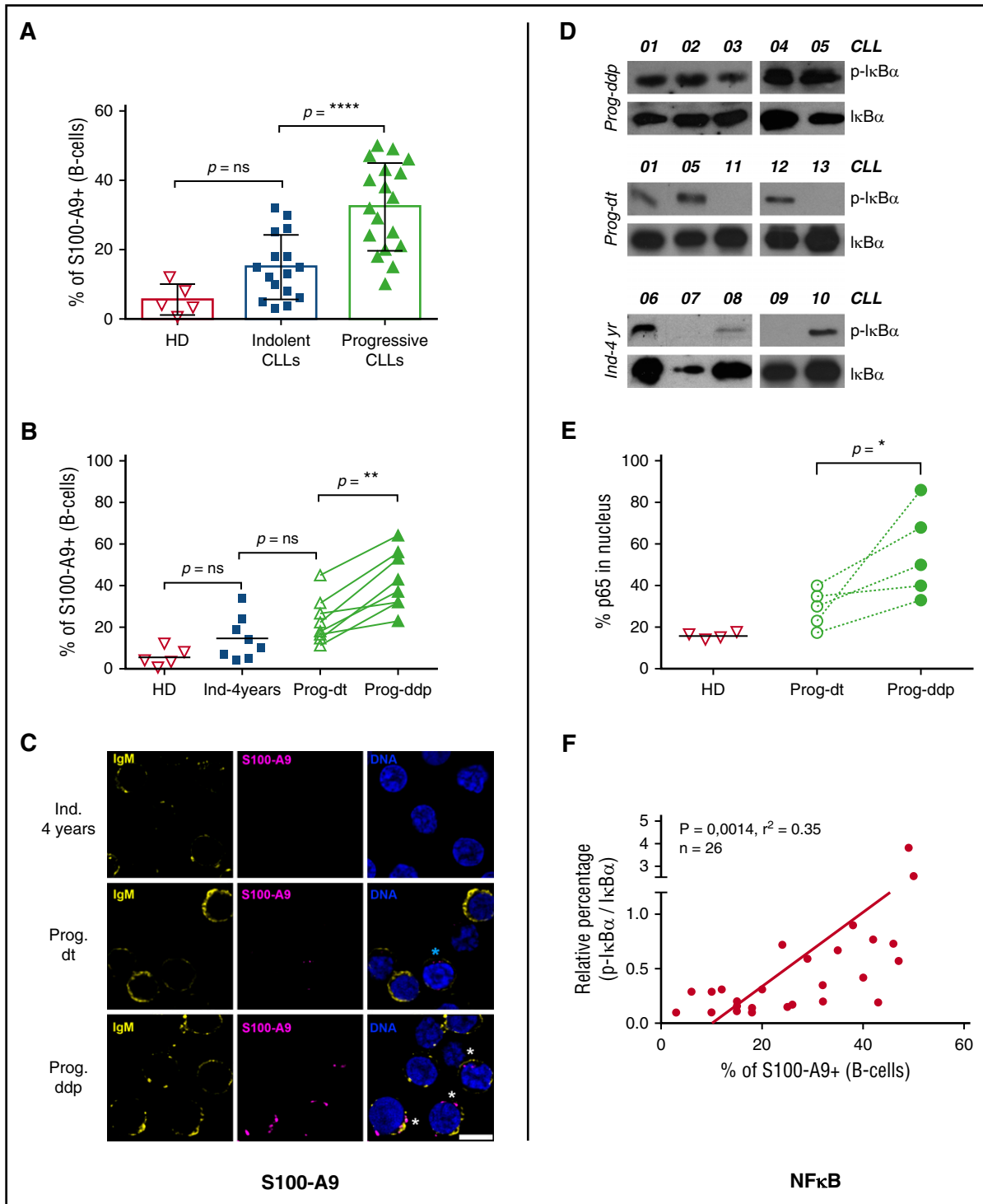
**Figure 4. EMMPRIN expression in CLL cells and S100-A9 binding in vitro.** (A) Reverse-transcription polymerase chain reaction analysis of EMMPRIN mRNA in CLL. EMMPRIN mRNA isoforms 1 to 4 expression was evaluated in MACS-sorted B lymphocytes (CD19<sup>+</sup>) and non-B cells (CD19<sup>-</sup>) as described by Oppezzo et al.<sup>18</sup> EMMPRIN isoform 2 is expressed in leukemic B cells at higher levels than in normal B cells, whereas isoforms 3 and 4 are also expressed but at basal levels. (B) Flow cytometry analysis of EMMPRIN protein levels in B lymphocytes. Median fluorescence intensity analysis of EMMPRIN staining in CLL and HD B cells reveals higher levels of EMMPRIN staining in CLL B cells (mean, 8.751; n = 15) compared with normal B cells (mean, 5.964; n = 5; Mann-Whitney test,  $P = .0037$ ). MFI, mean fluorescence intensity. (C) EMMPRIN in situ immunostaining. Direct in situ immunolocalization of EMMPRIN (magenta) shows higher staining intensities in CLL B cells compared with their normal counterparts (CD19<sup>+</sup> in yellow). EMMPRIN staining in normal T cells (CD3<sup>+</sup> in cyan) was assessed as positive control. Single confocal planes are shown; deconvolution was performed with Huygens Essential 4.5 (Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands; <http://svi.nl>). Scale bar, 5  $\mu$ m. (D) rhS100-A9 B-cell CLL in vitro binding assay. The binding ability of rhS100-A9 (green) on B-cell CLL cells (IgM<sup>+</sup> in yellow) expressing EMMPRIN (magenta) was evaluated on incubation of 10<sup>6</sup> cells with 5  $\mu$ g/mL for 1 hour at 37°C. An increase from basal 8% to 34% of S100-A9<sup>+</sup> cells was found. Flow cytometry analysis was performed with R/Bioconductor. Confocal microscopy analysis showed an increase in S100-A9 immunostaining and suggested colocalization of rhS100-A9 with EMMPRIN receptor, shown in white in the overlaid images (arrows). Deconvolved single confocal planes are shown. Scale bar, 5  $\mu$ m.

flow cytometry analysis showed a significantly higher expression in CLL cells compared with normal B cells (Figure 4B). In contrast, no significant differences were found after comparison of patients with progressive and indolent disease (data not shown). EMMPRIN expression was also characterized in T cells and macrophage/monocyte cells from HDs and patients with CLL. Different expression levels are shown in supplemental Figure 1. Confocal microscopy analysis confirmed the higher expression of EMMPRIN in CLL cells compared with those of HDs (Figure 4C). To elucidate whether EMMPRIN receptor is able to bind S100-A9 in CLL cells, we performed in vitro analysis, incubating PBMCs from progressive CLLs with rhS100-A9. Our results showed a percentage of leukemic cells expressing EMMPRIN that was able

to bind rhS100-A9 (Figure 4D). These results were confirmed by confocal microscopy showing colocalization of rhS100-A9 with EMMPRIN receptor (Figure 4D, arrows).

#### S100-A9 is overexpressed in CLL cells, increases during disease progression, and correlates with NF- $\kappa$ B pathway activation

On the basis of our previous results, we evaluated S100-A9 expression at mRNA and protein levels in the leukemic cells from patients with indolent disease and from the Prog-ddp subgroup. Analysis of S100-A9 mRNA expression demonstrated that gene transcription is increased in CLL cells from patients with progressive disease (supplemental



**Figure 5. Quantification of S100-A9 expression in the leukemic clone.** Flow cytometry analysis of PBMCs was performed evaluating IgM, CD5, and S100-A9<sup>+</sup> cells between HDs and the different CLL subgroups. CD19<sup>+</sup> cells of age-matched HDs were used to obtain reference values, and control isotypes were used for IgM and S100-A9 antibodies. (A) S100-A9 expression in indolent and progressive CLL samples during disease progression. Flow cytometry analysis was performed with specific antibodies, as described in supplemental Table 1. Five age-matched HDs to determine the physiological levels of S100-A9 in B lymphocytes and a total of 16 indolent CLLs and 18 progressive CLLs at the time of progression were evaluated. A significant increase of S100-A9 levels was found in the samples obtained from Prog-ddp CLLs (mean, 32.44) compared with samples from indolent CLLs (mean, 14.98; 1-way analysis of variance [ANOVA],  $P < .01$ ). No significant changes were observed between HD samples compared with indolent CLLs (mean, 5.55 and 14.98, respectively). ns, not significant. (B) S100-A9 protein expression levels in B lymphocytes at different times of disease evolution. Five HDs, 8 Ind-4years, and 8 progressive CLLs at the time of onset and 8 during disease progression were evaluated. A significantly higher level of S100-A9 protein in the leukemic cells from the Prog-ddp samples (mean, 42.50) compared with Prog-dt (mean, 23.24) and with Ind-4years (mean, 14.64) was demonstrated (1-way ANOVA,  $P < .01$ ). No significant differences were visualized comparing the expression of S100-A9 in B lymphocytes (mean, 1.38) with Ind-4years (mean, 14.64) or Prog-dt (mean, 23.24). Microscopy analysis was performed with specific anti-IgM, anti-CD5, and anti-S100-A9 (supplemental Table 1). (C) S100-A9 expression in the leukemic clone was confirmed as a discrete cytoplasmic pattern shown in red color. DNA staining was performed with methyl green as described by Oppezio et al.<sup>22</sup> Gray and white asterisks indicate low and high S100-A9 expression levels, respectively. Scale bar, 5 $\mu$ m (lower right). (D) NF- $\kappa$ B pathway is more activated in the samples of progressive CLLs during disease progression. Characterization of NF- $\kappa$ B pathway activation by immunoblot assays evaluating I $\kappa$ B- $\alpha$  and inhibitory I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation in PBMCs of the different

Figure 2A). At the protein level, our results showed a significant increase in the percentage of cells expressing S100-A9 in samples from patients with progressive disease when compared with those from patients with indolent disease or CD19<sup>+</sup> cells from HDs (Figure 5A). As found with exosomes, there was an increased expression of S100-A9 at the time of progression in Prog-ddp samples compared with the same samples at disease onset (Figure 5B). These results were confirmed by confocal microscopy of PBMCs from the different subgroups (Figure 5C). Representative histograms with different S100-A9 protein expression levels in the different subgroups and in a HD are depicted in supplemental Figure 2. Supporting the hypothesis that S100-A9 is overexpressed in activated CLL cells from patients with progressive disease, we found an increased percentage of S100-A9<sup>+</sup> B cells in lymph nodes (LNs) compared with their tumoral counterparts in the PB of the same patient (supplemental Figure 3). Interestingly, CLL cells from LNs expressing S100-A9 also showed an activated molecular profile, indicated by a higher expression of Ki-67 and survivin proteins when compared with S100-A9<sup>-</sup> CLL cells (supplemental Figure 4).

Because S100-A9 has been reported to increase NF- $\kappa$ B activity,<sup>26,28</sup> we evaluated the activation of the NF- $\kappa$ B pathway in leukemic cells with increased expression of S100-A9. To this aim, we analyzed the Ser32/36 phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  and the nuclear/cytoplasmic ratio of the transcription factor p65 between Prog-dt and Prog-ddp samples. As shown in Figure 5D, differences in I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation at different disease points were found, indicating the release of NF- $\kappa$ B from inhibitory I $\kappa$ B- $\alpha$  during disease progression. Moreover, a comparison of p65 localization between Prog-dt and Prog-ddp samples of the same patient demonstrated a significant increase of this transcription factor in the nucleus of the Prog-ddp sample (Figure 5E; supplemental Figure 1D). Finally, a significant and positive correlation was found between I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation and S100-A9 expression, which suggests a link between this protein and NF- $\kappa$ B activity. Together, these results show that leukemic cells derived from patients with progressive disease express high levels of S100-A9 when compared with indolent CLLs and that this expression is correlated with canonical NF- $\kappa$ B pathway activation.

#### Plasma exosomes with S100-A9 cargo promote NF- $\kappa$ B pathway activation in leukemic cells

S100-A9 is able to activate the NF $\kappa$ B pathway in carcinoma and melanoma cells,<sup>26,30</sup> but little evidence exists regarding its role in CLL. Taking our results into account, we hypothesized that specific expression of S100-A9 in the leukemic clone during disease progression as well as its significant increase in plasma exosomes could be one of the mechanisms triggering NF- $\kappa$ B activation during CLL progression. To evaluate the role of plasma exosomes with S100-A9 cargo regarding the NF- $\kappa$ B pathway, we obtained plasma exosomes from 3 patients with progressive disease (01, 02, and 04) at disease onset (S100-A9<sup>-</sup>) and during disease progression (S100-A9<sup>+</sup>). We incubated PBMCs of 2 patients with no mutation and 1 patient with mutation at time of disease onset and evaluated I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation and p65 nuclear translocation as regards activation of the canonical

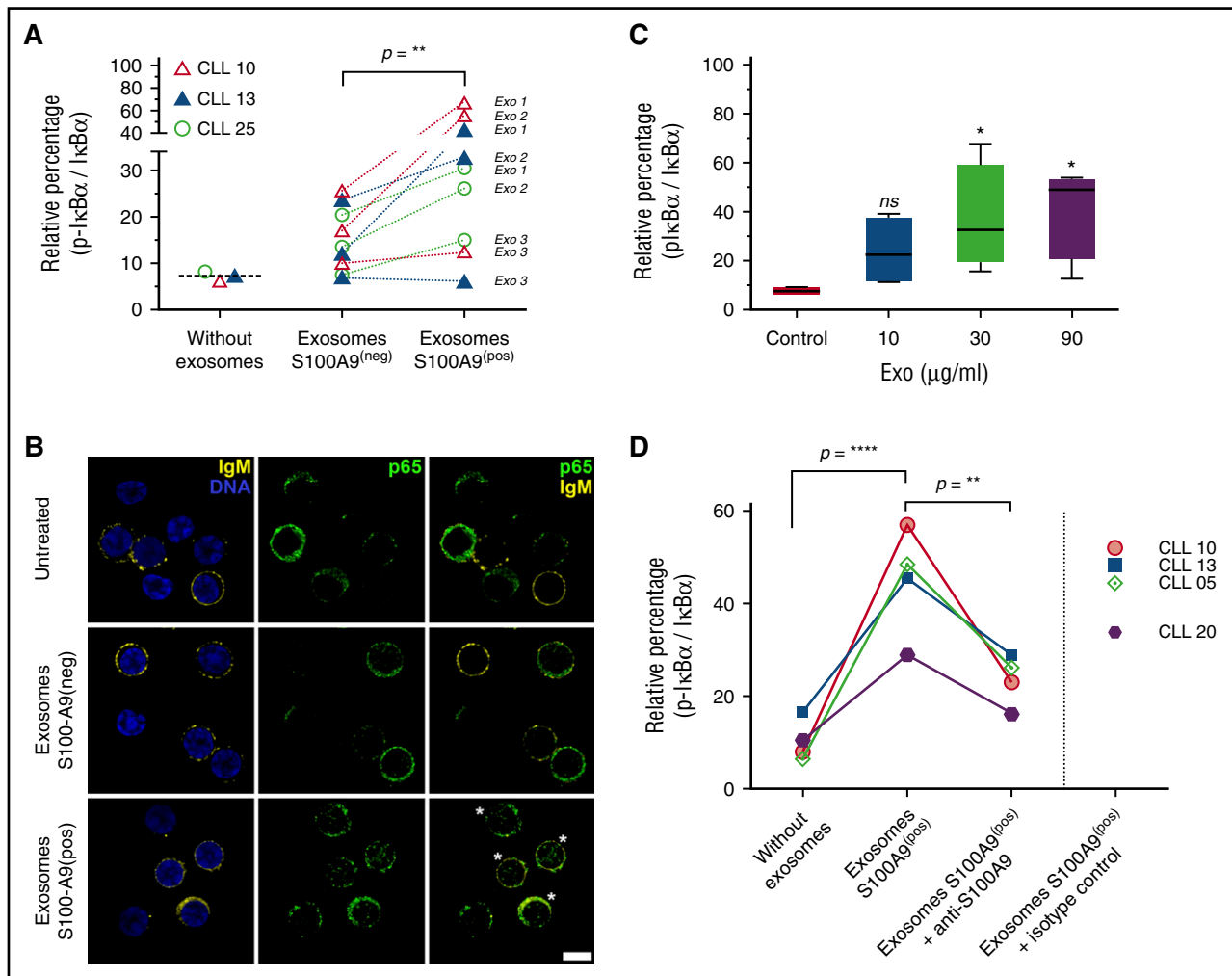
NF- $\kappa$ B pathway and the inducible processing of p100/p52 proteins as regards activation of the noncanonical pathway. Our results showed a clear activation of the canonical NF- $\kappa$ B pathway in at least 2 of the 3 plasma exosomes carrying S100-A9 in the 3 tested patients. As depicted in Figure 6A, a significant increase of I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation was observed after incubation of the exosomes extracted from the Prog-ddp subgroup (S100-A9<sup>+</sup>) but not with plasma-derived exosomes extracted from the Prog-dt subgroup (S100-A9<sup>-</sup>). The canonical NF- $\kappa$ B pathway activation was also confirmed by nuclear localization of p65 in the leukemic cells (Figure 6B). Interestingly, this activation seemed to be specific to the canonical NF- $\kappa$ B pathway but not to the noncanonical pathway (p100/p52 immunoblot analysis in supplemental Figure 5).

To better understand the molecular mechanism of this activation, we also performed in vitro analysis, treating CLL PBMCs at the time of disease progression with different amounts of plasma-derived exosomes carrying S100-A9. Our results suggest that phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  is dependent on S100-A9 plasma exosome dose (Figure 6C). Finally, we preincubated these exosomes with anti-S100-A9 antibody to demonstrate the specificity of NF- $\kappa$ B activation in the leukemic clone. Immunoblot assays showed a decrease of I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation after incubation of PBMCs with S100-A9<sup>+</sup> exosomes that were previously incubated with anti-S100-A9 antibody, which suggests that the interaction between cells and exosomes is blocked by specific anti-S100-A9 antibody. In contrast, high levels of I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation were maintained after incubation of plasma exosomes carrying S100-A9 or with these exosomes previously incubated with an irrelevant isotype control (Figure 6D). Together these results confirm that plasma exosomes carrying S100-A9 protein are able to promote activation of the NF- $\kappa$ B pathway, suggesting a specific role for these exosomes and this protein in CLL progression.

## Discussion

The dynamic interplay between the tumor and its microenvironment orchestrates critical events that contribute to tumor progression and drug resistance.<sup>31</sup> Microenvironment signals are provided not only by cell-to-cell interactions but also by different molecules such as soluble factors (cytokines, chemokines) or EVs, which play a key role in tumor-host crosstalk.<sup>32</sup> Specifically, the functional capacity of exosomes is altered as tumors progress to an aggressive phenotype.<sup>33</sup> We hereby report that plasma-derived exosomes of progressive and indolent CLLs throughout disease evolution display different proteomic profiles. Particularly during disease progression, we found different PPI networks associated with inflammation, tumor progression, leukemic cell infiltration, and cell survival. The PPI network AP-1 transcription factor is activated by inflammation and oxidative stress.<sup>34</sup> In CLL, AP-1 family members have been described as being associated with NF- $\kappa$ B induction after CD40L activation.<sup>35</sup> The other major network highlighted during disease progression is the pathway of class I PI3K signaling events mediated by AKT. This network is associated not only with PI3K/AKT pathway activation but also with canonical NF- $\kappa$ B pathway activation.

**Figure 5 (continued)** subgroups (Prog-dt and Prog-ddp). Representative cases (10 of 20 analyzed patients) as depicted after immunoblot reaction. (E) Increased NF- $\kappa$ B activation in the Prog-ddp subgroup was evidenced after quantification of p65 nucleus/cytoplasm stain ratio from a total of 100 CLL cells (IgM<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup>) in 5 samples from each subgroup (Prog-dt and Prog-ddp; n = 10). Prog-dt samples display a low percentage of cells with the transcription factor p65 in the nucleus (mean, 30) compared with Prog-ddp samples of the same patient (mean, 50; Mann-Whitney test,  $P = .019$ ). Immunofluorescent staining was performed with specific human anti-p65 transcription factor, specific anti-IgM, and anti-CD5 antibodies. (F) Positive correlation of S100-A9 expression with I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation in patients with CLL. The relationship between S100-A9 protein expression and I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation was investigated. A significant positive correlation was detected ( $r^2 = 0.35$ ; Spearman's rank test,  $P < .001$ ).



**Figure 6. Plasma-derived exosomes with S100-A9 cargo promote NF- $\kappa$ B pathway activation in leukemic cells.** (A-B) NF- $\kappa$ B pathway is activated after in vitro incubation with plasma-derived exosomes (Exo) carrying S100-A9. PBMCs of unmutated and mutated CLLs were incubated in RPMI 1640 and fetal bovine serum with plasma-derived exosomes (S100-A9<sup>+</sup>) extracted from Prog-ddp and plasma-derived exosomes without S100-A9 extracted from Prog-dt samples (90 minutes; 60  $\mu$ g/ml of total protein). Negative and positive exosomes were categorized by immunoblot. NF- $\kappa$ B activation was determined as the relative percentage by densitometry of the corresponding signal from phosphorylated I $\kappa$ B- $\alpha$ /total I $\kappa$ B- $\alpha$ . "Without exosomes" indicates basal phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  in the PBMCs of CLLs. Significant changes were observed in the rate of I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation after incubation with S100-A9<sup>+</sup> plasma-derived exosomes compared with their counterparts (S100-A9<sup>-</sup> plasma-derived exosomes; Wilcoxon signed rank test,  $P = .0078$ ). In this experiment, PBMCs at disease onset from 3 different patients, 2 with unmutated and 1 with mutated CLL (CLLs 10 and 13 and CLL 25, respectively) were incubated with plasma-derived exosomes from 3 different CLLs (Exo1, CLL 02; Exo2, CLL 05; Exo3, CLL 07) extracted at disease onset (S100-A9<sup>+</sup>) and during disease progression (S100-A9<sup>-</sup>). NF- $\kappa$ B pathway activation after incubation with plasma-derived exosomes carrying S100-A9 was also evidenced by p65 nuclear translocation. After 2 hours of incubation with plasma-derived exosomes (with or without S100-A9), PBMCs of the 3 CLLs were collected and stained with anti-IgM, anti-CD5, and anti-p65 transcription factor. A representative figure of the 3 patients with CLL studied is provided in Figure 5B. Green color indicates p65, and yellow staining corresponds to IgM<sup>+</sup> cells. DNA staining with methyl green was performed. More than 95% of IgM cells for CLL 10 and 13 and 72% for CLL 25 were positive for CD5 marker (estimated by flow cytometry analysis and confocal microscopy; data not shown). Leukemic cells after incubation with exosomes carrying S100-A9 with increased nuclear localization of p65 transcription factor are highlighted by white asterisks. Scale bar, 5  $\mu$ m (lower right). (C) Phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  in PBMCs of CLL after 90-minute incubation with increasing concentrations of plasma-derived exosomes carrying S100-A9. Data are reported as relative changes of phosphorylated I $\kappa$ B- $\alpha$ /total I $\kappa$ B- $\alpha$ . (D) Monoclonal antibody against S100-A9 was used to block the interaction of S100-A9<sup>+</sup> exosomes with leukemic cells. To confirm the specificity of NF- $\kappa$ B activation, 60  $\mu$ g of CLL plasma-derived exosomes (S100-A9<sup>+</sup>) were extracted from patient 01 and preincubated for 60 minutes with polyclonal antibody anti-S100-A9 at 6°C or with isotype control. Next, PBMCs from 4 different patients were incubated for 90 minutes at 37°C with these cocktails (S100-A9<sup>+</sup> exosomes plus anti-S100-A9 antibody, S100-A9<sup>+</sup> exosomes, and S100-A9<sup>-</sup> exosomes plus isotype control antibody). Low levels of I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation were found after PBMC incubation with anti-S100-A9 (data not shown). This unspecific activation was subtracted to obtain the values corresponding to the "exosomes S100-A9<sup>+</sup> plus anti-S100-A9 group. Our results showed a significant reduction in the ratio p-I $\kappa$ B- $\alpha$  / I $\kappa$ B- $\alpha$  after CLL PBMCs were incubated with S100-A9<sup>+</sup> exosomes plus anti-S100-A9 antibody (mean, 22) compared with CLL PBMCs incubated only with S100-A9<sup>+</sup> exosomes (mean, 44.95; 1-way analysis of variance  $P < .01$ ). Significant differences were found between CLL PBMCs incubated only with S100-A9<sup>+</sup> exosomes compared with untreated CLLs (mean, 10.40; without exosomes).

The importance of synergism between NF- $\kappa$ B and PI3K in CLL<sup>36</sup> and other lymphoid neoplasms<sup>37</sup> has been extensively demonstrated.

To identify the most relevant proteins present in CLL plasma exosomes from patients with progressive disease during disease progression, we focused on the proteins that constantly seemed to be over-represented in progressive samples analyzed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Among the 10 proteins

exclusively present in this subgroup, we focused on S100-A9 protein, which was also found in exosomes secreted by an unmutated CLL, as described by Pagetti et al,<sup>12</sup> whose study proposes that exosomes could induce an inflammatory phenotype in CLL and that the NF- $\kappa$ B pathway is activated in stromal cells. Taking these results into account and our proteomic characterization, we decided to investigate the role of S100-A9 during CLL progression. S100-A9 belongs to a family of

25 homologous intracellular calcium-binding proteins. Although S100-A9 is mainly found in heterodimers with S100-A8 (S100A8/A9, also known as calprotectin), it also exists as a homodimer, with its own functions.<sup>38</sup> Calprotectin and S100-A9 have been largely associated with chronic inflammation and tumor promotion.<sup>4,39</sup> Both molecules are responsible for NF- $\kappa$ B pathway activation, but different receptors are implicated in this process. Calprotectin activates NF- $\kappa$ B through TLR4,<sup>40,41</sup> whereas S100-A9 does so through EMMPRIN receptor.<sup>25,28</sup> Considering that CLL exosomes engage PPI networks associated with PI3K/NF- $\kappa$ B pathways during disease progression, that S100-A9 is 1 of the most representative proteins in exosomes of all progressive samples, and that we did not find S100-A8, we decided to evaluate the correlation between S100-A9 expression and NF- $\kappa$ B activity in the leukemic clone of the different subgroups. Our results showed that the elevated expression of S100-A9 in B cells of patients with disease progression is accompanied by increased activation of the NF- $\kappa$ B pathway. In addition, our results on EMMPRIN expression in CLL suggest that it could be 1 of the possible receptors for S100-A9. Our results showed that EMMPRIN isoform 2 is the main mRNA expressed in CLL cells, which agrees with similar results reported in other cancer cells.<sup>42</sup> High expression of EMMPRIN in CLL cells and its interaction with S100-A9 might implicate a new activation axis for the leukemic clone during disease progression. In this line, we must take into account that EMMPRIN is able to induce MMP production in tumor cells.<sup>4,43</sup> Interestingly, recent studies describe that overexpression of MMP-9 occurs in CLL and that elevated intracellular levels of (pro)MMP-9 correlate with advanced CLL stage and poor patient survival.<sup>4,44,45</sup>

Previous work has shown that S100-A9 is crucial in establishing the premetastatic niche, chemotherapy resistance, and subsequent metastasis in breast cancer<sup>25</sup> and melanoma.<sup>4</sup> The presence of S100-A9 in CLL plasma exosomes, their overexpression during leukemic progression, and the role of this protein in tumor development suggest a role in leukemia promotion and generate new and interesting questions in the pathogenesis of CLL. S100-A9 is required for the recruitment of myeloid-derived suppressive cells (MDSCs) and for suppression of an immune antitumor response.<sup>46</sup> Specifically in CLL, Jitschin et al<sup>47</sup> describe that through a still unknown mechanism, CLL cells are able to induce MDSCs with high expression of indoleamine-2,3-dioxygenase, which in turn becomes responsible for suppression of T-cell activation and induces suppressive regulatory T cells. Our results suggest that this unknown mechanism responsible for MDSC accumulation could originate in CLL cells expressing S100-A9 and/or exosomes carrying this protein. Another interesting question concerns the role that S100-A9 protein expressed in CLL cells could have in interacting with  $\beta$ 2 integrins. It has been demonstrated that S100-A9 mediates neutrophil adhesion to fibronectin through activation of  $\beta$ 2 integrins<sup>48</sup> and that in CLL  $\beta$ 2 integrins are essential for survival and apoptosis resistance.<sup>49</sup> Thus, CLL cells expressing S100-A9 could interact through  $\beta$ 2-integrins with endothelial cells to gain new survival and proliferative signals, as proposed by Maffei et al.<sup>49</sup>

Tumor-released exosomes become an efficient platform for the *in vivo* transfer of soluble crosstalk factors.<sup>50</sup> The function of exosomes seems to be dependent on their protein cargoes and, in turn, dependent on the cell types from which they originate.<sup>6</sup> Our proteomic approach demonstrates that CLL exosomes specifically contain S100-A9 during disease progression and that these exosomes activate the canonical NF- $\kappa$ B pathway. The fact that NF- $\kappa$ B activity is reduced by *in vitro*

incubation of plasma exosomes carrying S100-A9 with specific anti-S100-A9 antibodies confirms these results. Regarding exosome function in CLL, our results support and extend the findings of Paggetti et al,<sup>12</sup> suggesting that exosomes extracted from MEC-1 cells or, as in our case, from the plasma of patients during disease progression are able to activate the NF- $\kappa$ B pathway, not only in stromal cells, as described by Paggetti et al, but also in the leukemic clone. Recently, Peinado et al<sup>4</sup> reported that melanoma-derived exosomes are able to induce the expression of S100-A8/S100-A9 in premetastatic niches after NF- $\kappa$ B activation, which in turn becomes activated by calprotectin and/or S100-A9.<sup>25</sup> According to our results, an analogous loop could be envisaged in CLL when disease progression occurs. Microenvironment signals in the leukemic clone could upregulate S100-A9 expression in CLL cells, which in turn could activate the canonical NF- $\kappa$ B pathway, leading to an increase of proliferation and survival signaling, as suggested by the results analyzing CLL cells in LNs of patients with progressive disease, depicted in supplemental Figures 3 and 4.

In this work, we report for the first time different proteomic profiles of plasma exosomes among indolent and progressive CLLs, as well as within individual patients at the time of disease onset and during disease evolution. We describe the presence of the protein S100-A9 in CLL exosomes as well as an increased expression of this protein in leukemic cells from patients experiencing disease progression. Finally, we demonstrate that exosomes with S100-A9 cargo are able to increase NF- $\kappa$ B activity in CLL cells of patients with typical nonprogressive disease. This report proposes a new origin of NF- $\kappa$ B activation in CLL and highlights the importance of exosomes as extracellular mediators in the promotion of CLL progression.

---

## Acknowledgments

The authors thank Mirta Giordano and Romina Gamberale for critical comments and Hugo Naya for technical assistance in statistical analysis.

This work was supported by grants from Agencia Nacional de Investigación e Innovación (FCE\_1\_2011\_1\_7273 and FMV\_2011\_7323) (P.O.) and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC Proyectos I+D\_2014) (P.O.).

---

## Authorship

Contribution: D.P., N. Sotelo, and N. Seija performed experiments, collected chronic lymphocytic leukemia (CLL) samples, prepared figures, and wrote the paper; S.S. and C.A. performed experiments and collected CLL samples; R.D. and M.G. performed mass spectrometry and proteomic analysis; E.S. performed electronic microscopy analysis; V.I., C.O., A.I.L., R.G., and G.D. performed clinical activities and data collection for patients with CLL; 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.

ORCID profiles: D.P., 0000-0001-8356-1708.

Correspondence: Pablo Oppezzo, Institut Pasteur de Montevideo, Research Laboratory on Chronic Lymphocytic Leukemia, Mataojo 2020, Montevideo (11400), Uruguay; e-mail: poppezzo@pasteur.edu.uy.

## References

- Caligaris-Cappio F, Bertilaccio MT, Scielzo C. How the microenvironment wires the natural history of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Cancer Biol.* 2014;24:43-48.
- ten Hacken E, Burger JA. Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia—focus on the B-cell receptor. *Clin Cancer Res.* 2014;20(3):548-556.
- Abreu C, Moreno P, Palacios F, et al. Methylation status regulates lipoprotein lipase expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2013;54(8):1844-1848.
- Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med.* 2012;18(6):883-891.
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373-383.
- Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 10):1603-1611.
- Saleem SN, Abdel-Mageed AB. Tumor-derived exosomes in oncogenic reprogramming and cancer progression. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(1):1-10.
- Atay S, Godwin AK. Tumor-derived exosomes: a message delivery system for tumor progression. *Commun Integr Biol.* 2014;7(1):e28231.
- Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl).* 2013;91(4):431-437.
- Corcoran C, Rani S, O'Brien K, et al. Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes. *PLoS One.* 2012;7(12):e50999.
- Ghosh AK, Secreto CR, Knox TR, Ding W, Mukhopadhyay D, Kay NE. Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. *Blood.* 2010;115(9):1755-1764.
- Paggetti J, Haderk F, Seiffert M, et al. Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *Blood.* 2015;126(9):1106-1117.
- Ye SB, Li ZL, Luo DH, et al. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget.* 2014;5(14):5439-5452.
- Palacios F, Moreno P, Morande P, 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(22):4488-4496.
- Carvalho PC, Fischer JS, Xu T, Yates JR 3rd, Barbosa VC. PatternLab: from mass spectra to label-free differential shotgun proteomics. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2012;Chapter 13(Unit 13):19.
- Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV, et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat Protoc.* 2016;11(1):102-117.
- Pathan M, Keerthikumar S, Ang CS, et al. FunRich: an open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics.* 2015;15(15):2597-2601.
- Oppezzo P, Vuillier F, Vasconcelos Y, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood.* 2003;101(10):4029-4032.
- Palacios F, Abreu C, Prieto D, et al. Activation of the PI3K/AKT pathway by microRNA-22 results in CLL B-cell proliferation. *Leukemia.* 2015;29(1):115-125.
- Klinke DJ 2nd, Brundage KM. Scalable analysis of flow cytometry data using R/Bioconductor. *Cytometry A.* 2009;75(8):699-706.
- Prieto D, Aparicio G, Morande PE, Zolessi FR. A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. *Histochem Cell Biol.* 2014;142(3):335-345.
- Oppezzo P, Vasconcelos Y, Settegrana C, et al; French Cooperative Group on CLL. The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2005;106(2):650-657.
- Moreno P, Abreu C, Borge M, et al. Lipoprotein lipase expression in unmutated CLL patients is the consequence of a demethylation process induced by the microenvironment. *Leukemia.* 2013;27(3):721-725.
- Simpson RJ, Jensen SS, Lim JW. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics.* 2008;8(19):4083-4099.
- Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(2):96-109.
- Riva M, Källberg E, Björk P, et al. Induction of nuclear factor- $\kappa$ B responses by the S100A9 protein is Toll-like receptor-4-dependent. *Immunology.* 2012;137(2):172-182.
- Zheng X, Beissert T, Kukoc-Zivojinov N, et al. Gamma-catenin contributes to leukemogenesis induced by AML-associated translocation products by increasing the self-renewal of very primitive progenitor cells. *Blood.* 2004;103(9):3535-3543.
- Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S, et al. S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cancer Res.* 2013;73(1):172-183.
- Xiong L, Edwards CK III, Zhou L. The biological function and clinical utilization of CD147 in human diseases: a review of the current scientific literature. *Int J Mol Sci.* 2014;15(10):17411-17441.
- Wu R, Duan L, Cui F, et al. S100A9 promotes human hepatocellular carcinoma cell growth and invasion through RAGE-mediated ERK1/2 and p38 MAPK pathways. *Exp Cell Res.* 2015;334(2):228-238.
- Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol.* 2014;24:71-81.
- Tetta C, Ghigo E, Silengo L, Deregius MC, Camussi G. Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication. *Endocrine.* 2013;44(1):11-19.
- Meehan K, Vella LJ. The contribution of tumour-derived exosomes to the hallmarks of cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2016;53(2):121-131.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010;49(11):1603-1616.
- Mineva ND, Rothstein TL, Meyers JA, Lerner A, Sonenshein GE. CD40 ligand-mediated activation of the de novo RelB NF- $\kappa$ B synthesis pathway in transformed B cells promotes rescue from apoptosis. *J Biol Chem.* 2007;282(24):17475-17485.
- Cuní S, Pérez-Aciego P, Pérez-Chacón G, et al. A sustained activation of PI3K/NF- $\kappa$ B pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia.* 2004;18(8):1391-1400.
- Hussain AR, Ahmed SO, Ahmed M, et al. Cross-talk between NF $\kappa$ B and the PI3-kinase/AKT pathway can be targeted in primary effusion lymphoma (PEL) cell lines for efficient apoptosis [published correction appears in *PLoS One.* 2014;9(3):e92484]. *PLoS One.* 2012;7(6):e39945.
- Srikrishna G. S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. *J Innate Immun.* 2012;4(1):31-40.
- Németh J, Stein I, Haag D, et al. S100A8 and S100A9 are novel nuclear factor  $\kappa$ B target genes during malignant progression of murine and human liver carcinogenesis. *Hepatology.* 2009;50(4):1251-1262.
- Riva M, He Z, Källberg E, Ivars F, Leanderson T. Human S100A9 protein is stabilized by inflammatory stimuli via the formation of proteolytically-resistant homodimers. *PLoS One.* 2013;8(4):e61832.
- Gebhardt C, Riehl A, Durchdewald M, et al. RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development. *J Exp Med.* 2008;205(2):275-285.
- Huang Z, Tan N, Guo W, et al. Overexpression of EMMPRIN isoform 2 is associated with head and neck cancer metastasis. *PLoS One.* 2014;9(4):e91596.
- Sun J, Hemler ME. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res.* 2001;61(5):2276-2281.
- Ugarte-Berzal E, Bailón E, Amigo-Jiménez I, Albar JP, García-Marco JA, García-Pardo A. A novel CD44-binding peptide from the pro-matrix metalloproteinase-9 hemopexin domain impairs adhesion and migration of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *J Biol Chem.* 2014;289(22):15340-15349.
- Kamiguti AS, Lee ES, Till KJ, et al. The role of matrix metalloproteinase 9 in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2004;125(2):128-140.
- Cheng P, Corzo CA, Luetke N, et al. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med.* 2008;205(10):2235-2249.
- Jitschin R, Braun M, Büttner M, et al. CLL-cells induce IDOhi CD14+HLA-DRlo myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote TRegs. *Blood.* 2014;124(5):750-760.
- Anceriz N, Vandal K, Tessier PA. S100A9 mediates neutrophil adhesion to fibronectin through activation of beta2 integrins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354(1):84-89.
- Maffei R, Fiorcari S, Bulgarelli J, et al. Physical contact with endothelial cells through  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-integrins rescues chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug-induced apoptosis and induces a peculiar gene expression profile in leukemic cells. *Haematologica.* 2012;97(6):952-960.
- Iero M, Valenti R, Huber V, et al. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ.* 2008;15(1):80-88.





**blood**<sup>®</sup>

2017 130: 777-788

doi:10.1182/blood-2017-02-769851 originally published  
online June 8, 2017

## **S100-A9 protein in exosomes from chronic lymphocytic leukemia cells promotes NF- $\kappa$ B activity during disease progression**

Daniel Prieto, Natalia Sotelo, Noé Seija, Sandra Sernbo, Cecilia Abreu, Rosario Durán, Magdalena Gil, Estefanía Sicco, Victoria Irigoín, Carolina Oliver, Ana Inés Landoni, Raúl Gabus, Guillermo Dighiero and Pablo Opezzo

---

Updated information and services can be found at:

<http://www.bloodjournal.org/content/130/6/777.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections

[Immunobiology and Immunotherapy](#) (5503 articles)

[Lymphoid Neoplasia](#) (2609 articles)

---

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

[http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#repub\\_requests](http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests)

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://www.bloodjournal.org/site/subscriptions/index.xhtml>