

**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR Y BIOMEDICINA



TESIS DOCTORAL

**MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES EN LA  
LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA: DE LA FUNCIÓN  
DEL COMPLEJO FANCCORE A LA NEDDILACIÓN**

Realizada por: D<sup>a</sup>. SARA BRAVO NAVAS  
Dirigida por: Dr. CARLOS PIPAÓN GONZÁLEZ

Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria

**Santander 2019**





# UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR Y BIOMEDICINA



TESIS DOCTORAL

## **MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES EN LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA: DE LA FUNCIÓN DEL COMPLEJO FANCCORE A LA NEDDILACIÓN**

Realizada por: D<sup>a</sup>. SARA BRAVO NAVAS

Dirigida por: Dr. CARLOS PIPAÓN GONZÁLEZ

Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria

**Santander 2019**





## UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

### PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

El **Dr. Carlos Pipaón González**, investigador principal del Laboratorio de Hematología Molecular del grupo de Neoplasias Hematológicas y trasplante de progenitores hematopoyéticos del HUMV en el Centro de Investigación Valdecilla (IDIVAL) de Santander.

#### **CERTIFICA:**

Que **Dña. Sara Bravo Navas** ha realizado bajo mi dirección y supervisión el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: "Modificaciones postraduccionales en la leucemia linfática crónica: de la función del complejo FANCCore a la neddilación".

Considero que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación, al objeto de poder optar al grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Santander, 19 de noviembre de 2019.

**Fdo. Carlos Pipaón González**



Esta Tesis Doctoral ha sido financiada con la siguiente ayuda:

- Proyecto PI17/01688 del Instituto de Salud Carlos III, co-financiado por el Fondo Regional de Desarrollo Europeo (FEDER).
- El contrato pre-doctoral de Sara Bravo Navas fue subvencionado por fondos obtenidos por la Dr. Lucrecia Yáñez San Segundo de ensayos clínicos.

Quiero agradecer la ayuda prestada:

- Al Dr. Hong-Yu Hu, del Instituto de Bioquímica y Biología Celular de Shanghai, Shanghai, China, por cedernos amablemente el vector pCMV-Tag2B-NUB1L.
- Al Dr. Dimitris Xirodimas, del Centro de Investigación de Biología Celular de Montpellier (CBRM), Francia, por los plásmidos pCDNA<sub>3</sub> MDM2, pCDNA<sub>3</sub> His6-NEDD8 e pCDNA<sub>3</sub> His6-UBB, que nos ha facilitado cortésmente, y por sus comentarios constructivos sobre nuestro trabajo en su visita al laboratorio.



*“The real voyage of discovery consists not in seeking new landscapes, but in  
having new eyes”.*

*Marcel Proust*



*A todas las personas que me han acompañado e inspirado durante la escritura de este libro. . . .*

*. . . . A mi familia,  
y en especial a mi abuela Aurora.*





**AGRADECIMIENTOS.**



Recuerdo la primera lectura de tesis a la que asistí, y la experiencia fue realmente gratificante, tanto, que en ese momento deseé llegar a ser una de ellos algún día. Hoy, unos cuantos años después, puedo decir que aunque el camino ha sido largo, con dudas de cómo, dónde y con quién llevar a cabo este proyecto, no puedo estar más orgullosa de la decisión tomada.

La historia que muestro a continuación es el resultado del trabajo realizado durante estos años, junto con el esfuerzo de quienes han participado en él y sobre todo las ganas y la ilusión con las que cada día afrontábamos las horas que teníamos por delante. Y hablo en plural porque esto ha sido posible gracias a la ayuda de varias personas, que mencionaré a continuación, y sin las cuáles yo hoy no estaría escribiendo estas palabras.

En primer lugar quiero dar las gracias al Dr. Carlos Pipaón, mi director de tesis, gracias por mandar un e-mail al aire y cayera en mis manos. Gracias por darme la oportunidad de aprender y crecer a nivel laboral y como persona al mismo tiempo. Y en segundo lugar, quiero agradecer a la Dra. Lucrecia Yáñez, gracias por permitirme haber vivido haciendo lo que me gusta durante estos años, ojalá muchas personas fuesen como tú. A los dos gracias por vuestra ayuda, consejos e implicación en este trabajo, por vuestras ganas e ilusión por aprender y seguir avanzando un poquito más cada día. Ha sido un verdadero placer trabajar a vuestro lado y quien sabe, quizá nuestros caminos se crucen de nuevo algún día.

Gracias a mis padres, Aurora e Isidro, pilares fundamentales de mi vida. Habéis sido para mí una inspiración constante por vuestro trabajo y sacrificio, y espejo en el que mirarme siempre. Estar hoy aquí es posible gracias a vosotros y os estaré eternamente agradecida.

Gracias a mi hermano Néstor, por el tiempo que hemos pasado, pasamos y pasaremos juntos, las confidencias, el apoyo, ... infinitos pensamientos indescriptibles en unas pocas líneas y que hacen que no pueda imaginar mi vida sin ti. Y a mi reciente hermana política Marina, gracias por aparecer y por quedarte.

A toda mi familia, a los que ya no están con nosotros pero siempre en mi corazón, y a los que tengo la suerte de poder tener a mi lado y disfrutar cada día.

Y por supuesto gracias a ti Luis, porque sé que no importa el camino que escoja, ni las decisiones que tome, tú seguirás estando ahí apoyándome. Eres gran responsable de que este trabajo vea hoy la luz.

Gracias a mis amigas de siempre, especialmente a Patri, Marta y Nerea. Gracias por estar ahí, incondicionales en todo momento, por reír y llorar conmigo cuando lo he necesitado y por comprender y respetar que no haya podido pasar con vosotras todo el tiempo que me hubiera gustado, sois las mejores amigas que podría tener, y por eso sois y seréis las de siempre. Pero no quiero dejar de agradecer a una personita muy especial que llegó a mi vida hace un año, la pequeña Elsa, todavía eres muy pequeña pero algún día leerás estas palabras y entenderás lo especial que eres para mi, y la alegría que ha traído tu llegada a mi vida. Y por supuesto gracias a ti, Patri, por traerla al mundo y permitirme crecer a su lado.

A Aitana, has sido y serás mi gran compañera y amiga, y tenías que ser la siguiente, porque aunque me hubiese gustado compartir más momentos contigo, han sido suficientes para ver la gran persona que eres, muchas gracias por todo, no cambies nunca y que la vida te sonría siempre igual que haces tú.

Quiero agradecer al personal del Servicio de Hematología por toda la ayuda prestada durante estos años, y en especial a Marta, Pilar Fernández, Eli, Patricia, Susana y Reyes, gracias por ser como sois.

A mi querida Mariana, no sabes lo que te voy a echar de menos, llevas conmigo prácticamente desde el primer día, y va a ser difícil no verte cada semana, pero seguirás estando ahí ¡siempre!. Porque personas como tú no aparecen todos los días. Y gracias a Marta, tu alegría infinita ha sido de gran ayuda. Las tres hemos hecho un buen equipo! Y ojalá sea para siempre.

A Laura Álvarez, mi compi de micro y sin la cual estos años hubieran sido mucho más tristes y aburridos, me ha encantado compartirlos contigo. Te deseo todas las cosas buenas que estoy convencida de que te llegarán, porque la gente como tú no se merece menos.

También quiero acordarme de todos los estudiantes que han pasado por el laboratorio en estos años, ha sido un placer participar en vuestra formación, y espero haberos contagiado un poquito de ilusión por este trabajo. Especialmente a Vero, mi primera chica de máster, gracias por elegirnos. Fue maravilloso conocerte y tenerte como compañera, pero también muy triste perderte después, aunque te estaban esperando grandes oportunidades que llegado el momento celebraremos juntas. Siempre serás la chica de la eterna sonrisa.

Han pasado 5 años desde que llegué a Santander, y desde el primer día no he dejado de encontrarme con personas maravillosas, algo que me hace sentir sumamente afortunada. Y como toda historia tiene su principio, las primeras imágenes que me vienen a la mente comienzan con mi llegada al laboratorio de Genética Molecular, yo era la estudiante de máster y allí me encontré con ellas, mis queridas compañeras, personas que con el tiempo se convirtieron en especiales, amigas de verdad que sé que lo serán para siempre: Pilu, Lara, Rosa, Pilar Alonso, Ali, Laura, Natalia y Olga.

Pilu fuiste la primera en recibirme, y desde ese día no te separaste de mí, gracias por tu tiempo y tu paciencia, tu ayuda fue fundamental.

Gracias a Lara, una de las mejores personas que he conocido en mi vida, llena de vitalidad y alegría. Podría escribir páginas y páginas agradeciéndote infinitas cosas pero creo que me entenderás con un gracias por tanto y cuenta conmigo para siempre.

Rosa, mi física favorita, juntas conseguimos que en el laboratorio hubiera un poquito de todo, ha sido un placer conocerte y compartir contigo muchos momentos y... ¡los que quedan!.

Pilar Alonso, coincidimos poco al principio pero pronto te convertiste en alguien imprescindible, gracias por preocuparte, escucharme y ayudarme cada día, te echaré de menos.

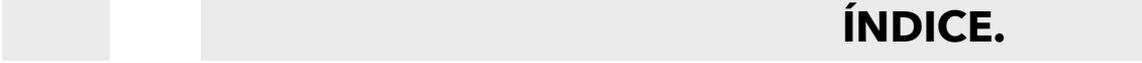
A Ali y Lauri, nunca olvidaré nuestros cafés y comidas en el IDIVAL, que luego pasarían a quedadas nocturnas!. Lauri bienvenida al hospital, es una alegría tenerte con nosotras de nuevo, y aunque ya no podré disfrutar mucho más de tu compañía, espero que ahora sí que sí seas muy feliz, te lo mereces.

Gracias Natalia por toda tu ayuda, y sobre todo en el último año, cuando las circunstancias o simplemente el destino nos ha unido más. Ya estamos cerca, y a partir de ahora sólo nos quedan cosas bonitas. No cambies nunca.

A Olga, mil gracias por todo, más aún en la última etapa, por estar ahí cada día, por tu generosidad y amistad incondicional, en definitiva por tu ayuda infinita.

Y por último, pero no menos importante!, gracias Vero Vidal, llegaste a nuestras vidas hace poco, pero cuanto me alegro de haberte conocido y compartir estos últimos meses contigo. Has sido una gran compañera, pero sobre todo una buena amiga. No puedo desearte más que suerte y felicidad siempre.

No sé que pasará mañana, ni como será mi vida en los próximos años, la gente que llegará y se irá, pero todas vosotras seréis especiales, y siempre siempre ocuparéis un sitio privilegiado en mi corazón.



## ÍNDICE.



- |           |  |
|-----------|--|
| <b>33</b> | 1. Modificaciones postraduccionales.                                       |
| 34        | 1.1. Clasificación y Función de las Modificaciones Postraduccionales.      |
| 35        | 1.2. Ubiquitinación.   |
| 38        | 1.2.1. HECT-E3 ubiquitin ligasas.  |
| 39        | 1.2.2. RING-E3 ubiquitin ligasas.  |
| 41        | 1.2.2.1. E3- CULLIN-RING ligasas (CRLs).                                   |
| 45        | 1.3. Neddilación.  |
| 48        | 1.3.1. Enzimas deubiquitinasas DUBs.                                       |
| 50        | 1.3.2. Inhibidores de Neddilación.   |
| <b>53</b> | 2. Aspectos Clínicos de la Leucemia Linfática Crónica.                     |
| 53        | 2.1. Características generales.  |
| 53        | 2.2. Progresión Clínica - Estratificación del riesgo.                      |
| 54        | 2.3. Marcadores Pronóstico - Estadio Clínico al diagnóstico.               |
| 54        | 2.3.1. Edad, expresión de $\beta$ 2-microglobulina.                        |
| 55        | 2.3.2. Estado mutacional de los genes IGHV.                                |
| 56        | 2.3.3. Expresión de ZAP-70 y CD38.   |
| 56        | 2.3.4. Anomalías citogenéticas.  |
| 57        | 2.3.5. Mutaciones recurrentes en los genes TP53, ATM, NOTCH, SF3B1, BIRC3. |

58	2.4. Diagnóstico.
58	2.4.1. Generalidades Fisiológicas / Fisiología.
58	2.4.2. Inmunofenotipo.
59	2.4.3. Características Morfológicas / Morfología.
59	2.5. Tratamiento.
60	2.5.1. Quimioterapia.
60	2.5.2. Quimioinmunoterapia.
61	2.5.3. Inhibidores de las rutas de señalización.
61	2.5.3.1. Inhibidores del BCR.
62	2.5.3.2. Inhibidores de Bcl-2.
<b>64</b>	<b>3. Aspectos Moleculares de la Leucemia Linfática Crónica.</b>
64	3.1. Características Moleculares.
64	3.1.1. Maquinaria de apoptosis.
68	3.1.2. Familia de proteínas Bcl-2.
70	3.1.3. Microambiente.
74	3.2. Rutas de señalización.
75	3.2.1. Receptor de célula B.
78	3.2.1.1. Proteína Bruton tirosin quinasa (BTK).
79	3.2.1.2. Vía PI3K/Akt.
81	3.2.2. Vía de supervivencia NF- $\kappa$ B.
85	3.2.3. Ruta de señalización NOTCH.
86	3.2.4. Regulación del ciclo celular.
88	3.2.5. Reparación del Daño en el ADN.

91

3.2.5.1. Gen supresor tumoral: p53.

95

3.2.5.2. Proteínas FANC: Anemia de Fanconi.

## II.

## OBJETIVOS.

101

Objetivos.

## III.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

105

1. Características de los pacientes y tiempo de progresión.

106

2. Cultivos Celulares.

106

2.1. Líneas y Cultivos Celulares.

108

2.2. Transfección Celular.

108

2.2.1. Método del Fosfato cálcico.

108

2.2.2. Método del FuGENE.

109

2.2.3. Electroporación.

109

2.2.4. Superfect.

110

3. Reactivos.

- 114** 4. Análisis de la Expresión Génica mediante RT-PCR Y RT-qPCR.
- 114 4.1. Extracción de ARN.
- 115 4.2. Obtención del ADN complementario.
- 116 4.3. Diseño de oligonucleótidos cebadores para PCR y qPCR.
- 118 4.4. Detección de la Expresión Génica mediante PCR semicuantitativa.
- 119 4.5. Detección de la Expresión Génica mediante PCR cuantitativa (qPCR) a tiempo real.

- 121** 5. Análisis estadístico.

- 121** 6. Análisis de secuenciación de ARN.

- 122** 7. Análisis de la actividad transcripcional mediante genes reporteros por luciferasa.

- 123** 8. Análisis de Proteínas por Western Blotting.

- 126** 9. Inmunofluorescencia de p53.

- 127** 10. Producción de virus e Infección lentiviral.

- 128** 11. Ensayos de proliferación celular.

**128** 12. Estudio del neddiloma.

## IV.

## RESULTADOS.

- 133** 1. Función que desempeña el gen FANCA en la LLC.
- 133 1.1. Expresión de genes FANCA en muestras de LLC.
- 135 1.2. Asociación estadística entre la sobreexpresión de FANCA y un peor pronóstico clínico en pacientes con LLC.
- 138 1.3. La sobreexpresión de FANCA en las células de la LLC altera la expresión de muchos genes de supervivencia celular.
- 141 1.4. La sobreexpresión de FANCA en células de LLC afecta la expresión de las dianas de p53, p21 y  $\Delta Np73$ .
- 146 1.5. FANCA activa la proliferación celular de los linfocitos B-LLC.
- 149** 2. Relación entre la neddilación y FANCA.
- 149 2.1. FANCA coopera con la proteína NUB1 en la inhibición de p53.
- 156** 3. Estudio de la función de la neddilación en la Leucemia Linfática Crónica.
- 156 3.1. Estudio del neddiloma.
- 161 3.2. Proteínas modificadas por neddilación.

163	3.2.1. Proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina y el citoesqueleto.
172	3.2.2. Proteínas implicadas en el metabolismo del ARN (RNA splicing).
173	3.2.3. Rutas activadas por el Receptor de célula B.
176	3.2.4. Proteínas de la ruta NF-κB.
180	3.2.5. Proteínas de la ruta NOTCH.
181	3.2.6. Proteínas de reparación del ADN.
184	3.2.6.1. Estudio del efecto de la Neddilación sobre la función, estabilidad y localización subcelular de la proteína p53.

## V.

## DISCUSIÓN.

- 195 1. Estudio de la función que desempeña FANCA en la LLC.
- 200 2. Relación entre las modificaciones postraduccionales y FANCA.
- 202 3. Estudio del papel de las modificaciones postraduccionales, y en especial la neddilación, en la Leucemia Linfática Crónica.

**VI.**

**CONCLUSIONES.**

**215**

Conclusiones.

**VII.**

**BIBLIOGRAFÍA.**

**219**

Bibliografía.

**VIII.**

**ANEXOS.**

**281**

Anexos.

**IX.**

**APÉNDICES.**

**309**

1. Abreviaturas.

**321**

2. Índice de Figuras y Tablas.







**I.**

**INTRODUCCIÓN.**



## 1. Modificaciones Postraduccionales.

La compleja fisiología de las células eucariotas está regulada por todo un conjunto de catalizadores biológicos que son las enzimas. La actividad de estas enzimas viene determinada por su secuencia, codificada en el ADN de cada célula, pero también por toda una serie de mecanismos postranscripcionales y postraduccionales que generan la enorme diversidad de proteínas necesaria para la modulación de los procesos fisiológicos de la célula.

De los diversos mecanismos reguladores disponibles en la célula, las modificaciones postraduccionales (PTM) de las proteínas engloban más de 200 reacciones descritas hasta ahora (1), y consisten en la conjugación covalente de grupos químicos a residuos de la cadena de aminoácidos (2), pudiendo ser la naturaleza de las mismas muy variada. La importancia biológica y la diversidad de las PTM han recorrido un largo camino, desde las primeras y clásicas descripciones de su papel en la regulación de la actividad enzimática y la degradación de proteínas, hasta su implicación en casi todos los procesos celulares (3).

La amplia gama de modificaciones postraduccionales reversibles crea una gran diversidad en la señalización. Algunas modificaciones como la glicosilación y la unión de moléculas lipídicas, son estables e importantes para la maduración y el correcto plegamiento de las proteínas recién sintetizadas, mientras que otras como la fosforilación (4), son transitorias y tienen funciones esenciales en la señalización intracelular. Un hecho importante es que una

proteína puede ser modificada por más de un tipo de PTM o de manera múltiple por la misma modificación en diferentes residuos (3).

### 1.1. Clasificación y Función de las Modificaciones Postraduccionales.

Las proteínas son estructuras formadas por cadenas de aminoácidos ordenados en una secuencia concreta, adoptando una conformación tridimensional determinada pero flexible. Las proteínas pueden ejecutar diversas funciones, desde proporcionar a la célula su soporte estructural como hacen las proteínas del citoesqueleto, a favorecer reacciones químicas como las enzimas, controlar el tráfico intracelular y el flujo de sustancias entre la célula y el exterior, y regular la expresión de los genes (2). El número de genes que codifican proteínas es muy similar entre los diferentes organismos con una complejidad variada. De manera que la actividad, estabilidad y localización subcelular de las proteínas se regulan de una manera muy precisa a través de las modificaciones postraduccionales (5).

Entre las posibles PTM se incluyen las modificaciones de pequeños grupos químicos como los fosfatos, o los grupos acetilo y metilo, la conjugación de lípidos y azúcares o la unión de moléculas pequeñas como la ubiquitina y otras 16 proteínas similares a la ubiquitina denominadas UBLs (*ubiquitin like molecules*) (6). La ubiquitina es el modificador mejor caracterizado y participa en prácticamente todos los aspectos de la homeostasis celular, a través del sistema ubiquitin-proteosoma (7). Dentro de las UBLs, se encuentran los miembros de la familia SUMO, implicados en la regulación de un gran número de procesos biológicos como la transcripción genética, el ciclo celular y la apoptosis entre otros (8); los miembros de la familia ATG8 y ATG12 que controlan la autofagia (9); FAT10, ISG15 y FUB1 que actúan como reguladores de las respuestas inmunitarias e inflamatorias (10) (11), URM1 que puede funcionar

regulando el estrés oxidativo y modula la traducción de proteínas a través de la tiolación del ARNt (12), y NEDD8, una proteína que desempeña un papel fundamental en el crecimiento celular, la viabilidad y el desarrollo (13)(14).

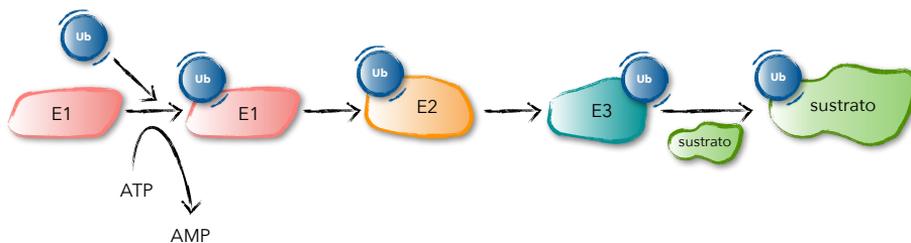
## 1.2. Ubiquitinación.

El descubrimiento del hecho de que las histonas podían ser modificadas por la proteína ubiquitina a través de enlaces peptídicos ligados a las lisinas (Lys), marcó una nueva etapa en la señalización postraducciona. Hasta ese momento, lo que se sabía era que pequeñas modificaciones químicas de los aminoácidos, entre las que se incluían la fosforilación y la acetilación, regulaban la función de las proteínas (5). La importancia de las modificaciones postraduccionales surgió en la década de los 80, cuando los estudios de referencia relacionaron la ubiquitinación de los sustratos dependientes de ATP con su degradación por el proteosoma, estudios que han dado lugar a todo lo que se conoce actualmente (15).

La ubiquitinación regula una gran cantidad de funciones celulares. La principal es etiquetar proteínas para su posterior degradación por el proteosoma, regulando de esta manera la progresión del ciclo celular (16), la inducción de la respuesta inflamatoria (17) y la presentación de antígenos (18), entre otros (19). Por otro lado, también se ha descrito que la ubiquitinación regula otros procesos que no implican la proteólisis dependiente del sistema ubiquitin-proteosoma, como la función ribosómica (20), las interacciones entre proteínas, la alteración de la distribución subcelular y la reparación del ADN, así como la función de ciertos factores de transcripción (19). Por estas razones, no es de extrañar que la ubiquitinación se haya relacionado con prácticamente todos los procesos celulares (21).

La ubiquitina es un polipéptido formado por 76 aminoácidos, que cumple funciones esenciales en las células eucariotas a través de su unión covalente a otras proteínas intracelulares en residuos de lisina. Este péptido contiene siete residuos de lisina, los cuales pueden ser ubiquitinados a su vez, dando lugar a cadenas de ubiquitina unidas a isopéptidos (15), o sufrir otro tipo de modificaciones postraduccionales, químicamente diferentes, como la fosforilación y la acetilación (15). La naturaleza de estas ramificaciones genera una interfaz que es reconocida por diferentes proteínas, lo que determina el destino final de la proteína (22).

La vía de ubiquitinación se produce a través de la acción secuencial de la enzima activadora de ubiquitina (Ub) E1, las enzimas conjugadoras de Ub denominadas UBC o E2 y las ligasas de Ub denominadas comúnmente E3 (23). El proceso comienza con la activación de la ubiquitina libre, mediante la formación de un enlace tío-éster entre el grupo carboxilo de la misma y la cisteína (Cys) activada de la proteína E1, de esta forma, se prepara el extremo C-terminal de la ubiquitina para que se produzca el ataque nucleofílico, en un proceso dependiente de ATP. A continuación, la ubiquitina se transfiere a la Cys activa de la proteína de conjugación E2, que transporta transitoriamente la molécula de ubiquitina activada, y finalmente una ligasa E3, encargada de catalizar la ubiquitinación del sustrato, transfiere la ubiquitina al residuo de lisina específico del sustrato, dando como resultado la formación de un enlace entre el extremo C-terminal de la ubiquitina y el grupo  $\epsilon$ -amino del residuo de lisina perteneciente al sustrato (**figura 1**). Este mecanismo en tres pasos inicia todas las reacciones de ubiquitinación que se conocen, independientemente de si ésta modificación señala la degradación proteosomal o cualquier otro destino (19) (21).



**Figura 1: Esquema de ubiquitinación.**

Los sustratos pueden sufrir modificaciones por una única ubiquitina en uno o más sitios, dando lugar a procesos de monoubiquitinación y multi-monoubiquitinación respectivamente, o se pueden etiquetar con cadenas de ubiquitina, dando lugar a poli- o multiubiquitinación. La formación de las cadenas peptídicas puede ocurrir a través de los siete residuos de Lys internos que contiene la ubiquitina o en su extremo N-terminal. La mayoría de las evidencias experimentales concluyen que las cadenas de ubiquitina se construyen secuencialmente comenzando con el péptido unido al sustrato, pero también hay algunos artículos que describen que las cadenas se pueden construir en E2 o E3 y transferirse a los sustratos en bloque (21), de manera que las cadenas de ubiquitina son una señal reconocible por otras proteínas con funciones específicas que se unen a ellas. También, existen las proteínas deubiquitininas (DUBs), que son una familia de enzimas que revierten la adición de ubiquitina, rompiendo el enlace peptídico y liberando los péptidos intactos (24).

La ubiquitinación se produce con elevada especificidad espacial, temporal y de sustrato, debido a las más de 600 enzimas E3 que se conocen codificadas por el genoma de los mamíferos (25), mientras que se estima que codifica 2 importantes enzimas E1 y aproximadamente unas 30 enzimas E2, que contienen un núcleo catalítico formado por unos 160 aminoácidos. Además de la especificidad y complejidad celular, las E3 representan una

superfamilia mucho más grande y diversa, que cumple una serie de condiciones fisiopatológicas que las convierten en interesantes objetivos farmacológicos (26). Se conocen principalmente 2 grupos de enzimas ligasas de ubiquitina (E3), que tienen en común la capacidad de unir un sustrato con una E2 específica, regulando diferentes procesos celulares al mediar la ubiquitinación de proteínas de maneras funcionalmente distintas, conocidos como HECT-E3 y RING-E3, que difieren en la forma de transferencia de la ubiquitina al sustrato (27).

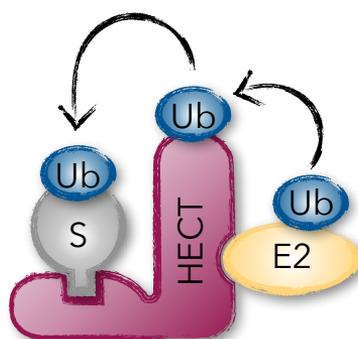
### 1.2.1. HECT-E3 ubiquitin ligasas.

Las ligasas de ubiquitina HECT-E3 son el grupo minoritario de ligasas E3, y se caracterizan por tener importantes funciones en el transporte de proteínas, la respuesta inmune y en diversas rutas de señalización que regulan el crecimiento y la proliferación celular. En mamíferos se han descrito unas 30 proteínas HECT-E3 (21).

La mayoría de las ligasas E3 de este tipo contienen un dominio HECT catalítico conservado, formado por 350 aminoácidos, que se localiza en el extremo C-terminal de estas enzimas y se describió por primera vez en el virus del papiloma humano. Este dominio está formado por dos lóbulos, el lóbulo C que se sitúa en el extremo C-terminal de la proteína y es donde se encuentra la cisteína (Cys) que forma los complejos tioéster con la ubiquitina, y el lóbulo N en la región N-terminal donde se une la enzima E2 (28). Este dominio es el que presenta la actividad de ubiquitina ligasa (**figura 2**).

Las HECT-E3 ubiquitina ligasas pueden presentar uno o más dominios de interacción de tipo proteína-proteína o proteína-lípido, situados hacia el extremo amino de las proteínas. Pueden dividirse en tres grupos: la familia Nedd4, la familia HERC y otros HECT (27). Los miembros de la familia Nedd4 contienen un dominio denominado C2 en el extremo N-terminal, que se une a los fosfolípidos, mediando la

orientación intracelular a la membrana plasmática. Pueden unirse también a otro tipo de proteínas específicas como la anexina (29) (30). Además contienen entre dos y cuatro dominios WW y el dominio HECT en el extremo C-terminal. La familia HERC posee uno o varios dominios denominados RLD (dominios homólogos al regulador de la condensación de la cromatina RCC1) y el dominio HECT (31). Y por último, otras familias HECT que incluyen proteínas que pueden contener varios dominios.

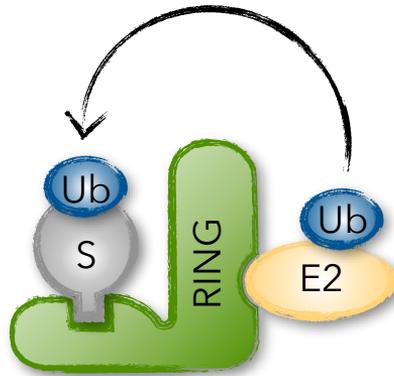


**Figura 2: Estructura de las ligasas de ubiquitina HECT-E3.** Estas enzimas contienen un residuo de Cys catalítico conservado que actúa como un aceptor de ubiquitina de las enzimas E2. Posteriormente, la ubiquitina se transfiere a un residuo de Lys específico del sustrato. Modificado de (27).

### 1.2.2. RING-E3 ubiquitin ligasas.

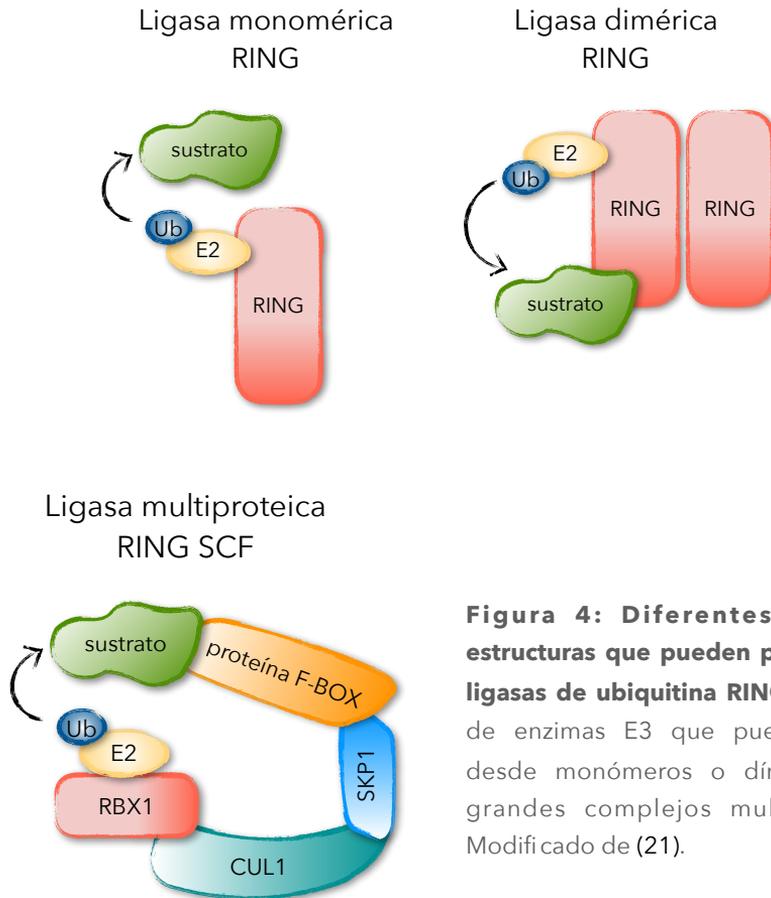
Las ligasas de ubiquitina RING-E3 son el subgrupo más grande de ubiquitin ligasas, implicadas en gran medida en los procesos de apoptosis y en el correcto funcionamiento del ciclo celular. Su estructura es multimérica y está formada por un dominio RING, que coordina  $Zn^{2+}$  a través de residuos de cisteína e histidina específicamente espaciados, que se une al E2 determinado (32).

A diferencia del dominio HECT, RING no forma un intermedio catalítico con la ubiquitina, sino que actúa como un andamio entre la enzima E2 y el sustrato, facilitando así la interacción entre ambos, la transferencia de la ubiquitina y por lo tanto la ubiquitinación del sustrato (21) (**figura 3**).



**Figura 3: Estructura de las ligasas de ubiquitina RING-E3.** Enzimas que actúan como andamio facilitando la interacción entre la E2 y el sustrato. Modificado de (27).

Los miembros de esta familia pueden formar monómeros, dímeros o complejos multiproteicos (**figura 4**). La dimerización puede dar lugar a homodímeros como BIRC2, un inhibidor celular de la apoptosis, y TRAF2, un factor de transcripción asociado al receptor TNF $\alpha$ , o heterodímeros como MDM2, un importante regulador negativo del supresor tumoral p53, y BRCA1, gen supresor de tumores (33). Dentro de los complejos de múltiples subunidades se encuentra el complejo FANCore, una ligasa E3 multiproteica que contiene la ligasa E3-RING denominada FANCL encargada de la monoubiquitinación de los sustratos FANCD2 y FANCI, en colaboración con la enzima E2 de conjugación UBE2T (34) (35) (36). Igualmente se encuentra la superfamilia de ligasas E3-Cullin-RING (CRL), que media la ubiquitinación de muchas proteínas diana, regulando así una amplia gama de procesos celulares (37).

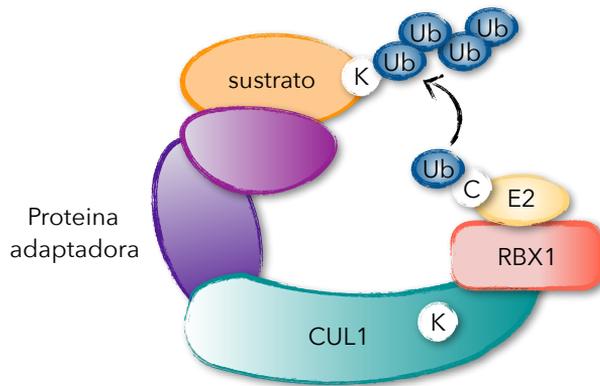


**Figura 4: Diferentes tipos de estructuras que pueden presentar las ligasas de ubiquitina RING-E3.** Grupo de enzimas E3 que pueden formar desde monómeros o dímeros hasta grandes complejos multiproteicos. Modificado de (21).

### 1.2.2.1. E3-CULLIN-RING ligasas (CRLs).

Los complejos Cullin-RING engloban la clase de ligasas de ubiquitina RING-E3 más grande que se conoce. Debido a la gran diversidad de subunidades receptor-sustrato que pueden formar, es posible que existan cientos de ligasas E3-Cullin-RING diferentes en las células eucariotas, lo que establece que estas enzimas sean mediadores clave en la regulación postraduccional de las proteínas (38) (39) (37).

Aunque existe una gran diversidad de CRL en términos de su composición y función, es posible caracterizarlas por una serie de factores generales. Las ligasas Cullin-RING (**figura 5**) son unos complejos modulares formados 3 proteínas: una de las diferentes isoformas de la proteína Cullina, junto con la proteína RING-BOX y una variedad de adaptadores que reconocen y aportan sustratos adecuados para la ubiquitinación (24).



**Figura 5: Diagrama de una ligasa de ubiquitina E3-Cullin-RING.** Las CRL presentan una estructura tridimensional formada por diferentes proteínas, una isoforma de CUL (CUL-1), la proteína RING-BOX (RBX1) y los adaptadores que reconocen los sustratos. La letra "K" que se encuentra en el sustrato representa el sitio aceptor de ubiquitina, mientras que la "K" que se encuentra en la CUL-1 es el sitio aceptor de NEDD8. La "C" que se localiza en la enzima E2 de conjugación de ubiquitina representa la localización de la Cys del sitio activo que se une a ubiquitina. Modificado de (24).

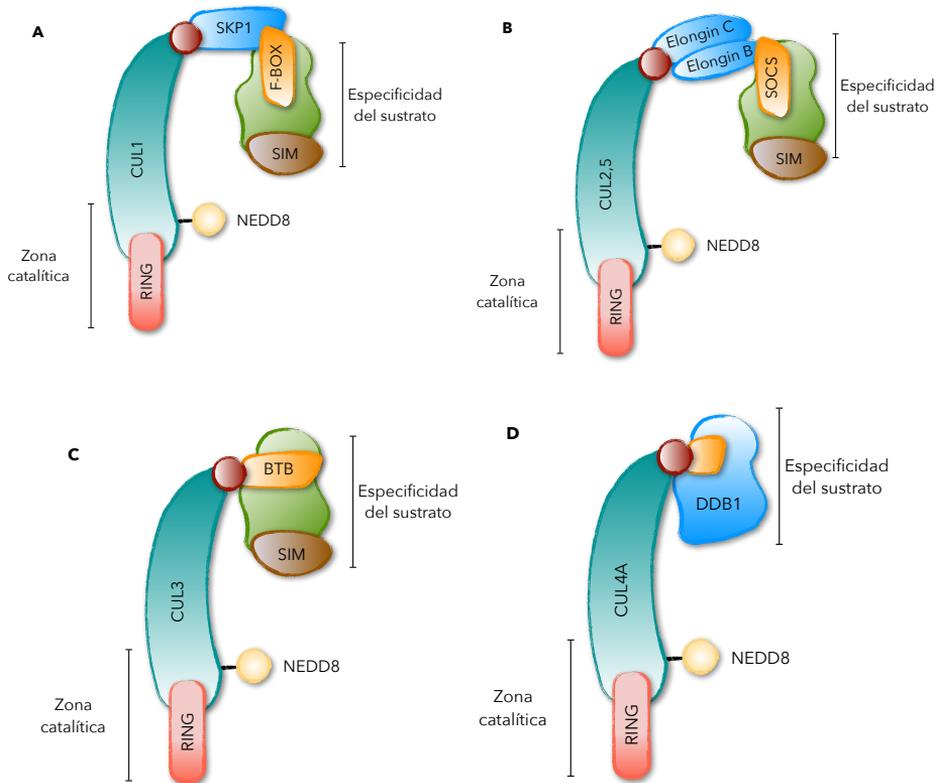
En los seres humanos, la familia de las cullinas está formada por 7 isoformas: CUL-1, CUL-2, CUL-3, CUL-4A, CUL-4B, CUL-5, CUL-7 y al menos otras dos proteínas como APC2, subunidad del complejo APC/C promotor de la anafase y la proteína de anclaje citoplasmática PARC (CUL-9) (37) (24). Estas dos últimas proteínas, contienen un dominio

homólogo a las cullinas, y aunque poseen actividad de ubiquitina-ligasa, son claramente diferentes a las otras cullinas (40) (41).

Las cullinas son proteínas de tipo *scaf-fold* para las ligasas E3 de ubiquitina Cullin-RING, con una arquitectura rígida y extendida, que controlan la ubiquitinación y la degradación proteosomal de proteínas que están implicadas en la regulación del ciclo celular, la regulación transcripcional y la transducción de señales (13) (42). Una característica importante de los CRL es que cada cullina puede unirse a numerosos receptores de sustrato, formándose por lo tanto ligasas E3 con un núcleo común pero capaces de reclutar diferentes proteínas. El núcleo catalítico común de las CRL consiste en una proteína RING y un miembro de la familia de las cullinas, de manera que la proteína RING se une al dominio de homología C-terminal de la cullina, próximo a un residuo de lisina conservado que se conjuga con NEDD8. La subunidad RING de las enzimas CRL actúa como el sitio de acoplamiento para las enzimas conjugadoras E2. Por otro lado, el dominio N-terminal de la cullina, que presenta una estructura similar entre todos los posibles miembros, tiene como función la interacción con las proteínas adaptadoras específicas, a las que se unen los receptores de sustrato (**figura 5**). Los receptores generalmente contienen un dominio N-terminal que se une al adaptador, y una región C-terminal que se une a la proteína (37). Los receptores de cullina marcan la especificidad del sustrato (43).

Las CRL que contienen CUL1 se denominan ligasas de ubiquitina SCF (SKP1-Cullin-F-Box), y reclutan sustratos a través de la proteína adaptadora SKP1 y el receptor de sustrato F-box (44), mientras que las otras CRL tienen composiciones diferentes y se les conoce con varios nombres. Las CRL de tipo 2 están formadas por CUL2 y CUL5 y reclutan sustratos a través de la proteína adaptadora Elongina C (45) y el receptor de sustrato SOCS. Los CRL de tipo 3 formados por CUL3, reclutan sustratos a través de proteínas

adaptadoras que contienen dominio BTB (46) (47). Y por último, las CRL de tipo 4 formadas por CUL4, que pueden reclutar sustratos a través de proteínas adaptadoras que se unen a la proteína de unión al daño en el ADN DDB1 (48) (**figura 6**).



**Figura 6: Diferentes estructuras CRL en función del tipo de CUL que forma el núcleo catalítico junto con la proteína RING.** El análisis estructural de la CUL-1 reveló que este tipo de proteínas tienen una forma alargada, con la proteína RING unida al extremo C-terminal, cerca del residuo de Lys conservado que se conjuga con el péptido NEDD8. En el extremo N-terminal de las proteínas CUL se encuentra la región que interactúa con las proteínas adaptadoras específicas, donde se unen los diferentes receptores de sustrato. Los receptores de sustrato contienen el extremo N-terminal que se une a la proteína adaptadora, y el C-terminal que se une al sustrato. (A) CRL tipo 1, CUL-1 o proteínas SKP1. (B) CRL tipo 2, CUL-2 y CUL-5. (C) CRL tipo 3, CUL-3. (D) CRL tipo 4, CUL-4. Modificado de (37).

El número de posibles proteínas sustrato para los CRL es del orden de cientos, entre los que se incluyen el inhibidor del factor nuclear  $\kappa\text{B}$  ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ), los inhibidores de quinasas dependiente de ciclinas, y el factor de transcripción NFR2 involucrado en la respuesta al estrés oxidativo, entre otros (13) (49). La degradación de los sustratos mediada por este grupo de enzimas, controla una amplia gama de procesos celulares, incluida la proliferación y diferenciación celular, así como la apoptosis (43). Por otro lado, la desregulación de esta familia de proteínas contribuye a la oncogénesis, que puede ser producida por la degradación excesiva de supresores tumorales o a través de la acumulación de oncoproteínas.

La cullina de esta familia de ligasas CRL necesita estar activada por NEDD8 para llevar a cabo su función, a excepción de APC2 y CUL-7 (13). Activar esta superfamilia de ligasas se convirtió en la principal característica del péptido NEDD8, ya que las cullinas son los sustratos mejor caracterizados para la neddilación, aunque con los años se han ido descubriendo y describiendo varias funciones biológicas en las que NEDD8 podría tener una gran importancia (12).

### **1.3. Neddilación.**

El péptido similar a la ubiquitina NEDD8 es una proteína conservada de 81 aminoácidos, predominantemente nuclear, que se descubrió como uno de los diez genes regulados negativamente en el cerebro de los ratones durante el desarrollo, mientras que en los tejidos adultos, la expresión se observa principalmente en el corazón y músculo esquelético (14). Esta pequeña proteína desempeña un papel importante en la regulación de la proliferación y desarrollo celular (50).

Dentro de la familia de las UBLs, NEDD8 es el que presenta mayor homología (80%) e identidad (60%) con la ubiquitina, pero posee una vía de conjugación a proteínas sustrato diferente (13). A

pesar de esa homología, la ubiquitina y NEDD8 tienen funciones no intercambiables en las células (12). Ya se ha descrito que NEDD8 y las enzimas de neddilación se encuentran altamente expresadas en los cánceres humanos (51) (52) (53) (54) (55).

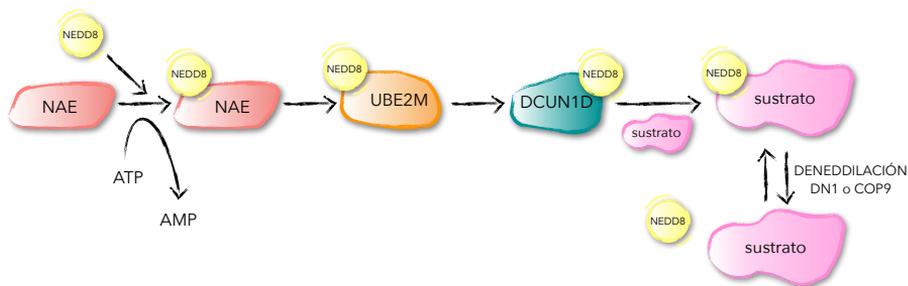
La estructura global de NEDD8 se puede dividir en dos partes, una cola C-terminal y un dominio globular de ubiquitina (UFD). La cola es flexible en disolución, y puede adoptar diferentes conformaciones al interactuar con las enzimas de neddilación y de-neddilación denominadas DUBs (56). Al igual que la ubiquitina, el péptido NEDD8 conjugado a una proteína termina con una secuencia de diGly (57), que es la que queda covalentemente unida a la lisina diana de neddilación, mediante la formación de un enlace isopeptídico entre el grupo carboxilo terminal de NEDD8 y el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina del sustrato (12) (58).

La neddilación es una modificación postraduccional que conjuga covalentemente, de manera reversible, una molécula de NEDD8 a un residuo de lisina de la proteína sustrato (14) (**figura 7**). Este proceso tiene su propio conjunto de enzimas para garantizar una ruta de conjugación distinta a la ubiquitina (42). El proceso de neddilación consiste en una cascada multienzimática en la que participan tres enzimas denominadas E1, E2 y E3 específicas de la ruta. El proceso comienza con la activación del extremo C-terminal de NEDD8, que contiene el resto de diGly y que será atacado posteriormente por la cisteína catalítica de la enzima E1 activadora denominada NAE (12). NAE es un heterodímero formado por la proteína de unión a la proteína precursora amiloide (APP-BP1) y la proteína UBA3 (59) (60). Para que NEDD8 pueda conjugarse con las proteínas diana, es necesario que se produzca la escisión de su extremo C-terminal, algo que lleva a cabo principalmente la hidrolasa C-terminal de ubiquitina denominada UCH-L3, entre otras (61). Aunque NAE es la única enzima E1 específica para NEDD8, hay

estudios que describen que la enzima de ubiquitina E1, UBE1, puede activar NEDD8 in vitro, con una eficacia bastante menor en comparación con la ubiquitina (62), pero que puede ser determinante en situaciones de estrés proteotóxico (63).

Hay dos enzimas E2 específicas de conjugación de NEDD8 denominadas UBE2M (UBEC12) y UBE2F. Ambas pueden unirse a NAE-NEDD8 catalizando una reacción de trans-tiolación, que implica la transferencia de NEDD8 desde la cisteína activa de NAE a la Cys activa de E2 (64).

La mayoría de las ligasas E3 de neddilación descritas hasta ahora pertenecen a la familia RING. Las más estudiadas son las subunidades del dominio RING-BOX: RBX1 y su homólogo RBX2, asociado a las cullinas. También se encuentran MDM2 (el regulador negativo de p53) y DCN1 entre otras (13). Estas ligasas, catalizan la transferencia de NEDD8 desde la cisteína del sitio activo de E2, hasta la lisina o extremo N-terminal de la proteína diana (65) (66) (67).



**Figura 7: Esquema de Neddilación.**

Varios estudios han demostrado que la vía de neddilación responde a diferentes estímulos, como el estrés celular y oxidativo, el choque térmico y la inhibición del proteosoma. Aunque el principal papel que tiene NEDD8 en la homeostasis celular es la degradación de

proteínas a través de la regulación de las Cullin-RING ligasas (CRL) (42) (62): Modificando covalentemente las cullinas, NEDD8 activa las ligasas E3 de las CRL, promoviendo la ubiquitinación y la degradación proteosomal de sus principales dianas (68). El mecanismo que describe la modificación de las cullinas con el péptido NEDD8 es muy específico, y se basa en la acción coordinada de NEDD8, junto con las ligasas E3, RBX1/DCN1, y el correspondiente sustrato (69). Una vía de neddilación muy activa conduce a una neddilación elevada de las cullinas, promoviendo la degradación de proteínas relacionadas con el crecimiento tumoral como p21 y p27 (70) (71).

Además de las cullinas, varios estudios han identificado otras proteínas posiblemente neddiladas susceptibles de poder ser importantes dianas terapéuticas (13), como son los supresores de tumores p53 y su homólogo TAp73 $\beta$  (72), el receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR, la proteína asociada al cáncer de mama BRCA3 y la proteína precursora amiloide APP (73) (74).

Las UBLs pueden formar cadenas en sus sustratos uniéndose primero a una proteína diana y luego a sí mismas, actuando como un aceptor para una nueva modificación adicional. La mayoría de los sustratos de NEDD8 se encuentran principalmente mono-neddilados en uno o varios residuos de lisina, sin embargo, las cullinas pueden estar hiper-neddiladas en múltiples residuos (12). Por lo tanto, la determinación del mecanismo de formación de las cadenas y su fisiología son importantes líneas de investigación.

### **1.3.1. Enzimas deubiquitinasas DUBs.**

El proceso de conjugación de las vías de ubiquitina y las UBLs se puede revertir a través de la acción de enzimas deubiquitinasas (DUBs). Estas proteasas liberan las modificaciones de los sustratos mediante la ruptura de los enlaces peptídicos unidos a lisina. Las DUBs

se han clasificado en cuatro familias: las hidrolasas del extremo C-terminal de ubiquitina (UCH), que muestran especificidad por los aductos de ubiquitina pequeños; la familia de proteasas específicas de ubiquitina (USP), que eliminan la ubiquitina de las proteínas plegadas; la familia de proteasas de tipo ubiquitina (ULP), que muestran especificidad hacia los conjugados SUMO y las isopeptidasas JAMM, que comprenden una familia de metaloproteasas dependientes de zinc (56).

De la misma manera, la neddilación también es reversible a través de la acción de proteasas que desconjugan el péptido NEDD8 de los sustratos, lo que apoya la función reguladora de esta modificación.

Entre las enzimas de-neddilantes podemos encontrar COP9 signalosoma, una metaloproteasa dependiente de zinc compuesta por ocho subunidades, que promueve la de-neddilación de las cullinas (13) (75) (76). Una segunda proteasa denominada DEN1 (NEDP1) posee una alta homología con la familia de proteasas ULP. Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que no reconoce los conjugados SUMO como sustratos (56), mientras que sí muestra una alta especificidad para NEDD8, pudiendo desconjugar el péptido de algunos sustratos proteicos, pero no de las cullinas, el sustrato mejor caracterizado de neddilación (12). Por otro lado, esta enzima también puede actuar como una hidrolasa del extremo C-terminal de NEDD8, al igual que UCH-L3, generando así su forma funcional para la conjugación a las cullinas (50).

### 1.3.2. Inhibidores de Neddilación.

Las vías de conjugación de la ubiquitina, NEDD8 y el resto de UBLs forman parte de un gran número de procesos biológicos, y por esa razón se han relacionado con muchas enfermedades, incluido el cáncer (77)(78).

A partir de los buenos resultados obtenidos en clínica bloqueando la degradación proteica, como ocurre con el fármaco Bortezomib, un inhibidor del proteosoma que se utiliza para el tratamiento del mieloma múltiple (79) (80) y el linfoma de células del manto (81), se planteó la posibilidad de inhibir la vía de neddilación, ya que el etiquetado con el péptido NEDD8 promueve la degradación de proteínas mediante la activación de las CRL (53) (52).

Los componentes de las CRL están sobreexpresados en varios tipos de cáncer (82). CUL-1 se encuentra mutada hasta en el 30% de algunas leucemias (83). Los niveles de CUL-3 y CUL-4A están asociados con la progresión tumoral en cáncer de mama (84). También se ha observado un aumento en los niveles de ARNm de CUL-7 en el carcinoma de pulmón, así como variaciones en otras proteínas relacionadas con el crecimiento celular, las vías de supervivencia, la actividad transcripcional y la apoptosis. Estos datos demuestran que existe una gran relación entre la actividad de las CRL y la tumorigénesis (85).

La enzima NAE participa en funciones importantes de las células, como la división celular, por lo que es posible que bloquear su actividad ayude a evitar el crecimiento de células cancerosas (86). Se ha desarrollado un inhibidor potente y selectivo de NAE, y por lo tanto de la vía de neddilación, denominado MLN4924 (pevonedistat) (87). El empleo de MLN4924 en el tratamiento de diversas patologías, tanto hematológicas como de tumor sólido (88), ha mostrado una

prometedora actividad antitumoral, induciendo apoptosis "in vitro" e "in vivo" (89). Este inhibidor se encuentra actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer (90). Varios estudios realizados "in vitro", han mostrado una actividad antitumoral sinérgica del MLN4924, en combinación con quimioterápicos alquilantes y radiación ionizante (85), así como ibrutinib e idelalisib (91).

El MLN4924 está relacionado estructuralmente con el AMP, de manera que compite con él por el sitio activo de unión a NAE. El mecanismo de inhibición se basa en la formación de un aducto covalente con NEDD8, NEDD8-MLN4924 (60). Este aducto resultante no puede unirse a la E2 correspondiente, de manera que bloquea la conjugación de NEDD8 y por lo tanto inhibe la ruta (86). La inhibición de la neddilación mediante MLN4924 da como resultado la acumulación de proteínas diana de CRL, como por ejemplo la forma fosforilada de I $\kappa$ B $\alpha$  (92) (93), y en consecuencia la disminución de la actividad NF- $\kappa$ B (87).

Primeramente, el tratamiento de células tumorales con MLN4924 conduce a una rápida disminución de la neddilación de las cullinas, aumentando la acumulación de varias de sus dianas (87). El principal efecto que se observa es una detención inicial de células en la fase S, debido a la continua replicación en ausencia de mitosis. Esto es debido principalmente a la acumulación de CDT1, un factor de replicación cuya degradación está mediada por las CRL (94) (95). La falta de degradación de CDT1, provoca respuesta al daño en el ADN, y por lo tanto, apoptosis (96). Pero la apoptosis no es la única respuesta a los efectos supresores del crecimiento celular mediados por MLN4924. Se han observado varios efectos producidos por este inhibidor de la neddilación, como es la activación de la autofagia (97) (98), la degradación lisosomal, inhibición de la angiogénesis tumoral (99) y la tumorigénesis, debido a la acumulación de p27 (inhibidor del ciclo celular) (100), o la inhibición de vías como NF- $\kappa$ B o mTOR (101)

(88) (102). Por otro lado, se ha descrito que el MLN4924 estabiliza proteínas como NRF2, factor de transcripción que controla la inducción de genes antioxidantes, cuya degradación está mediada por CUL-3 (103).

Se han descrito también objetivos de NEDD8 diferentes a las cullinas, de manera que la inhibición de la vía de neddilación afecta a la función de reguladores del ciclo celular, supresores tumorales como p53 (65), rutas de supervivencia como NF- $\kappa$ B (104), entre otros. Todos estos datos indican que NEDD8 tiene un papel importante en la regulación transcripcional (42).

Con todos estos datos, se ha demostrado que el MLN4924 es eficaz para reducir el crecimiento tumoral e inducir la apoptosis en una gran variedad de células tumorales (89) (105).

## **2. Aspectos Clínicos de la Leucemia Linfática Crónica.**

### **2.1. Características Generales.**

La Leucemia linfática crónica (LLC) es una enfermedad maligna de células B con una marcada heterogeneidad clínica y biológica. Es la neoplasia hematológica más frecuente en adultos en los países occidentales, con una incidencia alrededor de 4-5 pacientes por cada 100,000 habitantes por año (106). Presenta una prevalencia ligeramente superior en hombres frente a mujeres (107). La edad media de diagnóstico es de 65 años, mientras que un diagnóstico antes de los 40 es excepcional y no se han descrito casos durante la infancia (107).

La LLC se caracteriza por la acumulación de linfocitos B maduros en la sangre periférica, la médula ósea y los órganos linfoides, dando como resultado linfocitosis, linfadenopatías y esplenomegalia (108). Estos linfocitos, se caracterizan por la coexpresión de CD5, CD19 y CD23, y presentan una menor expresión de CD20 y CD79b que los linfocitos B normales (109). Expresan también niveles bajos de inmunoglobulinas de superficie.

### **2.2. Progresión Clínica - Estratificación del riesgo.**

El curso clínico de la LLC es muy heterogéneo. Hay pacientes que sobreviven durante muchos años sin la necesidad de una terapia, permaneciendo en un estado asintomático y completamente activos durante décadas, mientras que otros padecen una enfermedad más agresiva que progresa rápidamente, a pesar de recibir tratamiento (110). Los antiguos sistemas de Rai (111) y Binet (112) siguen estando vigentes y permiten clasificar a los pacientes según parámetros clínicos y analíticos. El sistema de Rai distingue 5 estadios en función del riesgo

(0-IV, de menor a mayor riesgo), teniendo en cuenta los parámetros de linfocitosis, anemia, trombocitopenia y presencia o no de linfadenopatías, hepato y/o esplenomegalia. Por otro lado, el sistema de Binet distingue 3 estadios clínicos (A, B y C, de menor a mayor riesgo), según el número de áreas linfoides afectadas, y la presencia o no de anemia y/o trombocitopenia (112).

Estos sistemas suelen emplearse de forma integrada, dando lugar así a un sistema simplificado de estadificación del riesgo que permite clasificar a los pacientes en tres grupos: riesgo bajo, intermedio y alto. A pesar de que estos sistemas de estadificación se utilizan en la actualidad, presentan algunas deficiencias, ya que no se pueden utilizar para predecir el riesgo individual de progresión de la enfermedad y la supervivencia en las etapas tempranas (113), por lo que es necesario completar estos estudios con la determinación de otros marcadores pronóstico.

### **2.3. Marcadores pronóstico - Estadío Clínico al diagnóstico.**

Los principales factores pronóstico que se emplean en la clínica actualmente para identificar los pacientes que requieren de una terapia relativamente temprana, se describen a continuación. Entre ellos se incluyen características clínicas, genéticas, moleculares y bioquímicas de las células de LLC..

#### **2.3.1. Edad, expresión de $\beta$ 2-microglobulina.**

La Edad superior a 65 años y el sexo masculino son parámetros que se asocian con un peor pronóstico, así como los niveles séricos elevados de  $\beta$ 2-microglobulina (114).

### 2.3.2. Estado mutacional de los genes IGHV.

La LLC se puede dividir en dos subtipos, que difieren principalmente en su comportamiento clínico. Estos subconjuntos dependen del estado mutacional de los genes codificantes de las regiones variables de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (genes IGHV), es decir, de si las células LLC presentan el IGHV mutado (M-LLC) o no mutado (U-LLC) (115).

En la LLC, estos genes pueden acumular mutaciones como consecuencia de la hipermutación somática o programada, que tiene lugar en el centro germinal y que puede modificar la afinidad del receptor de célula B (BCR) para los antígenos. Estas mutaciones se detectan comparando las secuencias de ADN de los genes en las células B, con genes relacionados en la línea germinal. Una secuencia que se diferencia en un 2% o más se define como mutada (110). Las células B-LLC que tienen el IGHV no mutado se originan a partir de células B CD5+ antes de experimentar hipermutación somática, mientras que las células B-LLC que presentan el IGHV mutado, probablemente se originen a partir de las células B CD5+ que han pasado y se han diferenciado en el centro germinal (108).

La prevalencia de genes IGHV mutados es mayor entre los pacientes que se encuentran en una etapa clínica temprana y asintomática, con deleciones cromosómicas 13q14 y sin alteraciones de TP53, por lo que no requieren de tratamiento y tienen una supervivencia mayor (116). Por otro lado, la prevalencia de genes no mutados es mayor entre los pacientes que padecen una enfermedad en progresión, con características citogenéticas desfavorables y por lo tanto más agresiva (117) (116). La evaluación del estado de mutación del gen IGHV es complicada, pero en general es un parámetro que se correlaciona bastante bien con la gravedad de la enfermedad y la supervivencia general, permaneciendo relativamente constante en el

curso de la patología, a pesar de los tratamientos y otros posibles cambios clínicos (118).

### **2.3.3. Expresión de ZAP-70 y CD38.**

A la hora de clasificar la LLC en categorías, también se tiene en cuenta la expresión del marcador específico de superficie CD38 y ZAP-70 mediante citometría de flujo. CD38 es una proteína transmembrana que media señales de proliferación y supervivencia en las células de la LLC (119). ZAP-70 es un miembro de la familia de proteínas de la Tirosin quinasa SYK, que se expresa normalmente en las células T, en las células NK ("*Natural Killer*") y en un subgrupo de células B-LLC (116).

Los pacientes con células B-LLC que expresan niveles elevados de CD38 o ZAP70 tienen un curso de la enfermedad más agresivo, con un período libre de progresión y supervivencia más corto (118). La expresión de ZAP-70 es un marcador subrogado del estado mutacional de la cadena pesada de las inmunoglobulinas y se mantiene estable durante la evolución de la enfermedad. Por el contrario, la expresión de CD38 es variable a lo largo de la enfermedad (120)(110).

### **2.3.4. Anomalías citogenéticas.**

Las alteraciones cromosómicas más comunes en LLC son: la deleción en el brazo largo del cromosoma 13, del13q14 (donde se incluyen miR-15a, miR-16-1), la deleción en el brazo largo del cromosoma 11, del11q23 (en el que reside el locus de ATM), la deleción en el brazo corto del cromosoma 17, del17p13 (en el que reside el locus de TP53) y la trisomía en el cromosoma 12. El análisis de hibridación in situ (FISH) ha demostrado que aproximadamente el 80% de los pacientes con LLC presentan al menos una de las cuatro anomalías más frecuentemente descritas (113)(121).

La pérdida de hetero y/o homocigosidad en el cromosoma 13q14 está presente en más del 50% de los casos, constituyendo la aberración citogenética más frecuente en la LLC. En esta región eliminada, se localiza un grupo de dos genes de miARN denominados miR-15a y miR-16-1. La expresión de estos genes se correlaciona inversamente con la expresión de Bcl-2 y Mcl-1, que codifican proteínas antiapoptóticas que se encuentran sobreexpresadas en la LLC (121) (122). Los pacientes con del 13q14 como única anomalía, poseen tiempos de supervivencia más largos (113).

La delección 11q23 es la segunda alteración mas frecuente, presente aproximadamente en el 18% de los pacientes y está asociada al gen ATM. Este gen codifica la proteína ATM (serina/treonina quinasa), que está implicada en la reparación del ADN (108). Tanto TP53 como ATM son genes que regulan la apoptosis y proporcionan resistencia a la quimioterapia (110).

La trisomía del cromosoma 12 está presente en el 16% de los pacientes y se asocia con un pronóstico intermedio (108).

La delección 17p13 está presente en aproximadamente el 7% de los pacientes y se asocia con la pérdida del gen supresor de tumores TP53. Esta mutación representa la forma más frecuente de inactivación del gen TP53, y va acompañada a menudo de la pérdida de funcionalidad del segundo alelo (117). Es una de las alteraciones relacionadas con peor pronóstico junto con la del 11q23 (121).

### **2.3.5. Mutaciones recurrentes en los genes TP53, ATM, NOTCH, SF3B1, BIRC3.**

La llegada de la secuenciación masiva ha ayudado a tratar de entender un poco mejor las alteraciones moleculares que dan lugar a

la heterogeneidad genética de la enfermedad (123) (124). Varios investigadores han observado mutaciones somáticas en los genes TP53 y ATM, implicados en procesos como el daño en el ADN; SF3B1, relacionado con el procesamiento de ARNm (125); ZMYM3, gen implicado en la remodelación de la cromatina; NOTCH1, de la ruta de señalización de Notch (126) (127); BIRC3, gen que codifica un miembro de la familia de proteínas IAP que inhibe la apoptosis, y en vías inflamatorias como MYD88, entre otros (108).

## **2.4. Diagnóstico.**

### **2.4.1. Generalidades Fisiológicas / Fisiología.**

La LLC puede tener manifestaciones clínicas muy variadas. En la actualidad, la mayoría de los pacientes se encuentran asintomáticos y la enfermedad se diagnostica tras la detección de linfocitosis en un hemograma de rutina. Sin embargo, a lo largo de la evolución de la enfermedad, y algunos pacientes en el momento diagnóstico, pueden aparecer síntomas como la pérdida de peso, fatiga, sudoración nocturna o derivados del aumento de la frecuencia de infecciones, entre otros. Asimismo, pueden presentar adenomegalias y dolor abdominal secundario a la presencia de hepato y/o esplenomegalia (108).

### **2.4.2. Inmunofenotipo.**

El diagnóstico de LLC se realiza tras detectarse en sangre periférica  $\geq 5,000$  linfocitos clonales por  $\mu\text{l}$ , identificados por análisis citométricos. Estas células típicamente presentan una elevada expresión del antígeno de células T CD5 y los antígenos de superficie de células B CD19 y CD23, mientras que los niveles de expresión de CD20 son bajos (128) (129).

### 2.4.3. Características Morfológicas / Morfología.

Para determinar las características morfológicas de estas células, se analizan los frotis de sangre, observándose que las células leucémicas son linfocitos maduros y pequeños, con un estrecho citoplasma y un núcleo denso que carece de nucleolos discernibles, con una cromatina parcialmente agregada (130). Estos linfocitos tienen tendencia a romperse cuando se realiza la extensión sanguínea en el portaobjetos, formándose las denominadas sombras de Gumprecht. Este hecho refleja la gran fragilidad que presentan estas células (108).

También se pueden realizar otros estudios secundarios como la biopsia de médula, para ver el tipo de infiltración linfocítica, y la biopsia de ganglio linfático como parte de la evaluación clínica, aunque estas pruebas no son necesarias para establecer un diagnóstico de la LLC.

### 2.5. Tratamiento.

La LLC sigue siendo una enfermedad incurable sin un trasplante alogénico de células madre, sin embargo, los tratamientos han mejorado mucho con la aparición de nuevos agentes terapéuticos (131). Para establecer nuevas terapias en el tratamiento de esta enfermedad, es necesario conocer el proceso mediante el cual una célula normal se transforma en patológica, y la susceptibilidad que presentan a las terapias actuales (132). Los regímenes para los pacientes de LLC que se han empleado hasta la actualidad incluyen la quimioterapia, la combinación de quimioterapia e inmunoterapia y más recientemente fármacos dirigidos a algunas rutas de señalización, como los inhibidores del receptor de célula B (BCR) y los inhibidores de Bcl-2, bloqueando así la proliferación y la supervivencia de las células B-LLC (108) (**figura 8**).

### **2.5.1. Quimioterapia.**

La quimioterapia ha sido la principal terapia en los últimos 50 años. El empleo de la quimioterapia convencional para el tratamiento de la LLC se basó durante muchos años en la utilización de agentes alquilantes como el clorambucil, ciclofosfamida combinados en muchas ocasiones con corticoides (133)(134)(135).

La llegada de los análogos de purina como la fludarabina, cladribina y pentostatina o el híbrido, bendamustina, que poseen mecanismos de acción como la inducción de la apoptosis, fueron un gran avance en el tratamiento de la LLC, tanto en pacientes tratados previamente como en pacientes refractarios (136) o en recaída (137), incluso para el tratamiento de otros trastornos linfoproliferativos de bajo grado (138). Principalmente el empleo de fludarabina mejoró los resultados obtenidos con los regímenes clásicos (139). Desde ese momento, la fludarabina se consideró un componente básico en la elaboración de nuevos esquemas de tratamiento en combinación con agentes alquilantes (140). La quimioterapia de combinación ciclofosfamida / fludarabina en primera línea, mostró mejores resultados en cuanto a la tasa de remisión completa y una supervivencia libre de progresión más larga (141)(142).

### **2.5.2. Quimioinmunoterapia.**

La adición de los anticuerpos monoclonales anti-CD20 como Rituximab (143) a los agentes citostáticos fludarabina y ciclofosfamida (FCR) o Bendamustina (BR) (144) (130) para el tratamiento de pacientes con LLC, aumentaron las tasas de respuesta (145).

A partir del Rituximab, se han ido desarrollando nuevos anticuerpos monoclonales como el Ofatumumab, un Ac monoclonal anti-CD20 de segunda generación que es eficaz tanto en monoterapia

(146) como en combinación con los agentes quimioterápicos Fludarabina y Clorambucil (147) (148). Obinutuzumab, es otro Ac monoclonal anti-CD20 de tercera generación, más potente que Rituximab, indicado en combinación con Clorambucil para el tratamiento de pacientes con comorbilidades (149).

Por otro lado, Alemtuzumab, un Ac monoclonal anti-CD52 fue utilizado durante varios años para el tratamiento de pacientes que presentaban una LLC refractaria a Fludarabina (150) (136) o tenían alteraciones a nivel de p53 (151), si bien a día de hoy carece de indicaciones en la LLC.

En la actualidad, el uso de la quimioinmunoterapia está restringido a pacientes que presentan un IGHV mutado y aquellos que no tienen la delección 17p ni la delección 11q ya que responden mejor a este tipo de tratamientos. Asimismo, hay que tener en cuenta los posibles efectos adversos que estos fármacos generan, como neutropenias e infecciones, por lo que en muchos casos es necesario una terapia antimicrobiana profiláctica conjunta.

### **2.5.3. Inhibidores de las rutas de señalización.**

#### **2.5.3.1. Inhibidores del BCR.**

Dentro de este grupo podemos encontrar los inhibidores del receptor de célula B, entre los que se encuentran los inhibidores de BTK (Bruton tirosin quinasa) de primera generación como Ibrutinib (152) (153) y los inhibidores de la ruta PI3K como Idelalisib (154) (155).

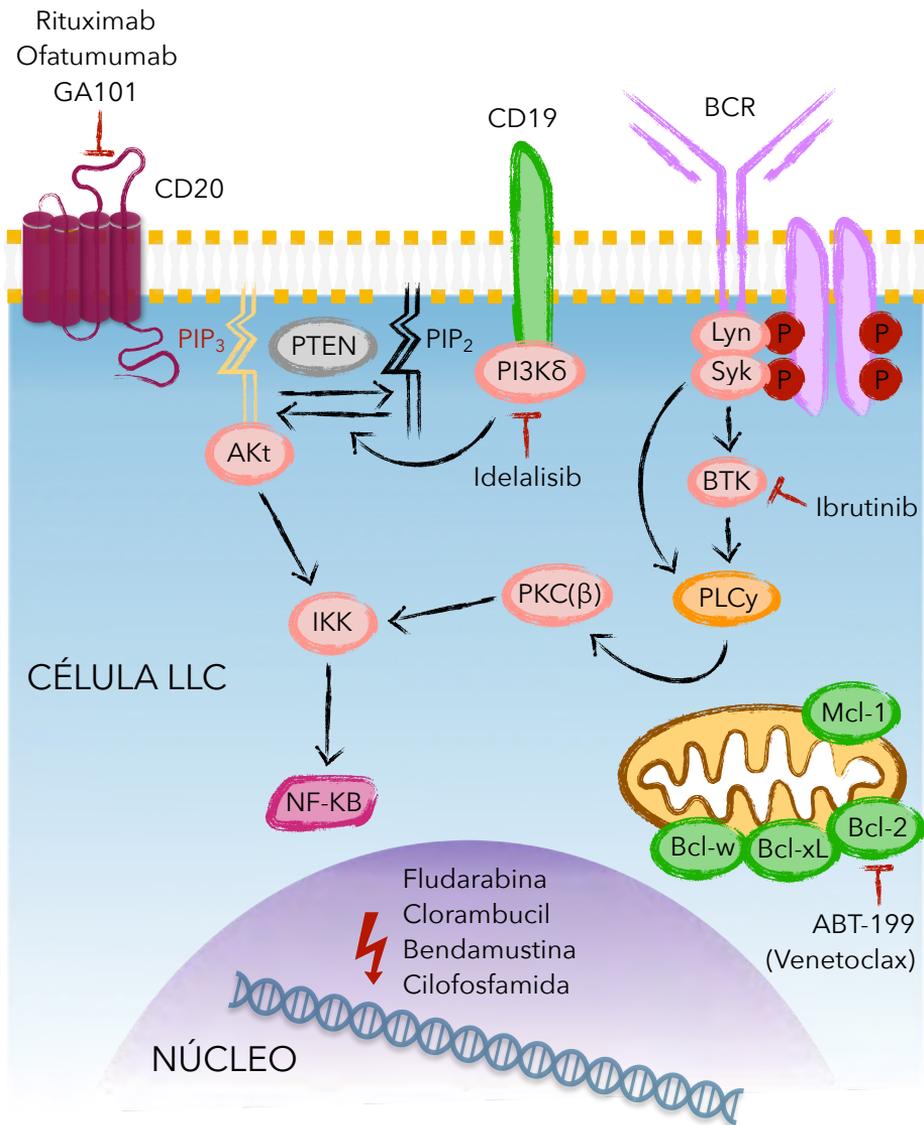
Al contrario que en el caso de los tratamientos con quimioterapia, el empleo de inhibidores de las rutas de señalización proporcionan mejores resultados en pacientes que presentan un IGHV no mutado o alteraciones genéticas de riesgo como la delección 17p.

Ibrutinib es a día de hoy el tratamiento de elección en todos los pacientes con alteraciones genéticas y/o moleculares de alto riesgo, ya sea como primera línea o como tratamiento de rescate tras haber fallado un esquema de quimioinmunoterapia (Guía clínica Grupo Español LLC). Por su toxicidad en forma de fenómenos autoinmunes (colitis, hepatitis, neumonitis), Idelalisib combinado con Rituximab ha quedado relegado en la actualidad a tratamiento de rescate en aquellos pacientes que han recibido otras opciones terapéuticas previas. Ambos fármacos producen de manera característica una rápida disminución de las linfadenopatías al inhibirse la migración de las células B-LLC de la sangre a los tejidos linfoides, dando lugar a una linfocitosis transitoria inofensiva.

### **2.5.3.2. Inhibidores de Bcl-2.**

La familia Bcl-2 es un grupo de proteínas muy conservadas que regulan la vía de la apoptosis, positiva o negativamente, desempeñando un papel clave en la progresión de la LLC (156).

Dada la similitud entre los dominios de unión a BH3 de Bcl-2 y Bcl-Xl, ha resultado complicado la generación de un inhibidor específico para Bcl-2, como es el caso de Venetoclax (157). Venetoclax es una molécula pequeña que inhibe específicamente Bcl-2 induciendo apoptosis en las células B-LLC. Resulta un tratamiento eficaz para los pacientes con enfermedad recidivante y del 17p. Entre las posibles toxicidades asociadas a este fármaco se encuentran los trastornos gastrointestinales, neutropenia y síndrome de lisis tumoral (158).



**Figura 8: Principales tratamientos de la LLC y sus dianas moleculares.** Modificado de (131).

### **3. Aspectos Moleculares de la Leucemia Linfática Crónica.**

#### **3.1. Características Moleculares.**

La leucemia Linfática Crónica se caracteriza por la acumulación en sangre periférica y en tejidos linfoides de células B maduras paradas en la fase G0/G1 del ciclo celular (159). Estudios realizados han demostrado que la LLC es una enfermedad de células no proliferantes, sino acumulativas, debido a que presentan defectos en su maquinaria de apoptosis y una supervivencia prolongada "in vivo". Sin embargo, existen evidencias de que la división celular ocurre en centros de proliferación, ya que se observa un aumento en el recuento de linfocitos y el acortamiento de los telómeros, lo que indica que estas células presentan un historial proliferativo prolongado (160).

Por lo tanto, se puede considerar que en la LLC existe un equilibrio dinámico entre las células que circulan en la sangre periférica, quiescentes y resistentes a la apoptosis, y células que se encuentran en los nichos de los tejidos linfoides en un estado de proliferación activa (161).

##### **3.1.1. Maquinaria de apoptosis.**

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada que ocurre de forma natural durante el desarrollo y envejecimiento celular (162). Durante el proceso apoptótico, las células sufren una serie de cambios morfológicos característicos, como la reducción del volumen celular y la fragmentación nuclear y citoplasmática, con formación de cuerpos apoptóticos (163) (164). Su función es la degradación de células no deseadas en pequeños fragmentos que se eliminan fácilmente por fagocitosis (165), manteniendo la homeostasis

celular en los tejidos. Este proceso se desencadena en respuesta a estímulos ambientales tanto fisiológicos como patológicos (163), o como mecanismo de defensa ante enfermedades, reacciones inmunes o agentes citotóxicos y mutagénicos, como la quimioterapia y la radiación ionizante, entre otros (166). Alteraciones en el proceso de apoptosis pueden contribuir a los efectos patológicos que se observan en multitud de enfermedades, como las inflamatorias y el cáncer, entre otras (167).

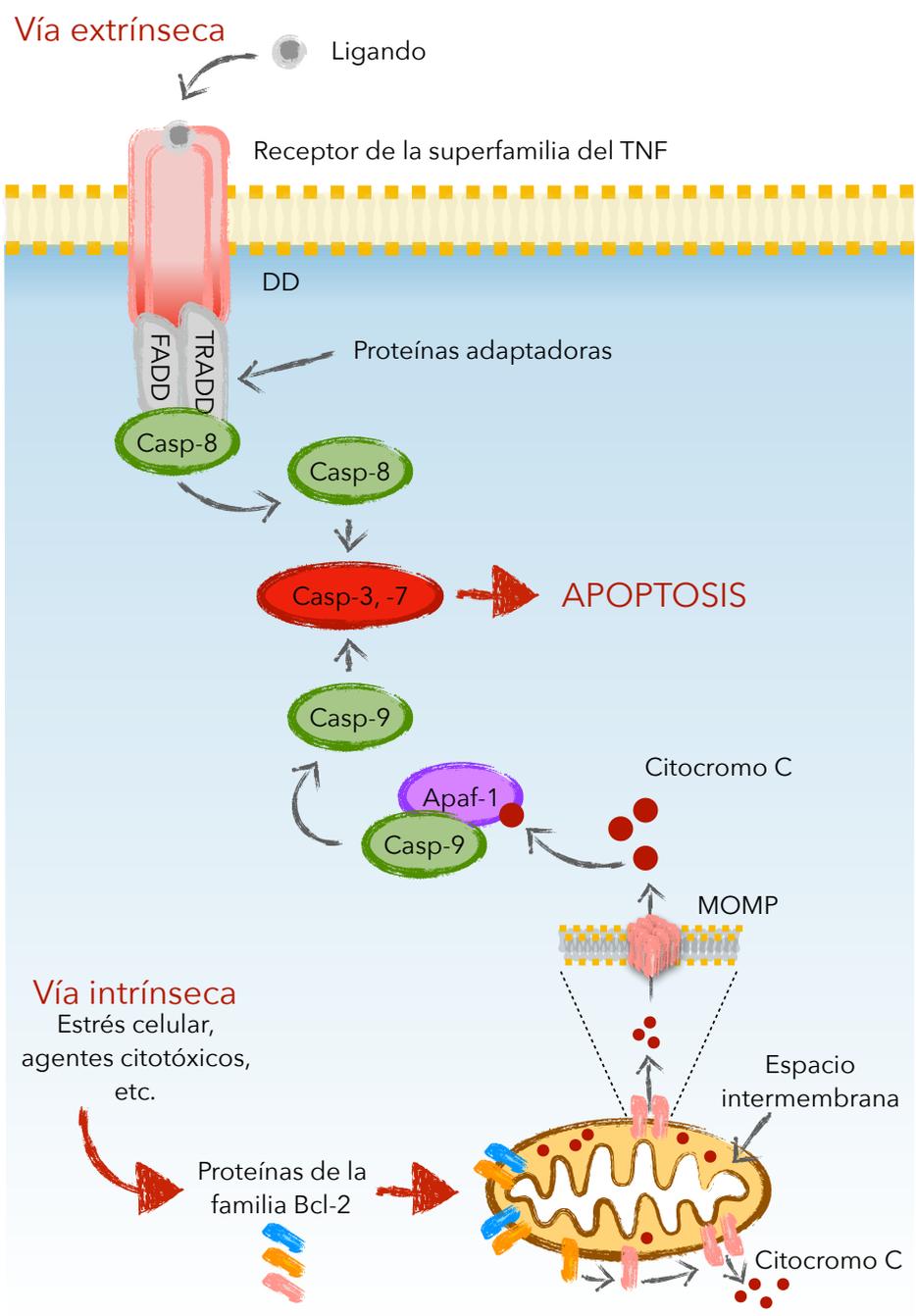
Las caspasas son una familia de enzimas con propiedades catalíticas, importantes en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por varios estímulos. Esta familia de proteínas, pertenecientes al grupo de las cisteín-proteasas, se caracterizan por contener un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. Se encuentran en la célula como precursores enzimáticos inactivos, que necesitan ser hidrolizados para iniciar su actividad. Las caspasas que intervienen en procesos de apoptosis se dividen en dos grupos: las caspasas iniciadoras y las efectoras. Las caspasas iniciadoras pueden activarse por autoproteólisis o mediante activadores. Las caspasa efectoras se activan a partir de un corte específico mediado por las caspasas iniciadoras .

En función de la procedencia de las señales de muerte, bien sean externas o internas, pueden distinguirse dos vías apoptóticas diferentes: la vía extrínseca o del receptor de muerte, y la vía intrínseca o mitocondrial (168) (169) (**figura 9**).

La vía extrínseca se desencadena tras la interacción de ligandos extracelulares con los receptores transmembrana, pertenecientes a la familia del TNF (factor de necrosis tumoral) (165). Estos receptores presentan un dominio citosólico denominado dominio de muerte (DD) (*death domain*), encargado de iniciar el proceso apoptótico. Una vez que el ligando se une al receptor, se incorporan unas proteínas

adaptadoras denominadas FADD (del inglés "dominio de muerte asociado a Fas") y TRADD, encargadas de la captación y activación de la caspasa 8. Esta caspasa a su vez, activa las caspasas 3 y 7, que son las llamadas caspasas efectoras que digieren la célula (170) (171).

La vía intrínseca se inicia por una serie de estímulos intracelulares en respuesta a agentes externos que generan estrés celular, como ciertas radiaciones, la ausencia de algunos factores de crecimiento o la exposición a compuestos citotóxicos (162). Estos estímulos activan proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl-2, que favorecen la liberación del citocromo c y otras proteínas que se encuentran en el espacio intermembrana de las mitocondrias, mediante la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) (172) (173) (174). Una vez que el citocromo c se encuentra en el citosol, se une a la proteína APAF-1, que recluta y activa la caspasa 9. Esta caspasa a su vez, activa las caspasas efectoras 3 y 7. De forma que, la activación de estas caspasas por cualquiera de las dos vías, dará lugar a la muerte celular programada de la célula objeto.



**Figura 9: Esquema de las vías de la apoptosis.** Se representan los componentes de las dos vías que participan, la vía extrínseca y la vía intrínseca. Modificado de (175) y (176).

### 3.1.2. Familia de proteínas Bcl-2.

Dado que la acumulación de las células tumorales en la LLC se debe principalmente a defectos en su maquinaria de apoptosis, se han descrito mecanismos que pueden explicar esta deficiente vía de muerte celular. Uno de ellos es la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas, como las de la familia de Bcl-2 (177).

La familia Bcl-2 está formada por un grupo de proteínas conservadas que funcionan como reguladores de la vía intrínseca de la apoptosis, regulando la muerte celular mediante el control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (MOMP) (178).

Los miembros de esta familia se pueden clasificar en tres subgrupos: atendiendo a criterios funcionales, si se trata de proteínas anti-apoptóticas o pro-apoptóticas, y a criterios estructurales, como la presencia de uno o varios dominios de homología con la proteína Bcl-2, denominados BH1, BH2, BH3 y BH4 (156).

El primer subgrupo corresponde a aquellas proteínas que ejercen una función anti-apoptótica y comparten los cuatro dominios de homología (BH1- BH4), como son Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1 y Bfl-1. Estas proteínas son las encargadas de defender a las células frente a la apoptosis, ya que previenen la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, mediante el secuestro de las proteínas pro-apoptóticas "sólo BH3" Bim y Bid, activadoras de Bax o Bak (179) (180) (181).

En el segundo subgrupo se encuentran aquellas proteínas que ejercen una actividad pro-apoptótica, compartiendo homología de secuencia en los dominios BH1, BH2 y BH3, y están representadas por las proteínas multidominio Bax y Bak. Este grupo de proteínas se consideran los ejecutores de la apoptosis, ya que se encargan de la

permeabilización de la membrana mitocondrial externa, ayudando a la salida del citocromo c, seguido de la activación de las caspasas y muerte celular (182)(183).

Por último, el tercer subgrupo formado por las proteínas Bik, Bid, Bim, Bad, Noxa, Puma, Bmf y Hrk, ejerce una función pro-apoptótica, y únicamente comparten homología dentro del dominio BH3. Esta subfamilia de proteínas se denomina "sólo BH3" (184), y son las encargadas de iniciar la apoptosis mediante la transmisión de las señales de estrés (172) (175). Para llevar a cabo esta función, únicamente la proteína Bid necesita ser activada proteolíticamente, principalmente por la caspasa 8, dando lugar a la forma truncada activa tBid (185). Esto indica que el dominio BH3 es un requisito fundamental para la función pro-apoptótica de los miembros de esta familia (186)(187).

Además de los dominios BH, varias de estas proteínas contienen un dominio transmembrana (TM) en el extremo c-terminal. Este TM favorece el anclaje de las proteínas, tanto a las membranas intracelulares como a la superficie externa de las mitocondrias (188), por lo que el TM contribuye a la actividad anti-apoptótica (189).

El equilibrio entre los niveles relativos de estas proteínas determina el destino celular en respuesta a la señalización apoptótica (177). Por esta razón, estas proteínas están reguladas principalmente por las interacciones entre los miembros pro- y anti-apoptóticos (176). De forma general, tBid, Bim y Puma interactúan con todas las proteínas antiapoptóticas, mientras que otras como Noxa, Bik y Bad son más selectivas.

El gen Bcl-2 fue descubierto originalmente como un gen oncogénico en el linfoma de célula B, que presentaba una translocación cromosómica t(14:18) (190) (191). Este gen se encuentra

altamente expresado en las células B-LLC, en comparación con las células CD19+ normales (192). Su principal función es evitar que las células sufran apoptosis (396) (193), de manera que la sobreexpresión de Bcl-2 se asocia con una supervivencia celular inadecuada (194), como ocurre en la LLC y en otras neoplasias tumorales (195), provocando una disminución de la sensibilidad a las terapias empleadas (196) y por lo tanto, dando lugar a un peor pronóstico clínico (197).

En las células sanas, Bcl-2 y el resto de proteínas anti-apoptóticas pertenecientes a su familia como Bcl-x o Mcl-1, previenen la apoptosis controlando los mediadores de muerte celular Bax y Bak bajo control (193). Sin embargo, cuando las células se someten a estrés celular o a algún tipo de daño genotóxico, el proceso de apoptosis comienza mediante la activación de las proteínas pro-apoptóticas de la familia, las denominadas "sólo BH3". Estas proteínas se unen e inhiben Bcl-2 o a alguno de sus compañeros (198), iniciado así el proceso apoptótico. Dado que este es el paso inicial para que comience el proceso, se han desarrollado moléculas pequeñas que imitan esa acción, para poder así inhibir farmacológicamente las proteínas anti-apoptóticas (199).

### 3.1.3. Microambiente.

El microambiente juega un papel muy importante en la LLC, así como en la mayoría de las neoplasias (110). Existen evidencias de que los fallos en la maquinaria de apoptosis que presentan estas células, no sólo son debidos a defectos intrínsecos de las mismas. La incapacidad de las células B-LLC para sobrevivir "in vitro" demuestra que las señales extrínsecas que provienen del microambiente desempeñan una función crítica en el desarrollo de la enfermedad (200) .

Un elemento clave en la patogénesis de la LLC es la infiltración de las células B-LLC en los tejidos linfoides, causando linfadenopatías, esplenomegalia e hiper celularidad en la médula ósea. Es en estos tejidos donde se encuentran los nichos o microentornos en los que las células pueden sobrevivir y proliferar, escapando de la apoptosis espontánea o inducida por los fármacos, contribuyendo así al mantenimiento y desarrollo de esta patología (201).

La palabra microambiente engloba todos los componentes presentes en los compartimentos donde se alojan y protegen las células B-LLC. Entre ellos se encuentran las células T y las células estromales (202). El estroma lo componen la población heterogénea de células adherentes no neoplásicas, que producen señales que regulan la reorganización del citoesqueleto (203) (204), vasos sanguíneos y proteínas de la matriz extracelular, proporcionando de esta manera el soporte estructural y funcional a las células neoplásicas a través del contacto célula-célula (205) (206). Además del contacto célula-célula, esencial para el efecto protector (207,208), las células estromales también secretan factores solubles como CXCL12 y CXCL13 (209), que actúan igualmente como protectores de las células B. Estos factores, cuyos receptores de membrana son CXCR4 y CXCR5, respectivamente (210), se encuentran altamente expresados en las células B-LLC circulantes en sangre periférica. CXCL12 no sólo protege a las células de la apoptosis, sino que también permite la migración de las mismas a la médula ósea, e induce supervivencia mediante la activación de rutas como MAPK/ERK y PI3K (211) (212), y la fosforilación de STAT3 (213).

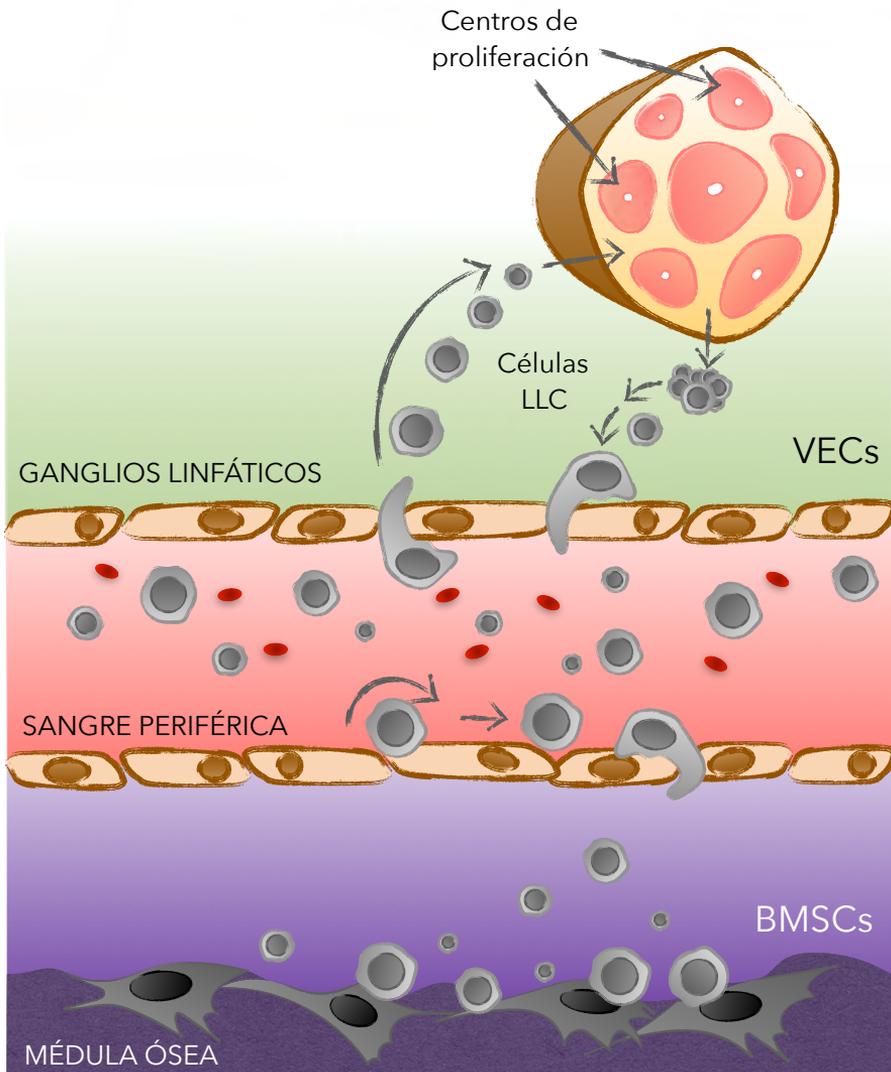
Las células B-LLC entran en contacto con diferentes células accesorias dependiendo del compartimento en el que se encuentren, bien sea la sangre periférica, la médula ósea y los órganos linfoides secundarios como el bazo y los ganglios linfáticos (200) (**figura 10**).

La sangre periférica se considera un compartimento transitorio que permite a las células de la LLC acceder a las zonas más relevantes, como la médula ósea o los tejidos linfoides. Sin embargo, hay artículos que describen que la interacción de las células B-LLC con el endotelio de los vasos sanguíneos, proporciona importantes señales de supervivencia mediadas a través de la activación de NF- $\kappa$ B. Esto podría explicar la activación constitutiva de estas rutas, así como la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Mcl-1 en esta patología (214).

Los pacientes de LLC presentan una médula ósea infiltrada con células neoplásicas, cuyo grado de infiltración se correlaciona con el estadio clínico y el pronóstico (215) (216). En la médula ósea se encuentran varios tipos de células accesorias, que secretan factores solubles como citoquinas, factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular, contribuyendo así a la proliferación y por lo tanto a la supervivencia celular. Entre ellas se encuentran las células T, células endoteliales y principalmente células estromales de médula ósea (BMSCs), que interactúan con las células B-LLC protegiéndolas de la apoptosis espontánea o inducida por agentes citotóxicos (207) (217) (208). Las interacciones de las células B-LLC con el estroma regulan la angiogénesis, dando lugar a la progresión de la enfermedad (218).

Por otro lado, en los pseudofolículos o centros de proliferación de los ganglios linfáticos, también pueden activarse y proliferar las células B-LLC (219). Estas áreas están constituidas por un gran número de células accesorias, como en el caso de la médula ósea, que protegen de igual forma a las células de la LLC, y es aquí donde tiene lugar la activación del receptor de célula B (BCR), de hecho, está descrito que el microambiente de los ganglios linfáticos promueve la señalización de BCR asociada con la activación de NF- $\kappa$ B en pacientes con LLC (219). Esta activación pone en marcha una cascada de señalización, provocando la proliferación y expansión del clon

leucémico (220) (221). En los tejidos linfáticos secundarios de los pacientes con LLC, más concretamente en el bazo, también se encuentran las células NLC "células de tipo enfermera". Se trata de células nodrizas que nutren los timocitos en desarrollo (222). Se puede confirmar que lo que contribuye a la progresión de la LLC no es únicamente fallos en la apoptosis de las células B, sino también una proliferación descontrolada (223).

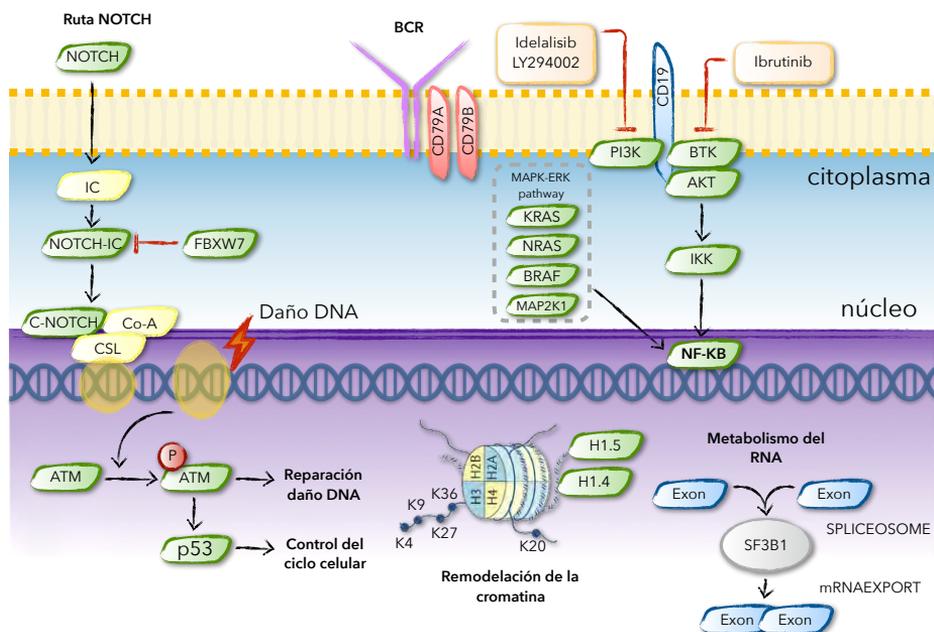


**Figura 10: Microambiente de la LLC.** En la imagen se representan los distintos compartimentos en los que se desarrolla la LLC, como son los órganos linfoides, sangre periférica y médula ósea. Modificado de (203).

Conocer mejor los mecanismos que subyacen al escape de la apoptosis y supervivencia de estas células, contribuye al desarrollo de nuevos fármacos que puedan interferir selectivamente en los diferentes puntos de las rutas de señalización (177). En consecuencia, se están evaluando nuevas estrategias para interrumpir las interacciones entre las células B-LLC y las células del microentorno que promueven su supervivencia. Estas estrategias podrían ser terapéuticas por sí mismas, o usarse en combinación con otras terapias estándar para mejorar el estado de los pacientes con esta enfermedad (224).

### 3.2. Rutas de señalización.

Teniendo en cuenta las alteraciones citogenéticas y mutaciones somáticas descritas en la LLC, hay artículos que concluyen que esta patología está relacionada con alteraciones en al menos 8 rutas de señalización, como son el receptor de célula B, la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la respuesta al daño en el DNA, la remodelación de la cromatina, las vías de supervivencia como NF- $\kappa$ B, la ruta NOTCH y el metabolismo del RNA (225) (**figura 11**).



**Figura 11: Diagrama de las rutas de señalización alteradas en la LLC.** Modificado de (108).

### 3.2.1. Receptor de célula B.

El receptor de los linfocitos B, denominado BCR, es una molécula de supervivencia esencial para las células B normales y patológicas (220). Desempeña una función importante en el mantenimiento y expansión del clon leucémico, ya que este receptor permite la unión de antígenos, y por lo tanto la capacidad de transmitir señales estimulantes al núcleo celular (110). Para llevar a cabo esta función, recluta a la membrana a las proteínas tirosin quinasas no receptoras (PTK) como SYK (tirosin quinasa del bazo), BTK (Bruton quinasa) y LYN (familia de quinasas SRC) (222,226).

El BCR está constituido por una inmunoglobulina de superficie (Ig), asociada a un heterodímero formado por las moléculas Iga e Igb (CD79a / CD79b). La Ig es una molécula de anticuerpo anclada a la

membrana, cuya función es el reconocimiento antigénico, mientras que el heterodímero lleva a cabo la transducción de la señal al interior de la célula B (222). Las respuestas del receptor de célula B varían según la intensidad de las señales y están moduladas por receptores, pudiendo dar como resultado desde señales bajas independientes del antígeno, hasta señales fuertes mediadas por antígenos, que conducen a la célula hacia la activación, diferenciación o apoptosis (227).

La señalización de BCR puede dar lugar a una amplia gama de respuestas, activando paralelamente diferentes vías de señalización que se encuentran por debajo como PI3K (Fosfoinositol -3-quinasa), ruta específica que se ha descrito como responsable de mantener la supervivencia de las células B (228), así como la vía AKT, o la señalización mediada por BTK, importante para la regulación de la apoptosis por NF- $\kappa$ B (229). La ruta NF- $\kappa$ B está implicada en la proliferación y supervivencia celular, al igual que la vía de la proteína quinasa MAPK (229).

En las células B normales, la señalización mediada por el BCR tiene lugar en tres fases. La primera fase comienza con la unión del antígeno y la formación de un complejo denominado signalosoma. Este complejo está formado por quinasas y proteínas de andamiaje a la membrana plasmática (230) (231). La formación del signalosoma da lugar a la fosforilación de CD79A y CD79B por la quinasa LYN, y por consiguiente la activación de SYK, a través de su dominio SH2 (dominio muy conservado en las proteínas de transducción de señales intracelulares, como SRC). La señal se propaga por SYK a través de la asociación con BLNK, una proteína de enlace central, que favorece la unión a componentes de señalización que se encuentran por debajo del BCR en la cascada de señalización, como BTK y PLC-2 (fosfolipasa C2) (232). SYK es un mediador clave en la señalización del BCR, que tras la estimulación por el antígeno se activa por fosforilación (233). Se ha descrito que se encuentra constitutivamente fosforilado en la LLC, y

su inhibición induce la apoptosis de las células B-LLC, así como la inhibición de la migración y adhesión de las células al estroma (234). Por otro lado, la fosforilación del dominio CD19, dependiente de LYN, también recluta la subunidad p85 de PI3K (220). El reclutamiento de PI3K a la membrana plasmática conduce a la producción de PIP3 (fosfatidilinositol trifosfato), necesario para una correcta activación de BTK, y seguidamente de AKT.

La segunda fase de la señalización de BCR implica la activación de PLC-2. Esta activación genera una serie de mensajeros posteriores que inducen la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular, activando la proteína quinasa C (PKC). Esta proteína induce la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B. PLC-2 también participa en la activación de ERK, regulada a su vez por la señalización de RAS/RAF1, c-JUN y la MAP quinasa p38 (235).

La tercera fase implica la modulación de la actividad transcripcional y la fosforilación de muchos genes reguladores, como Mcl-1, BIM, Ciclina D1 y Myc. Estos genes se encuentran más abajo en la cascada de señalización, y son los encargados de mediar los cambios que se producen en la proliferación, migración y supervivencia celular.

De la misma manera, existen reguladores negativos del BCR como CD22 y CD5 entre otros. Estos reguladores contienen inmunoreceptores que son fosforilados por LYN, e inhiben la señalización del BCR. Por lo tanto, LYN regula la transducción de señales a través del BCR de forma positiva y negativa (236).

En el caso de la LLC, la naturaleza molecular de la Ig de superficie ha proporcionado información sobre el desarrollo de esta patología. Aquellos pacientes LLC con una enfermedad progresiva, presentan la inmunoglobulina de superficie (Ig) del BCR codificada por

genes IGHV no mutados, y elevados niveles de la proteína ZAP-70, mientras que aquellos pacientes con una enfermedad más estable, presentan el Ig codificado por los genes IGHV mutados y no expresan ZAP-70 (237). Estudios ya publicados indican que la señalización de BCR, que promueve la proliferación de estas células, es generalmente más alta en el subtipo que presenta la IGHV no mutada (238) (219).

### **3.2.1.1. Proteína Bruton tirosin quinasa (BTK).**

La proteína Bruton tirosin quinasa, codificada por el gen BTK, es una proteína citoplasmática perteneciente a la familia de las Tec-quinasa (PTK), entre las que se encuentran otras 4 proteínas denominadas Itk, Tec, Bmx y Txk (239). La proteína BTK fue clonada y caracterizada por primera vez en el año 1993 (240) (241), y se expresa en casi todas las células hematopoyéticas, excepto en las células plasmáticas y los linfocitos T, y en las células B, desde las etapas más tempranas hasta las más maduras (242). Desempeña un papel importante en el desarrollo y proliferación del linaje de células B (243), constituyendo un elemento esencial en la vía de señalización del receptor de célula B (BCR) (229). Este gen codifica una proteína de 659 aminoácidos que contiene 5 dominios diferentes característicos de las moléculas de señalización (244), incluyendo un dominio de pleckstrina (PH) N-terminal, un dominio de homología Tec (TH), seguido de dos dominios de homología SRC (SH2 y SH3) y un dominio quinasa C-terminal (SH1) (240).

En humanos, mutaciones que provocan la disfunción de BTK conducen al síndrome XLA, denominado agammaglobulinemia ligada al cromosoma X. Esta enfermedad es una inmunodeficiencia primaria caracterizada por la falta de células B maduras circulantes y niveles bajos de inmunoglobulinas, causando infecciones bacterianas recurrentes.

BTK se expresa principalmente en el citoplasma, pero está descrito que se transloca a la membrana plasmática tras la activación de PI3K (245) (246) (247). Una vez allí, BTK se activa por fosforilación mediada por SYK o LYN, en respuesta a la unión del receptor de célula B con el antígeno, y comienza un proceso mediante el cual una variedad de proteínas interactúan entre sí, reclutando moléculas de señalización que dan como resultado la proliferación de las células B (244).

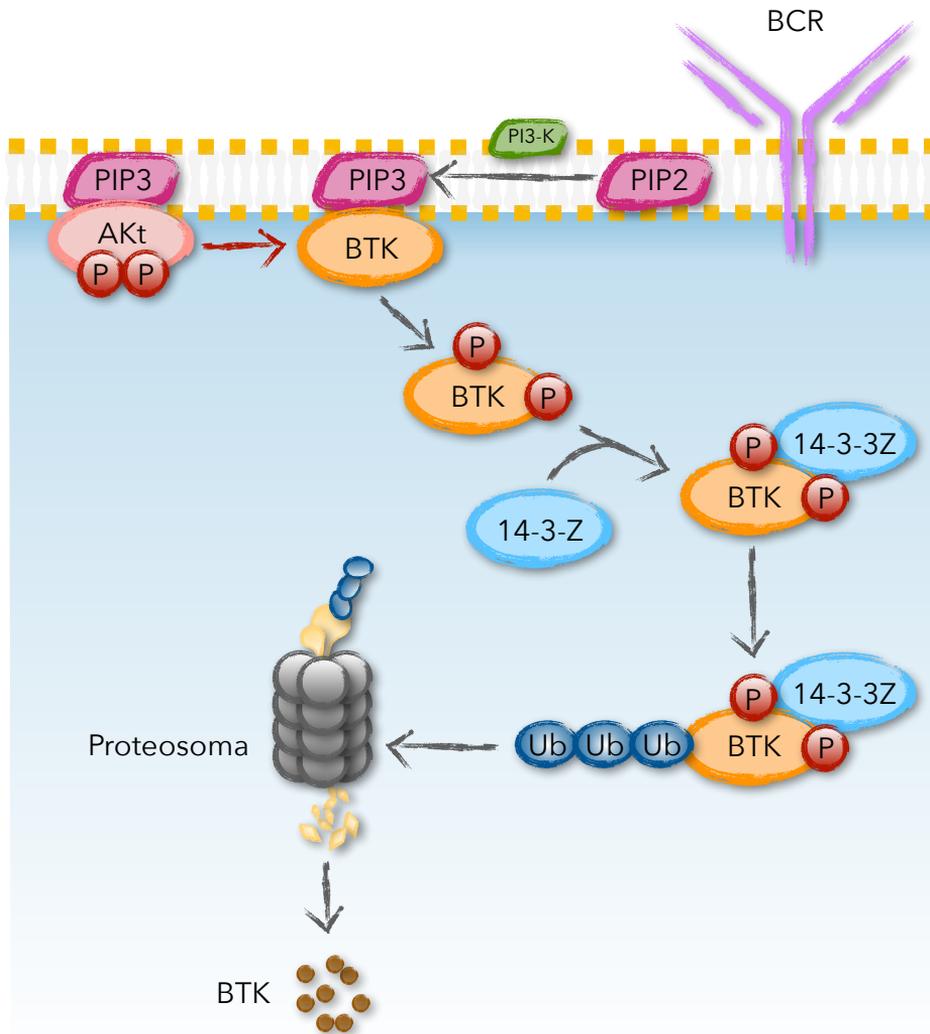
### 3.2.1.2. Vía PI3K/Akt.

La ruta de la fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) se considera un componente clave de la supervivencia celular en diferentes tipos de cáncer, incluida la LLC. Esta familia de enzimas se encarga de la fosforilación de los lípidos de inositol, cuya función principal una vez fosforilados es el reclutamiento a la membrana celular de proteínas de señalización (248) (249) (**figura 12**).

Las enzimas PI3K se clasifican en tres tipos denominados I, II y III, en función de su estructura, tipo de regulación y selectividad de sustrato. Las enzimas de tipo I son heterodímeros formados por una subunidad catalítica de aproximadamente 110 kDa (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  y p110 $\delta$ ) y una subunidad reguladora encargada de modular su actividad y localización celular (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , p55 $\gamma$ , p55 $\alpha$  y p50 $\alpha$ ) (248). Su principal objetivo es convertir fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) en fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), cuya función es facilitar el reclutamiento o la unión a la membrana plasmática de numerosas enzimas intracelulares, que contienen dominios de homología PH con selectividad específica a este lípido, tales como la Tec-quinasa BTK y AKT entre otras, dando lugar a la activación continua del BCR (250).

AKT es un componente que se encuentra más abajo en la vía de señalización del BCR que, una vez que se activa por fosforilación

mediada por PIP3, se transloca a la membrana plasmática. Una vez allí, da lugar a varios procesos entre los que se encuentran la fosforilación y activación de proteínas pro-apoptóticas como Bad (251), la fosforilación de MDM2, aumentando su actividad ubiquitina ligasa para llevar a cabo la ubiquitinación y posterior degradación de p53 (252), la fosforilación y activación de IKK, que se traduce en la activación de NF- $\kappa$ B, entre otros procesos (397).



**Figura 12: Esquema de las vías de señalización del BCR.** Fosforilación y activación de BTK y AKT. Modificado de (253).

El desarrollo de fármacos en los últimos años, para el tratamiento de la LLC dirigidos hacia el bloqueo de las vías de señalización del BCR, se considera un importante progreso, ya que la señalización del receptor de célula B es clave en la biología de la LLC (254). La inhibición farmacológica de BTK mediante Ibrutinib (255) (153), y de PI3K por Idelalisib (256), reducen las señales de supervivencia celular, disminuyendo la actividad de vías como NF- $\kappa$ B y ERK, así como las interacciones con el microambiente (257).

### 3.2.2. Vía de supervivencia NF- $\kappa$ B.

El factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B es el principal mediador de la función inmune (innata y adaptativa) y las respuestas inflamatorias, participando también en la regulación de procesos fisiológicos como la diferenciación, proliferación y supervivencia celular (258). También está descrito el papel que desempeña NF- $\kappa$ B en el desarrollo de varios linajes de células hematopoyéticas como las células B, y la formación de órganos linfoides secundarios (259). Por todo ello, la señalización de NF- $\kappa$ B es crítica, ya que responde a diversos estímulos mediando las respuestas celulares en los diferentes contextos fisiológicos (260).

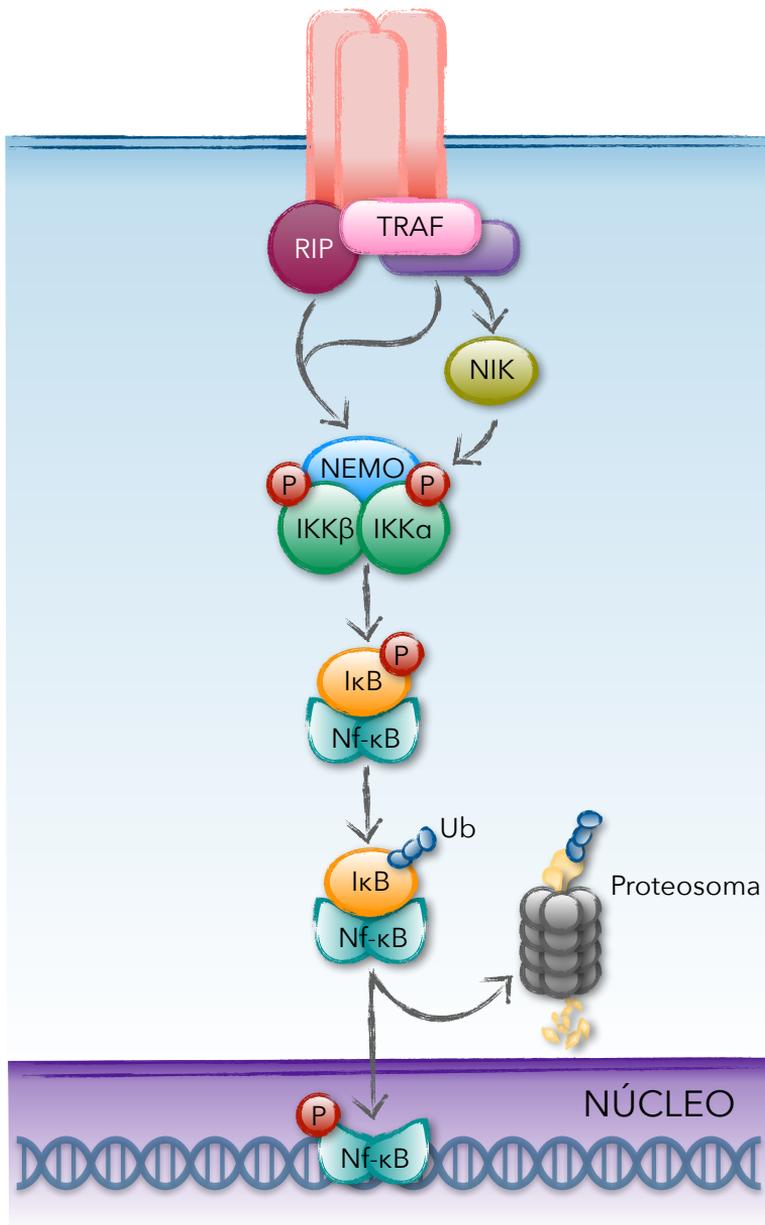
La familia de factores de transcripción NF- $\kappa$ B está formada por 5 miembros: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel y RelB, codificados por los genes NF $\kappa$ B1, NF $\kappa$ B2, RELA, REL y RELB, respectivamente (261). Todos ellos comparten un dominio de homología en el extremo N-terminal denominado RHD, responsable de la unión al ADN, la dimerización, la unión al inhibidor de I $\kappa$ B y la localización nuclear (262).

El esquema básico de señalización de NF- $\kappa$ B está formado por el complejo IKK, las proteínas inhibidoras I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$ ) y dímeros de NF- $\kappa$ B. Esta ruta se caracteriza por dos vías de señalización, la vía canónica y la vía no canónica (260) (**figura 13**).

Una vez recibidas las señales extracelulares por el receptor de membrana tiene lugar la activación de la quinasa de I $\kappa$ B (IKK), y por lo tanto la fosforilación, ubiquitinación y degradación de las proteínas inhibitoras I $\kappa$ B. El complejo IKK está formado por dos subunidades que presentan una elevada similitud, denominadas IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , y una subunidad reguladora denominada NEMO (IKK $\gamma$ ) (263). La activación de IKK puede ocurrir a través de los complejos TRAF/RIP, lo que conduce a la señalización canónica, o a través de TRAF y NIK (*NF- $\kappa$ B-inducing kinase*) que conduce a la vía no canónica. La vía canónica está basada en la degradación de los inhibidores de I $\kappa$ B en el citoplasma, y se induce por la quinasa IKK $\beta$  en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1 (264), por lo que tras la activación de IKK $\beta$  se produce la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B por el proteosoma. La vía no canónica consiste en el procesamiento del precursor p100 activándose a través de la quinasa IKK $\alpha$ . La activación de NIK lleva a cabo la fosforilación de IKK $\alpha$ , responsable de la fosforilación de p100, que tras su procesamiento en el proteosoma da lugar a la forma activa p52 (265).

El sistema IKK-NF- $\kappa$ B ejerce funciones importantes en el componente maligno del tumor, facilitando a las células resistencia ante los procesos apoptóticos, así como en el componente inflamatorio, facilitando la producción de factores de crecimiento que estimulan el desarrollo del tumor (266).

Finalmente, los dímeros de NF- $\kappa$ B que se han liberado, se pueden activar a través de varias modificaciones postraduccionales, se translocan al núcleo donde se unen a secuencias de ADN específicas e inducen la transcripción de genes diana (267). Las vías de NF- $\kappa$ B canónica y no canónica regulan diferentes conjuntos de genes diana, como por ejemplo los genes Bcl-2, Bax o Bim en la ruta canónica, y Cox-2, Ciclina D y Bcl-xl en la vía no canónica (380).



**Figura 13: Vías de señalización de la ruta NF-κB.** La señalización canónica de NF-κB comienza tras la activación del receptor, reclutamiento de proteínas adaptadoras y señalización a IKK a través del complejo TRAF/RIP. Una vez activado IKK, se produce la fosforilación y degradación de IκB. La señalización no canónica de NF-κB tiene lugar a partir de la activación del receptor, reclutamiento de proteínas adaptadoras y señalización a IKK a través de TRAF y NIK. Tras la activación de IKK, se produce el procesamiento de p100 a p52. Los dímeros de NF-κB fosforilados se unen al ADN e inducen la transcripción de genes diana. Modificado de (267).

La vía canónica de NF- $\kappa$ B juega un papel importante en la supervivencia de las células B mediada por la señalización del BCR. De manera natural, el complejo NF- $\kappa$ B se encuentra inactivo en el citoplasma formando dímeros unidos a I $\kappa$ B. Los dímeros más habituales son el heterodímero p50/p65, y el homodímero p50/p50 (17). Cuando se produce la estimulación del BCR a través de BTK, PI3K o AKT, tiene lugar la fosforilación y posterior degradación por el sistema ubiquitin-proteosoma de I $\kappa$ B, facilitando así la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y la transcripción génica (268).

La expresión de NF- $\kappa$ B se encuentra elevada en la LLC y relacionada con las interacciones que se producen entre las células B-LLC y el microambiente tumoral, hecho que proporciona un aumento en la supervivencia de las células B-LLC. Igualmente, las vías PI3K/AKT contribuyen a la activación de NF- $\kappa$ B en esta patología (269).

Se han desarrollado diferentes inhibidores de la señalización NF- $\kappa$ B, entre los que se encuentran los inhibidores de IKK, los inhibidores del proteosoma que bloquean la degradación de I $\kappa$ B, e inhibidores de la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B, entre otros. Aunque parece que la opción más efectiva es inhibir el sistema IKK, como ocurre con el inhibidor sintético BAY-117082, dirigido a bloquear la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ , y por lo tanto su degradación proteosómica y la translocación de proteínas NF- $\kappa$ B al núcleo (270). Hay estudios que describen que las células de LLC son sensibles a este inhibidor, sin embargo, este hecho no se ha podido correlacionar con los marcadores pronóstico establecidos CD38, ZAP-70 o el estado mutacional de IGHV (271).

### 3.2.3. Ruta de señalización NOTCH.

La familia NOTCH en mamíferos está compuesta por un conjunto de miembros formado por cuatro receptores heterodiméricos denominados Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4, y cinco ligandos, que presentan una función importante en la determinación del destino celular. Tanto los receptores como los ligandos son proteínas transmembrana que se constituyen por tres dominios, extracelular, transmembrana e intracelular (272). Para activar la vía de señalización de Notch, es necesario que el dominio intracelular se libere al citoplasma y posteriormente se transloque al núcleo (273). Está descrito que la señalización de Notch tiene una importante función en la hematopoyesis, estando muy relacionada con el mantenimiento de poblaciones linfoides, mieloides y eritroides, así como en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis de múltiples tipos celulares (274) (275). Por lo tanto, el control de esta ruta es de vital importancia para la correcta formación y desarrollo de los tejidos, y defectos en la misma, dan lugar a anomalías que finalmente pueden causar diferentes neoplasias malignas como las hematológicas y de tumor sólido (276).

La expresión aberrante de Notch en humanos se ha identificado como un factor importante en el desarrollo de leucemias y linfomas, debido a una translocación cromosómica que resulta en la expresión de una proteína truncada, constitutivamente activa, conocida como Notch1 (TAN-1) (277). Las mutaciones en la proteína Notch1 se han convertido en una de las alteraciones somáticas a tener en cuenta en la leucemia linfática crónica, afectando aproximadamente a un 10-15 % de los pacientes (278). Este tipo de mutaciones generan una isoforma más estable y activa de la proteína, facilitando la activación de la vía de señalización.

Los pacientes de LLC con Notch1 mutado muestran frecuentemente un IGHV no mutado, junto con una elevada expresión de CD38 y ZAP70, y entre las anomalías genéticas, las más frecuente son la 13q14 y la trisomía del 12, relacionándose en algunos casos con la inactivación del gen Tp53 (127) (279). Por lo tanto, aquellos pacientes con mutación de Notch1 tienen etapas de Rai y Binet avanzadas, con elevada expresión de  $\beta$ 2-microglobulina, lo que se traduce en un estadio clínico avanzado en el momento del diagnóstico y una supervivencia general más corta que aquellos con la proteína Notch1 no mutada (123). Hay autores, como Rossi et al. que describen que el impacto de estas mutaciones en la supervivencia global de los pacientes con LLC es independiente del IGHV (126).

### 3.2.4. Regulación del ciclo celular.

El ciclo celular comprende un conjunto de eventos nucleares y citoplasmáticos que deben estar perfectamente coordinados y regulados, dando lugar a la duplicación del ADN de los cromosomas de las células eucariotas, para luego segregarlo en dos células hijas genéticamente idénticas.

El ciclo celular proliferativo consiste en cuatro fases: G1, S, G2 y M. Durante la fase S, de síntesis de ADN, la célula replica completamente su genoma, produciendo una copia idéntica para cada célula hija. Esta fase se extiende durante unas 10-12 horas, la mitad del tiempo que dura un ciclo celular completo de células de mamífero. Durante la fase M de mitosis, la célula madre reparte el material genético en dos células hijas, proceso que ocupa aproximadamente 1 hora del tiempo total de un ciclo celular. La fase S y la fase M se encuentran separadas a su vez por dos fases intermedias preparativas, denominadas G (*gap*), que permiten a la célula tener un tiempo extra para crecer y repararse; la fase G1, entre la fase M y la fase S y la fase G2, entre la fase S y la mitosis. Si durante ese tiempo extra, las células

detectan que las condiciones extracelulares son desfavorables, retrasan su progresión a través de la fase G1, pudiendo entrar incluso en un estado de reposo o quiescencia denominado G0, en el que las células pueden permanecer durante mucho tiempo antes de volver a proliferar (399) (400).

Los componentes principales del sistema de control del ciclo celular pertenecen a una familia de enzimas denominadas quinasas dependientes de ciclina (Cdks). Estas enzimas catalizan la reacción de fosforilación de diferentes sustratos (400). La actividad de las Cdks requiere la unión a subunidades reguladoras denominadas ciclinas, cuyos niveles varían en momentos determinados del ciclo, regulando así la actividad de las CDKs (401). En las células humanas existen 20 CDKs y 29 ciclinas (402), pero sólo un pequeño conjunto de complejos Cdk-Ciclina participan en la progresión del ciclo celular. Por un lado, se encuentran las quinasas Cdk2, Cdk4 y Cdk6 que actúan en interfase, fase G1, S y G2, y Cdk1 que actúa en mitosis, y por otro lado las ciclinas pertenecientes a cuatro tipos, como son ciclinas A, B, C y D (280).

Además del control de síntesis y degradación de diferentes ciclinas, las Cdks están sujetas a una regulación negativa por parte de proteínas inhibitoras de Cdks, denominadas CKIs (*Cdk inhibitors*). Según su similitud de secuencia y estructura, los CKIs se dividen en dos familias: los inhibidores Cdk4 (INK4) y la familia CIP/KIP. Los inhibidores INK4, formados por p16, p15, p18 y p19, provocan la parada en G1, inhibiendo la actividad quinasa de Cdk4/6 (281) (282). Los inhibidores de la familia CIP/KIP, formada por p21, p27 y p57, modulan la actividad de varios complejos Cdk-Ciclina, inhibiendo procesos de proliferación y diferenciación celular (282) (283), y además, están implicados en la respuesta al estrés celular. p21 es diana transcripcional de p53, y media la parada del ciclo celular en las fases intermedias G1 y G2 en respuesta al daño en el ADN (398) (284). La expresión de p27 se encuentra normalmente elevada en células en reposo, disminuyendo

esa expresión cuando las células entran en ciclo. Este inhibidor provoca la parada del ciclo en la fase G1, en respuesta a señales antimitogénicas (285). p57 interviene en la regulación del ciclo celular durante el desarrollo embrionario (283).

Existe otro mecanismo de control del ciclo celular esencial, cuya función principal consiste en evitar la inestabilidad genómica generada por daños externos en el ADN o por la formación de estructuras aberrantes, generadas durante la replicación del ADN. Son los denominados puntos de control, que detienen o previenen la progresión del ciclo celular, proporcionando un tiempo extra para la reparación del daño, o cuando el daño es irreparable, previenen la proliferación celular mediante senescencia, diferenciación o apoptosis. Los principales puntos de control se encuentran en G1/S y en G2/M. Durante la transición de G1 a S, existe el punto de control G1/S que previene el inicio de la replicación del ADN si se encuentra dañado. El punto de control de G2/M, previene el inicio de la mitosis cuando existe daño en el ADN, generado en la fase G2 o por la propia replicación durante la fase S (286).

### **3.2.5. Reparación del Daño en el ADN.**

Desde el punto de vista clínico, el fracaso de las quimioterapias convencionales en el tratamiento de la LLC se basa en que la inducción de apoptosis, que se inicia como respuesta al daño producido en el ADN, se encuentra alterada.

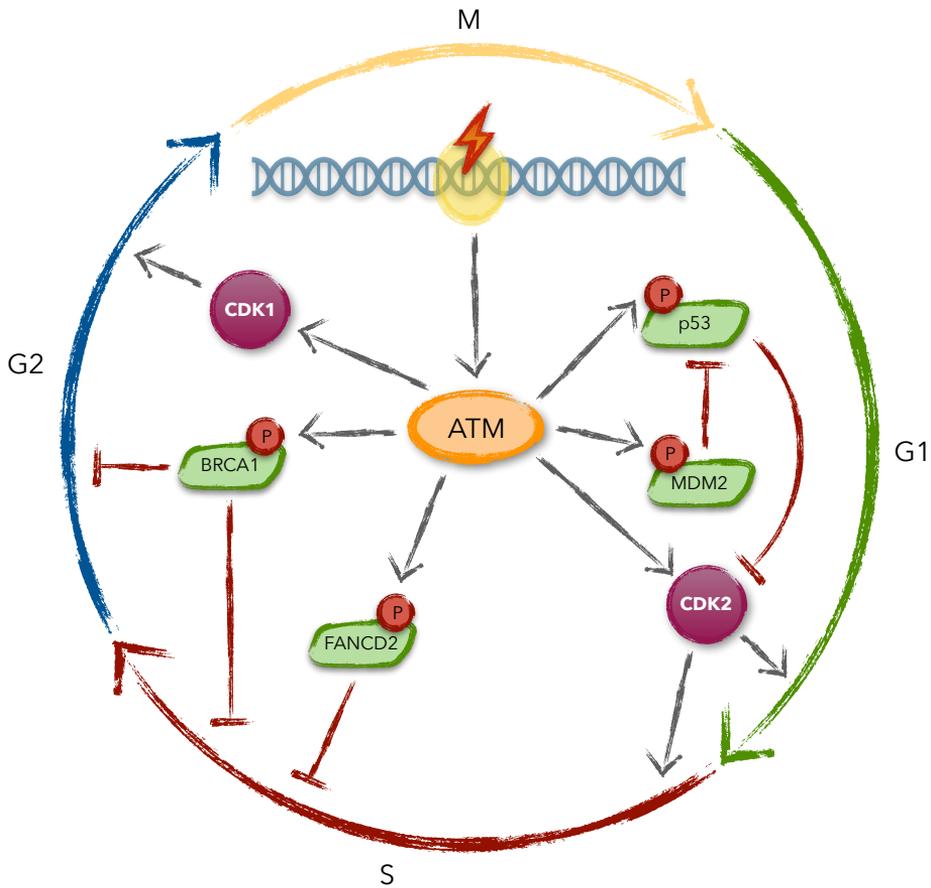
Para mantener la integridad del ADN, las células eucariotas han desarrollado un programa de vigilancia que consiste en la activación de los puntos de control del ciclo celular (G1/S y G2/M), en respuesta al daño producido en el ADN (DDR). Este daño puede ser causado por una replicación incompleta del ADN debido a fallos producidos en las horquillas de replicación, o inducido por agentes intrínsecos como las

modificaciones espontáneas, agentes químicos o radiación tipo UV o ionizante, entre otros (287).

La activación de los puntos de control consiste en la estimulación de una serie de quinasas que evitan la progresión a través del ciclo celular, y si el daño producido es superior a la capacidad de reparación, se activan vías de señalización adicionales que conducen a la muerte celular a través de la apoptosis (288). Las dos vías principales de respuesta al daño producido en el ADN son la vía ATM/Chk2 que se activa tras la rotura de doble hebra de ADN (DSB), y la vía ATR/Chk1 que responde principalmente a roturas de cadena sencilla de ADN (289).

La vía de la quinasa ATM o de reparación de roturas de doble hebra (DSB) se lleva a cabo mediante dos mecanismos diferentes, un mecanismo rápido y propenso a errores denominado recombinación no homóloga (NHEJ), y un proceso de reparación de alta fidelidad denominado recombinación homóloga (HR) (290).

ATM forma parte de una familia de proteínas conservada, con actividad quinasa que se denominan proteínas similares a PI3K (PIKK), debido a que contienen un dominio típico de esta familia de proteínas. ATM se localiza predominantemente en el núcleo de las células en división. Inicialmente, las moléculas de ATM se encuentran inactivas en las células no dañadas, formando dímeros o multímeros, y tras el daño en el ADN, se produce una fosforilación entre las moléculas de ATM, liberándose así cada una de ellas y convirtiéndose en monómeros activos en cuestión de minutos (291), respondiendo rápidamente a los DSB mediante la fosforilación de una amplia variedad de sustratos (292) (293). Entre los múltiples sustratos susceptibles de ser fosforilados se encuentran las proteínas p53 y FANCD2, proteína perteneciente a un complejo multiprotéico cuyos defectos conducen al síndrome conocido como Anemia de Fanconi (AF) (**figura 14**).



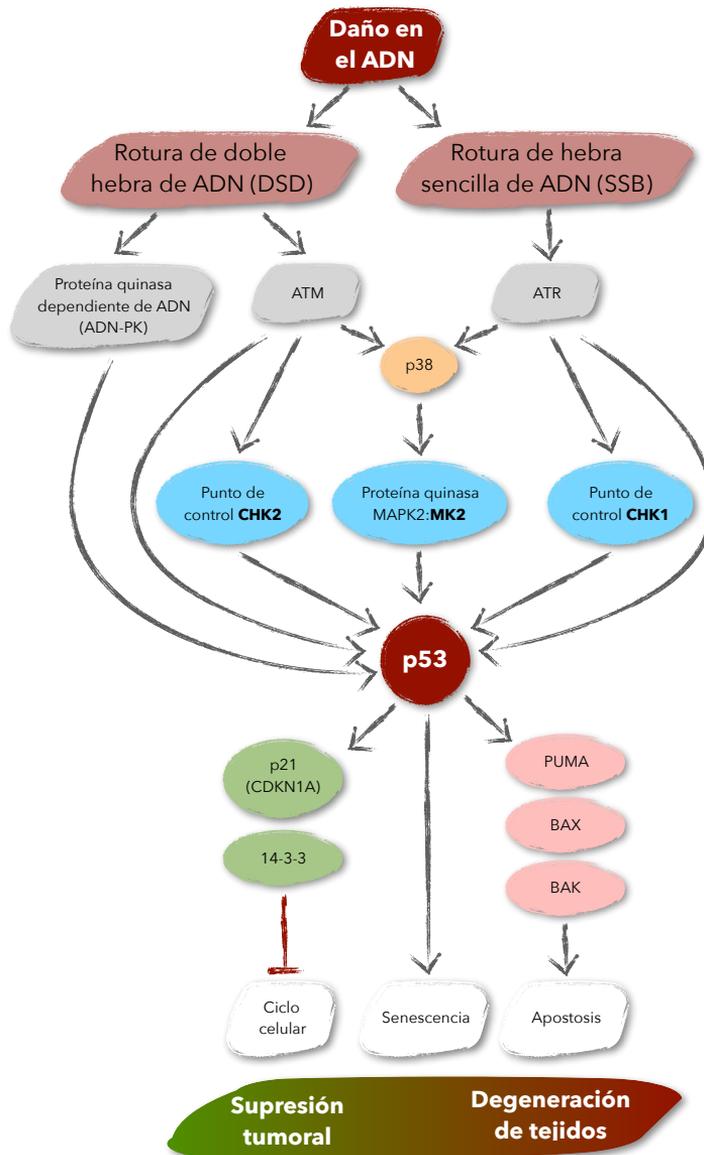
**Figura 14: Activación de los puntos de control del ciclo celular en respuesta a los DSB mediada por ATM.** La mayoría de estas vías están reguladas principalmente por ATM en la etapa temprana de la respuesta al daño en el ADN. Modificado de (290).

La proteína ATM se identificó como el gen que se encuentra mutado en la ataxia-telangiectasia (A-T). Esta patología pertenece a un grupo de enfermedades humanas conocidas como síndromes de inestabilidad cromosómica (294). Estos síndromes combinan varios grados de degeneración tisular e inestabilidad citogenética, y presentan signos prematuros de envejecimiento, sensibilidad a los agentes que dañan el ADN y predisposición al cáncer (295). Son todos

autosómicos recesivos y representan defectos en las vías principales de respuesta al daño en el ADN, cada una de las cuales se activa por una clase distinta de agente nocivo. Dentro de estos síndromes se encuentran por ejemplo el denominado Xeroderma pigmentosum (XP), Síndrome de Cockayne, Síndrome de Werner (WS) y la Anemia de Fanconi (FA) entre otros (290).

### **3.2.5.1. Gen supresor tumoral: p53.**

Las principales vías que se activan en respuesta al daño en el ADN, descritas anteriormente, convergen en p53, que se estabiliza tras la fosforilación y se localiza en el núcleo. Las vías de respuesta mediadas a través de p53 desempeñan un papel importante en el comportamiento de las células frente a la inestabilidad genómica, dando lugar a la parada del ciclo celular, senescencia y apoptosis (296) (**figura 15**).



**Figura 15: Esquema de las vías que se activan en respuesta al daño producido en el ADN, mediadas a través de p53.** Tras su activación, p53 induce una serie de genes diana que promueven la detención del ciclo celular, permitiendo la reparación del ADN, la senescencia o apoptosis. Modificado de (296).

La proteína codificada por el gen supresor de tumores p53 se descubrió en la década de los 70, y se identificó como una fosfoproteína celular de 53kD capaz de unirse al antígeno transformante SV40 T (297). Pertenece al grupo de genes implicado en el control del ciclo celular, cuya función es detener el ciclo en el paso de G1 a S, cuando se han producido lesiones en el ADN, proporcionando tiempo suficiente para que actúen los sistemas de reparación del ADN, y asegurar así la integridad genómica y la supervivencia de las células expuestas a agentes dañinos. Se han identificado dos grandes grupos de genes diana de p53, por un lado los reguladores negativos de la progresión celular, entre los que se encuentran el inhibidor de quinasas dependiente de ciclina p21 (CDKN1A) y 14-3-3, y por otro los genes promotores de la apoptosis como Puma, Bax y Bak (298) (299). La mutación de p53 es uno de los cambios genómicos más frecuentes, encontrándose mutado en más del 50% de los cánceres humanos (298) (300), permitiendo así la proliferación descontrolada de células dañadas (301). Sin embargo, una sobreexpresión de formas activas de p53, da como resultado fenotipos degenerativos y un envejecimiento celular prematuro (302).

p53 tiene dos proteínas homólogas conocidas como p63 (303) y p73 (304), que presentan un elevado grado de similitud con él, de forma que pueden unirse y activar la transcripción de muchos promotores sensibles a p53, mediando la detección del ciclo celular, la senescencia y apoptosis en respuesta al daño en el ADN. p63 y p73 contienen promotores alternativos y sitios de empalme por eso presentan isoformas diferentes con actividades similares o antagonistas. Las isoformas de la región C-terminal denominadas de longitud completa, TAp63 y TAp73, contienen un dominio de transactivación (TAD) y se comportan biológicamente de forma similar a p53. Sin embargo, las isoformas  $\Delta$ Np63 y  $\Delta$ Np73, que no presentan el dominio TAD, por lo que son transcripcionalmente inactivas, actúan como inhibidores de los miembros activos de la familia de p53 (305).

Sin embargo, diversos trabajos han descrito que pueden transactivar genes diana a través de un dominio de transactivación alternativo presente en sus extremos N-terminales a través de sitios de respuesta para Sp1(306) (307,308).

La proteína supresora de tumores p53 es una proteína de vida corta debido a su rápida degradación por el sistema ubiquitina-proteosoma. Sin embargo, tras la exposición de las células a diferentes estímulos de estrés, los niveles de p53 aumentan como consecuencia de la reducción de su degradación, activándose su función como factor de transcripción y promoviendo la detección del crecimiento celular y la apoptosis (65) (309). La actividad de p53 está regulada principalmente por modificaciones postraduccionales, tales como ubiquitinación, acetilación y fosforilación (310). Un regulador importante de la actividad y estabilidad de p53 es la proteína MDM2. MDM2 es una ubiquitina ligasa E3-RING que interactúa directamente con p53 e inhibe su función, promoviendo su ubiquitinación y degradación a través del proteosoma (311). El gen MDM2 se encuentra activo en aproximadamente el 7% de los cánceres sin una mutación asociada de p53, de manera que facilita la tumorigénesis inhibiendo la vía de supresión tumoral mediada por p53 (312) (313). Además, se ha descrito que MDM2 promueve la neddilación de p53, reprimiendo su actividad transcripcional (65).

Las mutaciones de TP53 y ATM son hechos comunes en la LLC, y se asocian con una respuesta deficiente a la quimioterapia inmunológica convencional y peor pronóstico (113) (314). De manera que las aberraciones cromosómicas más relevantes clínicamente afectan principalmente al supresor tumoral p53. Entre ellas se encuentran las deleciones en el brazo corto del cromosoma 17 (del 17p), hecho que se asocia con una resistencia elevada a las quimioterapias genotóxicas (113), y mutaciones puntuales de p53 que

dañan las proteínas en un considerable porcentaje de pacientes LLC y se asocian con un mal pronóstico (315).

### 3.2.5.2. Proteínas FANC: Anemia de Fanconi.

Se ha descrito que las proteínas FANC regulan procesos de monoubiquitinación y neddilación, de hecho, es probable que el proceso de monoubiquitinación más conocido sea el que realiza el complejo FANCCore sobre las proteínas FANCD2 y FANCI, para activar los procesos de reparación por recombinación homóloga del ADN, en respuesta a agentes que generan enlaces covalentes entre las cadenas de ADN o bien, tras el atasco de las horquillas de replicación (316). El complejo FANCCore es una E3 multiproteica que contiene la E3 RING ligasa FANCL que, en colaboración con la E2 UBE2T, cataliza la transferencia de un único residuo de ubiquitina a las dianas FANCD2 y FANCI (34) (35) (36), en respuesta al daño en el ADN. Los miembros que componen este complejo son FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL y FANCM. Una vez que estas proteínas activan sus dos dianas descritas hasta el momento, inician una cascada de señalización conocida como ruta FA/BRCA. Esta vía regula la detección, señalización y reparación de los enlaces cruzados (ICL) de ADN, e incluye otras 6 proteínas que se encuentran por debajo en la ruta, denominadas FANCD1, FANCI, FANCN, FANCO, FANCP y FANCO (conocidas también como BRCA2, BRIP1, PALB2, RAD51C, SXL4 y XPF ó ERCC4, respectivamente). Estas proteínas están involucradas en procesos de reparación del ADN por recombinación homóloga (317) (318). La mutación de cualquiera de estas proteínas da lugar a la patología conocida como Anemia de Fanconi (AF) (319).

La Anemia de Fanconi (AF) es un trastorno genético caracterizado por múltiples anomalías congénitas, inestabilidad cromosómica, y susceptibilidad al cáncer (320), principalmente tumores hematológicos y sólidos. Las anomalías hematológicas

representan las manifestaciones patológicas más abundantes (319). Clínicamente, esta enfermedad se caracteriza por una insuficiencia de la médula ósea, debutando en la niñez con una anemia aplásica y, con el tiempo, estos pacientes pueden desarrollar un síndrome mielodisplásico o una leucemia mieloide aguda, pero también, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, tumores hepáticos, cerebrales y cutáneos, entre otros (321) (322) (323).

Defectos en la ruta FA/BRCA también ocurren en células somáticas de individuos no Fanconi, pudiendo causar diferentes tipos de cáncer (324) (325) (326). Los tumores que albergan mutaciones en genes FANC son muy sensibles al tratamiento con agentes alquilantes, tales como cis-platino (CDDP), mitomicina C (MMC) o melfalán (327). Por el contrario, la sobreexpresión de genes FANC se ha asociado con refractariedad a melfalán en mieloma múltiple (328) (329). Por estos motivos, la ruta FA/BRCA se ha convertido en una posible diana en el tratamiento de diferentes neoplasias, y ya se están buscando posibles moléculas inhibitoras de esta vía (330) (331) (332). Recientemente se ha descrito que el inhibidor del proteosoma Bortezomib, empleado en el tratamiento de distintos tumores hematológicos, inhibe la ruta FA/BRCA, aportando así un mecanismo para su efecto antitumoral (333). En esta misma línea, se ha demostrado que el sistema de conjugación de NEDD8 conocido como neddilación, participa en la activación de la ruta FA/BRCA, ya que la inhibición del mismo sensibiliza las células a drogas sobrecrezantes del ADN, bloqueando la monoubiquitinación de FANCD2 (319). La neddilación tiene un papel bien definido en la reparación del ADN por excisión de nucleótidos (NER) (334) y también en la reparación de roturas de doble hebra de ADN (DSB), tanto por recombinación homóloga (HR) como por recombinación no homóloga (NHEJ) (335) (336) (337) (102). Se ha demostrado que FANCA, y posiblemente otras proteínas FANC, participan en ambos tipos de reparación DSB (338).

Recientemente, se ha publicado que FANCA modula la neddilación de diferentes proteínas (339), como es el caso del receptor de quimiocinas CXCR5. Este receptor transmembrana se relaciona con la movilidad de las células B y la migración a los centros germinales, teniendo una función importante en la progresión del cáncer y las enfermedades inflamatorias (340) (341). Se ha descrito que CXCR5 se modifica postraduccionalmente mediante la adición de NEDD8, a través de un mecanismo regulado por FANCA (339).



**II.**

**OBJETIVOS.**



Los objetivos de este trabajo van dirigidos a tratar de esclarecer las causas moleculares que puedan explicar las características comunes de esta patología.

Nuestros principales objetivos son:

1. **Rastreo de la expresión de genes FANC en muestras de pacientes de leucemia linfática crónica, y su correlación estadística con parámetros clínicos para discernir su valor pronóstico.** La deficiencia en proteínas FANC se han asociado a alteraciones del ciclo celular y a mecanismos de reparación del ADN y de la apoptosis, todos ellos procesos alterados en la LLC, por lo que se plantea el análisis de alguna deficiencia en la expresión de estos genes en esta patología.
2. **Análisis de los mecanismos moleculares mediante los cuales una variación en la expresión de las proteínas FANC afectaría al fenotipo de la leucemia linfática crónica.** Se realizará un rastreo de los genes y procesos celulares que ven afectada su función por las alteraciones en la expresión de los genes FANC en la LLC.
3. **Estudio de la función de las modificaciones postraduccionales en el desarrollo del fenotipo celular de la leucemia linfática crónica.** La única función conocida del complejo FANCore es la de modificar las proteínas FANCD2 y FANCI mediante monoubiquitinación. Trabajos recientes han reportado un papel de alguna de las proteínas individuales en otras modificaciones postraduccionales. Por otro lado, el estudio del efecto de agentes que inhiben algunas de estas modificaciones, como la

ubiquitinación o la neddilación, han demostrado eficacia sobre células de diferentes neoplasias hematológicas. El conocimiento del alcance de este tipo de modificaciones en la LLC puede aportar datos sobre su etiología y ayudar al diseño de nuevas terapias.

**III.**

**MATERIALES Y MÉTODOS.**



### 1. Características de los pacientes y tiempo de progresión.

Para el estudio de la expresión de genes FANC en leucemia linfática crónica se llevó a cabo el análisis de muestras de 101 pacientes diagnosticados de LLC. De estos pacientes, sesenta y dos (61,4%) eran hombres, con una mediana de edad al momento del diagnóstico de 66 años. El 89% de los pacientes se encontraban en la etapa A de estratificación del riesgo, considerando el sistema de Binet, y el 94% en el estadio O-I, según el sistema de Rai, en el momento del diagnóstico. Se dispuso de estudios citogenéticos de 77 pacientes, de los cuales 45 (58,4%) presentaban al menos una anomalía cromosómica. La delección 13q14 fue la aberración mas frecuente, con un 28,6%, seguida de la trisomía 12, con un 22,1%, la delección 11q23 con un 11,7% y finalmente la delección 17p13 con un 5,2%. La mediana de seguimiento fue de 87 meses, durante los cuales, 44 pacientes mostraron progresión de la enfermedad. La información clínica de los pacientes se resume en la **tabla 1**.

Variable	N (%)
<b>Género, Masculino</b>	62 (61.4)
<b>Edad al diagnóstico, mediana, años (rango)</b>	66 (59-74)
<b>Rai- 0-1</b>	94 (93.1)
<b>Binet- A</b>	89 (88.1)
<b>CD38 positivo<sup>b</sup></b>	12 (15.2)
<b>ZAP-70 positivo<sup>c</sup></b>	14 (21.2)
<b>FISH<sup>d</sup></b>	
- Anormal	45 (58.4)

- Delección 13q14	22 (28.6)
- Trisomía del 12	17 (22.1)
- Delección 11q23	9 (11.7)
- Delección 17p13	4 (5.2)
<b>Progresión</b>	44 (43.6)
<b>Tiempo de progresión, mediana, meses (rango)</b>	59 (39-112)
<b>Seguimiento, mediana, meses (rango)</b>	87 (53-130)
<sup>a</sup> Estadío al diagnóstico. <sup>b</sup> Datos disponibles en 79 pacientes. La expresión de CD38 $\geq$ 20% se consideró positiva. <sup>c</sup> Datos positivos en 66 pacientes. La expresión de ZAP70 $\geq$ 20% se consideró positiva. <sup>d</sup> Datos disponibles en 77 pacientes. Algunos pacientes mostraron dos o más aberraciones por FISH.	

**Tabla 1: Características generales de los 101 pacientes de LLC estudiados.**

## 2. Cultivos Celulares.

### 2.1. Líneas y Cultivos Celulares.

Las líneas celulares empleadas en los diferentes estudios llevados a cabo en esta tesis se resumen a continuación:

Las células B-LLC que se emplearon en estos estudios provienen de sangre periférica (PBMC) de pacientes que firmaron un consentimiento informado antes de la extracción. Se purificaron los linfocitos B (fracción mononuclear) mediante centrifugación en un gradiente de Ficol. Los pacientes LLC seleccionados presentan una afectación superior al 85% (más del 85% de los leucocitos son linfocitos). Para los controles de PBMC, las células CD19+ se aíslan de las capas leucocíticas de donantes sanos después del consentimiento informado, utilizando un sistema inmunomagnético (Miltenyi Biotec,

Bergisch Gladbach, Alemania). Otra vía de obtención de linfocitos B control han sido amígdalas resecadas de pacientes con hipertrofia no infecciosa, mediante lavados con PBS 1X, con el correspondiente consentimiento informado. Estas células se mantienen en medio RPMI suplementado con suero de ternera fetal (FBS) al 10% y cultivadas en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% y a 37°C.

Las células HEK293T provienen de un adenocarcinoma embrionario de riñón. Se mantienen en medio DMEM suplementado con suero de ternera fetal (FBS) al 10% y cultivadas en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% y a 37°C.

Las células 293T KOFAA9 contienen una mutación inactivadora de la función de FANCA y se generaron en el laboratorio mediante la técnica CRISPR/Cas9. Para ello, se transfectaron con una construcción de ARN guía de Cas9 junto con un plásmido donante que genera una inserción dirigida del ORF de la proteína GFP en el tercer exón del gen FANCA. La transfección se llevó a cabo con el reactivo SuperFect siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron seleccionadas por citometría a los 5 días. Estas células se mantienen en medio DMEM suplementado con suero de ternera fetal (FBS) al 10% y cultivadas en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% y a 37°C.

Las células linfoblásticas B deficientes en FANCA (Linfos FA), provienen de un paciente de Anemia de Fanconi y fueron inmortalizadas mediante infección con Epstein-Barr. Esta línea celular se mantiene en medio RPMI suplementado con suero de ternera fetal (FBS) al 10% y cultivadas en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% y a 37°C.

Las células de tumor de mama MCF7 se mantienen en medio RPMI suplementado con suero de ternera fetal (FBS) al 10% y cultivadas en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% y a 37°C.

La línea celular MEC-1, establecida a partir de un paciente LLC, nos fue amablemente cedida por la Dra. Dolores Delgado (Instituto de Biología Molecular y Biotecnología de Cantabria, IBBTEC, Santander, España). Estas células se mantienen en medio RPMI suplementado con suero de ternera fetal (FBS) al 10% y cultivadas en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% y a 37°C. Esta línea celular tiene una deleción en el brazo corto del cromosoma 17 (342).

## **2.2. Transfección Celular.**

### **2.2.1. Método del Fosfato cálcico.**

Este método químico se basa en la formación de un precipitado entre el cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) y el ADN, en una solución salina de fosfatos. Por un lado se realiza la mezcla de ADN y CaCl<sub>2</sub> (tubo 1), y por otro lado la solución salina de fosfatos (tubo 2). A continuación, se vierte la mezcla del tubo 1 sobre la solución del tubo 2, y durante el proceso, se forman unos agregados que las células incorporarán por endocitosis. Se deja la mezcla entre 10-20 min a temperatura ambiente y transcurrido ese tiempo se vierte sobre las células gota a gota. El cultivo se incuba unas 16 horas en una atmósfera humidificada. Este método de transfección proporciona un elevado rendimiento en células HEK293T, aunque posee cierta toxicidad.

### **2.2.2. Método del FuGENE.**

Este reactivo es capaz de transfectar directamente una amplia variedad de modelos celulares con elevada eficacia y baja toxicidad. Se hace la mezcla con el ADN y se vierte directamente sobre los cultivos celulares, con una confluencia aproximadamente del 80%. Las células se incuban entre 24 y 48 horas. Este método de transfección proporciona buen rendimiento en células MCF7.

### **2.2.3. Electroporación.**

Este método aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática celular mediante un campo eléctrico externo, que genera poros en las células por los que el ADN puede atravesar.

Las células B-LLC obtenidas a partir de la fracción de mononucleares de muestras primarias se transfectan por electroporación, aproximadamente unos 10 µg de ADN por cada condición. Se utiliza un sistema de electroporación BTX630 de BTX (Holliston, EE. UU.), siendo las condiciones óptimas 320V y 975µF.

### **2.2.4. Superfect.**

Este reactivo de transfección se basa en la tecnología denominada de dendrímero activado, desarrollada para la transfección de ADN en una amplia gama de líneas celulares, ya que los dendrímeros pueden formar complejos con el ADN o ARN, transportándolo al interior de las células. Este reactivo presenta una baja toxicidad y causa un daño menor en la membrana celular.

### 3. Reactivos.

Descripción (abreviatura)	Casa Comercial	Referencia	Aplicación
1kb Plus DNA	Invitrogen	10787018	Marcador ADN.
Ácido acético glacial	Panreac/ Aplichem	141008	Soluciones de tinción.
Ácido Bicinconínico (BCA)	G Biosciences	786-844	Determinación del nivel total de proteína en una solución.
Ácido etilendiamino tetraacético (EDTA)	Panreac/ Aplichem	131026	Agente quelante de cationes divalentes.
Agarosa	Pronadisa	8010 00	Separación de moléculas de ADN mediante electroforesis.
Albúmina de suero bovino (BSA)	G Biosciences	786-844	-
Alcohol isoamílico	Merck	100979	Precipitación de ácidos nucleicos.
Ampicilina	Fisher Bioreagents	BP1760-25	Antibiótico.
Anexina V marcada con FITC (Anexina V-FITC)	Immunostep	ANXVF-200T	Determinación de viabilidad celular/ apoptosis.
Aprotinina	VWR	E429-10MG	Inhibidor de proteasas
Azul Coomassie	VWR	G-250	Detección de proteínas.
Bis-acrilamida	AppliChem	A3651,1000	Agente de reticulación para los geles de poliacrilamida.
Bolas de sefarosa recubiertas de proteína G	Miltenyi Biotec	4RRPG-5	Inmunoprecipitación.

<b>Descripción (abreviatura)</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>Referencia</b>	<b>Aplicación</b>
Bortezomib	Cayman	10008822	Inhibidor del proteosoma.
Bromuro de Etidio	Sigma-Aldrich	E1510	Tinción fluorescente de ADN.
Buffer Fosfato salino (PBS)	Panreac/ Aplichem	A0964,9050 A9202,0010	Solución tampón.
Cell Trace TM Far Red	Thermo Fisher Technologies	C34564	Proliferación celular.
Cloroformo	Merck	102447	Agente orgánico utilizado en la extracción de ácidos nucleicos.
DEPC (dietil pirocarbonato)	Fisher	BP561-1	Inhibidor de RNAsa.
Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)	Invitrogen	18427088	Utilizados en reacciones de síntesis de ADN in vitro.
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Aplichem/ Panreac	A3672,0100	Disolvente.
DTT	Invitrogen	707265ML	Agente Reductor.
Etanol	Merck	100983	Precipitación de ácidos nucleicos.
Ficol	GE Healthcare	17-1440-02	Aislamiento de células sanguíneas.
Fludarabina (2-fluoroadenina-9-β- D-arabinofuranósido)	Sigma-Aldrich	F2773	Inducción de apoptosis.
fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF)	Sigma-Aldrich	93482-50ML-F	Inhibidor de proteasas
Fluoruro de Sodio (NaF)	Merck	106449	Inhibidor de fosfatasas
FuGENE®HD	Promega	E2311	Transfección Celular.
Glicerol	Fisher Bioreagents	10021083	Aporta densidad a las muestras.

<b>Descripción (abreviatura)</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>Referencia</b>	<b>Aplicación</b>
Glicina	VWR	1.04201.1000	-
I-Block™ Protein-Based Blocking Reagent	Applied-Biosystems	T2015	Bloqueo de membranas para WB.
Ibrutinib	Cayman	16274	Inhibidor de BTK.
Idelalisib/CAL-101	Selleck Chemicals	S2226	Inhibición de PI3Kδ.
Inhibidor de ARNsa (RNAin)	Life Technologies (Thermo)	N8080119	Inhibidor de la actividad RNAsa.
Isopropanol	Merck	109634	Precipitación de ácidos nucleicos.
Kanamicina	Aplichem/Panreac	A1493,0005	Antibiótico.
Kit de ensayo β-galactosidasa (Galacton Plus y Accelerator-II)	Tropix	T2222	Monitoriza la actividad galactosidasa mediante una reacción luminiscente.
Leupeptina	VWR	J580-5MG	Inhibidor de proteasas
LY294002 (LY)	Calbiochem	440204	Inhibición de PI3Ks.
Medio de cultivo celular DMEM	BioWest	L0103-500	Cultivo de células eucariotas.
Medio de cultivo celular RPMI	Gibco	52400-025	Cultivo de células eucariotas.
NP-40 solución 10%	MBL Internacional	JM-2111-100	Detergente.
Ortovanadato de sodio	Sigma-Aldrich	S6508-10G	Inhibidor de proteasas
Paraformaldehído	Sigma-Aldrich	P6148	Fijación/ Permeabilización celular.
Penicilina/Streptomycin	Life Technologies	15070-063	Antibióticos.
Pevonedistat (MLN4924)	Cayman	15217-1	Inhibidor de la neddilación.

<b>Descripción (abreviatura)</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>Referencia</b>	<b>Aplicación</b>
Random Hexamers (hexonucleótidos aleatorios)	Life Technologies	8080127	Cebadores para la reacción de retro-transcripción.
Reactivo Luciferasa	Promega	E1483	Sustrato de la enzima luciferasa.
Rojo Ponceau	Sigma-Aldrich	P3504	Tinción reversible para detectar proteínas.
Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)	VWR	UN1325	Detergente.
Suero Bovino Fetal (FBS)	Tico Europe	90A3FBSEU500	Aporta factores de crecimiento en cultivos celulares.
Superfect	Quiagen	301305	Transfección celular.
SuperSignal® West Dura	Thermo Scientific	34076	Sustrato de la fosfatasa de rábano picante con reacción quimioluminiscente.
SYBER™ Green	Applied-Biosystems	4309155	Tinción fluorescente de ADN.
Tampón Tris, borato, EDTA (TBE)	Panreac/ Aplichem	A0972,9010 PE	Solución tampón utilizada en electroforesis.
Taq ADN Polimerasa	Kappa Biosystems	KK1015 7958587001	Amplificación de fragmentos de ADN por PCR.
Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	Fisher	BP150-20	Catalizador de la reacción de polimerización de la acrilamida.
Transcriptasa Inversa (SuperScriptII)	Fisher	18064-014	Retrotranscriptasa. Polimerasa de ADN que utiliza RNA como molde.

Descripción (abreviatura)	Casa Comercial	Referencia	Aplicación
Tripsina 0,5%- EDTA	Fisher Scientific	25300-054	Mezcla de una proteasa y un agente quelante utilizada para despegar células adherentes.
Tris-HCl	Seeva	37190	Agente tamponante.
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T8787-100ml	Detergente.
Trizol (TriReagent)	Invitrogen	TR118	Reactivo comercial utilizado en la extracción de ácidos nucleicos.
TWEEN 20	VWR	9005-64-5	Surfactante (detergente) hidrofílico.
Vectashield	Vector laboratories	H-1200	Medio de montaje con DAPI para inmunofluorescencia.

**Tabla 2: Listado de líneas reactivos empleadas.**

## 4. Análisis de la Expresión Génica mediante RT-PCR y RT-qPCR.

### 4.1. Extracción de ARN.

La extracción de ARN se realiza para llevar a cabo estudios de expresión génica. Para ello utilizamos el reactivo comercial TRIZOL. El TRIZOL es una solución mono-fásica inmiscible en agua de fenol e isocianato de guanidina que mantiene la integridad de los ácidos nucleicos. En este punto se pueden conservar a  $-80^{\circ}\text{C}$  varios días. A este lisado se le añade una mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v) seguido de vórtex para una correcta emulsión de los

componentes, y de una centrifugación (1500 rpm, 20 minutos a temperatura ambiente) para separar la muestra en dos fases, una de ellas acuosa y otra orgánica. Al pH del TRIZOL, el ARN permanecerá en la fase acuosa, mientras que el ADN y las proteínas quedan en la interfase con la fase orgánica. El ARN será recuperado posteriormente de la fase acuosa por precipitación con isopropanol (se añade un volumen de isopropanol correspondiente a 0,7 veces el volumen de la muestra y se deja unos 10 min a temperatura ambiente; centrifugación a 1500 rpm, 20 min a 4°C). Finalmente, para eliminar las posibles impurezas en forma de sales se lava el pellet de ARN con Etanol al 80% en agua DEPC (centrifugación a 1500 rpm, 10 min a 4°C). Una vez seco, se resuspende el pellet en un volumen de agua DEPC adecuado en función del pellet obtenido.

La cuantificación de las muestras se lleva a cabo mediante la lectura de su absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro (Nanovue, GE Healthcare). La pureza se mide mediante el cociente entre la absorbancia a 260nm y a 280nm, el cual hace referencia a la cantidad de proteína presente en la muestra. Un resultado de 2,0 indica un ARN puro, sin contaminantes. Para evaluar la integridad del ARN, se realiza una electroforesis de cada muestra en un gel de agarosa al 1% en tampón tris-borato-EDTA (TBE). La electroforesis se lleva a cabo en una cubeta (Bio-Rad) a 150V durante 20 minutos. El ARN se almacena para su conservación a -80°C.

## **4.2. Obtención del ADN complementario.**

Para la evaluación de la expresión del ARNm de diferentes genes se utilizó una técnica basada en la PCR, para lo que es necesario convertir el ARN total extraído a ADN, que recibe el nombre de ADN complementario (cDNA). Para ello se realiza una retrotranscripción in vitro utilizando la transcriptasa inversa de MMTV (SuperScriptII) sobre el molde de nuestro ARN. Previo a esta reacción, el ARN total es

desnaturalizado a 65°C y enfriamiento rápido, para deshacer las estructuras secundarias del mismo y así facilitar el acceso a la retrotranscriptasa. En la desnaturalización se incluyen 2µg de ARNm total en presencia de agua, hexámeros de oligonucleótidos como cebadores (*Random Hexamers*) y los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs). Tras el enfriamiento rápido en hielo, se añade una mezcla con el resto de componentes (tampón 5x, DTT, 0,25 U/µl de inhibidor de ARN y 5 U/µl de transcriptasa inversa). El emparejamiento de los hexanucleótidos al azar se consigue con una incubación a 25°C durante 5 minutos, tras lo que se incuba a 42°C durante 1 hora para que trabaje la retrotranscriptasa. La reacción se termina desnaturalizando la enzima a 95°C durante 5 minutos. Para llevar a cabo las reacciones se emplea un termociclador (VWR). Las muestras se guardan para su conservación a -20°C.

#### 4.3. Diseño de oligonucleótidos cebadores para PCR y qPCR.

Para el diseño de los oligonucleótidos cebadores se emplea el programa informático "Primer Blast" ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)). Se consideran adecuadas las parejas de oligonucleótidos cuya longitud se encuentre en torno a 20 bases, su temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>) aproximadamente de 60°C y que su composición no favorezca la aparición de estructuras secundarias. Además, se comprueba mediante un análisis nBlast (*nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*) que el amplicón producto de los oligonucleótidos seleccionados corresponda únicamente al gen de interés y no amplifique otras secuencias en las células de estudio. Teniendo en cuenta estos parámetros, los cebadores u oligonucleótidos empleados se muestran en la siguiente tabla.

<b>Nombre del Gen</b>	<b>OLIGONUCLEÓTIDO Sentido/Antisentido (5'-3')</b>	<b>Tamaño del Amplicón (pb)</b>
GAPDH	5'-GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCA-3' 5'-CGGCCATCACGCCACAGTTTC-3'	416
B-ACTINA	5'-GCGGGAAATCGTGCGTGACATT-3' 5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3'	232
FANCA	5'-GAGCTCAAGGGTCAGGGCAA-3' 5'-AGTCCCCTCAGAAGAGATGA-3'	224
FANCB	5'-CCGCTGCGTTGAGTTTCATAA-3' 5'-TGGA AAAACAAGGACTTCCCAT-3'	281
FANCF	5'-CCTGAAGGTGATAGCGGTGG-3' 5'-GCGACAAAAGGCAGCAAAGA-3'	156
FANCD2	5'-ACCGGGACTTGCAGGGTGAA-3' 5'-AGGCAAAGTTCTGCTCCACCAACT-3'	194
FANCI	5'-TGGAAGTTTGTGGCGGAGTT-3' 5'-AATCCCCCGATTCCACCAAC-3'	278
TP53	5'-GTTCCGAGAGCTGAATGAGG-3' 5'-TCTGAGTCAGGCCCTTCTGT-3'	158
p21	5'-GAGGCACTCAGAGGAGGCGCCAT-3' 5'-CACACGCTCCAGGCGAAGTC-3'	224
p27	5'-CAGCTTGCCCGAGTTCTACT-3' 5'-AGAAGAATCGTCGTTGCAGG-3'	238
ΔNp73	5'-CGCCTACCATGCTGTACGTC-3' 5'-GTGCTGGACTGCTGGAAAGT-3'	267
NUB1	5'-GGCAAAGAGAGCAGCAGAGA-3' 5'-TTCCAGGCGGAAGTAACACC-3'	298
NOXA	5'-AGCTGCGTTTCACCAGGG-3' 5'-TCCAGCTACTTGCACTTGTTCT-3'	101
PUMA	5'-AGATTTGTGGTCCTCAGCCCTCG-3' 5'-CGCCGCTCGTACTGTGCGTT-3'	199
MDM2	5'-CGAGCTTGGCTGCTTCTGG-3' 5'-ATTGCACATTTGCCTGCTCC-3'	305

**Tabla 3: Listado de las secuencias de los cebadores utilizados.**

El análisis de los niveles de mensajero de los genes a estudio se realizó mediante una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de forma cuantitativa o semicuantitativa. La PCR es una reacción de replicación del ADN reiterada in vitro, que aprovecha la resistencia a altas temperaturas de la ADN polimerasa de determinados organismos termófilos. La reacción consta de tres etapas que se repiten un determinado número de veces o "ciclos". Cada ciclo comienza con una etapa de desnaturalización del ADN molde a 95°C durante 30 segundos, una etapa de emparejamiento de los cebadores específicos a 57°C durante 30 segundos, y una etapa de elongación o síntesis del ADN a 72°C durante un tiempo que depende del tamaño del amplicón (la polimerasa avanza a una velocidad de aproximadamente 1 Kilobase por minuto). De esta forma, el número de moléculas del amplicón crece de manera exponencial con cada ciclo, hasta que el sistema se satura.

Así, la PCR cuantitativa monitoriza la amplificación del ADN a lo largo de toda la reacción, para así poder comparar las cantidades de los amplicones en la fase exponencial de la reacción, justo cuando son proporcionales a las cantidades de los respectivos mensajeros de los que provienen en la muestra. Por su lado, la PCR semicuantitativa se basa en una estimación previa de dicha curva de amplificación para cada mensajero, de modo que las amplificaciones se realizan durante un número de ciclos determinado para cada gen, hasta que los amplicones estén acumulándose exponencialmente, momento en el que se analiza su cantidad mediante electroforesis.

#### **4.4. Detección de la expresión génica mediante PCR semicuantitativa.**

Para evaluar los niveles de ARNm se emplea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como enzima la DNA-polimerasa de *Thermophilus Aquaticus* (Taq). Se emplea el Kit Kappa

Taq ADN Polimerasa. Los análisis de PCR se llevan a cabo en las siguientes condiciones: para los controles de carga, GAPDH y  $\beta$ -actina un programa de 25 ciclos de amplificación. Para el resto de los genes analizados se emplea un programa de 32 ciclos de amplificación. En todos los casos, las bandas se visualizaron mediante electroforesis y tinción con bromuro de etidio. Los resultados muestran los niveles relativos del ARNm de interés y los niveles de ARNm de los controles internos GAPDH y  $\beta$ -actina empleados.

#### **4.5. Detección de la expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR) a tiempo real.**

La reacción de qPCR a tiempo real consiste en monitorizar el progreso de la reacción a medida que va ocurriendo. El fluoróforo *SYBER Green* se une específicamente a cadenas de doble hebra de ADN, permitiendo que el sistema de PCR a tiempo real detecte la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR. La detección se realiza al mismo tiempo que la amplificación. En esta técnica, se marca el umbral de fluorescencia en el punto en que la reacción de amplificación se encuentra en fase exponencial. El ciclo en el cual la reacción de amplificación atraviesa este umbral de fluorescencia se denomina Ct y depende de la cantidad de ADN complementario presente en la muestra.

Para realizar la qPCR se añaden por cada muestra 1  $\mu$ l de dilución (1/10) de ADNc, 0,2  $\mu$ M de la mezcla de los oligonucleótidos específicos sentido y antisentido, 12,5  $\mu$ l de SYBR® Green PCR *Reaction Mix* y 9,5  $\mu$ l de agua destilada. Por cada pocillo de las placas de 96 pocillos se cargan 25  $\mu$ l finales y todas las muestras se analizan por triplicado. La técnica se realiza en un termociclador modelo 7300 RealTime PCR System (Applied Biosystems). Las condiciones de qPCR utilizadas fueron: i) un primer segmento de desnaturalización de un ciclo a 95°C durante 10 minutos; ii) un segmento de emparejamiento y

elongación de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 57°C y 72°C durante un minuto, que se realizó durante 40 ciclos; iii) la curva de disociación, un solo ciclo de 95°C durante 15 segundos, 30 segundos a 60°C y 15 segundos a 95°C. Se toman medidas de fluorescencia al final de cada paso de emparejamiento del segundo segmento durante la amplificación y en el segmento final, para realizar la curva de disociación.

Cuando se representa la derivada de la fluorescencia frente a la temperatura, aparece un pico correspondiente a la temperatura de fusión del producto ( $T_m$ ). El área del pico es proporcional a la cantidad de producto de amplificación obtenido. En las condiciones en las que amplifica más de un producto, se detectan varios picos, cada uno con una  $T_m$  característica.

Los resultados se analizan utilizando como control interno GAPDH o  $\beta$ -actina. Se emplea un método de cuantificación relativa basado en la comparación de los valores  $C_t$  ( $\Delta C_t$ ), en el que cada valor  $C_t$  es el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido. Se supone una eficiencia óptima de reacción en las PCRs tanto del gen objeto de estudio como del gen de referencia (404). Este es el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , que expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores  $C_t$  de la muestra y los valores  $C_t$  del control, que se resume en la siguiente ecuación:

$$\text{ratio} = 2^{-[\Delta C_{\text{muestra}} - \Delta C_{\text{control}}]}$$

Como controles negativos se cuantifican en la misma placa pocillos con agua destilada en lugar de ADNc para poder detectar cualquier amplificación por contaminación.

## 5. Análisis estadístico.

Los datos se analizan utilizando SPSS v15.0 (Inc., Chicago, Illinois, EE. UU.) Y la versión 1.37 de EZR para R *commander*. El análisis descriptivo se realiza con las frecuencias y la mediana y el rango intercuartil para los datos cualitativos y cuantitativos, respectivamente. Las comparaciones de dos y dos grupos de muestras más se realizaron utilizando la prueba de *Student* no pareada de dos caras y la prueba ANOVA, respectivamente. Las comparaciones de los datos cualitativos se realizaron con la prueba Chi<sup>2</sup> y la prueba de Fisher. La probabilidad de progresión se calculó utilizando la incidencia acumulada de eventos en competencia. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## 6. Análisis de secuenciación de ARN.

Se llevó a cabo un análisis de secuenciación de ARN (RNAseq), a partir de 20 millones de células mononucleares obtenidas de sangre periférica del paciente LLC362 (63600 leucocitos /  $\mu$ l y 91.9% de linfocitos). Para ello, las células se sometieron a electroporación con un vector de expresión para FANCA o un vector vacío en las condiciones descritas anteriormente. Después de 36h en cultivo, se extrajo el ARN total utilizando el método de TRIZOL y se envió a la compañía BGI (Copenhague, Dinamarca) para la secuenciación completa del transcriptoma, utilizando la plataforma BGISEQ-500. El análisis bioestadístico ha sido proporcionado por la misma empresa.

## 7. Análisis de la actividad transcripcional mediante construcciones reporteras de luciferasa.

Para realizar este tipo de ensayos se han utilizado dos plásmidos, por un lado el vector *pG13Luc p53-reporter*, cedido por la Dra. Dolores Delgado (IBBTEC, Santander, España), y por otro lado el plásmido pGL P2p73, obtenido a partir de un fragmento genómico de PCR de 1001 pb (de -994 a +7, relativo al inicio de la traducción), perteneciente al segundo promotor de TP73, que se amplificó con cebadores específicos (sentido 5'- GAAAGCAGGCAGGTGGTTTGGG-3' y antisentido 5'-TGAATCCAACAACAAAACCCGC- 3' ) y se clonó en el vector *reporter* de luciferasa pGL2basic (Promega). Las células HEK293T se cotransfectaron por triplicado por el método del fosfato cálcico, con 2 µg de las construcciones descritas, 1 µg de los vectores de expresión indicados en cada experimento y 0,2 µg de pCMV-galactosidasa. Las actividades de luciferasa y β-galactosidasa se miden en un luminómetro (*Luminoskan Ascent*, Thermo Scientific), de 24 a 48 h después de la transfección, incubando los extractos celulares con sus respectivos sustratos. Las actividades de luciferasa se normalizan frente a la β-galactosidasa para obtener una actividad de luciferasa relativa.

## 8. Análisis de Proteínas por Western Blotting.

Para la obtención de lisados celulares, una vez recogidas y lavadas las células, se lisan en el buffer de lisis (50mM Tris-Cl pH=7.4; 150mM NaCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM EGTA; 10% Glicerol; 0,1% NP-40) al que se le añaden los inhibidores de proteasas y fosfatasas (NaF 1M; Ortovanadato de sodio 1M; DTT 100mM; Aprotinina 5mg/ml; Leupeptina 5mg/ml; PMSF (fluoruro de fenilmetanosulfonilo) 100mM;  $\beta$ -glicerofosfato 1M). Los precipitados celulares se resuspenden , en un volumen de tampón entorno a 100 $\mu$ l-300 $\mu$ l en función del tamaño de los mismos y se dejan lisando en hielo durante aproximadamente 20 minutos. A continuación se centrifugan (1500rpm durante 20min a 4°C) y el sobrenadante, que contiene el extracto total de proteínas, se traspasa a un eppendorf limpio. Se puede almacenar a -80°C hasta el momento de su uso. La cuantificación de la concentración de proteína se determina por BCA, siguiendo las instrucciones del fabricante, en placas multipocillo de 96 en el sistema lector de absorbancia Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, Inc). Las muestras de proteína (cantidad variable entre 10 $\mu$ g-50 $\mu$ g) se calientan a 95°C durante 5 minutos para su desnaturalización en tampón de carga con DTT. Se resuelven por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) de un porcentaje de acrilamida adecuado para la correcta migración de la proteína a analizar (8%-15%). La electroforesis se realiza en las condiciones de 120V y 300mA, en una cubeta (BioRad) empleando un tampón de electroforesis TRIS-Glicina (2,5 mM Tris, 19,2 mM glicina, 0,1% SDS). Seguidamente, las proteínas se transfieren a una membrana *Amersham Hyband* PVDF de 0,45 $\mu$ m de poro (GE Healthcare, Life Sciences) durante 50 minutos a 360mA en la misma cubeta y en frío. Como tampón de transferencia se emplea 2,5 mM Tris, 19,2 mM glicina y 20% MeOH. Finalizada la transferencia, se hacen tres lavados de 5 minutos con agua destilada de la membrana en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, se incuba la membrana durante 1 hora con solución de bloqueo (2mg/ml i-block y 0,1%

TWEEN20 (v/v) en PBS) en agitación y a temperatura ambiente para bloquear las proteínas que no interesan y seguidamente comienza la incubación con el anticuerpo primario. El anticuerpo primario va diluido en solución de bloqueo, y la incubación se lleva a cabo durante 12-14 horas a 4°C en agitación. Finalizada la incubación, se retira el anticuerpo primario y la membrana se lava tres veces con TBST (50mM Tris, 150mM NaCl y 0,1% Tween 20) durante 10 minutos cada lavado y comienza la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios se utilizan diluidos 1:10000 en solución de bloqueo.

El anticuerpo unido se detectó mediante un ensayo de quimioluminiscencia, utilizando como sustrato SuperSignal® West Dura, en un sistema fotográfico *Image Quant LAS4000* (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, Reino Unido). Los anticuerpos empleados en los estudios se muestran a continuación, **tablas 4 y 5**.

Nombre Anticuerpo	Especie	Casa comercial	Referencia	Anfitrión	Grado de especificidad
Anti ALFA-Tubulina		Santa Cruz Biotechnology	Sc-23948	Ratón	Monoclonal
Anti ERK2 (C-14)	Humano, Ratón, Rata	Santa Cruz Biotechnology	Sc-154	Conejo	Policlonal
Anti FANCA (ab506)	Humano	AbCam	Ab5063-100	Conejo	Policlonal
Anti FANCD2	Humano	Santa Cruz Biotechnology	Sc-20022	Ratón	Monoclonal
Anti FLAG (FG4R)	Humano	Invitrogen	Ma1-91878	Ratón	Monoclonal
Anti GAPDH	Humano	Santa Cruz Biotechnology	Sc-47724	Ratón	Monoclonal
Anti HA-probe (12CA5)	-	Santa Cruz Biotechnology	Sc-57592	Ratón	Monoclonal

Nombre Anticuerpo	Especie	Casa comercial	Referencia	Anfitrión	Grado de especificidad
Anti NEDD8 (Y297)	Humano, Ratón, Rata	AbCam	Ab81264	Conejo	Monoclonal
Anti NUB1 (F-10)	Humano, Ratón, Rata	Santa Cruz Biotechnology	Sc-377003	Ratón	Monoclonal
Anti p53 (FL-393)	Humano	Santa Cruz Biotechnology	Sc-6243	Conejo	Policlonal
Anti PARP (H-250)	Humano	Santa Cruz Biotechnology	Sc-7150	Conejo	Policlonal
Anti Ubiquitina (FL-76)	-	Santa Cruz Biotechnology	Sc-9133	Conejo	Policlonal

**Tabla 4: Listado de los anticuerpos primarios empleados.**

Nombre Anticuerpo	Especie	Casa Comercial	Referencia	Anfitrión	Grado de especificidad
Anti Rabbit IgG-HRP	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2357	Ratón	Monoclonal
Anti Goat IgG-HRP	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2768	Conejo	Monoclonal
m-IgGκ BP-HRP	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	Sc-516102	-	Monoclonal
Anti Mouse IgG H&L (FITC)	Ratón	AbCam	Ab6785	Cabra	Monoclonal

**Tabla 5: Listado de los anticuerpos secundarios utilizados.**

Las membranas se pueden volver a incubar con nuevos anticuerpos eliminando primero los anteriores. Para ello, finalizado el revelado hay que lavar bien la membrana con TBST y aclarar con agua destilada. A continuación, se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente en *buffer de stripping* (Glicina 200mM pH 2,8; EGTA 1mM; 0,1% SDS). Transcurridos los 60 minutos, se lava la membrana con agua destilada y TBST. A partir de este momento se bloquea la membrana de nuevo y podría comenzar una nueva incubación con otro anticuerpo primario.

## 9. Inmunofluorescencia de p53.

Las células HEK293T se cultivan en cubreobjetos hasta un 60-70% de confluencia. Una vez transfectadas con los plásmidos de interés se fijan en p-formaldehído al 4% durante unos 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente comienzan 3 lavados con PBS1X de 5 minutos cada uno, para eliminar el formaldehído, ya que posee cierta fluorescencia. Terminados los lavados, se permeabilizan con Triton X-100 al 0,5% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la permeabilización, se lavan los cristales dos veces con PBS1X y un último lavado de 5 minutos con PBS-TWEEN20 0,05%. A continuación, se incuban durante la noche a 4°C con un anticuerpo anti-p53 (FL-393). Después de un lavado prolongado al día siguiente, la detección se llevó a cabo con un anticuerpo secundario conjugado con FITC. La incubación con el anticuerpo secundario se realiza durante 45 minutos a temperatura ambiente y preservando las muestras de la luz. Después de 3 lavados en PBS1X, los cubreobjetos se montan utilizando un medio de montaje VectaShield con DAPI.

## 10. Producción de virus e Infección lentiviral.

Para mejorar la eficiencia de transfección de FANCA en células B-LLC y en una línea celular linfoblastoide, las células fueron infectadas con partículas lentivirales empaquetadas en células HEK293T. Para la producción de las partículas virales, las células HEK293T ( $1 \times 10^6$ ) se cultivaron en medio DMEM completo hasta un 60%-70% de confluencia, aproximadamente, en frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> (T<sub>25</sub>), y se transfectaron por el método del fosfato cálcico con una mezcla de plásmidos diferentes: tres vectores que codifican para la envuelta proteica del virus y la transcriptasa reversa (pRSV-Rev, pMDLg/pRRE y pCMV-VSV-G) y un vector viral de expresión para el gen deseado (FANCA (S11FAIEG), MDM2 (PLKO-CMV MDM2) o el correspondiente control (PLKO Cyan)). El plásmido de expresión para FANCA contiene el gen que codifica para la proteína GFP (*Green Fluorescence Protein*), mientras que el vector vacío utilizado contiene una modificación de dicho gen que varía su espectro de emisión fluorescente (Cyan). Tras la transfección, las células se incubaron durante 16 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se recogieron los sobrenadantes con las partículas lentivirales y las células HEK293T se procesaron para evaluar la eficiencia de transfección mediante la expresión de GFP y Cyan por citometría, en la Unidad de Citometría del Servicio de Hematología del HUMV. La infección de las células B se llevó a cabo en tubos Falcon de 15ml (FALCON) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 12-16 horas. Para ello, las células se cultivaron con los sobrenadantes correspondientes (500µl), filtrados previamente, en filtros de 32 µm de diámetro (Life Science), en un tubo por cada tipo de partícula viral. Pasado el tiempo de infección, el sobrenadante fue eliminado y las células se pusieron en cultivo con medio RPMI completo fresco, junto con un el reactivo CFSE para llevar a cabo el ensayo de proliferación celular en placas de 6 pocillos (Thermo Fischer).

## 11. Ensayos de proliferación celular.

La proliferación celular se midió utilizando el kit de proliferación de células *CellTrace™ Far Red*, para citometría de flujo. El método está optimizado para monitorizar la proliferación de linfocitos B. El reactivo se prepara según las instrucciones del fabricante. Se disuelve en DMSO a una concentración de stock de 1mM, mientras que la concentración de trabajo será de 1μM, suficiente para reconocer en torno a 5 generaciones. Se emplea una concentración celular de 10<sup>6</sup> células /ml. Cuando las células se incuban con el reactivo CFSE (éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína) para llevar a cabo el ensayo, se dejan crecer en una atmósfera humidificada durante 72 horas. En ese tiempo, el tinte se distribuye entre las dos células hijas en cada división y su fluorescencia se reduce a la mitad. La intensidad de fluorescencia de las diferentes generaciones de células se midió con un citómetro (NAVIOS 3-L, Beckman Coulter).

## 12. Estudio del neddiloma.

El método descrito por Xu et al. (376) se ha convertido en referencia para el estudio de las alteraciones en las modificaciones postraduccionales. De hecho, las compañías de biotecnología como Cell Signaling Technology ofrecen en la actualidad un servicio basado en él, llamado UbiScan, para la elaboración de perfiles de modificaciones postraduccionales en diferentes tejidos. Nuestro laboratorio ha llevado a cabo un estudio global de modificaciones postraduccionales en células B primarias obtenidas de pacientes con LLC, empleando esta plataforma (*Ubiscan de Cell Signaling Technology*). La técnica consiste en lo siguiente; Se obtuvo un extracto total de proteínas de dos pacientes de LLC seleccionados por sus características clínicas. Dicho extracto fue digerido con la

endopeptidasa tripsina, que corta las proteínas en el extremo C-terminal de los residuos de lisina (K) o arginina (R). Dado que la ubiquitina, NEDD8 e ISG15 se unen a la lisina de las proteínas diana a través de una secuencia de dos glicinas seguidas de una arginina, la digestión con tripsina deja un remanente de Diglicina (GG) unido a la lisina diana. Esta diglicina es reconocida por el anticuerpo específico UbiScan, cuya patente posee *Cell Signaling*. Después del enriquecimiento por inmunofinidad de los péptidos que contienen este remanente GG, se procedió a la identificación de los mismos por espectrometría de masas.



**IV.**

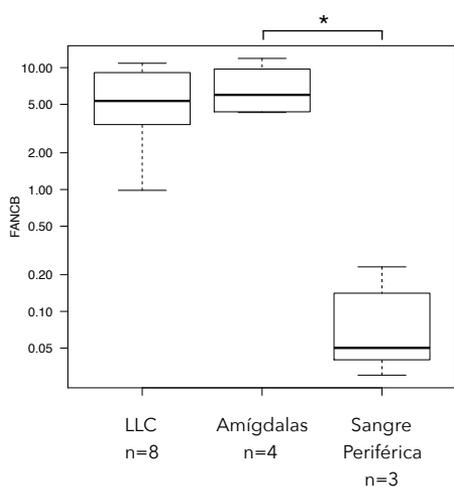
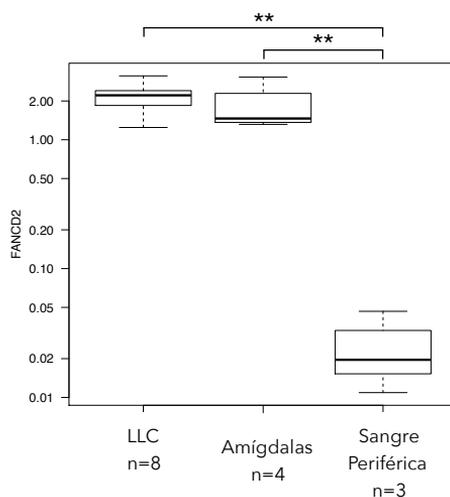
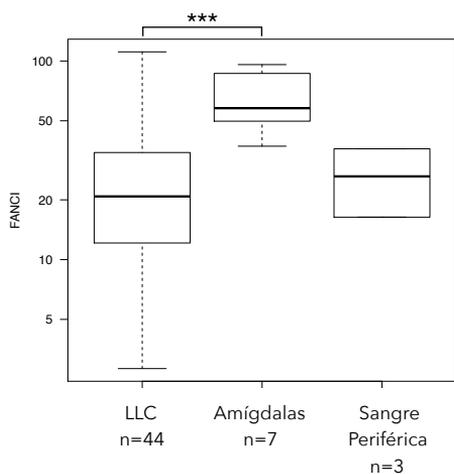
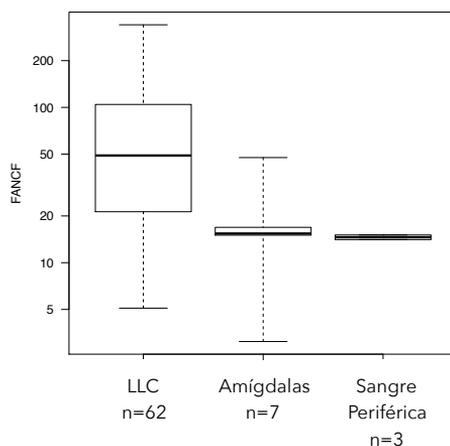
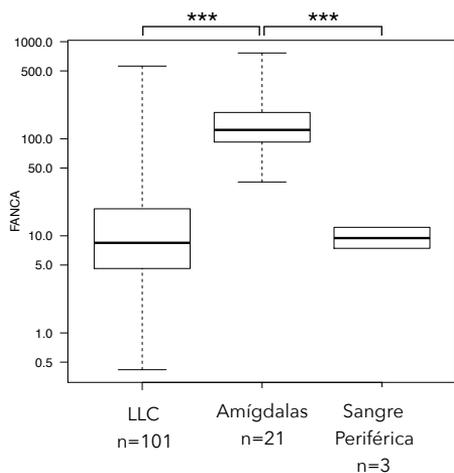
**RESULTADOS.**



## 1. Función que desempeña el gen FANCA en la LLC.

### 1.1. Expresión de genes FANC en muestras de LLC.

Ya que las proteínas FANC se relacionan con la reparación del ADN y el control tanto del ciclo celular como de la apoptosis (316), se investigó su papel en la deficiencia de muerte celular programada que presentan las células B-LLC. Para ello, se llevó a cabo un estudio de la expresión de 5 genes FANC: FANCA, FANCB, FANCF, FANCI y FANCD2, en células B de sangre periférica obtenidas a partir de pacientes afectados de LLC. Como control se utilizaron dos fuentes diferentes de células B: células B periféricas CD19+ obtenidas de capas leucocíticas (*buffy coats*) de donantes sanos, y células B obtenidas de amígdalas resecadas. En la **figura 16** se representa la expresión de los genes FANC en las muestras analizadas provenientes de las diferentes fuentes. De forma general, se pudo observar que la expresión de los diferentes genes en la LLC fue baja y bastante similar a la de sus homólogos de control de sangre periférica. Sin embargo, la expresión de FANCA y FANCI en las amígdalas fue mayor que en la sangre periférica, tanto en las muestras afectadas de LLC como en los controles ( $p < 0.001$ ). Estos datos sugieren que puede existir una asociación entre la expresión de estos dos genes y la interacción de las células B con el estroma de los órganos linfoides, un factor de supervivencia conocido para las células B-LLC (200).



**Figura 16: Diferencias en la expresión de genes FANCA, analizados por qPCR, entre pacientes con LLC y células B CD19+ de control, obtenidas a partir de amígdalas resecadas o sangre periférica de donantes sanos.** Los diagramas de cajas representan la expresión de cada gen FANCA en relación con la expresión del gen de control GAPDH. Se ha utilizado un eje logarítmico para representar todos los genes FANCA. El rango de bigotes representa el mínimo y el máximo. Las diferencias entre la expresión génica y las muestras se ha calculado utilizando la prueba de ANOVA \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

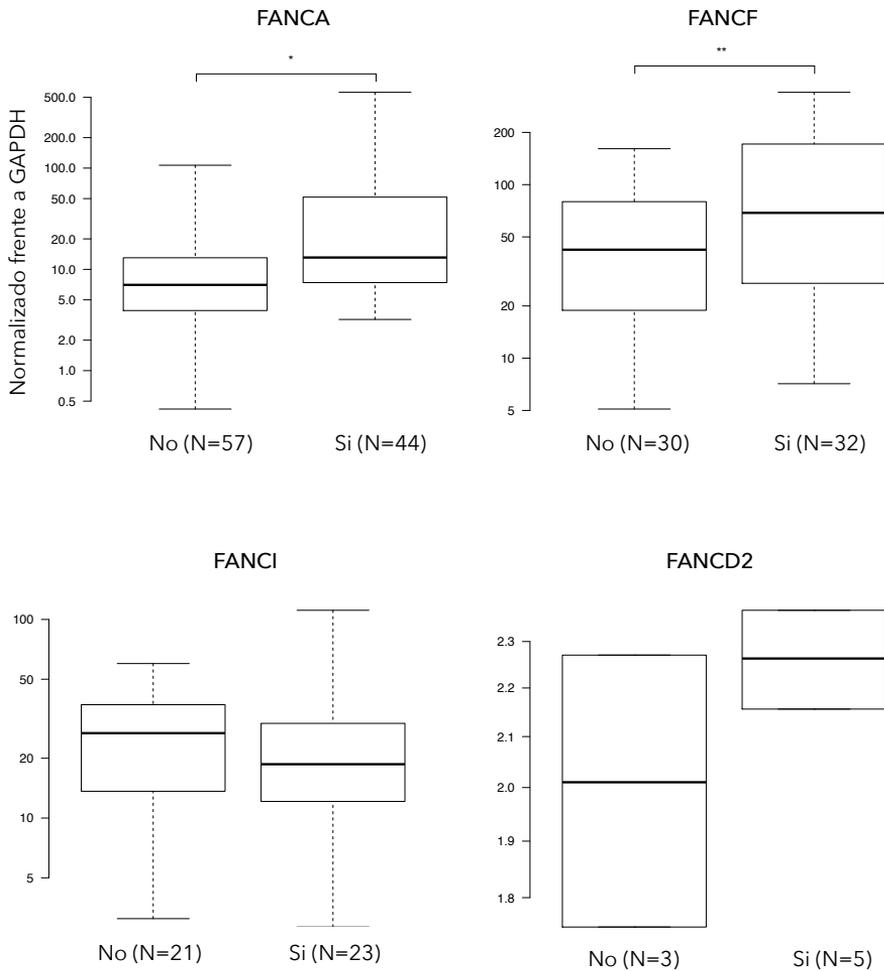
## 1.2. Asociación estadística entre la sobreexpresión de FANCA y un peor pronóstico clínico en pacientes con LLC.

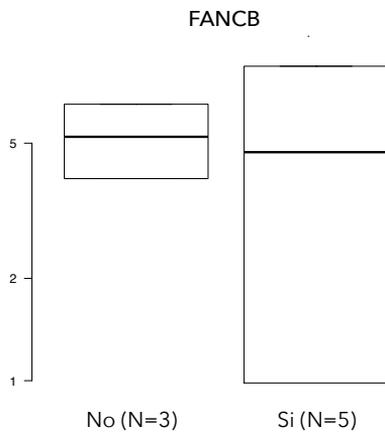
Entre las muestras analizadas, se observó un cierto número de pacientes de LLC con una elevada expresión de FANCA, más similar a la encontrada en linfocitos B obtenidos de amígdalas (**figura 16**), por lo que se quiso investigar si este hecho podría asociarse con manifestaciones clínicas específicas de esos pacientes. Para ello, se llevaron a cabo estudios citogenéticos, mostrados en la **tabla 6**, observándose que la sobreexpresión de FANCA estaba relacionada estadísticamente con el sexo masculino ( $p = 0.028$ ), y la delección 11q23 ( $p = 0.022$ ).

	FANCA bajo (N=79)	FANCA alto (N=22)	P-valor
Género, Masculino, n(%)	44 (55.7%)	18 (81.8%)	0.028
Edad, años, media	65.7	64.8	0.786
Estadio de Rai, II-IV	4 (5.1%)	3 (13.6%)	0.236
Estadio de Binet, B or C	7 (8.9%)	5 (22.7%)	0.118
Análisis citogenético disponible	60 (75.9%)	17 (77.3%)	0.897
- FISH anormal	36 (60.0%)	9 (52.9%)	0.143
- Delección 13q14	18 (30.0%)	4 (23.5%)	0.602
- Trisomía del 12	15 (25%)	2 (11.8%)	0.245
- Delección 11q23	4 (6.7%)	5 (29.4%)	0.022
- Delección 17p13	3 (5.0%)	1 (5.9%)	0.885

**Tabla 6: Diferencias en las características clínicas y citogenéticas de los pacientes estudiados, en relación con su nivel de expresión de FANCA.** Se considera un valor relativo de expresión de ARNm FANCA/GAPDH de 21,5, como el límite para definir la expresión de FANCA alta o baja. El análisis estadístico se ha llevado a cabo utilizando la prueba *Chi2* y la prueba *T de Student* no pareada (para muestras independientes).

También se llevó a cabo el análisis de la expresión de los diferentes genes FANC en las muestras LLC de pacientes en progresión, en comparación con aquellos que mostraban una patología estable. Lo que observamos fue una asociación estadísticamente significativa entre los niveles elevados de expresión de los genes FANCA y FANCF y la progresión de la enfermedad, como se observa en la **figura 17**.

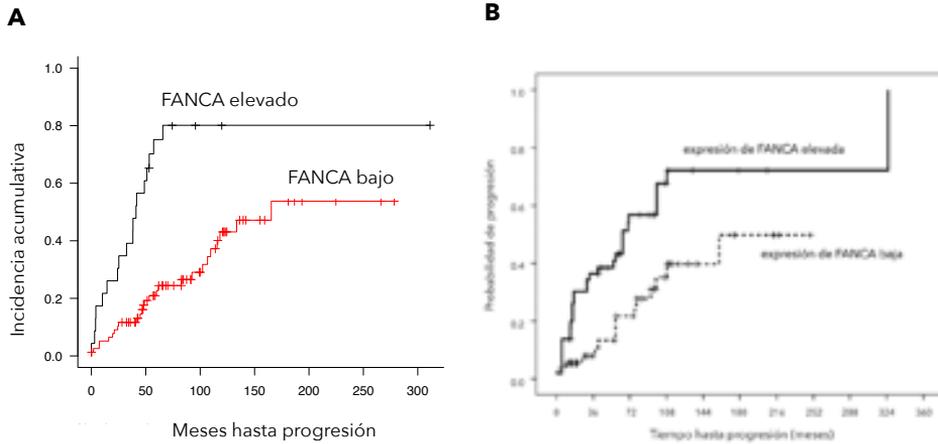




**Figura 17: Análisis de la expresión de los genes FANCA, FANCF, FANCI, FANCD2 y FANCB mediante qPCR en muestras de LLC, de acuerdo con el nivel de progresión de la enfermedad.**

Los diagramas de caja representan la expresión de cada gen FANC en relación con la expresión del gen control GAPDH. Se ha utilizado un eje logarítmico para representar todos los genes FANC excepto FANCD2. El rango de bigotes representa el mínimo y el máximo. Las diferencias entre la expresión génica y la progresión de la enfermedad se han calculado utilizando la prueba T de Student no pareada. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

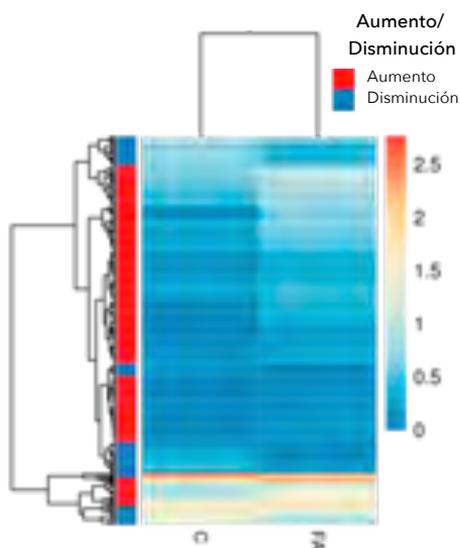
La probabilidad de progresión fue más corta en pacientes con elevados niveles de expresión de FANCA, concretamente de 82,7 meses [Intervalo de confianza del 95%: 51.03-NA] , frente a 165,4 meses [Intervalo de confianza del 95%: 118.2-NA]; ( $p = 0,012$ ) (**figura 18A**). Esta observación se confirmó en una cohorte independiente de pacientes con LLC, como se muestra en la **figura 18B**. Todos estos datos apoyan la sobreexpresión de FANCA como un marcador de mal pronóstico en la LLC.



**Figura 18: Probabilidad de progresión en función del nivel de expresión de FANCA en pacientes con LLC.** (A) La progresión se ha definido como el intervalo entre el diagnóstico y el primer signo de enfermedad activa. La probabilidad de progresión se ha calculado utilizando la incidencia acumulada de la recurrencia de eventos competitivos y la prueba de rango logarítmico. Se considera un valor relativo de expresión de ARNm FANCA/GAPDH de 21,5, como el límite para definir la expresión de FANCA alta o baja. (B) Supervivencia libre de progresión en una segunda cohorte de pacientes con LLC. Un valor de expresión de ARNm de FANCA/GAPDH relativo de 40 se considera el límite entre los niveles de expresión de FANCA altos y bajos.

### 1.3. La sobreexpresión de FANCA en las células de la LLC altera la expresión de muchos genes de supervivencia celular.

Para investigar el mecanismo que subyace al peor pronóstico de los pacientes con elevada expresión de FANCA, se reforzó la expresión de este gen en células B obtenidas de pacientes con LLC. Para ello, se transfectaron estas células mediante electroporación con un vector de expresión para FANCA, y se analizaron los cambios en la expresión génica mediante secuenciación del ARN (RNAseq). Tras el análisis de los datos, se detectaron cambios significativos en la acumulación de 265 ARNm, de los cuales, 199 se encontraban regulados positivamente y 66 regulados negativamente (**figura 19**).



**Figura 19: Alteración de la expresión génica inducida por FANCA.** El *heatmap* representa los genes expresados diferencialmente (DEG) en una muestra del paciente LLC362, tranfectada con un vector vacío (C), o con un vector de expresión para FANCA (FA). El eje x representa estas 2 condiciones. El eje y representa los DEGs. La escala de colores representa el nivel de expresión del gen transformado  $\log_{10}$  veces en cada condición. La barra de la izquierda indica la variación cuando se transfecta FANCA: el color azul representa un aumento, mientras que el color rojo indica una reducción en la expresión del ARNm del gen correspondiente.

El análisis bioestadístico de estos genes expresados diferencialmente, reveló que muchos de los genes clasificados como reguladores negativos de la muerte celular estaban regulados positivamente cuando se sobreexpresaba FANCA (<http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0060548>) (**tabla 7**).

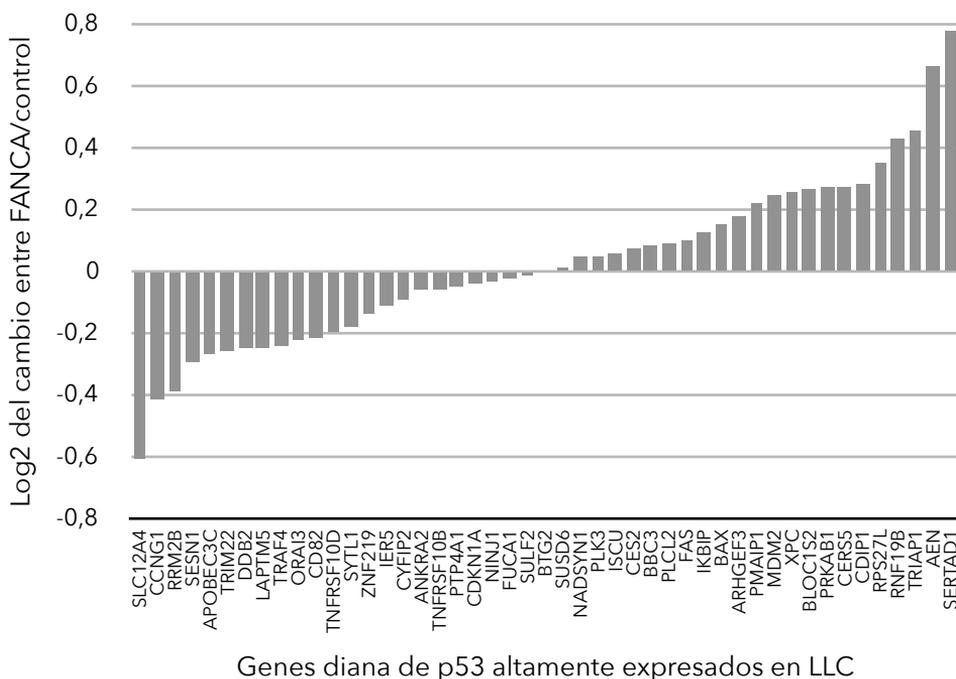
Análisis Ontológico / ID	Nombre	Variación	Inducción
<b>Muerte Celular</b>			
2919	CXCL1	Aumento	2,5
2920	CXCL2	Aumento	1,6
54210	TREM1	Aumento	2,3
6364	CCL20	Aumento	1,3
2921	CXCL3	Aumento	1,8
3576	CXCL8	Aumento	1,3
22914	KLRK1	Aumento	1,8
5473	PPBP	Aumento	1,1
<b>Regulación negativa de la muerte celular</b>			
4318	MMP9	Aumento	2,9

64919	BCL11B	Aumento	2,2
2207	FCER1G	Aumento	1,5
2247	FGF2	Aumento	2,3
6347	CCL2	Aumento	3,2
5329	PLAUR	Aumento	2,3
5166	PDK4	Aumento	1,7
1270	CNTF	Aumento	5,9
1718	DHCR24	Aumento	4,8
8877	SPHK1	Aumento	1,1
6352	CCL5	Aumento	1,1
5055	SERPINB2	Aumento	1,6
8870	IER3	Aumento	1,2
3620	IDO1	Aumento	1,4
1440	CSF3	Aumento	1,3
3491	CYR61	Aumento	4,5
3569	IL6	Aumento	1,3
BGI_novel_G000202	NA	Aumento	8,4
6653	SORL1	Aumento	1,1
2776	GNAQ	Aumento	4,2
2821	GPI	Disminución	-1,1
1191	CLU	Aumento	4,5
4233	MET	Aumento	1,5
3875	KRT18	Aumento	1,4
101	ADAM8	Disminución	-1,1

**Tabla 7: Genes expresados diferencialmente en células B-LLC que sobreexpresan FANCA, relacionados con la regulación negativa de la muerte celular.** Análisis ontológico de los genes expresados diferencialmente inducidos por la sobreexpresión de FANCA. Se muestran dos categorías de la base de datos AmiGo 2 (<http://amigo.geneontology.org>) relacionadas con la inhibición de la muerte celular y la variación de veces en la expresión del ARNm de los genes que se encuentran por debajo.

#### 1.4. La sobreexpresión de FANCA en células de LLC afecta la expresión de las dianas de p53, p21 y $\Delta$ Np73.

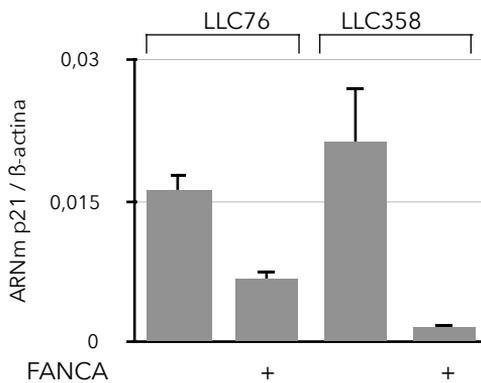
Está descrito que las células que carecen de una ruta FA-BRCA funcional (343) presentan una activación excesiva de p53, junto con una elevada apoptosis. Por esta razón, nos centramos en analizar la expresión de diferentes genes diana de p53 en células B-LLC que sobreexpresan FANCA. Para ello, comparamos los genes que se encontraron diferencialmente expresados en nuestro RNAseq, con la lista de 116 genes diana de p53 descritos como activados en al menos 6 de los 16 conjuntos de datos, obtenidos de estudios de genes regulados por p53 (344). La **figura 20** muestra cómo la sobreexpresión de FANCA afecta a la acumulación de los genes diana de p53 más expresados en las muestras de LLC analizadas.



**Figura 20: Variación en la expresión de genes diana de p53 inducida por FANCA.** Análisis de la expresión de ARNm de los genes diana de p53 más expresados en LLC, inducida por FANCA.

A partir de estos datos, para poder obtener una información más detallada del efecto que ejerce FANCA sobre la regulación transcripcional por p53, se realizaron experimentos in vitro con dianas bien conocidas de p53.

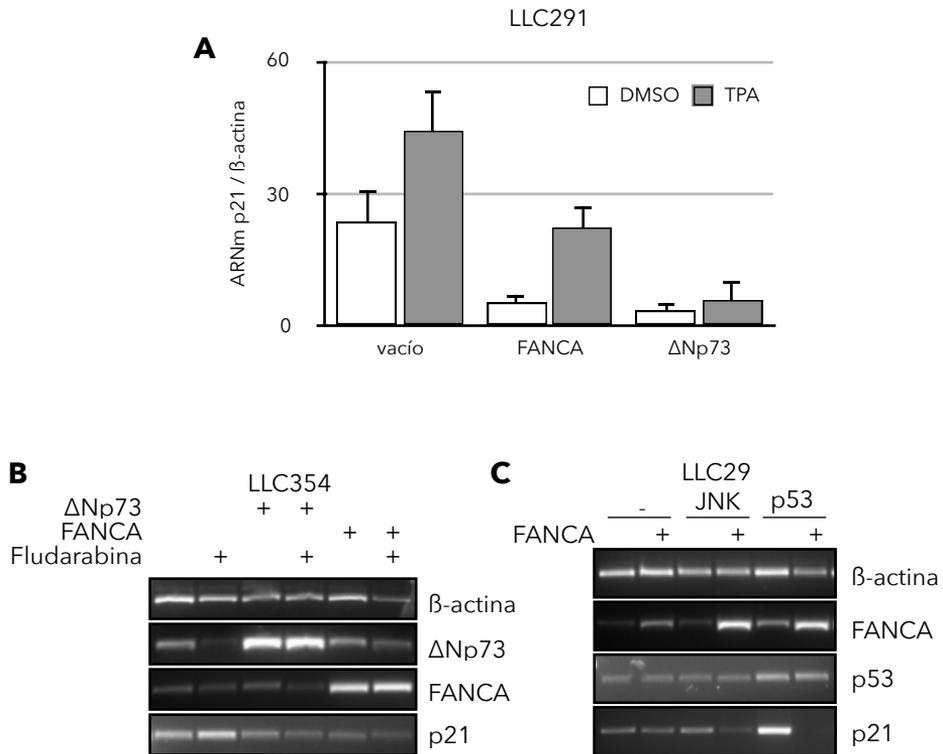
En nuestro análisis RNAseq encontramos que p21, una proteína que interactúa con CDK (CDKN1A) y diana de p53, mostraba una expresión reducida de ARNm, de unas 20,95 veces, tras la transfección con el vector de expresión para FANCA. Quisimos confirmar este resultado empleando otras muestras de células B-LLC primarias, y aunque con variaciones entre los pacientes analizados, pudimos observar una reducción en el nivel basal de expresión del ARNm de p21 en células B-LLC transfectadas con un plásmido de expresión para FANCA (**figura 21**).



**Figura 21: La sobreexpresión de FANCA altera la expresión del ARNm de p21.** Análisis cuantitativo por RT-PCR de muestras de ARN extraídas de dos pacientes LLC diferentes, transfectadas con un plásmido de expresión para FANCA o un vector vacío como control.

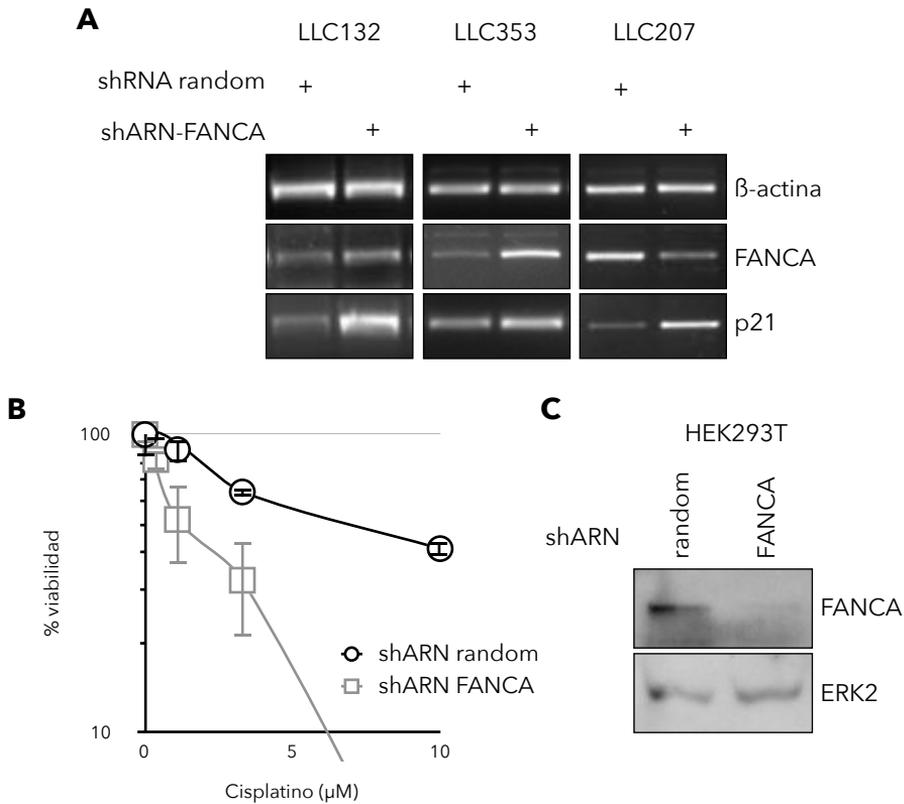
Por otro lado, analizamos cómo afectaba la sobreexpresión de FANCA a la inducción de p21 con ésteres de forbol (como 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato, TPA) o con el fármaco fludarabina en células B-LLC. Observamos que las células transfectadas con un vector de expresión de FANCA no acumulaban el mensajero de p21 de igual manera que las transfectadas con un vector vacío, lo que apoya la idea de que FANCA bloquea la expresión de p21 (**figuras 22A y 22B**). El efecto que se observa sobre p21 es comparable al observado sobre

$\Delta$ Np73, otra diana conocida de p53 (**figuras 22A y 22B**). Más aún, FANCA bloqueó la inducción de p21 mediada por la sobreexpresión de p53, hecho que confirma que FANCA interfiere con su función (**figura 22C**).



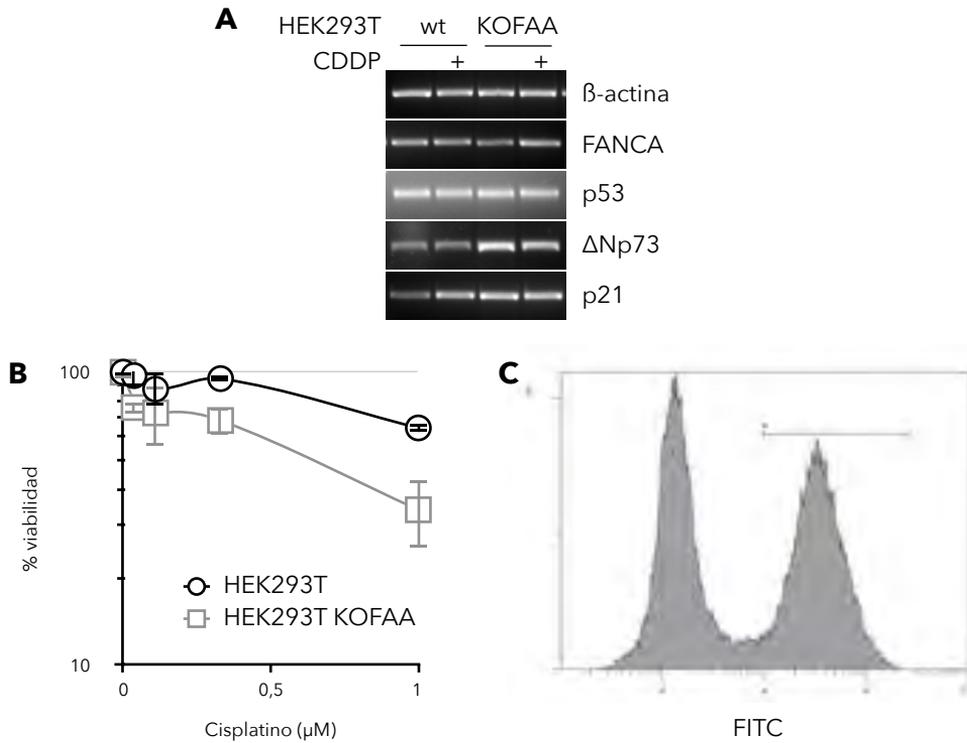
**Figura 22: La sobreexpresión de FANCA altera la expresión del ARNm de dianas de p53 como p21 y  $\Delta$ Np73 $\alpha$ .** (A) Análisis de la acumulación de ARNm de p21 en relación con la expresión de ARNm de  $\beta$ -actina, gen utilizado como control, en una muestra de LLC transfectada con vectores de expresión para FANCA o  $\Delta$ Np73 $\alpha$ , tratada con TPA 25nM cuando se indique. Se representa el valor medio  $\pm$  la desviación estándar de tres determinaciones independientes. (B) Análisis por RT-PCR de la inducción del ARNm de p21 por fludarabina 5 $\mu$ M en una muestra de LLC transfectada con vectores de expresión para FANCA,  $\Delta$ Np73 $\alpha$  o un vector vacío como control. (C) Efecto de la sobreexpresión de FANCA sobre la acumulación del ARNm de p21, activado por la quinasa c-jun N-terminal (JNK) o por p53, en una muestra de LLC.

Por el contrario, cuando se interfirió la expresión de FANCA con construcciones de tipo *small hairpin-RNA* (shRNA) de FANCA en células B-LLC (**figuras 23B y 23C**), se pudo observar un aumento en la expresión del ARNm de p21, como se observa en la **figura 23A**.



**Figura 23: El silenciamiento de la expresión de FANCA favorece la expresión del ARNm de p21.** (A) Interferir la expresión de FANCA aumenta la acumulación de ARNm de p21. Se analiza la expresión de ARNm de p21 en tres muestras de LLC transfectadas con una construcción shARN para silenciar la expresión de FANCA o un plásmido de secuencia aleatoria como control. Las figuras B y C muestran la eficacia de los procedimientos empleados para silenciar FANCA. (B) Ensayo de viabilidad celular (XTT) en respuesta a concentraciones crecientes de cis-platino. Las células MCF7 transfectadas con construcciones de shARN para FANCA o una secuencia aleatoria como control, se incubaron en presencia de las concentraciones indicadas de cis-platino durante 70 horas en una placa de 96 pocillos. (C) Análisis por *Western Blotting* de los extractos de proteínas obtenidos a partir de células HEK293T transfectadas con un vector de expresión para FANCA y una construcción shARN FANCA o una secuencia aleatoria como control. Se muestra la expresión de ERK2 como control.

De la misma manera, células HEK293T con una mutación inactivadora de FANCA (**figuras 24B y 24C**) generada mediante CRISPR/Cas9, también mostraron niveles elevados de p21 (**figura 24A**).

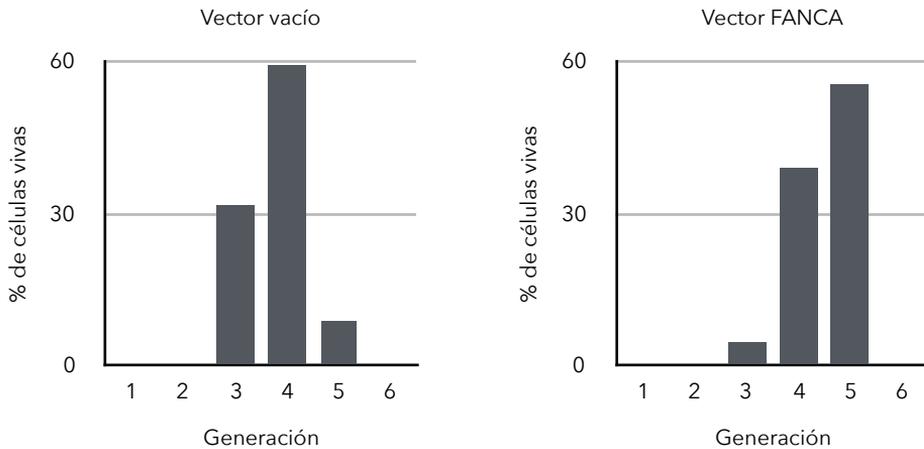


**Figura 24: Una mutación dirigida por CRISPR/Cas9 sobre la proteína FANCA favorece la expresión del ARNm de p21.** (A) Análisis de la expresión de p21 y ΔNp73 basal e inducida por cis-platino (CDDP) en células HEK293T que presentan una mutación dirigida por CRISPR/Cas9 de FANCA (KOFAA), en comparación con células HEK293T wt. Las imágenes B y C muestran la eficacia de los procedimientos empleados para interferir la función de FANCA. Las células HEK293T se han transfectado con una construcción de ARN guía de Cas9 junto con un plásmido donante que genera una inserción dirigida del ORF de la proteína fluorescente GFP en el tercer exón del gen FANCA. (B) Ensayo de viabilidad celular (XTT) en respuesta a concentraciones crecientes de cis-platino. Se incuban células HEK293T con la inserción del ORF de GFP en el gen FANCA y células sin transfectar en presencia de las concentraciones indicadas de cis-platino durante 70 horas en una placa de 96 pocillos. (C) Confirmación por citometría de flujo de la inserción del ORF de GFP en el gen FANCA de las células HEK293T mediante la técnica CRIPR/Cas9. Se han seleccionado las proteínas positivas a GFP antes de realizar los experimentos.

Aunque  $\Delta Np73$  puede producirse por *splicing* alternativo, en general se produce por la transcripción a partir de un segundo promotor del gen TP73 alojado en su tercer intrón y que contiene elementos de respuesta a p53. Así, analizamos cómo afectaba la sobreexpresión de FANCA a la expresión del mensajero de  $\Delta Np73$ . Como se muestra en la **figura 27**, las células transfectadas con FANCA mostraron también una reducción en el ARNm de  $\Delta Np73$ , al igual que en el caso de p21, lo que apoya la idea de que FANCA interfiere con la actividad transcripcional de p53.

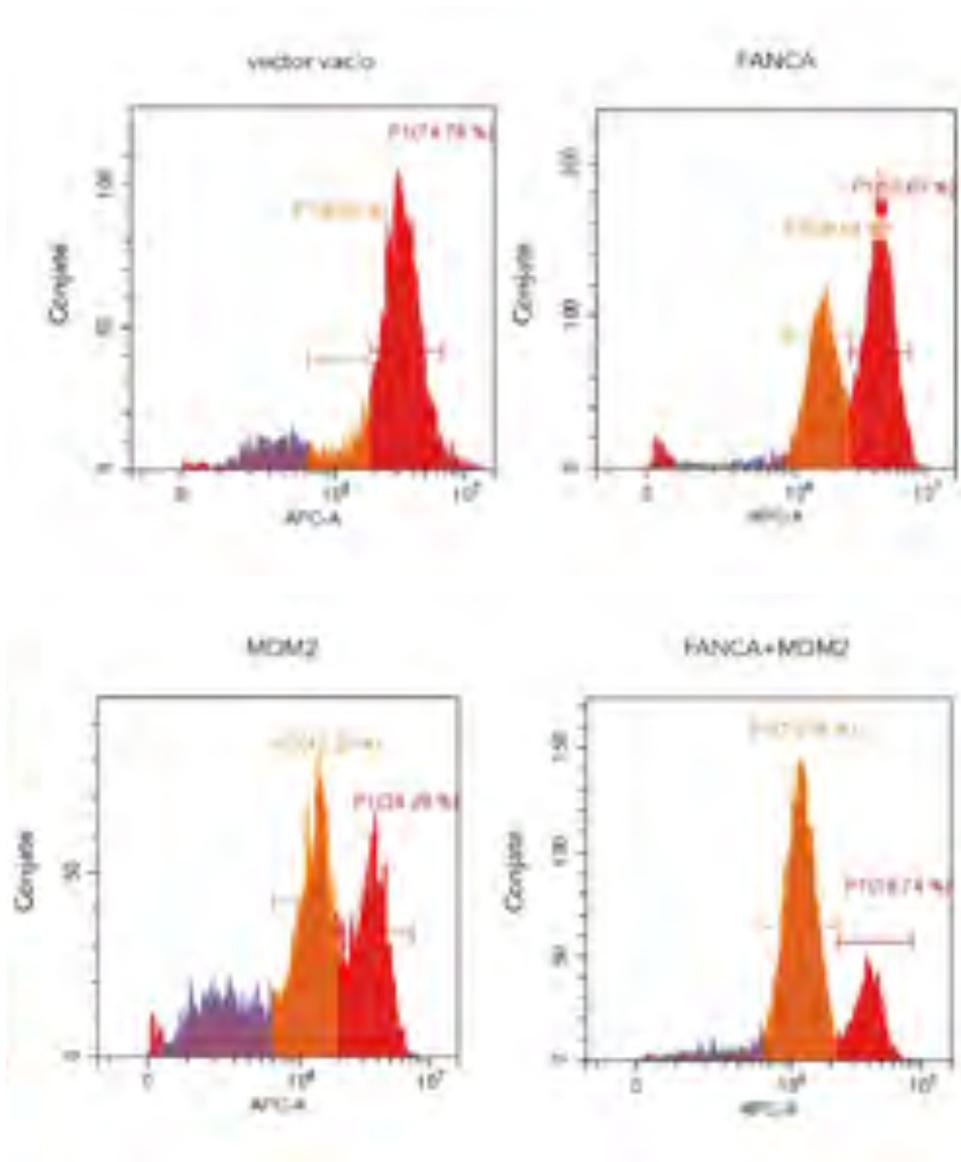
### 1.5 FANCA activa la proliferación celular de los linfocitos B-LLC.

p21 interacciona con la proteína CDK, impidiendo así que el ciclo celular progrese (398) (284). A la vista de nuestros datos, un aumento de la expresión de FANCA levantaría el freno que supone p21 sobre la proliferación celular, lo que explicaría la asociación de la sobreexpresión de FANCA con progresión y peor pronóstico en la LLC. Decidimos estudiar el efecto que un aumento de la expresión de FANCA tiene sobre la proliferación de linfocitos B. Para ello, transdujimos un vector viral de expresión de FANCA en células B linfoblastoides y analizamos el número de generaciones que eran capaces de producir en un determinado período de tiempo, mediante la técnica de tinción fluorescente con CFSE. Como puede verse en la **figura 25**, la transducción de FANCA produjo un aumento de la proliferación, medida como un mayor número de células que alcanzaban generaciones más avanzadas.



**Figura 25: La sobreexpresión de FANCA favorece la proliferación de las células B linfoblásticas.** Análisis de la proliferación de una línea celular linfoblástica con una mutación patológica de FANCA, infectada con un vector lentiviral vacío, o un vector de expresión para FANCA. Se ha medido la proliferación mediante el método CFSE. Se representa el porcentaje de células en cada generación tras un período de incubación de 72 horas.

Quisimos también estudiar el efecto de FANCA en la proliferación de células B-LLC primarias, para lo que las infectamos con un vector viral de expresión de FANCA. Teniendo en cuenta que las células B-LLC no proliferan en cultivo, fuera de los órganos linfoides (200), la transducción de FANCA produjo un aumento de la proliferación de linfocitos B-LLC cultivados ex-vivo. De igual manera, ya que el gen MDM2 es el principal regulador de la estabilidad de p53 y media su ubiquitinación y degradación en el proteosoma (311), decidimos infectar también estas células en combinación con los vectores FANCA y MDM2, observando un aumento de la proliferación celular aún más pronunciado, como se observa en los porcentajes de cuantificación de los picos de fluorescencia en las diferentes generaciones (**figura 26**).



**Figura 26: Efecto de FANCA sobre la proliferación de células B-LLC.** Las células B-LLC se han infectado con un vector lentiviral de expresión de FANCA, un vector lentiviral de expresión de MDM2 o una combinación de ambos como se indica. Se ha medido la proliferación mediante el método CFSE (éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína). En la figura se muestra el porcentaje de células que se encuentran en cada generación cuantificando el pico de fluorescencia.

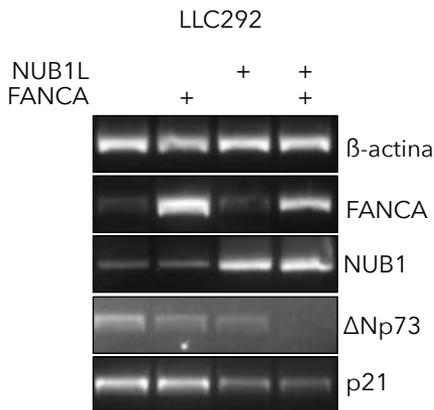
## 2. Relación entre la neddilación y FANCA.

La única función conocida de la proteína FANCA es la que deriva de su participación en un complejo E3 multiprotéico de 8 proteínas (complejo FANCCore) que contiene la E3 RING ligasa FANCL y que, en colaboración con la E2 UBE2T, cataliza la conjugación con un único residuo de ubiquitina de dos proteínas, FANCD2 y FANCI (34) (35) (36). Esta monoubiquitinación permite a estas dos proteínas ser reclutadas a puntos del ADN donde se ha producido una rotura de doble hebra, de manera que participan en su reparación por recombinación homóloga (316). Sin embargo, Renaudin et al. aportaron datos recientemente de otra función de la proteína FANCA fuera del complejo FANCCore, en la neddilación de proteínas de membrana (339). Nos llamó la atención que muchas de las proteínas descritas en su rastreo eran factores pronóstico de la leucemia linfática crónica (CXCR5,  $\beta$ 2-microglobulina y CD44, entre otras). Así, nos propusimos valorar la neddilación como posible mecanismo por el que FANCA estuviese afectando la progresión de la LLC.

### 2.1. FANCA coopera con la proteína NUB1 en la inhibición de p53.

Como se muestra en la página *Entrez Gene* del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), se ha reportado que FANCA es capaz de interactuar en ensayos de dobles híbridos con la proteína NUB1 (*NEDD8 ultimate buster-1*), que es capaz de mediar la degradación de NEDD8 y sus proteínas conjugadas. El hecho de que FANCA pueda interactuar con NUB1 apoya nuestra hipótesis de que FANCA pudiese ejercer su efecto sobre la LLC a través de la modulación de procesos de modificación postraduccional.

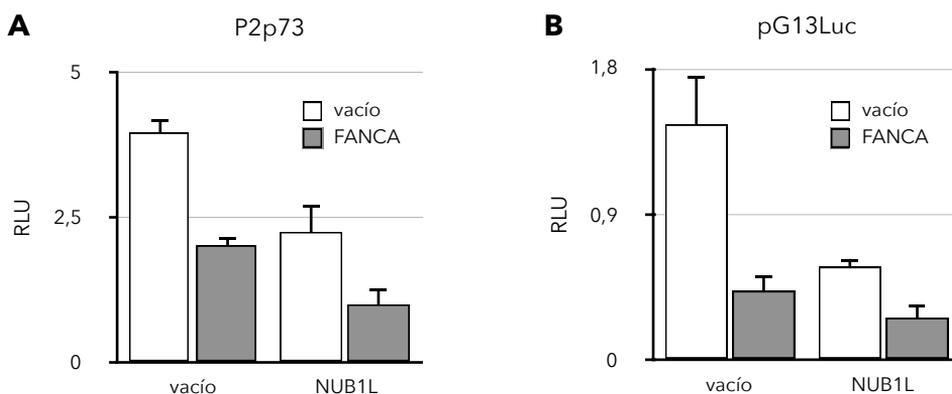
NUB1 reduce la actividad transcripcional de p53 inhibiendo su neddilación (345). p53 se regula vía neddilación y ubiquitinación mediada por MDM2 (65), por lo que nos planteamos si FANCA podría estar modulando la función de p53 a través de un mecanismo relacionado con su estado de neddilación. NUB1 tiene una variante de *splicing*, NUB1L, que contiene 14 aminoácidos extra que codifican un dominio de asociación a ubiquitina (UBA) adicional. Cuando transfectamos NUB1L en células B-LLC primarias, observamos una inhibición de la expresión de los mensajeros de p21 y  $\Delta$ Np73 (**Figura 27**) y que la cotransfección de FANCA atenuaba aún más esa inhibición.



**Figura 27: Las proteínas FANCA y NUB1L cooperan en la inhibición de la función del gen p53.** Análisis por RT-PCR de la expresión del ARNm de p21 y  $\Delta$ Np73 en una muestra de LLC transfectada con vectores de expresión para FANCA, NUB1L o ambos.

Analizamos entonces el efecto de FANCA y NUB1L sobre la activación del promotor de  $\Delta$ Np73 (P2p73). Los ensayos de luciferasa realizados mostraron que tanto FANCA como NUB1L ejercían una acción represiva sobre la actividad basal de p2p73, y se observó una cooperación cuando se transfectaron juntos. El vector testigo P2p73, incluye 1kb de la secuencia promotora de  $\Delta$ Np73, que contiene dos elementos de respuesta a p53, controlando la transcripción del gen luciferasa. Para demostrar la acción inhibitoria de FANCA y NUB1L sobre p53 y no sobre cualquier otro elemento del promotor, empleamos el plásmido pG13Luc, que contiene varios elementos de

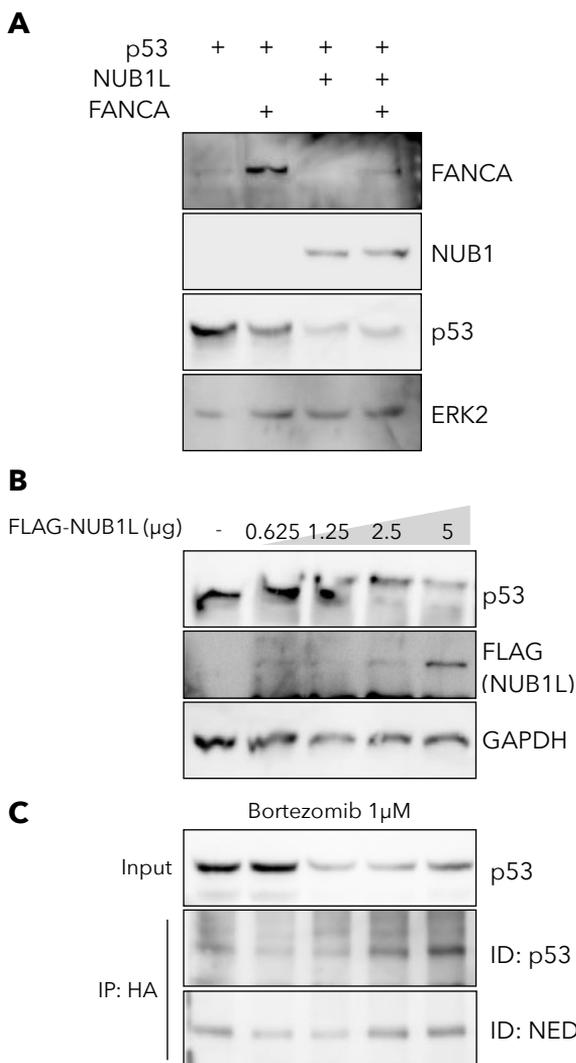
respuesta a p53 en tándem. Mediante un ensayo de luciferasa se observó que la transfección de FANCA, NUB1L o ambos, en células HEK293T inhibían la actividad de la construcción y mostraron de nuevo algún tipo de cooperación (**figuras 28A y 28B**).



**Figura 28: Las proteínas FANCA y NUB1L cooperan en la inhibición de la función del gen p53.** (A y B) Efecto de FANCA y NUB1L sobre la actividad de p53. Se transfectan células HEK293T con vectores de expresión para FANCA y / o NUB1L junto con P2p73 o pG13Luc. Se representan las actividades de luciferasa en relación con la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa transfectada como control interno (unidades de luciferasa relativas)  $\pm$  SD de tres determinaciones independientes.

Dado que está descrito que NUB1 y su isoforma NUB1L disminuyen los niveles de NEDD8 libre no conjugado y de proteínas neddiladas (346), estudiamos la posibilidad de que la inhibición de la función de p53 mediada por FANCA y NUB1L fuese causada por una reducción en los niveles de proteína de p53. El análisis por *Western Blotting* reveló un efecto claro de la sobreexpresión de NUB1L sobre la estabilidad de la proteína p53 (**figura 29A**). El efecto es dependiente de dosis, como puede apreciarse en la (**figura 29B**). Para demostrar que p53 está neddilado en estas circunstancias, transfectamos NEDD8 etiquetado con el epítipo HA junto con p53 e inmunoprecipitamos todas las proteínas conjugadas con HA-NEDD8 con un anticuerpo

específico. Las células fueron tratadas con bortezomib, un inhibidor del proteosoma, para evitar la acción de NUB1L sobre las proteínas neddiladas. Entre estas proteínas resueltas por *Western Blotting* pudimos detectar p53 (**figura 29C**).

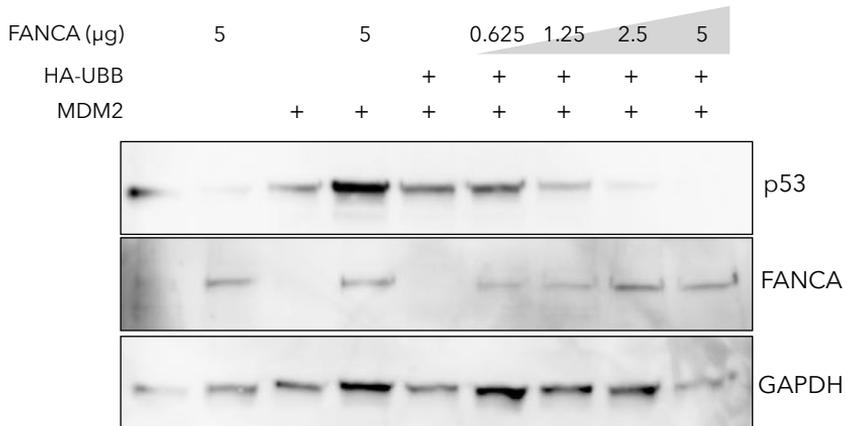


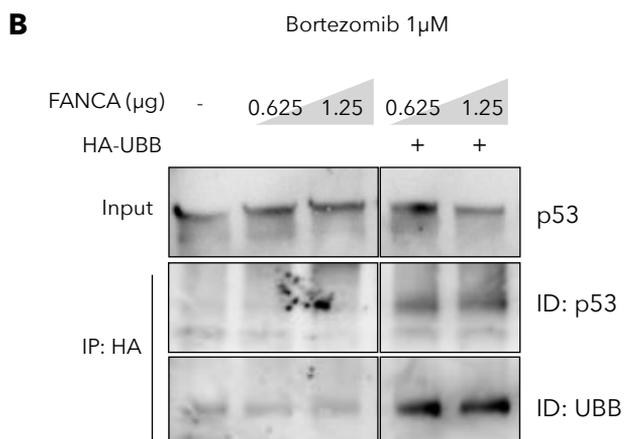
**Figura 29: Las proteínas FANCA y NUB1L cooperan en la inhibición de la función del gen p53.**

(A) Análisis de la estabilidad de la proteína p53 en presencia de FANCA, NUB1L o ambos mediante *Western Blotting*. Como control de carga se emplea la proteína ERK2. Se muestran los datos de un experimento representativo. (B) En la figura se muestra el efecto del aumento de las concentraciones de NUB1L en la estabilidad de p53. (C) La figura muestra las células transfectadas con los mismos vectores de expresión pero tratadas con bortezomib. Los extractos de proteína se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-HA y se resolvieron mediante *Western Blotting*. El primer panel muestra la expresión de p53 antes de la inmunoprecipitación.

Por su parte, FANCA mostraba un efecto discreto sobre la estabilidad de p53 por sí sólo (**figura 29A**). Decidimos investigar si FANCA colaboraba con la ubiquitinación y degradación de p53 mediada por MDM2, observando que la co-expresión de MDM2 y ubiquitina en dosis crecientes de FANCA potenciaba la desestabilización de p53 inducida por FANCA, cuando se cotransfectaron en células HEK293T (**figura 30A**). La disminución de la estabilidad de la proteína p53 observada, se puede correlacionar con el aumento de la proliferación celular medido mediante la técnica de tinción fluorescente CFSE, que se mostraba en la **figura 26**. Para demostrar que MDM2 cataliza la ubiquitinación de p53, cotransfectamos FANCA con una ubiquitina etiquetada con el epítipo HA. La inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-HA arrastró a p53, como puede verse en la **figura 30B**. Dicha cotransfección se acompañó de una disminución de los niveles de p53.

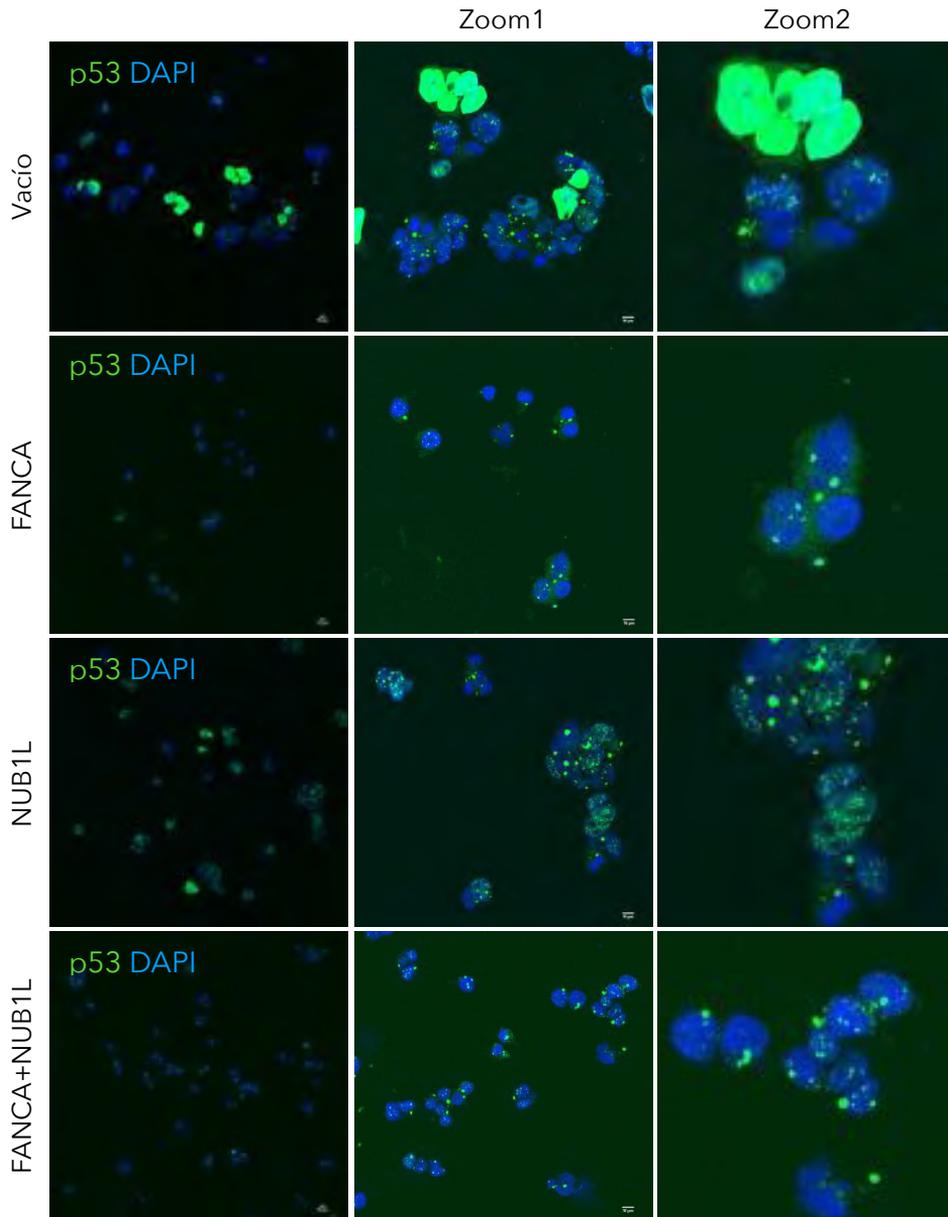
**A**





**Figura 30: Las proteínas FANCA y MDM2 cooperan en la desestabilización de la proteína p53.** (A) Análisis de cómo afectan diferentes concentraciones de FANCA sobre la estabilidad de p53 por *Western Blotting*. Se emplean células HEK293T transfectadas con plásmidos de expresión para FANCA, HA-UBB y MDM2 en las muestras indicadas. (B) Los extractos de las células transfectadas con p53, FANCA, MDM2 y HA-UBB se trataron con bortezomib para bloquear el proteosoma. Los extractos se inmunoprecipitaron con anti-HA y se analizan por *Western Blotting*.

Los datos presentados hasta ahora muestran por primera vez que tanto FANCA como NUB1 median la inestabilidad de p53. Liu et al. habían descrito que NUB1 interfiere con la función de p53 al promover su exportación nuclear (345), por esta razón, estudiamos la localización subcelular de p53 en células que sobreexpresan FANCA. Para ello, transfectamos vectores de expresión para FANCA o NUB1L en células HEK293T y estudiamos la localización subcelular de p53 mediante inmunofluorescencia. Como se muestra en la **figura 31**, p53 muestra una expresión mayoritariamente nuclear cuando se sobreexpresa en células HEK293T. Sin embargo, la cotransfección de FANCA, NUB1L o ambos impulsó una reducción en la señal de p53 detectada por inmunofluorescencia en el núcleo. p53 muestra una localización principalmente citoplasmática tras la transfección de las células con FANCA o NUB1L, lo que sugiere un papel de estas proteínas no sólo en la estabilidad de p53, sino también en su localización subcelular.



**Figura 31: FANCA y NUB1L promueven la localización citoplasmática de p53.** La localización subcelular de p53 se determinó por inmunofluorescencia en células HEK293T transfectadas con un vector de expresión para p53, junto con plásmidos para FANCA, NUB1L o ambos. La proteína p53 se ha detectado con un anticuerpo secundario de fluorescencia FITC (verde), mientras que el ADN se ha teñido con DAPI (azul) para la localización de los núcleos celulares. Cada imagen se muestra con dos aumentos para mayor claridad.

### **3. Estudio de la función de la neddilación en la Leucemia Linfática Crónica.**

Nuestros estudios sobre el mecanismo por el que una sobreexpresión de FANCA se asocia con progresión y un peor pronóstico en la leucemia linfática crónica desveló la importancia que las modificaciones postraduccionales tienen en las manifestaciones clínicas de esta patología. Es por esto que decidimos elaborar un perfil de las modificaciones postraduccionales en pacientes LLC para obtener una visión global del alcance de estos procesos en la patogénesis de la enfermedad. Además, dado que existe una creciente evidencia de la importancia de la neddilación en muchos procesos neoplásicos, tanto de tumores sólidos como hematológicos (88) (347), decidimos estudiar cómo el inhibidor de NAE, MLN4924 pevonedistat, afecta al perfil de modificaciones postraduccionales, en un intento de identificar posibles neddilaciones con las técnicas disponibles actualmente. Aunque ya se han desarrollado métodos de predicción de proteínas neddiladas, el descubrimiento de la neddilación es bastante reciente y las dianas encontradas son limitadas, por lo que hay que seguir realizando estudios experimentales para encontrar sitios específicos de neddilación, y establecer los mecanismos para el reconocimiento de los mismos (348).

#### **3.1. Estudio del neddiloma.**

Como hemos dicho, para estudiar si un cambio en el perfil de las modificaciones postraduccionales pudiese estar detrás de la etiología de la leucemia linfática crónica, llevamos a cabo un rastreo de las mismas en muestras primarias de células B de pacientes y lo comparamos con las de linfocitos B obtenidos de donantes sanos. Se empleó un método basado en el enriquecimiento por inmunofinidad de péptidos que se encuentran modificados por ubiquitina, NEDD8 o

ISG15, empleando anticuerpos que se dirigen específicamente contra el resto K-GG que permanece en los residuos de lisina modificados después de la digestión trípica de un extracto celular.

El resto de diGly (K-GG) que queda en los péptidos después de la digestión con tripsina es compartido por proteínas modificadas por diferentes UBL, como ubiquitina, NEDD8 e ISG15, por lo que el anticuerpo está identificando todas esas modificaciones (ubiquitinación, neddilación e isgilación) simultáneamente. Además, la abundancia de ubiquitinaciones es mucho mayor que las neddilaciones (6%) e isgilaciones (2%) (57) (349).

Recientemente, Akimov et al. evitaron estos inconvenientes en el estudio del ubiquitinoma humano al desarrollar un nuevo anticuerpo monoclonal llamado UbiSite, dirigido contra un remanente más grande (ESTLHLVLRGG) que queda exclusivamente sobre los péptidos ubiquitinados después de la digestión con la endoproteinasa LysC, que corta la cadena peptídica en el extremo C-terminal de los residuos de lisina (K). El anticuerpo UbiSite permitió el análisis del ubiquitinoma humano completo en líneas celulares Jurkat y Hep2, prácticamente sin reactividad cruzada con otras modificaciones de UBL (350).

Así, para tratar de minimizar los inconvenientes que presentaba el empleo del anticuerpo UbiScan en el rastreo de neddilaciones, se decidió incluir en el estudio las muestras tratadas con el inhibidor de la neddilación (MLN4924, pevonedistat), lo que permitió identificar las modificaciones sensibles al mismo. Dado que algunos trabajos apuntaban a que la ubiquitinación o la neddilación de una lisina dependía del reconocimiento de secuencias peptídicas concretas alrededor de la misma (348), decidimos cruzar nuestros datos con los obtenidos por Akimov et al. en su estudio de proteínas ubiquitinadas en células Jurkat, para descartar del nuestro ubiquitinaciones.

Para el rastreo se utilizaron células mononucleares aisladas de muestras de sangre de dos pacientes, cuyas características analíticas, clínicas y citogenéticas pueden consultarse en la **tabla 8**. Dichas células mononucleares fueron cultivadas durante 24h en presencia o ausencia de 0,25µM MLN4924. Como control se utilizaron células CD19+ aisladas inmunomagnéticamente de 8 *buffy coats* de donantes sanos desechados por el banco de sangre, previo consentimiento informado. Los resultados que se indican a continuación corresponden a observaciones hechas en ambos pacientes.

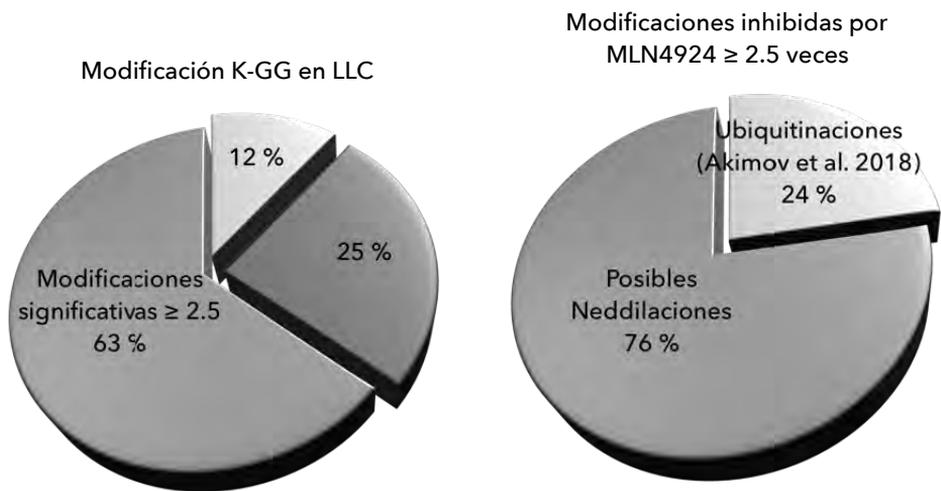
	<b>YLG 364</b>	<b>CFS 283</b>
<b>Edad diagnóstico</b>	54	46
<b>Leucocitos diagnóstico</b>	14,9	195
<b>Estadío Rai/Binet al diagnóstico</b>	0A	IIB
<b>CD38</b>	Negativo	Negativo
<b>ZAP70</b>	Negativo	Negativo
<b>Citogenética</b>	13q14	13q14
<b>Estado de IGHV</b>	Mutado	No Mutado
<b>Tratamiento previo</b>	No	Si - FCR
<b>Progresion</b>	Si	Si

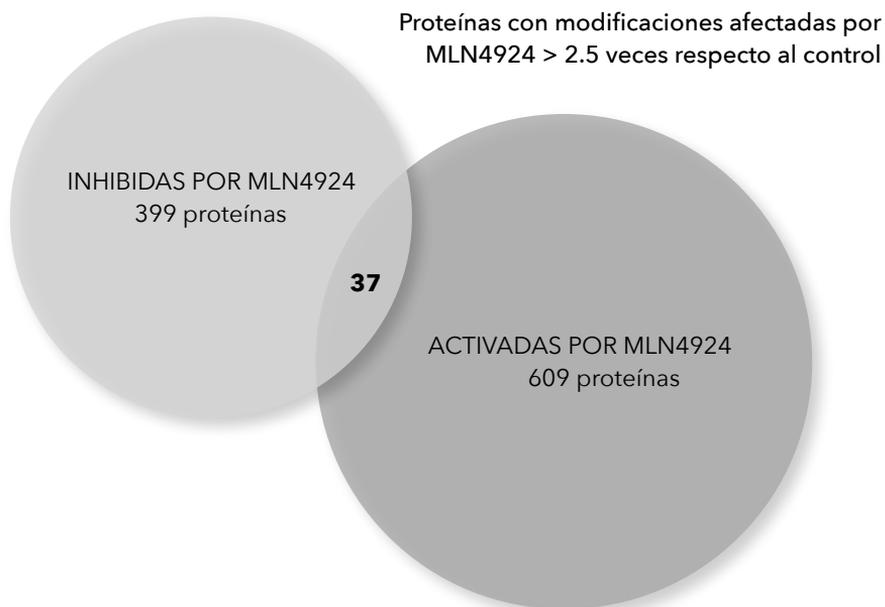
**Tabla 8: Tabla de las características clínicas, analíticas y citogenéticas de los dos pacientes LLC analizados en el rastreo.**

El estudio identificó un total de 3384 péptidos modificados diferencialmente correspondientes a 1746 proteínas. De estos péptidos detectados que contienen el remanente de K-GG, 2142 (63%) corresponden a un aumento de  $\geq 2,5$  veces en las células B-LLC con respecto a los controles. Estos datos indican que la LLC presenta un nivel elevado de modificaciones postraduccionales con respecto a los linfocitos B sanos. El empleo del inhibidor MLN4924, permitió

diferenciar las modificaciones sensibles a la neddilación. De entre las 2142 modificaciones significativas en los pacientes LLC, 353 se revirtieron notablemente (más de 2,5 veces) tras la incubación con el inhibidor. Comparando estos datos con los obtenidos por Akimov et al. (350), el 77% de estos sitios no fueron detectados por el anticuerpo UbiSite, empleado en sus estudios.

De forma general, el MLN4924 afectó de manera significativa (cambios  $\geq 2,5$  veces) la cantidad de remanente de K-GG en 1666 sitios, distribuidos entre 399 proteínas que mostraban modificaciones reducidas y 609 proteínas cuyas modificaciones se encontraban aumentadas. También se observó que 37 proteínas mostraban modificaciones de ambos tipos.





**Figura 32: Diagramas de porcentajes.** Las gráficas de sectores representan el nivel de modificaciones postraduccionales que presenta la LLC con respecto a los controles.

Como primera aproximación para determinar si este aumento en la modificación postraduccionales estaba relacionado con la etiología de la LLC, llevamos a cabo una clasificación de las proteínas diferencialmente modificadas según las rutas celulares en las que participan. Los rastreos genómicos y los numerosos trabajos que se han realizado en LLC hasta el momento, han determinado que las características celulares de la LLC derivan de alteraciones en 8 rutas principales, como son la del receptor de célula B, la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la respuesta al daño en el ADN, la remodelación de la cromatina, la vía de supervivencia NF-κB, la ruta NOTCH y el metabolismo del ARN (225). Así, prestamos atención a las modificaciones que afectan a alguna de estas rutas (**figura 11**, página 75).

### 3.2. Proteínas modificadas por neddilación.

Los principales objetivos de neddilación son las cullinas, una importante familia de proteínas que funcionan como andamios del grupo de ligasas denominadas Cullin-RING (CRL). El estudio ha identificado las cullinas CUL-1, CUL-3 y CUL-5 con una modificación incrementada en las muestras de LLC con respecto a los controles, y esas modificaciones mostraron una reducción después del tratamiento con MLN4924, como se muestra en la **tabla 9**.

Nombre Proteína	DMSO LLC vs Control	MLN4924 LLC vs Control	Sitio	Péptido
CUL1	4,0	-2,0	410	FINNNAVTK*MAQSSSK
CUL3	3,4	-16,5	292	NGK*TEDLGCMYK
CUL5	8,2	-4,8	724	TQEAIQIMK*M#R

**Tabla 9: Tabla de las proteínas Cullinas que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.** En la tabla se muestran los datos de las diferentes cullinas que presentan unos valores de modificación significativos (cambios  $\geq 2,5$  veces). Primeramente la comparativa entre las muestras LLC y los controles sanos, y por otro lado los valores de modificación tras el tratamiento con MLN4924. Las últimas dos columnas muestran las lisinas concretas modificadas y los péptidos en los que se encuentran.

De forma similar, también se ha encontrado que varios miembros de la cascada de neddilación se encuentran alterados y son sensibles a la acción de MLN4924, como es el caso de las proteínas NAE, UBE2M, DCUN1D entre otras (**tabla 10**).

Nombre Proteína	DMSO LLC vs Control	MLN4924 LLC vs Control	Sitio	Péptido
NAE1	-2,0	-27,3	338	GTIPDMIADSGK*YIK
NAE1	-2,8	-18,9	12	LLKEQK*YDR
UBA3	6,5	1,9	409	SPAITATLEGK*NR
UBE2M	2,0	-2,4	92	VGQGYPHDPPK*VK
UBE2M	2,6	-1,7	72	LVICPDEGFYK*SGK
DCUN1D1	-0,4	-5,2	143	AQIPK*MEQELKEPGR
DCUN1D1	-1,9	-3,3	63	K*KLEQLYNR
DDB1	14,0	2,1	1121	MQEVVANLQYDDGSGMK*R
COPS7B	14,9	0,3	221	TLK*ATASSSAQEMEQQLAER

**Tabla 10: Tabla de enzimas pertenecientes a la cascada de neddilación que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.** En la tabla se muestran los datos de las diferentes proteínas que presentan unos valores de modificación significativos (cambios  $\geq 2,5$  veces). Primeramente la comparativa entre las muestras LLC y los controles sanos, y por otro lado los valores de modificación tras el tratamiento con MLN4924. Las últimas dos columnas muestran las lisinas concretas modificadas y los péptidos en los que se encuentran.

Curiosamente, el péptido NEDD8 alberga modificaciones en varios de sus residuos de lisina, y todos ellos muestran una reducción tras el tratamiento con MLN4924 (**tabla 11**).

Nombre Proteína	DMSO LLC vs Control	MLN4924 LLC vs Control	Sitio	Péptido
NEDD8	1,8	-12,5	54	QMNDEK*TAADYK
NEDD8	2,0	-8,2	6	VK*TLTGKEIEIDIEPTDKVER
NEDD8	2,5	-4,2	22	TLTGKEIEIDIEPTDK*VER
NEDD8	1,7	-4,0	48	LIYSGK*QMNDEK
NEDD8	-1,5	-5,4	11	VK*TLTGK

**Tabla 11: Tabla de los diferentes residuos del péptido NEDD8 que se encuentran modificados en nuestro rastreo.** En la tabla se muestran los datos que presentan unos valores de modificación significativos (cambios  $\geq 2,5$  veces). Primeramente la comparativa entre las muestras LLC y los controles sanos, y por otro lado los valores de modificación tras el tratamiento con MLN4924. Las últimas dos columnas muestran las lisinas concretas modificadas y los péptidos en los que se encuentran.

### 3.2.1. Proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina y el citoesqueleto.

Una de las alteraciones más conocida de las células B-LLC y que se emplea en el diagnóstico de la enfermedad es la condensación de su cromatina. Por esta razón, fue interesante observar que el mayor grupo de proteínas con restos K-GG sensibles al MLN4924 que se pudo identificar en el estudio fueron las histonas y otras proteínas asociadas a la cromatina (**tabla 12**).

Nombre Proteína	DMSO LLC vs Control	MLN4924 LLC vs Control	Sitio	Péptido
H1B	911,8	516,9	49	ATGPPVSELITK*AVAAS K
H1B	8,6	1,1	194	SPAKPK*AVKPK
H1B	11,7	5,6	37	K*ATGPPVSELITK
H1B	3,4	-0,5	17	SETAPAETATPAPVEK*S PAK
H1C	-90,8	-398,1	17	AAPPAEK*APVK
H1C	58,7	28,8	160	K*PAAATVTK
H1C	21,9	8,2	21	PAAPAAAPPAEKAPVK* K
H1C	17,5	9,3	159	KAK*KPAAATV
H1C	12,2	6,3	201	AAKPK*VVKPK

Nombre Proteína	DMSO LLC vs Control	MLN4924 LLC vs Control	Sitio	Péptido
H1C;H1D; H1E	724,4	415,1	§46; §47; §46	KASGPPVSELITK*AVAA SK
H1C;H1D; H1E	17,6	14,8	§63; §64; §63	SGVSLAALK*K
H1C;H1F1; H1D;H1E; H1B	60,4	32,4	§90; §93; §91; §90; §93	SLVSK*GTLVQTK
H1C;H1F1; H1D;H1E; H1B	-6,4	-10,3	§63;66; §64; §63; §66	SLAALK*K
H1C;H1F1; H1D;H1E; H1B	8,5	5,8	§97; §100; §98; §97; §100	GTLVQTK*GTGASGSFK
H1D;H1E	7,3	4,2	§35; §34	RK*ASGPPVSELI
H1E	10,8	3,0	§17	SETAPAAPAAPAPAEK*T PVK
H1X	3,8	0,3	19	TTAEGMAK*K
H1X	1,9	-0,8	§23	KVTK*AGGSAALSPSK
H2AE	13,4	9,5	§119	VTIAQGGVLPNIQAVLLP K*KTESHHKT
H2AE; HIST1H2AD; HIST1H2AH; H2A.1; H2AO; HIST2H2AC; H2AFJ; H2AFJ iso 2	1,8	-1,5	§100; §100; §100; 100; §100; §100; §100; §100	LLGK*VTIAQGGVLPNIQ AV

Nombre Proteína	DMSO LLC vs Control	MLN4924 LLC vs Control	Sitio	Péptido
H2AFY; H2AFY iso 2; H2AFY iso 3	569,1	537,5	§123; §123; §123	GK*LEAIITPPPAK
H2AFY; H2AFY iso 2; H2AFY iso 3	65,0	36,1	§167; §167; §166	QGEVSK*AASADSTTEG TPADGFTVLSTK
H2AFY; H2AFY iso 2; H2AFY iso 3	1,0	-3,7	332; 329; 331	QTAAQLILK*AI
H2AFY; H2AFY iso 2; H2AFY iso 3	11,3	6,9	§323; 320; 322	NGFVK*QTAAQLILK
H2AFY; H2AFY iso 2; H2AFY iso 3	-12,7	-16,1	§117; §117; §117	ASGGVLPNIHPELLAKK*
H2AFY; H2AFY iso 2; H2AFY iso 3	2,9	-0,2	§295; §292; 294	TVK*NCLALADDDK
H2AFY; H2AFY iso 2; H2AFY iso 3	10,2	7,6	§189; §189; §188	AASADSTTEGTPADGFT VLSTK*SLFLGQK
H2B;H2B1C; H2B1D; H2B1H; H2B1L; H2B1M; H2B1N; H2BFH; H2B2E; H2B2F; HIST3H2BB; H2B2F iso2; H2B1A	9,8	4,0	117; §117; §117; §117; §117; §117; §117; §117; §117; §117; §117; §117; 117; §118	HAVSEGK*AVTKYTSSK

Nombre Proteína	DMSO LLC vs Control	MLN4924 LLC vs Control	Sitio	Péptido
H2B;H2B1C; H2B1D; H2B1H; HIST1H2BJ; H2B1K; H2B1L; H2B1M; H2B1N; H2BFH; H2B2E; H2B2F; HIST3H2BB; H2B2F iso2; H2BFS; H2B1A	4,6	1,6	117; §117; §117; §117; §117; §117; §117; §117; §117; §117; §117; §117; §117; §117; 117; §117; §118	HAVSEGTK*AVTK
H2B;H2B1N	15,4	7,7	§6;§6	PEPSK*SAPAPK
H2B1D	16,0	7,3	§6	PEPTK*SAPAPK
H2B1D; H2B1C; H2B1H; HIST1H2BJ; H2B1K; H2B1L; H2B1N; H2BFH; HIST2H2BC; HIST2H2BD; H2B2E; HIST3H2BB; H2BFS	12,1	4,8	§21; §21; §21; §21; §21; §21; §21; §21; §21; §21; §21; §21; §21; §21	KAVTK*AQK
H2B1L	11,4	5,9	§6	PELAK*SAPAPK
H2B1M	45,0	23,2	§6	PEPVK*SAPVPK
H2B2F; H2B1H; H2BFH; H2B2F iso2	5,5	2,9	§6; §6; §6; 6	PDDPAK*SAPAPK
H2B2F; H2B2F iso2	11,3	8,3	§21;21	AVTK*VQK





Nombre Proteína	DMSO LLC vs Control	MLN4924 LLC vs Control	Sitio	Péptido
ZNF638; ZNF638 iso3; ZNF638 iso3; ZNF638 iso3	13,9	11,4	§951; 951; 951;48	K*AAESMVK

**Tabla 12: Tabla de histonas que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.** En la tabla se muestran los datos de las diferentes proteínas que presentan unos valores de modificación significativos (cambios  $\geq 2,5$  veces). Primeramente la comparativa entre las muestras LLC y los controles sanos, y por otro lado los valores de modificación tras el tratamiento con MLN4924. Las últimas dos columnas muestran las lisinas concretas modificadas y los péptidos en los que se encuentran.

Por otro lado, la fragilidad es otra característica importante de los linfocitos B-LLC, responsable de la aparición de las sombras de Gumprecht. El porcentaje de sombras se correlaciona inversamente con el nivel de vimentina y con un peor pronóstico (351) (352). La vimentina es una de las proteínas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto (353), y en nuestro estudio fue una de las proteínas que se identificaron como supuestamente modificadas por neddilación, dado que su modificación se reducía tras el tratamiento con el inhibidor. De igual manera se identificaron modificaciones en otras proteínas como lamina, vinculina, actina, tubulina entre otras (**tabla 13**).

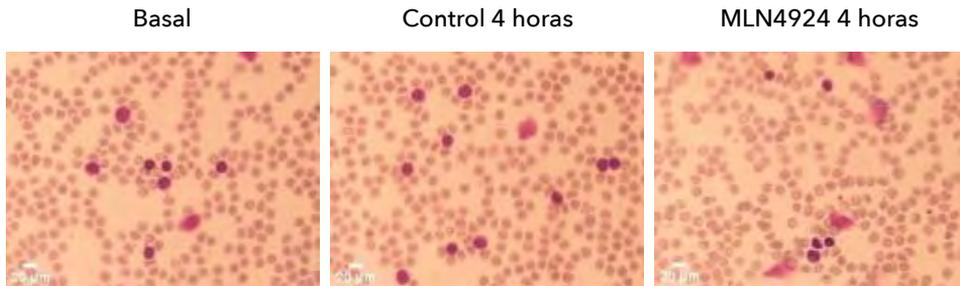
Nombre Proteína	DMSO LLC vs Control	MLN4924 LLC vs Control	Sitio	Péptido
ACTA2; ACTB; ACTC1; ACTG1; ACTG2; ACTA1	4,9	0,5	§52, §63; §50, §61; §52, §63; §50, §61; §51, §62; §52, §63	HQGVMVGMGQK*DSYVGD EAQSK*R
CAP1	-12,3	-15,2	126	GSK*LFNHLSAVSESI
Cofilin-1; Cofilin-2	-31,1	-34,3	§112; §112	FWAPESAPLK*SK
EPB41	7,4	2,4	§366	ELEEK*VMELHK
EPB41	2,7	-0,4	361	LAPNQTK*ELEEK
Ezrin	22,7	9,3	§357	LQDYEEK*TK
Ezrin	9,5	4,2	523	RITEAEK*NER
Ezrin	6,5	2,9	§450	AK*EAQDDLK
Ezrin; Moesin	7,9	4,1	§35; §35	QLFDQVVK*TIGLR
Ezrin; Moesin; Radixin	28,3	13,3	§306; §306; §306	RKPDTIEVQQMK*AQAR
Ezrin; Moesin; Radixin	73,8	61,3	§263; §263; §263	K*APDFVFYAPR
Ezrin; Moesin; Radixin	8,6	4,8	§262; §262; §262;	FVIKPIDK*K
Ezrin; Radixin	13,0	9,0	§3; §3	PK*PINVR
Lamin B1	-6,5	-30,0	417	K*RVDVEESEASSSV
Lamin B1	1,7	-4,7	§111	CK*AEHDQLLLNYAK

Nombre Proteína	DMSO LLC vs Control	MLN4924 LLC vs Control	Sitio	Péptido
Lamin B1	1,6	-3,8	§109	AKLQIELGK*CK
Lamin B2	0,0	-4,8	§186	AQLAK*AEDGHAVAK
Lamin B2	5,9	1,3	123	LQIEIGK*LR
Lamin B2	2,9	-0,3	196	K*QLEKETLMR
Lamin B2	6,8	4,1	§520	FTPK*YILR
Lamin B2	6,1	3,5	§290	LDSAK*LSSDQNDK
profilin 1	194,6	154,0	§108	TDK*TLVLLMGK
STMN1	30,2	16,9	§128	DK*HIEEVR
TUBB1	-35,3	-55,9	§324	MSTK*EVDQQLLSVQTR
Vimentin	2,1	-3,0	§168	RQVDQLTNDK*AR
Vinculin	7,8	4,4	§219	NSK*NOGIEEALK

**Tabla 13: Tabla de proteínas del citoesqueleto que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.** En la tabla se muestran los datos de las diferentes proteínas que presentan unos valores de modificación significativos (cambios  $\geq 2,5$  veces). Primeramente la comparativa entre las muestras LLC y los controles sanos, y por otro lado los valores de modificación tras el tratamiento con MLN4924. Las últimas dos columnas muestran las lisinas concretas modificadas y los péptidos en los que se encuentran

Para observar el posible efecto que pudiera tener el MLN4924 sobre el aspecto de la cromatina y de las sombras de Gumprecht, incubamos sangre periférica de muestras de 3 pacientes LLC con el inhibidor de la neddilación durante 4h. El análisis de los frotis realizados nos ha mostrado un aumento en el número de sombras de Gumprecht en las muestras tratadas con el inhibidor de la neddilación durante 4h de dos de los pacientes analizados, en comparación con las muestras basales, como se puede observar en la **figura 33**. De todas maneras, dado el número tan pequeño de pacientes estudiados hasta

el momento, se trata de datos muy preliminares que se están ampliando en el laboratorio.



**Figura 33: El tratamiento con MLN4924 parece afectar al porcentaje de sombras de Gumprecht en pacientes LLC.** Las imágenes pertenecen a las muestras analizadas de 1 paciente LLC. Se observa un aumento del número de sombras de Gumprecht tras el tratamiento con MLN4924 durante 4h. Son observaciones preliminares.

### 3.2.2. Proteínas implicadas en el metabolismo del ARN (RNA *splicing*).

Se encontraron varias proteínas pertenecientes al *splicing* del ARN modificadas en la muestra de LLC con respecto a los controles, y dichas modificaciones se reducían tras el tratamiento con MLN4924. La proteína SF3B1, un componente principal del spliceosoma, se ha descrito como mutada en aproximadamente el 15% de los pacientes LLC analizados en estudios de secuenciación masiva (125). Estos estudios indican que la función de empalme en el metabolismo del ARN se encontraría alterada en la LLC. Entre las proteínas encontradas en nuestro rastreo, no se encontraron modificaciones en SF3B1, pero sí en otros factores de empalme como SF3A1 y SF1 entre otros (**tabla 14**).

Nombre Proteína	DMSO LLC vs Control	MLN4924 LLC vs Control	Sitio	Péptido
SF3A1	8,6	1,1	102	HKVSEFK*EGK
SF3A1	16,8	10,4	§419	ASKPLPPAPAPDEYLVSPITGE K*IPASK
SFRS3	12,3	7,2	§23	VYVGNLGNNGNK*TELER
SFRS3	27,8	14,4	§85	VRVELSNGEK*R
SFRS7	16,3	7,8	§24	VYVGNLGTGAGK*GELER
SFRS7	13,0	5,7	§70	GLDGK*VICGSR
SFRS15	11,7	1,5	1078	GK*EKPEVTDR
SF1	1,9	-1,9	227	NILK*QGIETPEDQNDLRK
SF2	4,9	2,1	174	K*LDNTK*FR

**Tabla 14: Tabla de proteínas implicadas en el *splicing* del ARN que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.** En la tabla se muestran los datos de las diferentes proteínas que presentan unos valores de modificación significativos (cambios  $\geq 2,5$  veces). Primeramente la comparativa entre las muestras LLC y los controles sanos, y por otro lado los valores de modificación tras el tratamiento con MLN4924. Las últimas dos columnas muestran las lisinas concretas modificadas y los péptidos en los que se encuentran

### 3.2.3. Rutas activadas por el Receptor de célula B.

En esta patología parece haber una actividad alterada de BCR (110), cuyas señales son transducidas al núcleo por cascadas de fosforilación que incrementan la supervivencia de las células malignas. Por esta razón, el BCR es una de las principales dianas terapéuticas y hoy en día, muchos medicamentos van dirigidos a alterar estas señales, como son los inhibidores de las quinasas BTK y PI3k, Ibrutinib (255) e Idelalisib (256) respectivamente.

En el estudio se han encontrado varias lisinas pertenecientes a la Bruton Tirosin quinasa (BTK) modificadas positivamente en las muestras de LLC (**tabla 15**). Lo que es más interesante es que otras dos quininas reclutadas por el receptor de células B y que participan en la activación de BTK (SYK y LYN), aparecen también en el rastreo (**tabla 16**). Llama la atención la gran cantidad de lisinas de estas tres proteínas que aparecen aberrantemente modificadas en la LLC, así como que la mayoría de ellas incrementen su modificación tras el tratamiento con MLN4924, lo que parece indicar una regulación conjunta por mecanismos postraduccionales. El hecho de que estas modificaciones se incrementen en respuesta al inhibidor de NAE parece descartar que sean neddilaciones.

Nombre Proteína	Sitio	Modificación en LLC	Modificación tras MLN4924
BTK	§322	6,3	14,4
BTK	§406	12,0	30,2
BTK	§536	25,3	51,4
BTK	§558	10,4	34,1
BTK	296	5,5	10,2
BTK	374	13,1	28,6
BTK	417	19,9	47,8
BTK	430	6,0	16,8

**Tabla 15: Tabla de sitios específicos de la quinasa BTK que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.** En la tabla se muestran los datos de las diferentes proteínas que presentan unos valores de modificación significativos (cambios  $\geq 2,5$  veces). Primeramente la comparativa entre las muestras LLC y los controles sanos, y por otro lado los valores de modificación tras el tratamiento con MLN4924. Las últimas dos columnas muestran las lisinas concretas modificadas y los péptidos en los que se encuentran.

<b>Nombre Proteína</b>	<b>Sitio</b>	<b>Modificación en LLC</b>	<b>Modificación tras MLN4924</b>
LYN	§9	27,3	19,8
LYN	109	4,7	3,3
LYN	213	2,8	2,3
LYN	271	2,5	9,4
LYN	275	11,2	32,5
LYN	278	15,5	32,1
LYN	301	7,3	13,6
LYN	332	2,3	4,6
LYN	338	19,9	28,8
LYN	361	11,5	15,8
LYN	382	43,2	149,9
LYN	7	3,2	2,2
LYN	§20	17,2	11,6
SYK	294	14,2	24,8
SYK	§105	24,9	42,2
SYK	§116	37,4	73,6
SYK	§402	54,8	99,5
SYK	§509	152,1	328,8
SYK	§517	16,0	30,9
SYK	§587	7,6	14,4
SYK	§60	14,2	33,0
SYK	124	1,1	4,1
SYK	133	32,5	80,4
SYK	151	2,2	7,1
SYK	187	21,1	38,7
SYK	191	-1,7	-0,1
SYK	225	20,9	34,4

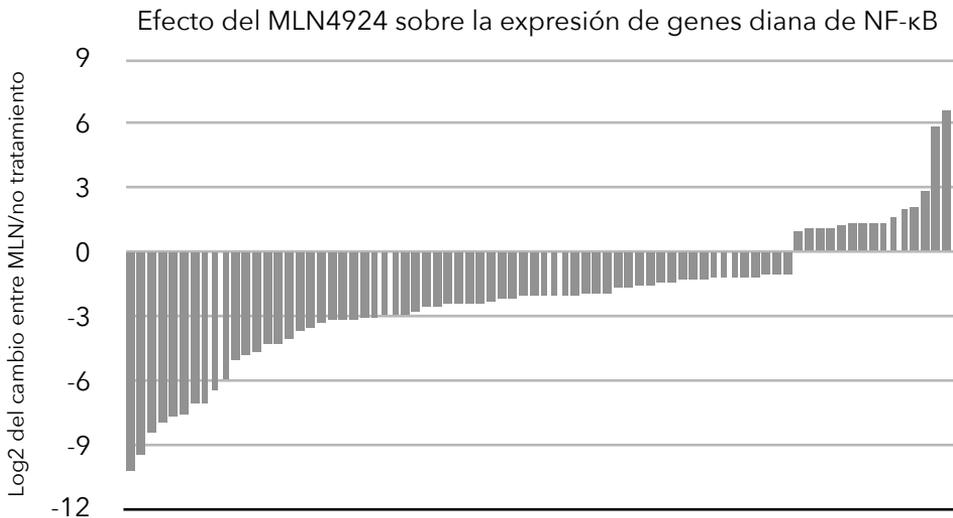
SYK	261	3,0	6,8
SYK	368	77,8	93,5
SYK	375	3,2	6,3
SYK	386	14,1	29,8
SYK	387	12,4	17,7
SYK	397	20,9	39,7
SYK	469	13,9	29,0
SYK	527	3,2	9,3
SYK	533	-0,9	2,2
SYK	548	0,3	5,7
SYK	577	0,3	2,9

**Tabla 16: Tabla de sitios específicos de las quinasas LYN y SYK que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.** En la tabla se muestran los datos de las diferentes proteínas que presentan unos valores de modificación significativos (cambios  $\geq 2,5$  veces). Primeramente la comparativa entre las muestras LLC y los controles sanos, y por otro lado los valores de modificación tras el tratamiento con MLN4924. Las últimas dos columnas muestran las lisinas concretas modificadas y los péptidos en los que se encuentran.

### 3.2.4. Proteínas de la ruta NF- $\kappa$ B.

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B está asociado con la activación de genes anti-apoptóticos y su vía de activación se ha descrito como constitutivamente activada en la LLC (269). Para estudiar el efecto que la neddilación tiene sobre la actividad de la ruta NF- $\kappa$ B, llevamos a cabo un análisis del transcriptoma de células B primarias obtenidas de un paciente con LLC, cuyas células se trataron o no con MLN4924 a una concentración de 0,25 $\mu$ M (**figura 35**). En la **figura 34** se puede apreciar el grado en que el MLN4924 altera la expresión de genes diana conocidos de NF- $\kappa$ B, observándose principalmente una regulación negativa. Además, está descrito el papel de la neddilación

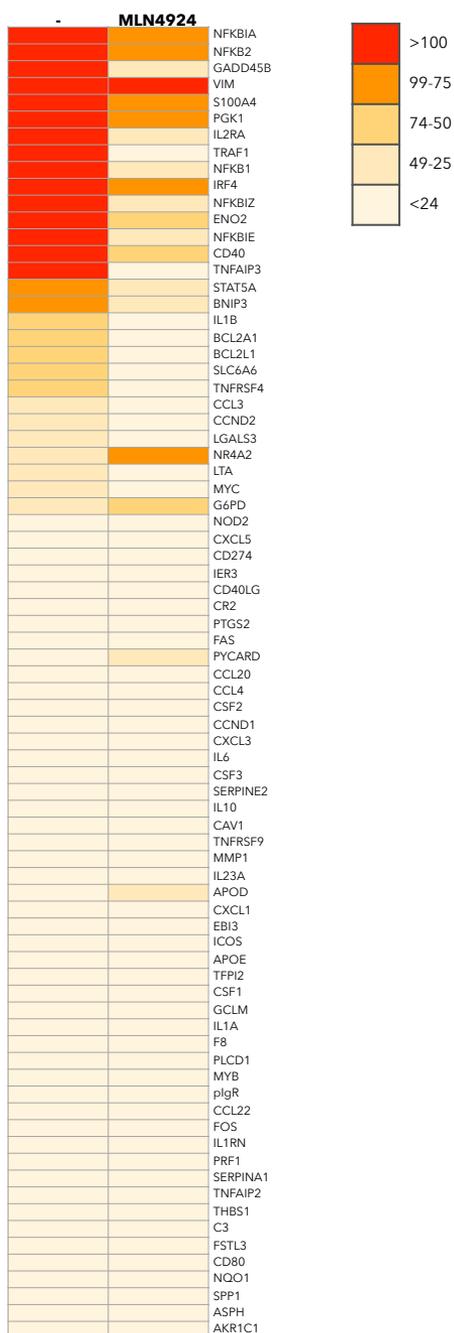
en la activación de NF- $\kappa$ B, ya que el tratamiento de las células B-LLC con MLN4924 da lugar a la acumulación de la forma fosforilada de I $\kappa$ B, inhibidor de NF- $\kappa$ B (91). Sin embargo, nuestros datos indican que la estabilización de I $\kappa$ B es mucho menor que la que se logra con bortezomib, un inhibidor conocido del proteosoma.



**Figura 34: El MLN4924 altera la expresión de varios genes diana de la ruta NF- $\kappa$ B.**

La gráfica representa la variación en la expresión de genes diana conocidos de la ruta NF- $\kappa$ B en nuestro análisis de RNAseq de muestras LLC, sin tratamiento y tratadas con el inhibidor de la neddilación.

### Expresión de genes diana de NF-κB sensibles a MLN4924 en LLC



**Figura 35: Alteración de la expresión génica inducida por MLN4924.** El heat-map representa los genes diana de la ruta NF-κB expresados diferencialmente en una muestra del paciente LLC362, sin tratamiento y tratada con el inhibidor de la nedililación.

La información obtenida en el rastreo mostró modificaciones en tres proteínas involucradas en la activación de NF- $\kappa$ B por TNF $\alpha$ : TANK, IKK $\beta$  y NEMO (**tabla 17**). Estas tres proteínas conforman un complejo ternario que participa en la fosforilación de I $\kappa$ B y por lo tanto en la activación de NF- $\kappa$ B (264). Estos datos apoyarían la función de la neddilación en la activación de la ruta NF- $\kappa$ B en una posición por encima de la desestabilización del inhibidor I $\kappa$ B, regulando positivamente la vía de supervivencia.

Nombre Proteína	DMSO LLC vs Control	MLN4924 LLC vs Control	Sitio	Péptido
IKK $\beta$	3,6	7,6	§106	K*YLNQFENCCGLR
NEMO	3,6	5,4	344	LK*ASCQESAR
TANK	9,0	3,8	§189; §195	LNIPDTATETQCSVPIQCTDKT DK*QEALFK*PQAK
TANK	7,5	3,2	§308	TTDK*TKPSNLVNTCIR
TANK	7,9	3,7	§195; §199	LNIPDTATETQCSVPIQCTDKT DKQEALFK*PQAK*DDINR
TRAF2	-0,9	-4,6	176	APCCGADVK*AHHEVCPK
TRAF2	-1,5	-4,6	27	TLLGTK*LEAK
TRAF2	-5,7	-8,6	119	GTLK*EYESCHEGR
CD40	-36,2	-66,2	267	QEQEINFDDLPGSNTAAP VQETLHGCPVTOEDGK*ES R

**Tabla 17: Tabla de proteínas implicadas en la ruta NF- $\kappa$ B que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.** En la tabla se muestran los datos de las diferentes proteínas que presentan unos valores de modificación significativos (cambios  $\geq 2,5$  veces). Primeramente la comparativa entre las muestras LLC y los controles sanos, y por otro lado los valores de modificación tras el tratamiento con MLN4924. Las últimas dos columnas muestran las lisinas concretas modificadas y los péptidos en los que se encuentran.

### 3.2.5. Proteínas de la ruta NOTCH.

La desregulación de la vía de señalización de NOTCH se ha identificado durante estos años como una de las anomalías moleculares más recurrentes en la patogénesis de la LLC, sin embargo su papel y regulación siguen siendo poco conocidas. En nuestro estudio hemos encontrado la proteína MIB1 (354) (355), una E3-Cullin-RING ligasa que media la degradación de Notch y cuya modificación varía tras el tratamiento con MLN4924 (**tabla 18**).

Por otro lado, los factores de transcripción Íkaros (356) y Aiolos, reguladores de genes diana de Notch, también aparecen en el estudio mostrando una modificación reducida en las células B-LLC con respecto a las células control, la cual se reduce más aún después del tratamiento con el inhibidor de la neddilación (**tabla 19**).

Nombre Proteína	DMSO LLC vs Control	MLN4924 LLC vs Control	Sitio	Péptido
MIB1	20,1	11,4	§895; §896	AAVLFQPCGHMCACENCAN LMK*K

**Tabla 18: Tabla de la modificación encontrada en la proteína MIB1, implicada en la ruta Notch.** En la tabla se muestran los datos de la proteína MIB1 que presenta unos valores de modificación significativos (cambios  $\geq 2,5$  veces). Primeramente la comparativa entre las muestras LLC y los controles sanos, y por otro el valor de modificación tras el tratamiento con MLN4924. Las últimas dos columnas muestran la lisina concreta significativamente modificada y el péptido en el que se encuentra.

Nombre Proteína	DMSO LLC vs Control	MLN4924 LLC vs Control	Sitio	Péptido
Aiolos	-17,6	-25,7	419	NGMPLLK*EVPR
Aiolos	-14,7	-18,4	361	AEM#SNGAPQEELEK*K
Ikaros	-57,5	-80,0	157	SHTGERPFQCNOQCGASFTQ K*GNLLR

**Tabla 19: Tabla de factores de transcripción implicados en la ruta Notch que se encuentran modificados en nuestro rastreo.** En la tabla se muestran los datos de las diferentes proteínas que presentan unos valores de modificación significativos (cambios  $\geq 2,5$  veces). Primeramente la comparativa entre las muestras LLC y los controles sanos, y por otro lado los valores de modificación tras el tratamiento con MLN4924. Las últimas dos columnas muestran las lisinas concretas modificadas y los péptidos en los que se encuentran.

### 3.2.6. Proteínas de reparación del ADN.

Uno de los procesos celulares ya descritos como regulados por neddilación es la reparación del ADN. Nuestro estudio y posterior selección de datos identificó las proteínas Ku70 y Ku80, relacionadas con el mecanismo de reparación del ADN por unión de extremos no homólogos (NHEJ) (335), como altamente modificadas en las células B-LLC con respecto a las células control, tal y como se muestra en la **tabla 20**. Concretamente, la proteína Ku80 se encontraba modificada en múltiples lisinas, y en dos de ellas se observó una reducción de la modificación tras el tratamiento con MLN4924. Además, se identificaron otras proteínas de reparación de ADN supuestamente neddiladas como DDB1, DDB2, H2AX, XPC y RAD23B. Curiosamente, la mayoría de estas proteínas están relacionadas con el mecanismo de reparación del ADN por escisión de nucleótidos (NER), y su mutación da lugar al síndrome de inestabilidad genómica conocido como Xeroderma Pigmentosum.

Nombre Proteína	DMSO LLC vs Control	MLN4924 LLC vs Control	Sitio	Péptido
DDB2	13,4	1,6	§151	DKPTFIK*GIGAGGSITGLK
H2AX	19,5	10,6	128; 135	KTSATVGPVK*APSGGKK
Ku80	7,7	1,4	§195	LGGHGPSFPLK*GITEQQK
Ku80	7,6	2,0	§660	FNNFLK*ALQEK
XPC	2,1	-3,0	§508	KDPSLPAASSSSSSSK*R
XPC	9,0	5,2	§785	K*LDIDCVQAI
Ku70	9,0	5,6	§114	NIYVLOELDNPGAK*R
MORF4L1	10,6	6,5	§127	ANQEQYAEGK*MR
MORF4L1	9,1	5,5	§111	YVDTNLQK*QR
MORF4L1	8,3	5,4	§117	ELQK*ANQEQYAEGK
MORF4L1	9,5	6,6	§143	TSGLQQK*NVEVK
RAD23B	2,6	-0,0	§151	QEKPAEK*PAETPVATSPTA TDSTSGDSSR

**Tabla 20: Tabla de proteínas implicadas en la reparación del ADN que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.** En la tabla se muestran los datos de las diferentes proteínas que presentan unos valores de modificación significativos (cambios  $\geq 2,5$  veces). Primeramente la comparativa entre las muestras LLC y los controles sanos, y por otro lado los valores de modificación tras el tratamiento con MLN4924. Las últimas dos columnas muestran las lisinas concretas modificadas y los péptidos en los que se encuentran.

La proteína p53 se encuentra mutada en más del 50% de los tumores (298), constituyendo uno de los cambios genómicos más frecuente en los cánceres humanos (300). Teniendo en cuenta que la desactivación de la función de p53, bien sea por la delección 17q (113) o por la mutación del gen (315), es uno de los principales factores de mal pronóstico en la LLC, encontrar modificada esta proteína y

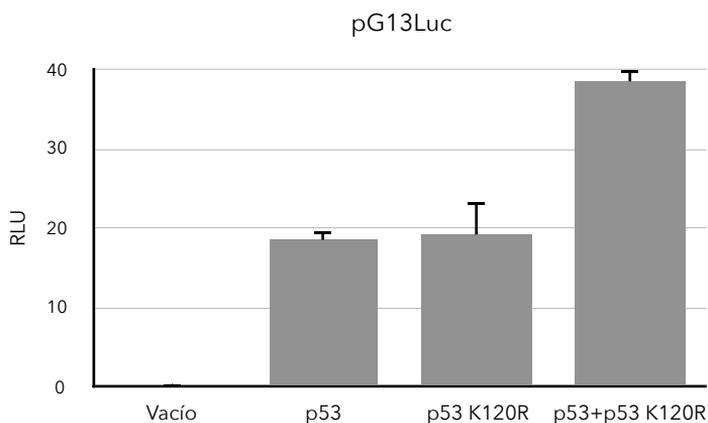
observar una variación tras el tratamiento con el inhibidor, nos pareció un resultado muy interesante que estudiar en profundidad. En nuestro rastreo, hemos encontrado un aumento de 13,7 veces en la modificación de una única lisina de p53, la K120, que es revertida parcialmente tras el tratamiento con MLN4924. Además, hemos encontrado modificaciones similares en la hidrolasa de ubiquitina USP7, que contrarresta el efecto desestabilizador de MDM2 y TRIM27 sobre p53, eliminando grupos ubiquitina (**tabla 21**). USP7 también se ha relacionado con resistencia a bortezomib en el mieloma múltiple (MM), por su acción desestabilizadora sobre IκBα (357).

Nombre Proteína	DMSO LLC vs Control	MLN4924 LLC vs Control	Sitio	Péptido
p53	13,7	7,5	120	LGFLHSGTAK*SVTCTYSPA LNK
USP7	13,2	7,7	1096	YTYLEK*AIK
USP7	4,2	-0,1	882	KLYYQQLK*MK
TP53RK	0,4	5,1	40	FLSGLELVK*QGAEAR

**Tabla 21: Tabla de las proteínas implicadas en la reparación del ADN y ubiquitinación que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.** En la tabla se muestran los datos de las diferentes proteínas que presentan unos valores de modificación significativos (cambios  $\geq 2,5$  veces). Primeramente la comparativa entre las muestras LLC y los controles sanos, y por otro lado los valores de modificación tras el tratamiento con MLN4924. Las últimas dos columnas muestran las lisinas concretas modificadas y los péptidos en los que se encuentran.

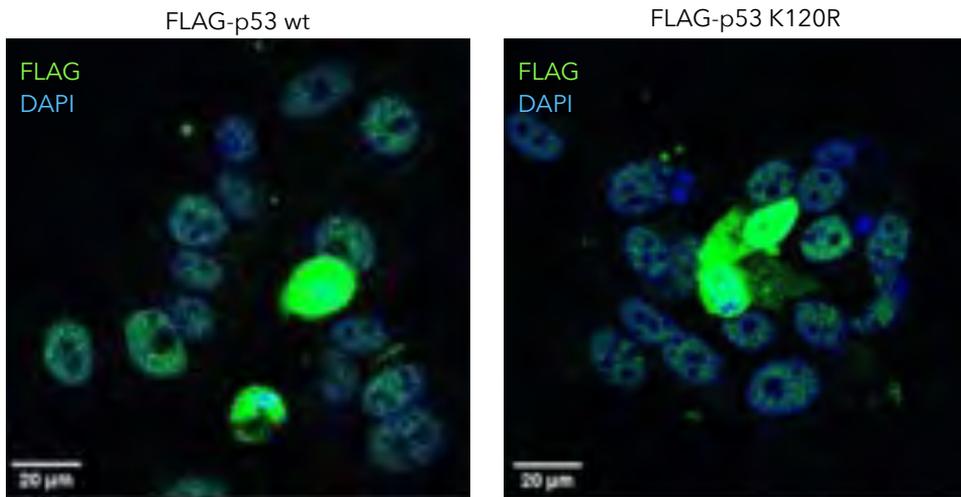
### 3.2.6.1. Estudio del efecto de la Neddilación sobre la función, estabilidad y localización subcelular de la proteína p53.

Para poder explicar la participación de la modificación de la lisina 120 de p53 en el fenotipo de la LLC llevamos a cabo experimentos in vitro. Hemos comenzado generando un mutante que cambiaba la lisina 120 por una arginina (K120R). Dado que la carga de ambos aminoácidos es similar, esperábamos que el mutante no cambiase mucho la conformación de la proteína. Para confirmarlo medimos la actividad transcripcional de ambos, transfectándolos junto con el vector testigo pG13Luc. Tanto la forma agreste de p53 como el mutante K120R promovieron la actividad luciferasa por igual, por lo que supusimos que la mutación no había producido grandes cambios conformacionales, tal y como se observa en la **figura 36**. Estos datos concuerdan con los de otros grupos que mostraron que la mutación K120R no afectaba a la función transcripcional de p53 sobre sitios de alta afinidad (390).



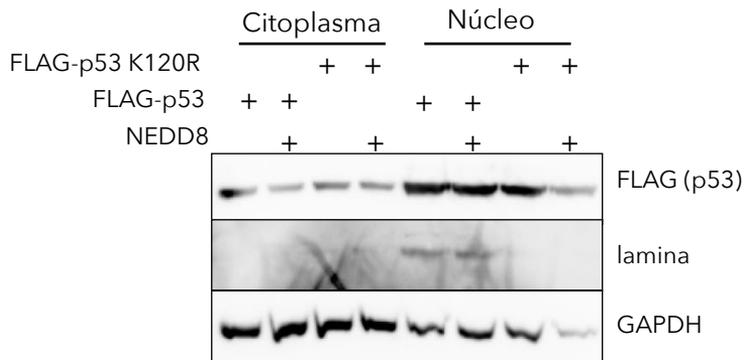
**Figura 36: El mutante K120R de la proteína p53 no afecta la actividad transcripcional de p53.** Efecto de p53 agreste y p53-K120R sobre la actividad de la proteína p53. Se transfectan células HEK293T con vectores de expresión para p53 wt y p53-K120R junto con pG13Luc. Se representan las actividades de luciferasa en relación con la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa transfectada como control interno (unidades de luciferasa relativas)  $\pm$  SD de tres determinaciones independientes.

Se ha descrito que las mutaciones de p53 en la región de unión al ADN, como ocurre en el caso de p53-K120R, afectan a su distribución intracelular, localizándose en mayor medida en el citoplasma (358). Por lo que para determinar la distribución de nuestro mutante, llevamos a cabo ensayos de inmunofluorescencia en células MCF7 transfectadas con la forma agreste de p53 y p53-K120R. Al microscopio confocal pudimos observar que ambas formas se localizaban principalmente en el núcleo, no apreciando cambios claros en la localización entre una forma y otra, como se puede observar en la **figura 37**.



**Figura 37: El mutante K120R de la proteína p53 no afecta la localización subcelular de p53.** La localización subcelular de p53 se determinó por inmunofluorescencia en células MCF7 transfectadas con un vector de expresión para p53 wt, junto con un plásmido de expresión para p53-K120R, ambos etiquetados con el epítipo FLAG. La proteína p53 se ha detectado con un anticuerpo secundario de fluorescencia verde (FITC), anti FLAG, mientras que el ADN se ha teñido con DAPI (azul) para la localización de los núcleos celulares.

De la misma manera, tras realizar ensayos de fraccionamiento celular por *Western Blotting*, tampoco observamos un cambio en la estabilidad de la proteína entre el citoplasma y el núcleo. En la **figura 38**, se puede apreciar como tanto la forma agreste como el mutante K120R tienen una localización muy similar, mayoritariamente nuclear.



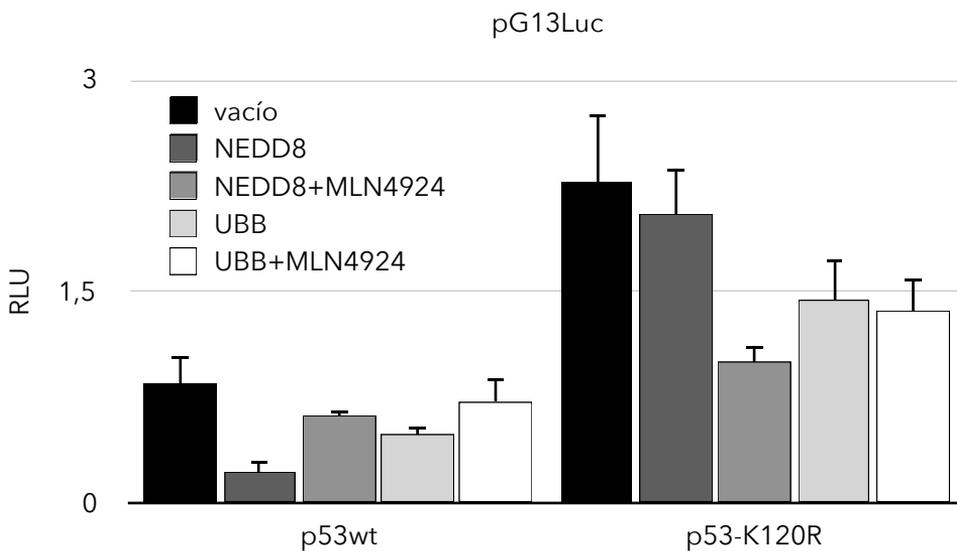
**Figura 38: El mutante K120R de p53 no afecta la estabilidad de la proteína p53.**

Se emplean células HEK293T transfectadas con plásmidos de expresión para las formas p53 wt y p53-K120R, junto con un vector de expresión para NEDD8. Se extraen las proteínas citoplasmáticas y nucleares y se analiza la estabilidad de p53 por *Western Blotting*. Como controles de carga se emplea Lamina para las proteínas nucleares y GAPDH para las citoplasmáticas. Se muestran los datos de un experimento representativo.

Por otro lado, la transfección de NEDD8 tampoco afectó a la localización subcelular de la proteína, como se puede apreciar en la **figura 38** (comparando las calles 2 y 4, en el citoplasma, y las calles 6 y 8 en el núcleo. La bajada que se observa en la calle 8 se debe a un error de carga, como revela el control empleado GAPDH).

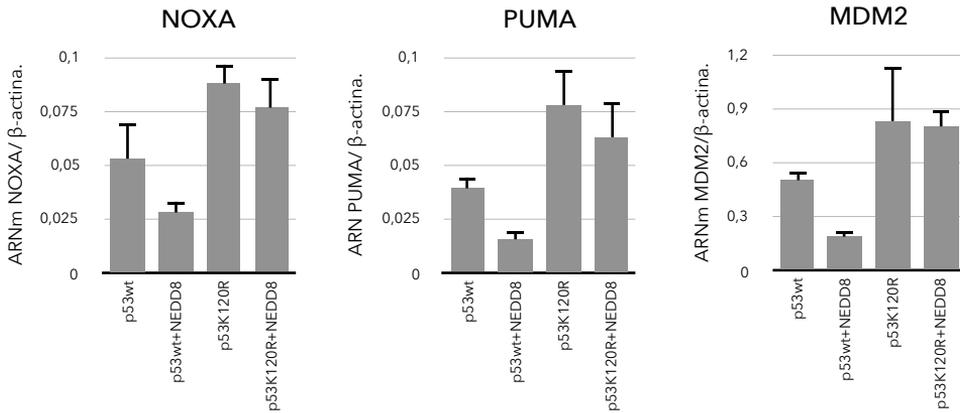
Ya que está descrito que la acetilación de la lisina 120 de p53, dentro del dominio de unión al ADN, es necesaria para la apoptosis mediada por p53, pero no así para la senescencia o el control del ciclo celular (359), quisimos investigar como influía la modificación por

NEDD8 de este residuo en la actividad de p53. Para ello, se utilizó de nuevo la construcción testigo pG13Luc y se cotransfectó con las construcciones p53 wt y p53-K120R, junto con plásmidos de expresión para NEDD8 o Ubiquitina, en presencia de MDM2. Como puede verse en la **figura 39**, la cotransfección de NEDD8 tuvo un profundo impacto en la transactivación de la construcción testigo por p53 wt, que se revertía tras la incubación con MLN4924. Por el contrario, la actividad del mutante no parecía verse afectada por la sobreexpresión de NEDD8, aunque curiosamente, la incubación con MLN4924 produjo una disminución en la actividad luciferasa de las células transfectadas con el mutante en presencia de NEDD8. La sobreexpresión de ubiquitina afectó por igual a la transactivación de ambas formas de p53, observándose una disminución de la actividad posiblemente debido a su degradación por el proteosoma.



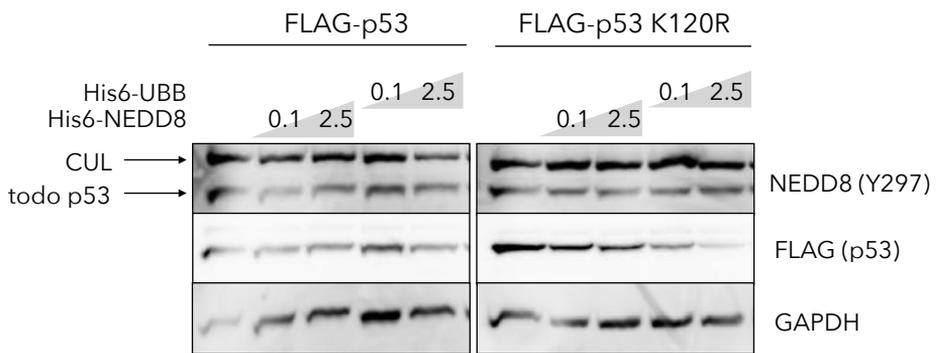
**Figura 39: La neddilación de la lisina 120 afecta a la función de la proteína p53.** Efecto de NEDD8 o Ubiquitina en la lisina 120 sobre la actividad de p53. Se transfectan células HEK293T con construcciones para p53 wt y p53-K120R, junto con el vector testigo pG13Luc y plásmidos de expresión para NEDD8 o Ubiquitina, en presencia o no de MLN4924 (0,25µM). Se representan las actividades de luciferasa en relación con la actividad de la β-galactosidasa transfectada como control interno (unidades de luciferasa relativas) ± SD de tres determinaciones independientes.

Investigamos también el efecto de la neddilación de la lisina 120 de p53 sobre la transcripción de sus genes dianas. Para ello, utilizamos la línea celular MEC1 derivada de un paciente LLC, y que alberga una delección del brazo corto del cromosoma 17. La transfección tanto de p53 agreste como de su mutante K120R se acompañó de altos niveles de los mensajeros de varios de sus genes diana, como PUMA, NOXA, o MDM2 (**figura 40**). Curiosamente, la cotransfección de NEDD8 indujo una reducción en los niveles de estos mensajeros inducida por p53 agreste. Sin embargo, NEDD8 no afectó a la inducción de estos genes mediada por el mutante K120R (**figura 40**).



**Figura 40: Efecto de la neddilación de K120 sobre la transcripción de genes diana de p53 en células MEC-1.** Análisis cuantitativo de la expresión de genes diana de p53 por RT-PCR. Se transfectaron  $2.10^6$  células MEC-1 por cada condición mediante electroporación, junto con plásmidos de expresión para p53 wt y p53-K120R, y un vector para NEDD8 en las muestras que se indique. Los valores de expresión se han relativizado frente a  $\beta$ -actina.

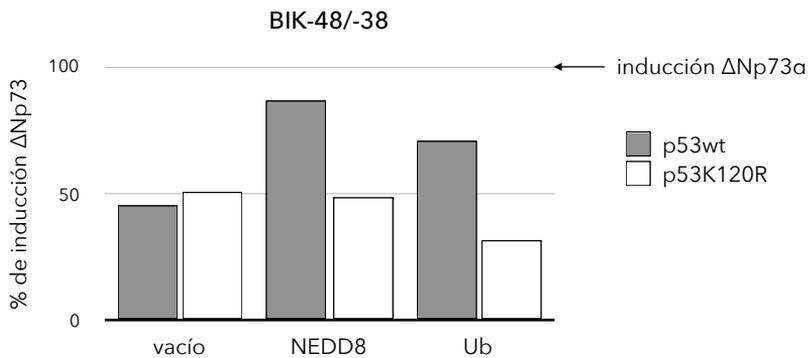
El efecto de NEDD8 sobre la actividad de p53 mediado por la lisina 120 podría deberse a diferentes efectos sobre la estabilidad, la localización subcelular o la capacidad de unión al ADN de la proteína. En primer lugar, transfectamos las formas p53 wt y p53-K120R etiquetadas con un epítipo FLAG en células HEK293T y estudiamos como la modificación por NEDD8 o ubiquitina afectaban a su estabilidad. En el *Western Blotting* que se muestra en la **figura 41**, puede verse como la neddilación de la lisina 120 de p53 no afecta a la estabilidad de la proteína, independientemente de la presencia o no de la mutación K120R. La co-expresión de ubiquitina, sin embargo, sí que afecta a la estabilidad de p53 wt, y en mayor medida a la de su mutante, observándose una disminución en la estabilidad dependiente de dosis.



**Figura 41: La neddilación de la lisina 120 no afecta a la estabilidad de la proteína p53.** Análisis de la estabilidad de la proteína p53 en presencia de NEDD8 o Ubiquitina mediante *Western Blotting*. Se transfectan células HEK293T con construcciones para p53 wt y p53-K120R etiquetadas con el epítipo FLAG, junto con plásmidos de expresión para NEDD8 (His6-NEDD8) o Ubiquitina (His6-UBB) en las muestras indicadas. Como control de carga se emplea GAPDH.

Dado que el dominio de unión al ADN participa en la dimerización de la proteína, investigamos si la neddilación de la lisina 120 de p53 afectaba a su interacción con otro miembro de la familia

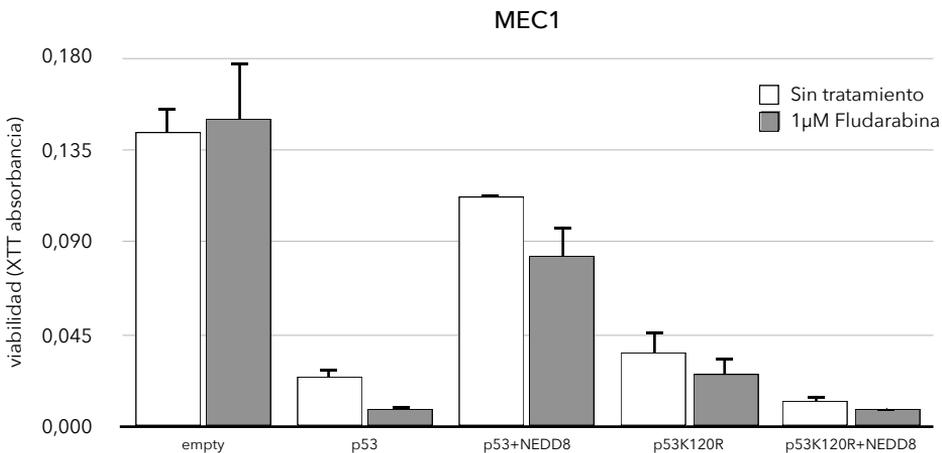
de p53 como es  $\Delta Np73$ . Para ello, empleamos la construcción testigo de respuesta a  $\Delta Np73$ , BIK -48/-38 (308) y estudiamos si la neddilación o ubiquitinación modificaban su represión por p53 wt ó p53-K120R,. Tanto p53 como su mutante redujeron a la mitad la transactivación de esta construcción testigo por  $\Delta Np73$ , lo que indica la interacción de ambas formas con  $\Delta Np73$  y la inhibición de su función. Sin embargo, la neddilación de p53 agreste produjo una interferencia con dicha inhibición que no se vio con el mutante, observándose un aumento en la transactivación de la construcción testigo como se muestra en la **figura 42**, sugiriendo que es la neddilación de la lisina 120 la que media el efecto inhibitorio. Por su lado, la ubiquitinación de p53 tuvo un efecto similar a la neddilación en la inducción de la expresión por  $\Delta Np73$ , aunque menos pronunciado, probablemente debido a la degradación de las proteínas.



**Figura 42: La modificación de la lisina 120 interfiere con el dominio de unión al ADN de la proteína p53, en su interacción con  $\Delta Np73$ .** Análisis de la transactivación de la construcción testigo de respuesta a  $\Delta Np73$ , BIK -48/-38. Se transfectan células HEK293T con construcciones para p53 wt y p53-K120R, junto con plásmidos de expresión para NEDD8 o Ubiquitina cuando se indica.

Finalmente, hemos iniciado experimentos para estudiar cómo influye la neddilación de la lisina 120 de p53 sobre la viabilidad y la respuesta a quimioterápicos. Para ello utilizamos la línea celular de LLC, MEC1 que es deficiente en p53, a la que restituimos p53 agreste o

el mutante K120R en presencia o ausencia de NEDD8, y analizamos su respuesta a fludarabina. Como puede verse en la **figura 43**, las células MEC1 son refractarias al tratamiento con 1 $\mu$ M de fludarabina. La transfección de p53, tanto en su forma agreste como mutada, indujo una profunda disminución en su viabilidad basal. Sin embargo, sólo las células transfectadas con p53 agreste respondieron al tratamiento con fludarabina, en concordancia con datos de otros grupos que recalcan la importancia de este residuo en la respuesta apoptótica de p53 (392). De forma llamativa, la neddilación tuvo un efecto diferencial sobre las células transfectadas con la forma agreste de p53 respecto al mutante K120R. La cotransfección de NEDD8 en presencia de MDM2 revirtió en gran medida tanto la viabilidad basal como la respuesta a fludarabina, pero no en células transfectadas con el mutante K120R. Estos datos, aún preliminares, mostrarían el profundo efecto que la neddilación de la lisina 120 de p53 tiene sobre la supervivencia de células B-LLC y por ende, sobre el pronóstico de los pacientes.



**Figura 43: La neddilación de la lisina 120 afecta a la viabilidad de las células B-LLC en respuesta a quimioterápicos como la Fludarabina.** Análisis de la viabilidad de células MEC-1 a partir de un ensayo representativo de viabilidad celular (XTT). Las células se transfectan mediante electroporación con plásmidos de expresión para p53 wt y p53-K120R, junto con un vector de expresión para NEDD8 en las muestras que se indique, en presencia de MDM2. Se incuban las células MEC-1, transfectadas con los plásmidos correspondientes, en presencia o no de Fludarabina 1 $\mu$ M durante 60 horas en una placa de 96 pocillos.



**V.**

**DISCUSIÓN.**



A día de hoy, la leucemia linfática crónica sigue siendo una enfermedad incurable, a pesar de todos los esfuerzos que se llevan realizando durante años para identificar una alteración genética única, y las causas moleculares que puedan explicar las características comunes que presentan los pacientes con LLC.

La característica molecular considerada como el principal problema que presentan las células B de la LLC es una apoptosis defectuosa (360), que debería iniciarse en respuesta a daños producidos en el ADN. Un desequilibrio entre las proteínas pro y anti apoptóticas, junto con la expresión de ciertas moléculas involucradas en las principales rutas de señalización descritas como afectadas en la LLC (225), y el entorno en el que residen estos linfocitos B, se consideran los factores principales que dan lugar a los defectos en la maquinaria de apoptosis. Además, la aparición de clones neoplásicos que favorecen la resistencia a los tratamientos empleados como la quimioinmunoterapia, y el elevado riesgo de padecer complicaciones infecciosas que pueden presentar estos pacientes, pone de manifiesto la necesidad de encontrar nuevos objetivos terapéuticos (361).

Por estas razones, dada la experiencia de nuestro laboratorio en el estudio de proteínas relacionadas con la reparación del daño en el ADN, y el hecho de que en la leucemia linfática crónica la inactivación del gen TP53 y la delección de ATM sean los dos peores factores pronóstico en esta patología (113) (314), ambos genes involucrados en la respuesta al daño en el ADN, nos centramos en el estudio de la función que podrían desempeñar otras proteínas relacionadas con la reparación del daño en el ADN, el control del ciclo celular y la apoptosis como son los genes FANC, en esta patología.

## 1. Estudio de la función que desempeña FANCA en la LLC.

En este trabajo, hemos analizado la expresión de un grupo de genes FANC en pacientes con LLC. Los genes FANC codifican un conjunto de proteínas no relacionadas estructuralmente, pero que forman un complejo denominado FANCCore, que se activa en respuesta al bloqueo de las horquillas de replicación y las roturas de doble hebra (316), procesos en los que también están involucrados ATM y p53. Por estas razones, comenzamos un rastreo de la expresión de los genes FANC, en la leucemia linfática crónica.

Mutaciones en cualquiera de los 22 genes FANC descritos hasta el momento, deja a las células propensas a la apoptosis y con una tasa de crecimiento más lenta (362) (366), de hecho, este fenotipo celular está detrás del agotamiento progresivo de células progenitoras hematopoyéticas en pacientes con Anemia de Fanconi (343). Sin embargo, en la leucemia linfática crónica ocurre una situación de alguna manera opuesta, ya que se acumulan células incapaces de ser auto eliminadas, debido a un fallo en su maquinaria de apoptosis (364).

El estudio de la expresión de los diferentes genes FANC se realizó en una cohorte de varios cientos de pacientes con LLC, pero finalmente el estudio combinado de 5 genes FANC se llevó a cabo en 101 pacientes con leucemia linfática crónica. Un tema importante a tener en cuenta fue la elección de los controles adecuados, y para ello se emplearon dos tipos. Linfocitos B obtenidos de amígdalas extirpadas a pacientes mediante resección quirúrgica, dada la facilidad con la que pueden extraerse. Sin embargo, ya que una patología como la LLC en la que la interacción con el estroma de los órganos linfoides se considera un factor importante de supervivencia de las células B

afectadas (110) (200), decidimos utilizar también células CD19+ circulantes aisladas a partir de muestras de donantes sanos (*buffy coats*), mediante un procedimiento inmunomagnético. Pudimos confirmar grandes diferencias en la expresión de determinados genes entre estos dos tipos de células controles, lo que apoya la idea de que la interacción de los linfocitos B con células de estroma de órganos linfoides induce la expresión de genes que favorecen su supervivencia. El análisis de la expresión de los diferentes genes FANC mostró diferencias significativas entre los distintos controles empleados y las muestras de células B patológicas, teniendo estas últimas una expresión más parecida a la de las células CD19+ circulantes sanas. Éste era el caso de los genes FANCI y sobretodo FANCA. De esta manera, la mayor expresión de FANCA en las células derivadas de las amígdalas la asociaría con una mayor supervivencia. De entre los pacientes analizados, encontramos un grupo cuya expresión de FANCA se asemejaba más a la de células B obtenidas de amígdala y decidimos estudiar si esta observación se asociaba con alguna característica clínica adversa. Para poder establecer una correlación entre nuestras observaciones y la posible evolución de los pacientes, cruzamos nuestros datos de expresión génica con los datos clínicos de los mismos recogidos por el servicio de hematología durante su diagnóstico y tratamiento. De esta manera, identificamos que una elevada expresión del gen FANCA estaba asociada con progresión de la enfermedad y con un tiempo menor hasta el tratamiento, o lo que es lo mismo, con un peor pronóstico. Fue interesante también observar que una elevada expresión de FANCA se asociaba con la delección 11q23, la segunda alteración citogenética más frecuente en la LLC, asociada al gen ATM y caracterizada por presentar grandes adenopatías (365) (366).

Hay artículos que describen que la sobreexpresión de genes FANC se asocia con la resistencia a la quimioterapia, como ocurre en el melanoma (367). La sobreactivación de la vía FA/BRCA se relaciona

con la resistencia a los agentes alquilantes en los gliomas (368), así como la sobreexpresión de FANCF se asocia con la resistencia a melfalán en el mieloma múltiple (328), y su desmetilación se ha relacionado con tumores de ovario y mama (324) (330).

Nuestros datos revelan una elevada expresión de FANCA en células B-LLC de un grupo de pacientes, por lo que nos propusimos buscar algún proceso celular que estuviese relacionado con el peor pronóstico que presentan estos. Nuestro primer objetivo fue analizar qué genes veían alterada su expresión por los altos niveles de expresión de FANCA en células B-LLC. Para ello forzamos la sobreexpresión de FANCA en células B-LLC mediante electroporación de un vector de expresión y analizamos el transcriptoma mediante RNAseq. Encontramos 265 genes significativamente afectados tras la transfección de las células B-LLC con FANCA, y observamos que 23 de los 25 genes encontrados clasificados como genes reguladores negativos de la muerte celular mostraban una regulación positiva, así como otros genes asociados a la progresión tumoral.

Está descrito que las células deficientes en genes FANCA presentan una mayor activación de p53 y p21 (343) (369), y de hecho, nuestros datos del transcriptoma de células con sobreexpresión de FANCA han mostrado importantes variaciones en la expresión de genes diana de p53. Por ello, nos planteamos si la sobreexpresión de FANCA que presentan ciertos pacientes LLC, podría relacionarse con una disminución de la función de p53. El empleo de células B-LLC transfectadas con FANCA nos permitió observar que la sobreexpresión de este gen se asociaba con una reducción en los niveles de ARNm de p21, aunque con variaciones entre los pacientes LLC analizados. p21 es un inhibidor de ciclinas y su disminución se suele asociar con mayor proliferación (283), lo que podría explicar la asociación de la sobreexpresión de FANCA con estadios más agresivos y de peor pronóstico en la LLC. Sin embargo, sí que se observó de forma general

una disminución en la expresión del ARNm de  $\Delta Np73$ , otra diana conocida de p53.  $\Delta Np73$  es una isoforma del supresor tumoral p73 truncada en el extremo N-terminal de la proteína. Puede generarse por un uso alternativo de los exones del gen  $Tp73$ , o transcribirse directamente desde su propio promotor  $P2p73$ , localizado en el tercer intrón del gen (306). El promotor  $P2p73$  contiene varios elementos de respuesta a p53, y se encuentra muy activado por p53. Los ensayos de luciferasa realizados muestran que esta inducción se ve disminuida con la sobreexpresión de FANCA, el mismo efecto que se observa sobre pG13Luc, un vector indicador de p53. Estos datos indican que FANCA está interfiriendo con la función de p53, y esta interferencia podría explicar el peor pronóstico de los pacientes con LLC que presentan la delección 11q23 y una sobreexpresión del gen FANCA, ya que tanto p53 como de  $\Delta Np73$ , promueven la detención del ciclo celular y la expresión de genes pro-apoptóticos como los pertenecientes a la familia de proteínas de Bcl-2 "sólo BH3" (308) (370) (371). De hecho, nuestros experimentos han demostrado que la transducción de un vector de expresión para FANCA en linfocitos B de pacientes LLC, o en líneas celulares linfoblastoides, aumentó su proliferación.

## 2. Relación entre las modificaciones postraduccionales y FANCA.

Las modificaciones postraduccionales de la proteína p53 se consideran importantes reguladores de su localización subcelular, estabilidad y función. La ligasa E3 de ubiquitina MDM2 media tanto la ubiquitinación como la neddilación de p53, inhibiendo su actividad transcripcional (65). En esta misma línea, NUB1 (*NEDD8 ultimate buster-1*), se ha descrito como un importante regulador de la función de p53, promoviendo su localización citoplasmática e inhibiendo su actividad transcripcional (345). Nuestros resultados muestran como la sobreexpresión de NUB1 desestabiliza p53, lo que se podría explicar porque cuando p53 se conjuga con NEDD8, se convierte en una diana para su degradación por el proteosoma mediada por NUB1 (346). De hecho, hemos observado que bloqueando la función del proteosoma con bortezomib, se acumula la proteína p53 neddilada en las células.

Se ha especificado que FANCA interactúa directamente con NUB1 (372), por lo que decidimos investigar un posible efecto directo de FANCA sobre la estabilidad de p53. En base a nuestros experimentos, hemos podido demostrar como FANCA y NUB1L colaboran en la degradación e inactivación funcional de p53 cuando se transfectan conjuntamente, mostrando por primera vez que FANCA colabora con la ligasa de ubiquitina E3 MDM2 en la ubiquitinación y degradación de p53. Sin embargo, aunque en la página *Entrez Gene* de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2175>) de FANCA, NUB1 aparece como una de las proteínas que interactúa con FANCA en ensayos de dobles híbridos (372), no pudimos demostrar una interacción directa entre estas dos proteínas, ni mediante ensayos de coimmunoprecipitación ni utilizando un sistema de dobles híbridos. Una observación más detallada nos permitió darnos cuenta de que el

número de acceso y la descripción funcional indicados en el artículo original correspondían al gen NUBP1 en lugar de NUB1.

En conjunto, nuestros resultados parecen indicar que tanto NUB1L como FANCA colaboran en la desestabilización de p53, posiblemente mediante mecanismos implicados en su regulación mediada por MDM2, y no a través de su interacción (373). La localización subcelular de la proteína p53 parece también estar regulada por la colaboración de FANCA y NUB1L. Liu et al. ya describieron que NUB1 interfería con la función de p53 promoviendo su exportación nuclear (345), algo que nosotros hemos podido comprobar, y mostrar por primera vez la colaboración de la proteína FANCA en ese mecanismo, observando un cambio de la localización subcelular de p53 al citoplasma tras la transfección de ambas proteínas.

En resumen, en este estudio hemos descrito que la elevada expresión de FANCA puede considerarse como un nuevo marcador pronóstico de la leucemia linfocítica crónica, relacionado con la deleción conocida previamente 11q23. Hemos profundizado en los mecanismos moleculares que están detrás de este marcador de mal pronóstico y hemos revelado una interferencia directa, previamente desconocida, de FANCA con la estabilidad y función de p53.

### **3. Estudio del papel de las modificaciones postraduccionales, y en especial la neddilación, en la Leucemia Linfática Crónica.**

El complejo FANCCore es una E3 ligasa multiproteica encargada de la monoubiquitinación de las proteínas FANCD2 y FANCI en respuesta al atasco de las horquillas de replicación (34) (35) (36). Sin embargo, recientemente se ha descrito una función de la proteína FANCA en la neddilación de CXCR5 y otras proteínas de membrana (339), varias de las cuales son marcadores pronóstico en la leucemia linfática crónica. Para obtener una visión general del alcance e importancia de las modificaciones postraduccionales en la etiología de la leucemia linfática crónica, decidimos realizar un rastreo completo de todas las proteínas modificadas en la LLC. Este estudio se llevó a cabo en muestras de pacientes LLC mediante la plataforma UbiScan de *Cell Signaling Technology*, que ha sido ampliamente utilizada en el rastreo de modificaciones postraduccionales en otras patologías (377) (405) (406) y en el estudio del papel de la proteína FANCA en la neddilación (339).

Nuestros datos muestran un aumento en las modificaciones postraduccionales en células B-LLC con respecto a linfocitos B circulantes sanos. La neddilación es una modificación postraducciona implicada en el desarrollo de varias neoplasias malignas, tanto hematológicas como de tumor sólido (57) (53) (54) (55) (374). Las herramientas disponibles hasta la fecha, básicamente el anticuerpo UbiScan, impiden hacer una selección positiva de neddilación, ya que detectan a la vez residuos comunes a la ubiquitinación, la isgилación y la neddilación. Por esta razón, para tratar de diferenciar las modificaciones por neddilación del resto de modificaciones detectadas en nuestro estudio, empleamos muestras pareadas tratadas o no con el inhibidor de la neddilación MLN4924. Este inhibidor se

está probando en ensayos clínicos para el tratamiento de diferentes tipos de tumores (88) (90) (97). Hay artículos que ya han mostrado el efecto citostático que puede tener este inhibidor sobre las células B-LLC ex vivo, potenciando la acción de los agentes alquilantes y los fármacos que se emplean en la actualidad en el tratamiento de esta patología, como el ibrutinib y el idelalisib (91). Por otra parte, nos fue de gran ayuda comparar nuestros datos con los sitios de ubiquitinación auténticos descritos por Akimov et al. en su estudio del ubiquitinoma humano (350), identificados con un anticuerpo específico para esta modificación. De esta manera, razonamos que la doble comparativa nos identificaría neddilaciones verdaderas.

Nuestra selección identificó numerosas proteínas implicadas en prácticamente todas las rutas descritas como alteradas en la LLC, que mostraban un incremento en su modificación, reversible, al menos parcialmente, por tratamiento con MLN4924, lo que apoyó la idea de que la neddilación se encuentra elevada en la leucemia linfática crónica.

El hecho de que las cullinas y otras proteínas relacionadas con la neddilación apareciesen entre los péptidos modificados, y que esa modificación disminuyera con el inhibidor, respaldó nuestra estrategia de emplear el MLN4924 como primera aproximación para identificar dianas de neddilación en la LLC. También observamos que el péptido NEDD8 se encontraba entre las proteínas con más residuos de lisina modificados en nuestra selección, dato que indica la existencia de procesos de poli-neddilación ramificada o la formación de conjugados híbridos NEDD8-ubiquitina (13) (42).

Entre las principales proteínas descritas como importantes en el fenotipo de la LLC se encuentran las implicadas en la remodelación de la cromatina. Las histonas constituyen un componente estructural clave para el correcto empaquetamiento del material genético en el núcleo

celular, que afecta a su accesibilidad para la maquinaria transcripcional y, por tanto, a la expresión génica. Entre las características morfológicas más notables de las células B-LLC están una alta condensación de su cromatina, la ausencia de nucleolos y un citoplasma bastante reducido (375). Encontrar en nuestro rastreo un elevado número de histonas altamente modificadas en la LLC y sensibles a ML4924, nos hizo pensar que la neddilación podría relacionarse con la condensación de la cromatina característica de esta patología, hecho que puede impedir la expresión de ciertos genes supresores de tumores como p53, lo que explicaría el peor pronóstico de estos pacientes. Está descrito que la elevada expresión de HDAC1 (histona deacetilasa) en pacientes LLC se relaciona con un peor pronóstico (403), ya que la acetilación estaría favoreciendo la descondensación de la cromatina, y en consecuencia mejorando el pronóstico de estos pacientes. Cabe hipotetizar que la competencia de la neddilación por las lisinas diana de acetilación afecte a la condensación de la cromatina en células LLC.

Los linfocitos proliferantes en esta patología son especialmente frágiles, y se rompen con facilidad tras realizar las extensiones sanguíneas, dando lugar a las denominadas sombras de Gumprecht (108). Por esta razón, las proteínas del citoesqueleto constituyen otro grupo de proteínas muy importante en el fenotipo de la LLC. En nuestro estudio, observamos que ciertas proteínas del citoesqueleto mostraban una elevada modificación en las muestras de LLC, cuyos niveles disminuían tras el tratamiento con MLN4924. Este es el caso de la vimentina, entre otras, encargada de proporcionar el soporte estructural a los linfocitos circulantes (353). Los niveles elevados de esta proteína se correlacionan con menos sombras de Gumprecht, y por lo tanto con un peor pronóstico.

Nuestros resultados del análisis de las extensiones realizadas a partir de sangre periférica de 3 pacientes, sin tratamiento y tratadas

durante 4 horas con MLN4924, mostraron en 2 de los pacientes un aumento en el recuento de sombras de Gumprecht tras el tratamiento con MLN4924, dato que puede concordar con el mejor pronóstico que presentan aquellos pacientes con mayor número de sombras, aunque estos datos son observaciones muy preliminares, por lo que para sacar conclusiones más decisivas habría que realizar estos estudios aumentando el número de pacientes, algo que ya se está llevando a cabo en el laboratorio.

Igualmente, el *splicing* de ARN es un proceso postranscripcional que consiste en la eliminación de intrones del transcrito primario, y en el empalme de los exones que generen las proteínas que la célula necesite en cada situación. Este proceso es catalizado por el spliceosoma, y una serie de proteínas que participan en el procesamiento del ARN, como es el caso de la proteína SF3A1 (378), entre otros factores de empalme. En nuestro estudio hemos encontrado esta proteína modificada positivamente en dos lisinas, observándose una disminución en la modificación tras el tratamiento con el inhibidor de la neddilación. Estas observaciones podrían correlacionar con la importancia que tiene el mantenimiento estructural de esta proteína, ya que mutaciones puntuales en algunas de sus regiones se asocian con enfermedades hematológicas, como los síndromes mielodisplásicos y ciertos tipos de leucemias (379).

Entre las principales rutas descritas como alteradas en la LLC se encuentra la del receptor de célula B. La señalización de BCR promueve la proliferación y supervivencia de las células B patológicas (110), y su sobreexpresión se ha relacionado con los principales factores de mal pronóstico en la LLC (219). Es por estas razones que en los últimos años, el BCR se ha convertido en una de las principales dianas terapéuticas, desarrollándose fármacos dirigidos al bloqueo de sus vías de señalización, como Ibrutinib (255) e Idelalisib (256). En esta misma línea, hay artículos que describen una actividad antitumoral

sinérgica del inhibidor de la neddilación con éstos fármacos (91). Encontrar en nuestro rastreo modificaciones positivas de múltiples lisinas pertenecientes tanto a la bruton tirosin quinasa (BTK), como a otras quinasas reclutadas por el BCR, SYK y LYN, nos mostró la importancia que puede llegar a tener la modificación de estas proteínas en el desarrollo de la patología. Sin embargo, todas estas modificaciones se incrementaban tras el tratamiento con MLN4924, lo que parece indicar que su regulación por neddilación es compleja. De hecho, ya se han descrito muchas de las lisinas modificadas en nuestro rastreo como ubiquitinaciones, información que se puede obtener en la página <https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=618&showAllSites=true>, en la que muestran los residuos modificados por alguna PTM en las proteínas, como acetilaciones, fosforilaciones y ubiquitinaciones, entre otras. Por ejemplo, en el caso de la quinasa BTK, aparecen ya identificadas las lisinas K322, K406, K536, K558 como ubiquitinadas, así como para la proteína SYK, ya se han descrito ubiquitinadas las lisinas K60, K509, K517, K587 y acetiladas las lisinas K105, K116, K402, y en el caso de la proteína LYN, las lisinas K9 y K20 aparecen como modificadas por ubiquitinación. La competencia entre todas estas modificaciones por las mismas lisinas, así como el efecto cruzado sobre proteínas reguladoras de estos procesos, podrían explicar la respuesta de las mismas al MLN4924. Es de enorme interés indagar en estas observaciones, dada la relevancia de las rutas activadas por BCR en la LLC (110).

Una de estas rutas es la vía de supervivencia de NF- $\kappa$ B, que se encuentra constitutivamente activada en la LLC, hecho que se relaciona también con las interacciones que se producen entre las células B-LLC y el microambiente tumoral (269), activándose una serie de genes anti-apoptóticos (380). En nuestro estudio del transcriptoma llevado a cabo en células B-LLC, tratadas o no con el inhibidor de la neddilación, observamos que el MLN4924 alteraba la expresión de muchos genes diana conocidos de NF- $\kappa$ B, y curiosamente, el 80,8% de esos genes

eran reprimidos por la acción del inhibidor, mientras que sólo un 19,2% aumentaban la expresión de su mensajero. Estos datos concuerdan con lo descrito por autores como Godbersen et al. (91) y apuntan a que la ruta NF- $\kappa$ B es un importante mediador del efecto del MLN4924 sobre la viabilidad de las células B en la LLC. Estos autores, basan el efecto de la inhibición de la neddilación sobre la ruta NF- $\kappa$ B en la estabilización que produce sobre la proteína I $\kappa$ B fosforilada, sugiriendo que se ve afectada su ubiquitinación y degradación en el proteosoma. Sin embargo, llama la atención que en su artículo no muestran la cantidad de proteína I $\kappa$ B total, tan solo la forma fosforilada. Nuestros datos parecen indicar que MLN4924 no es un buen estabilizador de la proteína I $\kappa$ B, especialmente comparado con el robusto efecto de bortezomib, un inhibidor del proteosoma, sobre la misma. Nuestro rastreo ha revelado modificaciones en tres proteínas involucradas en la activación de NF- $\kappa$ B por TNF $\alpha$ , como son TANK, IKK $\beta$  y NEMO, que conforman un complejo ternario que participa en la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B, y por lo tanto en la activación de NF- $\kappa$ B por la vía canónica (264). Encontrar estas proteínas modificadas en nuestro estudio apunta a un nuevo mecanismo de influencia de la neddilación sobre la ruta NF- $\kappa$ B, que regularía la fosforilación de I $\kappa$ B.

Entre las anomalías moleculares descritas como más recurrentes en la LLC, encontradas tras realizar el análisis del genoma completo y compararlo con las características y resultados clínicos, se encuentra la desregulación de la vía de señalización de Notch (123). Aquellos pacientes con LLC que presentan Notch1 mutado, entorno a un 12%, se asocian con un peor pronóstico de la enfermedad (381), aunque a día de hoy se desconoce su regulación (278). En nuestro estudio no hemos encontrado ninguna diana entre los miembros de esta ruta, pero sí proteínas que podrían modular la actividad de la ruta Notch, como es el caso de la proteína MIB1. Esta proteína es una ligasa de ubiquitina E3-RING que induce la actividad de la ruta Notch mediante la ubiquitinación y endocitosis de sus ligandos (354) (355),

mientras que la represión de MIB1 reduce la activación de la ruta de señalización. En nuestro rastreo esta proteína se encuentra altamente modificada, y esos niveles de modificación disminuyen tras el tratamiento con MLN4924, por lo que pudiera ser que esta variación en su modificación afectase a la desregulación de la ruta Notch en la LLC. Por otro lado, entre los factores de transcripción modificados en nuestro estudio, se encontraron las proteínas Aiolos e Íkaros, reguladores de genes diana de Notch. Estas proteínas mostraban una reducción en su modificación potenciada aún más tras el tratamiento con MLN4924. El factor de transcripción Íkaros regula la expresión de genes encargados de controlar la progresión del ciclo celular y la supervivencia (356). La expresión de Íkaros se reduce al sistema hemo-linfopoyético, y la pérdida de su actividad puede contribuir al desarrollo de neoplasias hematológicas como la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Igualmente, la proteína Aiolos se expresa en células B maduras y es homóloga a Íkaros (382). Es necesario determinar el efecto de las modificaciones encontradas en la LLC sobre la actividad de estas proteínas, lo que nos permitirá un mejor entendimiento de esta enfermedad y el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

El fracaso de las terapias convencionales empleadas en el tratamiento de la leucemia linfática crónica se debe principalmente a procesos de apoptosis defectuosos, que se inician en respuesta a diferentes daños producidos en el ADN, como las roturas de doble hebra (DSB) y de cadena sencilla (287). Ya se ha descrito que la reparación del ADN es uno de los procesos regulado por neddilación, y de hecho, en nuestro rastreo encontramos varias proteínas implicadas en reparación modificadas por neddilación. Entre ellas detectamos modificaciones en el heterodímero Ku, un complejo proteico de reparación de ADN por unión de extremos no homólogos (NHEJ) (335), formado por subunidades de 70 y 80 kDa, modificado en varias de sus lisinas.

La proteína p53 también ha aparecido en nuestro rastreo como altamente modificada en la lisina 120 (K120), disminuyendo esa modificación tras el tratamiento con MLN4924. Esta proteína se encuentra inactiva en la mayoría de los cánceres humanos, bien por mutación, cambio en la localización citoplasmática o por un aumento de las interacciones con su regulador negativo MDM2 (383) (384), entre otras, por lo que conocer su regulación y las posibles alteraciones que presenta esta proteína en cáncer es fundamental (385). La mutación de esta proteína constituye uno de los principales cambios genómicos en los tumores (300) (298), considerándose en la LLC uno de los principales factores de mal pronóstico (113) (315). p53 promueve la supresión tumoral a través de su capacidad como factor de transcripción que se activa mediante modificaciones postraduccionales, como la ubiquitinación, fosforilación, acetilación, sumoilación, metilación y neddilación (310) (386) (387) (388) (389). La regulación transcripcional que ejerce esta proteína tiene una función muy importante, provocando la detención del ciclo celular ante un daño producido en el ADN y facilitando así la reparación de las células dañadas, o induciendo la apoptosis cuando el ADN se ha dañado de forma irreparable (390). De esta manera, la proteína p53 ayuda al mantenimiento de la estabilidad genómica, y es por eso que se le conoce como el “guardián del genoma” (391).

La proteína p53 puede acetilarse en varias lisinas, localizadas principalmente en su extremo C-terminal, aunque también en la lisina 120 que se encuentra dentro del dominio de unión al ADN (392). Hay artículos que describen la importancia que tiene la lisina 120 en la función de p53 como supresor tumoral, ya que la acetilación de este residuo dentro del dominio de unión al ADN aumenta la estabilidad de la proteína p53, permite la asociación con otras proteínas, y es necesaria para las respuestas ante el daño en el ADN, y por lo tanto, para la apoptosis mediada por p53 (359) (393) (394). De forma que la mutación y pérdida de este residuo en los cánceres humanos anula

completamente la apoptosis dependiente de p53 (395). Para poder averiguar si la modificación de este residuo se podía relacionar con el fenotipo de la LLC, generamos un mutante cambiando la lisina 120 por una arginina (K120R), mutación que no cambiaba aparentemente la conformación de la proteína. A partir de ensayos realizados con las formas agreste y mutada de p53, hemos estudiado cómo la neddilación de este residuo influye sobre la función de p53 y el fenotipo celular de la LLC .

Los resultados obtenidos hasta el momento, derivados de ensayos preliminares que se han realizado en el laboratorio, muestran que la mutación en sí no tuvo efecto sobre la actividad transcripcional de la proteína p53. Tampoco sobre su localización subcelular. Esto contrasta con lo publicado por otros autores, que describen que ciertos mutantes de p53 se localizan en el citoplasma, mostrando mayor susceptibilidad a sufrir ubiquitinaciones, tanto en las lisinas que se encuentran en el extremo C-terminal como en el dominio de unión al ADN. Sin embargo, hay lisinas cuyas mutaciones pueden inhibir la ubiquitinación, y por lo tanto rescatar la localización nuclear de la proteína (358). Hecho que podría explicar que no observemos cambios significativos en la localización intracelular de nuestro mutante p53-K120R, con respecto a la forma p53 agreste.

Ya que parece que la modificación por acetilación de la lisina 120 es clave para que la proteína p53 ejerza su función como supresor tumoral, nos preguntamos qué ocurría cuando se modificaba este residuo por NEDD8. Nuestros datos indican una potente regulación de p53 a través de la neddilación de la lisina 120, ya que afecta a la supervivencia de las células B y a su respuesta a quimioterápicos como la fludarabina. Pero son varios los posibles mecanismos por los cuales esta PTM podría estar afectando a la actividad de la proteína p53. Para intentar determinar el proceso, primeramente decidimos analizar cómo afectaba la neddilación a la estabilidad de la proteína p53. Tras el

análisis de los extractos celulares, lo que observamos fue que la neddilación de la proteína p53 no afectaba a su estabilidad, independientemente de la presencia de la mutación. Sin embargo, la ubiquitinación sí que provocaba una disminución dependiente de dosis en la estabilidad de la proteína, más pronunciada en el caso de la forma mutada. Tras descartar una posible regulación a través de cambios en la estabilidad de la proteína y cambios en su localización subcelular, nos planteamos la posibilidad de que el péptido NEDD8 pudiera estar interfiriendo con la unión al ADN de la proteína p53. Para responder a esta pregunta llevaremos a cabo ensayos de tipo CHIP y ELISA, que no han podido realizarse aún en el momento de escritura de esta tesis. Pero sí hemos podido aportar datos que indican que la neddilación de la lisina 120 afecta a la dimerización de la proteína, a través de un experimento en el que se demostraba que la modificación de este residuo interfiere con la inhibición que ejerce p53 sobre la transactivación de un elemento de respuesta a  $\Delta Np73$ .

Los resultados obtenidos hasta el momento en el laboratorio sobre la relevancia que puede tener la neddilación de la lisina 120 de p53 en la LLC, y teniendo en cuenta lo que ya está descrito en cuanto a la importancia que tiene la acetilación de la misma (359), nos lleva a plantear que pueda existir una competencia entre la acetilación y la neddilación de esa lisina en esta patología. Hay artículos que describen que NAT10 acetila p53 en K120 en respuesta al daño producido en el ADN, aumentando la afinidad de p53 por sitios en los promotores de genes pro-apoptóticos, lo que correlacionaría con la idea de que una neddilación de la lisina 120 bloquee su acetilación y por tanto la actividad pro-apoptótica de p53 en células B-LLC (359) (393). Curiosamente, NAT10 es una proteína acetiltransferasa nucleolar (407), y sabemos que la variante más típica de la LLC carece de nucleolos, lo que podría afectar a la acción que NAT10 ejerce sobre la funcionalidad de p53, quizá alterando el equilibrio entre acetilación y neddilación.

A modo de resumen, este trabajo de tesis muestra que las modificaciones postraduccionales desempeñan una función importante en la etiología de la leucemia linfática crónica. Por un lado, hemos encontrado que la sobreexpresión del gen FANCA es un marcador de mal pronóstico en esta patología. FANCA participa en la degradación de p53 mediada por MDM2. Por otro lado, nuestro rastreo muestra que la LLC presenta un nivel elevado de modificaciones postraduccionales, algunas de las cuales se revierten por la acción del inhibidor de la neddilación MLN4924. Este aumento de las PTM afecta a miembros de las rutas de señalización descritas como afectadas en la LLC. Hemos iniciado la caracterización de la modificación encontrada en la proteína p53 en LLC, y nuestro datos indican que puede tratarse de una neddilación que interfiere con la función de p53.

**VI.**

**CONCLUSIONES.**



1. La expresión elevada de las proteínas FANCA y FANCI se puede correlacionar con la interacción de las células B-LLC con el estroma de los órganos linfoides, un factor de supervivencia conocido para estas células.
2. La expresión elevada de las proteínas FANCA y FANCF se ha asociado estadísticamente con progresión de la enfermedad.
3. La sobreexpresión de FANCA se relaciona estadísticamente con la del 11q23 y una menor supervivencia libre de progresión en los pacientes con LLC.
4. La sobreexpresión de FANCA podría considerarse un marcador de mal pronóstico en la LLC.
5. La sobreexpresión de FANCA regula positivamente la expresión de muchos genes de supervivencia celular.
6. La sobreexpresión de FANCA bloquea la expresión de genes diana de p53 como p21 y  $\Delta Np73$ , lo que podría explicar la asociación de la sobreexpresión de FANCA con progresión y peor pronóstico de los pacientes con LLC.
7. FANCA colabora con la ubiquitinación y degradación de p53 mediada por MDM2. La disminución de la estabilidad de p53 se correlaciona con el aumento en la proliferación de células B-LLC.
8. Las proteínas FANCA y NUB1L participan en la estabilidad y localización subcelular de p53.

9. La LLC presenta un nivel elevado de Modificaciones postraduccionales, algunas de las cuales se revierten por la acción del inhibidor de la neddilación MLN4924.
10. El aumento en las PTM afecta a miembros de las rutas de señalización descritos como alterados en la LLC.
11. La neddilación de la lisina 120 modula la función de la proteína p53, inhibiendo la transcripción de algunos de sus genes diana con función pro-apoptótica, como PUMA y NOXA en células LLC.
12. La neddilación de la lisina 120 de p53 no afecta a su estabilidad, ni a su localización subcelular.
13. La neddilación de la lisina 120 interfiere con la dimerización del p53.
14. La neddilación de la lisina 120 afecta a la viabilidad de las células B-LLC en respuesta a quimioterápicos como la Fludarabina.

**VII.**

**BIBLIOGRAFÍA.**



1. Kho Y, Kim SC, Jiang C, Barma D, Kwon SW, Cheng J, et al. A tagging-via-substrate technology for detection and proteomics of farnesylated proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Aug 24;101(34):12479-84.
2. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*. Nature Publishing Group; 2003 Mar;21(3):255-61.
3. Deribe YL, Pawson T, Dikic I. Post-translational modifications in signal integration. *Nature Structural & Molecular Biology*. Nature Publishing Group; 2010 Jun;17(6):666-72.
4. Hunter T, Cooper JA. Protein-tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA; 1985;54(1):897-930.
5. Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci*. 2002 Oct;27(10):514-20.
6. van der Veen AG, Ploegh HL. Ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Biochem*. 2012;81(1):323-57.
7. Ravid T, Hochstrasser M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2008 Sep;9(9):679-90.

8. Gareau JR, Lima CD. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nature Publishing Group; 2010 Dec;11(12):861-71.
9. Schreiber A, Peter M. Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jan;1843(1):163-81.
10. Villarroya-Beltri C, Guerra S, Sánchez-Madrid F. ISGylation - a key to lock the cell gates for preventing the spread of threats. *Journal of Cell Science.* The Company of Biologists Ltd; 2017 Sep 15;130(18):2961-9.
11. Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Aug;6(8):599-609.
12. Enchev RI, Schulman BA, Peter M. Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nature Publishing Group; 2015 Jan;16(1):30-44.
13. Leidecker O, Xirodimas DP. Isolation of NEDDylated proteins in human cells. *Methods Mol Biol.* Totowa, NJ: Humana Press; 2012;832(Chapter 8):133-40.
14. Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Yeh ET. Characterization of NEDD8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein. *J Biol Chem.* 1997 Nov 7;272(45):28557-62.
15. Swatek KN, Komander D. Ubiquitin modifications. *Cell Res.* Nature Publishing Group; 2016 Apr;26(4):399-422.

16. Koepp DM, Harper JW, Elledge SJ. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*. 1999 May 14;97(4):431-4.
17. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16(1):225-60.
18. Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol*. 1999;17(1):739-79.
19. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*. 2001;70(1):503-33.
20. Spence J, Gali RR, Dittmar G, Sherman F, Karin M, Finley D. Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell*. 2000 Jul 7;102(1):67-76.
21. Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *Journal of Cell Science*. The Company of Biologists Ltd; 2012 Feb 1;125(Pt 3):531-7.
22. Haglund K, Dikic I. Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J*. John Wiley & Sons, Ltd; 2005 Oct 5;24(19):3353-9.
23. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998;67(1):425-79.
24. Hua Z, Vierstra RD. The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annu Rev Plant Biol*. Annual Reviews; 2011;62(1):299-334.

25. Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy VA, Orth A, et al. Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. Ploegh H, editor. PLoS ONE. Public Library of Science; 2008 Jan 23;3(1):e1487.
26. Kirkin V, Dikic I. Ubiquitin networks in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2011 Feb;21(1):21-8.
27. Rotin D, Kumar S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nature Publishing Group; 2009 Jun;10(6):398-409.
28. Huang L, Kinnucan E, Wang G, Beaudenon S, Howley PM, Huibregtse JM, et al. Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science.* 1999 Nov 12;286(5443):1321-6.
29. Staub O, Dho S, Henry P, Correa J, Ishikawa T, McGlade J, et al. WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na<sup>+</sup> channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J.* European Molecular Biology Organization; 1996 May 15;15(10):2371-80.
30. Kanelis V, Rotin D, Forman-Kay JD. Solution structure of a Nedd4 WW domain-ENaC peptide complex. *Nat Struct Biol.* Nature Publishing Group; 2001 May;8(5):407-12.
31. Garcia-Gonzalo FR, Rosa JL. The HERC proteins: functional and evolutionary insights. *Cell Mol Life Sci.* Birkhäuser-Verlag; 2005 Aug;62(16):1826-38.

32. Zheng N, Wang P, Jeffrey PD, Pavletich NP. Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell*. 2000 Aug 18;102(4):533-9.
33. Brzovic PS, Rajagopal P, Hoyt DW, King MC, Klevit RE. Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. *Nat Struct Biol*. Nature Publishing Group; 2001 Oct;8(10):833-7.
34. Machida YJ, Machida Y, Chen Y, Gurtan AM, Kupfer GM, D'Andrea AD, et al. UBE2T is the E2 in the Fanconi anemia pathway and undergoes negative autoregulation. *Mol Cell*. 2006 Aug;23(4):589-96.
35. Alpi AF, Pace PE, Babu MM, Patel KJ. Mechanistic insight into site-restricted monoubiquitination of FANCD2 by Ube2t, FANCL, and FANCI. *Mol Cell*. 2008 Dec 26;32(6):767-77.
36. Alpi A, Langevin F, Mosedale G, Machida YJ, Dutta A, Patel KJ. UBE2T, the Fanconi anemia core complex, and FANCD2 are recruited independently to chromatin: a basis for the regulation of FANCD2 monoubiquitination. *Mol Cell Biol*. 2007 Dec;27(24):8421-30.
37. Petroski MD, Deshaies RJ. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2005 Jan;6(1):9-20.
38. Watson IR, Irwin MS, Ohh M. NEDD8 pathways in cancer, Sine Quibus Non. *Cancer Cell*. 2011 Feb 15;19(2):168-76.
39. Zhao Y, Sun Y. Cullin-RING Ligases as attractive anti-cancer targets. *Curr Pharm Des*. NIH Public Access; 2013;19(18):3215-25.

40. Hochstrasser M. There's the rub: a novel ubiquitin-like modification linked to cell cycle regulation. *Genes Dev.* 1998 Apr 1;12(7):901-7.
41. Pan Z-Q, Kentsis A, Dias DC, Yamoah K, Wu K. NedD8 on cullin: building an expressway to protein destruction. *Oncogene.* Nature Publishing Group; 2004 Mar 15;23(11):1985-97.
42. Xirodimas DP. Novel substrates and functions for the ubiquitin-like molecule NEDD8. *Biochem Soc Trans.* Portland Press Limited; 2008 Oct;36(Pt 5):802-6.
43. Lee J, Zhou P. Cullins and cancer. *Genes Cancer.* SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA; 2010 Jul;1(7):690-9.
44. Michel JJ, Xiong Y. Human CUL-1, but not other cullin family members, selectively interacts with SKP1 to form a complex with SKP2 and cyclin A. *Cell Growth Differ.* 1998 Jun;9(6):435-49.
45. Stebbins CE, Kaelin WG, Pavletich NP. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science.* 1999 Apr 16;284(5413):455-61.
46. Pintard L, Willis JH, Willems A, Johnson J-LF, Srayko M, Kurz T, et al. The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature.* Nature Publishing Group; 2003 Sep 18;425(6955):311-6.
47. Furukawa M, He YJ, Borchers C, Xiong Y. Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol.* Nature Publishing Group; 2003 Nov;5(11):1001-7.

48. Shiyonov P, Nag A, Raychaudhuri P. Cullin 4A associates with the UV-damaged DNA-binding protein DDB. *J Biol Chem.* 1999 Dec 10;274(50):35309-12.
49. Emanuele MJ, Elia AEH, Xu Q, Thoma CR, Izhar L, Leng Y, et al. Global identification of modular cullin-RING ligase substrates. *Cell.* 2011 Oct 14;147(2):459-74.
50. Wu K, Yamoah K, Dolios G, Gan-Erdene T, Tan P, Chen A, et al. DEN1 is a dual function protease capable of processing the C terminus of Nedd8 and deconjugating hyper-neddylated CUL1. *J Biol Chem.* 2003 Aug 1;278(31):28882-91.
51. Hori T, Osaka F, Chiba T, Miyamoto C, Okabayashi K, Shimbara N, et al. Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8. *Oncogene.* Nature Publishing Group; 1999 Nov 18;18(48):6829-34.
52. Salon C, Brambilla E, Brambilla C, Lantuejoul S, Gazzeri S, Eymin B. Altered pattern of Cul-1 protein expression and neddylation in human lung tumours: relationships with CAND1 and cyclin E protein levels. *J Pathol.* 2007 Nov;213(3):303-10.
53. Chairatvit K, Ngamkitidechakul C. Control of cell proliferation via elevated NEDD8 conjugation in oral squamous cell carcinoma. *Mol Cell Biochem.* Springer US; 2007 Dec;306(1-2):163-9.
54. Delgado TC, Barbier-Torres L, Zubieta-Franco I, Lopitz-Otsoa F, Varela-Rey M, Fernández-Ramos D, et al. Neddylation, a novel paradigm in liver cancer. *Transl Gastroenterol Hepatol.* 2018;3(6):37-7.

55. Zubieta-Franco I, Fernández-Tussy P, Barbier-Torres L, Simon J, Fernández-Ramos D, Lopitz-Otsoa F, et al. Deregulated neddylation in liver fibrosis. *Hepatology*. 2017 Feb;65(2):694-709.
56. Reverter D, Wu K, Erdene TG, Pan Z-Q, Wilkinson KD, Lima CD. Structure of a complex between Nedd8 and the Ulp/Senp protease family member Den1. *J Mol Biol*. 2005 Jan 7;345(1):141-51.
57. Kim W, Bennett EJ, Huttlin EL, Guo A, Li J, Possemato A, et al. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol Cell*. 2011 Oct 21;44(2):325-40.
58. Kumar S, Yoshida Y, Noda M. Cloning of a cDNA which encodes a novel ubiquitin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Aug 31;195(1):393-9.
59. Leyser HM, Lincoln CA, Timpste C, Lammer D, Turner J, Estelle M. Arabidopsis auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature*. Nature Publishing Group; 1993 Jul 8;364(6433):161-4.
60. Walden H, Podgorski MS, Huang DT, Miller DW, Howard RJ, Minor DL, et al. The structure of the APPBP1-UBA3-NEDD8-ATP complex reveals the basis for selective ubiquitin-like protein activation by an E1. *Mol Cell*. 2003 Dec;12(6):1427-37.
61. Wada H, Kito K, Caskey LS, Yeh ET, Kamitani T. Cleavage of the C-terminus of NEDD8 by UCH-L3. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Oct 29;251(3):688-92.

62. Hjerpe R, Thomas Y, Chen J, Zemla A, Curran S, Shpiro N, et al. Changes in the ratio of free NEDD8 to ubiquitin triggers NEDDylation by ubiquitin enzymes. *Biochem J.* 2012 Feb 1;441(3):927-36.
63. Maghames CM, Lobato-Gil S, Perrin A, Trauchessec H, Rodriguez MS, Urbach S, et al. NEDDylation promotes nuclear protein aggregation and protects the Ubiquitin Proteasome System upon proteotoxic stress. *Nat Commun. Nature Publishing Group;* 2018 Oct 22;9(1):4376.
64. Huang DT, Ayrault O, Hunt HW, Taherbhoy AM, Duda DM, Scott DC, et al. E2-RING expansion of the NEDD8 cascade confers specificity to cullin modification. *Mol Cell.* 2009 Feb 27;33(4):483-95.
65. Xirodimas DP, Saville MK, Bourdon J-C, Hay RT, Lane DP. Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell.* 2004 Jul 9;118(1):83-97.
66. Yang Y, Kitagaki J, Dai R-M, Tsai YC, Lorick KL, Ludwig RL, et al. Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer Res. American Association for Cancer Research;* 2007 Oct 1;67(19):9472-81.
67. Xie P, Zhang M, He S, Lu K, Chen Y, Xing G, et al. The covalent modifier Nedd8 is critical for the activation of Smurf1 ubiquitin ligase in tumorigenesis. *Nat Commun. Nature Publishing Group;* 2014 May 13;5(1):3733.
68. Malhab LJB, Descamps S, Delaval B, Xirodimas DP. The use of the NEDD8 inhibitor MLN4924 (Pevonedistat) in a cyclotherapy approach to protect wild-type p53 cells from MLN4924

induced toxicity. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2016 Nov 30;6(1):37775.

69. Scott DC, Sviderskiy VO, Monda JK, Lydeard JR, Cho SE, Harper JW, et al. Structure of a RING E3 trapped in action reveals ligation mechanism for the ubiquitin-like protein NEDD8. *Cell*. 2014 Jun 19;157(7):1671-84.
70. Zhou L, Zhang W, Sun Y, Jia L. Protein neddylation and its alterations in human cancers for targeted therapy. *Cell Signal*. 2018 Apr;44:92-102.
71. Zhao Y, Morgan MA, Sun Y. Targeting Neddylation pathways to inactivate cullin-RING ligases for anticancer therapy. *Antioxid Redox Signal*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA; 2014 Dec 10;21(17):2383-400.
72. Watson IR, Blanch A, Lin DCC, Ohh M, Irwin MS. Mdm2-mediated NEDD8 modification of TAp73 regulates its transactivation function. *J Biol Chem*. 2006 Nov 10;281(45):34096-103.
73. Rabut G, Peter M. Function and regulation of protein neddylation. "Protein modifications: beyond the usual suspects" review series. *EMBO Rep*. EMBO Press; 2008 Oct;9(10):969-76.
74. Wang M, Medeiros BC, Erba HP, DeAngelo DJ, Giles FJ, Swords RT. Targeting protein neddylation: a novel therapeutic strategy for the treatment of cancer. *Expert Opin Ther Targets*. Taylor & Francis; 2011 Mar;15(3):253-64.

75. Lyapina S, Cope G, Shevchenko A, Serino G, Tsuge T, Zhou C, et al. Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2001 May 18;292(5520):1382-5.
76. Zhou C, Seibert V, Geyer R, Rhee E, Lyapina S, Cope G, et al. The fission yeast COP9/signalosome is involved in cullin modification by ubiquitin-related Ned8p. *BMC Biochem*. BioMed Central; 2001;2(1):7.
77. Hoeller D, Hecker C-M, Dikic I. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group; 2006 Oct;6(10):776-88.
78. Hoeller D, Dikic I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature*. Nature Publishing Group; 2009 Mar 26;458(7237):438-44.
79. Kane RC, Bross PF, Farrell AT, Pazdur R. Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *Oncologist*. 2003;8(6):508-13.
80. Dimopoulos MA, Terpos E. Hematology: first-line bortezomib benefits patients with multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol*. Nature Publishing Group; 2009 Dec;6(12):683-5.
81. Kane RC, Dagher R, Farrell A, Ko C-W, Sridhara R, Justice R, et al. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2007 Sep 15;13(18 Pt 1):5291-4.
82. Wang Z, Liu P, Inuzuka H, Wei W. Roles of F-box proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group; 2014 Apr;14(4):233-47.

83. Welcker M, Clurman BE. FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer*. 2008 Feb;8(2):83-93.
84. Haagenson KK, Tait L, Wang J, Shekhar MP, Polin L, Chen W, et al. Cullin-3 protein expression levels correlate with breast cancer progression. *Cancer Biol Ther*. Taylor & Francis; 2012 Sep;13(11):1042-6.
85. Abidi N, Xirodimas DP. Regulation of cancer-related pathways by protein NEDDylation and strategies for the use of NEDD8 inhibitors in the clinic. *Endocr Relat Cancer*. Bioscientifica Ltd; 2015 Feb;22(1):T55-70.
86. Brownell JE, Sintchak MD, Gavin JM, Liao H, Bruzzese FJ, Bump NJ, et al. Substrate-assisted inhibition of ubiquitin-like protein-activating enzymes: the NEDD8 E1 inhibitor MLN4924 forms a NEDD8-AMP mimetic in situ. *Mol Cell*. 2010 Jan 15;37(1):102-11.
87. Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, Berger AJ, Gavin JM, Adhikari S, et al. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature*. Nature Publishing Group; 2009 Apr 9;458(7239):732-6.
88. Li L, Wang M, Yu G, Chen P, Li H, Wei D, et al. Overactivated neddylation pathway as a therapeutic target in lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2014 Jun;106(6):dju083.
89. Soucy TA, Dick LR, Smith PG, Milhollen MA, Brownell JE. The NEDD8 Conjugation Pathway and Its Relevance in Cancer

Biology and Therapy. *Genes Cancer*. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA; 2010 Jul;1(7):708-16.

90. Lan H, Tang Z, Jin H, Sun Y. Neddylation inhibitor MLN4924 suppresses growth and migration of human gastric cancer cells. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2016 Apr 11;6(1):24218.
91. Godbersen JC, Humphries LA, Danilova OV, Kebbekus PE, Brown JR, Eastman A, et al. The Nedd8-activating enzyme inhibitor MLN4924 thwarts microenvironment-driven NF- $\kappa$ B activation and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Clin Cancer Res*. American Association for Cancer Research; 2014 Mar 15;20(6):1576-89.
92. Read MA, Brownell JE, Gladysheva TB, Hottellet M, Parent LA, Coggins MB, et al. Nedd8 modification of cul-1 activates SCF(beta-TrCP)-dependent ubiquitination of I $\kappa$ B. *Mol Cell Biol*. American Society for Microbiology (ASM); 2000 Apr;20(7):2326-33.
93. Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW. The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I $\kappa$ B and beta-catenin and stimulates I $\kappa$ B ubiquitination in vitro. *Genes Dev*. Cold Spring Harbor Lab; 1999 Feb 1;13(3):270-83.
94. Zhong W, Feng H, Santiago FE, Kipreos ET. CUL-4 ubiquitin ligase maintains genome stability by restraining DNA-replication licensing. *Nature*. Nature Publishing Group; 2003 Jun 19;423(6942):885-9.

95. Higa LA, Banks D, Wu M, Kobayashi R, Sun H, Zhang H. L2DTL/CDT2 interacts with the CUL4/DDB1 complex and PCNA and regulates CDT1 proteolysis in response to DNA damage. *Cell Cycle*. Taylor & Francis; 2006 Aug;5(15):1675-80.
96. Kim Y, Kipreos ET. Cdt1 degradation to prevent DNA re-replication: conserved and non-conserved pathways. *Cell Div*. BioMed Central; 2007 Jun 12;2(1):18.
97. Luo Z, Yu G, Lee HW, Li L, Wang L, Yang D, et al. The Nedd8-activating enzyme inhibitor MLN4924 induces autophagy and apoptosis to suppress liver cancer cell growth. *Cancer Res*. American Association for Cancer Research; 2012 Jul 1;72(13):3360-71.
98. Luo Z, Pan Y, Jeong LS, Liu J, Jia L. Inactivation of the Cullin (CUL)-RING E3 ligase by the NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924 triggers protective autophagy in cancer cells. *Autophagy*. Taylor & Francis; 2012 Nov;8(11):1677-9.
99. Tan M, Li H, Sun Y. Endothelial deletion of Sag/Rbx2/Roc2 E3 ubiquitin ligase causes embryonic lethality and blocks tumor angiogenesis. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2014 Oct 30;33(44):5211-20.
100. Yang D, Tan M, Wang G, Sun Y. The p21-dependent radiosensitization of human breast cancer cells by MLN4924, an investigational inhibitor of NEDD8 activating enzyme. El-Deiry WS, editor. *PLoS ONE*. 2012;7(3):e34079.
101. Li H, Tan M, Jia L, Wei D, Zhao Y, Chen G, et al. Inactivation of SAG/RBX2 E3 ubiquitin ligase suppresses KrasG12D-driven

lung tumorigenesis. *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation; 2014 Feb;124(2):835-46.

102. Li T, Guan J, Huang Z, Hu X, Zheng X. RNF168-mediated H2A neddylation antagonizes ubiquitylation of H2A and regulates DNA damage repair. *Journal of Cell Science*. 2014 May 15;127(Pt 10):2238-48.
103. Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW, Diehl JA. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol*. American Society for Microbiology Journals; 2004 Oct;24(19):8477-86.
104. Gao F, Cheng J, Shi T, Yeh ETH. Neddylation of a breast cancer-associated protein recruits a class III histone deacetylase that represses NFkappaB-dependent transcription. *Nat Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2006 Oct;8(10):1171-7.
105. Jiang Y, Liang Y, Li L, Zhou L, Cheng W, Yang X, et al. Targeting neddylation inhibits intravascular survival and extravasation of cancer cells to prevent lung-cancer metastasis. *Cell Biol Toxicol*. 2019 Jun;35(3):233-45.
106. Dighiero G, Binet JL. When and how to treat chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2000 Dec 14;343(24):1799-801.
107. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1995 Oct 19;333(16):1052-7.

108. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*. Nature Publishing Group; 2017 Jan 19;3:16096.
109. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, Cordone I, Crescenzi S, Pescarmona E, et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood*. 1999 Jul 15;94(2):448-54.
110. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2005 Feb 24;352(8):804-15.
111. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975 Aug;46(2):219-34.
112. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981 Jul 1;48(1):198-206.
113. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 2000 Dec 28;343(26):1910-6.
114. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S, et al. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leukemia & Lymphoma*. 1996 Aug;22(5-6):439-47.

115. Kipps TJ, Rassenti LZ, Duffy S, Kobayashi R, Martin T, Chen PP, et al. Immunoglobulin Gene Rearrangement and Expression in B-CLL. *Leukemia & Lymphoma*. Taylor & Francis; 1991;5 Suppl 1(sup1):39-45.
116. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003 May 1;348(18):1764-75.
117. Rossi D, Gerber B, Stüssi G. Predictive and prognostic biomarkers in the era of new targeted therapies for chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. 2017 Jan 16;58(7):1548-60.
118. Weinberg JB, Volkheimer AD, Chen Y, Beasley BE, Jiang N, Lanasa MC, et al. Clinical and molecular predictors of disease severity and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*. 2007 Dec;82(12):1063-70.
119. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Sep 15;94(6):1840-7.
120. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Sep 15;94(6):1848-54.
121. Bertilaccio MTS, Scielzo C, Muzio M, Caligaris-Cappio F. An overview of chronic lymphocytic leukaemia biology. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010 Mar;23(1):21-32.

122. Calin GA, Croce CM. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. *Semin Oncol.* 2006 Apr;33(2):167-73.
123. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* Nature Publishing Group; 2011 Jun 5;475(7354):101-5.
124. Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD, et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature.* Nature Publishing Group; 2010 Jan 14;463(7278):191-6.
125. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* Massachusetts Medical Society; 2011 Dec 29;365(26):2497-506.
126. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012 Jan 12;119(2):521-9.
127. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med.* 2011 Jul 4;208(7):1389-401.
128. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal

antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol.* 1997 Oct;108(4):378-82.

129. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol.* BMJ Publishing Group; 1998 May;51(5):364-9.
130. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. 2008. pp. 5446-56.
131. Tausch E, Mertens D, Stilgenbauer S. Advances in treating chronic lymphocytic leukemia. *F1000Prime Rep.* 2014;6(65):65.
132. Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med.* Massachusetts Medical Society; 2004 Nov 18;351(21):2159-69.
133. Raphael B, Andersen JW, Silber R, Oken M, Moore D, Bennett J, et al. Comparison of chlorambucil and prednisone versus cyclophosphamide, vincristine, and prednisone as initial treatment for chronic lymphocytic leukemia: long-term follow-up of an Eastern Cooperative Oncology Group randomized clinical trial. *J Clin Oncol.* 1991 May;9(5):770-6.

134. Byrd JC, Lin TS, Grever MR. Treatment of relapsed chronic lymphocytic leukemia: old and new therapies. *Semin Oncol.* 2006 Apr;33(2):210-9.
135. Chang JE, Kahl BS. Bendamustine for treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Pharmacother.* 2012 Jul;13(10):1495-505.
136. Keating MJ, Flinn I, Jain V, Binet J-L, Hillmen P, Byrd J, et al. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood.* 2002 May 15;99(10):3554-61.
137. Robak T. Therapy of chronic lymphocytic leukaemia with purine nucleoside analogues: facts and controversies. *Drugs Aging.* Springer International Publishing; 2005;22(12):983-1012.
138. Cheson BD, Vena DA, Foss FM, Sorensen JM. Neurotoxicity of purine analogs: a review. *J Clin Oncol.* 1994 Oct;12(10):2216-28.
139. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine.* 2000 Dec 14;343(24):1750-7.
140. Bosch F, Ferrer A, López-Guillermo A, Giné E, Bellosillo B, Villamor N, et al. Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2002 Dec;119(4):976-84.

141. Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, Pasold R, Hensel M, Steinbrecher C, et al. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. American Society of Hematology; 2006 Feb 1;107(3):885-91.
142. Lukenbill J, Kalaycio M. Fludarabine: a review of the clear benefits and potential harms. *Leuk Res*. 2013 Sep;37(9):986-94.
143. Byrd JC, Gribben JG, Peterson BL, Grever MR, Lozanski G, Lucas DM, et al. Select high-risk genetic features predict earlier progression following chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab in chronic lymphocytic leukemia: justification for risk-adapted therapy. *J Clin Oncol*. 2006 Jan 20;24(3):437-43.
144. Hallek M. State-of-the-art treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. American Society of Hematology; 2009;2009(1):440-9.
145. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010 Oct 2;376(9747):1164-74.
146. Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, Stilgenbauer S, Williams CD, Hellmann A, et al. Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. American Society of Clinical Oncology; 2010 Apr 1;28(10):1749-55.
147. Castillo J, Milani C, Mendez-Allwood D. Ofatumumab, a second-generation anti-CD20 monoclonal antibody, for the

treatment of lymphoproliferative and autoimmune disorders. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009 Apr;18(4):491-500.

148. Wierda WG, Kipps TJ, Dürig J, Griskevicius L, Stilgenbauer S, Mayer J, et al. Chemoimmunotherapy with O-FC in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. American Society of Hematology; 2011 Jun 16;117(24):6450-8.
149. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*. 2014 Mar 20;370(12):1101-10.
150. Rai K, Hallek M. Future prospects for alemtuzumab (MabCampath). *Med Oncol*. 2002;19 Suppl:S57-63.
151. Pettitt AR, Jackson R, Carruthers S, Dodd J, Dodd S, Oates M, et al. Alemtuzumab in combination with methylprednisolone is a highly effective induction regimen for patients with chronic lymphocytic leukemia and deletion of TP53: final results of the national cancer research institute CLL206 trial. *J Clin Oncol*. American Society of Clinical Oncology; 2012 May 10;30(14):1647-55.
152. Badar T, Burger JA, Wierda WG, O'Brien S. Ibrutinib: a paradigm shift in management of CLL. *Expert Rev Hematol*. 2014 Dec;7(6):705-17.
153. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013 Jul 4;369(1):32-42.

154. Yang Q, Modi P, Newcomb T, Quéva C, Gandhi V. Idelalisib: First-in-Class PI3K Delta Inhibitor for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia, Small Lymphocytic Leukemia, and Follicular Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2015 Apr 1;21(7):1537-42.
155. Khan M, Saif A, Sandler S, Mirrakhimov AE. Idelalisib for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *ISRN Oncol. Hindawi*; 2014;2014(1, article 1001):931858-7.
156. Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch Toxicol. Springer Berlin Heidelberg*; 2015 Mar;89(3):289-317.
157. Del Gaizo Moore V, Brown JR, Certo M, Love TM, Novina CD, Letai A. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J Clin Invest. American Society for Clinical Investigation*; 2007 Jan;117(1):112-21.
158. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med. Massachusetts Medical Society*; 2016 Jan 28;374(4):311-22.
159. Barlogie B, Latreille J, Freireich EJ, Fu CT, Mellard D, Meistrich M, et al. Characterization of hematologic malignancies by flow cytometry. *Blood Cells.* 1980;6(4):719-44.
160. Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Sison C, et al. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations.

Blood. American Society of Hematology; 2004 Jan 15;103(2):375-82.

161. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest.* American Society for Clinical Investigation; 2005 Mar;115(3):755-64.
162. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 6 ed. 2007 Jun;35(4):495-516.
163. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* Nature Publishing Group; 1972 Aug;26(4):239-57.
164. Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell.* 1993 Aug 27;74(4):597-608.
165. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001 Feb 23;104(4):487-501.
166. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA; 2001;41(1):367-401.
167. Rudin CM, Thompson CB. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med.* 1997;48(1):267-81.

168. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group; 2002 Apr;2(4):277-88.
169. Igney FH, Krammer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol*. 2002 Jun;71(6):907-20.
170. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1305-8.
171. Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect*. 2009 Nov;11(13):1050-62.
172. Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2010 Sep;11(9):621-32.
173. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. Nature Publishing Group; 2009 Jan;16(1):3-11.
174. Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu H-C, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ-D, et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2006 Dec;8(12):1348-58.
175. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2008 Mar;9(3):231-41.

176. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2014 Jan;15(1):49-63.
177. Kolb J-P, Kern C, Quiney C, Roman V, Billard C. Re-establishment of a normal apoptotic process as a therapeutic approach in B-CLL. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2003 Dec;3(4):261-86.
178. Shimizu S, Ide T, Yanagida T, Tsujimoto Y. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2000 Apr 21;275(16):12321-5.
179. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2002 Sep;2(3):183-92.
180. Letai A. Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation; 2005 Oct;115(10):2648-55.
181. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*. 2001 Sep;8(3):705-11.
182. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway

to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001 Apr 27;292(5517):727-30.

183. Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, et al. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol*. Rockefeller University Press; 1999 Mar 8;144(5):903-14.
184. Hinds MG, Smits C, Fredericks-Short R, Risk JM, Bailey M, Huang DCS, et al. Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death Differ*. Nature Publishing Group; 2007 Jan;14(1):128-36.
185. Yuan J. Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol*. 1997 Apr;9(2):247-51.
186. Kelekar A, Thompson CB. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol*. 1998 Aug;8(8):324-30.
187. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, et al. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J*. 1998 Jan 15;17(2):384-95.
188. Nakai M, Takeda A, Cleary ML, Endo T. The bcl-2 protein is inserted into the outer membrane but not into the inner membrane of rat liver mitochondria in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Oct 15;196(1):233-9.
189. Bingle CD, Craig RW, Swales BM, Singleton V, Zhou P, Whyte MK. Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain

3 only gene product that promotes cell death. *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2000 Jul 21;275(29):22136-46.

190. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 1984 Nov 30;226(4678):1097-9.
191. Tsujimoto Y, Jaffe E, Cossman J, Gorham J, Nowell PC, Croce CM. Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature*. Nature Publishing Group; 1985 May;315(6017):340-3.
192. Robertson LE, Plunkett W, McConnell K, Keating MJ, McDonnell TJ. Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia*. 1996 Mar;10(3):456-9.
193. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group; 2002 Sep;2(9):647-56.
194. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nuñez G, Jaeger U, McKearn JP, et al. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*. 1989 Apr 7;57(1):79-88.
195. Strasser A, Harris AW, Bath ML, Cory S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*. 1990 Nov 22;348(6299):331-3.

196. Schmitt CA, Lowe SW. Bcl-2 mediates chemoresistance in matched pairs of primary E(mu)-myc lymphomas in vivo. *Blood Cells Mol Dis.* 2001 Jan;27(1):206-16.
197. Pepper C, Thomas A, Hoy T, Cotter F, Bentley P. Antisense-mediated suppression of Bcl-2 highlights its pivotal role in failed apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 1999 Dec;107(3):611-5.
198. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell.* 2005 Feb 4;17(3):393-403.
199. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature.* Nature Publishing Group; 2005 Jun 2;435(7042):677-81.
200. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood.* American Society of Hematology; 2009 Oct 15;114(16):3367-75.
201. Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood.* 1998 May 1;91(9):3379-89.
202. Caligaris-Cappio F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2003 Nov;123(3):380-8.

203. Davids MS, Burger JA. Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Open J Hematol*. NIH Public Access; 2012;3(S1).
204. Kumar CC. Signaling by integrin receptors. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 1998 Sep 17;17(11 Reviews):1365-73.
205. Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group; 2007 Feb;7(2):139-47.
206. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2006 Feb;6(2):107-16.
207. Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand AV. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol*. 1996 Jan;92(1):97-103.
208. Lagneaux L, Delforge A, De Bruyn C, Bernier M, Bron D. Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia & Lymphoma*. Taylor & Francis; 1999 Nov;35(5-6):445-53.
209. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med*. 2005 Apr 18;201(8):1307-18.
210. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*. 1999 Dec 1;94(11):3658-67.

211. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 2000 Oct 15;96(8):2655-63.
212. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, et al. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood*. American Society of Hematology; 2005 Aug 1;106(3):1012-20.
213. Burger M, Hartmann T, Krome M, Rawluk J, Tamamura H, Fujii N, et al. Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. American Society of Hematology; 2005 Sep 1;106(5):1824-30.
214. Buggins AGS, Pepper C, Patten PEM, Hewamana S, Gohil S, Moorhead J, et al. Interaction with vascular endothelium enhances survival in primary chronic lymphocytic leukemia cells via NF-kappaB activation and de novo gene transcription. *Cancer Res*. 2010 Oct 1;70(19):7523-33.
215. Han T, Barcos M, Emrich L, Ozer H, Gajera R, Gomez GA, et al. Bone marrow infiltration patterns and their prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia: correlations with clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic data. *J Clin Oncol*. 1984 Jun;2(6):562-70.

216. Pangalis GA, Roussou PA, Kittas C, Mitsoulis-Mentzikoff C, Matsouka-Alexandridis P, Anagnostopoulos N, et al. Patterns of bone marrow involvement in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic (well differentiated) non-Hodgkin's lymphoma. Its clinical significance in relation to their differential diagnosis and prognosis. *Cancer*. 1984 Aug 15;54(4):702-8.
217. Balakrishnan K, Burger JA, Wierda WG, Gandhi V. AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance. *Blood*. American Society of Hematology; 2009 Jan 1;113(1):149-53.
218. Kay NE, Shanafelt TD, Strege AK, Lee YK, Bone ND, Raza A. Bone biopsy derived marrow stromal elements rescue chronic lymphocytic leukemia B-cells from spontaneous and drug induced cell death and facilitates an "angiogenic switch". *Leuk Res*. 2007 Jul;31(7):899-906.
219. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. American Society of Hematology; 2011 Jan 13;117(2):563-74.
220. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Oct 20;118(16):4313-20.
221. Ding W, Nowakowski GS, Knox TR, Boysen JC, Maas ML, Schwager SM, et al. Bi-directional activation between mesenchymal stem cells and CLL B-cells: implication for CLL disease progression. *Br J Haematol*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111); 2009 Nov;147(4):471-83.

222. Burger JA. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program. American Society of Hematology*; 2011;2011(1):96-103.
223. Plander M, Seegers S, Ugocsai P, Diermeier-Daucher S, Iványi J, Schmitz G, et al. Different proliferative and survival capacity of CLL-cells in a newly established in vitro model for pseudofollicles. *Leukemia. Nature Publishing Group*; 2009 Nov;23(11):2118-28.
224. Fecteau J-F, Corral LG, Ghia EM, Gaidarova S, Futalan D, Bharati IS, et al. Lenalidomide inhibits the proliferation of CLL cells via a cereblon/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism independent of functional p53. *Blood. 2014 Sep 4;124(10):1637-44.*
225. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature. Nature Publishing Group*; 2015 Oct 22;526(7574):519-24.
226. Kurosaki T. Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol. Annual Reviews* 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA; 1999;17(1):555-92.
227. Packham G, Krysov S, Allen A, Savelyeva N, Steele AJ, Forconi F, et al. The outcome of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: proliferation or anergy. *Haematologica. Haematologica*; 2014 Jul;99(7):1138-48.

228. Srinivasan L, Sasaki Y, Calado DP, Zhang B, Paik JH, DePinho RA, et al. PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell*. 2009 Oct 30;139(3):573-86.
229. Buggy JJ, Elias L. Bruton tyrosine kinase (BTK) and its role in B-cell malignancy. *Int Rev Immunol*. Taylor & Francis; 2012 Apr;31(2):119-32.
230. Packham G, Stevenson F. The role of the B-cell receptor in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Semin Cancer Biol*. 2010 Dec;20(6):391-9.
231. Niiro H, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2002 Dec;2(12):945-56.
232. Dal Porto JM, Gauld SB, Merrell KT, Mills D, Pugh-Bernard AE, Cambier J. B cell antigen receptor signaling 101. *Mol Immunol*. 2004 Jul;41(6-7):599-613.
233. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Carsetti L, Berno V, Sica S, et al. Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2009 Apr;23(4):686-97.
234. Buchner M, Baer C, Prinz G, Dierks C, Burger M, Zenz T, et al. Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010 Jun 3;115(22):4497-506.
235. Hashimoto A, Okada H, Jiang A, Kurosaki M, Greenberg S, Clark EA, et al. Involvement of guanosine triphosphatases and

phospholipase C-gamma2 in extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase activation by the B cell antigen receptor. *J Exp Med*. Rockefeller University Press; 1998 Oct 5;188(7):1287-95.

236. Ingley E. Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jan;1784(1):56-65.
237. Petlickovski A, Laurenti L, Li X, Marietti S, Chiusolo P, Sica S, et al. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. American Society of Hematology; 2005 Jun 15;105(12):4820-7.
238. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. American Society of Hematology; 2002 Dec 15;100(13):4609-14.
239. Wiestner A. Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012 Dec 6;120(24):4684-91.
240. Vetrie D, Vorechovský I, Sideras P, Holland J, Davies A, Flinter F, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature*. Nature Publishing Group; 1993 Jan 21;361(6409):226-33.
241. Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, Parolini O, Allen RC, Klisak I, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine

kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell*. 1993 Jan 29;72(2):279-90.

242. Yu L, Mohamed AJ, Simonson OE, Vargas L, Blomberg KEM, Björkstrand B, et al. Proteasome-dependent autoregulation of Bruton tyrosine kinase (Btk) promoter via NF-kappaB. *Blood*. 2008 May 1;111(9):4617-26.
243. Lindvall JM, Blomberg KEM, Väliäho J, Vargas L, Heinonen JE, Berglöf A, et al. Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications, and expression profiling. *Immunol Rev*. 1st ed. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111); 2005 Feb;203(1):200-15.
244. Mohamed AJ, Nore BF, Christensson B, Smith CI. Signalling of Bruton's tyrosine kinase, Btk. *Scand J Immunol*. 1999 Feb;49(2):113-8.
245. Nore BF, Vargas L, Mohamed AJ, Brandén LJ, Bäckesjö CM, Islam TC, et al. Redistribution of Bruton's tyrosine kinase by activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Rho-family GTPases. *Eur J Immunol*. John Wiley & Sons, Ltd; 2000 Jan;30(1):145-54.
246. Genevier HC, Hinshelwood S, Gaspar HB, Rigley KP, Brown D, Saeland S, et al. Expression of Bruton's tyrosine kinase protein within the B cell lineage. *Eur J Immunol*. 1994 Dec;24(12):3100-5.
247. Li T, Rawlings DJ, Park H, Kato RM, Witte ON, Satterthwaite AB. Constitutive membrane association potentiates activation of Bruton tyrosine kinase. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 1997 Sep 18;15(12):1375-83.

248. Deane JA, Fruman DA. Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol. Annual Reviews*; 2004;22(1):563-98.
249. Herman SEM, Gordon AL, Wagner AJ, Heerema NA, Zhao W, Flynn JM, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase- $\delta$  inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood. American Society of Hematology*; 2010 Sep 23;116(12):2078-88.
250. Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol. Nature Publishing Group*; 2003 Apr;3(4):317-30.
251. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997 Oct 17;91(2):231-41.
252. Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, Tanaka K, et al. Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem*. 2002 Jun 14;277(24):21843-50.
253. Mohammad DK, Nore BF, Hussain A, Gustafsson MO, Mohamed AJ, Smith CIE. Dual phosphorylation of Btk by Akt/protein kinase b provides docking for 14-3-3 $\zeta$ , regulates shuttling, and attenuates both tonic and induced signaling in B cells. *Mol Cell Biol. American Society for Microbiology Journals*; 2013 Aug;33(16):3214-26.

254. Wiestner A. BCR pathway inhibition as therapy for chronic lymphocytic leukemia and lymphoplasmacytic lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program. American Society of Hematology*; 2014 Dec 5;2014(1):125-34.
255. Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, Reddy NM, et al. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2014 Jul 17;371(3):213-23.
256. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014 Mar 13;370(11):997-1007.
257. Hacken ten E, Burger JA. Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia--focus on the B-cell receptor. *Clin Cancer Res*. 2014 Feb 1;20(3):548-56.
258. Gerondakis S, Grumont R, Gugasyan R, Wong L, Isomura I, Ho W, et al. Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene. Nature Publishing Group*; 2006 Oct 30;25(51):6781-99.
259. Liang Y, Zhou Y, Shen P. NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cell Mol Immunol*. 2004 Oct;1(5):343-50.
260. Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene. Nature Publishing Group*; 2006 Oct 30;25(51):6706-16.

261. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2006 Oct 30;25(51):6680-4.
262. Huxford T, Malek S, Ghosh G. Structure and mechanism in NF-kappa B/I kappa B signaling. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1999;64:533-40.
263. Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*. 2006 Oct 17;2006(357):re13-3.
264. Scheidereit C. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2006 Oct 30;25(51):6685-705.
265. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, et al. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science*. 2001 Aug 24;293(5534):1495-9.
266. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2005 Oct;5(10):749-59.
267. Hayden MS, Ghosh S. Shared Principles in NF-kB Signaling. *Cell*. 2008 Feb;132(3):344-62.
268. Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood*. American Society of Hematology; 2012 Aug 9;120(6):1175-84.
269. Cuní S, Pérez-Aciego P, Pérez-Chacón G, Vargas JA, Sánchez A, Martín-Saavedra FM, et al. A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic

lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2004 Aug;18(8):1391-400.

270. Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T, et al. Novel inhibitors of cytokine-induced I $\kappa$ B phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 1997 Aug 22;272(34):21096-103.
271. López-Guerra M, Colomer D. NF- $\kappa$ B as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Ther Targets*. Taylor & Francis; 2010 Mar;14(3):275-88.
272. Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell*. 1997 Jul 25;90(2):281-91.
273. Leong KG, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood*. American Society of Hematology; 2006 Mar 15;107(6):2223-33.
274. Sambandam A, Maillard I, Zediak VP, Xu L, Gerstein RM, Aster JC, et al. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat Immunol*. Nature Publishing Group; 2005 Jul;6(7):663-70.
275. He Y, Pear WS. Notch signalling in B cells. *Semin Cell Dev Biol*. 2003 Apr;14(2):135-42.

276. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999 Apr 30;284(5415):770-6.
277. Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, et al. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*. 1991 Aug 23;66(4):649-61.
278. Villamor N, Conde L, Martínez-Trillos A, Cazorla M, Navarro A, Beà S, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2013 Apr;27(5):1100-6.
279. Sportoletti P, Baldoni S, Cavalli L, Del Papa B, Bonifacio E, Ciurnelli R, et al. NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *Br J Haematol*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111); 2010 Nov;151(4):404-6.
280. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group; 2009 Mar;9(3):153-66.
281. Pavletich NP. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol*. 1999 Apr 16;287(5):821-8.
282. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. Cold Spring Harbor Lab; 1999 Jun 15;13(12):1501-12.

283. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*. 2008 Feb;14(2):159-69.
284. Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res*. 1999 Feb 1;246(2):280-9.
285. Hengst L, Reed SI. Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1998;227(Chapter 2):25-41.
286. Lukas J, Lukas C, Bartek J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)*. 2004 Aug;3(8-9):997-1007.
287. Reinhardt HC, Yaffe MB. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol*. 2009 Apr;21(2):245-55.
288. Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*. 2007 Dec 14;28(5):739-45.
289. Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*. 2003 May;3(5):421-9.
290. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group; 2003 Mar;3(3):155-68.
291. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. Nature Publishing Group; 2003 Jan 30;421(6922):499-506.

292. Kim ST, Lim DS, Canman CE, Kastan MB. Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 1999 Dec 31;274(53):37538-43.
293. O'Neill T, Dwyer AJ, Ziv Y, Chan DW, Lees-Miller SP, Abraham RH, et al. Utilization of oriented peptide libraries to identify substrate motifs selected by ATM. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 2000 Jul 28;275(30):22719-27.
294. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science. American Association for the Advancement of Science*; 1995 Jun 23;268(5218):1749-53.
295. Vessey CJ, Norbury CJ, Hickson ID. Genetic disorders associated with cancer predisposition and genomic instability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1999;63:189-221.
296. Reinhardt HC, Schumacher B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet*. 2012 Mar;28(3):128-36.
297. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature. Nature Publishing Group*; 1979 Mar 15;278(5701):261-3.
298. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature. Nature Publishing Group*; 2000 Nov 16;307-10.

299. Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell*. 2001 Mar;7(3):673-82.
300. Hussain SP, Harris CC. p53 mutation spectrum and load: the generation of hypotheses linking the exposure of endogenous or exogenous carcinogens to human cancer. *Mutat Res*. 1999 Jul 16;428(1-2):23-32.
301. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science*. 1994 Nov 4;266(5186):807-10.
302. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, et al. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*. Nature Publishing Group; 2002 Jan 3;415(6867):45-53.
303. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*. 1998 Sep;2(3):305-16.
304. Jost CA, Marin MC, Kaelin WG. p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*. Nature Publishing Group; 1997 Sep 11;389(6647):191-4.
305. Camus S, Ménendez S, Fernandes K, Kua N, Liu G, Xirodimas DP, et al. The p53 isoforms are differentially modified by Mdm2. *Cell Cycle*. Taylor & Francis; 2012 Apr 15;11(8):1646-55.
306. Grob TJ, Novak U, Maisse C, Barcaroli D, Lüthi AU, Pirnia F, et al. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback

- loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ.* Nature Publishing Group; 2001 Dec;8(12):1213-23.
307. Liu G, Nozell S, Xiao H, Chen X. DeltaNp73beta is active in transactivation and growth suppression. *Mol Cell Biol.* 2004 Jan;24(2):487-501.
308. Sánchez-Carrera D, García-Puga M, Yáñez L, Romón Í, Pipaón C.  $\Delta$ Np73 is capable of inducing apoptosis by coordinately activating several BH3-only proteins. *Bioscience Reports.* Portland Press Limited; 2015 Apr 28;35(3):e00198.
309. Laín S. Protecting p53 from degradation. *Biochem Soc Trans.* 2003 Apr;31(2):482-5.
310. Brooks CL, Gu W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 Apr;15(2):164-71.
311. Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* John Wiley & Sons, Ltd; 1997 Dec 22;420(1):25-7.
312. Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res.* 1998 Aug 1;26(15):3453-9.
313. Forslund A, Zeng Z, Qin L-X, Rosenberg S, Ndubuisi M, Pincas H, et al. MDM2 gene amplification is correlated to tumor progression but not to the presence of SNP309 or TP53 mutational status in primary colorectal cancers. *Molecular Cancer Research.* American Association for Cancer Research; 2008 Feb;6(2):205-11.

314. Hallek M. Therapy of chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010 Mar;23(1):85-96.
315. Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, Smardova J, Benner A, Soussi T, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2010 Dec;24(12):2072-9.
316. Kottemann MC, Smogorzewska A. Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. *Nature*. Nature Publishing Group; 2013 Jan 17;493(7432):356-63.
317. Kashiyama K, Nakazawa Y, Pilz DT, Guo C, Shimada M, Sasaki K, et al. Malfunction of nuclease ERCC1-XPF results in diverse clinical manifestations and causes Cockayne syndrome, xeroderma pigmentosum, and Fanconi anemia. *Am J Hum Genet*. 2013 May 2;92(5):807-19.
318. Bogliolo M, Schuster B, Stoepker C, Derkunt B, Su Y, Raams A, et al. Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet*. 2013 May 2;92(5):800-6.
319. Kee Y, D'Andrea AD. Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia. *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation; 2012 Nov;122(11):3799-806.
320. Grompe M, D'Andrea A. Fanconi anemia and DNA repair. *Hum Mol Genet*. 2001 Oct 1;10(20):2253-9.

321. Kutler DI, Auerbach AD, Satagopan J, Giampietro PF, Batish SD, Huvos AG, et al. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. American Medical Association; 2003 Jan;129(1):106-12.
322. Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood*. American Society of Hematology; 2003 Feb 1;101(3):822-6.
323. Alter BP, Greene MH, Velazquez I, Rosenberg PS. Cancer in Fanconi anemia. *Blood*. American Society of Hematology; 2003 Mar 1;101(5):2072-2.
324. Taniguchi T, Tischkowitz M, Ameziane N, Hodgson SV, Mathew CG, Joenje H, et al. Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nat Med*. Nature Publishing Group; 2003 May;9(5):568-74.
325. Olopade OI, Wei M. FANCF methylation contributes to chemoselectivity in ovarian cancer. *Cancer Cell*. 2003 May;3(5):417-20.
326. D'Andrea AD. Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. Schwartz RS, editor. *N Engl J Med*. Massachusetts Medical Society; 2010 May 20;362(20):1909-19.
327. Sasaki MS, Tonomura A. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res*. 1973 Aug;33(8):1829-36.
328. Chen Q, Van der Sluis PC, Boulware D, Hazlehurst LA, Dalton WS. The FA/BRCA pathway is involved in melphalan-induced

DNA interstrand cross-link repair and accounts for melphalan resistance in multiple myeloma cells. *Blood*. American Society of Hematology; 2005 Jul 15;106(2):698-705.

329. Yarde DN, Oliveira V, Mathews L, Wang X, Villagra A, Boulware D, et al. Targeting the Fanconi anemia/BRCA pathway circumvents drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Res*. 2009 Dec 15;69(24):9367-75.
330. Chirnomas D. Chemosensitization to cisplatin by inhibitors of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006 Apr 1;5(4):952-61.
331. Oda T, Hayano T, Miyaso H, Takahashi N, Yamashita T. Hsp90 regulates the Fanconi anemia DNA damage response pathway. *Blood*. 2007 Jun 1;109(11):5016-26.
332. Landais I, Sobeck A, Stone S, LaChapelle A, Hoatlin ME. A novel cell-free screen identifies a potent inhibitor of the Fanconi anemia pathway. *Int J Cancer*. John Wiley & Sons, Ltd; 2009 Feb 15;124(4):783-92.
333. Jacquemont C, Taniguchi T. The Fanconi anemia pathway and ubiquitin. *BMC Biochem*. BioMed Central; 2007 Nov 22;8 Suppl 1(Suppl 1):S10-0.
334. Groisman R, Polanowska J, Kuraoka I, Sawada J-I, Saijo M, Drapkin R, et al. The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell*. 2003 May 2;113(3):357-67.

335. Cukras S, Morffy N, Ohn T, Kee Y. Inactivating UBE2M impacts the DNA damage response and genome integrity involving multiple cullin ligases. Muzi-Falconi M, editor. PLoS ONE. 2014;9(7):e101844.
336. Wu J, Zhang X, Zhang L, Wu C-Y, Rezaeian AH, Chan C-H, et al. Skp2 E3 ligase integrates ATM activation and homologous recombination repair by ubiquitinating NBS1. Mol Cell. 2012 May 11;46(3):351-61.
337. Jimeno S, Fernández-Ávila MJ, Cruz-García A, Cepeda-García C, Gómez-Cabello D, Huertas P. Neddylation inhibits CtIP-mediated resection and regulates DNA double strand break repair pathway choice. Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(2):987-99.
338. Howard SM, Yanez DA, Stark JM. DNA damage response factors from diverse pathways, including DNA crosslink repair, mediate alternative end joining. Maizels N, editor. PLoS Genet. Public Library of Science; 2015 Jan;11(1):e1004943.
339. Renaudin X, Guervilly JH, Aoufouchi S, Rosselli F. Proteomic analysis reveals a FANCA-modulated neddylation pathway involved in CXCR5 membrane targeting and cell mobility. Journal of Cell Science. 2014 Aug 14;127(16):3546-54.
340. Müller G, Höpken UE, Lipp M. The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. Immunol Rev. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111); 2003 Oct;195(1):117-35.
341. Yu D, Zhan XH, Zhao XF, Williams MS, Carey GB, Smith E, et al. Mice deficient in MIM expression are predisposed to

lymphomagenesis. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2012 Jul 26;31(30):3561-8.

342. Stacchini A, Aragno M, Vallario A, Alfarano A, Circosta P, Gottardi D, et al. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leuk Res*. 1999 Feb;23(2):127-36.
343. Ceccaldi R, Parmar K, Mouly E, Delord M, Kim JM, Regairaz M, et al. Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell*. 2012 Jul 6;11(1):36-49.
344. Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2017 Jul 13;36(28):3943-56.
345. Liu G, Xirodimas DP. NUB1 promotes cytoplasmic localization of p53 through cooperation of the NEDD8 and ubiquitin pathways. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2010 Apr 15;29(15):2252-61.
346. Liu S, Yang H, Zhao J, Zhang Y-H, Song A-X, Hu H-Y. NEDD8 ultimate buster-1 long (NUB1L) protein promotes transfer of NEDD8 to proteasome for degradation through the P97UFD1/NPL4 complex. *J Biol Chem*. 2013 Oct 25;288(43):31339-49.
347. Yao W-T, Wu J-F, Yu G-Y, Wang R, Wang K, Li L-H, et al. Suppression of tumor angiogenesis by targeting the protein neddylation pathway. *Cell Death Dis*. Nature Publishing Group; 2014 Feb 13;5(2):e1059-9.

348. Yavuz AS, Sözer NB, Sezerman OU. Prediction of neddylation sites from protein sequences and sequence-derived properties. *BMC Bioinformatics*. BioMed Central; 2015;16 Suppl 18(Suppl 18):S9-11.
349. Na CH, Peng J. Analysis of ubiquitinated proteome by quantitative mass spectrometry. *Methods Mol Biol*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012;893(10):417-29.
350. Akimov V, Barrio-Hernandez I, Hansen SVF, Hallenborg P, Pedersen A-K, Bekker-Jensen DB, et al. UbiSite approach for comprehensive mapping of lysine and N-terminal ubiquitination sites. *Nature Structural & Molecular Biology*. Nature Publishing Group; 2018 Jul 2;25(7):631-40.
351. Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, Geyer SM, LaPlant BR, Call TG, et al. Using smudge cells on routine blood smears to predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: a universally available prognostic test. *Mayo Clin Proc*. 2007 Apr;82(4):449-53.
352. Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, Zent CS, Call TG, Bone ND, et al. Percentage of smudge cells on routine blood smear predicts survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 10;27(11):1844-9.
353. Brown MJ, Hallam JA, Colucci-Guyon E, Shaw S. Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments. *J Immunol*. 2001 Jun 1;166(11):6640-6.
354. Dho SE, Silva-Gagliardi N, Morgese F, Coyaud E, Lamoureux E, Berry DM, et al. Proximity interactions of the ubiquitin ligase Mind bomb 1 reveal a role in regulation of epithelial polarity

complex proteins. *Sci Rep. Nature Publishing Group*; 2019 Aug 28;9(1):12471-18.

355. Koo B-K, Lim H-S, Song R, Yoon M-J, Yoon K-J, Moon J-S, et al. Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch. *Development*. 2005 Aug;132(15):3459-70.
356. Ayón-Pérez MF, Pimentel-Gutiérrez HJ, Durán-Avelar M de J, Vibanco-Pérez N, Pérez-Peraza VM, Pérez-González ÓA, et al. IKZF1 Gene Deletion in Pediatric Patients Diagnosed with Acute Lymphoblastic Leukemia in Mexico. *Cytogenet Genome Res. Karger Publishers*; 2019;158(1):10-6.
357. Yao Y, Zhang Y, Shi M, Sun Y, Chen C, Niu M, et al. Blockade of deubiquitinase USP7 overcomes bortezomib resistance by suppressing NF- $\kappa$ B signaling pathway in multiple myeloma. *J Leukoc Biol*. 2018 Dec;104(6):1105-15.
358. Nie L, Sasaki M, Maki CG. Regulation of p53 nuclear export through sequential changes in conformation and ubiquitination. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 2007 May 11;282(19):14616-25.
359. Liu X, Tan Y, Zhang C, Zhang Y, Zhang L, Ren P, et al. NAT10 regulates p53 activation through acetylating p53 at K120 and ubiquitinating Mdm2. *EMBO Rep*. 2016 Mar;17(3):349-66.
360. Danilov AV, Danilova OV, Klein AK, Huber BT. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Mol Med*. 2006 Sep;6(6):665-75.

361. Danilov AV, Soderquist RS, Bates DJP, Eastman A. Toward a cure for chronic lymphocytic leukemia: an attack on multiple fronts. *Expert Rev Anticancer Ther.* Taylor & Francis; 2013 Sep;13(9):1009-12.
362. Dutrillaux B, Aurias A, Dutrillaux AM, Buriot D, Prieur M. The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia. *Hum Genet.* 1982;62(4):327-32.
363. Poot M, Gross O, Epe B, Pflaum M, Hoehn H. Cell cycle defect in connection with oxygen and iron sensitivity in Fanconi anemia lymphoblastoid cells. *Exp Cell Res.* 1996 Feb 1;222(2):262-8.
364. Sanz L, Garcia-Marco JA, Casanova B, La Fuente de MT, García-Gila M, Garcia-Pardo A, et al. Bcl-2 family gene modulation during spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Mar 12;315(3):562-7.
365. Joshi AD, Dickinson JD, Hegde GV, Sanger WG, Armitage JO, Bierman PJ, et al. Bulky lymphadenopathy with poor clinical outcome is associated with ATM downregulation in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients irrespective of 11q23 deletion. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007 Jan 15;172(2):120-6.
366. Dickinson JD, Gilmore J, Iqbal J, Sanger W, Lynch JC, Chan J, et al. 11q22.3 deletion in B-chronic lymphocytic leukemia is specifically associated with bulky lymphadenopathy and ZAP-70 expression but not reduced expression of adhesion/cell surface receptor molecules. *Leukemia & Lymphoma.* 2006 Feb;47(2):231-44.

367. Kao WH, Riker AI, Kushwaha DS, Ng K, Enkemann SA, Jove R, et al. Upregulation of Fanconi anemia DNA repair genes in melanoma compared with non-melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol.* 2011 Oct;131(10):2139-42.
368. Chen CC, Taniguchi T, D'Andrea A. The Fanconi anemia (FA) pathway confers glioma resistance to DNA alkylating agents. *Journal of Molecular Medicine.* 2007 Jan 13;85(5):497-509.
369. Pipaón C, Real PJ, Fernandez-Luna JL. Defective binding of transcriptional repressor ZEB via DNA methylation contributes to increased constitutive levels of p73 in Fanconi anemia cells. *FEBS Lett.* John Wiley & Sons, Ltd; 2005 Aug 29;579(21):4610-4.
370. Zenz T, Kröber A, Scherer K, Häbe S, Bühler A, Benner A, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood.* American Society of Hematology; 2008 Oct 15;112(8):3322-9.
371. Zhu H-J, Liu L, Fan L, Zhang L-N, Fang C, Zou Z-J, et al. The BH3-only protein Puma plays an essential role in p53-mediated apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia & Lymphoma.* 2013 May 21;54(12):2712-9.
372. Reuter TY, Medhurst AL, Waisfisz Q, Zhi Y, Herterich S, Hoehn H, et al. Yeast two-hybrid screens imply involvement of Fanconi anemia proteins in transcription regulation, cell signaling, oxidative metabolism, and cellular transport. *Exp Cell Res.* 2003 Oct 1;289(2):211-21.

373. Bonacci T, Audebert S, Camoin L, Baudelet E, Iovanna J-L, Soubeyran P. Regulation of NUB1 Activity through Non-Proteolytic Mdm2-Mediated Ubiquitination. Yan C, editor. PLoS ONE. Public Library of Science; 2017;12(1):e0169988.
374. Bahjat M, de Wilde G, van Dam T, Maas C, Bloedjes T, Bende RJ, et al. The NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924 induces DNA damage in Ph+ leukemia and sensitizes for ABL kinase inhibitors. *Cell Cycle*. Taylor & Francis; 2019 Sep;18(18):2307-22.
375. Reed CE, Bennett JM. N-acetyl-beta-glucosaminidase activity in normal and malignant leukocytes. *J Histochem Cytochem*. 1975 Oct;23(10):752-7.
376. Xu G, Paige JS, Jaffrey SR. Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling. *Nat Biotechnol*. Nature Publishing Group; 2010 Aug;28(8):868-73.
377. Zheng Y-X, Zhang X-X, Hernandez JA, Mahmmod YS, Huang W-Y, Li G-F, et al. Transcriptomic analysis of reproductive damage in the epididymis of male Kunming mice induced by chronic infection of *Toxoplasma gondii* PRU strain. *Parasit Vectors*. BioMed Central; 2019 Nov 8;12(1):529-11.
378. Martelly W, Fellows B, Senior K, Marlowe T, Sharma S. Identification of a non-canonical RNA binding domain in the U2 snRNP protein SF3A1. *RNA*. 2019 Aug 5;;rna.072256.119.
379. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing

machinery in myelodysplasia. *Nature*. Nature Publishing Group; 2011 Sep 11;478(7367):64-9.

380. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. Cold Spring Harbor Lab; 2004 Sep 15;18(18):2195-224.
381. Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K, et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood*. 2009 Jan 22;113(4):856-65.
382. Wang JH, Avitahl N, Cariappa A, Friedrich C, Ikeda T, Renold A, et al. Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state. *Immunity*. 1998 Oct;9(4):543-53.
383. Gu J, Nie L, Wiederschain D, Yuan ZM. Identification of p53 sequence elements that are required for MDM2-mediated nuclear export. *Mol Cell Biol*. 2001 Dec;21(24):8533-46.
384. Lohrum MA, Woods DB, Ludwig RL, Bálint E, Vousden KH. C-terminal ubiquitination of p53 contributes to nuclear export. *Mol Cell Biol*. American Society for Microbiology Journals; 2001 Dec;21(24):8521-32.
385. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group; 2002 Aug;2(8):594-604.
386. Luo J, Li M, Tang Y, Laszkowska M, Roeder RG, Gu W. Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Feb 24;101(8):2259-64.

387. Meek DW, Anderson CW. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Dec;1(6):a000950-0.
388. Kruse J-P, Gu W. Modes of p53 regulation. *Cell.* 2009 May 15;137(4):609-22.
389. Lee JT, Gu W. The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. *Cell Death Differ. Nature Publishing Group;* 2010 Jan;17(1):86-92.
390. Reed SM, Quelle DE. p53 Acetylation: Regulation and Consequences. *Cancers (Basel). Multidisciplinary Digital Publishing Institute;* 2014 Dec 23;7(1):30-69.
391. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature. Nature Publishing Group;* 1992 Jul 2;358(6381):15-6.
392. Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, Li K, Marmorstein R, Lane WS, et al. Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell.* 2006 Dec 28;24(6):841-51.
393. Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y, Gu W. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell.* 2008 May 16;133(4):612-26.
394. Muñoz-Fontela C, González D, Marcos-Villar L, Campagna M, Gallego P, González-Santamaría J, et al. Acetylation is indispensable for p53 antiviral activity. *Cell Cycle. Taylor & Francis;* 2011 Nov 1;10(21):3701-5.

395. Li T, Kon N, Jiang L, Tan M, Ludwig T, Zhao Y, et al. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell*. 2012 Jun 8;149(6):1269-83.
396. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. Nature Publishing Group; 1988 Sep 29;335(6189):440-2.
397. Frenzel LP, Reinhardt HC, Pallasch CP. Concepts of Chronic Lymphocytic Leukemia Pathogenesis: DNA Damage Response and Tumor Microenvironment. *Oncol Res Treat*. Karger Publishers; 2016;39(1-2):9-16.
398. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):817-25.
399. Alberts B, J. A., Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2007). *Molecular biology of the cell*, Garland Science.
400. Morgan, D. O. (2007). *The cell cycle: Principles of Control*. Lonson, New Science Press.
401. Morgan, D. O. (1995). "Principles of CDK regulation." *Nature* 374(6518): 131-134.
402. Cao L, Chen F, Yang X, Xu W, Xie J, Yu L. Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BMC Evol Biol*. BioMed Central; 2014 Jan 17;14(1):10-6.

403. Zhou Z, Fang Q, Li P, Ma D, Zhe N, Ren M, et al. Entinostat combined with Fludarabine synergistically enhances the induction of apoptosis in TP53 mutated CLL cells via the HDAC1/HO-1 pathway. *Life Sci.* 2019 Sep 1;232:116583.
404. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
405. Astl L, Tse A, Verkhivker GM. Interrogating Regulatory Mechanisms in Signaling Proteins by Allosteric Inhibitors and Activators: A Dynamic View Through the Lens of Residue Interaction Networks. *Adv Exp Med Biol.* Singapore: Springer Singapore; 2019;1163(2):187-223.
406. Huang Z, Ma A, Yang S, Liu X, Zhao T, Zhang J, et al. Transcriptome analysis and weighted gene co-expression network reveals potential genes responses to heat stress in turbot *Scophthalmus maximus*. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 2019 Nov 1;33:100632.
407. Shen Q, Zheng X, McNutt MA, Guang L, Sun Y, Wang J, et al. NAT10, a nucleolar protein, localizes to the midbody and regulates cytokinesis and acetylation of microtubules. *Exp Cell Res.* 2009 Jun 10;315(10):1653-67.







**Artículo 1**

Fludarabine resistance mediated by aminoglycoside-3'-phosphotransferase-IIa and the structurally related eukaryotic cAMP-dependent protein kinase.

**Artículo 2**

Elevated FANCA expression determines a worse prognosis in chronic lymphocytic leukemia and interferes with p53 function.

Fludarabine resistance mediated by aminoglycoside-3'-phosphotransferase-IIa and the structurally related eukaryotic cAMP-dependent protein kinase

Dámaso Sánchez-Carrera, Sara Bravo-Navas, Elena Cabezón, Ignacio Arechaga, Matilde Cabezas, Lucrecia Yáñez, and Carlos Pipaón

The FASEB Journal 2017 31:7, 3007-3017

<https://doi.org/10.1096/fj.201601245R>

Elevated FANCA expression determines a worse prognosis in chronic lymphocytic leukemia and interferes with p53 function

Sara Bravo-Navas, Lucrecia Yáñez, Íñigo Romón, and Carlos Pipaón

The FASEB Journal 2019 33:9, 10477-10489

<https://doi.org/10.1096/fj.201802439RR>







## 1. Abreviaturas.

### Abreviaturas

<b>14-3-3:</b>	Proteína activadora de tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa.
<b>A-T:</b>	Ataxia - telangiectasia.
<b>Ac:</b>	Anticuerpo.
<b>ADN :</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>AF:</b>	Anemia de Fanconi.
<b>AKT:</b>	Proteína serina-treonina quinasa.
<b>AMP:</b>	Adenosín monofosfato cíclico.
<b>ANOVA:</b>	Análisis de la varianza.
<b>AP-1:</b>	Proteína activadora 1.
<b>APAF-1:</b>	Factor 1 activador de proteasas de apoptosis.
<b>APC2:</b>	Subunidad del complejo APC/C promotor de la anafase.
<b>APP:</b>	Proteína precursora amiloide.
<b>ARN:</b>	Ácido ribonucleico.
<b>ARNm:</b>	ARN mensajero
<b>ARNseq:</b>	Secuenciación del transcriptoma.
<b>ARNt:</b>	ARN de transferencia.

<b>ATG-12:</b>	Proteína 12 similar a ubiquitina (UBL) relacionada con la autofagia.
<b>ATG-8:</b>	Proteína 8 similar a ubiquitina (UBL) relacionada con la autofagia.
<b>ATM:</b>	Ataxia-telangiectasia mutado.
<b>ATP:</b>	Adenosina trifosfato.
<b>ATR:</b>	ATM relativo a Rad3.
<b>BAD:</b>	Antagonista de Bcl-2 en la muerte celular.
<b>BAK:</b>	Antagonista de Bcl-2 /asesino 1
<b>BAX:</b>	Proteína X asociada a Bcl-2.
<b>BCA:</b>	Ácido bicinconínico.
<b>Bcl-2:</b>	Proteína 2 de linfoma de células B.
<b>Bcl-w:</b>	Proteína 2 similar a Bcl-2.
<b>Bcl-x:</b>	Proteína 1 similar a Bcl-2.
<b>Bcl-xL:</b>	Isoforma larga de la proteína 1 similar a Bcl-2.
<b>Bcl-xS:</b>	Isoforma corta de la proteína similar a Bcl-2.
<b>BCR:</b>	Receptor de célula B.
<b>Bfl-1:</b>	Gen relacionado con Bcl-2 en hígado fetal.
<b>BH:</b>	Dominio de homología a Bcl-2.
<b>BID:</b>	Dominio agonista de muerte celular que interacciona con Bcl-2.
<b>BIK:</b>	Asesino que interacciona con Bcl-2.
<b>BIM:</b>	<i>Mediador de muerte celular que interacciona con Bcl-2.</i>

<b>BIRC2:</b>	Proteína 2 que contiene la repetición de IAP (proteína inhibidora de apoptosis)
<b>BIRC3:</b>	<i>Proteína 3 que contiene la repetición de IAP (proteína inhibidora de apoptosis)</i>
<b>BLNK:</b>	B cell linker protein.
<b>Bmf:</b>	Factor modificador de Bcl-2.
<b>BMSCs:</b>	Células estromales de médula ósea.
<b>BR:</b>	Bendamustina/Rituximab.
<b>BRCA:</b>	Breast cancer.
<b>BSA:</b>	Albúmina de suero bovino.
<b>BTB:</b>	Dominio de las proteínas adaptadoras que reclutan sustratos en las CRL de tipo 3.
<b>BTK:</b>	<i>Tirosina quinasa de Bruton.</i>
<b>c-Rel:</b>	Factor de transcripción de NF- $\kappa$ B, codificado por el gen REL.
<b>cADN:</b>	ADN complementario.
<b>Cas9:</b>	Proteína 9 asociada a CRIPR.
<b>Caspasa:</b>	Proteasas cisteín-ácido aspártico.
<b>CDDP:</b>	Cis-platino.
<b>CDK:</b>	Quinasa dependiente de ciclina.
<b>CDKN1:</b>	p21
<b>CDT1:</b>	Chromatin licensing and DNA replication Factor 1.
<b>CFSE:</b>	Éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína.

<b>CHK1:</b>	Quinasa del punto de control 1.
<b>CHK2:</b>	Quinasa del punto de control 2.
<b>CKI:</b>	Inhibidor de CDK.
<b>COP9:</b>	Metaloproteasas dependiente de Zinc. Enzima de-neddilante.
<b>CRISPR:</b>	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas.
<b>CRL:</b>	Ligasas de ubiquitina Cullin-RING.
<b>CUL:</b>	Cullina. Cullin
<b>CXCL:</b>	Receptor de quimioquinas C-X-C.
<b>CXCR:</b>	Receptor de quimioquinas C-X-C.
<b>Cys:</b>	<i>Cisteína.</i>
<b>DBS:</b>	Roturas de doble hebra.
<b>DCN1:</b>	Ligasa E3 de neddilación.
<b>DD:</b>	Dominio de muerte.
<b>DDB1:</b>	Proteína de unión al daño en el ADN.
<b>DDR:</b>	Daño producido en el ADN.
<b>DEG:</b>	Genes expresados diferencialmente.
<b>del:</b>	Delección.
<b>DEN1:</b>	Enzima de-neddilante.
<b>DEPC:</b>	Dietilpirocarbonato.
<b>diGly:</b>	Resto de dos glicinas (GG).

<b>DMEN:</b>	Dulbecco's modified eagle medium.
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA-PK:</b>	Proteína quinasa dependiente de ADN.
<b>dNTPs:</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato.
<b>DTT:</b>	ditiotreitól
<b>DUBs:</b>	<i>Enzimas deubiquitinasas.</i>
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético.
<b>EGFR:</b>	Factor de crecimiento epidérmico.
<b>EGTA:</b>	Ácido etilenglicol tetraacético.
<b>ERK:</b>	Quinasa regulada por señales extracelulares.
<b>F-Box:</b>	Receptor de sustrato para las CRL de tipo 1.
<b>FA-BRCA:</b>	Ruta Fanconi-BRCA.
<b>FADD:</b>	Fas associating protein with DD.
<b>FANC:</b>	Grupo de Proteínas perteneciente a la familia de genes de AF.
<b>FBS:</b>	Suero bovino fetal.
<b>FCR:</b>	Fludarabina/Ciclofosfamida/Rituximab.
<b>FDB:</b>	Fludarabina.
<b>FISH:</b>	Hibridación in situ fluorescente.
<b>FITC:</b>	Isotiocianato de fluoresceína.
<b>GFP:</b>	Green Fluorescent protein.

<b>GO:</b>	Ontología génica.
<b>HR:</b>	Recombinación homóloga.
<b>Hrk:</b>	<i>Proteína de muerte 5/"harakin"</i>
<b>IAP:</b>	Proteína inhibidora de la apoptosis.
<b>ICL:</b>	Enlaces cruzados de ADN.
<b>Ig:</b>	Inmunoglobulina.
<b>IGHV:</b>	Región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas.
<b>IKK:</b>	Quinasa de $\kappa\text{B}$ . Formada por $\text{IKK}\alpha$ , $\text{IKK}\beta$ y NEMO.
<b>IL-1:</b>	Interleuquina 1
<b><math>\text{I}\kappa\text{B}\alpha</math>:</b>	Inhibidor alfa de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ .
<b>JNK:</b>	Quinasa de Jun en N-terminal.
<b>kD:</b>	KiloDalton.
<b>LLC:</b>	Leucemia linfática crónica B.
<b>LYN:</b>	Nueva proteína tirosina quinasa relacionada con Lck/Yes/tirosina quinasa Lyn.
<b>Lys:</b>	Lisina.
<b>LysC:</b>	Endoproteinasa.
<b>M-LLC:</b>	<i>Células LLC con IGHV mutado.</i>
<b>MAPK:</b>	Quinasa activada por mitógeno.
<b>Mcl-1:</b>	Secuencia 1 de leucemia de células mieloides.
<b>MDM2:</b>	Murine double minute 2.

<b>miARN:</b>	Micro ARN.
<b>MK2:</b>	<i>Proteína quinasa 2 activada por MAPK.</i>
<b>MLN4924:</b>	Inhibidor de la neddilación. (pevonedistat).
<b>MMC:</b>	Mitomicina c.
<b>MMTV:</b>	Virus del tumor mamario de ratón.
<b>MOMP:</b>	Permeabilización de la membrana mitocondrial externa.
<b>MSCs:</b>	Células estromales de origen mesenquimal.
<b>mTOR:</b>	Diana de rapamicina en células de mamífero.
<b>MYD88:</b>	Proteína adaptadora.
<b>NAE:</b>	Enzima activadora de NEDD8.
<b>NEDD8:</b>	Péptido similar a ubiquitina.
<b>NEMO:</b>	Modulador esencial de NF- $\kappa$ B. Conocido también por IKK $\gamma$ .
<b>NER:</b>	Reparación por excisión de nucleótidos.
<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b>	Factor nuclear $\kappa$ B.
<b>NHEJ:</b>	Recombinación no homóloga.
<b>NIK:</b>	Quinasa inductora NF- $\kappa$ B.
<b>NK:</b>	Células "Natural Killer".
<b>NLCs:</b>	Nurse-like cells
<b>NOTCH1:</b>	proteína 1 homóloga del locus neurogénico NOTCH.
<b>NOXA:</b>	Proteína 1 inducida por forbol-12-miristato-13-acetato.

<b>NP-40:</b>	Nonil fenoxipolietoxietanol.
<b>NRF2:</b>	Factor de transcripción involucrado en respuesta al estrés oxidativo.
<b>NUB1:</b>	NEDD8 ultimate buster-1.
<b>ORF:</b>	open reading frame
<b>PARC:</b>	Proteína de anclaje citoplasmática.
<b>pb:</b>	<i>Pares de bases.</i>
<b>PBMC:</b>	Células mononucleares de sangre periférica.
<b>PBS:</b>	Tampón fosfato salino.
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>PH:</b>	Dominio de homología a pleckstrina.
<b>PI3K:</b>	Quinasa de fosfatidilinositol-4, 5-bifosfato.
<b>PIKK:</b>	<i>Proteína con actividad quinasa similar a PI3K.</i>
<b>PIP2:</b>	<i>Fosfatidilinositol -4,5 -bifosfato.</i>
<b>PIP3:</b>	Fosfatidilinositol trifosfato.
<b>PKA:</b>	Proteína quinasa A.
<b>PKC:</b>	<i>Proteína quinasa C.</i>
<b>PLC-2:</b>	Fosfolipasa C 2.
<b>PMSF:</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
<b>PTK:</b>	Proteína tirosin quinasa.
<b>PTM:</b>	<i>Modificaciones postraduccionales.</i>

<b>PUMA:</b>	Modulador de la apoptosis inducido por TP53/componente 3 de unión a Bcl-2.
<b>PVDF:</b>	Fluoruro de polivinilideno.
<b>qPCR:</b>	PCR cuantitativa.
<b>r.p.m:</b>	Revoluciones por minuto.
<b>RAF-1:</b>	Proteína quinasa serina/treonina.
<b>RAS:</b>	Proteína G señalizadora. Familia de proteínas GTPasas.
<b>RBX1:</b>	Subunidad del dominio RING-BOX de ligasas E3. Homólogo RBX2.
<b>RelA:</b>	Factor de transcripción de NF-κB, codificado por el gen RELA
<b>RelB:</b>	Factor de transcripción de NF-κB, codificado por el gen RELB.
<b>RIP:</b>	Proteína inactivadora de ribosomas.
<b>RLD:</b>	dominios homólogos al regulador de la condensación de la cromatina RCC1
<b>RPMI:</b>	Roswell Park Memorial Institute.
<b>RT-PCR:</b>	PCR con transcripción reversa.
<b>SCF:</b>	Ligasa de ubiquitina (SKP1-Cullin-Fbox)
<b>SDS-PAGE:</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
<b>SDS:</b>	Dodecilsulfato sódico.
<b>SF3A1:</b>	Subunidad 1 del factor de splicing 3a.
<b>SF3B1:</b>	Subunidad 1 del factor de splicing 3b.
<b>SH2:</b>	Src homology 2.

<b>shRNA:</b>	Small harping RNA.
<b>SKP1:</b>	Proteína adaptadora.
<b>SOCS:</b>	Receptor de sustrato para las CRL de tipo 2.
<b>Sp1:</b>	Factor de transcripción.
<b>SPSS:</b>	Statistical package for the social sciences.
<b>SRC:</b>	Activador de tirosin quinasas de membrana o citoplasmáticas.
<b>STAT:</b>	Traductor de señales y activador de la transcripción.
<b>STAT3:</b>	Traductor de señales y activador de la transcripción 3.
<b>SUMO:</b>	Small Ubiquitin-like modifier.
<b>SV40T:</b>	Simian virus 40 T antigen.
<b>SYK:</b>	Proteína tirosin quinasa del bazo.
<b>TA:</b>	Temperatura ambiente.
<b>TAD:</b>	Dominio de transactivación.
<b>Taq:</b>	Polimerasa de Thermophilus Aquaticus.
<b>TBE:</b>	Tris-borato EDTA.
<b>tBID:</b>	Proteína BID truncada.
<b>TBS-T:</b>	Tampón tris salino con 0,1% de Tween®20
<b>TH:</b>	Dominio de homología Tec quinasas.
<b>Tm:</b>	Temperatura de melting.
<b>TM:</b>	Dominio transmembrana.

<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa.
<b>TNF:</b>	Factor de necrosis tumoral.
<b>TP53:</b>	Antígeno tumoral celular p53.
<b>TPA:</b>	12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato.
<b>TRADD:</b>	TNF receptor - associating protein with DD.
<b>TRAF:</b>	Miembro de la familia de proteínas del factor asociado al receptor TNF.
<b>Tris:</b>	Trisaminometano.
<b>U-LLC:</b>	Células LLC con IGHV no mutado.
<b>UBA3:</b>	Enzima E1 activadora de ubiquitina.
<b>UBB/Ub:</b>	Ubiquitina.
<b>UBC:</b>	Enzima E2 conjuradora de ubiquitina.
<b>UBE2F:</b>	Enzima E2 de conjugación específica de NEDD8.
<b>UBE2M:</b>	Enzima E2 de conjugación específica de NEDD8. (UBEC12).
<b>UBE2T:</b>	Enzima E2 de conjugación de ubiquitina.
<b>UBL:</b>	Modificación similar a ubiquitina.
<b>UCH-L3:</b>	Hidrolasa C-terminal de ubiquitina.
<b>UFD:</b>	Dominio globular de ubiquitina.
<b>ULP:</b>	Proteasas de tipo ubiquitina.
<b>USP:</b>	Proteasas específicas de ubiquitina.
<b>UV:</b>	Radiación ultravioleta.

<b>VECs:</b>	Células endoteliales vasculares.
<b>Vm:</b>	Vimentina.
<b>WB:</b>	Western Blotting.
<b>WS:</b>	Síndrome de Werner.
<b>wt:</b>	Wild type. Agreste.
<b>WW:</b>	Dominio proteico modular que media interacciones específicas con ligandos.
<b>XIAP:</b>	Proteína inhibidora de la apoptosis (IAP) ligada al cromosoma X.
<b>XLA:</b>	Agammaglobulinemia ligada a cromosoma X.
<b>XP:</b>	Xeroderma pigmentosum.
<b>ZAP-70:</b>	Proteína asociada $\xi$ de 70 kDa.
<b>ZMYM3:</b>	Gen implicado en la remodelación de la cromatina.

## 2. Índice de Figuras y Tablas.

### Figuras.

- 37 **Figura 1:** Esquema de ubiquitinación.
- 39 **Figura 2:** Estructura de las ligasas de ubiquitina HECT-E3.
- 40 **Figura 3:** Estructura de las ligasas de ubiquitina RING-E3.
- 41 **Figura 4:** Diferentes tipos de estructuras que pueden presentar las ligasas de ubiquitina RING-E3.
- 42 **Figura 5:** Diagrama de una ligasa de ubiquitina E3-Cullin-RING.
- 44 **Figura 6:** Diferentes estructuras CRL en función del tipo de CUL que forma el núcleo catalítico junto con la proteína RING.
- 47 **Figura 7:** Esquema de Neddilación.
- 63 **Figura 8:** Principales tratamientos de la LLC y sus dianas moleculares.
- 67 **Figura 9:** Esquema de las vías de la apoptosis.
- 73 **Figura 10:** Microambiente de la LLC.
- 75 **Figura 11:** Diagrama de las rutas de señalización alteradas en la LLC.
- 80 **Figura 12:** Esquema de las vías de señalización del BCR.
- 83 **Figura 13:** Vías de señalización de la ruta NF- $\kappa$ B.
- 90 **Figura 14:** Activación de los puntos de control del ciclo celular en respuesta a los DSB mediada por ATM.
- 92 **Figura 15:** Esquema de las vías que se activan en respuesta al daño producido en el ADN mediadas a través de p53.

- 134 **Figura 16:** Diferencias en la expresión de genes FANC, analizados por qPCR, entre pacientes con LLC y células B CD19+ de control, obtenidas a partir de amígdalas resecadas o sangre periférica de donantes sanos.
- 136 y 137 **Figura 17:** Análisis de la expresión de los genes FANCA, FANCF, FANCI, FANCD2 y FANCB mediante qPCR en muestras de LLC, de acuerdo con el nivel de progresión de la enfermedad.
- 138 **Figura 18:** Probabilidad de progresión en función del nivel de expresión de FANCA en pacientes con LLC.
- 139 **Figura 19:** Alteración de la expresión génica inducida por FANCA.
- 141 **Figura 20:** Variación en la expresión de genes diana de p53 inducida por FANCA.
- 142 **Figura 21:** La sobreexpresión de FANCA altera la expresión del ARNm de p21.
- 143 **Figura 22:** La sobreexpresión de FANCA altera la expresión del ARNm de dianas de p53 como p21 y  $\Delta Np73\alpha$ .
- 144 **Figura 23:** El silenciamiento de la expresión de FANCA favorece la expresión del ARNm de p21.
- 145 **Figura 24:** Una mutación dirigida por CRISPR/Cas9 sobre la proteína FANCA favorece la expresión del ARNm de p21.
- 147 **Figura 25:** La sobreexpresión de FANCA favorece la proliferación de las células B linfoblastoides.
- 148 **Figura 26:** Efecto de FANCA sobre la proliferación de células B-LLC.
- 150 **Figura 27:** Las proteínas FANCA y NUB1L cooperan en la inhibición de la función del gen p53.
- 151 **Figura 28:** Las proteínas FANCA y NUB1L cooperan en la inhibición de la función del gen p53.

- 152 **Figura 29:** Las proteínas FANCA y NUB1L cooperan en la disminución de la estabilidad del gen p53.
- 153 y 154 **Figura 30:** Las proteínas FANCA y MDM2 cooperan en la desestabilización de la proteína p53.
- 155 **Figura 31:** FANCA y NUB1L promueven la localización citoplasmática de p53.
- 159 y 160 **Figura 32:** Diagramas de porcentajes.
- 172 **Figura 33:** El tratamiento con MLN4924 parece afectar al porcentaje de sombras de Gumprecht en pacientes LLC.
- 177 **Figura 34:** El MLN4924 altera la expresión de varios genes diana de la ruta NF- $\kappa$ B.
- 178 **Figura 35:** Alteración de la expresión génica inducida por MLN4924.
- 184 **Figura 36:** El mutante K120R de la proteína p53 no afecta la actividad transcripcional de p53.
- 185 **Figura 37:** El mutante K120R de la proteína p53 no afecta la localización subcelular de p53.
- 186 **Figura 38:** El mutante K120R de p53 no afecta la estabilidad de la proteína p53.
- 187 **Figura 39:** La neddilación de la lisina 120 afecta a la función de la proteína p53.
- 188 **Figura 40:** Efecto de la neddilación de K120 sobre la transcripción de genes diana de p53 en células MEC-1.
- 189 **Figura 41:** La neddilación de la lisina 120 no afecta a la estabilidad de la proteína p53.
- 190 **Figura 42:** La modificación de la lisina 120 interfiere con el dominio de unión al ADN de la proteína p53, en su interacción con  $\Delta$ Np73.

191 **Figura 43:** La neddilación de la lisina 120 afecta a la viabilidad de las células B-LLC en respuesta a quimioterápicos como la Fludarabina.

## Tablas.

- 105 y 106 **Tabla 1:** Características generales de los 101 pacientes de LLC estudiados.
- 110 a 114 **Tabla 2:** Listado de líneas reactivos empleadas.
- 117 **Tabla 3:** Listado de las secuencias de los cebadores utilizados.
- 124 **Tabla 4:** Listado de los anticuerpos primario empleados.  
125
- 125 **Tabla 5:** Listado de los anticuerpos secundarios utilizados.
- 135 **Tabla 6:** Diferencias en las características clínicas y citogenéticas de los pacientes estudiados, en relación con su nivel de expresión de FANCA.
- 139 y 140 **Tabla 7:** Genes expresados diferencialmente en células B-LLC que sobreexpresan FANCA, relacionados con la regulación negativa de la muerte celular.
- 158 **Tabla 8:** Tabla de las características clínicas, analíticas y citogenéticas de los dos pacientes LLC analizados en el rastreo.
- 161 **Tabla 9:** Tabla de las proteínas Cullinas que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.
- 162 **Tabla 10:** Tabla de enzimas pertenecientes a la cascada de neddilación que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.
- 162 **Tabla 11:** Tabla de los diferentes residuos del péptido NEDD8 que se encuentran modificados en nuestro rastreo.

- 163 a 169 **Tabla 12:** Tabla de histonas que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.
- 170 y 171 **Tabla 13:** Tabla de proteínas del citoesqueleto que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.
- 173 **Tabla 14:** Tabla de proteínas implicadas en el splicing del RNA que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.
- 174 **Tabla 15:** Tabla de sitios específicos de la quinasa BTK que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.
- 176 **Tabla 16:** Tabla de sitios específicos de las quinasas LYN y SYK que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.
- 179 **Tabla 17:** Tabla de proteínas implicadas en la ruta NF- $\kappa$ B que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.
- 180 **Tabla 18:** Tabla de la modificación encontrada en la proteína MIB1, implicada en la ruta Notch.
- 181 **Tabla 19:** Tabla de factores de transcripción implicados en la ruta Notch que se encuentran modificados en nuestro rastreo.
- 182 **Tabla 20:** Tabla de proteínas implicadas en la reparación del ADN que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.
- 183 **Tabla 21:** Tabla de las proteínas implicadas en la reparación del ADN y ubiquitinación que se encuentran modificadas en nuestro rastreo.





