

Evaluación del efecto de las mutaciones generadas por la enzima AID en regiones génicas 3' UTR en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica

Orientador: PhD. Pablo Oppezzo

Laboratorio de investigación en Leucemia Linfocítica Crónica

Institut Pasteur de Montevideo

Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Mayo 2021

Tesina de Finalización de Carrera

María Amparo Rico
Fernandez



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



Agradecimientos

A toda mi familia, que me sostuvo cada día desde el momento en que decidí empezar este camino; han sido los primeros en compartir la alegría de los aciertos y, sobre todo, la desilusión de los fracasos. Sobre todo, a mi mamá y Agus, quienes estuvieron en los momentos más difíciles que atravesé en esta carrera; me animaron a seguir y creyeron en mí más de lo que yo misma pude hacerlo. Este título tiene un pedacito de cada uno de ellos.

A mis amigas, por vivir conmigo todos estos años de crecimiento en todo sentido; por cada charla, cada abrazo y cada salida; por alegrarme los días, y por recordarme que hay vida más allá de una buena calificación.

A Leandro, por ser mi gran compañero; por su paciencia e incondicionalidad en esta última etapa, que tanto ha significado para mí; por entender las ausencias, el cansancio, los malhumores, por transmitirme su tranquilidad en cada momento difícil y confiar plenamente en mí; por nunca dudar de que lo iba a lograr, aun cuando yo sí lo hice; y por caminar conmigo en las etapas que vendrán. También a toda su familia, por recibirme tan cálidamente siempre en su hogar y hacerme sentir una más.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias, sin quienes no estaría aquí hoy; por las horas de estudio compartidas, las charlas, los almuerzos; por haber compartido este proceso desde el inicio, donde crecimos y aprendimos juntos.

A Pablo, por abrirme las puertas de su laboratorio desde el día uno; por su paciencia y generosidad en este proceso de formación, por sus invaluable enseñanzas en la realización y escritura de esta Tesina, y por haber confiado en mí desde el inicio.

A mis compañeros de laboratorio, por el apoyo, por el compañerismo de todos los días, y por hacer las horas de mesada más divertidas; por haber festejado juntos los experimentos que sí salían, y prestar su tiempo y oídos cuando los resultados no fueron los esperados. En especial, a María Elena y Flor, que con mucho cariño y dedicación me han enseñado todo lo que necesitaba saber, quitando tiempo de su propio trabajo, y estuvieron ahí para ayudarme cada vez que cometí un error o se presentó una situación que no supe manejar. Todos han sido un sostén fundamental en este proceso.

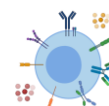
A Leti, por su tiempo y paciencia al enseñarme a largar PCR en tiempo real; por recibirme con una sonrisa cada una de las mil veces que toqué la puerta de su laboratorio.

A Paula, por la dedicación y enorme paciencia al formarme en citometría; por hacerse un tiempo cada vez que me surgía una duda, y por su amabilidad al corregir mis errores.

A Marco, Lucas, Nati, y toda persona que al cruzarme en los pasillos ofreció su ayuda o consejo sobre algún experimento, o simplemente me regaló una sonrisa.

A todos los integrantes de la Cantina, por recibirnos cada día con alegría y ofrecernos lo mejor de sí; por hacer de nuestros almuerzos de los mejores momentos del día.

A toda persona con quien compartí un curso o experiencia y a quien se cruzó en mi camino estos años... todos han sido parte de este logro.



Contenido

Introducción	4
AID en el linfocito B normal	4
Sistema Inmune	4
Desarrollo del linfocito B	5
Activación del linfocito B en el Centro Germinal	6
Mecanismo de acción de AID en los procesos de HMS y CI	8
Rol de AID en oncogénesis: mutaciones <i>off-target</i>	10
Leucemia Linfoide Crónica	11
Generalidades	11
Rol del microambiente en LLC	13
AID y poblaciones proliferantes en LLC	14
Rol mutagénico de AID en LLC	16
Resultados preliminares	18
Mutaciones generadas por AID en 3' UTR	18
Genes con mutaciones en 3' UTR relevantes en LLC	20
Objetivos	22
Objetivos generales	22
Objetivos específicos	22
Materiales y métodos	24
Extracción de ARN de pacientes y síntesis de ADNc	24
PCR a punto final	24
PCR en tiempo real	25
Citometría de Flujo	26
Resultados	27
Discusión y conclusiones	32
Referencias	37

Resumen

La **Leucemia Linfoide Crónica (LLC)** es el tipo más común de leucemia en adultos de países occidentales, con una edad promedio de diagnóstico de 72 años. Se clasifica como un desorden linfoproliferativo, caracterizado por la acumulación de linfocitos B de fenotipo peculiar en sangre periférica, médula ósea, nodos linfáticos y bazo. El curso clínico de la enfermedad es altamente heterogéneo, con la mayoría de sus pacientes transitando una enfermedad indolente, sin indicaciones de tratamiento y sobreviviendo por muchos años; otros, en cambio, sufren una enfermedad más agresiva, requiriendo tratamiento poco después del diagnóstico y con frecuentes recaídas. Entre los indicadores de curso clínico desfavorable más robustos encontrados hasta el momento, después del perfil mutacional de la región variable de la cadena pesada de las Inmunoglobulinas, se encuentra la expresión de la enzima **deaminasa de citidinas inducida por activación, o AID**. La expresión de AID en el linfocito B normal cumple un rol fundamental en la generación de la diversidad de los anticuerpos por su actividad mutagénica sobre los genes de las inmunoglobulinas, mediante los procesos de Hipermutación Somática (HMS) y Conmutación Isotípica (CI). En el linfocito B leucémico, en cambio, su expresión desregulada lleva a la introducción de mutaciones en otros genes, no codificantes para inmunoglobulinas (mutaciones *off-target*), posiblemente con un papel clave en los eventos tempranos de la transformación leucémica, y más tarde en la progresión de la enfermedad. El hallazgo de un importante número de mutaciones generadas por AID en regiones no traducidas del extremo 3' (3' UTRs) de genes de relevancia para la LLC en pacientes progresores con expresión constitutiva de esta enzima nos ha llevado a pensar en un posible mecanismo de regulación de la expresión de estos a nivel postranscripcional, mediado por microARNs específicos, que afecten de alguna manera el estado de activación y/o proliferación celular del linfocito B leucémico. En esta Tesina de Finalización de Carrera de la Licenciatura en Bioquímica nos hemos propuesto el estudio de la expresión de algunos de estos genes, y las posibles implicancias a nivel postranscripcional de los eventuales cambios en la expresión para el linfocito B-LLC.

Palabras clave: Leucemia Linfoide Crónica; linfocito B; microambiente; progresión; AID; mutagénesis; 3' UTR; microARN.

Introducción

AID en el linfocito B normal

Sistema Inmune

El sistema inmune consiste en una colección de células, sustancias químicas y procesos que funcionan para proteger al organismo de antígenos extraños, como microbios (bacterias, hongos y parásitos), virus, células cancerosas y toxinas. Se divide en dos líneas de defensa: inmunidad innata y adaptativa.

Inmunidad innata

La inmunidad innata está compuesta por cuatro tipos de barreras de defensa: anatómica (piel y membranas mucosas), fisiológica (temperatura, pH bajo y mediadores químicos), endocítica y fagocítica, e inflamatoria. Algunos tipos celulares implicados en esta respuesta son: fagocitos (macrófagos y neutrófilos), células dendríticas, mastocitos, basófilos, eosinófilos, células *natural killer* (NKs) y células linfoides innatas. La inmunidad innata contra patógenos depende de la presencia de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés), que permite a un rango limitado de células inmunes detectar y responder rápidamente a un amplio rango de patógenos que comparten estructuras comunes, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés). Ejemplos de estos patrones son componentes de la pared celular bacteriana, como lipopolisacáridos (LPS), o ácido ribonucleico (ARN) doble hebra, producido durante algunas infecciones virales¹.

Una función crucial de la inmunidad innata es el rápido reclutamiento de células inmunes al sitio de infección e inflamación a través de la producción de **citoquinas** y **quimioquinas** (pequeñas proteínas de la comunicación y reclutamiento celular). La producción de citoquinas moviliza diversos mecanismos de defensa en todo el cuerpo, y activa respuestas celulares locales a la infección y lesiones. La acción fagocítica de la respuesta innata promueve la remoción de células muertas o complejos de anticuerpos y remueve sustancias extrañas presentes en órganos, tejidos, sangre y linfa. Además, activa la respuesta inmune adaptativa, a través de la movilización de **células presentadoras de antígenos (APCs, por sus siglas en inglés)**¹.

Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa tiene como funciones principales: el reconocimiento de antígenos extraños, distinguiéndolos de autoantígenos; la generación de vías inmunológicas efectoras patógeno-específicas que eliminan patógenos específicos o células infectadas por patógenos, y el desarrollo de una memoria inmunológica que pueda eliminar rápidamente un patógeno específico ante una eventual infección subsecuente. Las células del sistema adaptativo incluyen **células T** antígeno-específicas, las cuales son activadas para proliferar a través de la acción de APCs, y **células B**, que se diferencian en células plasmáticas (entre otras) para producir anticuerpos.

Las células T (o linfocitos T) derivan de células madre hematopoyéticas en la médula ósea, y luego migran y maduran en el timo. Expresan una serie de receptores de unión a antígenos en su membrana, llamados **receptores de células T (TCRs, por sus siglas en inglés)**. Cada célula T expresa un único tipo de TCR. Requieren de la acción de APCs (generalmente células dendríticas, pero también macrófagos, células B, fibroblastos y células epiteliales) para reconocer a su antígeno específico¹.

Las APCs expresan en su superficie un grupo de proteínas llamado **complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés)**, que presentan fragmentos de proteínas (péptidos)

cuando la célula es infectada por un patógeno. Los MHC se dividen en tipo I y II: los MHC-I se encuentran en todas las células nucleadas, y presentan péptidos endógenos (intracelulares); los MHC-II, en cambio, están presentes únicamente en las APCs y presentan péptidos exógenos (extracelulares) a las células T. Las células T, entonces, son activadas cuando interactúan con una APC que ha digerido un antígeno y presenta los fragmentos peptídicos de dicho antígeno en sus MHC. El complejo antígeno-MHC activa el TCR, y la célula T secreta citoquinas que guiarán la respuesta inmune. Este proceso de presentación de antígenos estimula a las células T para diferenciarse tanto a células T citotóxicas (CD8⁺) como **células T helper (Th, CD4⁺)**. Las primeras están abocadas a la destrucción de células infectadas por agentes extraños, y las segundas median la respuesta inmune al secretar citoquinas que activarán diferentes tipos de células¹.

A diferencia de las células T, las células B (o linfocitos B) pueden reconocer antígenos directamente, sin necesidad de interactuar con APCs, a través de los **receptores de células B** (del inglés, **BCRs**). Su principal función es la producción de anticuerpos contra antígenos extraños. Cuando son activadas por el antígeno para el cual poseen un receptor específico, las células B proliferan y se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos o células B de memoria; las primeras, a diferencia de las de memoria, poseen menor vida media, y suelen morir por apoptosis cuando el agente extraño que indujo la respuesta inmune es eliminado. Sin embargo, producen grandes cantidades de anticuerpos que ingresan a la circulación y tejidos, brindando una protección efectiva contra los patógenos. Es por esto que juegan un papel crucial en la inmunidad humoral o mediada por anticuerpos¹.

Desarrollo del linfocito B

El desarrollo de las células B inicia en el hígado fetal, y continúa en la médula ósea (MO) durante la maduración del embrión de mamífero. A lo largo de los procesos de diferenciación, el microambiente brindado por los diferentes tejidos (el “nicho microambiental”) juega un rol esencial en el aporte de nutrientes, supervivencia y estímulos de desarrollo¹.

Las células madre hematopoyéticas multipotentes dan lugar a los precursores linfoides, que inician un programa de diferenciación irreversible. El desarrollo de las células B a partir de estos está determinado por una serie de factores de transcripción esenciales que determinan el destino celular, a ser el factor de la célula B temprano (del inglés, **EBF1**), **E2A**, y **PAX5**¹.

Todas las células B maduras expresan un anticuerpo unido a su membrana con especificidad individual, formado por dominios de Inmunoglobulinas. Cada **Inmunoglobulina (Ig)** está asociada a cofactores α y β (Ig α e Ig β), los cuales participan en la transducción de señales del receptor de membrana. Estos tres elementos, en conjunto, conforman el BCR. La diversidad de las células B inmunológicamente competentes radica en la variabilidad de su BCR, la cual es consecuencia de procesos de recombinación durante el desarrollo del linfocito B. En dichos procesos, los segmentos génicos localizados en el locus Ig son combinados para dar lugar a genes Ig nuevos e individualmente generados².

Los anticuerpos se componen de cuatro cadenas polipeptídicas de dominios Ig, de las cuales dos son cadenas livianas idénticas (Ig_L), y dos son cadenas pesadas idénticas (Ig_H), unidas por enlaces disulfuro. Las cadenas livianas pueden ser de isotipo κ o λ . A su vez, cada dominio Ig se compone de una región carboxiterminal constante (C) y una aminoterminal variable (V). La región variable contiene cuatro regiones *framework*, separadas por regiones hipervariables, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs, por sus siglas en inglés) 1, 2 y 3^{2,3}.

En el momento en que el precursor de la célula B expresa una cadena pesada y liviana funcionales, que pueden aparearse apropiadamente para formar el BCR, se alcanza el estadio de célula B inmadura, y el BCR se expresa exclusivamente con el isotipo IgM. Luego se dan otros procesos de selección, donde las

células B autorreactivas (aquellas que muestran reactividad hacia autoantígenos, es decir, moléculas propias del organismo que son reconocidas como extrañas) son convertidas a un estado anérgico (es decir, son incapaces de generar una respuesta inmune), o sufren muerte celular por apoptosis. Aquellas células B con BCR funcionales, seleccionadas positivamente, son llamadas células B maduras, *naïve* (en español, vírgenes). Estas abandonan el microambiente de la MO y circulan como linfocitos pequeños, inactivos, en la sangre periférica (SP) y órganos linfoides secundarios (OLS)^{2,3}.

Recombinación V(D)J

Mientras que el gen de la región V_H (pesada) se genera por la recombinación de tres segmentos independientes, llamados variable (V_H), diversidad (D_H) y de unión (J_H), los genes de la cadena liviana de la región V (V_L) se componen sólo de dos segmentos, V_L (variable liviano, del inglés *light*) y J_L (de unión, del inglés *junction*, liviano). La recombinación somática de dichos segmentos es catalizada por las enzimas RAG1 y RAG2. Estas reconocen secuencias señal de recombinación flanqueantes a los segmentos génicos, clivan el ADN en dichos sitios, y generan estructuras de horquilla en los extremos codificantes. Estas estructuras pueden ser resueltas de diferentes maneras para generar elementos palindrómicos. Allí, eventualmente actúan exonucleasas, las cuales remueven arbitrariamente nucleótidos de los extremos de los segmentos que están siendo recombinados, para que luego la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) añada al azar (es decir, sin estar codificados en la línea germinal) nucleótidos a los extremos de los segmentos antes de ser unidos. Finalmente, factores de reparación del ADN completan el proceso de recombinación³. La enorme cantidad de combinaciones posibles de segmentos recombinados, tanto en la región variable pesada como en la liviana, y luego la introducción de nucleótidos al azar en los extremos, constituyen la primera fuente de diversidad de los BCRs.

Activación del linfocito B en el Centro Germinal

Ante el contacto con el antígeno correspondiente, las células B maduras son activadas y migran a las zonas T de los OLS. La interacción con células Th activadas (ver *Inmunidad adaptativa*, pág. 4) provee una mayor estimulación a los linfocitos B e induce la proliferación, llevando a la formación del foco primario. Una fracción de las células B proliferantes se diferencia a células plasmáticas de vida media corta, que secretan anticuerpos de isotipo IgM y por tanto proveen una ola inicial de anticuerpos de baja afinidad. Algunas células B, sin embargo, migran junto con las células Th activadas hacia los folículos B e inician la reacción del centro germinal⁴.

El **centro germinal (CG)** es una estructura histológica transitoria formada en los OLS, generalmente en respuesta a antígenos T-dependientes⁴.

En el CG ocurren los dos procesos de gran importancia para mantener una efectiva respuesta inmune adaptativa: la de **hipermutación somática (HMS o SHM, por sus siglas en inglés)** y el proceso de **conmutación isotípica (CI o CSR, del inglés *Class Switch Recombination*)**.

En el caso de la HMS, los clones de células B aumentan su afinidad luego de este proceso, resultando en la generación de plasmocitos que expresan anticuerpos de alta afinidad, capaces de neutralizar efectivamente los patógenos. En términos histológicos, el CG se compone de una zona oscura o DZ (del inglés, *Dark Zone*) formada por las células B en activa proliferación (centroblastos), y una zona clara o LZ (del inglés, *Light Zone*) en donde las células B que completaron una ronda de proliferación (centrocitos) interactúan con **células dendríticas foliculares (FDCs, por sus siglas en inglés)**, células T y macrófagos, siendo sujetas al proceso de **selección por afinidad**. En la zona oscura, el proceso de HMS introduce mutaciones puntuales, así como pequeñas deleciones, inserciones o duplicaciones en los genes IgV rearrreglados. Estas mutaciones en el gen IgV eventualmente generan cambios en la afinidad del BCR por

su antígeno. Los centroblastos que adquirieron mutaciones migran a la LZ, donde son sujetos a la selección por afinidad; allí interactúan con FDCs que presentan el antígeno en su superficie. Si la afinidad del BCR del centroblasto por dicho antígeno es lo suficientemente alta, este internaliza el antígeno, lo procesa y lo presenta en un complejo péptido-MHC-II a las células Th foliculares (Thf) antígeno-específicas. Por tanto, las células B que expresan BCRs con afinidad apropiada para el antígeno (Ag) así procesado reciben señales de supervivencia y proliferación. De esta manera, las células B-CG sufren múltiples rondas de proliferación, mutación y selección, lo que conlleva a un aumento progresivo de la afinidad del BCR por el Ag correspondiente (**Figura I**)^{2,5}. Las mutaciones introducidas en este proceso constituyen el segundo mecanismo de generación de diversidad de los BCRs.

El otro proceso importante de recombinación del DNA ocurre en los centrocitos, y es conocido como conmutación isotópica (CI). En este caso, las células B *naïve* inicialmente expresando los isotipos IgM e IgD son sometidas a un proceso de corte de doble hebra del ADN y empalme (*splicing*) alternativo, mediante el cual la región constante C μ (que produce un anticuerpo de isotipo IgM) es eventualmente reemplazada por alguno de los segmentos génicos C α , C ξ o C γ (correspondientes a los isotipos IgA, IgE o IgG, respectivamente). Luego de la delección del segmento C μ y C δ , el exón V_HD_HJ_H (que conforma la región variable pesada) será expresado como parte de una cadena pesada que contenga el segmento C_H que reemplazó al segmento C μ . El cambio de clase lleva a cambios en la competencia de señalización del BCR, y a modificaciones en las funciones efectoras del anticuerpo^{2,3}.

Luego de varios ciclos de proliferación, mutación y selección positiva, las células B-CG se diferencian a plasmocitos secretores de anticuerpos, o bien a células B de memoria inactivas, que abandonan el microambiente del CG⁶.

Ambos procesos, HMS y CI, son dependientes de la enzima **AID** (del inglés, *Activation-Induced Cytidine Deaminase*, o en español, **deaminasa de citidinas inducida por activación**)⁶. A modo de simplificar la nomenclatura, nos referiremos a esta enzima, de ahora en más, como AID.

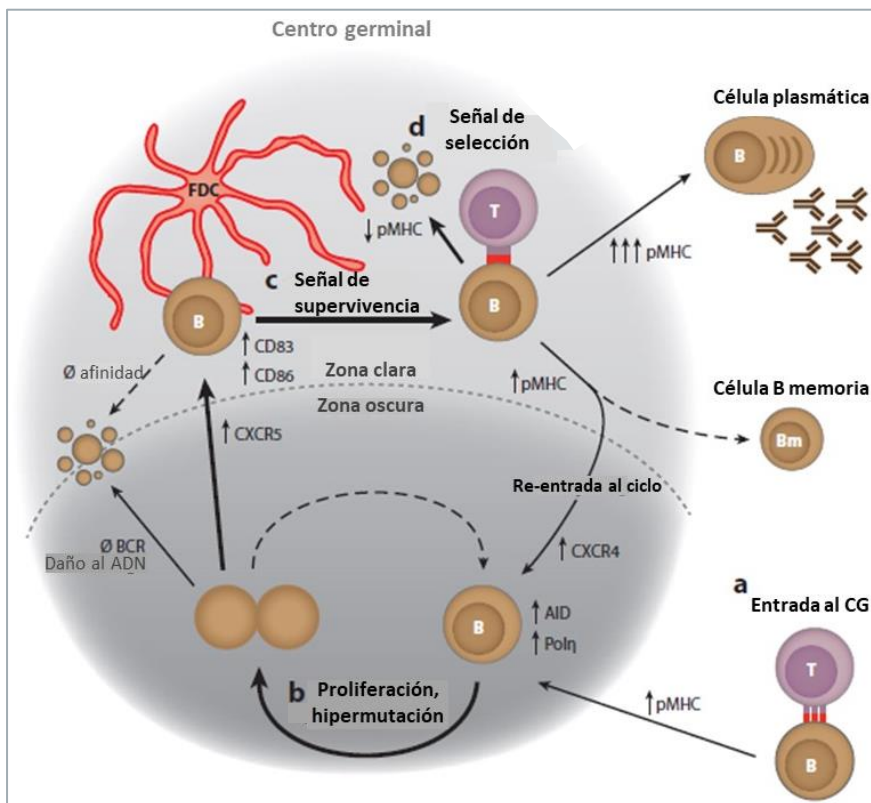


Figura I: representación del modelo propuesto para el proceso de selección por afinidad en el CG (adaptado de Victora y Nussenzweig, 2012⁶). a: las células B compiten por un número limitado de células T en la frontera T:B. b: las células del CG en la DZ proliferan y sufren HMS. Estas células se mantienen en la DZ por su alta expresión del receptor de quimioquinas CXCR4. Luego de una ronda de división y mutación, las células B DZ migran a la LZ a través de la sobreexpresión del receptor de quimioquinas CXCR5. c: las células B interactúan con su antígeno en los complejos inmunes de las FDCs. Todas las células que migran a la LZ sobreexpresan CD83 y CD86. La afinidad por el BCR determina el nivel de expresión del complejo péptido-MHC (p-MHC) en la superficie de la célula B. d: las

células B que presentan su antígeno compiten por la colaboración T.

Mecanismo de acción de AID en los procesos de HMS y CI

La enzima AID forma parte de una familia de deaminasas de polinucleótidos junto con las enzimas APOBEC, la mayoría de las cuales catalizan la conversión de C (citidina o citosina) a U (uracilo). AID es el único factor específico de las células B de vertebrados. En las células B, la actividad deaminasa de AID se concentra en las regiones variable (IgV) y de *switch* (en español, cambio) o S de los loci Ig para iniciar los procesos de HMS y CI. Con una frecuencia menor pero consecencial, AID también actúa sobre una serie de loci genómicos, no de inmunoglobulinas, usualmente llamados **off-targets**, que le adjudican a esta enzima una actividad oncogénica (ver más adelante)⁷⁻⁹.

La regulación de la expresión del gen *Aicda* (codificante para AID) combina factores actuando en *cis* y en *trans*, así como microARNs que regulan la estabilidad del ARN mensajero (ARNm) resultante (ver *Mutaciones generadas por AID en 3' UTR*, pág. 18, para una mayor comprensión del mecanismo de acción de los microARNs)⁹.

AID deamina las citosinas en el ADN simple hebra (ADNsh), más eficientemente dentro de pequeñas burbujas de ADN¹⁰, como las que se generan durante el proceso de transcripción del ADN; es por esto que la transcripción es un factor que aumenta fuertemente la actividad de AID sobre el ADN. AID muestra preferencia por la deaminación de citosinas ubicadas en el contexto de un motivo específico, **WRC** (siendo W=A/T, R=A/G), denominados *hot spots* ("puntos calientes"). Posiblemente, la actividad enzimática de AID esté modulada de acuerdo a su ubicación e interacción con el sustrato⁹.

Los residuos U generados por AID pueden estimular múltiples vías de reparación del ADN, incluyendo la **vía de reparación de mismatches (MMR)**, por sus siglas en inglés) y la **vía de reparación por escisión de bases (BER)**, por sus siglas en inglés) (**Figura II**)⁹. El término *mismatch*, proveniente del inglés, refiere a un error en el apareamiento entre dos bases según las reglas de Watson y Crick.

En la vía MMR, el error de apareamiento entre U y G es detectado por el heterodímero MutS α , formado por los monómeros MSH2 y MSH6. MutS α recluta a MutL α (formado por MLH1 y PMS2) y a la exonucleasa 1 (Exo1). La actividad exonucleasa de PMS2 luego cliva el ADN de la región que se encuentra hacia el 5' respecto al *mismatch*, creando un vacío en la hebra de ADN, que reclutará a Exo1. La exonucleasa inicia, entonces, la resección del hueco, pasando por el sitio del *mismatch*, creando una región extendida de ADN simple hebra. Luego, el factor PCNA recluta a la polimerasa δ (Pol δ), de alta fidelidad, la cual repara la región simple hebra sintetizando su complementaria, y la ligasa 1 (Lig1) finaliza la reparación⁹. Mediante este mecanismo, la mutación es reparada correctamente, con una muy baja tasa de error.

Por otro lado, en la vía BER, la U es reconocida por la enzima UNG (uracil-DNA glicosilasa). Esta enzima cliva el enlace glucosídico que une la base nitrogenada (uracilo) con la desoxirribosa del ADN dejando, entonces, un sitio abásico que es reconocido por APE1/2 (endonucleasa de sitio apurínico/apirimidínico 1/2). La polimerasa β (Pol β) y una ligasa son reclutadas; Pol β remueve la desoxirribosa 5' e inserta un solo nucleótido, seguido de la ligación^{9,11}.

Ambas vías reparan con alta fidelidad los errores en el ADN; por tanto, se requieren vías no canónicas, propensas a errores, para la introducción de mutaciones (transiciones o transversiones) en los procesos de HMS y CI.

Una vía de MMR no canónica ha sido propuesta por Peña-Díaz et al.¹²: esta vía utiliza a PCNA ubiquitinada (PCNA^{Ub}) para reclutar a la Polimerasa η (Pol η , polimerasa de baja fidelidad), y es dependiente de la actividad endonucleasa de PMS2/MLH. Durante la HMS, en lugar de MutL α se recluta a APE2 al *mismatch*, y esta recluta a Exo1. Luego, a través de la ubiquitinación de PCNA, Pol η es reclutada, en lugar de Pol δ . Esta resintetiza el hueco en el ADN introduciendo mutaciones, las cuales se dan principalmente en residuos A:T.

Por otro lado, en la vía BER no canónica durante la SHM, algunos sitios abásicos sirven como moldes no informativos (ya que en la hebra complementaria se introducirán nucleótidos sin un molde que indique el nucleótido correspondiente). La enzima REV (polimerasa reclutada por la ubiquitinación de PCNA), entonces, inserta residuos dCMP en la nueva hebra de ADN opuesta al sitio abásico. Luego de una siguiente ronda de replicación del ADN, esto resulta en una transversión estable en el sitio original del par de bases C:G^{9,12}.

En cuanto al proceso de CI, este consiste en una reacción de deleción y recombinación que se da como resultado de la generación de cortes doble hebra en las regiones S precedentes a cada gen C_H (región constante de la cadena pesada) de las Igs. Las regiones S son elementos repetitivos del ADN, conservados, reconocidos por AID. Una vez que comienza la transcripción a partir de un promotor específico del gen C_H correspondiente, las hebras del ADN se separan; AID es reclutada a la región S, simple hebra, y deamina los residuos C específicos, para dar residuos U. Si dos U se generan lo suficientemente próximos en las dos hebras opuestas, mediante la vía BER se generan cortes doble hebra. Luego, los extremos generados por dos cortes doble hebra en diferentes regiones S son eventualmente unidos mediante los mecanismos de **unión de extremos no homólogos (NHEJ**, por sus siglas en inglés) canónico o alternativo^{9,13}.

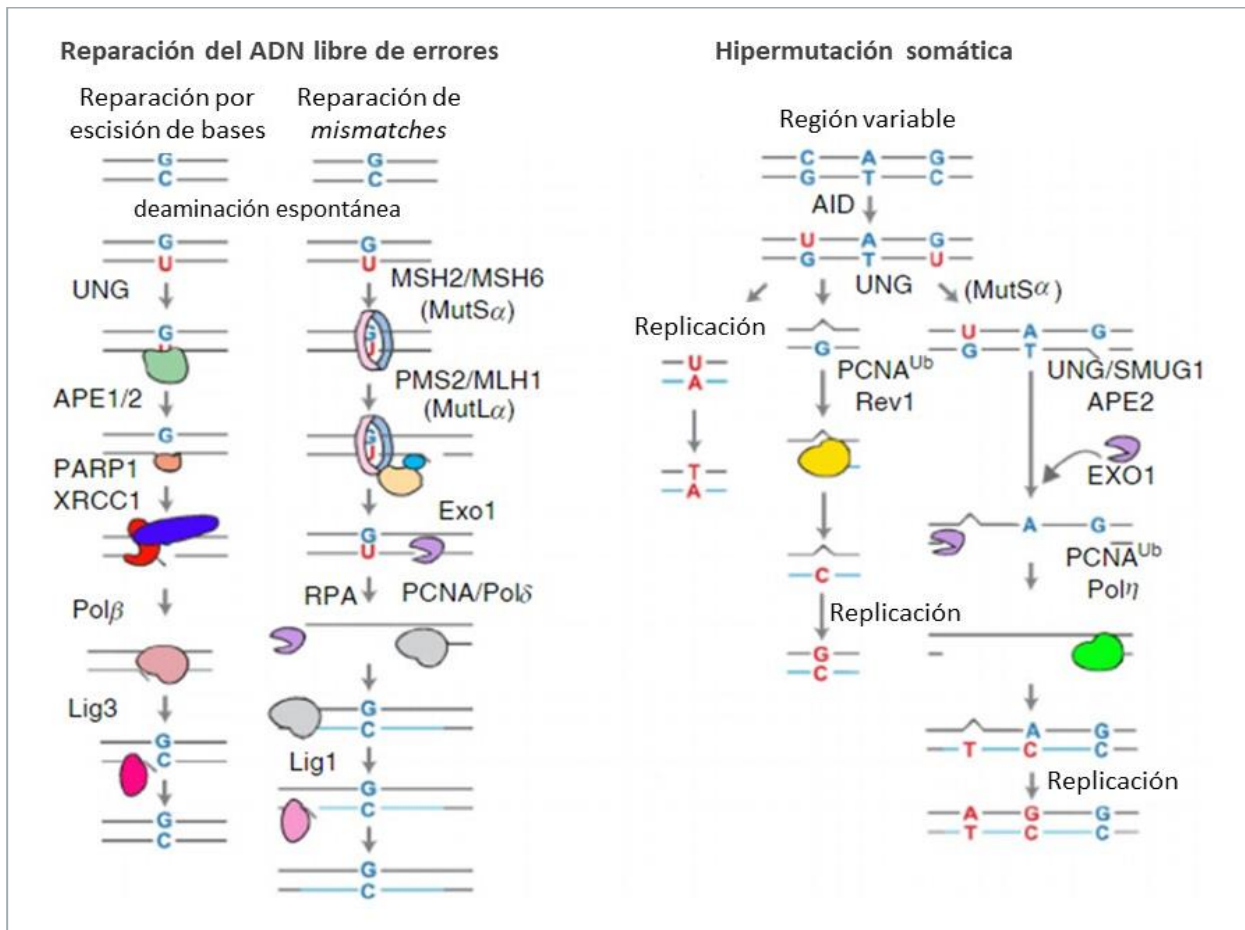
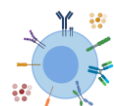


Figura II: vías bioquímicas canónicas de reparación del ADN por escisión de bases (BER), reparación de mismatches (MMR) e HMS (adaptado de Methot y Di Noia, 2016⁹). La vía BER es iniciada por UNG, creando un sitio abásico que es reconocido por APE1/2, la cual corta el ADN hacia el 5' del sitio abásico. Otros factores son reclutados, y reclutan a PCNA y Polβ. Polβ remueve la deoxirribosa en 5' e inserta un único nucleótido, seguido de la ligación. En la vía MMR, MutSα reconoce el error en el apareamiento U:G y recluta a MutLα, quien escinde nucleótidos hacia el 5' del mismatch vía PMS2. Exo1 crea una región extendida de ADN simple hebra. PCNA recluta a Polδ para replicar sobre la región simple hebra y la Ligasa1 finaliza la reparación. Durante la SHM, el U actúa como molde para la replicación, llevando a una transición C-T. Alternativamente, la vía BER no canónica lleva tanto a transiciones como transversiones. MutSα inicia la reparación mutagénica, afectando los pares A:T. Ambas vías reclutan polimerasas de baja fidelidad (Polη, ζ, ι) a través de la ubiquitinación de PCNA (PCNA^{Ub}).



Rol de AID en oncogénesis: mutaciones *off-target*

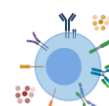
Como fue explicado en la sección anterior, en condiciones fisiológicas, la expresión de AID debe estar estrictamente regulada, y sólo es inducida transitoria y específicamente en las células B activadas en el CG para estimular los procesos de HMS y CI. Los mecanismos de regulación de AID son diversos y complejos, y han sido descritos en excelentes revisiones que pueden ser consultadas^{9,14}, por lo que no serán ahondados aquí.

Si bien originalmente se creía que AID actúa específicamente en las regiones V y pre-*Switch* de los genes de las Igs, recientemente se ha reunido evidencia de que AID también deamina otros genes que, de no ser correctamente reparados, pueden ser oncogénicos^{15,16}. Por tanto, se cree que la desregulación de AID podría tener un rol crítico en el origen y la evolución de los linfomas¹⁴ (a modo de aclaración, se define como linfoma a toda neoplasia hematológica desarrollada a partir de linfocitos¹⁷, siendo la Leucemia Linfocítica Crónica uno de ellos (ver más adelante)).

En cuanto a la evidencia acerca del vínculo entre la acción de AID y la generación y evolución de los linfomas, en su trabajo publicado en 2003, Okazaki y colaboradores demostraron una correlación directa entre la expresión desregulada de AID y la tumorigénesis, utilizando un modelo de ratones AID-transgénicos, en el cual el gen *Aicda* se encuentra bajo el control del promotor de actina, conduciendo a su expresión ubicua y constitutiva. Los ratones en cuestión desarrollaron múltiples microadenomas de pulmón y ocasionalmente adenocarcinomas, carcinomas hepatocelulares, melanomas y sarcomas¹⁸. Con este y otros trabajos¹⁹⁻²¹ se ha demostrado que la expresión constitutiva de AID es potencialmente deletérea, tanto para las células B como para células no B, ya que puede introducir cortes doble hebra en el ADN, no sólo en las regiones IgV o S de los genes de Ig, sino también en otros genes, incluyendo oncogenes, lo cual podría inducir aun más translocaciones cromosomales y mutaciones puntuales²². Se cree que cuando estas mutaciones y/o translocaciones generan una ventaja de supervivencia en la célula B, y de alguna forma esta logra pasar por alto señales de muerte celular preestablecidas, se obtienen células descontroladas a nivel molecular que podrían tener un rol en la generación o en la progresión del tumor.

Refiriéndonos a linfomas de células B maduras en particular, una característica común de todos estos es la presencia de translocaciones cromosomales recíprocas entre el locus Ig y un proto-oncogén, como las translocaciones *c-myc/IgH* en BL (linfoma de Burkitt), *Bcl2* en FL (linfoma folicular), *Bcl6* en DLBCL (del inglés, Diffuse Large B Cell Lymphoma, o en español: linfoma difuso de células B grandes), entre otros^{23,24}. Se ha observado que, como resultado de estas translocaciones, el oncogén queda sujeto al control del locus Ig activo, llevando a la expresión constitutiva y desregulada del gen translocado. Se cree que estas translocaciones son resultado de procesos de HMS y CI aberrantes²⁵. Además de las translocaciones, el proceso de HMS descontrolado también parece contribuir a la patogénesis de los linfomas, al mutar genes no Ig. Más aun, múltiples proto-oncogenes son hipermutados en linfomas de células B derivadas del CG, como DLBCL y BL²⁶. Se ha demostrado en numerosos trabajos que la HMS aberrante en células B normales y tumorales afecta muchos proto-oncogenes y genes supresores de tumores, como *Myc*, *Igα*, *Pax5*, *Bcl6*, *Rhoh* y *Pim1*²⁵⁻²⁸. Adicionalmente, en el último trabajo publicado por nuestro grupo²⁹ se presenta evidencia de la firma de AID en estas mutaciones *off-target* (ver *Rol mutagénico de AID en LLC*, pág. 15).

En suma, se cree que es posible que AID posea una función dual en el desarrollo de linfomas de células B: en el desarrollo inicial del tumor por las translocaciones cromosomales, y en la progresión de este, a causa de la introducción de mutaciones puntuales¹⁶.



Leucemia Linfoide Crónica

Generalidades

La **Leucemia Linfoide Crónica (LLC)** es una neoplasia de células B CD5-positivas (CD5⁺), que se caracteriza por la acumulación de linfocitos tumorales pequeños, de apariencia madura, en la sangre, MO y tejidos linfoides. Esta acumulación resulta en una linfocitosis (aumento de la cantidad o proporción de linfocitos en la sangre) que se diagnostica en un análisis de rutina, y que muchas veces puede llevar a la infiltración de la célula leucémica en la MO, o a la generación de linfadenopatía (aumento de volumen o inflamación de los ganglios linfáticos) y esplenomegalia (aumento del volumen del bazo por encima de sus dimensiones normales), palpables en una examinación física. Los síntomas de la enfermedad incluyen fatiga, pérdida de peso involuntaria, sudoraciones nocturnas excesivas, y frecuencia aumentada de infecciones. Algunos pacientes pueden presentar síntomas de una citopenia inmune (definiéndose como citopenia a toda afección que implique un número de células sanguíneas menor a lo normal, como por ejemplo anemia hemolítica autoinmune o púrpura trombocitopénico autoinmune)³⁰.

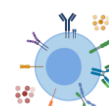
Epidemiología

En cuanto a la epidemiología de la enfermedad, la incidencia promedio de la LLC varía entre individuos de diferentes regiones geográficas, desde un 0,01% en individuos de Asia oriental hasta un 0,06% (6/100.000 habitantes/año) en individuos de Europa y Estados Unidos. Constituye el tipo de leucemia más frecuente en países occidentales, constituyendo el 40% de todas las leucemias en individuos mayores de 65 años. El riesgo de desarrollar LLC es aproximadamente dos veces mayor en hombres que en mujeres, y se incrementa con la edad: la edad media al momento del diagnóstico va desde 70 a 72 años^{31,32}.

Diagnóstico

La LLC es normalmente detectada por un aumento en el número de linfocitos en sangre por encima de los 3500 por microlitro (μL). El diagnóstico inicial requiere la detección de más de 5000 células por μL de células B-LLC clonales, las cuales expresan bajos niveles de Ig de membrana. Las células LLC típicamente expresan **CD5** (glicoproteína normalmente expresada en la superficie de linfocitos T maduros, con un rol fundamental en su diferenciación hacia células T reguladoras naturales, y también sobreexpresada luego de la activación de linfocitos B normales³³); **CD23** (también conocido como receptor Fc-IgE de baja afinidad, expresado en células B maduras, macrófagos activados, FDCs, entre otros³³), y poseen una baja expresión de la molécula **CD19** (miembro del complejo CD19/CD21, que participa en las vías de señalización por el BCR³³), en comparación con el linfocito B normal³⁰. También muestran bajos niveles de **CD20** (presente en todas las células B normales, con un rol en el desarrollo y diferenciación de estas hacia células plasmáticas³³); no expresan CD10 (propia de linfocitos, macrófagos, granulocitos, entre otros, con función hidrolasa de péptidos inflamatorios y vasoactivos³³), y no se tiñen con el anticuerpo monoclonal FMC7 (que reconoce un epítipo de CD20)³⁴. Además, expresan el antígeno de membrana onco-embriionario **ROR1**^{35,36}.

La LLC se divide en dos grandes grupos, que difieren en su comportamiento clínico. Ambos se diferencian por la expresión, en las células LLC, de la región variable de la cadena pesada del gen de las inmunoglobulinas (IgV_H), clasificándose como **mutado (LLC M)** o **no mutado (LLC NM)**, según presenten diferencias en la secuencia mayores al 2% con respecto a la línea germinal, lo cual parecería reflejar la etapa en la diferenciación de la célula B normal a partir de la cual se originaron^{37,38} (**Figura III**). Pacientes



con perfil NM suelen mostrar una enfermedad más agresiva que aquellos que expresan un IgV_H mutado³⁰.

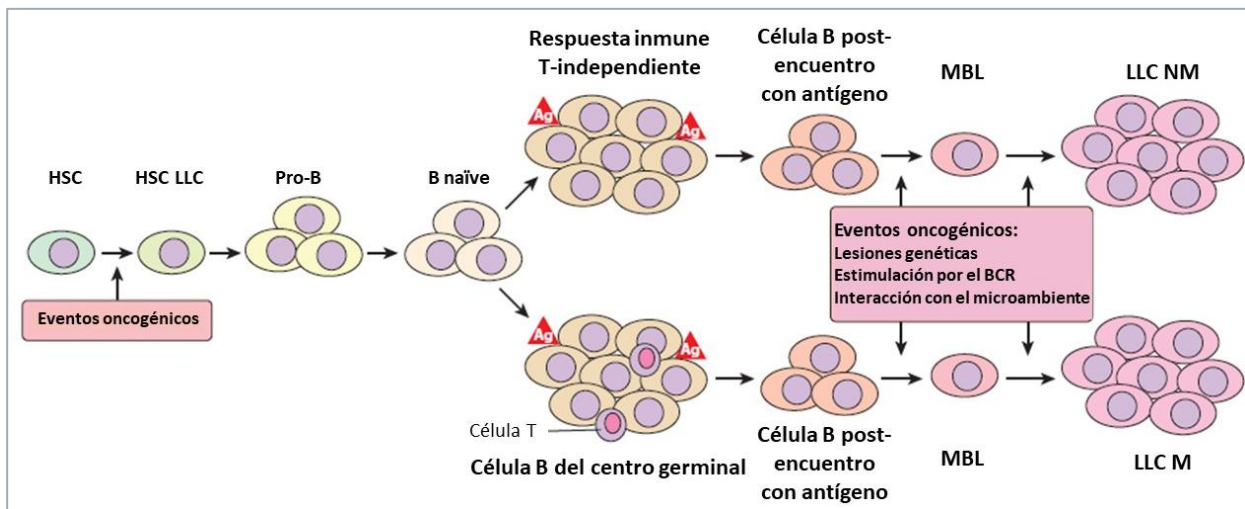


Figura III: modelo del desarrollo de la Leucemia Linfocítica Crónica (adaptado de Zhang y Kipps, 2014³⁹). Las mutaciones que contribuyen al desarrollo de la LLC pueden darse en cualquier estadio de diferenciación de la célula B, incluyendo las células madre hematopoyéticas (HSCs, por sus siglas en inglés). Las HSCs con mutaciones oncogénicas eventualmente dan lugar a células B con ventajas de crecimiento/supervivencia, las cuales, ante una estimulación T-dependiente o independiente, pueden llevar a la linfocitosis de células B clonales (del inglés, MBL). Las células LLC que se originan de células B que han sufrido mutación somática en sus inmunoglobulinas expresan IgV_Hs mutados (LLC M), mientras que las LLC que se originaron de células B que no han sufrido mutaciones somáticas expresan IgV_Hs de la línea germinal (LLC NM). La expansión de un clon LLC se asocia con la acumulación *de novo* de lesiones genéticas adicionales, así como interacciones continuadas entre las células leucémicas y células accesorias y antígenos (Ags) en el microambiente leucémico de los tejidos linfoides⁴⁰.

Existen dos sistemas de clasificación clínica para dividir a los pacientes con LLC en tres grandes grupos^{41,42}: el sistema Rai es más utilizado en Estados Unidos, mientras que la clasificación Binet predomina en Europa. Ambos sistemas reconocen la importancia de la función de la MO y definen a la enfermedad en estadio avanzado, o de alto riesgo, por la presencia de anemia o trombocitopenia pronunciadas. Lo interesante aquí es que el curso clínico de una LLC recién diagnosticada es extremadamente variado: algunos pacientes permanecen sin síntomas y son plenamente activos por décadas, mientras que otros rápidamente se vuelven sintomáticos o desarrollan una enfermedad de alto riesgo, lo cual requiere tratamiento poco después del diagnóstico y puede resultar en la muerte por complicaciones relacionadas al tratamiento y/o a la enfermedad en sí misma. Es por esto que durante décadas se han buscado parámetros o marcadores que permitan predecir el curso clínico de los pacientes; algunos parámetros asociados con un peor pronóstico son: sexo masculino, edad mayor a 65 años y comorbilidades médicas. Desde el punto de vista molecular, podemos resaltar los siguientes marcadores de mal pronóstico: 1) expresión de un IgV_H1-02 no mutado, o IgV_H 2-21 mutado; 2) positividad para la expresión proteica de **ZAP-70**^{43,44}, **CD49d** o **CD38** (ver *AID y poblaciones proliferantes en LLC*, pág. 13); presencia de la deleción (17p) (38), de la deleción (11q) (123), o Trisomía 12; 4) altos niveles de β2-microglobulina sérica; 5) cariotipo complejo (entendiéndose por esto la presencia de tres o más aberraciones cromosómicas); y 6) un alto recuento absoluto de linfocitos (más de 5000 células por μ L) con una tasa de duplicación alta, y/o enfermedad de estadio avanzado en la presentación inicial³⁰.

BCR y señalización en la célula B

Las células de LLC típicamente coexpresan los isotipos IgD e IgM, aunque en bajos niveles en comparación con una célula B normal. Un bajo porcentaje de los casos de LLC expresa isotipos con

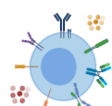
cambio de clase, más comúnmente IgG^{45,46}. Existe evidencia que sugiere que las Ig de membrana de las células B-LLC poseen afinidad por autoantígenos, lo cual lleva a una señalización del BCR constitutiva *in vivo*^{47,48}; la importancia de esta interacción es resaltada por el éxito clínico que han tenido los inhibidores de kinasas que bloquean esta señalización, aunque los efectos en otros receptores también podrían jugar un rol. La profundización en los tratamientos disponibles hoy en día para la LLC escapa a los objetivos de la Introducción a esta Tesina, por lo que quedan a disposición revisiones y artículos que pueden consultarse⁴⁹⁻⁵¹.

La activación aumentada de la célula B es más comúnmente observada en casos de LLC que expresan un IgV_H no mutado, mientras que la anergia predomina en la mayoría de los casos de LLC que expresan IgV_H mutado⁵². La anergia es un estado de letargo celular inducido por la activación crónica de los receptores de antígenos en ausencia de una colaboración de células T adecuada. Las células anérgicas son menos propensas a proliferar en respuesta a la señalización por el BCR que las células más activadas, lo cual podría explicar, en parte, la observación de que pacientes que expresan un IGV_H mutado suelen cursar una enfermedad más indolente que aquellos con perfil no mutado³⁰.

Rol del microambiente en LLC

Las células de LLC dependen de señales de supervivencia que reciben en los tejidos linfoides de células adyacentes no neoplásicas dentro del microambiente tumoral (**Figura IV**). Las células B-LLC siguen gradientes de quimioquinas hacia los nodos linfáticos, donde forman los “centros de proliferación”⁴⁷, diferentes a los centros germinales normales. En estos centros de proliferación, las células LLC contactan células estromales no malignas, **células nurse-like (NLCs)**, también conocidas como macrófagos linfoma-asociados), células T y células estromales derivadas del mesénquima. El encuentro con el Ag o un posible autoantígeno se da eventualmente durante este tránsito, estimulando así la activación de la célula LLC y su proliferación. Solo un bajo porcentaje de células LLC prolifera en un momento dado; el resto, o bien no son estimuladas, o son conducidas a un estado de anergia⁵². Sin embargo, dentro de los centros de proliferación, todas las células LLC son expuestas a quimioquinas, integrinas, citoquinas y factores de supervivencia (como los factores BAFF y APRIL, de la superfamilia de ligandos de factores de necrosis tumoral, TNF), los cuales activan las vías conocidas como factor nuclear κ B canónico (NF κ B)⁴⁷ y Pi3K/AKT⁵³, antes de salir a la sangre.

La activación de NF κ B puede inducir la expresión del mir-155 (molécula de microARN, ver *Mutaciones generadas por AID en 3' UTR*, pág. 17), el cual estimula la señalización y activación del BCR⁵⁴. Las citoquinas secretadas por las células T, como IL-4, pueden aumentar la expresión de la IgM de membrana, lo cual podría facilitar la interacción de la célula LLC con su Ag⁵⁵, o aumentar la expresión de AID a través de la vía JAK/STAT6, llevando a la proliferación celular y a la consecuente posibilidad de incorporar nuevas mutaciones o translocaciones que aumenten la progresión tumoral o la resistencia al tratamiento^{29,50}. Además, la producción de varias proteínas WNT por las células del microambiente puede activar las vías de señalización Wnt canónica y no canónica^{56,57}, lo cual también lleva a la estimulación celular, así como a la proliferación y migración de la célula LLC⁵³.



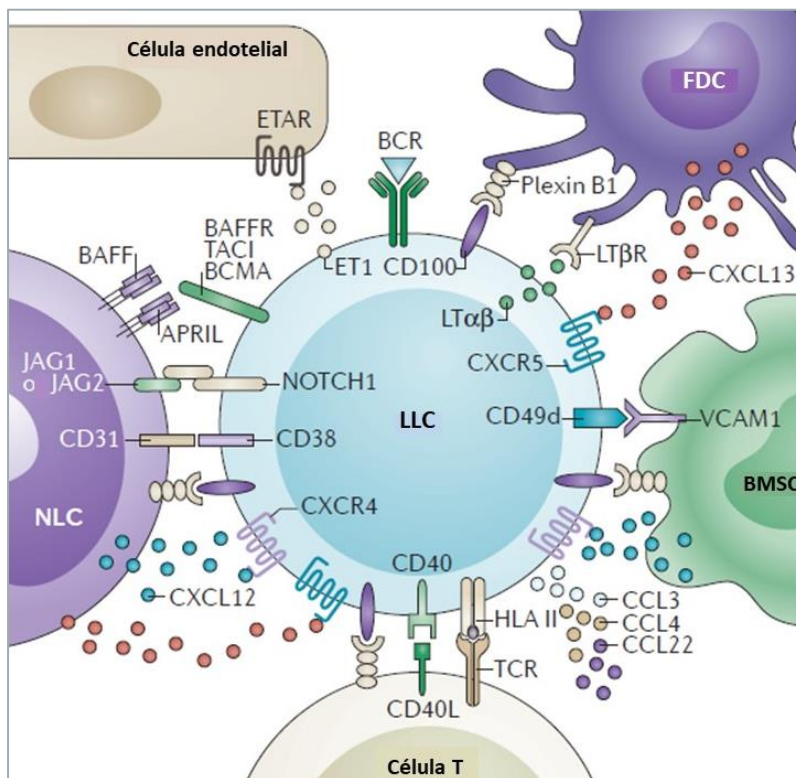


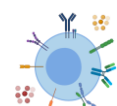
Figura IV: microambiente de la célula LLC (adaptado de Fabbri y Dalla Favera, 2016⁵⁸). La migración de la célula LLC hacia el tejido linfóide es mediada por CXCR4 en respuesta a CXCL12, secretado por las NLCs, y también vía CCR7 en respuesta a CCL19 y CCL21, producidos por las células de las vénulas endoteliales (HEVs). Las células endoteliales HEV también expresan hialuronano, el cual interactúa con CD44 para facilitar la señalización de la célula B y posiblemente potenciar la producción de la MMP9 (metaloproteínasa de matriz). Algunas de las quimioquinas que promueven la supervivencia de la célula B-LLC son CXCL12, BAFF y APRIL. La supervivencia también es promovida por la interacción CD31-CD38, y por la producción de factores WNT por células estromales, que interactúan con ROR1/2 y receptores Frizzled. El contacto de la célula LLC con células mesenquimales estromales también se da por interacciones VCAM1 (proteína de adhesión celular vascular 1)-integrina $\alpha 4\beta 1$, que contribuyen a la

supervivencia. Las células LLC pueden secretar CCL3/4, las cuales reclutan células T y monocitos al microambiente. Células T activadas pueden proveer señales de proliferación a través de interacciones CD40L-CD40 y de la secreción de citoquinas como IL-2, IL-4 e IL-10. Las células LLC secretan CCL12/22, que atraen más células T al microambiente. En los tejidos, las células LLC pueden ser expuestas a (auto)antígenos que, eventualmente, estimulan la activación B por interacciones con la Ig de membrana, lo cual podría aumentar la respuesta de la célula LLC a las señales y factores proveídos por el microambiente LLC.

A medida que las células LLC abandonan el tejido, el encuentro con el Ag será transitorio, y sus efectos probablemente se revierten en la sangre, llevando a aumentos variables en la expresión de IgM de membrana y del receptor de quimioquinas **CXCR4** (molécula implicada en el mantenimiento de la retención de la célula B y su contacto con elementos estromales de los tejidos linfoides sólidos)⁵⁹. La expresión de CXCR4 en la célula LLC es disminuida ante la exposición al ligando de quimioquina CXCL12⁶⁰, producido por las NLCs⁶¹. Por tanto, las células LLC en la sangre que recientemente han abandonado el tejido linfóide expresan bajos niveles de CXCR4 y altos niveles de CD5, relativos a las células LLC que van en camino a reingresar a los compartimentos linfoides⁶². Por razones aún no comprendidas, un alto nivel de expresión de CXCR4 en las células LLC circulantes se asocia con un peor pronóstico en pacientes con perfil IgV_H mutado, posiblemente influenciando la reentrada de las células a los centros de proliferación⁶².

AID y poblaciones proliferantes en LLC

Hoy en día es ampliamente aceptada la visión de la LLC no como una enfermedad estática sino dinámica, compuesta por grupos de células proliferantes y sobrevivientes a la apoptosis, y el balance entre dichos grupos determina, al menos en parte, la tan heterogénea evolución clínica entre los pacientes^{63,64}. Esto fue demostrado por primera vez en 2005 por Messmer et al. ⁶⁵, quien mostró que las células leucémicas de cada paciente analizado poseen tasas de reproducción definibles y sustanciales, que varían entre 0,1% y 1,0% de la totalidad del clon por día. Con este y otros trabajos relacionados^{66,67} se postuló que los pacientes con mayores tasas de proliferación celular sufren una enfermedad más agresiva y de peor respuesta al tratamiento que aquellos con una tasa menor de proliferación.



A partir de este descubrimiento, muchos esfuerzos se han hecho por conocer las características de estas poblaciones proliferantes. Se ha probado que existe un subgrupo de células LLC proliferantes que sobreexpresan distintas moléculas indicadoras de una activación mediante señalización por el microambiente. Por ejemplo, se identificó una estrecha asociación entre la expresión del marcador **CD38**, niveles aumentados de **Ki-67** (antígeno asociado a la proliferación) y **ZAP-70** (tirosina quinasa expresada normalmente cerca de la superficie de los linfocitos, crucial en la señalización de la célula T)⁶⁸. CD38 es una molécula implicada en procesos de señalización y activación, y es también un marcador pronóstico en la LLC³⁸ (ver *Genes con mutaciones en 3' UTR relevantes en LLC*, pág. 19). Esto sugiere que la fracción positiva para CD38 (CD38⁺) contiene miembros más activados, y podría entrar al ciclo celular más frecuentemente que su contraparte negativa⁶⁸. También se ha visto que las células B-LLC CD38⁺ sobreexpresan el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), lo cual se asocia con una expresión aumentada de la proteína antiapoptótica **MCL1**⁶⁹.

Por otro lado, trabajos de nuestro laboratorio han descrito un subgrupo diferente de células LLC proliferantes en pacientes progresores y de muy mal pronóstico clínico, que muestran un perfil IgV_H no mutado y expresión de AID en los linfocitos tumorales de SP. Se ha visto que estas células sufren un proceso activo de CI, ya que expresan tanto IgM como IgG en su superficie (IgM⁺/IgG⁺), y expresan, además, marcadores de proliferación y activación celular, como la proteína **Ki-67**, **CD49d**, **BCL-2**, el oncogen **c-myc**, y **Survivina** (una proteína miembro de la familia de inhibidores de la apoptosis). Además de ello, esta subpoblación muestra niveles disminuidos de **p27^{Kip1}**, una proteína inhibidora del ciclo celular, característicos de un comportamiento de activa proliferación^{53,70}. Si bien el rol de esta subpoblación en activa proliferación aun no se comprende completamente, se cree que podría tener un papel adyuvante en el mantenimiento de otras subpoblaciones proliferantes de LLC.

Por otro lado, en 2011 Calissano et al. describió otro subgrupo de células LLC proliferantes, que también expresan AID⁶². En este trabajo se caracterizaron los compartimentos proliferante y quiescente, en función de las diferencias en la densidad de expresión de **CD5** y de **CXCR4**⁶². Se postuló que una alta densidad de CD5 indicaría activación celular, tal como ocurre en las células B normales, y que niveles bajos de CXCR4 indicarían células que han internalizado el receptor como resultado de un evento de activación, y por tanto han salido del tejido linfóide a la periferia⁶². Se propone que la totalidad de las células LLC se muestra como un continuo entre las fracciones **CXCR4^{bajo}/CD5^{alto}**, **CXCR4^{int}/CD5^{int}** y **CXCR4^{alto}/CD5^{bajo}**: en un extremo se encontraría la población proliferante, altamente enriquecida en células jóvenes que acaban de abandonar el tejido linfóide sólido, donde ocurrió la activación y proliferación; el otro extremo correspondería a la población quiescente, compuesta de células más viejas, menos robustas, que probablemente han estado circulando en la sangre por más tiempo y apelan, a través de sus altos niveles de CXCR4, a migrar a un nicho de tejido sólido para escapar a la muerte^{16,62}.

En una línea similar, el grupo de Huemer et al, utilizó otro marcador de activación celular, **CD86** (sobreexpresado en células B que están sufriendo división en las zonas clara y oscura de los CGs), para identificar la fracción proliferante⁷¹. Encontraron que la expresión de Ki-67 es más alta en las células LLC **CD86^{alto}/CXCR4^{bajo}** que en su contraparte **CD86^{bajo}**. Esta fracción proliferante también expresa AID, y coincide con la fracción **CXCR4^{bajo}/CD5^{alto}** descrita por Calissano et al.⁶². Adicionalmente, resultados de nuestro laboratorio, no publicados aun, muestran que la subpoblación proliferante IgM⁺/IgG⁺ descrita previamente muestra también una alta expresión de las moléculas CD5 y CD38, así como una baja expresión de CXCR4. Estos datos sugieren la correlación entre la expresión de AID, CD5 y CD38 con moléculas representativas de una activación tumoral de las células LLC en el centro proliferante. Más importante aun, estos resultados muestran que la sobreexpresión de AID es la principal característica común de estas subpoblaciones proliferantes, y plantea una pregunta de gran importancia en lo que



respecta a la evolución de la LLC: *¿es la expresión aberrante de AID, mantenida en el tiempo en pacientes con alta linfocitosis, responsable de una mayor progresión tumoral, originada por mutaciones no específicas en genes que no son de Igs?*^{16,29}. De ser esto así, sería razonable asumir que la progresión de la enfermedad podría estar relacionada a la evolución clonal de estas células proliferantes, y que la expresión constitutiva de AID en la historia del clon leucémico sería un evento clave en la progresión de la enfermedad¹⁶.

Rol mutagénico de AID en LLC

Al igual que en los linfocitos B normales, la expresión de AID es regulada en el estado de activación celular en las células B-LLC. Se asume que las células LLC en sangre que expresan AID se han dividido recientemente y han emigrado de los tejidos linfoides, principalmente nodos linfáticos (a saber por la mayor tasa de división celular en dicho sitio)⁷². La fracción de células activadas, AID⁺, es pequeña y varía con el tiempo^{73,74}; la presencia y los niveles de miembros intraclonales AID⁺ se correlacionan directamente con un peor curso clínico y menor supervivencia¹⁶. Esto aplica principalmente a pacientes con un perfil IgV_H no mutado (que poseen mayores niveles de AID), como también a la fracción de pacientes con perfil mutado, en donde también se ha descrito la expresión de AID. Además, los niveles de AID se correlacionan con anormalidades citogenéticas asociadas a un peor desarrollo clínico y, en conjunto, derivan en un menor tiempo al primer tratamiento⁷³.

Es razonable pensar que dicha pequeña fracción AID⁺, que está contenida casi exclusivamente en la fracción proliferante (recientemente dividida) del clon leucémico y acaba de completar una ronda de replicación de su DNA, tiene la mayor probabilidad de haber desarrollado una lesión genética que resulta en la progresión de la enfermedad. Es por esto que esta fracción es especialmente peligrosa¹⁶. Esta hipótesis se basa en los estudios realizados por los grupos de Chiorazzi y Oppezzo, en donde se muestra que la tasa diaria de división de la célula leucémica, que se correlaciona con el nivel de expresión de AID, está asociada a marcadores de mal pronóstico (perfil IgV_H no mutado, altos niveles de ZAP-70 y CD38^{65,75}) y predice el tiempo requerido al primer tratamiento.

En adición a esto, resultados del trabajo de Bagnara et al.⁷⁶ muestran que el proceso mutacional de AID continúa luego de la transformación leucémica dentro de miembros individuales del clon leucémico, incluyendo aquellos en los cuales el clon clínicamente definido es clasificado como no mutado. Por tanto, se hipotetiza que también podrían estar afectados genes no Ig por este proceso mutacional⁷⁶.

El genoma de la LLC se caracteriza por la presencia de alteraciones estructurales y un amplio rango de mutaciones, que resultan en un paisaje genómico muy heterogéneo. La presencia de anormalidades cromosómicas, junto con el perfil mutacional del gen IgV_H, son de los predictores más fuertes del curso clínico⁷⁷: aproximadamente un 80% de los pacientes con LLC presentan al menos una de las cuatro alteraciones cromosómicas más comunes⁷⁸, y la tasa de mutación promedio en LLC va desde 0,4 a 2,1 alteraciones por megabase^{79,80}. En términos generales, un genoma de LLC típico posee aproximadamente 2500 lesiones moleculares, siendo esta carga mayor en pacientes con perfil mutado (3000 mutaciones/megabase) que los de perfil no mutado (2000 mutaciones/megabase)⁷⁷.

Si bien la mayoría de los pacientes con LLC presenta alguna de las anormalidades cromosómicas más recurrentes, cuando se trata de variantes de un sólo nucleótido (del inglés, SNVs: *Single Nucleotide Variants*), solo unas pocas muestran una recurrencia mayor al 5% en los pacientes¹⁶. Además, existe un gran número de genes mutados a frecuencias menores que aún no se han caracterizado biológica y/o clínicamente¹⁶.

En concordancia con la gran heterogeneidad clínica de los pacientes con LLC, el paisaje genómico de la LLC es complejo, con una enorme lista de genes (en continuo crecimiento) mutados a bajas frecuencias.

Dentro de este paisaje heterogéneo, hay una serie de lesiones genéticas compartidas por las diferentes malignidades de células B que afectan mecanismos y procesos similares, como la reparación del ADN y la señalización por el receptor de antígenos, lo cual indica cierto grado de coincidencia en algunas vías involucradas en linfomagénesis^{81,82}. Las mutaciones más frecuentes en LLC afectan genes como **Notch** (de la vía de señalización celular NOTCH, crucial en la comunicación célula-célula, que involucra mecanismos de regulación génica que controlan múltiples procesos de diferenciación celular durante la vida embrionaria y adulta⁸³), **Sf3b1** (codificante para el factor de *splicing* 3b1, que forma parte del complejo de pequeñas ribonucleoproteínas nucleares, implicadas en procesos de corte y empalme del ARN⁸⁴) y **Birc3** (codificante para BIRC3, proteína implicada en la regulación de la apoptosis, así como en la señalización inflamatoria e inmunidad, proliferación celular, invasión celular y metástasis⁸⁵), y han sido reportadas en un 2-10% de los pacientes⁸⁶. La frecuencia de mutaciones de los genes conductores del cáncer, a excepción de **Myd88** e **Igll5**, han sido asociados con una enfermedad progresora, de alto riesgo, o perfil no mutado^{87,88}.

Una cuestión curiosa relacionada a la actividad de AID en linfomagénesis es el desacoplamiento entre la expresión de AID y la HMS^{46,89,90}, y el hecho paradójico de que la actividad de AID se encuentra enriquecida en casos de LLC con perfil IgV_H no mutado⁹¹. La contribución de las aberraciones subclonales a la patogénesis de la LLC está siendo cada vez más aceptada, debido a trabajos importantes en el área^{77,92}. Con esto se propone que las lesiones clonales, que causan mayormente cambios estructurales, generalmente corresponden a eventos conductores más tempranos, mientras que las lesiones subclonales en genes conductores (como *Notch1* o *Sf3b1*) son adquiridas más tarde en el curso de la enfermedad⁹³⁻⁹⁵.

En suma, se cree que AID podría jugar un rol importante en el origen de la leucemia, pero principalmente que el efecto acumulativo de mutaciones en el tiempo en las fracciones proliferantes contribuiría a la mutagénesis y posterior progresión tumoral, facilitando así la emergencia de nuevos subclones involucrados en, incluso, la refractoriedad (reaparición de la enfermedad o de sus signos y síntomas luego de un período de mejora) al tratamiento¹⁶.

En cuanto a las mutaciones con firma de AID en LLC, Kasar et al. demostró que, del total de mutaciones somáticas encontradas en una cohorte de LLC de pacientes indolentes, el 25% mostraban *firmas* de AID, es decir, evidencia de que la mutación fue generada por AID, (tanto **canónica** (c-AID, que representa el cambio introducido por AID en el *hot spot* WRC, pudiendo ser sustituciones C-G o C-T) como **no canónica** (nc-AID, que representa el cambio A-C en el contexto WA)), de las cuales 20% son nc-AID, y 5% son c-AID⁷⁹. Es decir, en pacientes con una LLC indolente, la firma de AID predominante sería la no canónica. Sin embargo, de las mutaciones con firma nc-AID, solo un 60-70% se ha comprobado que se deban a la acción de AID, mientras que las restantes podrían ser resultado de otros factores mutagénicos (a ser radiación UV, envejecimiento, entre otros)⁹⁶. En adición a esto, la relevancia de estos datos en pacientes indolentes resulta cuestionable, dado que, como hemos mencionado, AID es un indicador de mal pronóstico en LLC y se ha demostrado que su expresión se ve aumentada en pacientes progresores.

En línea con esto, nuestro grupo realizó estudios en ratones con LLC, a los que se indujo la sobreexpresión de AID, demostrando que la principal firma de AID es canónica²⁹ (a diferencia de los datos de Kasar et al. en pacientes LLC indolentes, donde se vio que la firma predominante es la no canónica). Posteriormente, se realizó la búsqueda de mutaciones en una cohorte de LLC humana, esta vez de pacientes progresores, con expresión de AID mantenida (y en altos niveles) en SP. Los datos obtenidos coinciden con los del modelo murino, siendo la firma c-AID la predominante. Más importante aun, los genes con firma c-AID encontrados en ratones son, en gran parte, genes de relevancia funcional



en la progresión clínica de la LLC, como **MCL1**, **PIM1**, **CD38**, entre otros²⁹. Al día de hoy, cómo esta actividad canónica de AID influencia el estado mutacional del genoma de LLC y, en consecuencia, el curso de la enfermedad a largo plazo, sigue siendo una pregunta sin responder¹⁶.

Resultados preliminares

Mutaciones generadas por AID en 3' UTR

En un trabajo de Maestría en Ciencias Biológicas previo a mi llegada al laboratorio, el MSc. Seija realizó el análisis de un **secuenciado masivo del exoma (WES**, del inglés, *Whole Exome Sequencing*) sobre una cohorte de dos grupos de pacientes: grupo A) cinco pacientes con LLC clínicamente progresores y con necesidad de tratamiento, perfil IgV_H no mutado, y con alta expresión de AID en SP; grupo B) cinco pacientes con perfil no mutado, clínicamente indolentes y, por ende, sin necesidad de tratamiento, que no expresaron AID en SP en ninguna de las evaluaciones periódicas (cada 6 meses) durante 3-4 años. En los pacientes del grupo A), la expresión de AID fue evaluada cada 6 meses durante un periodo de 3-4 años, siendo posible, de esta manera, seleccionar aquellos pacientes con expresión de AID mantenida en el tiempo. De ambos grupos, a su vez, se tomaron muestras al tiempo del debut (inicio de la enfermedad), y durante la progresión o evolución de esta (según se trate de pacientes progresores e indolentes, respectivamente). Por tanto, se secuenciaron 4 grupos de muestras, cada uno de los cuales se compone del *pool* (agrupamiento) de los cinco pacientes. Además, para cada muestra se secuenció el ADN de células no tumorales, CD3⁺/CD19⁻, de todos los pacientes implicados, como control negativo⁹⁷.

Del análisis del secuenciado se obtuvo una lista de genes que contienen mutaciones con firma de AID, presentes en los *pool* de pacientes AID⁺ (y ausentes en los AID⁻), al momento del debut y que se mantienen durante la progresión. Si bien estos resultados forman parte de la Tesis de Maestría antes mencionada, mi trabajo de Tesina y futuro trabajo de Tesis de Maestría pretenden evaluar el rol funcional e impacto biológico de algunas de las mutaciones originadas por AID en algunos de los genes previamente descritos.

Uno de los resultados de mayor interés obtenidos de este proyecto ha sido la observación de un incremento significativo de mutaciones *off-target* de AID en la **región no traducida del extremo 3' (3' UTR**, del inglés *Untranslated Region*) en comparación a las encontradas en la región no traducida del extremo 5' (5' UTR) (**Figura V**)⁹⁷.

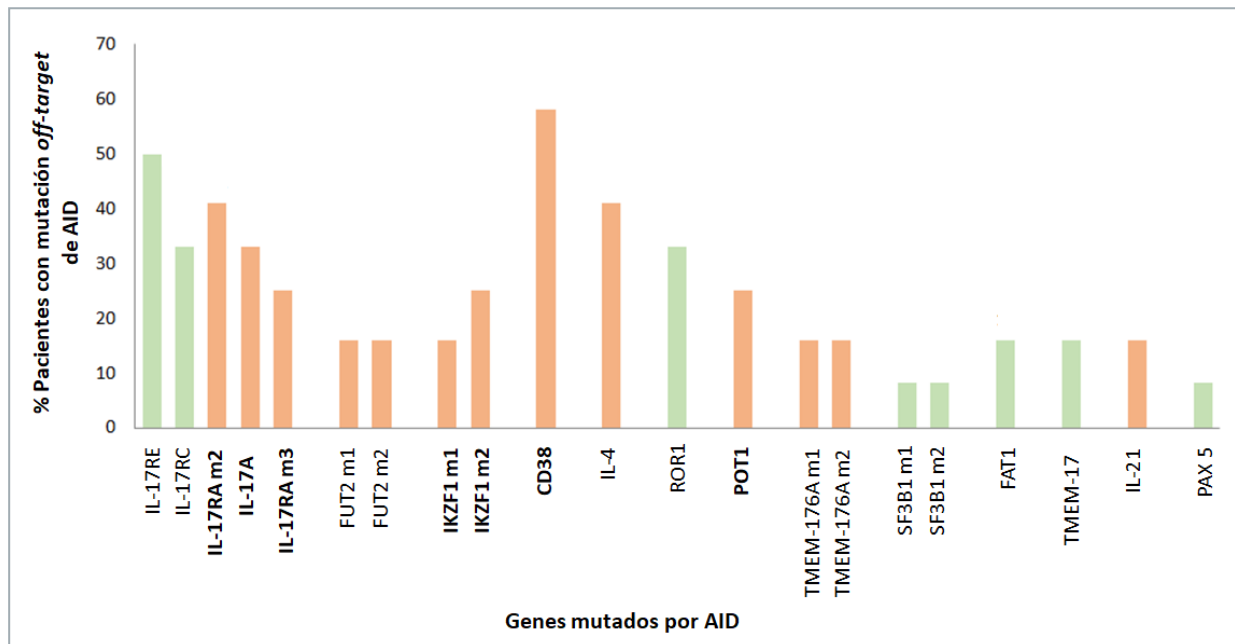


Figura V: genes mutados por AID graficados en función del porcentaje de pacientes con LLC registrados mediante WES con la mutación (adaptado de Seija, 2018⁹⁷). Las barras en color naranja indican genes con mutaciones en 3' UTR, mientras que las de color verde indican mutaciones en 5' UTR o en la región codificante del gen. En negrita se resaltan los genes seleccionados para posteriores estudios en este trabajo. Para los genes que presentan más de una mutación, estas se distinguen con "mx", siendo x el número de la mutación. A todos los valores de porcentaje se les restó los correspondientes a su respectivo control de células no leucémicas.

Estos resultados nos parecen de gran interés, puesto que las regiones génicas no traducidas del ARN han sido ampliamente descritas como sitios de regulación de la transcripción de muchos genes: en estas regiones se encuentran los sitios determinantes de la localización subcelular, exportación al núcleo, eficiencia de la traducción y estabilidad del ARNm^{98,99}. Además, son sitios de unión a microARNs (miARNs).

Los miARNs son pequeños fragmentos (de 22 pares de bases, aproximadamente) de ARN no codificante, que juegan un rol en la regulación postranscripcional del ARNm. Típicamente, los miARN se generan de un miARN primario doble hebra, a través de dos eventos de clivaje enzimático. El miARN simple hebra se asocia con la proteína Argonata y con otros cofactores, constituyendo el complejo efector llamado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés). RISC induce la degradación del ARNm blanco y la supresión de su traducción a través de la interacción con las secuencias complementarias en la región 3' UTR del ARNm blanco¹⁰⁰⁻¹⁰². Para que el mecanismo transcurra eficientemente, es necesario que la complementariedad entre la secuencia blanco y la del miARN sea del 100%, o muy cercana. Por lo tanto, técnicamente bastarían mutaciones en un único o unos pocos nucleótidos para interferir en la interacción, pudiendo tanto perderse como generarse nuevos blancos de ARNm.

Muchos miARNs pueden funcionar como oncogenes (llamados "oncomiRs") o genes supresores de tumores a través de la regulación de la expresión de ARNm específicos, y la desregulación de su expresión ha sido fuertemente asociada a los procesos de iniciación del cáncer, progresión y metástasis^{103,104}. Más aun, la implicancia de diversos miARNs ha sido probada en LLC, siendo los mir-15a y miR-16a, localizados en el cromosoma 13q14, los más ampliamente descritos¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Por estas razones, el estudio posterior de los genes que poseen mutaciones en su 3' UTR generadas por AID, sumado al hecho de que sus funciones podrían ser relevantes en la biología de la LLC, resulta de vital importancia para entender nuevas causas de la progresión y/o la refractoriedad al tratamiento de la LLC en estos pacientes.

Genes con mutaciones en 3' UTR relevantes en LLC

En el estudio de secuenciado mencionado se obtuvo una lista de mutaciones validadas para una serie de genes relevantes en LLC y en procesos inmunológicos en general. La validación de las mutaciones en los genes preliminares seleccionados se realizó mediante un segundo secuenciado masivo, sobre 15 pacientes adicionales progresores, AID⁺, durante la progresión⁹⁷. Luego del análisis, los resultados muestran un grupo de genes que podrían ser de gran interés, dadas sus posibles implicancias en la biología de la LLC, como **IL-17RA** (con una ocurrencia del 41% para la mutación 1 y 25% para la mutación 2), **IL-17A** (33%), **POT1** (25%), **IKZF1** (16% y 25% para la mutación 1 y 2, respectivamente) y **CD38** (58%) (ver Figura VI, pág. 17).

IL17A e IL17RA

IL-17A es una citoquina proinflamatoria que induce la producción de IL-6 e IL-8 en una variedad de células¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Es tradicionalmente aceptado que IL-17A e IL-17F son producidas primariamente por linfocitos Th-17 CD4⁺^{111,112}. Sin embargo, se han identificado otros tipos celulares que las producen, como linfocitos T CD8⁺ y células NK bajo ciertas condiciones^{113,114}. En el trabajo de Vazquez Tello et al., publicado en 2002, se postuló la posibilidad de que los linfocitos B normales sean una fuente de IL-17A y/o IL-17F¹¹⁵.

El rol de IL-17 y su efecto en la inducción de IL-6 en la progresión de la LLC no se comprende completamente hoy en día. Existen trabajos en los que se postula que la frecuencia de células Th17 en LLC se ve aumentada en comparación con individuos sanos, y que niveles altos de IL-17 se correlacionan con un peor curso clínico¹¹⁶. Sin embargo, otros estudios afirman que la respuesta Th17/IL-17 juega un rol protector, y que pacientes con LLC en un estadio más avanzado de la enfermedad presentan niveles menores de Th17/IL-17^{117,118}.

Por otro lado, en Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) se han reportado altos niveles de IL-17A, la cual sería capaz de inducir la proliferación de las células B mediante la vía de señalización intracelular AKT. Interesantemente, esta misma vía se encuentra activada también en LLC^{119,120}.

Tal como lo plantea Seija en su trabajo de Maestría, en cuanto a las mutaciones en 3' UTR observadas en este gen y la posible implicancia de estas en la expresión de la proteína y de su receptor, podría hipotetizarse un mecanismo autócrino de proliferación de la célula LLC dependiente de IL-17: dentro del microambiente proveído en los centros proliferantes, donde el clon leucémico recibe diversos estímulos de supervivencia y proliferación desde distintas células, las mutaciones en 3' UTR podrían conducir a un aumento en la expresión, tanto de IL17 como del complejo receptor de IL17 (IL17R, conformado por IL-17RA e IL-17RC); esto podría generar una autoinducción de la proliferación de la célula leucémica, y a su vez, un rápido descenso en los niveles de dicha interleuquina, que explicaría los reportes de su disminución en sangre periférica en pacientes progresores⁹⁷. Uno de los objetivos de esta Tesina será confirmar esta hipótesis, comenzando por el análisis de la expresión diferencial en los genes codificantes para esta interleuquina y su receptor.

POT1

El gen *POT1* codifica para la proteína POT1 (cuyo nombre significa Protección de los Telómeros), de unión a ADN simple hebra telomérico. POT1 no sólo recubre los telómeros, sino también recluta la enzima telomerasa hacia los extremos de los cromosomas. En las células somáticas humanas, los telómeros se acortan gradualmente con la edad^{121,122}; en contraste, los telómeros de la línea germinal y de células cancerosas no se acortan, consistentemente con el comportamiento de organismos inmortales y unicelulares¹²³⁻¹²⁶. En lo que respecta a la acción de POT1, se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de expresión del gen que la codifica y el largo de los telómeros, y su

sobreexpresión se asocia a un peor pronóstico en cáncer¹²⁷. Sin embargo, las mutaciones encontradas en LLC apuntan a una disrupción en su función, con una consecuente disfunción telomérica y generación de aberraciones cromosómicas, frecuentes en pacientes progresores^{97,128}. Es por esto que el posible impacto de las mutaciones en el 3' UTR en este gen debe ser estudiado en profundidad.

IKZF1

La familia de factores de transcripción Ikaros es esencial para la hematopoyesis, al controlar el destino del linaje celular y el estado de proliferación¹²⁹⁻¹³¹; la pérdida de la función de estos se asocia con inmunodeficiencias y con el desarrollo de diferentes tipos de leucemia¹³²⁻¹³⁸. IKZF1 es una proteína que participa en un complejo multimérico con acetiltransferasas, metiltransferasas, deacetilasas, y el complejo remodelador de la cromatina llamado NURD^{129,134,139}. Su localización pericentromérica es fundamental para su función normal como factor de transcripción¹⁴⁰. El gen *IKZF1*, que contiene 8 exones, codifica para IKZF1, y a través de vías de *splicing* (corte y empalme) alternativo, se producen diferentes isoformas de la proteína¹²⁹. La porción aminoterminal de IKZF1 incluye un dominio de unión al ADN, y la región carboxiterminal contiene dos dominios de dedos de Zinc, responsables de interactuar con proteínas regulatorias, formando el complejo remodelador del nucleosoma. La presencia de las isoformas activas determina la localización nuclear pericentromérica en la heterocromatina de IKZF1¹⁴⁰⁻¹⁴². Algunas isoformas pierden la capacidad de unión al ADN, y son llamadas **isoformas dominantes negativas (IDN)**, ya que pueden afectar la función de las isoformas activas¹⁴². Los altos niveles de las isoformas negativas como **Ik6**, **Ik7** e **Ik4/8** en algunos tipos de leucemia sugieren que la expresión y el patrón de localización de IKZF1 podría estar relacionado a la transformación maligna en células cancerosas^{143,144}. Existen datos de una posible predominancia de las isoformas negativas Ik6 e Ik4/8 en LLC¹⁴⁵, aunque no han sido confirmados. En adición a esto, estudios previos han asociado la disminución en los niveles de expresión de *IKZF1* con un peor pronóstico en LLA¹⁴⁶.

Por estas razones, resulta interesante el estudio de la expresión de *IKZF1* en los pacientes progresores en los que se hallaron las mutaciones en la región 3' UTR.

CD38

En células B humanas, la proteína CD38 se expresa como una molécula de membrana integral, generalmente en conformación dimérica. La molécula tiene una tendencia a asociarse con otras proteínas, formando grandes complejos supramoleculares: las moléculas asociadas a CD38 en células B humanas incluyen el complejo CD19/CD81, el receptor de quimioquinas CXCR4, y moléculas de adhesión, como CD49d^{147,148}. En conjunto, estas señales aumentan tanto la quimiotaxis como la proliferación en las células B neoplásicas.

En LLC, CD38 es aceptado como un marcador dependiente de pronóstico no favorable y como un indicador de activación y proliferación de las células^{38,149-153}. Es generalmente aceptado que pacientes CD38⁺ tendrán un menor tiempo antes de la progresión, requerirán tratamientos más tempranos y frecuentes, y eventualmente menor sobrevida³⁸.

El clon LLC CD38⁺ muestra una habilidad aumentada para migrar en respuesta a CXCL12¹⁵⁴, para transducir señales mediadas por el BCR, y para responder al entrecruzamiento mediado por anticuerpos anti-IgM y anti-IgD¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Por tanto, se cree que la expresión de CD38 es al menos un reflejo cuantitativo de la activación de la célula LLC *in vivo*¹⁵⁸.



Objetivos

Dada la importancia funcional que los genes mencionados podrían tener en el comportamiento de una célula B en el sistema inmune y específicamente en un linfocito leucémico, los objetivos que nos hemos propuesto en esta Tesina son los que se describen a continuación.

Objetivos generales

Elucidar los posibles efectos de las mutaciones *off-target* en las regiones 3' UTR generadas por la enzima AID en los cinco genes previamente seleccionados, para poder aportar conocimientos sobre el rol de esta en la progresión de la LLC.

Objetivos específicos

2.1 *Diseñar cebadores específicos para corroborar mutaciones con la firma de AID en los genes seleccionados a partir del estudio de secuenciado masivo.*

Para llevar a cabo este objetivo específico se realizará la selección de cebadores específicos que amplifiquen el fragmento del gen en el cual fue localizada la mutación con firma de AID de aquellos genes previamente seleccionados. A partir del ARN extraído de sangre de pacientes con LLC en donde se identificó la mutación se realizará la transcripción reversa para obtención del ADN copia o complementario (ADNc) y, posteriormente, la puesta a punto de las condiciones para obtener la amplificación del producto deseado por PCR cuantitativa (qPCR o PCR en tiempo real). De la misma manera, se sintetizará ADNc de muestras de pacientes en donde no se identificó la mutación, para contar con los controles correspondientes.

2.2 *Evaluación de las diferencias de expresión para los genes seleccionados en el ADNc de pacientes con y sin la mutación con la firma de AID.*

Se evaluará el cDNA de pacientes que posean la mutación específica de AID ("Mut") en los genes seleccionados y de pacientes que no posean la mutación ("Wt"). Se determinará la expresión de cada uno de ellos relativa al gen de expresión constitutiva *GAPDH* mediante la técnica PCR en tiempo real. Los genes seleccionados previamente para llevar a cabo este análisis son: *IL17A*, *IL17RA*, *POT1*, *IKZF1* y *CD38*. Todos ellos muestran mutaciones en las regiones no traducidas 3', las cuales podrían estar implicadas en regulación de la expresión génica a nivel del ARNm.

2.3 *Experimentos in vitro con células primarias de pacientes con LLC para intentar correlacionar los posibles efectos de la mutación ocasionada por AID con características de activación y/o proliferación celular, típicas de la progresión tumoral de los pacientes portando la mutación.*

Este objetivo es dependiente de los resultados que se obtengan del *Objetivo específico 2.2*; de las posibles funciones atribuidas al gen diferencialmente expresado, y de la actividad que este gen pueda tener en la progresión leucémica.

A modo de ejemplo, podemos pensar diferentes hipótesis: en el caso de encontrar diferencias en el gen *IKZF1*, el cual es un factor de transcripción importante en el desarrollo del linfocito B, la expresión alterada de esta molécula podría estar afectando directamente el desarrollo de la célula tumoral, determinando el grado de diferenciación del tumor. Numerosos trabajos proponen que células más indiferenciadas llevan a la generación de tumores más malignos^{159,160}. En el caso

específico de la LLC, el hecho constatado de que aquellas células cuyo BCR no tiene mutaciones (caso típico de un linfocito B que aún no encontró su Ag por no haber pasado por el CG), podría estar mostrando a una célula más inmadura, y por ende ser responsable de una LLC de peor evolución, en comparación con aquellas células que tienen un BCR mutado, típico de pacientes con LLC de mejor pronóstico³⁷. Mutaciones en el 3' UTR de *IKZF1* podrían relacionarse con la expresión diferencial de este factor de transcripción, afectándose así el desarrollo del clon leucémico.

En el caso de CD38, podríamos plantear que las mutaciones con firma de AID en el 3' UTR del gen codificante para esta proteína sean responsables de su sobreexpresión. La confirmación de este dato sería de gran importancia, ya que un aumento de la expresión de CD38 en el clon leucémico se correlaciona con una mayor progresión de la enfermedad¹⁶¹. En este caso, estaríamos presentando una explicación original de una de las posibles causas de la sobreexpresión de un marcador pronóstico de importancia en la LLC como CD38.

Otro de los genes que sería de interés estudiar es el codificante para los receptores de IL-17, por la hipótesis de autoinducción de la célula B leucémica antes expuesta (ver *Genes con mutaciones en 3' UTR relevantes en LLC*, pág. 18).

En resumen, creemos que la constatación de la expresión diferencial de alguno de los genes seleccionados previamente, así como la corroboración del mecanismo responsable de este cambio en la expresión en el clon tumoral, podrían ser aportes científicos de interés en la biología de la LLC.



Materiales y métodos

Extracción de ARN de pacientes y síntesis de ADNc

Una vez seleccionadas las muestras de los pacientes con LLC con o sin mutaciones en las regiones 3' UTR, se procede a la extracción del ARN a partir de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés). Se toman 5×10^6 PBMC y se tratan con el reactivo TRIzol (Invitrogen, 15596026), según el procedimiento descrito por Chomczynski y col.¹⁶². Para la evaluación de la extracción se mide la relación de absorbancia a (260/280)nm, y a partir del valor a 260nm se obtiene la concentración de ARN obtenido. Para la reacción de retrotranscripción se utilizó el kit de la transcriptasa reversa Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV RT; Invitrogen, 28025-013), siguiendo las indicaciones del proveedor, en un volumen total de reacción de 40µL. Para esto se toman entre 300 y 500ng de ARNm, y se utilizan los reactivos indicados por el proveedor.

El mismo procedimiento fue aplicado para todas las muestras utilizadas en los experimentos: pacientes con LLC y líneas celulares Daudi y MEC-1.

PCR a punto final

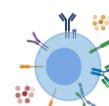
PCR de *GAPDH* y Electroforesis en gel de Agarosa

Para evaluar la reacción de retrotranscripción se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a punto final con 1µL del ADNc de cada paciente, amplificando el gen *GAPDH* (codificante para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, de la vía glucolítica, de expresión constitutiva). Se utilizó la enzima Taq ADN Polimerasa (Invitrogen, 10342020), con los reactivos correspondientes indicados por el proveedor, en un volumen final de reacción de 25µL. Los cebadores se utilizaron en concentración 300nM. Sus secuencias son las siguientes: Directo: 5' GGTGCTGAGTATGTCGTGGA 3'; Reverso: 5' ATGCCAGTGAGCTTCCGTT 3'. Las condiciones de termociclado se detallan en la **Tabla 1**. El termociclador utilizado es Applied Biosystems 2720.

Tabla 1: condiciones de termociclado para la reacción en cadena de la polimerasa del gen *GAPDH*.

	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 minutos	1
Desnaturalización	94	30 segundos	
<i>Annealing</i>	62	30 segundos	30
Extensión	72	30 segundos	
Extensión final	72	7 minutos	1

Teniendo en cuenta el tamaño de los amplicones (productos de amplificación) esperados, se realiza un gel de Agarosa al 2% (Agarosa UltraPure, Invitrogen, 16500500) en buffer TAE 1x (Tris base, ácido acético glacial, EDTA, pH=8), del cual se utilizan 100mL. Para el revelado del ADN doble hebra se utiliza solución de Bromuro de Etidio (Eurobio, GEPBET02) de concentración 0,5µg/mL. El buffer de muestra a utilizar (6XS, Tipo II Maniatis) consta de 0,25% de azul de Bromofenol, 0,25% de xylene cyanol FF, y 30% de glicerol en agua. El marcador de peso molecular utilizado es 100pb DNA Ladder, con un rango de peso molecular de 100 a 2000pb (Invitrogen, 15628). La cuba de electroforesis se conecta a 100V por 15 minutos (aproximadamente, hasta observar que el frente de corrida superó al menos la mitad del gel). Una vez culminada la corrida, se visualiza en transiluminador (Carestream, Gel Logic 112).



PCR de *IKZF1* y Electroforesis en gel de Agarosa

Para la visualización de las diferentes isoformas de *IKZF1* se pusieron a punto las condiciones para una PCR a punto final, variando las condiciones de termociclado; volúmenes de cebadores, ADNc, $MgCl_2$, enzima; volumen y concentración del gel de Agarosa; voltaje y tiempo de corrida. Se utilizó la ADN polimerasa NZYtaq II (nzytech, MB354), con los reactivos indicados por el proveedor (buffer de reacción, $MgCl_2$, mix de dNTPs, agua destilada) y siguiendo el procedimiento recomendado por aquel. Se utilizó ADNc de dos pacientes con LLC, la **línea celular Daudi** (células humanas de Linfoma de Burkitt africana-americana (Merck, 85011437)) y la **línea celular MEC-1** (células derivadas de B-LLC en transformación prolinfocítica¹⁶³). El volumen de ADN molde utilizado fue $2\mu L$ para pacientes con LLC, y $1\mu L$ para líneas celulares. El volumen final de todas las reacciones fue $50\mu L$. Los cebadores se diseñaron de manera tal que el producto de amplificación abarcara todos los exones del gen, para poder obtener las diferentes variantes de *splicing*. Se utilizaron en concentración 300nM, y sus secuencias son: 5' TAAGCGATACTCCAGATGAGGGCG 3' (Directo); 5' TTGTTGCTCTCGGTGTCCGTGG 3' (Reverso).

Las condiciones de termociclado son las mismas que para *GAPDH*, y están detalladas en la **Tabla 1**.

Para la electroforesis se realizó un gel de Agarosa al 1,5%, con los mismos reactivos descritos para la PCR de *GAPDH*. Se preparó un volumen final de 200mL de gel. La corrida de electroforesis se hizo a 120V, durante una hora aproximadamente, con el objetivo de lograr una mayor y mejor separación de los productos de PCR.

Para la determinación de los pesos moleculares (en pares de bases, pb) de los productos de amplificación, se obtuvo la secuencia completa del gen de la base de datos NCBI¹⁶⁴.

PCR en tiempo real

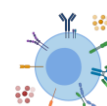
Para la cuantificación de la expresión de genes con mutaciones en 3' UTR a nivel de ARNm, se realizó PCR en tiempo real en el equipo QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific). Se pusieron a punto las condiciones de reacción para todos los genes, variando concentraciones de ADN, de cebadores y condiciones de ciclado. Se utilizó el *mix* de reacción FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Merck, 4913850001). Los cebadores utilizados fueron diseñados en Macrogen y sintetizados por Integrated DNA Technologies. Sus secuencias se detallan en la **Tabla 2**. Se utilizaron a concentración 300nM, con $2\mu L$ de ADNc, para volúmenes finales de reacción de $20\mu L$. En el caso particular del gen *IKZF1*, cabe aclarar que los cebadores se diseñaron de manera de obtener un único producto de amplificación de 197 pb, correspondiente a una región del exón 8, de manera de obtener un único producto de amplificación y evitar variaciones en función de las diferentes variantes de *splicing*. Dicha región se especifica en la **Figura 2** de la sección *Resultados* (pág. 26). Las condiciones de ciclado para la amplificación de todos los genes son las que provee el termociclador por defecto, con una temperatura de *annealing* de 60°C (ver QuantStudio Design and Analysis Desktop Software User Guide¹⁶⁵).

Tabla 2: secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR en tiempo real. Todas las secuencias se escriben en sentido 5'-3'.

	Cebador Directo	Cebador Reverso
<i>POT1</i>	GGGATGGCACCAGGACACCA	AGACCCTGATCCCCGACCGT
<i>IL17A</i>	CCACCGCAATGAGGACCCTGA	GCCCACGGACACCAGTATCTTCT
<i>IL17RA</i>	ATTTCTTGTGCCTGACTGTGAGC	TGGAGTGTCTGGCATTCTGGGC
<i>IKZF1</i>	GAGGTGGTCCCGGTCATCAG	TTGTTGCTCTCGGTGTCCGTGG
<i>CD38</i>	GCCTCATCTTCGCCAGCCA	CGCCACCTCGGGACGACCAC

Determinación relativa de los niveles de expresión: método $\Delta(\Delta Ct)$

La reacción de PCR se siguió en tiempo real y se analizó mediante QuantStudio 3 Software (Thermo Fisher Scientific). Se realizó, para cada gen en sus pacientes correspondientes, una cuantificación relativa por el



método de cálculo de $\Delta(\Delta Ct)$, descrito por Livak y Schmittgen¹⁶⁶, así como en tantos otros trabajos. Como muestra de referencia se utilizó ADNc de Daudi, y como control de expresión constitutiva se amplificó el gen *GAPDH*, tanto para las muestras problema (ADNc de pacientes) como para la muestra de referencia.

Se determinó la expresión relativa del gen de interés en la muestra problema mediante el cálculo: $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$, donde $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct_{\text{muestra problema}} - \Delta Ct_{\text{muestra de referencia}}$. $\Delta Ct_{\text{muestra problema}}$ corresponde a la diferencia entre el valor Ct del gen de interés y el Ct de *GAPDH* con el ADNc del paciente como molde, mientras que $\Delta Ct_{\text{muestra de referencia}}$ corresponde a la misma diferencia, con el ADNc de Daudi como molde.

Citometría de Flujo

Preparación de las muestras

Para los ensayos de Citometría de Flujo se utilizaron PBMC de pacientes con LLC. Las muestras fueron descongeladas a 37°C en baño húmedo, y se les agregó medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, ThermoFisher, MFC00217820) suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF) (Gibco, ThermoFisher, MFC00132239) al 10%. Las muestras se centrifugaron por 8 minutos a 400 rcf y se resuspendió el *pellet* en buffer DPBS (ThermoFisher Scientific, 14190144). Se realizó el conteo de células viables al microscopio óptico en Cámara de Malassez, con solución Azul de Tripiano 0,4% (Thermo Fisher Scientific, 15250061).

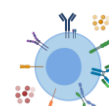
Marcaje con anticuerpos en superficie

Para el análisis de expresión de CD38 en células proliferantes de LLC en citometría se utilizaron placas Corning® de poliestireno en fondo V (Merck, CLS3896-48EA). Los anticuerpos utilizados fueron: anti-CD5 FITC (clon UCHT2, 1µL por pocillo), anti-CXCR4 PE (clon 12G5, 1µL por pocillo), y anti-CD38 APC (clon HIT2, 1µL por pocillo), todos de BD Biosciences; anti-CD19 PerCp Cy5.5 (clon HIB19) de BioLegend, y control isotípico IgG1-kappa-APC de ratón (1µL por pocillo), de BD BioSciences.

Las muestras problema corresponden a las PBMC de los 6 pacientes con LLC, marcadas con los anticuerpos mencionados: anti-CD5 FITC, anti-CXCR4 PE, anti-CD38 APC y anti-CD19 PerCp Cy5.5. Además, para cada uno de los 6 pacientes se incluyó, como control de unión inespecífica del anticuerpo anti-CD38 APC, la misma mezcla de anticuerpos excepto este, con el anticuerpo IgG1-kappa-APC en su lugar. Por tanto, se realizaron dos *mixes* de anticuerpos, en un volumen final de 84µL cada uno (lo que corresponde a 12µL de la mezcla de anticuerpos por pocillo). Los volúmenes se completan con PBS-SBF10%-Azida de sodio 0,025%. Por último, se añadieron controles de cada uno de los anticuerpos por separado (control de único color, UC), y control sin marcar (sin anticuerpos) con las células de un solo paciente (LLC 358). Cabe aclarar que para el control UC de APC no se utilizó el anticuerpo anti-CD38 sino anti-CD5-APC (BioLegend), puesto que la muestra debía ser positiva para el antígeno en cuestión (justamente, para la muestra problema no se contaba con dicha información).

Brevemente, para el marcaje se dispusieron aproximadamente 0,5 millones de células resuspendidas en DPBS por pocillo. Se centrifugaron brevemente (5 minutos a 1700 rpm) y se descartó el sobrenadante. A cada pocillo se le agregaron 12µL del *mix* de anticuerpos correspondiente o control UC, y se incubaron las muestras por 15 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Se realizaron dos lavados con 120µL (por pocillo) de PBS, con las mismas condiciones de centrifugación. Luego se fijaron las células con 25µL (por pocillo) de paraformaldehído polimérico (PFA) al 5%, durante 15 minutos a 4°C. Se agregó PBS y se llevó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se resuspendieron las células en 125µL de PBS-SBF-Azida, previo al análisis en el citómetro.

Los datos de citometría de flujo fueron adquiridos usando el citómetro BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences), y el análisis se realizó con el software FlowJo v10.7 (BD Biosciences).



Resultados

Análisis de la expresión de los genes con mutaciones en 3' UTR por PCR en tiempo real

Para determinar los posibles cambios en los niveles de expresión de los genes con mutaciones en su 3' UTR con firma de AID, se seleccionó un grupo de pacientes que tuvieran la mutación en cuestión (mutados), y otro grupo de pacientes que no la tuvieran (*wild-type*). Se diseñaron cebadores específicos para los siguientes genes: *IL17A*, *IL17RA*, *POT1*, *IKZF1* y *CD38*, y se calculó su expresión relativa a una muestra de referencia (en este caso, ADNc de la línea celular Daudi) por el método $\Delta(\Delta Ct)$ (ver *Materiales y métodos*, pág. 24).

En la **Figura 1** se muestran los gráficos obtenidos de la cuantificación de cada gen. Los pacientes se dividen en "Mut" (mutado) y "Wt" (*wild-type*).

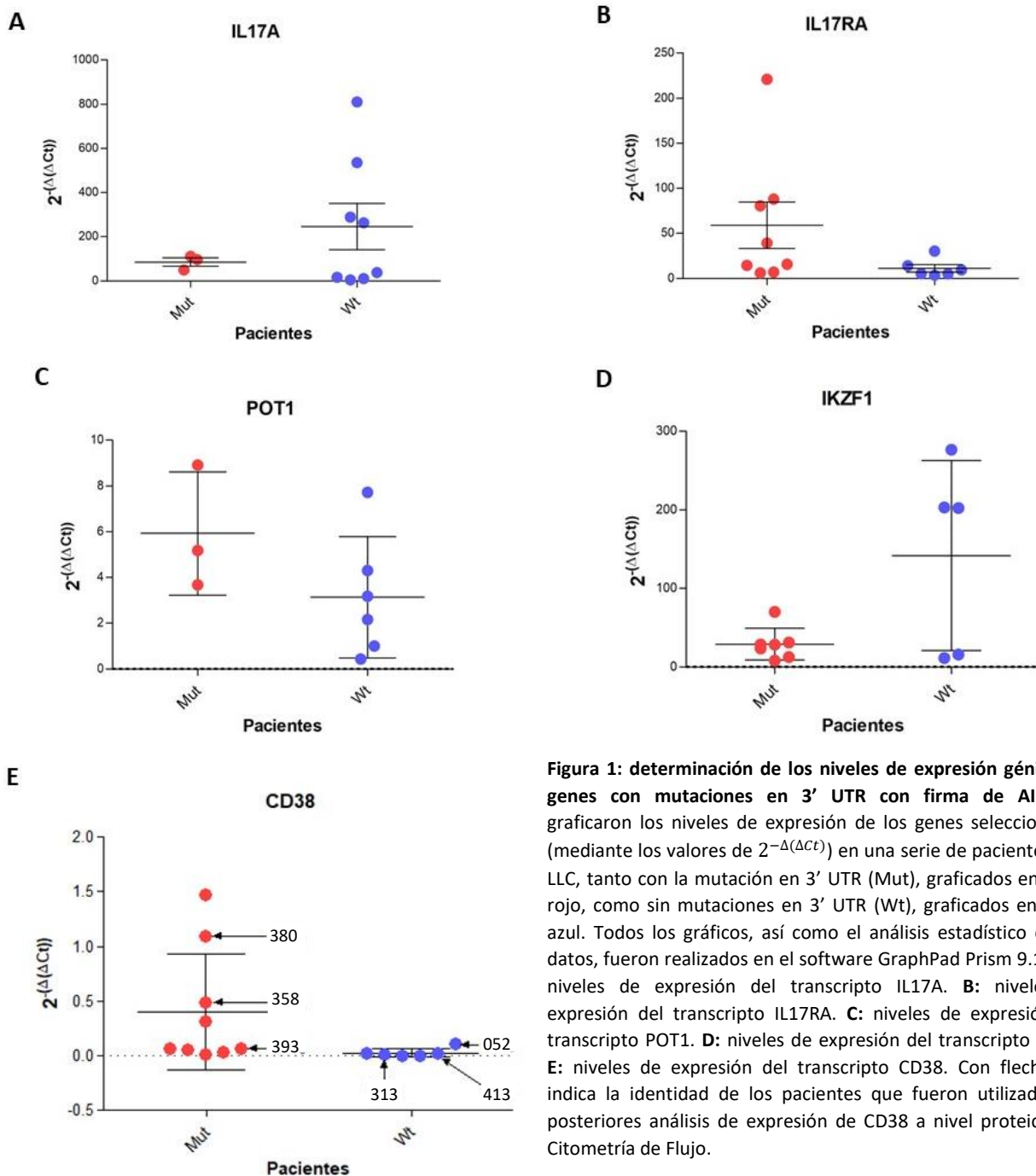
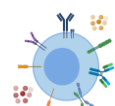


Figura 1: determinación de los niveles de expresión génica de genes con mutaciones en 3' UTR con firma de AID. Se graficaron los niveles de expresión de los genes seleccionados (mediante los valores de $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$) en una serie de pacientes con LLC, tanto con la mutación en 3' UTR (Mut), graficados en color rojo, como sin mutaciones en 3' UTR (Wt), graficados en color azul. Todos los gráficos, así como el análisis estadístico de los datos, fueron realizados en el software GraphPad Prism 9.1.0. **A:** niveles de expresión del transcripto *IL17A*. **B:** niveles de expresión del transcripto *IL17RA*. **C:** niveles de expresión del transcripto *POT1*. **D:** niveles de expresión del transcripto *IKZF1*. **E:** niveles de expresión del transcripto *CD38*. Con flechas se indica la identidad de los pacientes que fueron utilizados en posteriores análisis de expresión de *CD38* a nivel proteico por Citometría de Flujo.



Para todos los genes, se realizó el test estadístico t-Student (test t) no pareado, con $p < 0.05$, utilizando el software GraphPad Prism 9.1.0. Para *IL17A* e *IL17RA*, el test t no arrojó diferencias significativas entre los grupos (Figs. 1A y B). Tampoco para *POT1* (Fig. 1C). Para *IKZF1*, el t-test sí mostró diferencias significativas (Fig. 1D). Para *CD38*, no se vieron diferencias (Fig. 1E).

Análisis de las isoformas de IKZF1 por PCR a punto final

Como se mencionó en la Introducción, altos niveles de las isoformas negativas de la proteína IKZF1 (Ik6, Ik7 e Ik4/8) han sido descritos en algunos tipos de leucemia. Al ser un factor de transcripción crucial para la determinación del linaje de la célula B, se cree que la expresión y patrón de localización de IKZF1 podrían estar implicados en la transformación maligna en células cancerosas^{143,144}.

Con el fin de analizar cualitativamente las diferentes isoformas de IKZF1 activamente transcritas en LLC, y confirmar los datos publicados por de Oliveira¹⁴⁵, decidimos amplificar los diferentes fragmentos correspondientes a estas. Para ello, de 4 muestras (dos líneas celulares, MEC-1 y Daudi, y dos pacientes progresores de LLC, 060 y 278) se extrajo el ARN, y a partir de él se sintetizó el ADNc (ver *Materiales y métodos*, pág. 22), que serviría de molde para la reacción en cadena de la polimerasa. Se utilizó un solo par de cebadores, que logran amplificar la totalidad de las variantes de *splicing* del gen. El resultado de la electroforesis en gel del Agarosa y una representación del gen *IKZF1* con sus diferentes patrones de *splicing* alternativo se muestran en la **Figura 2**.

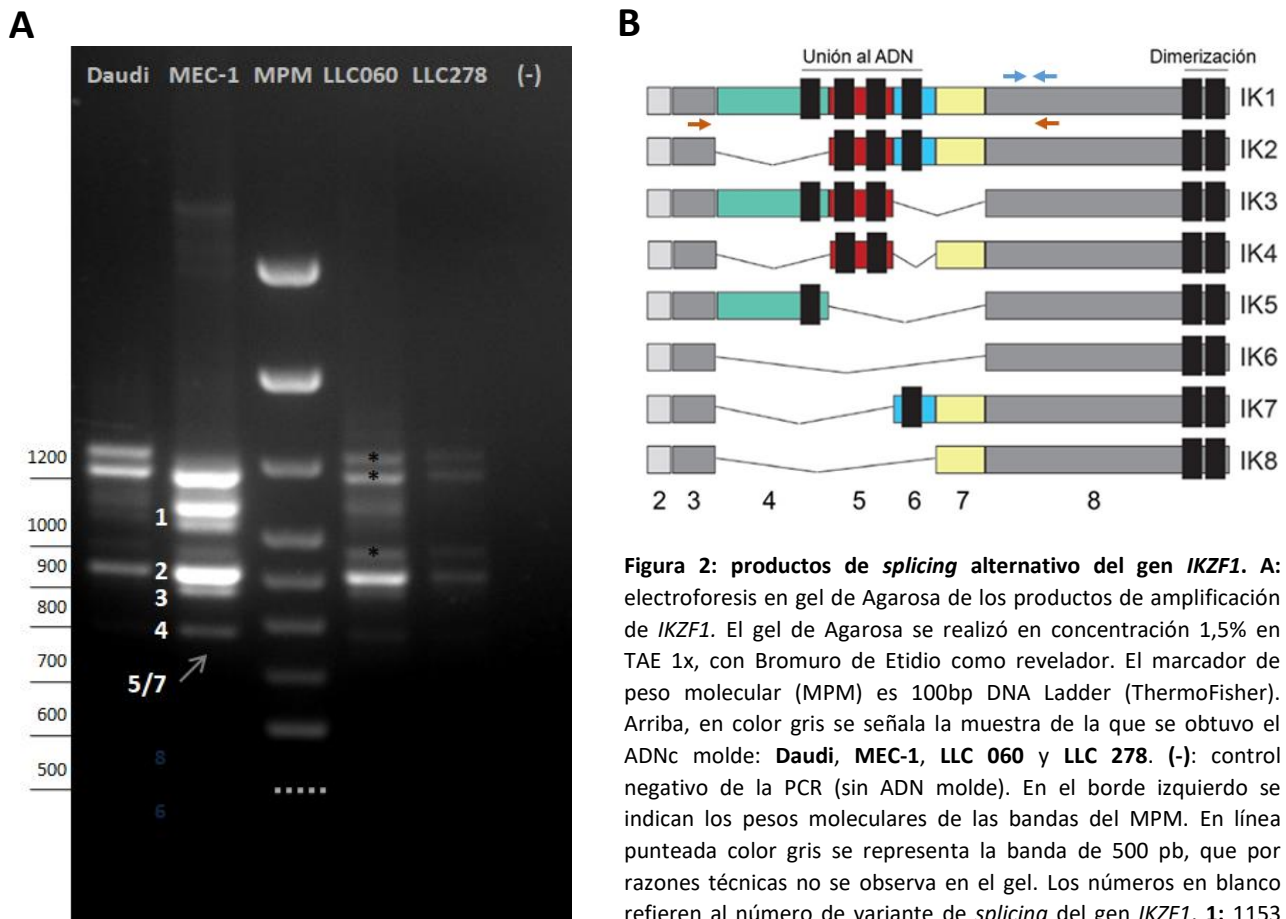


Figura 2: productos de *splicing* alternativo del gen *IKZF1*. A: electroforesis en gel de Agarosa de los productos de amplificación de *IKZF1*. El gel de Agarosa se realizó en concentración 1,5% en TAE 1x, con Bromuro de Etidio como revelador. El marcador de peso molecular (MPM) es 100bp DNA Ladder (ThermoFisher). Arriba, en color gris se señala la muestra de la que se obtuvo el ADNc molde: **Daudi**, **MEC-1**, **LLC 060** y **LLC 278**. (-): control negativo de la PCR (sin ADN molde). En el borde izquierdo se indican los pesos moleculares de las bandas del MPM. En línea punteada color gris se representa la banda de 500 pb, que por razones técnicas no se observa en el gel. Los números en blanco refieren al número de variante de *splicing* del gen *IKZF1*. 1: 1153 pb (IK1); 2: 892 pb (IK2); 3: 892 pb (IK3); 4: 766 pb (IK4); 5: 724 pb (IK5); 7: 724 pb (IK7). En números color azul oscuro se muestra la ubicación esperada de las isoformas restantes, que no pudieron ser identificadas en el gel (8 y 6). 6: 463 pb (IK6); 8: 598pb (IK8). Los asteriscos indican bandas no identificadas. B: representación esquemática de las variantes de *splicing* del gen *IKZF1* (adaptado de Marke et al., 2018¹⁶⁷). Con flechas color azul se indican las regiones de hibridación de los cebadores utilizados en PCR real, y con flechas color naranja se indican los utilizados para PCR a punto final. Se indican los dedos de Zinc aminotermiales que definen el dominio de unión al ADN y los dos dedos de Zinc carboxitermiales que representan el dominio de dimerización de la proteína. Las áreas coloreadas indican las regiones

de las regiones de unión al ADN y dimerización de la proteína. Las áreas coloreadas indican las regiones de unión al ADN y dimerización de la proteína. Las áreas coloreadas indican las regiones de unión al ADN y dimerización de la proteína. Las áreas coloreadas indican las regiones de unión al ADN y dimerización de la proteína.

individuales dentro de la proteína que son codificadas por distintos exones. Las variantes que pierden los exones 4 y 5 (IK6-IK8) representan las IDNs predominantes.

Como puede observarse en la Figura 2.A, pudieron identificarse 6 de las 8 isoformas descritas en la bibliografía: IK1, de 1153 pb; IK2 e IK3, de 892 pb; IK4, de 766 pb; IK5 e IK7, de 724 pb. No es posible identificar cuál de las bandas corresponde a IK2 e IK3 (de mayor o menor intensidad), dado que la escala de pesos moleculares es aproximada y no se puede determinar con exactitud (al menos mediante esta técnica) cuál es la banda de 892 pb. Se obtuvo, también, una serie de bandas cuyo peso molecular se encuentra en el rango de los 1200pb, no identificadas según la bibliografía (señaladas con asteriscos).

Análisis de la expresión de CD38 en células de LLC por Citometría de Flujo

Si bien el análisis de la expresión a nivel del transcrito del gen *CD38* no arrojó diferencias significativas entre pacientes con y sin la mutación en 3' UTR, sí se observa cierta tendencia en los pacientes *Mut* a aumentar su expresión con respecto a los *Wt*. Por esta razón, y por la importancia clínica de la expresión de CD38 como marcador de progresión en LLC¹⁶¹, nos pareció interesante evaluar su expresión a nivel proteico, tanto en la fracción proliferante como en la fracción quiescente, descritas por Calissano et al.⁶² del clon tumoral en el mismo paciente, por Citometría de Flujo.

Un dato no menor a tener en cuenta en el análisis de nuestros resultados de qPCR es el hecho ya comprobado de la heterogeneidad del clon tumoral. Si bien este aspecto será ampliado en la Discusión, vale la pena presentar, en esta sección, la siguiente hipótesis: dada la heterogeneidad intraclonal del tumor, es esperable encontrar que no todas las células del clon dentro del mismo paciente sean portadoras de la mutación identificada en el estudio de WES. En el caso puntual de CD38, esperamos que la mutación en 3' UTR esté presente en aquellas células que normalmente se encuentran más activadas y expresan AID en forma constitutiva. En efecto, puesto que la expresión de AID se restringe principalmente a las poblaciones proliferantes (ver *AID y poblaciones proliferantes en LLC*, pág. 13), es esperable encontrar una mayor diferencia en la expresión a nivel de transcrito y de proteína por la mutación en 3' UTR en esta fracción que en la fracción quiescente, donde la expresión de AID es menor.

Es con el fin de demostrar esta hipótesis que se decidió evaluar la expresión de CD38 a nivel proteico en las fracciones quiescente y proliferante, específicamente.

Para esto se tomaron muestras de 3 pacientes *Mut*: LLC 380, LLC 358 y LLC 393, y 3 pacientes *Wt*: LLC 313, LLC 413 y LLC 052. Todos ellos fueron marcados con anticuerpos anti CD19-PerCP Cy5.5 y anti CD5-FITC para identificar la población de células leucémicas (**CD19⁺/CD5⁺**); anti CD5-FITC y anti CXCR4-PE para identificar las poblaciones quiescente (**CXCR4^{alto}CD5^{bajo}**) y proliferante (**CXCR4^{bajo}CD5^{alto}**); y anti CD38-APC para cuantificar la expresión de dicha proteína en superficie.

En la **Figura 3** se resume la estrategia experimental, así como los resultados obtenidos en citometría. Se ejemplifica, en A y B, la estrategia de *gating* (selección) de poblaciones para un paciente LLC con la mutación en 3' UTR, y para un paciente sin la mutación, que fue aplicada para todas las muestras. Luego, en C, se presenta el gráfico de porcentaje de células leucémicas (CD19⁺/CD5⁺) CD38⁺, para pacientes *Mut* y *Wt*. Por último, en D se grafica el mismo parámetro que en C, pero esta vez medido en las fracciones quiescente y proliferante, específicamente. Todos los valores de porcentaje de células CD38⁺ fueron calculados restando el valor correspondiente arrojado para los controles isotípicos de cada paciente.

Adicionalmente, en la **Tabla 3** se muestran los valores de porcentaje de eventos CD19⁺/CD5⁺/CD38⁺ para ambos grupos de pacientes, que fueron utilizados para construir los gráficos.

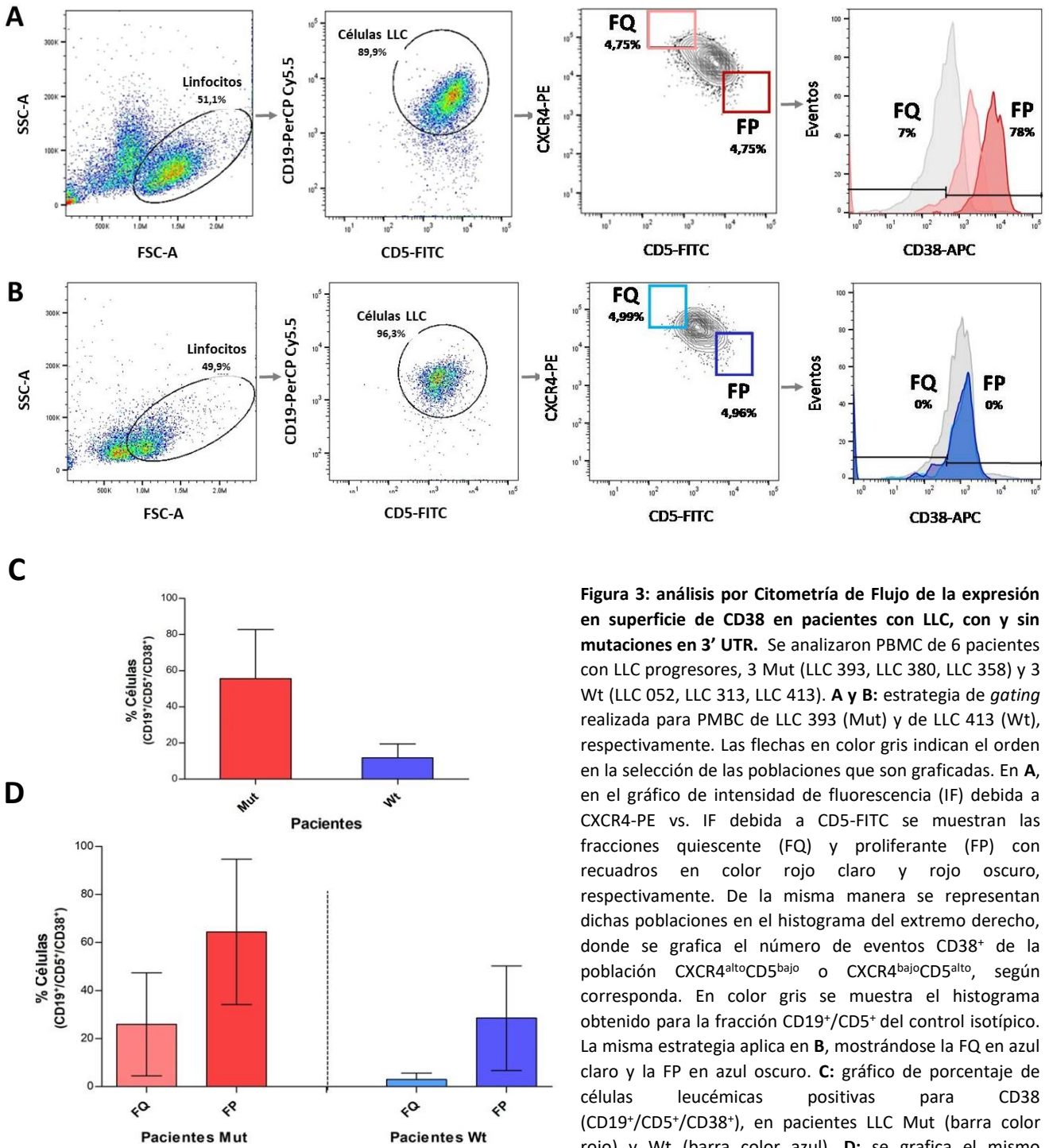


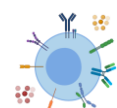
Figura 3: análisis por Citometría de Flujo de la expresión en superficie de CD38 en pacientes con LLC, con y sin mutaciones en 3' UTR. Se analizaron PBMC de 6 pacientes con LLC progresores, 3 Mut (LLC 393, LLC 380, LLC 358) y 3 Wt (LLC 052, LLC 313, LLC 413). **A y B:** estrategia de *gating* realizada para PMBC de LLC 393 (Mut) y de LLC 413 (Wt), respectivamente. Las flechas en color gris indican el orden en la selección de las poblaciones que son graficadas. En **A**, en el gráfico de intensidad de fluorescencia (IF) debida a CXCR4-PE vs. IF debida a CD5-FITC se muestran las fracciones quiescente (FQ) y proliferante (FP) con recuadros en color rojo claro y rojo oscuro, respectivamente. De la misma manera se representan dichas poblaciones en el histograma del extremo derecho, donde se grafica el número de eventos CD38⁺ de la población CXCR4^{alto}CD5^{bajo} o CXCR4^{bajo}CD5^{alto}, según corresponda. En color gris se muestra el histograma obtenido para la fracción CD19⁺/CD5⁺ del control isotópico. La misma estrategia aplica en **B**, mostrándose la FQ en azul claro y la FP en azul oscuro. **C:** gráfico de porcentaje de células leucémicas positivas para CD38 (CD19⁺/CD5⁺/CD38⁺), en pacientes LLC Mut (barra color rojo) y Wt (barra color azul). **D:** se grafica el mismo parámetro que en C, pero esta vez medido en las FQ y FP por separado, con el mismo código de colores establecido en A y B.



Tabla 3: valores de porcentaje de células LLC CD38⁺ utilizados para los gráficos de las Figuras 3.C y 3.D. Con llaves se indican los pacientes Mut y Wt. La segunda columna ("LLC") corresponde a los porcentajes de células CD19⁺/CD5⁺/CD38⁺, graficados en la Figura 3.C; las columnas tercera ("LLC FQ") y cuarta ("LLC FP") corresponden a los porcentajes de células CD19⁺/CD5⁺/CXCR4^{alto}/CD5^{bajo}/CD38⁺ y CD19⁺/CD5⁺/CXCR4^{bajo}/CD5^{alto}/CD38⁺, respectivamente.

Paciente LLC	LLC % (células CD38 ⁺)	LLC FQ % (células CD38 ⁺)	LLC FP % (células CD38 ⁺)
358	82,1	68,6	93,5
380	1,5	1,0	3,85
393	83,4	8,2	95,9
052	26,9	8,5	71,6
313	1,8	0,4	12,5
413	6,8	0,0	1,4

Como puede observarse en la Figura 3.C, el porcentaje de células leucémicas que expresan CD38 en su superficie tiende a ser mayor en los pacientes con la mutación en 3' UTR que en los que no la tienen, aunque es fundamental tener en cuenta que el número de muestras es bajo (3 pacientes de cada grupo), por lo cual no se espera encontrar diferencias significativas. Resulta interesante el hecho de comprobar que la hipótesis planteada para este experimento se cumple, al menos para dos de los tres casos analizados, tanto en los pacientes Mut como en los Wt. Como puede observarse al desglosar los resultados en la Tabla 3, los datos muestran claramente una mayor expresión de CD38 en la FP respecto a la FQ en aproximadamente el 70% de los casos estudiados.



Discusión y conclusiones

La Leucemia Linfocítica Crónica es una neoplasia de células B CD5⁺ en la que los linfocitos tumorales, de apariencia madura, se acumulan en la SP, MO y OLS. Si bien existe un consenso en cuanto a su diagnóstico y a las características que la definen, lejos está de ser una enfermedad con curso clínico predecible y de ser comprendida totalmente: la principal causa de esta falta de conocimiento está directamente relacionada a una gran heterogeneidad clínica y molecular, característica de esta leucemia. Esta ha llevado, incluso, a preguntarnos si la LLC es realmente una única enfermedad, o se trata de dos neoplasias diferentes con características comunes¹⁶⁸. Por ejemplo, hay pacientes que cursan una enfermedad indolente, sin síntomas y viven por muchos años, mientras que otros padecen una enfermedad más agresiva, progresora, requiriendo tratamiento poco después del diagnóstico. Uno de los predictores del curso clínico más robustos es el perfil mutacional (IgV_H): pacientes LLC NM suelen padecer una enfermedad más agresiva que pacientes LLC M^{37,38}. Los tratamientos disponibles hoy en día muestran una efectividad variable, siendo muy alta en algunos casos, baja en otros, y con refractoriedad a la terapia en más de un 10-15% de los casos¹⁶⁹. Esta gran heterogeneidad, tanto molecular como clínica, es una de las grandes características biológicas de la LLC, y una de las causas principales por las que, para un porcentaje de pacientes, sigue siendo una enfermedad incurable¹⁷⁰.

Durante décadas se han invertido esfuerzos en comprender las razones de esta heterogeneidad clínica, así como también las causas de la progresión y de la refractoriedad al tratamiento. La hipótesis más aceptada actualmente es la propuesta por Landau et al.¹⁷¹, que establece que mutaciones que afectan selectivamente a las células B contribuirían en mayor medida al inicio de la enfermedad, y precederían a la selección de nuevas mutaciones que darán origen, a su vez, a un clon tumoral más agresivo y de mayor "fitness" (término del inglés utilizado en Genética, que refiere a la aptitud o eficacia biológica), resultando en una mayor progresión de la enfermedad. En cuanto a cuál es la posible causa de una refractoriedad terapéutica en la LLC, se propone lo siguiente: en pacientes tratados, la quimioterapia (e incluso una terapia más dirigida, ya sea con anticuerpos monoclonales o con inhibidores de kinasas) eventualmente remueve ciertos clones, pero puede terminar favoreciendo la proliferación de uno o más subclones aun más agresivos que el que dio origen a la necesidad de tratamiento. En otras palabras, los subclones tumorales con ventajas de supervivencia se benefician del tratamiento y proliferan rápidamente, contribuyendo a la reaparición de la enfermedad o de alguno de sus signos o síntomas¹⁷¹.

El origen de esta resistencia y, por tanto, de la progresión de la enfermedad, es multivariable y, si bien las mutaciones podrían jugar un rol principal^{172,173}, aun es una incógnita. En los últimos años se ha reunido evidencia para sugerir la hipótesis en la que la expresión aberrante de AID podría jugar un rol en la progresión de la enfermedad mediante la introducción de mutaciones *off-target* en genes no Igs. Interesantemente, los niveles de expresión de AID en células B leucémicas se correlacionan con un peor curso clínico, principalmente en pacientes LLC NM, derivando en un menor tiempo al primer tratamiento⁶⁹. Más aun, la sobreexpresión de AID es el factor común en todas las subpoblaciones proliferantes de LLC encontradas hasta el momento^{62,70,71}. Por estas razones se cree que la expresión constitutiva de AID en el clon leucémico sería clave en la evolución del clon tumoral, así como también en la progresión de la enfermedad^{28,174}.

A partir de esto, mucho se ha trabajado por conocer concretamente cuáles son las mutaciones *off-target* generadas por AID. En 2011, el grupo de Kasar identificó las mutaciones con firma de AID canónica y no canónica en una cohorte de pacientes con LLC indolentes, observando que la firma no canónica es la predominante en pacientes con un perfil de LLC indolente⁷⁹. Adicionalmente, datos de nuestro grupo muestran que la firma de AID predominante en pacientes progresores, a diferencia de lo que ocurre en pacientes indolentes, es una firma canónica, encontrándose una serie de genes relevantes para la

biología de la LLC y la progresión leucémica, lo cual fue demostrado tanto en un modelo murino de LLC sobreexpresando AID como en pacientes de LLC con expresión constitutiva de esta enzima²⁹.

En el análisis del WES realizado por el Msc. Seija sobre grupos de pacientes con LLC progresores, con y sin expresión de AID mantenida en el tiempo, se observó una proporción aumentada de mutaciones *off-target* de AID en regiones 3' UTR con respecto a las mutaciones en 5' UTR en los pacientes del primer grupo⁹⁷.

Las 3' UTR son el sitio blanco de miARNs, moléculas de ARN pequeño no codificante que participan en la regulación posttranscripcional de los genes, afectando su vida media y eficiencia de traducción. Puesto que varias de las mutaciones en 3' UTR se localizaron en genes relevantes para la biología de la LLC, y que en esta patología se ha descrito una gran cantidad de miARNs actuando como supresores de tumores u oncogenes¹⁶⁰, nos pareció interesante profundizar en el estudio de la expresión diferencial de algunos de los genes que mostraron mutaciones canónicas de AID en las regiones 3' UTR.

La hipótesis planteada para nuestro trabajo es, entonces, la siguiente: *mutaciones generadas por AID en las regiones 3' UTR de genes blanco de miARNs podrían alterar posibles interacciones miARN-ARNm, llevando a cambios en la expresión de genes relevantes para la progresión de la LLC.*

En este trabajo seleccionamos, por tanto, 5 genes con mutaciones AID en la región 3' UTR, por su relevancia en la biología de esta neoplasia: *IL-17* e *IL-17RA*; *POT1*; *IKZF1* y *CD38*. Luego se dispuso a analizar la expresión de estos genes, en busca de diferencias entre aquellos pacientes progresores que tuvieran la mutación y los que no la tuvieran.

Para el análisis de los resultados de PCR cuantitativa sobre los genes mutados, en primer lugar, debemos tener en cuenta un aspecto que fue mencionado brevemente en Resultados: las mutaciones reportadas para cada paciente corresponden al *pool* de células leucémicas del paciente. En cada paciente existen, simultáneamente, células B activadas expresando AID (FP, menor al 3% del total de células B leucémicas), y células B no activadas, pero que se mantienen quiescentes, es decir, no mueren (FQ, mayor al 90% del total). Puesto que, de acuerdo con la técnica de secuenciado masivo, nuestros datos refieren a la totalidad del clon leucémico dentro de un mismo paciente (FP+FQ), es esperable que nos resulte difícil identificar grandes diferencias en los niveles de expresión entre el grupo de células tumorales con la mutación (Mut) y el grupo de células "wild type" (Wt). Por lo tanto, dada esta gran heterogeneidad en el clon leucémico y el hecho de que nuestros datos de qPCR reportan la totalidad de la muestra, resulta técnicamente imposible identificar de qué clon/clones provienen las mutaciones.

Una forma correcta de abordar este asunto sería a través de la técnica de secuenciado de célula única (en inglés, *Single Cell Sequencing*), de reciente desarrollo, con la cual se obtiene información individual de cada célula en una muestra a través de tecnologías de secuenciado de última generación. Debido a que esta técnica posee un alto costo económico y aun no se encuentra disponible en nuestro país, decidimos, igualmente, evaluar nuestra hipótesis a través de PCR cuantitativa, teniendo en mente lo previamente discutido acerca de la heterogeneidad del clon al analizar los resultados obtenidos, y asumiendo que la comparación entre pacientes con y sin la mutación podría, al menos, guiarnos en la interpretación de los resultados. En este contexto, los resultados de PCR en tiempo real deben tomarse como una primera aproximación (esperando o no diferencias significativas de expresión) que nos permita, al menos, continuar con el estudio de aquellos genes en los que se observe alguna diferencia entre los grupos de pacientes portando o no la mutación en 3' UTR.

Además de esto, se debe tener en cuenta que para la realización de un estudio confirmatorio debería existir la posibilidad de evaluar la expresión de los genes seleccionados en las diferentes fracciones, FQ y FP, por separado, por alguna técnica económicamente accesible. Una de las maneras más sencillas de realizar esta aproximación experimental es contando con anticuerpos específicos de alta calidad, que se encuentren disponibles en el mercado. Un ejemplo de esto fue la evaluación de la expresión de la proteína y marcador de pronóstico en LLC, CD38; esta pudo ser evaluada sin inconvenientes y



simultáneamente en la FQ y FP del mismo paciente por citometría de flujo, lo cual nos permite sortear el problema del análisis del conjunto de todo el clon leucémico al momento de realizar el WES o PCR.

Como fue mencionado anteriormente, la expresión proteica de la molécula CD38 posee una relevancia mayor en la biología de la LLC, ya que es una de las moléculas marcadoras de pronóstico en esta neoplasia, capaz de inducir un estado de activación en el clon tumoral^{137,67-68}. CD38 es una enzima que interactúa con los ligandos NAD^+ y NADP^+ , los cuales son convertidos en cADPR, ADPR y NAADP, todos agentes movilizantes de Ca^{2+} . También interactúa con ligandos no-sustratos, como CD31 y ácido hialurónico, los cuales regulan contactos célula-célula y célula-matriz extracelular¹⁵⁸. La interacción con CD31 estimula la activación de una vía de señalización intracelular que incluye ZAP-70 y ERK1/2 como actores principales. En la **Figura VI** se esquematizan las interacciones establecidas por CD38 en el contexto celular.

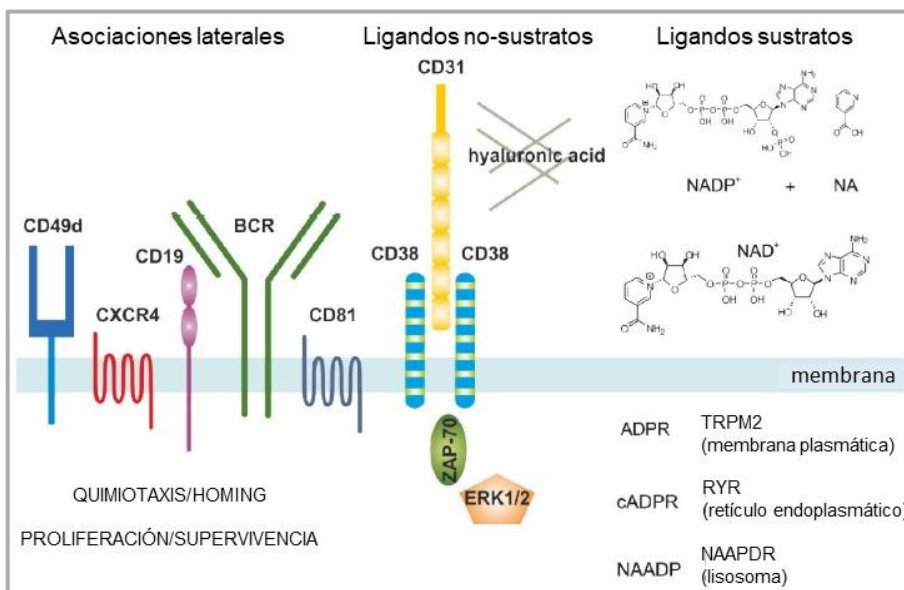


Figura VI: características estructurales y funcionales de la molécula CD38 humana (adaptado de Malavasi et al., 2011¹⁵⁸). En células B humanas, CD38 se expresa como una molécula integral de membrana, generalmente en conformación dimérica. Como enzima puede interactuar con NAD^+ y NADP^+ (ligandos sustratos), convirtiéndolos en cADPR, ADPR y NAADP, todos agentes movilizadores de Ca^{2+} intracelular. CD38 también interactúa con ligandos no-sustratos, como CD31 y ácido hialurónico, que regulan los

contactos célula-célula y célula-matriz. En la membrana plasmática, CD38 muestra localización preferencial en microdominios en estrecho contacto con el complejo BCR (CD19/CD81) y con moléculas que regulan el *homing* (CXCR4 y CD49d). La unión de CD38 a su ligando natural CD31 estimula la activación de una vía de señalización intracelular que incluye ZAP-70 y ERK1/2. Estas señales aumentan la quimiotaxis y la proliferación de las células B neoplásicas.

En este trabajo, a pesar de no haberse observado diferencias significativas a nivel del transcritpo luego del análisis de PCR en tiempo real, se realizó igualmente una cuantificación de CD38 a nivel proteico. Interesantemente, nuestros estudios en citometría de flujo, si bien son preliminares, demuestran la presencia de un aumento en la expresión de CD38 en aquellos pacientes con la mutación *off-target* de AID en la región 3' UTR del gen que la codifica. Esta diferencia se observa tanto al comparar la totalidad del clon en los pacientes del grupo mutado los del grupo *wild-type*, como al comparar específicamente las FP y las FQ de los pacientes de ambos grupos (Fig. 1.E).

El hecho de que de los 3 pacientes Mut analizados, 2 vean aumentada su expresión de CD38 con respecto a los Wt, ayuda a reafirmar el mecanismo inicialmente propuesto por Seija: la mutación en la región 3' UTR podría encontrarse dentro de la región blanco de un miARN; esto generaría una disminución en la complementariedad entre las secuencias y, por tanto, por ejemplo, una menor eficiencia en el mecanismo de degradación del ARNm de CD38⁹⁷. En consecuencia, la expresión de CD38 aumentaría. Más interesante aún es que, dentro del grupo de pacientes con la mutación, la expresión de CD38 sea mayor en la FP, ya que es ampliamente aceptado que dicha fracción sobreexpresa AID⁶². Por tanto, con este resultado nos acercamos a confirmar la hipótesis de que la mutación en 3' UTR del gen *CD38*, que se correlaciona con una mayor expresión de CD38, sería causada por AID.

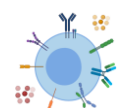
Por primera vez, los resultados aquí presentados proveen un posible nexo entre la expresión anómala de AID en la FP de pacientes con LLC con un curso clínico desfavorable, y la expresión aumentada del marcador de mal pronóstico, activación y proliferación celular, CD38^{38,149-153}.

Estos resultados dan el puntapié inicial para un posterior proyecto de postgrado. En principio, tenemos pensado volver a estudiar la expresión a nivel proteico de CD38 en un mayor número de pacientes con y sin la mutación, para confirmar estos resultados preliminares en una cohorte mayor. A largo plazo, se propone volver a realizar un secuenciado en esta cohorte expandida, específicamente del gen *CD38* y su región 3' UTR, en busca de la mutación que previamente identificamos y creemos responsable del aumento de la expresión de CD38. De confirmarse esta tendencia, se procedería al modelado teórico de posibles moléculas de miARN que se unieran a la región 3' UTR de CD38 para realizar posteriores estudios *in vitro*, por ejemplo, la transfección de la línea celular MEC-1 con un vector portando un gen reportero (como lo es el codificante para la proteína luciferasa) y la región 3' UTR de *CD38* con o sin la mutación en estudio. Esto nos permitiría identificar el microARN específico que estaría regulando la expresión de CD38 en LLC, y confirmar que la acción de AID a través de mutaciones *off-target* puede modificar el comportamiento del clon leucémico.

En lo que respecta a los otros genes estudiados por PCR cuantitativa, cabe mencionar que, dado el poco conocimiento de las posibles implicancias de la proteína POT1 en LLC u otras patologías relacionadas, así como de IL-17 y su receptor (IL-17R), no se creyó conveniente invertir más esfuerzos en posteriores análisis sobre la expresión de estas proteínas y sus posibles implicancias en la progresión leucémica.

Sin embargo, evaluamos de interés el análisis de la expresión de *IKZF1*, un factor de transcripción de importancia para el desarrollo del linfocito B^{129,131}. A diferencia del resto de los genes, este arrojó diferencias estadísticamente significativas en el análisis por PCR en tiempo real, mostrando una disminución en la expresión en los pacientes Mut respecto a los Wt. Esto se encuentra en línea con lo esperado, según nuestra hipótesis de que una disrupción en la función de un factor de transcripción crucial para la diferenciación del linfocito B, como lo es IKZF1, podría generar células B leucémicas con un menor grado de diferenciación. Dado que células tumorales indiferenciadas suelen dar lugar a tumores más malignos, esto podría concordar con la observación de que esta mutación esté involucrada en la función de IKZF1 sobre el clon tumoral y se encuentre en pacientes con una LLC de peor evolución clínica¹³⁷⁻¹³⁸.

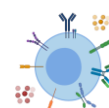
Si bien no dejamos de lado la hipótesis de que mutaciones en 3' UTR podrían interferir con interacciones miARN-ARNm blanco, también se debe tener en cuenta que las regiones 3' UTR son determinantes para la localización subcelular del transcripto y, por tanto, de la proteína que codifica⁹⁹. Específicamente en LLC y con foco en el gen *IKZF1*, en un trabajo publicado en 2019, de Oliveira et al.¹⁴³ analiza por microscopía confocal la localización subcelular de esta proteína en una cohorte de 60 pacientes con LLC al tiempo del debut (19 con perfil IgV_H NM, los restantes con perfil Mut) y en 10 donantes sanos. Los resultados muestran que, a diferencia de los donantes sanos, en los que la proteína se localiza predominantemente en el núcleo, en la mayoría de los pacientes con LLC *IKZF1* se encuentra mayormente en el citosol¹⁴⁵. Dado que este gen codifica para un factor de transcripción y su función se completa en el núcleo, la presencia mayoritaria de *IKZF1* en el citosol sugiere una inactivación de este factor de transcripción en LLC. De acuerdo con los resultados obtenidos, sería interesante, en futuras investigaciones, realizar un estudio análogo en nuestra cohorte y evaluar si existen diferencias en la localización subcelular de *IKZF1* en función de la presencia de mutaciones en 3' UTR entre las diferentes subpoblaciones (FQ y FP) del clon tumoral. De ser así, esto proveería un dato de suma importancia en lo que refiere al origen de esta disrupción en la función de *IKZF1*: la expresión aberrante de AID en pacientes progresores generaría mutaciones en el 3' UTR del gen, que afectarían la localización subcelular de la proteína y con ella, su función.



El otro punto de interés en el análisis del gen *IKZF1* es la gran cantidad de isoformas que presenta el transcrito, que suponen mecanismos de regulación postraduccional mediante la presencia de isoformas dominantes negativas (IDNs) que han sido descritas al momento^{138,140mi}. Como se mencionó en la sección *Genes con mutaciones en 3' UTR relevantes en LLC* de la Introducción (pág. 19), en el trabajo de Oliveira et al. se describe la predominancia de las IDNs de *IKZF1* en pacientes con LLC¹⁴⁵. A raíz de las observaciones de dicho trabajo respecto al gen *IKZF1* decidimos llevar a cabo un análisis cualitativo por PCR a punto final de la expresión de las diferentes isoformas del gen en dos muestras de líneas celulares (MEC-1 y Daudi) y en dos pacientes con LLC progresores (LLC 060 y LLC 278). Nuestros resultados muestran que es posible encontrar, en ambos pacientes, 6 de las 8 isoformas de *IKZF1*, observándose principalmente las bandas correspondientes a Ik1, 2, 3, 4, 5 y 7, siendo la banda mayoritaria la correspondiente al peso esperado para Ik2, de 892 pb. Por último, se obtuvieron 3 bandas mayoritarias, presentes en todas las muestras, que no pudieron identificarse: 2 en el rango de los 1200 pb, y una entre 900 pb y 1000 pb. Estas podrían ser producto de uniones inespecíficas de los cebadores con el molde en la reacción de PCR, o bien isoformas del gen aun no descritas. Para confirmar esto, es necesaria la extracción de las bandas para su secuenciado y su comparación con bases de datos, lo cual no fue realizado aun.

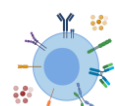
En este trabajo se logró cuantificar la expresión de *IKZF1* en pacientes con y sin la mutación de AID en 3' UTR, encontrando una disminución de esta en pacientes del primer grupo, así como observar el perfil de *splicing* diferencial de *IKZF1*, tanto en dos líneas celulares como en pacientes progresores, incluidas algunas isoformas dominantes negativas. En conjunto, estos datos, si bien deben profundizarse, podrían sugerir un posible rol de la desregulación de *IKZF1*, producto de la actividad mutagénica de AID, en las vías de diferenciación de la célula B en LLC. La confirmación de una posible implicancia de la función alterada de *IKZF1* en LLC requiere estudios más profundos que abarquen todas sus isoformas, la cuantificación de los niveles de expresión de cada una de ellas, el análisis de patrones de localización celular, entre otras.

Como conclusiones finales de este trabajo cabe mencionar que, si bien son preliminares, nuestros resultados muestran que la actividad mutagénica de AID en la célula leucémica llevaría a mutaciones en genes no Ig que colaboran tanto en eventos tempranos de la transformación leucémica (*IKZF1*) como en la emergencia de nuevos clones implicados en la progresión del tumor y activación linfocitaria (*CD38*). De la gran cantidad de mutaciones encontradas en el genoma LLC, se ha demostrado que un porcentaje de ellas llevan la firma de AID^{29,79,97}. Sin embargo, poco se ha ahondado en el posible efecto de dichas mutaciones y sus implicancias en la evolución del clon leucémico. Esta Tesina de Finalización de Carrera tuvo como fin comenzar a comprender el origen y las consecuencias de este gran número de mutaciones de AID en genes no Igs en una región génica no codificante, pero de crucial importancia para la regulación del gen. Conocer los mecanismos por los que AID contribuye a la progresión tumoral es de vital importancia, ya que contribuiría a la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para una enfermedad que, al día de hoy, sigue considerándose incurable.

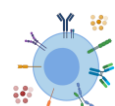


Referencias

1. Marshall, J.S., Warrington, R., Watson, W. & Kim, H.L. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* **14**, 49 (2018).
2. Seifert, M., Scholtysik, R. & Küppers, R. Origin and Pathogenesis of B Cell Lymphomas. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **971**, 1-25 (2013).
3. Tonegawa, S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575-581 (1983).
4. Ise, W. & Kurosaki, T. Plasma cell differentiation during the germinal center reaction. *Immunological Reviews* **288**, 64-74 (2019).
5. Basso, K. & Dalla-Favera, R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nature Reviews Immunology* **15**, 172-184 (2015).
6. Victora, G. & Nussenzweig, M. Germinal Centers. *Annual review of immunology* **30**, 429-457 (2011).
7. Casellas, R., *et al.* Mutations, kataegis and translocations in B cells: understanding AID promiscuous activity. *Nature Reviews Immunology* **16**, 164-176 (2016).
8. OKAZAKI, I., *et al.* Activation-Induced Cytidine Deaminase Links Class Switch Recombination and Somatic Hypermutation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **987**, 1-8 (2003).
9. Methot, S. & Di Noia, J. Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. Vol. 133 (2016).
10. Larijani, M., *et al.* AID Associates with Single-Stranded DNA with High Affinity and a Long Complex Half-Life in a Sequence-Independent Manner. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 20-30 (2007).
11. Chi, X., Li, Y. & Qiu, X. V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. *Immunology* **160**, 233-247 (2020).
12. Peña-Díaz, J. & Jiricny, J. Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone? *Trends in Biochemical Sciences* **37**, 206-214 (2012).
13. Boboila, C., Alt, F.W. & Schwer, B. Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks. *Adv Immunol* **116**, 1-49 (2012).
14. Honjo, T., *et al.* The AID dilemma: infection, or cancer? *Advances in cancer research* **113**, 1-44 (2012).
15. Robbiani, D.F. & Nussenzweig, M.C. Chromosome Translocation, B Cell Lymphoma, and Activation-Induced Cytidine Deaminase. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **8**, 79-103 (2013).
16. Oppezzo, P., Navarrete, M., Chiorazzi, N. AID in chronic lymphocytic leukemia: Induction and action during disease progression. *Manuscrito aun no publicado* (2021).
17. Dorland, W.A.N. & Taylor, E.J. *Dorland's illustrated medical dictionary*, (W.B. Saunders, Philadelphia, Pa.; Toronto, 1988).
18. Okazaki, I.-m., *et al.* Constitutive Expression of AID Leads to Tumorigenesis. *Journal of Experimental Medicine* **197**, 1173-1181 (2003).
19. Pasqualucci, L., Kitaura, Y., Gu, H. & Dalla-Favera, R. 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**, 395-400 (2006).
20. Ramiro, A., *et al.* AID Is Required for c-myc/IgH Chromosome Translocations In Vivo. *Cell* **118**, 431-438 (2004).
21. Takizawa, M., *et al.* AID expression levels determine the extent of cMyc oncogenic translocations and the incidence of B cell tumor development. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 1949-1957 (2008).
22. Honjo, T., *et al.* The AID dilemma: infection, or cancer? *Adv Cancer Res* **113**, 1-44 (2012).
23. Bemark, M. & Neuberger, M.S. The c-MYC allele that is translocated into the IgH locus undergoes constitutive hypermutation in a Burkitt's lymphoma line. *Oncogene* **19**, 3404-3410 (2000).
24. Willis, T.G. & Dyer, M.J.S. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* **96**, 808-822 (2000).



25. Küppers, R. & Dalla-Favera, R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* **20**, 5580-5594 (2001).
26. Pasqualucci, L., *et al.* Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* **412**, 341-346 (2001).
27. Migliazza, A., *et al.* Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 12520-12524 (1995).
28. Lohr, J.G., *et al.* Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 3879-3884 (2012).
29. Morande, P.E., *et al.* AID overexpression leads to aggressive murine CLL and non-Ig mutations that mirror human neoplasms. *Blood* (2021).
30. Kipps, T.J., *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Disease Primers* **3**, 16096 (2017).
31. Nabhan, C., *et al.* The Impact of Race, Ethnicity, Age, and Sex on Clinical Outcome in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Comprehensive SEER Analysis in the Modern Era. *Leukemia & lymphoma* **55**(2014).
32. Pulte, D., Redaniel, M.T., Bird, J. & Jeffreys, M. Survival for patients with chronic leukemias in the US and Britain: Age related disparities and changes in the early 21st century. *European Journal of Haematology* **94**(2014).
33. Murphy, K., Weaver, C. & Janeway, C. *Janeway's immunobiology*, (2017).
34. Deans, J. & Polyak, M. FMC7 is an epitope of CD20. *Blood* **111**, 2492; author reply 2493-2494 (2008).
35. Cui, B., *et al.* High-level ROR1 associates with accelerated disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **128**, 2931-2940 (2016).
36. Fukuda, T., *et al.* Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 3047-3052 (2008).
37. Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G. & Stevenson, F.K. Unmutated Ig VH Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* **94**, 1848-1854 (1999).
38. Damle, R.N., *et al.* Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia: Presented in part at the 40th Annual Meeting of The American Society of Hematology, held in Miami Beach, FL, December 4-8, 1998. *Blood* **94**, 1840-1847 (1999).
39. Zhang, S. & Kipps, T.J. The Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **9**, 103-118 (2014).
40. Gaidano, G., Foà, R. & Dalla-Favera, R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of Clinical Investigation* **122**, 3432-3438 (2012).
41. Rai, K., *et al.* Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **46**, 219-234 (1975).
42. Binet, J.L., *et al.* A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia. Prognostic significance. *Cancer* **40**, 855-864 (1977).
43. Rassenti, L.Z., *et al.* ZAP-70 Compared with Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Mutation Status as a Predictor of Disease Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* **351**, 893-901 (2004).
44. Orchard, J.A., *et al.* ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet* **363**, 105-111 (2004).
45. Fais, F., *et al.* Examples of in vivo isotype class switching in IgM+ chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of Clinical Investigation* **98**, 1659-1666 (1996).
46. Oppezco, P., *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood* **101**, 4029-4032 (2003).
47. Herishanu, Y., *et al.* The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-κB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **117**, 563-574 (2011).
48. Minden, M.D.-v., *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* **489**, 309-312 (2012).

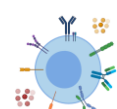


49. Awan, F.T. & Byrd, J.C. New Strategies in Chronic Lymphocytic Leukemia: Shifting Treatment Paradigms. *Clinical Cancer Research* **20**, 5869-5874 (2014).
50. Morande, P.E., *et al.* Ibrutinib therapy downregulates AID enzyme and proliferative fractions in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **133**, 2056-2068 (2019).
51. Slupsky, J.R. Ibrutinib is safer than we think. *Blood* **133**, 2006-2007 (2019).
52. Graham, P., *et al.* The outcome of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: proliferation or anergy. *Haematologica* **99**, 1138-1148 (2014).
53. Palacios, F., *et al.* Activation of the PI3K/AKT pathway by microRNA-22 results in CLL B-cell proliferation. *Leukemia* **29**, 115-125 (2015).
54. Cui, B., *et al.* MicroRNA-155 influences B-cell receptor signaling and associates with aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **124**, 546-554 (2014).
55. Aguilar-Hernandez, M.M., *et al.* IL-4 enhances expression and function of surface IgM in CLL cells. *Blood* **127**, 3015-3025 (2016).
56. Lu, D., *et al.* Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3118-3123 (2004).
57. Yu, J., *et al.* Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation. *The Journal of Clinical Investigation* **126**, 585-598 (2016).
58. Fabbri, G. & Dalla-Favera, R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Cancer* **16**, 145-162 (2016).
59. Coelho, V., *et al.* Identification in CLL of circulating intraclonal subgroups with varying B-cell receptor expression and function. *Blood* **122**, 2664-2672 (2013).
60. Burger, J.A., Burger, M. & Kipps, T.J. Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells Express Functional CXCR4 Chemokine Receptors That Mediate Spontaneous Migration Beneath Bone Marrow Stromal Cells. *Blood* **94**, 3658-3667 (1999).
61. Burger, J.A., *et al.* Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* **96**, 2655-2663 (2000).
62. Calissano, C., *et al.* Intraclonal Complexity in Chronic Lymphocytic Leukemia: Fractions Enriched in Recently Born/Divided and Older/Quiescent Cells. *Molecular Medicine* **17**, 1374-1382 (2011).
63. Chiorazzi, N. Cell proliferation and death: Forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best practice & research. Clinical haematology* **20**, 399-413 (2007).
64. Oppezzo, P. & Dighiero, G. "Role of the B-cell receptor and the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia". *Blood Cancer Journal* **3**, e149-e149 (2013).
65. Messmer, B.T., *et al.* In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of Clinical Investigation* **115**, 755-764 (2005).
66. Defoiche, J., *et al.* Reduction of B cell turnover in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* **143**, 240-247 (2008).
67. van Gent, R., *et al.* *In vivo* Dynamics of Stable Chronic Lymphocytic Leukemia Inversely Correlate with Somatic Hypermutation Levels and Suggest No Major Leukemic Turnover in Bone Marrow. *Cancer Research* **68**, 10137-10144 (2008).
68. Damle, R.N., *et al.* CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood* **110**, 3352-3359 (2007).
69. Pepper, C., *et al.* Highly purified CD38+ and CD38- sub-clones derived from the same chronic lymphocytic leukemia patient have distinct gene expression signatures despite their monoclonal origin. *Leukemia* **21**, 687-696 (2007).
70. Palacios, F., *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* **115**, 4488-4496 (2010).
71. Huemer, M., *et al.* AID induces intraclonal diversity and genomic damage in CD86+ chronic lymphocytic leukemia cells. *European Journal of Immunology* **44**, 3747-3757 (2014).
72. Herndon, T.M., *et al.* Direct in vivo evidence for increased proliferation of CLL cells in lymph nodes compared to bone marrow and peripheral blood. *Leukemia* **31**, 1340-1347 (2017).

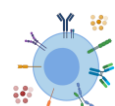


73. Patten, P.E.M., *et al.* IGHV-unmutated and IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia cells produce activation-induced deaminase protein with a full range of biologic functions. *Blood* **120**, 4802-4811 (2012).
74. Albesiano, E., *et al.* Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. *Blood* **102**, 3333-3339 (2003).
75. Murphy, E.J., *et al.* Leukemia-cell proliferation and disease progression in patients with early stage chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **31**, 1348-1354 (2017).
76. Tang, C., Bagnara, D., Chiorazzi, N., Scharff, M.D. & MacCarthy, T. AID Overlapping and Poln Hotspots Are Key Features of Evolutionary Variation Within the Human Antibody Heavy Chain (IGHV) Genes. *Frontiers in Immunology* **11**(2020).
77. Chiorazzi, N. & Stevenson, F.K. Celebrating 20 Years of IGHV Mutation Analysis in CLL. *HemaSphere* **4**, e334 (2020).
78. Döhner, H., *et al.* Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* **343**, 1910-1916 (2000).
79. Kasar, S., *et al.* Whole-genome sequencing reveals activation-induced cytidine deaminase signatures during indolent chronic lymphocytic leukaemia evolution. *Nature Communications* **6**, 8866 (2015).
80. Landau, D.A., *et al.* Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* **526**, 525-530 (2015).
81. Boiza-Sánchez, M., *et al.* Lymphoplasmacytic lymphoma associated with diffuse large B-cell lymphoma: Progression or divergent evolution? *PLOS ONE* **15**, e0241634 (2020).
82. Navarrete, M.A. & Oppezco, P. The pathogenesis of follicular lymphoma, beyond apoptosis resistance. *Translational Cancer Research*, S529-S532 (2017).
83. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. & Lake, R.J. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* **284**, 770-776 (1999).
84. NCBI. SF3B1 splicing factor 3b subunit 1 [Homo sapiens (human)]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=23451>.
85. UniProt. Q13489 (BIRC3_HUMAN). <https://www.uniprot.org/uniprot/Q13489>.
86. Cortese, D., *et al.* On the way towards a 'CLL prognostic index': focus on TP53, BIRC3, SF3B1, NOTCH1 and MYD88 in a population-based cohort. *Leukemia* **28**, 710-713 (2014).
87. Schnaiter, A., *et al.* NOTCH1, SF3B1, and TP53 mutations in fludarabine-refractory CLL patients treated with alemtuzumab: results from the CLL2H trial of the GCLLSG. *Blood* **122**, 1266-1270 (2013).
88. Stilgenbauer, S., *et al.* Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood* **123**, 3247-3254 (2014).
89. Scherer, F., *et al.* Selection patterns of B-cell receptors and the natural history of follicular lymphoma. *British Journal of Haematology* **175**, 972-975 (2016).
90. Scherer, F., *et al.* Isotype-switched follicular lymphoma displays dissociation between activation-induced cytidine deaminase expression and somatic hypermutation. *Leukemia & Lymphoma* **57**, 151-160 (2016).
91. Maura, F., *et al.* A practical guide for mutational signature analysis in hematological malignancies. *Nature Communications* **10**, 2969 (2019).
92. Malcikova, J., *et al.* ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia—update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia* **32**, 1070-1080 (2018).
93. Rossi, D. & Gaidano, G. The clinical implications of gene mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Cancer* **114**, 849-854 (2016).
94. Baliakas, P., *et al.* Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **29**, 329-336 (2015).
95. Nadeu, F., *et al.* Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **127**, 2122-2130 (2016).

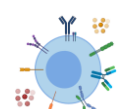
96. Ye, X., *et al.* Genome-wide mutational signatures revealed distinct developmental paths for human B cell lymphomas. *Journal of Experimental Medicine* **218**(2020).
97. Seija, N. Implicancias de la enzima AID en la mutagénesis y evolución clonal durante la progresión de la Leucemia Linfocítica Crónica. *Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.* (2018).
98. Barrett, L.W., Fletcher, S. & Wilton, S.D. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci* **69**, 3613-3634 (2012).
99. Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S. & Pesole, G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology* **3**, reviews0004.0001 (2002).
100. Akgül, B. & Erdoğan, İ. Intracytoplasmic Re-localization of miRISC Complexes. *Frontiers in Genetics* **9**(2018).
101. Bartel, D.P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136**, 215-233 (2009).
102. Iwasaki, S., *et al.* Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery Mediates ATP-Dependent RISC Loading of Small RNA Duplexes. *Molecular Cell* **39**, 292-299 (2010).
103. Leva, G.D., Garofalo, M. & Croce, C.M. MicroRNAs in Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **9**, 287-314 (2014).
104. Ventura, A. & Jacks, T. MicroRNAs and Cancer: Short RNAs Go a Long Way. *Cell* **136**, 586-591 (2009).
105. Calin, G.A., *et al.* 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* **99**, 15524-15529 (2002).
106. Ji, J., *et al.* MicroRNA Expression, Survival, and Response to Interferon in Liver Cancer. *New England Journal of Medicine* **361**, 1437-1447 (2009).
107. Pekarsky, Y. & Croce, C.M. Role of miR-15/16 in CLL. *Cell Death & Differentiation* **22**, 6-11 (2015).
108. Ma, X., *et al.* IL-17 Enhancement of the IL-6 Signaling Cascade in Astrocytes. *The Journal of Immunology* **184**, 4898-4906 (2010).
109. Wang, L., *et al.* IL-17 can promote tumor growth through an IL-6–Stat3 signaling pathway. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 1457-1464 (2009).
110. Jin, W. & Dong, C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging Microbes & Infections* **2**, 1-5 (2013).
111. Caligaris-Cappio, F. & Hamblin, T.J. B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: A Bird of a Different Feather. *Journal of Clinical Oncology* **17**, 399-399 (1999).
112. Ding, W., *et al.* Bi-directional activation between mesenchymal stem cells and CLL B-cells: implication for CLL disease progression. *British Journal of Haematology* **147**, 471-483 (2009).
113. Mognetti, B., Montagna, G.L., Perrelli, M.G., Pagliaro, P. & Penna, C. Bone marrow mesenchymal stem cells increase motility of prostate cancer cells via production of stromal cell-derived factor-1 α . *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **17**, 287-292 (2013).
114. Majumdar, M.K., Thiede, M.A., Mosca, J.D., Moorman, M. & Gerson, S.L. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *Journal of Cellular Physiology* **176**, 57-66 (1998).
115. Marrache, A.M., *et al.* Proinflammatory Gene Induction by Platelet-Activating Factor Mediated Via Its Cognate Nuclear Receptor. *The Journal of Immunology* **169**, 6474-6481 (2002).
116. Tang, D., *et al.* Increased frequencies of Th17 in the peripheral blood of patients with chronic lymphocytic leukemia: A one year follow-up. *Pakistan journal of medical sciences* **30**, 1128-1133 (2014).
117. Hus, I., *et al.* Th17/IL-17A Might Play a Protective Role in Chronic Lymphocytic Leukemia Immunity. *PLOS ONE* **8**, e78091 (2013).
118. Jadidi-Niaragh, F., *et al.* Downregulation of IL-17-producing T cells is associated with regulatory T cell expansion and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **34**(2012).
119. Schrader, A., *et al.* AKT-pathway inhibition in chronic lymphocytic leukemia reveals response relationships defined by TCL1. *Curr Cancer Drug Targets* **14**, 700-712 (2014).



120. Brown, J.R. The PI3K pathway: clinical inhibition in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* **43**, 260-264 (2016).
121. Hanish, J.P., Yanowitz, J.L. & de Lange, T. Stringent sequence requirements for the formation of human telomeres. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 8861-8865 (1994).
122. Cowell, J.K. Telomeres and telomerase in ageing and cancer. *Age (Omaha)* **22**, 59-64 (1999).
123. Romero, D.P. & Blackburn, E.H. A conserved secondary structure for telomerase RNA. *Cell* **67**, 343-353 (1991).
124. Lingner, J., Cooper, J.P. & Cech, T.R. Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science* **269**, 1533-1534 (1995).
125. Lingner, J., *et al.* Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* **276**, 561-567 (1997).
126. Prowse, K.R. & Greider, C.W. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 4818-4822 (1995).
127. Kondo, T., *et al.* Expression of **POT1** is Associated with Tumor Stage and Telomere Length in Gastric Carcinoma. *Cancer Research* **64**, 523-529 (2004).
128. Ramsay, A.J., *et al.* POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genetics* **45**, 526-530 (2013).
129. Georgopoulos, K. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nature Reviews Immunology* **2**, 162-174 (2002).
130. Nichogiannopoulou, A., Trevisan, M., Neben, S., Friedrich, C. & Georgopoulos, K. Defects in Hemopoietic Stem Cell Activity in Ikaros Mutant Mice. *Journal of Experimental Medicine* **190**, 1201-1214 (1999).
131. Westman, B.J., Mackay, J.P. & Gell, D. Ikaros: a key regulator of haematopoiesis. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 1304-1307 (2002).
132. Nakayama, H., *et al.* Decreases in Ikaros activity correlate with blast crisis in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Research* **59** **16**, 3931-3934 (1999).
133. Georgopoulos, K., Moore, D.D. & Derfler, B. Ikaros, an Early Lymphoid-Specific Transcription Factor and a Putative Mediator for T Cell Commitment. *Science* **258**, 808-812 (1992).
134. Molnár, A. & Georgopoulos, K. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 8292-8303 (1994).
135. Joshi, I., *et al.* Loss of Ikaros DNA-binding function confers integrin-dependent survival on pre-B cells and progression to acute lymphoblastic leukemia. *Nature Immunology* **15**, 294-304 (2014).
136. Oliveira, V.C., *et al.* Ikaros could be a key factor in the maintenance of "B-side" of B-1 cells. *Immunobiology* **220**, 1232-1239 (2015).
137. Zhou, F., *et al.* Ikb6 expression provides a new strategy for the therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Rep* **31**, 1373-1379 (2014).
138. Mullighan, C.G., *et al.* BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* **453**, 110-114 (2008).
139. Kim, J., *et al.* Ikaros DNA-Binding Proteins Direct Formation of Chromatin Remodeling Complexes in Lymphocytes. *Immunity* **10**, 345-355 (1999).
140. Brown, K.E., *et al.* Association of Transcriptionally Silent Genes with Ikaros Complexes at Centromeric Heterochromatin. *Cell* **91**, 845-854 (1997).
141. Cobb, B.S., *et al.* Targeting of Ikaros to pericentromeric heterochromatin by direct DNA binding. *Genes Dev* **14**, 2146-2160 (2000).
142. Li, Z., Perez-Casellas, L.A., Savic, A., Song, C. & Dovat, S. Ikaros isoforms: The saga continues. *World J Biol Chem* **2**, 140-145 (2011).
143. Ruiz, A., Jiang, J., Kempski, H. & Brady, H.J.M. Overexpression of the Ikaros 6 isoform is restricted to t(4;11) acute lymphoblastic leukaemia in children and infants and has a role in B-cell survival. *British Journal of Haematology* **125**, 31-37 (2004).
144. Yagi, T., *et al.* High frequency of Ikaros isoform 6 expression in acute myelomonocytic and monocytic leukemias: Implications for up-regulation of the antiapoptotic protein Bcl-XL in leukemogenesis. *Blood* **99**, 1350-1355 (2002).



145. Oliveira, V.C.d., *et al.* Deregulation of Ikaros expression in B-1 cells: New insights in the malignant transformation to chronic lymphocytic leukemia. *Journal of leukocyte biology* **106**, 581-594 (2019).
146. Mullighan, C.G., *et al.* Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine* **360**, 470-480 (2009).
147. Deaglio, S., Vaisitti, T., Zucchetto, A., Gattei, V. & Malavasi, F. CD38 as a molecular compass guiding topographical decisions of chronic lymphocytic leukemia cells. *Seminars in Cancer Biology* **20**, 416-423 (2010).
148. Deaglio, S., *et al.* CD38/CD19: a lipid raft–dependent signaling complex in human B cells. *Blood* **109**, 5390-5398 (2007).
149. Del Poeta, G., *et al.* Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **98**, 2633-2639 (2001).
150. Ibrahim, S., *et al.* CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **98**, 181-186 (2001).
151. Jelinek, D.F., *et al.* Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* **115**, 854-861 (2001).
152. Morabito, F., *et al.* Peripheral blood CD38 expression predicts survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research* **25**, 927-932 (2001).
153. Dürig, J., *et al.* CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* **16**, 30-35 (2002).
154. Vaisitti, T., *et al.* CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* **24**, 958-969 (2010).
155. Zupo, S., *et al.* CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood* **88**, 1365-1374 (1996).
156. Lanham, S., *et al.* Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **101**, 1087-1093 (2003).
157. Morabito, F., *et al.* Prognostic relevance of in vitro response to cell stimulation via surface IgD in binet stage a CLL. *British Journal of Haematology* **149**, 160-163 (2010).
158. Malavasi, F., *et al.* CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood* **118**, 3470-3478 (2011).
159. GUDJONSSON, T. & MAGNUSSON, M.K. Stem cell biology and the cellular pathways of carcinogenesis. *APMIS* **113**, 922-929 (2005).
160. Chiorazzi, N. & Ferrarini, M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* **117**, 1781-1791 (2011).
161. Thompson, P.A. & Tam, C.S. CD38 expression in CLL: a dynamic marker of prognosis. *Leukemia & lymphoma* **55**, 1-2 (2014).
162. Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15**, 532-534, 536-537 (1993).
163. Stacchini, A., *et al.* MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leukemia Research* **23**, 127-136 (1999).
164. NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=10320>.
165. Scientific, T. QuantStudio Design and Analysis Desktop Software User Guide. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0010408_QuantStudioDesign_Analysis_Desktop_Software_UG.pdf (2015).
166. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* **25**, 402-408 (2001).
167. René, M., Frank, N.v.L. & Blanca, S. The many faces of IKZF1 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **103**, 565-574 (2018).
168. Hamblin, T. Chronic lymphocytic leukaemia: one disease or two? *Annals of Hematology* **81**, 299-303 (2002).



169. Robak, T., Stilgenbauer, S. & Tedeschi, A. Front-line treatment of CLL in the era of novel agents. *Cancer Treatment Reviews* **53**, 70-78 (2017).
170. Hallek, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *American Journal of Hematology* **94**, 1266-1287 (2019).
171. Landau, Dan A., *et al.* Evolution and Impact of Subclonal Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cell* **152**, 714-726 (2013).
172. Burger, J.A., *et al.* Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nature Communications* **7**, 11589 (2016).
173. Burger, J.A. & O'Brien, S. Evolution of CLL treatment — from chemoimmunotherapy to targeted and individualized therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* **15**, 510-527 (2018).
174. Oppezzo, P. & Dighiero, G. What Do Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination Teach Us About Chronic Lymphocytic Leukaemia Pathogenesis? in *Chronic Lymphocytic Leukemia* 71-89 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2005).

