



Paper de la proteïna ZAP-70 en la regulació de la interacció de la leucèmia limfàtica crònica amb el microambient

Eva Calpe Berdiel

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona

**PAPER DE LA PROTEÏNA ZAP-70 EN LA REGULACIÓ DE
LA INTERACCIÓ DE LA LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA
AMB EL MICROAMBIENT**

TESI DOCTORAL
PROGRAMA DE DOCTORAT EN MEDICINA

Eva Calpe Berdiel

Barcelona, 2013



Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona

**PAPER DE LA PROTEÏNA ZAP-70 EN LA REGULACIÓ DE
LA INTERACCIÓ DE LA LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA
AMB EL MICROAMBIENT**

Eva Calpe Berdiel

Llicenciada en Biotecnologia

Director de tesi: Dr. Francesc Bosch i Albareda

Tutor de tesi: Dr. Emili Monsterrat i Costa

Servei d'Hematologia. Hospital Vall d'Hebron

Barcelona, 2013

Más se estima lo que con más trabajo se gana (*Aristóteles*)

La ciencia avanza a pasos, no a saltos (*Thomas B. Macaulay*)

Sólo de un modo se puede acertar; errar, de infinitos (*Benito Jerónimo Feijóo*)

Al meu pare

RESUM

La Leucèmia Limfàtica Crònica (LLC) és una neoplàsia maligna caracteritzada per l'acumulació monoclonal i progressiva de limfòcits B madurs a la sang, moll de l'os i òrgans limfoides. És la leucèmia més comú al món occidental, afecta als adults i la seva incidència és major en edats avançades, essent més freqüent en homes. Malgrat els avenços en el coneixement de la patogenicitat, la LLC continua essent una malaltia incurable. La LLC és una malaltia clínicament molt heterogènia. Els pacients poden presentar una evolució molt ràpida de la malaltia o, per contra, tenir una esperança de vida normal.

Un dels factors pronòstic independents que ajuda a determinar la probabilitat de progressió i la supervivència és la proteïna ZAP-70. Aquesta proteïna ha estat associada amb una major senyalització del BCR i a una major resposta a estímuls de supervivència i migració. Aquests estímuls provindrien d'ambients favorables com el present als ganglis limfàtics i al moll de l'os, localització preferent de les cèl·lules de LLC. Amb aquest coneixement, la present tesi va ésser plantejada amb l'objectiu d'estudiar els efectes de la proteïna ZAP-70 en la regulació de la interacció de les cèl·lules de LLC amb el microambient.

El primer estudi es va iniciar amb la generació de dues línies cel·lulars que expressen la proteïna ZAP-70 de manera estable. La proteïna ZAP-70 va augmentar la senyalització de l'IgM-BCR, i no de l'IgD-BCR, mitjançant l'activació d'Akt i ERK1/2. L'activació constitutiva de ZAP-70, a la segona línia estable, va permetre observar que, per si sola, ZAP-70 és capaç de potenciar l'activació de la via de les MAPK. També es va observar que ZAP-70 pot retardar la internalització d'elements del BCR posterior a l'activació d'aquest, explicant la perllongada activitat senyalitzadora. L'estimulació del BCR en cèl·lules amb expressió de ZAP-70 va ésser capaç de modular diferencialment l'expressió de diferents receptors de quimioquines, destacant l'augment d'expressió de CCR7, el qual va resultar ésser dependent de l'activació d'ERK1/2. Nivells elevats d'aquest receptor van implicar major senyalització d'aquest, posterior a la lligació de la quimioquina CCL21, i major migració *in vitro*. Estudis amb mostres primàries de pacients amb LLC varen mostrar elevada expressió de CCR7 en cèl·lules amb alta expressió de ZAP-70, així com elevada capacitat de migració.

El segon estudi es va plantejar amb l'objectiu d'observar, *in vivo*, la capacitat d'infiltració dels limfòcits B malignes amb expressió de ZAP-70 com a únic factor diferencial. Els ratolins inoculats amb limfòcits amb expressió de ZAP-70 no varen presentar diferències en supervivència respecte als ratolins controls però sí es va observar una major infiltració del moll de l'os. La principal quimioquina que regula el tràfic de limfòcits al moll de l'os és la CXCL12 i els nostres estudis varen confirmar *in vitro* que ZAP-70 provoca una major migració cel·lular a aquesta quimioquina. Aquest augment de migració no es dona per un increment en els nivells del receptor CXCR4, sinó per una major senyalització d'aquest amb la lligació de la quimioquina.

En conclusió, segons les nostres observacions, la proteïna ZAP-70 augmenta la senyalització del BCR i modula l'expressió d'alguns receptors de quimioquines com el CCR7. ZAP-70 augmenta la infiltració del moll de l'os per la cèl·lula B maligna, principalment per una major senyalització del receptor CXCR4 posteriorment a la seva estimulació. En pacients amb LLC, aquest mecanisme facilitaria l'accés de les cèl·lules malignes a rebre estímuls anti-apoptòtics i senyals de proliferació en un ambient favorable, com és el moll de l'os. En conseqüència, possibles teràpies inhibidores d'aquest tàndem CXCR4/CXCL12 podrien contribuir a la millora en el tractament d'aquesta malaltia.

SUMMARY

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a malignant neoplasm characterized by the monoclonal and progressive accumulation of mature B lymphocytes in blood, bone marrow and lymph nodes. CLL is the most common leukemia found in adults in Western countries being slightly more common in men. Despite significant advances in understanding the pathogenesis, it is still an incurable disease. CLL is a very heterogeneous disease and patients can have a very fast progression or conversely, have a normal life span.

One of the independent prognostic factors that help to determine the progression and survival is ZAP-70 protein. This protein has been related to enhanced signaling through the BCR, and to increased response to diverse migrative and survival stimuli. These stimuli come from favorable microenvironments, mainly from the lymph node and bone marrow, where these cells accumulate. Against this background, this thesis aimed to ascertain the specific influence of ZAP-70 protein in the crosstalk between CLL cells and the microenvironment.

The first study was initiated with the generation of two cell lines stably expressing ZAP-70 protein. The protein ZAP-70 increased the signaling from IgM-BCR, but not from IgD-BCR, by enhancing Akt and ERK1/2 activation. Constitutively active ZAP-70 found in the second cell line was sufficient to potentiate MAPK signaling. A delayed internalization of components from the BCR was observed after receptor activation in ZAP-70 expressing cells, probably explaining the increased activation observed. Stimulation of the BCR in ZAP-70-expressing cell line lead to a differential modulation of chemokine receptors expression. The most significant change was the up-regulation of CCR7 expression, which was dependent on the activation of ERK1/2. Moreover, stimulation of CCR7 with CCL21 in ZAP-70-expressing cells caused an increased signaling and migration *in vitro*. Subsequent analysis of primary samples from patients with CLL confirmed the increased expression of CCR7 and migrative capacity in ZAP-70 positive cells.

The aim of the second study was to observe *in vivo* the migratory pattern of cells with ZAP-70 expression as the only variable. Mice inoculated with a ZAP-70-expressing cell line did not have a different survival from that of control mice, however, a remarkable greater infiltration of the bone marrow was observed in these mice. The main chemokine regulating the trafficking of B-lymphocytes into the bone marrow is CXCL12. *In vitro* experiments showed that ZAP-70 causes an increased migration toward this chemokine. This enhanced migration was not related to an increased expression of the CXCR4 receptor but to an enhanced signaling upon chemokine ligation.

Collectively, our findings suggest that ZAP-70 enhances BCR signaling and modulates chemokine receptors on cell surface such as CCR7. ZAP-70 enhances the migration of malignant B-cells into the bone marrow mainly by enhancing signaling and migration after CXCR4 stimulation. In patients with CLL, this mechanism would facilitate the access of malignant cells to receive additional survival, anti-apoptotic and proliferative signals that can be found in the supportive microenvironment of the bone marrow. Consequently, the development of new treatments blocking the tandem CXCR4/CXCL12 may contribute to the improvement of the CLL treatment strategy.

ABREVIATURES	i
I. INTRODUCCIÓ	1
1. DESENVOLUPAMENT LIMFOCITARI	1
1.1. Diferenciació dels limfòcits pro-B.....	3
1.2. Desenvolupament del limfòcit pre-B i limfòcit B immadur.....	4
1.3. Selecció del repertori madur de receptors antigènics (limfòcit B madur).....	6
2. LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA	8
2.1. Generalitats	8
2.2. Origen cel.lular	9
2.3. Pronòstic.....	13
2.3.1. Factors pronòstic clínics	14
2.3.2. Factors pronòstic biològics.....	16
2.3.2.1. Marcadors sèrics	16
2.3.2.2. Estat mutacional de les IGHV	17
2.3.2.3. Anomalies cromosòmiques.....	18
2.3.2.4. Expressió del CD38.....	20
2.3.2.5. Expressió de la proteïna ZAP-70	20
2.4. Mutacions	21
3. LLC I MICROAMBIENT	23
3.1. Compartiments i cèl·lules del microambient	23
3.1.1. Sang perifèrica	24
3.1.2. Moll de l'os	25
3.1.3. Ganglis limfàtics	26
3.2. Senyals del microambient.....	29

3.2.1. Factors solubles.....	29
3.2.1.1. Citoquines	29
3.2.1.2. Quimioquines.....	30
3.2.1.2.1. Receptor i transducció de senyal	33
3.2.1.2.2. Migració limfocitària	35
3.2.1.3. Altres factors solubles	36
3.2.2. Molècules d'adhesió i altres receptors de membrana	37
3.2.3. Receptor de cèl·lules B (BCR).....	39
4. LA PROTEÏNA ZAP-70	42
4.1. Estructura de la proteïna ZAP-70	43
4.2. ZAP-70 en limfòcits B i T normals	45
4.3. ZAP-70 com a factor pronòstic	46
4.4. ZAP-70 i la senyalització al BCR.....	47
II. HIPÒTESI I OBJECTIUS	51
III. RESULTATS	57
CAPÍTOL 1	59
CAPÍTOL 2	79
IV. DISCUSSIÓ	117
V. CONCLUSIONS	129
VI. BIBLIOGRAFIA	133

LLISTA DE FIGURES

Figura 1. Hematopoiesi en humans.....	1
Figura 2. Estructura molecular de les immunoglobulines.....	5
Figura 3. Desenvolupament de la LLC basat en un model murí.....	12
Figura 4. Corba de supervivència de la LLC amb IGHV mutat i no mutat.....	17
Figura 5. Supervivència global i anomalies genètiques en la LLC.....	19
Figura 6. Compartiments de les cèl·lules de LLC.....	24
Figura 7. Centre de proliferació als ganglis limfàtics.....	27
Figura 8. Senyals entre les cèl·lules de LLC i el microambient.....	29
Figura 9. Estructura i senyalització dels receptors de quimioquines.....	34
Figura 10. Etapes de la migració endotelial.....	35
Figura 11. Senyalització del BCR.....	39
Figura 12. Estructura de la proteïna ZAP-70.....	43
Figura 13. Correlació entre ZAP-70 i les mutacions d'IGHV.....	47
Figura 14. ZAP-70 i la senyalització al BCR.....	48

LLISTA DE TAULES

Taula 1. Estadis bàsics maduratiu dels limfòcits B.	3
Taula 2. Factors pronòstic clínics i biològics de la LLC	13
Taula 3. Estratificació Rai i Binet de la LLC	14
Taula 4. Classificació dels receptors de quimioquines	31

ABREVIATURES

ADN Àcid desoxiribonucleic

BCR *B-cell receptor*

BMSC *Bone Marrow Stromal Cell*

BTK *Bruton's tyrosine kinase*

CD *Cluster of differentiation*

CDR *Complementary-determining regions*

CG Centre germinal

DLEU *Deleted in lymphocytic leukemia*

ERK *Extracellular signal-regulated kinase*

FGF *Fibroblast Growth Factor*

FISH Hibridació fluorescent *in situ*

GPCR *G-protein coupled receptor*

HEV *High endothelial venules*

HSC *Hematopoietic stem cell*

IFN Interferó

IG Immunoglobulina

IGHV *Immunoglobulin heavy chain variable*

IL Interleuquina

ITAM *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

JNK *c-JUN NH₂-terminal kinase*

LAT *Linker for activation of T cells*

LDH Lactat deshidrogenasa

LLA Leucèmia Limfoblàstica Aguda

LLC Leucèmia limfàtica crònica

MALT *Mucosa-associated lymphoid tissue*

MAPK *Mitogen-activated protein kinase*

MBL *Monoclonal B lymphocytosis*

MHC *Major histocompatibility complex*

MMP *Matrix metalloproteinase*

MO Moll de l'os

NFAT *Nuclear factor of activated T cells*

NF- κ B *Nuclear factor κ B*

NK *Natural killer*

NLC *Nurse-like cell*

PAMP *Pathogen-associated molecular patterns*

PBMC *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PFS *Progression-free survival*

PI3K Fosfatidil-inositol 3-quinasa

PIP3 Fosfatidil-inositol trifosfat

PKC *Protein kinase C*

PLC γ Fosfolipasa-C γ

SDF-1 α *Stromal cell-derived factor-1 α*

SYK *Spleen tyrosine kinase*

TCR *T-cell receptor*

TK *Timidina-quinasa*

TLR *Toll-like receptor*

TNF *Tumor necrosis factor*

TREG *Regulatory T cell*

VCAM-1 *Vascular cell adhesion molecule-1*

VEGF *Vascular endothelial growth factor*

VLA *Very late antigen*

ZAP-70 *Zeta-associated protein-70*

β2-MG *β2-Microglobulina*



INTRODUCCIÓ

1. DESENVOLUPAMENT LIMFOCITARI

L'hematopoesi es defineix com el procés de formació, desenvolupament i maduració de les cèl·lules sanguínies (eritròcits, leucòcits i plaquetes) a partir d'una cèl·lula precursora indiferenciada anomenada cèl·lula mare hematopoiètica.¹ Les cèl·lules sanguínies tenen una vida limitada i per això cal una producció contínua de noves cèl·lules al llarg de tota la vida de l'individu; s'estima que una persona adulta necessita una producció d'uns cent mil milions de noves cèl·lules hematopoiètiques cada dia.²

El primer pas en la diferenciació de la cèl·lula mare comporta la bifurcació entre la línia mieloide i limfoide (Figura 1).

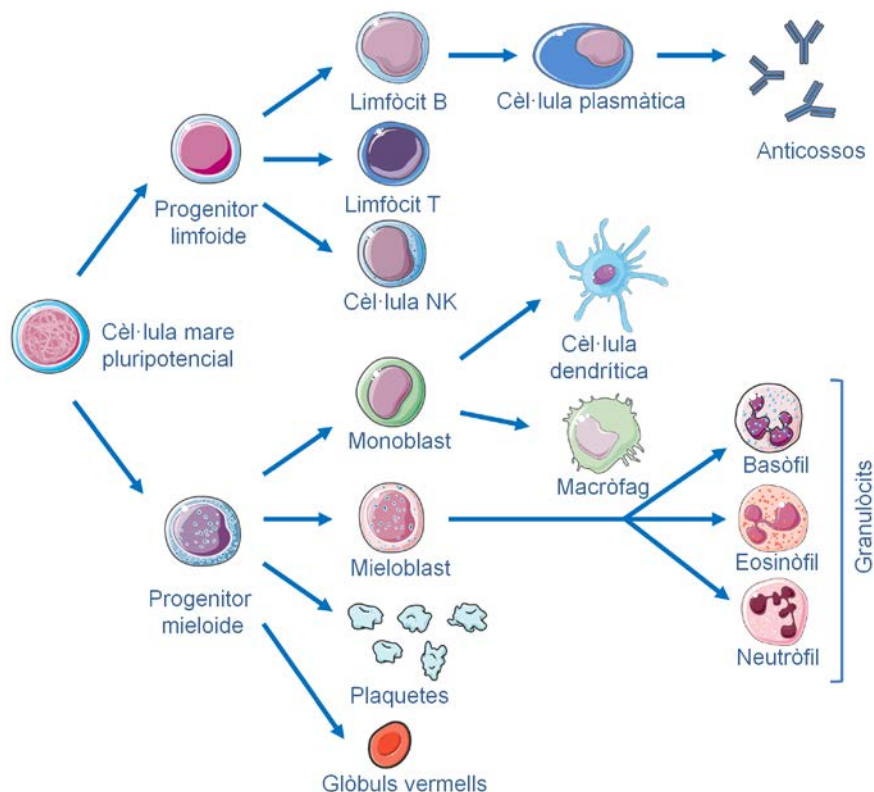


Figura 1. Hematopoesi en humans. Maduració i diferenciació de la cèl·lula mare pluripotencial al llinatge limfoides o mieloide. Elaboració pròpia.

El procés maduratiu de la línia mieloide permet obtenir diferents tipus cel·lulars, com són els macròfags, els diferents tipus de granulòcits, els glòbuls vermells, les cèl·lules dendrítiques i les plaquetes. Paral·lelament, la línia limfoide genera limfòcits B, limfòcits T, algunes cèl·lules dendrítiques i limfòcits NK (de l'anglès *natural killer*).³

El procés maduratiu d'ambdues línies s'inicia en la vida fetal i es dona principalment al fetge. Un cop el moll de l'os es desenvolupa al final de la gestació, és aquest el que assumeix la formació de la majoria de les cèl·lules sanguínies. No obstant, la maduració, activació i proliferació d'algunes cèl·lules limfoides es dona en òrgans limfoides secundaris (melsa, timus i ganglis limfàtics).⁴

Centrant la nostra atenció en el limfòcits B, aquests són els encarregats de la resposta immune de l'organisme davant antígens estranys. L'objectiu de la maduració limfocitària és, per tant, obtenir una població diversa de limfòcits B perifèrics capaços de ser autotolerants i reactius davant nombrosos antígens externs. Per assolir aquesta funció, els limfòcits B han de passar per una sèrie d'estadis de maduració, representats a la **Taula 1** i descrits a continuació.⁵

MADURACIÓ DELS LIMFÒCITS B						
	Cèl·lula progenitora	Pro-B	Pre-B	B immadur	B madur	B efector
Localització	MO				Perifèria	
Antigen	Independent			Antigen propi		Antigen estrany
Ig a membrana	No			IgM	IgM IgD	- Canvi d'isotip - Maduració d'afinitat - Secreació d'Ig

Taula 1. Estadis bàsics madurats dels limfòcits B.

1.1. Diferenciació dels limfòcits pro-B⁶

Les fases inicials del desenvolupament dels limfòcits B tenen lloc al moll de l'os i depenen de la presència de les cèl·lules de l'estroma. Aquestes cèl·lules sintetitzen factors de creixement que estimulen la proliferació i diferenciació dels progenitors.⁶ Aquests limfòcits són grans i no expressen immunoglobulines a la membrana, però sí comencen el procés de reordenament d'aquests gens, concretament de la cadena pesada (H, de l'anglès *heavy*) de la immunoglobulina M (IgM), anomenada cadena μ . Si aquest reordenament de les cadenes pesades de les immunoglobulines (IGHV, de l'anglès *immunoglobulin heavy chain variable*) és productiu, el limfòcit passarà a anomenar-se pre-B (Taula 1).

1.2. Desenvolupament del limfòcit pre-B i limfòcit B immadur (reordenament dels gens de les immunoglobulines)

Aquesta fase continua tenint lloc al moll de l'os i és independent de l'antigen. El limfòcit continua essent gran i amb elevada capacitat proliferativa (limfoblast). El limfòcit pro-B passa a anomenar-se pre-B en el moment en què es dona la recombinació seqüencial dels segments gènics culminant amb la generació d'immunoglobulines funcionals. Aquest procés funciona en paral·lel a l'expressió de proteïnes senyalitzadores accessòries necessàries per a l'expressió del receptor de limfòcits pre-B (pre-BCR) i del receptor de limfòcits B (BCR, de l'anglès *B-cell receptor*) a la membrana cel·lular dels limfòcits pre-B o els limfòcits B immadurs, respectivament. És precisament quan finalitza aquest reordenament dirigit a la síntesi completa de la immunoglobulina IgM quan el limfòcit passa a anomenar-se limfòcit B immadur.

La síntesi de cada una de les cadenes de les immunoglobulines implica la reordenació de diversos segments gènics, les combinacions dels quals resulten en els diversos gens funcionals, responsables directes de la codificació de cada una de les cadenes d'immunoglobulines. Això explica les nombroses possibilitats de formació del gran nombre d'immunoglobulines, a partir d'un material genètic limitat. Aquest reagrupament de segments de gens donarà lloc a la síntesi de les cadenes pesades i lleugeres (**Figura 2**).

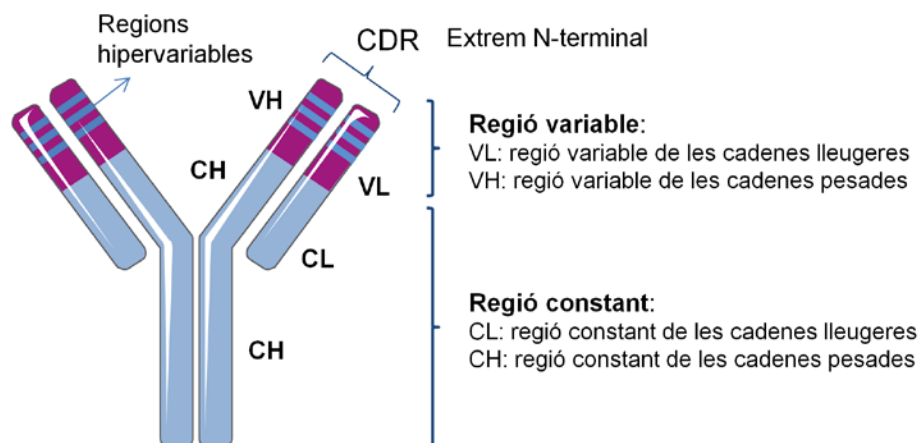


Figura 2. Estructura molecular de les immunoglobulines. CDR: de l'anglès *complementary-determining regions*. Elaboració pròpia.

- Cadena pesada H: Tots els gens que codifiquen per les cadenes pesades es troben localitzats al cromosoma 14. Els dominis constants de les cadenes pesades (C_H) són codificats per un únic gen per cada isotip (α , δ , ϵ , γ , μ) i es troben, respectivament, als diferents anticossos expressats pels limfòcits B, coneguts com immunoglobulina IgA, IgD, IgE, IgG i IgM. Aquesta regió constant de les cadenes pesades només contribuirà al tipus d'anticòs expressat, però no ho farà a la diversitat, donat que no modificarà l'especificitat per l'antigen. En canvi, per codificar el domini variable de la cadena pesada (V_H) els gens s'organitzen en tres grups, els gens V (variables), els gens D (diversitat) i els gens J (acoblament, de l'anglès *joining*). Cada combinació V-D-J (50-30-6 gens respectivament) codificarà per un domini variable diferent, lloc d'unió de l'antigen, i donarà lloc a un total de 9000 cadenes pesades possibles per cada una de les immunoglobulines.

- Cadena lleugera L : Hi ha dos tipus de cadenes lleugeres, kappa (κ ; gens al cromosoma 2) i lambda (λ ; gens al cromosoma 22). De la mateixa manera que s'observa a les cadenes pesades, les cadenes lleugeres també tenen dos dominis successius, el domini constant (C_L) i el domini variable (V_L), sent aquest últim el lloc d'unió de l'antigen. En el cas de les cadenes κ hi haurà una unió a l'atzar de gens V-D (40-5 gens respectivament) amb un únic gen C. Pel que fa a les cadenes λ , la unió, també a l'atzar, serà dels gens V-J (30-3 gens respectivament) amb 3 gens C.

Aquestes diverses combinacions encara no permetrien assolir el repertori de 10^9 anticossos diferents estimat com a necessaris a l'ésser humà. Aquest augment en el repertori s'aconsegueix, principalment, pel procés anomenat recombinació somàtica. Aquesta recombinació intervé en el canvi d'isotip i implica que el segment gènic V-D-J, ja reordenat, es combini amb un gen de la regió C. L'ADN que queda entre els segments seleccionats és eliminat. Per aconseguir encara una major diversitat d'anticossos es donarà la hipermutació somàtica, però aquesta ja serà posterior a la estimulació antigènica, i serà descrita al següent apartat 1.3.

1.3. Selecció del repertori madur de receptors antigènics (limfòcit B madur)

Una vegada el limfòcit B immadur expressa el seu BCR, essent encara exclusivament IgM, aquest podrà ésser seleccionat positivament i dirigir-se a estadis més madurs o, per contra, ésser seleccionat negativament i ser eliminat. La selecció positiva es donarà mitjançant el reconeixement dèbil d'alguns antígens propis, assegurant que tots els limfòcits que compleixin la maduració siguin portadors de receptors funcionals i siguin capaços de

respondre a antígens estranys dins els teixits limfàtics perifèrics. En canvi, la selecció negativa vindrà donada per la unió d'aquests limfòcits a autoantígens presents al moll de l'os, promovent una edició del receptor per intentar canviar la seva afinitat o directament induint l'eliminació del limfòcit. Així, només els limfòcits B inmadurs amb BCR funcional rebran senyals de supervivència per promoure la seva selecció i migració des del moll de l'os fins als òrgans limfoides secundaris (melsa, timus i ganglis limfàtics), on continuen la seva maduració. És en aquests òrgans on el limfòcit passa a fer-se petit, quiescent i madur. El limfòcit B madur passarà a expressar, no només la immunoglobulina IgM, sinó també la IgD.⁷

El limfòcit B madur surt del moll de l'os al torrent sanguini, recircula i es localitza als ganglis limfàtics, la melsa i els teixits limfoides associats a mucosa (MALT, de l'anglès *mucosa-associated lymphoid tissue*) formant fol·licles.⁸ És allí, i amb la col·laboració dels limfòcits T CD4+, quan aquests limfòcits B madurs entren en contacte amb l'antigen. L'estimulació antigènica d'aquests limfòcits B originarà una expansió clonal implicant la formació dels centres germinals (CG). Aquests limfòcits B activats i localitzats al CG són, novament, cèl·lules grans amb elevada capacitat proliferativa (centroblast), i comencen el procés d'hipermutació somàtica a les regions variables dels gens de les immunoglobulines per tal de millorar l'especificitat antigènica.⁹ Aquest procés implica canvis a l'ADN genòmic del limfòcit per aconseguir canvis en l'afinitat i l'especificitat de l'anticòs per l'antigen. Serà també en aquesta etapa quan es doni un canvi de classe de les immunoglobulines i les cèl·lules passin a ser més petites i sense capacitat de proliferar (centròcits). L'activació produïda per l'antigen fa que aquests limfòcits puguin canviar la cadena pesada de les

immunoglobulines passant a expressar no només IgM i IgD sinó també IgG, IgA i IgE. Aquests limfòcits B, amb una afinitat d'unió per l'antigen millorada, es diferencien de nou cap a una cèl·lula B memòria circulant, romanent en la fase G₀ del cicle cel·lular, o bé passen a ser cèl·lules plasmàtiques amb capacitat secretora d'immunoglobulines.¹⁰ Ambdues vies de diferenciació permeten obtenir una resposta més ràpida i eficient en cas de nou contacte amb l'antigen.

2. LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA

2.1. Generalitats

La leucèmia limfàtica crònica (LLC) és una malaltia clínicament heterogènia caracteritzada per l'acumulació progressiva de limfòcits B monoclonals, madurs, petits i immunològicament incompetents, a la sang, moll de l'os, ganglis limfàtics i melsa.¹¹ El limfòcits de la LLC tenen expressió a la superfície dels marcadors CD19, CD5, i CD23 i nivells reduïts de IgM, IgD, CD20, CD22 i CD79b.¹² La producció deficient d'anticossos, característica dels pacients amb LLC, afavoreix l'aparició de processos infecciosos, essent aquestes infeccions un dels motius principals de mortalitat.¹³ La LLC és la leucèmia més comú en adults del món occidental, amb una incidència anual de 3-5 casos per cada 100.000 individus, representant aproximadament el 16-30% de totes les leucèmies.¹⁴ L'edat mitjana al diagnòstic és d'uns 70 anys i la freqüència és de dos homes per cada dona afectada essent lleugerament més freqüent en la raça blanca.^{14,15}

Les cèl·lules de LLC poden arribar a representar el 99% del total de cèl·lules mononucleades a la sang perifèrica i la majoria es troben aturades a

la fase G₀ del cicle cel·lular.¹⁶ La quiescència observada en la majoria de cèl·lules de LLC va portar a hipotetitzar que l'acumulació de limfòcits malignes era deguda a la existència de defectes en l'apoptosi i no a la proliferació activa d'aquests. No obstant, publicacions recents indiquen que un nombre relativament elevat d'aquestes cèl·lules es troben en proliferació activa.¹⁷ Gràcies al marcatge *in vivo*, ha estat possible quantificar la proliferació de les cèl·lules de LLC, i s'ha pogut documentar que una petita fracció del clon leucèmic (aproximadament 0.1-1.78%) es divideix activament, el que produiria entre 1×10^9 i 1×10^{12} noves cèl·lules cada dia.

2.2. Origen cel·lular

L'expressió de CD5, inicialment descrit com a marcador de cèl·lules *naïve*,^{18,19} va donar suport a la idea que la LLC tenia l'origen en aquestes cèl·lules.^{20,21} Per aquest motiu la LLC ha estat considerada una malaltia derivada de limfòcits B que no han passat pel centre germinal, també anomenats limfòcits B pre-germinals. No obstant, aquesta hipòtesi va ésser qüestionada en el moment en què van aparèixer publicacions que demostraven que el 50% dels malalts amb LLC presentaven hipermutacions somàtiques,^{22,23} la qual cosa implicava que aquestes cèl·lules de LLC provenien de cèl·lules B memòria amb experiència antigènica.^{24,25} Com s'explicarà en detall a l'apartat 2.3.2.2., el fet de no presentar aquestes hipermutacions somàtiques a IGHV està relacionat amb una major probabilitat de presentar un estat avançat de la malaltia, d'exhibir característiques citogenètiques desfavorables, de necessitar un tractament abans i de tenir una supervivència menor.²⁴ Aquesta diferència en les mutacions i en el pronòstic

de la malaltia va suggerir que la LLC podia tractar-se de dues entitats diferents: aquella provinent de cèl·lules B *naïve* no mutades (pre-centre germinal) i aquella provinent de cèl·lules B memòria amb hipermutació somàtica (post-centre germinal). Posteriorment, van aparèixer nous estudis d'expressió gènica comparant les dues entitats, i van demostrar que les diferències entre els dos grups eren menors, descartant així la teoria que es tractaven de dues malalties diferents.²⁶ Per altra banda, la comparació dels perfils d'expressió gènica de les cèl·lules B de la LLC amb les diferents subpoblacions de limfòcits B normals va revelar que el perfil de les cèl·lules de LLC, independentment del nivell de mutacions del gen IGHV, estava molt relacionat amb els limfòcits B memòria, i per tant, amb les cèl·lules amb experiència antigènica.²⁶⁻²⁸ Igualment, van aparèixer evidències que les cèl·lules B podien adquirir mutacions sense necessitat de passar pel CG, romanent per tant a la zona marginal.²⁹ Les característiques compartides entre aquesta població limfocitària i les cèl·lules de LLC van suggerir un possible origen de la malaltia en els limfòcits B de la zona marginal ja que, de la mateixa manera que passa a les cèl·lules de LLC, aquests limfòcits normals poden presentar els gens de les immunoglobulines tant en estat mutat com no mutat. La majoria d'aquestes cèl·lules expressen el marcador de limfòcit B memòria CD27 i no han fet canvi de classe de cadena pesada.^{30,31} Aquesta teoria va perdre força en el moment que va sorgir un nou estudi d'expressió gènica³² que comparava la LLC amb les diferents poblacions de limfòcits B normals, definint les poblacions normals de manera més acurada que a l'estudi previ del 2001.²⁶ Així, es va comparar la LLC amb els limfòcits B normals *naïve*, amb els limfòcits de la zona marginal, es va diferenciar entre els limfòcits B memòria amb canvi de classe, dels limfòcits B CD27+IgM+IgD+ o

CD27+IgM+(IgD baix) i per últim es va definir millor la població CD5+ madura. Aquest estudi, alhora, va poder definir una nova varietat de limfòcit B normal CD5+CD27+ post-germinal, i per tant amb mutacions a les immunoglobulines. Els resultats d'aquest estudi van permetre identificar, de nou, poblacions B normals amb elevada semblança als dos subgrups de LLC. Pel que fa a la LLC amb IGHV no mutada, aquesta seria una població de limfòcits B CD5+CD27- que no ha passat pel CG, mentre que la LLC amb IGHV mutada s'originaria en els limfòcits B normals CD5+CD27+ post-CG.

Recentment, un nou treball ha estudiat el paper de diferents subpoblacions de limfòcits B en la patogènesi de la LLC mitjançant xenotransplantament.³³ En aquest treball es van seleccionar limfòcits B CD19+ (clonals), limfòcits pro-B i cèl·lules mare hematopoètiques CD34+CD38- de pacients amb LLC per a la posterior inoculació en ratolins immunosuprimits. Es va observar que només les cèl·lules mare hematopoètiques (CLL-HSC, de l'anglès *CLL-hematopoietic stem cell*) implantaven en aquests ratolins. Aquests animals, inicialment, presentaven un desenvolupament hematopoètic normal amb un petit increment de limfòcits pro-B policlonals. Aquests limfòcits acabaven donant lloc a una expansió oligoclonal equivalent a la limfocitosi B monoclonal (MBL, de l'anglès *monoclonal B lymphocytosis*). La MBL és una entitat que es defineix per la presència de $< 5 \times 10^9$ limfòcits B clonals/L circulants en individus sans (3-5% de la població general).^{12,34} Aquests limfòcits són, en la majoria dels casos, fenotípicament similars a les cèl·lules tumorals de la LLC. La MBL es troba present en un 13-18% dels familiars de primer grau dels pacients amb LLC.^{35,36} Es coneix que la gran majoria de casos de LLC estan precedits per una MBL, mentre que la ratio de

transformació de MBL a LLC és d'un 1% a l'any,³⁷ tot i que es desconeixen els factors i mecanismes implicats en la progressió/transformació maligna de la MBL a LLC (**Figura 3**).³³ Aquest estudi indica que les CLL-HSC ja presentarien algun tipus d'alteració, encara per determinar, que predisposaria al desenvolupament de la LLC, sense afectar en el desenvolupament hematopoètic de la resta de línies.

Malgrat les nombroses publicacions dirigides a conèixer l'origen exacte de la LLC, aquest, roman desconegut.

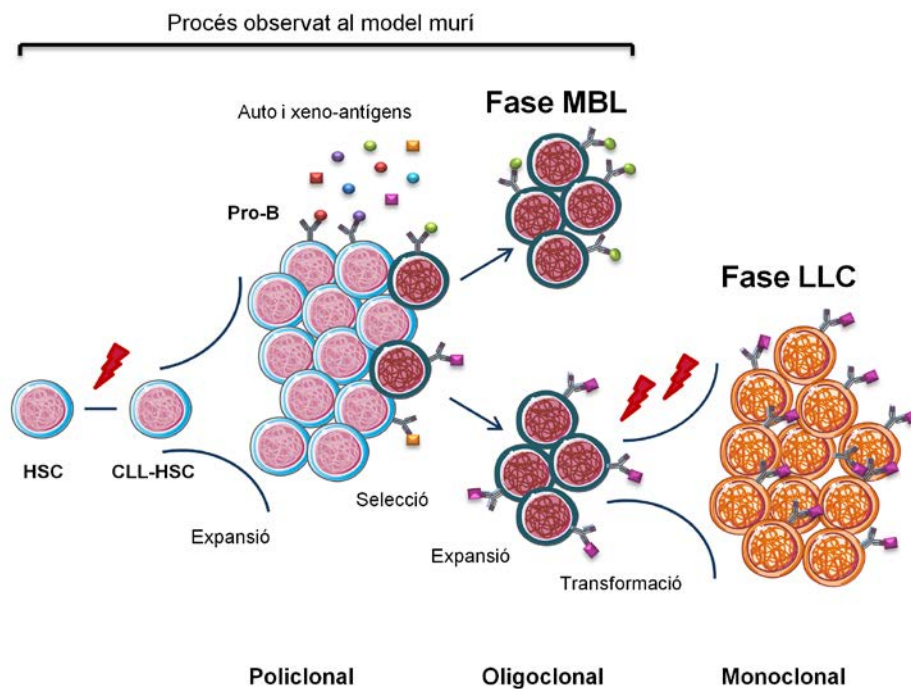


Figura 3. Representació esquemàtica del desenvolupament de la LLC basat en un model de xenotransplantament. CLL-HSC: de l'anglès *CLL-hematopoietic stem cell*. MBL: de l'anglès *monoclonal B lymphocytosis*. Adaptació de Kikushige, Y. *Cancer Cell* 2011.³³

2.3. Pronòstic

El curs clínic de la LLC és extremadament heterogeni. Així, la meitat dels pacients mai presentaran progressió de la malaltia, amb una expectativa de vida similar a la de la població normal, mentre que l'altra meitat requerirà tractament i la seva expectativa de vida es veurà disminuïda com a conseqüència de la LLC.³⁸ Factors pronòstic eficients en la predicció del curs clínic de la LLC, en les fases inicials del diagnòstic, són necessaris per poder conèixer amb antel.lació el curs clínic més probable en cadascun d'aquests pacients. El pronòstic de la LLC és, actualment, depenent de dos tipus de factors, els clínics i els biològics (Taula 2).³⁹

FACTORS PRONÒSTIC		RISC BAIX	RISC ALT
CLÍNICS	Sistema Rai	0	II-IV
	Sistema Binet	A	C
	Temps de duplicació limfocitària	> 12 mesos	< 12 mesos
	Infiltració del moll de l'os	No difusa	Difusa
BIOLÒGICS	Marcadors sèrics	Normals	Alts
	Estat mutacional de IGHV	Mutat	No mutat
	Anomalies cromosòmiques	del13q, normal, trisomia 12	del11q, del17p
	CD38	<30%	>30%
	ZAP-70	<20%	>20%

Taula 2. Factors pronòstic clínics i biològics de la LLC. Adaptació de Ghia P. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2007.³⁹

2.3.1. Factors pronòstic clínics

Són tres els factors clínics usats per determinar l'evolució de la LLC:

- L'estadiatge basat en el sistema Rai i el sistema Binet (Taula 3).^{40,41}

Aquests dos sistemes de classificació són simples, barats i aplicables a tot el món. Es basen en exploracions físiques i anàlisis estàndards de laboratori i no requereixen d'avançat equipament mèdic. Un estadi Rai de 0 (baix risc) i un estadi Binet A estan relacionats amb una evolució favorable.⁴² Els dos mètodes poden, d'altra banda, ésser utilitzats per estimar el moment d'inici del tractament de la malaltia. Inicialment, el nombre de grups pronòstics a la classificació Rai era de 5, però més endavant aquests van passar a ésser 3.⁴³ Actualment, tots dos mètodes de classificació descriuen 3 grans subgrups amb pronòstics clínicament diferents.

SISTEMA	CARACTERÍSTIQUES CLÍNIQUES	MEDIANA DE SUPERVIVÈNCIA, ANYS
RAI		
0	Limfocitosi a sang i moll de l'os	>10
I i II	Limfadenopaties, esplenomegàlies +/- hepatomegàlies	7
III i IV	Anèmia, trombocitopènia	0.75-4
BINET		
A	Menys de tres àrees de limfadenopaties; sense anèmia ni trombocitopènia	12
B	Més de dos àrees nodals; sense anèmia ni trombocitopènia	7
C	Hemoglobina <100 g/L, plaquetes <100 x10 ⁹ g/L	2-4

Taula 3. Estratificació Rai i Binet de la LLC. Adaptació de Gribben, JG. Blood 2010.⁴⁴

- Temps de duplicació limfocitària. Aquells pacients que presenten una duplicació del nombre absolut de limfòcits inferior a 12 mesos, tenen, en general, un pitjor curs clínic.⁴⁵ Aquesta acumulació vindrà donada per un balanç entre la mort i la divisió cel·lular. El temps de duplicació limfocitària actualment es considera més un criteri per iniciar el tractament que com a factor pronòstic.

- Infiltració del moll de l'os. La infiltració del moll de l'os és una característica comú dels pacients amb LLC. Es considera que hi ha infiltració si el total de cèl·lules leucèmiques al moll de l'os supera el 30% del total de cèl·lules obtingudes a l'aspirat.⁴⁶ Aquestes cèl·lules leucèmiques tenen la mateixa morfologia que les cèl·lules localitzades a la sang perifèrica. És important destacar que, tot i que l'aspirat o la biòpsia del moll de l'os no resulten imprescindibles per al diagnòstic de la LLC, el patró histològic de la biòpsia del moll de l'os té valor pronòstic.⁴⁷ Els patrons histològics d'infiltració medul·lar, s'engloben en tres categories molt àmplies que, molt sovint, queden solapades: nodular, intersticial i difús. En general, la presència d'una infiltració difusa, on l'arquitectura del moll de l'os queda completament destruïda, implica un pitjor pronòstic de la malaltia.^{48,49} Actualment, només s'estudia la infiltració del moll de l'os en assajos clínics i en casos amb diagnòstic dubtós.

Aquestes característiques clíniques permeten determinar l'evolució de la malaltia però tenen unes limitacions, ja que no són capaces de predir l'evolució de la LLC en el diagnòstic a les fases inicials. És precisament per aquest motiu que es va treballar en la recerca de factors pronòstic biològics

amb l'objectiu d'afegir poder pronòstic als estadis clínics. Alguns d'aquests factors pronòstic biològics es descriuen a continuació.

2.3.2. Factors pronòstic biològics

Diversos factors pronòstic biològics, en associació amb paràmetres clínics, han estat identificats com a paràmetres amb capacitat predictiva de l'evolució de la LLC. A continuació, es descriuen alguns dels més importants.

2.3.2.1. Marcadors sèrics

Els marcadors sèrics més importants en pacients amb LLC són la β 2-microglobulina (β 2-MG), la timidina-quinasa (TK), i el CD23 soluble. La β 2-MG és una proteïna extracel·lular expressada en cèl·lules nucleades, i unida no covalentment al complex major d'histocompatibilitat de classe I. En la LLC, nivells elevats d'aquesta proteïna correlacionen amb estadis avançats de la malaltia i amb temps curts fins a la progressió (PFS, de l'anglès *progression-free survival*).⁵⁰⁻⁵² La TK intervé en la síntesi d'ADN i la trobem en cèl·lules en divisió.⁵³ Nivells elevats d'aquest enzim en sèrum de pacients amb LLC s'associen a una progressió de la malaltia i a estadis avançats d'aquesta.^{54,55} CD23 és un receptor de membrana implicat en resposta immunològica dependent d'IgE, i és expressat en cèl·lules B memòria, en cèl·lules presentadores d'antigen i en plaquetes. CD23 pot fragmentar-se en porcions solubles amb activitats biològiques pleiotròpiques. Nivells sèrics elevats de CD23 soluble correlacionen inversament amb la supervivència i la progressió de la malaltia en pacients a l'estadi Binet A.^{56,57} Contràriament a altres neoplàsies limfoides, els nivells de lactat deshidrogenasa (LDH) com a factor

pronòstic han perdut força en pacients amb LLC,^{58,59} no obstant encara hi ha estudis que demostren que nivells elevats d'aquest enzim al sèrum estan associats a un menor temps de supervivència en aquest malalt.^{60,61}

2.3.2.2. Estat mutacional de les IGHV

L'absència de mutacions a la regió variable de les cadenes pesades de les immunoglobulines (IGHV) s'associa amb una malaltia més agressiva, amb una supervivència menor (9 anys per pacients amb IGHV no mutat en front a 24 anys per als pacients amb IGHV mutat)^{24,25} i amb un temps fins a la progressió i la necessitat de tractament més curt (3.8 anys per pacients amb IGHV no mutat en front a 8.6 anys per als pacient amb IGHV mutat) (Figura 4).⁶²

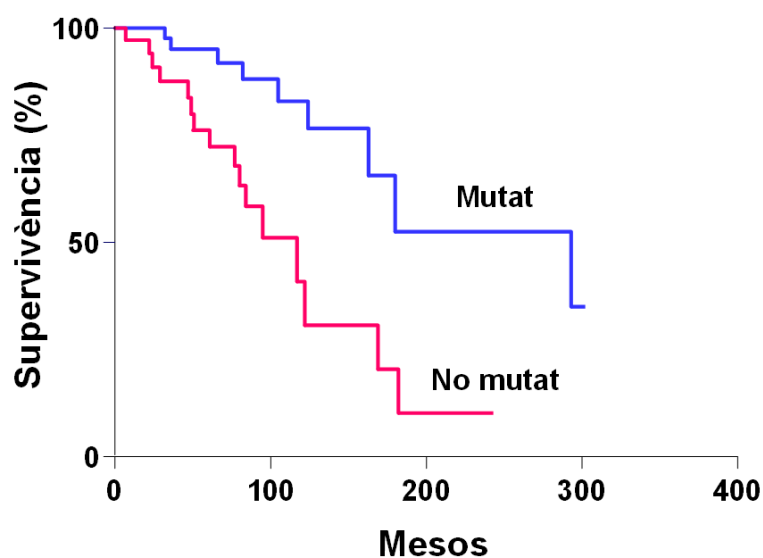


Figura 4. Corba de supervivència comparant els pacients de LLC amb IGHV mutat i no mutat. La mediana de supervivència dels casos no mutats és de 117 mesos. La mediana del casos mutats és de 293 mesos. La diferència és estadísticament significativa amb $P=0.001$. Gràfic de Hamblin, TJ. Blood 1999.²⁴

2.3.2.3. Anomalies cromosòmiques

Fins al moment actual no s'ha trobat una anomalia cromosòmica present en tots els casos de LLC. No obstant, més d'un 80% dels casos presenten anomalies cromosòmiques recurrents.⁶³

L'anomalia més comú és la deleció de la banda 13q14, situada al braç llarg del cromosoma 13, la qual es troba aproximadament en el 55% dels malalts i està relacionada amb un bon pronòstic de la malaltia.⁶³ En aquesta regió s'ha identificat el gen DLEU2 (de l'anglès *deleted in lymphocytic leukemia*) així com el cluster de microARNs (miR)-15a/16-1. Aproximadament un 27% dels ratolins amb deleció d'aquesta regió DLEU2/miR-15a/16-1 desenvolupen LLC.⁶⁴ La següent alteració més freqüent és la deleció de la banda 11q22, la qual afecta aproximadament a un 20% dels malalts. En aquesta regió cromosòmica es troba el gen ATM, relacionat amb processos de reparació de l'ADN.⁶⁵ És, probablement, per l'afectació directa de la funció d'aquesta proteïna que aquesta anomalia està relacionada amb una menor supervivència dels malalts. En aproximadament un 16% dels malalts es troba la trisomia del cromosoma 12.⁶³ La supervivència dels malalts amb aquesta anomalia és lleugerament inferior als casos sense cap tipus d'alteració citogenètica.⁶³ Per últim, en aproximadament un 7% dels malalts trobem la deleció 17p13, banda del cromosoma 17 en la qual es troba el gen supressor de tumors TP53. Al diagnòstic, la distribució de la mutació de TP53 i la del17p13 en pacients amb LLC es solapa només parcialment. Mentre que en el 80-90% dels pacients amb aquesta delecció tenen mutació del gen TP53, un 3.4% dels malalts de LLC presenten mutacions a TP53 amb absència de la del17p13.⁶⁶ Per tant, aquests pacients no seran detectats pel FISH convencional. Tant la

mutació de TP53 com la del17p13 estan relacionades amb estadis avançats de la malaltia, resistència a tractaments amb quimioterapies depenents de TP53, com és la fludarabina, i amb un pitjor pronòstic.^{63,66-68}

D'aquesta manera l'ordre de pitjor a millor pronòstic en pacients amb LLC seria: del17p13 > del11q22 > trisomia 12 > sense alteracions citogenètiques > del13q14. Gràficament podem veure la supervivència en funció de l'anomalia citogenètica en la següent figura (Figura 5).

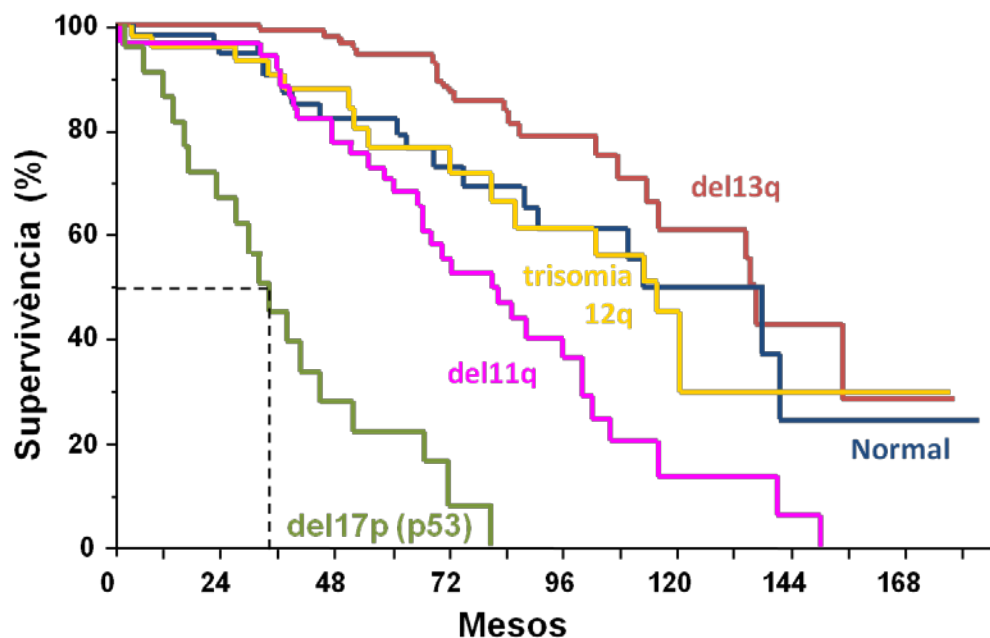


Figura 5. Supervivència global i anomalies genètiques en pacients amb LLC. Adaptació de Gràfic de Döhner, H. NEJM 2000.⁶³

2.3.2.4. Expressió del CD38

L'expressió de la molècula de superfície CD38 en limfòcits leucèmics va ser un dels primers marcadors proposats com a indicador de l'estat mutacional de les immunoglobulines.²⁵ El CD38 és una proteïna que es troba a la superfície dels limfòcits pro-B i en cèl·lules plasmàtiques.⁶⁹ Actualment se'l considera com un factor pronòstic independent. Així, els pacients amb limfòcits B amb elevada expressió de CD38 (>30%) tenen una supervivència global significativament menor que els pacients amb nivells baixos (<30%). Aquesta molècula està implicada en la regulació del creixement cel·lular i la diferenciació en diferents estadis del desenvolupament.⁷⁰ La seva expressió és bastant constant en la majoria de casos de LLC però han estat descrits casos de canvis d'expressió al llarg de l'evolució de la malaltia, especialment després de l'inici del tractament.^{71,72}

2.3.2.5. Expressió de la proteïna ZAP-70

La proteïna ZAP-70 és una proteïna tirosina quinasa important en la senyalització en limfòcits T i NK, absent en limfòcits B normals madurs, i expressada en cèl·lules de LLC. Diverses publicacions han descrit l'expressió elevada d'aquesta proteïna (>20%) com un factor de risc en l'evolució de la malaltia, traduïnt-se en una menor supervivència global, així com també en un menor temps lliure de tractament.^{73,74} Donat que la proteïna ZAP-70 és la base d'aquesta tesi, aquesta s'explica amb major detall a l'apartat 4.

2.4. Mutacions

No s'ha trobat cap lesió genètica comú en la LLC. No obstant, s'han identificat mutacions recurrents com per exemple la mutació a TP53, NOTCH1, SF3B1, MYD88, BIRC3 i POT1.

La mutació del gen supressor de tumors TP53, com ja s'ha comentat a l'apartat 2.3.2.3., es troba present en un 7% dels pacients amb LLC. La importància d'un p53 funcional recau en el fet que nombrosos agents quimioterapèutics, com és la fludarabina en la LLC, produeixen dany a l'ADN, induint l'apoptosi cel·lular de manera depenent de p53. Els pacients amb aquesta mutació no responen a tractaments depenents d'aquesta via de senyalització.

Els progressos tecnològics del últims cinc anys han permès la identificació de noves mutacions en la LLC. El desenvolupament de la seqüenciació de nova generació, coneguda també com seqüenciació massiva paral·lela, ha permès una seqüenciació ràpida del genoma de la LLC. D'aquesta manera, algunes de les mutacions noves més recurrentment descrites han estat les del gen NOTCH1 (12.2% dels pacients),^{75,76} SF3B1 (9.7-15% del pacients),^{77,78} MYD88 (2.9% dels pacients)⁷⁵, BIRC3 (4% dels pacients)⁷⁹ i POT1 (3.5% dels pacients).⁸⁰

NOTCH1 és un receptor de membrana amb una via de senyalització important per a la comunicació entre cèl·lules, que implica mecanismes de regulació de gens que controlen nombrosos processos de diferenciació cel·lular. La mutació del gen NOTCH1 genera un "codó stop" prematur implicant la síntesis de la proteïna NOTCH1 sense domini C-terminal. L'absència d'aquesta regió resulta en l'acumulació d'una isoforma activa de la proteïna.

Els pacients amb NOTCH1 mutat tenen uns estadis de la malaltia més avançats al diagnòstic, factors biològics adversos i supervivència global significativament més curta que els pacients sense aquesta mutació. Igualment, les mutacions de NOTCH1 han estat associades a IGHV no mutat, a la trisomia 12 i a una major probabilitat de transformació de la LLC a Síndrome de Richter.⁷⁵

Les mutacions del gen SF3B1, més comuns en pacients amb IGHV no mutat, s'han pogut relacionar amb factors pronòstic desfavorables, amb una progressió més ràpida de la malaltia, i amb una pitjor supervivència global. Tenint en compte que SF3B1 codifica per una proteïna que participa al spliceosoma, les mutacions d'aquest també s'han vist relacionades amb alteracions en la funció d'splicing de les cèl·lules de LLC.^{77,78}

Una altra mutació recurrent és la del gen MYD88. Aquesta ha estat identificada també en altres limfomes, destacant així el seu paper en la patogènesi de les neoplàsies limfoides.⁸¹ Aquesta proteïna participa en la senyalització de la IL-1 i dels *Toll-like receptors* o TLR durant la resposta immune.⁸² Els pacients amb aquesta mutació, més recurrent en pacients amb IGHV mutat, tenen una secreció més elevada de citokines que afavoreixen el reclutament de macròfags i limfòcits T. Aquestes cèl·lules reclutades proporcionen a les cèl·lules de LLC un ambient favorable per a la seva supervivència.

El gen BIRC3 codifica per una proteïna reguladora negativa de la senyalització de la via NF-κB. La mutació de BIRC3 implica, en conseqüència, una activació constitutiva de la via NF-κB, important en la generació de senyals de supervivència. Tot i que les mutacions de BIRC3 no són molt comuns en la

LLC en el moment del diagnòstic (4%), s'ha observat que sí es presenta en un elevat percentatge (24%) en pacients de LLC refractaris al tractament amb fludarabina.⁷⁹

POT1 és una altra proteïna que s'ha observat mutada en pacients amb LLC. Aquesta proteïna actua protegint els telòmers dels cromosomes, proporcionant estabilitat genòmica. La mutació d'aquesta proteïna impossibilita aquesta protecció i fa que el genoma d'aquestes cèl·lules sigui més susceptible de noves mutacions. Aquesta mutació s'ha relacionat amb pacients amb IGHV no mutat i amb elevada expressió de ZAP-70.⁸⁰

3. LLC I MICROAMBIENT

3.1. Compartiments i cèl·lules del microambient

La LLC, com ja s'ha comentat, es caracteritza per una acumulació progressiva de limfòcits B monoclonals, sobretot, a la sang, al moll de l'os i als ganglis limfàtics.¹¹ El microambient que la cèl·lula de LLC troba en cada un d'aquests compartiments afecta de manera directa en la seva biologia. Així, Herishanu i col·laboradors,⁸³ han demostrat recentment, mitjançant estudis d'expressió gènica, que les cèl·lules de LLC d'un mateix pacient expressen gens diferencials depenent del compartiment en el que es trobin.

En cadascun d'aquests compartiments, les cèl·lules de LLC interactuen amb diferents cèl·lules accessòries, com són els limfòcits T, les cèl·lules estromals o les NLC (de l'anglès *nurse-like cells*).⁸⁴ Aquestes interaccions afavoriran la supervivència i proliferació d'aquestes cèl·lules i conferiran resistència als tractaments quimioteràpics.⁸⁵ A continuació, es representen els

tres compartiments on es poden trobar les cèl·lules de LLC, amb les cèl·lules accessòries de cada un d'ells, i posteriorment la descripció d'aquests (Figura 6).

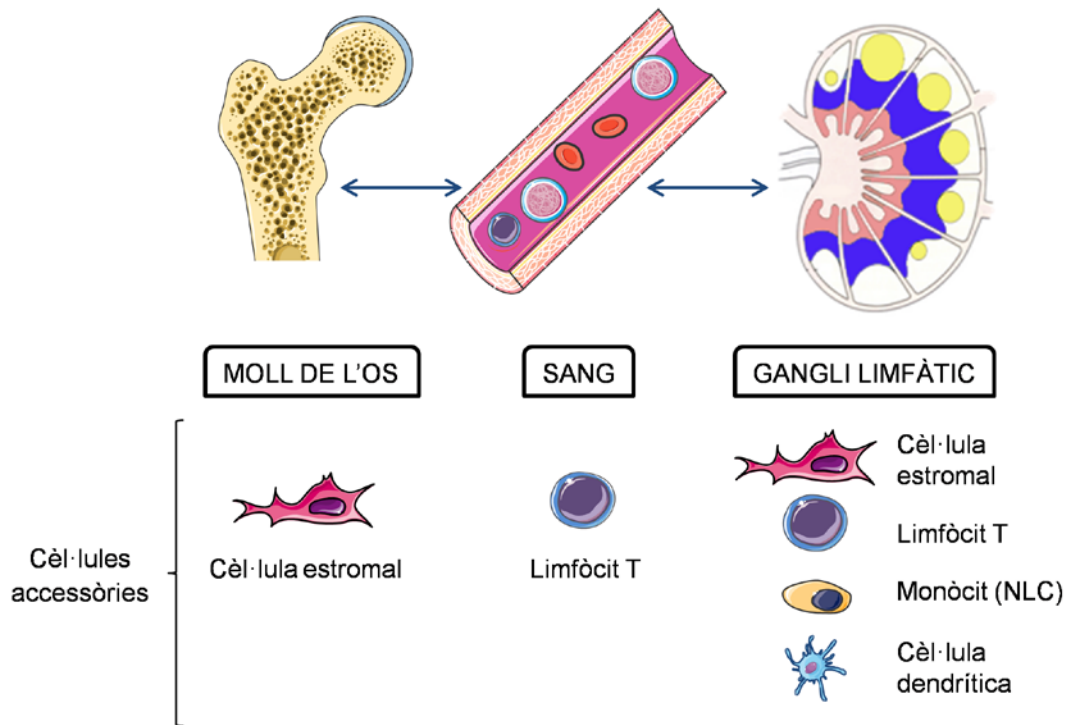


Figura 6. Compartiments de les cèl·lules de LLC. Les cèl·lules de LLC circulen entre el moll de l'os, la sang i els ganglis limfàtics. Adaptació de Friedberg, JW. Blood 2011.⁸⁶

3.1.1. Sang perifèrica

Quan les cèl·lules de LLC estan a la sang, aquestes es troben majoritàriament quiescents, en fase G_0 del cicle cel·lular. En aquest microambient, les cèl·lules leucèmiques estan en contacte, bàsicament, amb limfòcits T.

La importància de les cèl·lules T en la LLC continua essent un dels conceptes amb major controvèrsia en la investigació de la LLC. Els pacients

amb LLC no tractats presenten major nombre de cèl·lules T circulants que un individu sa.⁸⁷ No es té coneixement si aquesta expansió es dona per la interacció amb el clon de la LLC, amb antígens microbians més prevalents en la LLC, o per altres motius.

L'elevada expressió de cèl·lules T en pacients amb LLC és, de fet, d'un petit subgrup de cèl·lules T, les Treg (de l'anglès *Regulatory T cell*). Aquestes es defineixen com les cèl·lules T CD4+ amb expressió d'elevats nivells de CD25, expressió de FoxP3 citoplasmàtic i baixos nivells a membrana de CD127. Aquests elevats nivells en sang correlacionen amb factors clínico-biològics agressius de la malaltia. Els resultats *in vitro* indiquen que els limfòcits T estarien jugant un paper en la inhibició de l'apoptosi de la cèl·lula B maligna, així com en la progressió de la malaltia.⁸⁸ Tot i aquests coneixements, el paper de les Treg en la patogènesi de la malaltia continua estant per definir.⁸⁹

3.1.2. Moll de l'os

És en el moll de l'os i en els ganglis limfàtics, on les cèl·lules de LLC troben les cèl·lules accessòries capaces d'induir la seva activació i proliferació.⁸⁴ L'estudi d'expressió gènica de les cèl·lules de LLC en els diferents compartiments⁸³ va permetre determinar que tot i ser dos ambients favorables per les cèl·lules leucèmiques aquests tenen estímuls i efectes diferents sobre el clon maligne.

En el moll de l'os, les cèl·lules accessòries que trobem són les anomenades cèl·lules estromals del moll de l'os (BMSC, de l'anglès *bone marrow stromal cell*). Aquestes, van ésser les primeres cèl·lules estromals

caracteritzades en donar suport a les cèl·lules de LLC.⁹⁰⁻⁹² Les BMSCs, a l'hematopoesi normal, proporcionen llocs d'unió i factors de creixement als precursors hematopoiètics. A la LLC, la funció de les BMSCs sembla que seria la mateixa, creant zones al moll de l'os on les cèl·lules de LLC es mantindrien protegides d'agents citotòxics i on disposarien dels nutrients necessaris per a sobreviure. Co-cultius de LLC amb BMSCs, secretores de la quimioquina CXCL12, indueixen l'adhesió i una ràpida i espontània migració de les cèl·lules de LLC sota les BMSCs. Aquest efecte depèn de l'expressió de CXCR4 (receptor de la quimioquina CXCL12) i de la integrina VLA-4 per part de les cèl·lules leucèmiques.⁹² Aquesta observació dóna suport al model que proposa que l'expressió de CXCR4 de les cèl·lules de LLC és el que permet la recircularització entre la sang i el moll, suggerint aquest mecanisme com el responsable de la infiltració del moll de l'os per les cèl·lules de LLC.⁹²

3.1.3. Ganglis limfàtics

El clon leucèmic de la LLC prolifera principalment en els ganglis limfàtics, i ho fa dins unes estructures histològiques anomenades centres de proliferació o pseudofol·licles.⁹³ Aquestes zones de proliferació són acumulacions de cèl·lules leucèmiques proliferants en contacte directe amb limfòcits T CD4+ activats (CD4OL+), amb cèl·lules estromals, amb cèl·lules dendrítiques i amb les NLC (**Figura 7**).

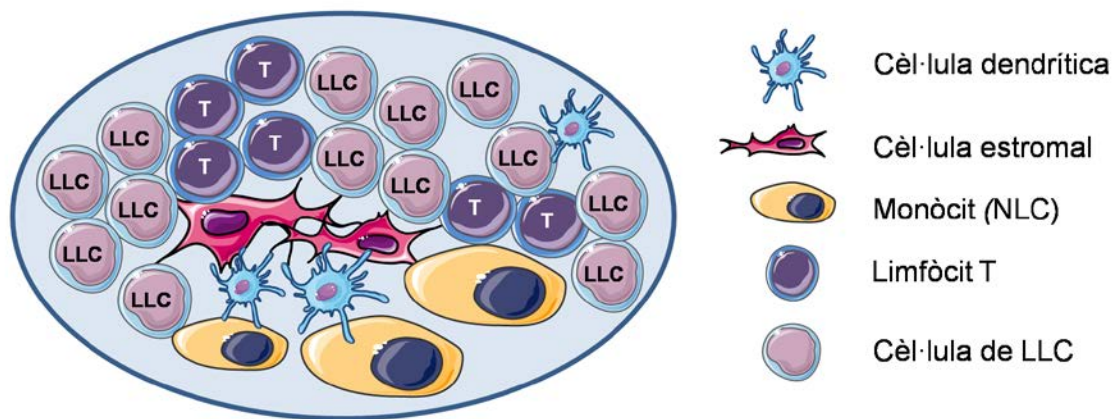


Figura 7. Centre de proliferació als ganglis limfàtics dels pacients amb LLC.

Elaboració pròpia.

Pel que fa a les cèl·lules T en aquest microambient, és conegut que aquestes colocalitzen amb les cèl·lules de LLC proliferants, suggerint un paper dels limfòcits T en l'estimulació de l'expansió clonal.⁹⁴ Aquesta interacció provoca que les mateixes cèl·lules de LLC modifiquin les característiques funcionals dels limfòcits T. Per exemple, s'ha descrit que els limfòcits T de pacients amb LLC tendeixen a produir un perfil de citocines TH2, entre elles la IL-4,⁹⁵ que intervenen en la estimulació humoral, encarregada de promoure la proliferació i el canvi de classe de les immunoglobulines del limfòcit B. En aquesta direcció, s'ha estudiat *in vivo*, mitjançant la transferència de cèl·lules de LLC en ratolins immunosuprimits, que la proliferació del clon leucèmic es dona només si els limfòcits T CD4+ del mateix pacient hi són presents, ressaltant de nou el paper destacable que juguen els limfòcits T en la patogènesi i progressió de la malaltia.⁹⁶

Les altres cèl·lules accessòries al gangli limfàtic són les cèl·lules dendrítiques. La seva funció principal és la de presentar l'antigen als limfòcits B, però s'ha observat *in vitro*, que aquestes cèl·lules també tenen la capacitat de promoure la supervivència de les cèl·lules de LLC, i ho fan, a través de la inducció d'un augment de la proteïna anti-apoptòtica Mcl-1.⁹⁷

Les NLC van ésser identificades mitjançant el cultiu *in vitro* de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC, de l'anglès *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) de pacients amb LLC. Posades en cultiu, les PBMC de pacients amb LLC desenvolupen nombroses NLC, essent cèl·lules grans, rodones i adherents amb capacitat d'atraure les cèl·lules de LLC, protegint-les d'apoptosi espontània o induïda per algun tipus de droga.^{98,99} Les NLC secreten les quimioquines CXCL12 i CXCL13, així com les molècules antiapoptòtiques BAFF i APRIL les quals estimulen la supervivència de les cèl·lules de LLC.^{100,101} *In vivo*, les NLC s'han trobat a la melsa i als ganglis limfàtics dels pacients amb LLC, suggerint que seria en aquests òrgans on promourien la supervivència de les cèl·lules de LLC.^{100,102} L'origen de les NLC continua essent estudiat però, tot i que inicialment es creia que les NLC provenien de les cèl·lules estromals,⁹⁸ les noves investigacions consideren que les NLC serien un nou tipus cel·lular que existeix *in vivo* diferenciat a partir de les cèl·lules mononucleades CD14+ amb les que comparteix nombroses característiques, com l'elevada expressió de CD68.^{100,103}

3.2. Senyals del microambient

Els diferents senyals provinents del microambient poden interferir en la proliferació i supervivència de la cèl·lula, així com poden mediar en la migració d'aquestes cèl·lules a entorns més favorables. Algunes d'aquestes senyals es representen a la **Figura 8** i es descriuen a continuació.

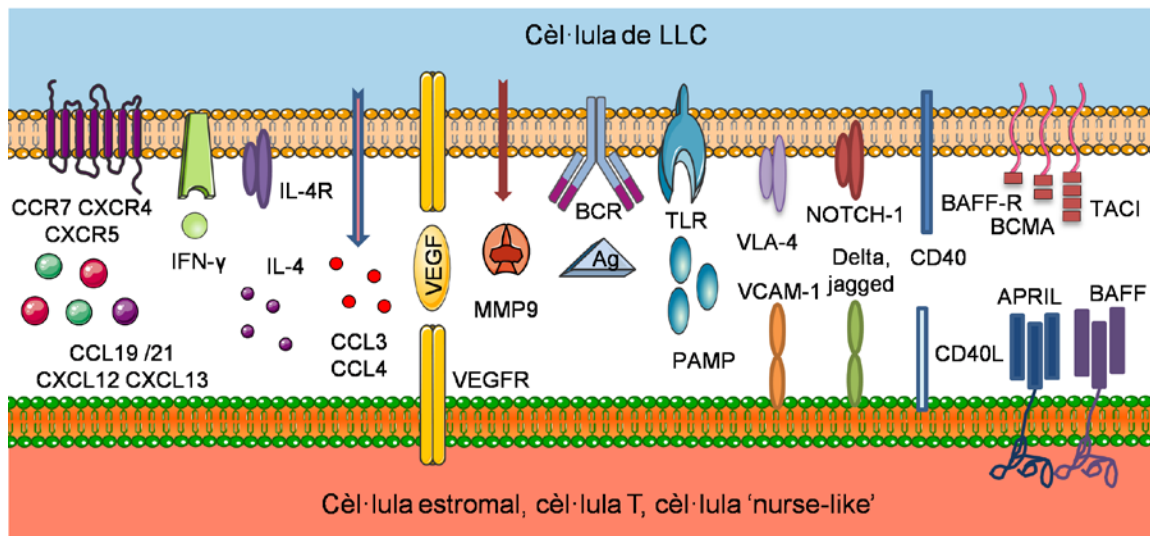


Figura 8. Algunes de les senyals que regulen les interaccions de les cèl·lules de LLC amb el microambient. Elaboració pròpia.

3.2.1. Factors solubles

3.2.1.1. Citoquines

Les citoquines són un grup de proteïnes secretades de baix pes molecular (8-15 kDa) que s'uneixen a receptors específics de la membrana de les cèl·lules on exerceixen la seva funció, iniciant la corresponent cascada de transducció de senyal. Les citoquines poden dividir-se en cinc tipus depenent del seu origen, estímul i efecte biològic: interleuquines (IL), factors de necrosi

tumoral (TNF), factors estimuladors de colònies, interferons (IFN) i quimioquines.

En la LLC diverses citoquines participen en afavorir la supervivència de les cèl·lules leucèmiques. En aquest sentit, s'ha demostrat, que la IL-4 segregada pels limfòcits T, té la capacitat d'inhibir l'apoptosi de les cèl·lules leucèmiques, tant l'espontània com la induïda per agents tòxics.^{104,105} Algunes publicacions postulen que aquest efecte es donaria per un increment dels nivells de BCL-2.¹⁰⁶ Investigacions més recents han observat que la cèl·lula de LLC és capaç de segregar nous factor solubles per ella mateixa, tenint d'aquesta manera un paper actiu en la generació d'un ambient favorable per a la seva supervivència. Un d'aquests factors és la citoquina IFN- γ , amb efecte anti-apoptòtic sobre les cèl·lules de LLC. Aquesta citoquina, segregada per la mateixa cèl·lula leucèmica, sembla que podria tenir gran rellevància *in vivo*, donat que s'han pogut detectar nivells elevats d'aquesta en plasma de pacients amb LLC en comparació amb persones sanes.^{104,107}

3.2.1.2. Quimioquines

Les quimioquines són un tipus de citoquines que reben aquest nom per ser citoquines quimiotàctiques, amb propietats quimioattractives. Aquestes proteïnes indueixen la migració limfocitària als diferents òrgans i teixits.

Les quimioquines es classifiquen en 4 famílies en funció de la posició dels dos residus de Cys N-terminals a la proteïna madura: **CC**, **CXC**, **C** i **CX3C** (**Taula 4**). Actualment es coneixen més de 50 quimioquines, que s'uneixen almenys a 20 receptors,¹⁰⁸ la majoria dels quals interaccionen amb 2 o més

quimioquines. Els receptors de quimioquines s'agrupen en funció el tipus de quimioquina que s'uneix, seguit d'una 'R' i un número, indicant l'ordre del seu descobriment.

La majoria de les quimioquines conegudes en humans pertanyen als grups CXC i CC, i exceptuant dues d'elles (CXCL16 i CX3CL1), la resta són proteïnes secretades.¹⁰⁹

RECEPTORS CXC		RECEPTORS CC	
RECEPTOR	LLIGAND	RECEPTOR	LLIGAND
CXCR1	CXCL1, CXCL6, CXCL8	CCR1	CCL3, CCL5, CCL7, CCL14-16, CCL23
CXCR2	CXCL1-3, CXCL5-8	CCR2	CCL2, CCL7, CCL12-13, CCL16
CXCR3	CXCL9-11	CCR3	CCL5, CCL7-8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL24, CCL26, CCL28
CXCR4	CXCL12	CCR4	CCL17, CCL22
CXCR5	CXCL13	CCR5	CCL3-5, CCL8, CCL14
CXCR6	CXCL16	CCR6	CCL20
CXCR7	CXCL11-12	CCR7	CCL19, CCL21
RECEPTORS CX3C		CCR8	CCL1, CCL4, CCL17
CX3R1	CX3CL1	CCR9	CCL25
RECEPTORS C		CCR10	CCL27-28
XCR1	XCL1-2		

Taula 4. Classificació dels receptors de quimioquines en subfamílies.

Tant els limfòcits T com B expressen receptors per diverses quimioquines, i la seva expressió i funció es modula durant la diferenciació i activació limfocitària.¹¹⁰

Estudis de perfil d'expressió gènica, comparant cèl·lules de pacients amb LLC estable o agressiva, han permès identificar diferències en gens que codifiquen per proteïnes implicades en la migració cel·lular.^{111,112} De la mateixa manera, les cèl·lules de LLC amb major sensibilitat a les quimioquines han estat associades a un pitjor pronòstic.¹¹³ Tota aquesta informació ha contribuït a la visió que actualment es té de la LLC com una malaltia caracteritzada per un balanç dinàmic entre les cèl·lules circulants a la sang perifèrica i les cèl·lules localitzades en ambients favorables com els òrgans limfoides.¹¹⁴ Concretament, s'ha descrit, que el receptor de quimioquines CXCR4 s'expressa amb elevats nivells a la superfície de les cèl·lules de LLC,^{92,115-117} mitjançant la migració d'aquestes cèl·lules a través de l'endoteli vascular i sota les BMSC, secretores de CXCL12.^{92,118} D'altra banda també s'ha descrit que el CXCL12, lligand de CXCR4, afavoreix la supervivència de les cèl·lules de LLC.^{98,113} L'expressió de CXCR4 a la superfície cel·lular es troba regulada pel seu lligand CXCL12 mitjançant l'endocitosi del receptor.⁹² Així, els teixits on trobem cèl·lules de LLC presenten nivells baixos de CXCR4 superficial, com a conseqüència dels elevats nivells de CXCL12. Aquesta característica permet distingir les cèl·lules de LLC dels ganglis limfàtics i del moll de l'os, de les cèl·lules de LLC de la sang, les quals expressen nivells baixos i alts de CXCR4, respectivament.^{92,119}

Un altre receptor de quimioquines sobreexpressat en les cèl·lules de la LLC és el CXCR5. Aquest receptor és expressat en limfòcits B madurs, en limfòcits T i en alguns tipus de cèl·lules dendrítiques. El lligand de CXCR5 és la quimioquina CXCL13, secretada constitutivament per les cèl·lules estromals al límit fol·licular. Indueix el reclutament de limfòcits B *naïve* als fol·licles¹²⁰ i és

la responsable del posicionament dins el centre germinal.¹²¹ L'estimulació de les cèl·lules de LLC amb CXCL13 indueix internalització de CXCR5, quimiotaxi i major activació de la via de les MAPK.

CCR7 és una altre receptor de quimioquines amb implicacions en la LLC. Els seus lligands, el CCL19 i CCL21 s'expressen en el òrgans limfoides secundaris i gaudeixen d'un important paper en la migració i distribució dels limfòcits T i B normals immadurs. S'ha reportat que l'expressió de CCR7 a la superfície de les cèl·lules de LLC està augmentada, i s'ha relacionat amb factors de mal pronòstic, com l'elevada expressió de ZAP-70 i la presència de limfadenopaties en la clínica del pacient.^{113,118,122}

Unes altres quimioquines que han estat relacionades amb la LLC, són la CCL3 i CCL4. Aquestes, a diferència de les descrites fins al moment, són secretades posteriorment a l'estímul del BCR,¹²³ per la mateixa cèl·lula de LLC. Aquestes quimioquines, per tal de crear un ambient favorable per a sobreviure¹²³, promouen l'atracció de limfòcits T.¹²⁴ CCL3 i CCL4 es troben altament expressades en pacients amb LLC i han estat associades a un pitjor pronòstic de la malaltia.

3.2.1.2.1. Receptor i transducció de senyal

Els receptors poden estar expressats a la superfície cel·lular de manera constitutiva o, per contra, ser induïts. La seva estructura consta d'un domini extracel·lular, compost per la regió N-terminal, 7 dominis transmembrana orientats de forma perpendicular a la membrana plasmàtica, amb 3 loops extracel·lulars i 3 intracel·lulars acoblats a la proteïna G al seu extrem C-

terminal intracel·lular (GPCR, de l'anglès *G-protein coupled receptor*) (Figura 9).¹²⁵ Les parts extracel·lulars del receptor participen en la unió de les quimioquines, mentre que la part intracel·lular està implicada en la transducció de senyal a l'interior de la cèl·lula. Les proteïnes G consten de tres subunitats, α , β i γ . La unió de la quimioquina al seu receptor indueix l'activació de GPCR, amb el consegüent canvi de conformació, i l'activació de diferents cascades de senyalització.¹²⁶⁻¹²⁸

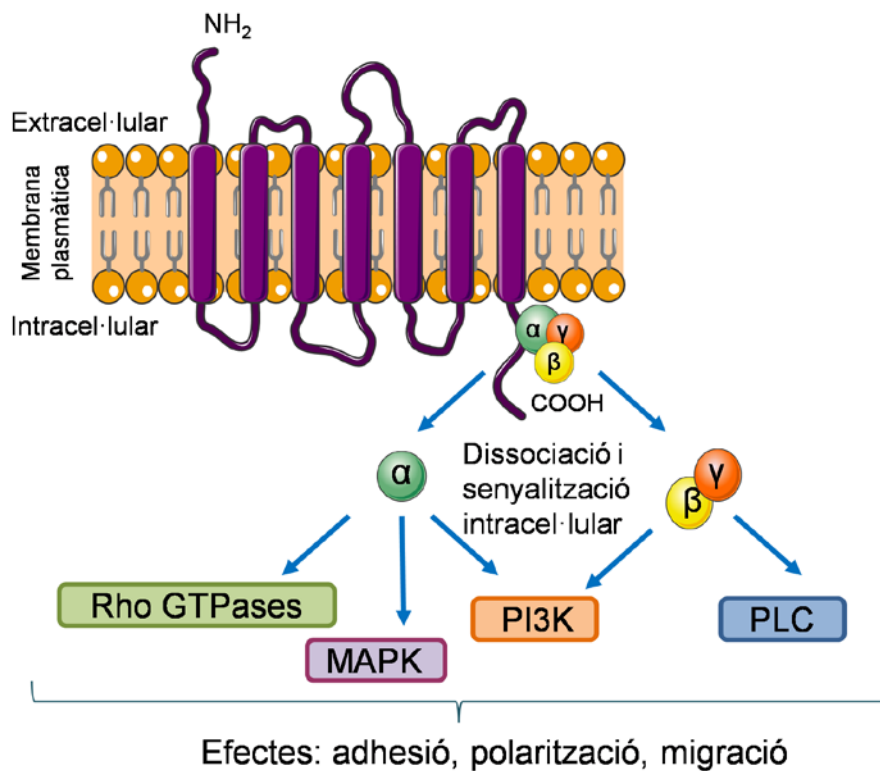


Figura 9. Estructura genèrica d'un receptor de quimioquines amb les principals vies de senyalització activades per la unió de les quimioquines als seus receptors. Elaboració pròpia.

3.2.1.2.2. Migració limfocitària

La migració limfocitària de la sang perifèrica als òrgans limfoides secundaris és un multiprocés dependent, en un primer moment, de les vènules d'endoteli alt (HEV, de l'anglès *high endothelial venules*). Aquestes HEV estan compostes per cèl·lules endotelials especialitzades, amb una morfologia arrodonida per afavorir l'adhesivitat en el moment de la extravasació limfocitària i es localitzen als òrgans limfoides secundaris, a excepció de la melsa.¹²⁹

Aquest procés d'extravasació es dona a través d'una seqüència de processos (Figura 10).¹³⁰

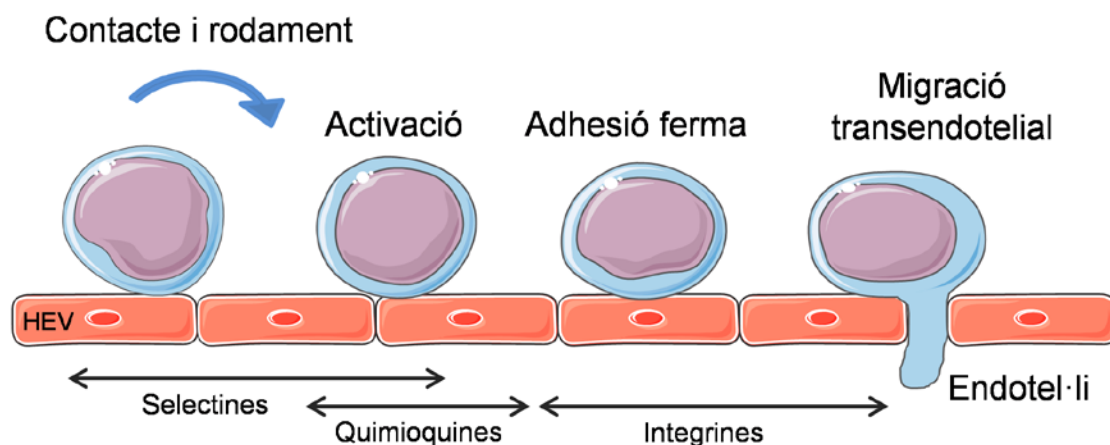


Figura 10. Etapes de la migració endotelial. Selectines, quimioquines i integrines participen en el procés. Elaboració pròpia.

- **Contacte i rodament:** Les unions inicials del limfòcit B a l'endoteli són mediades per selectines, permetent el rodament del limfòcit sobre l'endoteli. Aquesta adherència del limfòcit a les HEV és feble i transitòria.

- **Activació:** El limfòcit roda per la superfície de l'endoteli fins que els GPCRs del limfòcit reconeixen quimioquines expressades a la superfície luminal de les HEV. Aquestes quimioquines expressades constitutivament als òrgans limfoides secundaris són la CCL19, CCL21 (ligands de CCR7), CXCL13 (ligand de CXCR5) i CXCL12 (ligand de CXCR4) i regulen l'entrada i organització funcional dels limfòcits i de les cèl·lules dendrítiques.¹³⁰⁻¹³² Aquest reconeixement receptor-quimioquina provoca l'activació del limfòcit.

- **Adhesió ferma:** L'activació del limfòcit indueix l'expressió d'un tipus de molècules d'adhesió, les integrines, que afavoreixen la unió ferma del limfòcit a les HEV.

- **Migració transendotelial:** Aquest últim pas involucra el pas del limfòcit a través de la membrana basal de les HEV. Fins el moment, els mecanismes moleculars que participen en aquest procés no són coneguts amb detall.

3.2.1.3. Altres factors solubles

Entre els factors solubles del microambient trobem les molècules petites amb poder pro-angiogènic. L'angiogènesi és un procés fonamental per a la formació de vasos sanguinis i s'ha pogut relacionar amb estadis avançats de la LLC.¹³³ Les cèl·lules de LLC secreten, sobretot en ganglis limfàtics i en el moll de l'os, factors pro-angiogènics com el FGF (de l'anglès *Fibroblast Growth Factor*),¹³³ el VEGF (de l'anglès *vascular endothelial growth factor*)¹³⁴ i Ang (de l'anglès *Angiopoietin*).¹³⁵ Els nous vasos sanguinis es caracteritzen per una major permeabilitat i per contribuir així a la disseminació de la malaltia. Les

cèl·lules de LLC també poden expressar receptors d'alguns d'aquests factors pro-angiogènics, la transducció de la senyal dels quals afavorirà la supervivència cel·lular.¹³⁶

Un altre element soluble que juga un paper molt important en la migració de les cèl·lules de LLC és l'enzim MMP-9 (de l'anglès *Matrix metalloproteinase-9*).¹³⁷ MMP-9 és una proteasa que digereix el col·lagen tipus IV, component principal de la membrana basal.^{138,139} Aquesta proteasa s'expressa en nivells molt majors en la LLC que en limfòcits B normals i correlaciona amb estadis avançats de la malaltia.¹⁴⁰ L'adhesió de les cèl·lules de LLC a la proteïna VCAM-1 (de l'anglès *vascular cell adhesion molecule-1*), de les cèl·lules estromals, mediada per la integrina VLA-4 (de l'anglès *very late antigen-4*) incrementa els nivells de MMP-9 així com també ho fa la interacció de les quimioquines CXCL12 i CCL21 als seus receptors CXCR4 i CCR7.¹⁴⁰

3.2.2. Molècules d'adhesió i altres receptors de membrana

El perfil de molècules d'adhesió de les cèl·lules de LLC està essent molt estudiat, donat que aquest perfil pot influenciar i determinar la capacitat d'aquestes cèl·lules a respondre a quimioquines i migrar a zones específiques del cos. Una de les molècules més rellevants és la integrina VLA-4, també anomenada $\alpha 4\beta 1$. Aquesta integrina té gran importància en processos inflamatoris i en la recircularització limfocitària.¹⁴¹ Igualment, està implicada en l'adhesió dels progenitors hematopoiètics a l'estroma del moll de l'os,¹⁴² requerint-se la seva funció per al correcte desenvolupament dels progenitors de limfòcits T i B.¹⁴³ Elevats nivells de VLA-4, concretament de la subunitat $\alpha 4$, també coneguda per CD49d, correlacionen amb la presència de

limfadenopaties, així com amb els pacients amb estadis avançats de LLC.^{144,145} Ha estat demostrat que VLA-4 augmenta la supervivència de les cèl·lules de LLC a través de la unió al seu lligand VCAM-1, activant la via PI3K, o interactuant amb MMP-9/CD44, activant STAT3.^{146,147}

Els limfòcits B neoplàsics de la LLC expressen a la superfície receptors de dues proteïnes de la família de les TNF: BR3, per la proteïna BAFF i BCMA i TACI, per la proteïna APRIL. Ambdues proteïnes són expressades normalment en monòcits, macròfags, cèl·lules dendrítiques i neutròfils i participen en la supervivència, proliferació i diferenciació dels limfòcits B.¹⁴⁸ Cal destacar que les NLC, que protegeixen la cèl·lules de LLC d'apoptosi *in vitro*, expressen nivells elevats de BAFF i APRIL.¹⁰¹ Per altra banda, d'una manera autocrina, sembla que les cèl·lules de LLC promouen igualment la seva supervivència, mitjançant l'expressió de BAFF i APRIL.¹⁴⁹

Les cèl·lules de LLC no estan exposades únicament a senyals provinents de les cèl·lules accessòries o a elements del microambient, sinó que també són sensibles als patògens, concretament als patrons moleculars associats a patògen o PAMPs (de l'anglès *Pathogen-associated molecular patterns*). El reconeixement d'aquestes seqüències, el realitzen a través de receptors de membrana o citosòlics anomenats *Toll-like receptors* o TLR. S'ha suggerit que la inflamació o autoimmunitat mediada pels TLR podria tenir un paper en el desenvolupament, progressió i/o acumulació de la LLC.¹⁵⁰

Un dels estímuls més importants del microambient en la LLC és la interacció del lligand CD40 (CD40L)-CD40, la qual indueix la síntesis de proteïnes de proliferació i d'anti-apoptosi. En els centres de proliferació, les cèl·lules de LLC estan en contacte amb cèl·lules T activades amb expressió de

CD40L (membre de la superfamília TNF- α). La lligació amb el CD40 de les cèl·lules de LLC s'ha proposat com un procés clau en l'activació, proliferació i supervivència de les cèl·lules de LLC.^{151,152} No obstant, tot i que l'estimulació amb CD40L augmenta la resistència a l'apoptosi,¹⁵³ per si sola indueix poca proliferació.¹⁵⁴ Recentment també s'ha descrit, que la IL-21, citocina segregada per les cèl·lules T activades, contribuiria juntament amb CD40L a la proliferació de les cèl·lules de LLC.¹²⁴

3.2.3. Receptor de cèl·lules B (BCR)

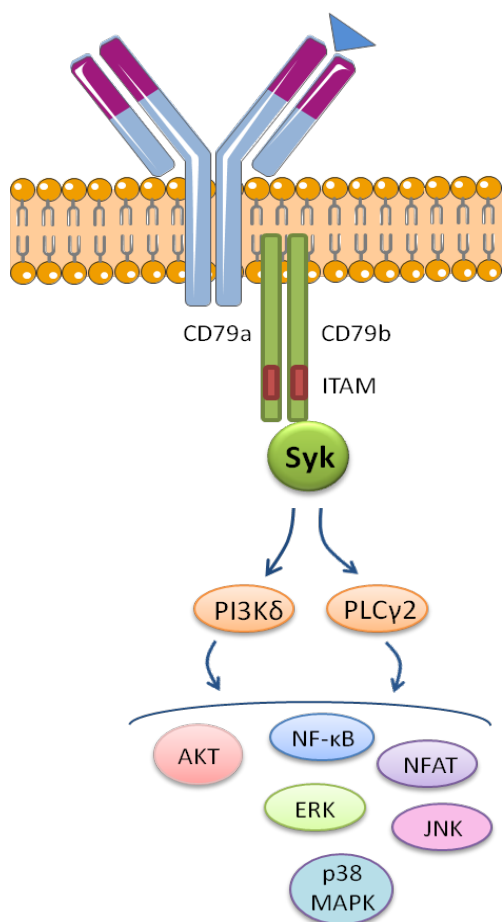


Figura 11. Senyalització del BCR.
Elaboració pròpia.

El receptor de cèl·lules B o BCR és un receptor de membrana essencial per a la transducció de senyals. La complexitat de la senyalització del receptor permet obtenir nombrosos efectes, incloent la supervivència, apoptosi o proliferació d'aquestes cèl·lules. Més detalladament, el BCR és un complex multimèric format per immunoglobulines superficials de membrana normalment IgM i/o IgD, associades amb l'heterodímer Ig- α (CD79a) / Ig- β (CD79b).¹⁵⁵ En aquestes cadenes citoplasmàtiques del CD79a/CD79b és on trobem els dominis ITAM (de l'anglès *Immunoreceptor*

tyrosine-based activation motif). Els residus tirosina d'aquests dominis es fosforilaran posteriorment a la lligació de proteïnes involucrades en la senyalització del BCR.¹⁵⁶ En limfòcits B normals, posteriorment a la unió de l'antigen, es dóna el reclutament als motius ITAM de proteïnes com la tirosina quinasa SYK (**Figura 11**), la qual s'activa, iniciant subseqüentment l'activació de proteïnes efectores de la senyalització, com és la PI3K (fosfatidil-inositol 3-quinasa) o la PLC γ 2 (fosfolipasa-C γ 2). L'activació de PI3K genera un segon missatger, el PIP3 (fosfatidil-inositol trifosfat), el qual recluta a la membrana i activa la quinasa Akt. La via PI3K/Akt juga un paper molt important en la supervivència de les cèl·lules B i protegeix la cèl·lula de mort induïda pel BCR, induint l'expressió de proteïnes antiapoptòtiques, i inactivant proteïnes involucrades en apoptosi.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Per altra banda, l'activació de PLC γ 2 induïx la mobilització de Ca²⁺ i l'activació de PKC (de l'anglès *Protein Kinase C*), primordial per a l'activació de la via de les MAPK, on s'inclourien proteïnes quinasa com ERK (de l'anglès *extracellular signal-regulated kinase*), JNK (de l'anglès *c-JUN NH₂-terminal kinase*) i p38 MAPK, i factors de transcripció com NF- κ B i NFAT (de l'anglès *nuclear factor of activated T cells*).^{159,160} El balanç entre aquestes molècules de senyalització determinarà el resultat d'aquestes cèl·lules B i si, per exemple, progressaran en el cicle cel·lular o esdevindran apoptòtiques.

La baixa expressió en superfície del BCR en el limfòcit B de la LLC és un tret característic i únic que permet la distinció amb altres síndromes limfoproliferatius de limfòcits B. El mecanisme que comporta aquesta baixa expressió d'immunoglobulines superficials, fins el moment, és desconegut, tot hi existir algun estudi que determina que seria per una manca de

processament i transport a la membrana¹⁶¹ o com a conseqüència d'una internalització del receptor per la unió de l'antigen.¹⁶²

Estudis en nombrosos casos de LLC, han revelat, que la regió del BCR on es dóna la unió a l'antigen es troba formada per una combinació preferent de gens de les immunoglobulins. Aquesta situació és present en un 10% dels malalts i es coneix com estereotip del BCR.¹⁶³ El fet que tant els casos mutats com no mutats presentin receptors similars (receptors estereotipats), suggereix l'existència d'un nombre limitat d'elements antigènics que podrien ésser reconeguts pel receptor leucèmic.¹⁶⁴ Tot hi haver evidències que donen suport a aquesta idea, diverses publicacions determinen que un antigen extrínsec no resulta imprescindible per aquesta senyalització. Una de les publicacions més recents en aquest tema ha descrit que la LLC, tant IGHV mutada com no mutada, presenta BCRs amb capacitat senyalitzadora independent d'antigen. Aquestes cèl·lules de LLC, amb expressió d'un BCR estereotipat, tenen la capacitat d'induir una senyalització autònoma, i sembla que ho farien a través de la interacció d'aquest BCR amb epítops intrínsecs del BCR de la mateixa cèl·lula. Aquesta senyalització autònoma no exclou que antigens extrínsecs puguin també contribuir a la patogènesis de la LLC, potenciant, fins i tot, l'activitat basal d'aquests receptors.¹⁶⁵ Uns altres estudis han determinat que el BCR dels pacients amb LLC amb IGHV no mutat és poli-reactiu,^{166,167} amb factors tant intrínsecs com extrínsecs, que contribuirien a una major senyalització intracel·lular, explicant el caràcter més agressiu d'aquest grup de pacients. En canvi, *in vitro* s'ha observat, que els pacients amb IGHV mutat no responen a la lligació d'IgM (receptor anèrgic), implicant absència de senyalització intracel·lular. L'estat d'un BCR desensibilitzat,

incapaç de respondre a l'estímul, sembla que provindria per una activació antigènica constant.¹⁶⁸

La senyalització del BCR ha estat també relacionada amb la modulació de proteïnes que participen en la interacció de la cèl·lula de la LLC amb el microambient, així com en la proliferació i migració d'aquestes cèl·lules.^{112,113,169} L'activació del BCR comporta la modulació de l'expressió de diverses molècules coestimuladores i d'adhesió com CD54, CD62L, CD44, CD40, CD80 i CD86, així com una major migració a la quimioquines CXCL12 i CXCL13.¹⁶⁹

Les cèl·lules de LLC, per tal de crear un ambient més favorable per a la seva supervivència, tenen la capacitat de segregar CCL3 i CCL4 (descrites a l'apartat 3.2.1.2.) posterior a l'estimulació del BCR.¹²³ Aquestes citoquines permetran el reclutament de nous limfòcits T que afavoriran la supervivència i proliferació cel·lular, principalment gràcies al contacte CD40L-CD40 que establiran (apartat 3.2.2.).¹²⁴

4. LA PROTEÏNA ZAP-70

La proteïna ZAP-70 és una proteïna de 70 kDa, aïllada per primera vegada al 1991 en cèl·lules T,¹⁷⁰ que pertany a la família de les proteïnes tirosina quinasa. ZAP-70 és un component essencial en la senyalització cel·lular del receptor de cèl·lules T (TCR, de l'anglès *T-cell receptor*) i en la senyalització a les cèl·lules NK,¹⁷¹ i el fet de ser descoberta associada a la cadena zeta dels dominis citoplasmàtics del complex TCR¹⁷² és el que va portar a anomenar-la com proteïna ZAP-70 (de l'anglès *Zeta-associated protein-70*).

La proteïna tirosina quinasa equivalent en els limfòcits B és la proteïna SYK (de l'anglès *Spleen tyrosine kinase*).¹⁷³ Les dues proteïnes tenen funcions pràcticament equivalents en limfòcits T i B, on són fonamentals per a la cascada de senyalització intracel·lular després de l'activació del BCR o TCR, necessària per a l'activació i desenvolupament de les funcions efectores d'aquestes cèl·lules.

4.1. Estructura de la proteïna ZAP-70

El gen que codifica per a la proteïna ZAP-70 es troba situat a la banda cromosòmica 2q11.2 en humans.¹⁷⁴ Es localitza preferentment en el citoplasma cel·lular dels limfòcits T en repòs i, al activar-se, s'acumula a la membrana plasmàtica.¹⁷⁵ La proteïna s'organitza en dos dominis SH2 N-terminal i un domini tirosina quinasa a l'extrem C-terminal. Les dues zones intermèdies són anomenades interdomini A i interdomini B (Figura 12).¹⁷⁶

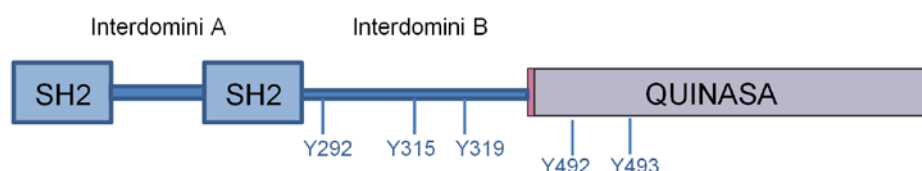


Figura 12. Estructura de la proteïna ZAP-70. Està formada pel domini tirosina quinasa i dos dominis SH2. Els principals residus tirosina (Y) fosforilables, que regulen la funció de la proteïna, estan indicats. Elaboració pròpia.

- Dominis SH2

Els dominis SH2 són els responsables del reclutament de la proteïna ZAP-70 als motius ITAM dels dominis citoplasmàtics de les proteïnes

CD3 i de les cadenes zeta (components del complex del TCR) de les cèl·lules T. Els motius ITAM es fosforilen en resposta a l'estimulació del TCR, permetent la unió de ZAP-70 a través dels dominis SH2, iniciant així la cascada de senyalització intracel·lular.¹⁷⁷

- Domini quinasa

El domini quinasa de la proteïna ZAP-70 conté dos residus tirosina, Tyr 492 i Tyr 493 que són fosforilats posteriorment a l'estimulació del receptor per altres tirosines quinasa de la família Src, Lck en cèl·lules T i Lyn en cèl·lules B, o per autofosforilació (per la mateixa ZAP-70).¹⁷⁸ L'activació dels dos residus serà necessària per a la completa activitat enzimàtica de la proteïna.¹⁷⁹

- Interdominis

Tot i que l'activitat catalítica de la proteïna ZAP-70 representa la funció més important, la interacció de ZAP-70 amb altres proteïnes contribueix al seu paper en la transducció de la senyal a través del receptor. La regió entre el segon domini SH2 i el domini quinasa, conegut com interdomini B, conté tres tirosines, Tyr292, Tyr315 i Tyr319,¹⁷⁶ les quals són fosforilades per quinases de la família Src. La unió de diferents proteïnes senyalitzadores permetrà el reclutament de noves proteïnes en el complex del receptor que al seu torn activaran diverses cascades de senyalització. Estudis mutacionals mostren que la Tyr292, un cop fosforilada, permet la unió de proteïnes reguladores negatives que inactiven l'activitat quinasa de la ZAP-70.^{180,181} Les Tyr315 i 319, en canvi, regulen positivament l'activitat enzimàtica de ZAP-70.^{182,183}

4.2. ZAP-70 en limfòcits B i T normals

En limfòcits T, la presentació d'antigens per la via del complex major d'histocompatibilitat (MHC, de l'anglès *major histocompatibility complex*) resulta necessària per a l'inici de la cascada de senyalització resultant en l'activació del limfòcit T. Proteïnes de la família Src fosforilen els dominis ITAM de les cues citoplasmàtiques del CD3 i de les cadenes zeta induint el reclutament de la proteïna ZAP-70 a través dels seus dominis SH2.¹⁸⁴ La proteïna ZAP-70 llavors es fosforila i, al mateix temps, gràcies a la seva activitat quinasa, fosforila altres proteïnes, entre elles LAT (*Linker for activation of T cells*) i SLP-76. La proteïna SLP-76 forma un complex amb Vav activant noves vies de senyalització com la mobilització de calci i l'activació de PLC γ 2 induint, en conseqüència, regulació gènica, proliferació i reorganització d'actina en aquestes cèl·lules.¹⁸⁵ La fosforilació de LAT implica l'activació d'una via de senyalització molt important, la de les MAPK (de l'anglès *mitogen-activated protein kinase*).¹⁸⁶ L'estímul inicial del TCR dóna, com a resultat, respostes diverses, depenent del tipus de limfòcit T que sigui i, fins i tot, del microambient on es trobi.

Durant molt de temps la proteïna ZAP-70 va ser considerada exclusiva dels limfòcits T i NK i absent del llinatge B. Estudis en aquest àmbit van demostrar que també està present en estadis inicials del desenvolupament dels limfòcits B, observant la seva expressió en progenitors de limfòcits B, així com en subpoblacions de limfòcits B activats.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ A més, estudis en ratolins van demostrar que l'absència de la proteïna SYK en estadis inicials del desenvolupament del limfòcit B podia ser compensada per la presència de la proteïna ZAP-70.¹⁹⁰ Com ja s'ha comentat, la proteïna SYK en limfòcits B té un

paper anàleg al descrit per la proteïna ZAP-70 en limfòcits T. Ambdues proteïnes tenen una homologia del 50% i una estructura funcional de dominis equivalent.

4.3. ZAP-70 com a factor pronòstic

L'expressió de la proteïna ZAP-70 està relacionada amb l'estat mutacional de les immunoglobulines en pacients amb LLC (**Figura 13**). Els casos de LLC amb els gens de les immunoglobulines no mutats expressen nivells alts de ZAP-70, mentre que els casos de LLC amb els gens de les immunoglobulines mutats expressen nivells baixos de ZAP-70.⁷⁴

L'expressió de ZAP-70, a diferència de l'expressió de CD38, no varia al llarg del curs de la malaltia,^{191,192} i de manera independent, té un valor pronòstic, estant associada a una progressió més ràpida de la malaltia i a una supervivència menor.^{74,193}

La detecció cel·lular de l'expressió de ZAP-70 és possible mitjançant l'anàlisi d'ARNm, el Western blot, la immunohistoquímica o la citometria de flux. Aquest últim ofereix l'avantatge de permetre la selecció de poblacions cel·lulars específiques, excloent, per exemple, l'elevada expressió de ZAP-70 dels limfòcits T. El 20% de cèl·lules positives per ZAP-70 ha estat el punt de tall més acceptat per definir la positivitat de ZAP-70 (**Figura 13**).

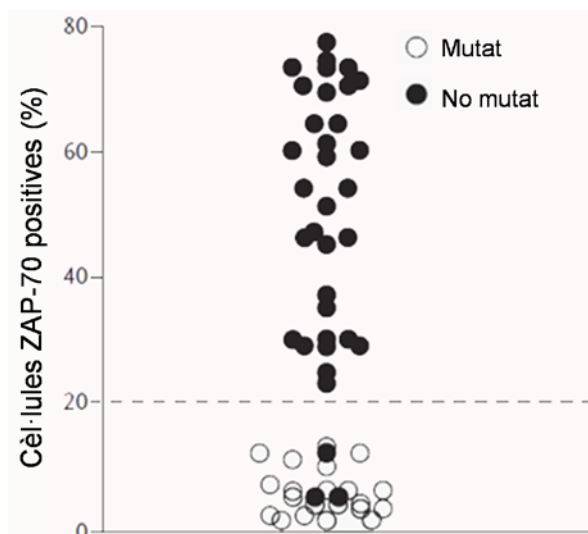


Figura 13. Correlació dels nivells de la proteïna ZAP-70 amb les mutacions de IGHV.

Imatge de Crespo, M. NEJM 2003.⁷⁴

L'expressió de ZAP-70 ha permès també predir el temps fins a la necessitat de tractament d'aquests pacients, sent de 8.4 anys per els casos ZAP-70 negatius i de 2.6 anys per als ZAP-70 positius.⁶² Tot i ser prematura la recomanació de tractament en pacients amb ZAP-70 elevada, sí resulta convenient la monitorització d'aquests pacients amb una major freqüència.

4.4. ZAP-70 i la senyalització del BCR

El paper destacat de la proteïna ZAP-70 en la senyalització del TCR i la seva homologia amb SYK, van fer pensar que ZAP-70 podria estar potenciant la senyalització del BCR d'aquest grup de pacients amb una malaltia més agressiva. Diferents estudis han demostrat que l'expressió de ZAP-70 augmenta la senyalització del BCR posterior a l'estímul d'aquest (Figura 14).¹⁹⁴⁻¹⁹⁸ En aquesta direcció s'ha observat que l'expressió *de novo* de

ZAP-70 en cèl·lules ZAP-70 negatives permet transformar les cèl·lules no responedores a l'activació d'IgM en cèl·lules que sí responen.

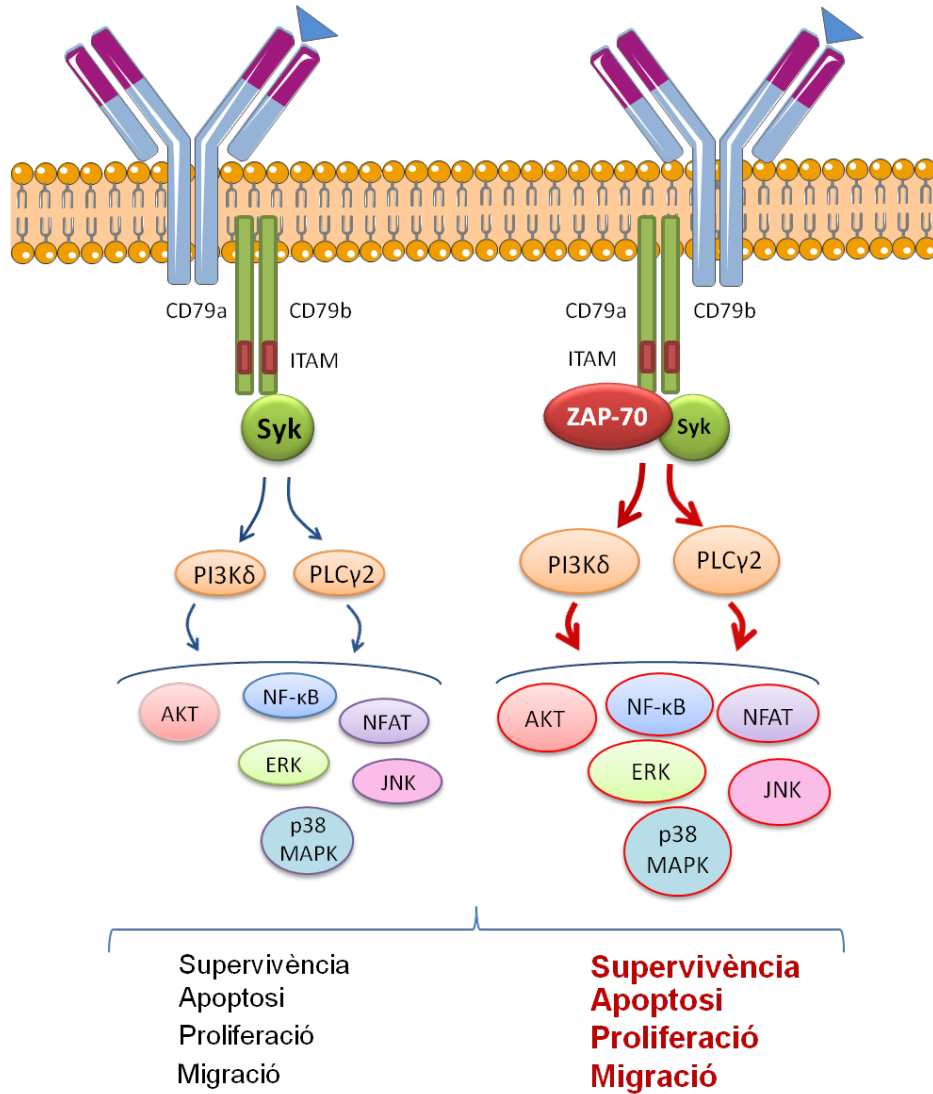


Figura 14. ZAP-70 i la senyalització al BCR. Senyalització del BCR sense ZAP-70 (esquerra) i senyalització de la LLC amb expressió de ZAP-70 (dreta). Molècules senyalitzadores activades posteriorment a la lligació de l'antigen, i els seus efectes biològics, estant aquests potenciat amb l'expressió de ZAP-70. Adaptació de Stevenson F. Blood 2004.¹⁹⁹

Una de les proteïnes que és fosforilada posterior a l'activació del BCR és la proteïna SYK. Com ja s'ha comentat, la proteïna SYK és una proteïna tirosina quinasa important en la senyalització del BCR.^{200,201} La senyalització del BCR varia entre pacients, depenent de la fosforilació que presenta SYK posterior a l'activació del receptor.^{202,203} No obstant, s'ha demostrat, que aquesta varietat de senyalització entre pacients, no es dona per una diferència d'expressió de la proteïna SYK,²⁰³ si no pel fet d'expressar també la proteïna ZAP-70.¹⁹⁴ Així, estudis posteriors en limfòcits B amb expressió ectòpica de ZAP-70, han revelat, que aquesta és capaç de potenciar la resposta del BCR, independentment de la seva activitat tirosina quinasa¹⁹⁷ i que en cèl·lules B amb absència de la proteïna SYK, ZAP-70 és capaç de reconstituir la senyalització.²⁰⁴ L'expressió de ZAP-70 s'ha associat a un augment de la fosforilació de les proteïnes intracel·lulars SYK, BLNK i PLC γ 2, entre d'altres.

La generació d'una proteïna ZAP-70 mutada ha permès observar que sense el domini quinasa ni el domini SH2, ZAP-70 és incapaç d'unir-se al complex del BCR, posterior a l'activació del receptor, a través dels motius ITAM del CD79b, i augmentar la senyalització intracel·lular.

En cèl·lules primàries de LLC, l'elevada expressió de la proteïna ZAP-70 també s'ha correlacionat amb altres característiques biològiques, com la major resposta a estímuls de supervivència i de migració. S'ha descrit que els nivells que aquestes cèl·lules ZAP-70 positives segreguen de CCL3 i CCL4 (descrites a l'apartat 3.2.1.2.), posterior a l'estimulació del BCR,¹²³ és superior. El fet que aquests nivells siguin majors facilita el reclutament de cèl·lules T, favorables per a la supervivència de la cèl·lula maligna. Per tal d'aconseguir un millor microambient, la cèl·lula de LLC és també capaç de modular

diferencialment receptors d'adhesió i migració. Per exemple, s'ha observat, que les cèl·lules B amb expressió de ZAP-70 tenen majors nivells del receptor CCR7, augmentant la migració d'aquestes cèl·lules als lligands, CCL19 i CCL21 i afavorint la seva supervivència.¹¹³

Investigacions en aquesta direcció, han determinat que ZAP-70 és capaç d'induir en limfòcits T una senyalització intracel·lular, posterior a l'estimulació de CXCR4 i CXCR3 amb els seus lligands, independentment de l'activació del TCR.^{205,206} Aquestes observacions donen a la proteïna ZAP-70 un nou paper en la senyalització dels receptors de quimioquines, essent capaç d'influir en la migració de cèl·lules amb expressió de ZAP-70 de manera directa.

D'aquesta manera, l'expressió de ZAP-70 potencia la senyalització intracel·lular, tant del BCR com dels receptors de quimioquines, afectant en la supervivència, la proliferació i la migració de les cèl·lules que l'expressen.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI DE TREBALL

El microambient dels ganglis limfàtics i del moll de l'os es considera actualment un element crucial en la evolució de la LLC, així com en la resistència al tractament. L'ambient favorable, amb senyals estimuladores, que les cèl·lules de LLC disposen en aquests compartiments afavoreix la supervivència i proliferació d'aquestes cèl·lules. El fet que els pacients amb LLC amb expressió elevada de ZAP-70 cursin amb una malaltia més agressiva, ens va fer plantejar la hipòtesi, que l'expressió de la proteïna ZAP-70 podria estar modificant la capacitat d'interactuar d'aquestes cèl·lules amb el microambient. ZAP-70 podria estar modulant l'expressió de receptors implicats en migració, modificant així, la capacitat de migració d'aquestes cèl·lules. Si es confirmés, les cèl·lules amb expressió de ZAP-70 migrarien a ambients favorables on rebrien senyals de supervivència, la qual cosa podria estar relacionada amb el curs clínic més agressiu d'aquests pacients.

OBJECTIUS

1. Determinar els efectes fenotípics de l'expressió ectòpica de la proteïna ZAP-70 en limfòcits B madurs neoplàsics.

1.1. Estudiar l'efecte de ZAP-70 en la senyalització del BCR.

1.2. Estudiar l'efecte de ZAP-70 sobre l'expressió i senyalització de molècules d'adhesió i receptors de quimioquines.

1.3. Estudiar el paper de la ZAP-70 en la migració i/o adhesió de les cèl·lules de LLC.

2. Determinar el paper de la proteïna ZAP-70 en la supervivència i la infiltració tissular de les cèl·lules B madures neoplàsiques en un model murí de leucèmia.

2.1. Determinar el paper de ZAP-70 en la supervivència d'animals injectats de forma intravenosa amb cèl·lules B neoplàsiques.

2.2. Determinar el paper de ZAP-70 en la infiltració per part de les cèl·lules B neoplàsiques als diferents òrgans.



RESULTATS

CAPÍTOL 1

CAPÍTOL 1.

ZAP-70 augmenta la senyalització i la migració dels limfòcits B malignes a CCL21, induint l'expressió de CCR7 mitjançant ERK1/2.

L'expressió de la proteïna ZAP-70 a la Leucèmia Limfàtica Crònica (LLC) correlaciona amb un pronòstic desfavorable de la malaltia. Tot i que es coneix aquesta associació, el paper de la proteïna en la biologia tumoral de la cèl·lula B no ha estat definit amb exactitud.

S'ha descrit amb anterioritat, que l'elevada expressió de ZAP-70 en les cèl·lules leucèmiques dels pacients amb LLC correlacionen amb una biologia més agressiva de la malaltia, tant a nivell de la senyalització del BCR com a nivell de supervivència i migració cel·lular. No obstant, es desconeix, si aquestes característiques desfavorables, que es tradueixen en un pitjor pronòstic, són un efecte directe de l'expressió de ZAP-70 o són simplement un reflex de la biologia diferencial de les cèl·lules amb expressió d'aquesta proteïna.

Per aquest motiu, l'objectiu del nostre estudi va ésser estudiar l'efecte directe de l'expressió de ZAP-70 en una cèl·lula B, a través de la generació d'una línia cel·lular amb expressió estable de la proteïna ZAP-70.

El primer punt que es va abordar, va ésser l'aspecte de la senyalització del BCR. En una de les línies cel·lulars estables (Ramos), es va poder observar que l'estimulació del BCR resultava diferent en funció si es donava a través d'IgM o d'IgD. L'estimulació d'IgD implicava una activació d'Akt, però en qualsevol cas, no resultava diferent pel fet d'expressar ZAP-70. L'activació d'IgM, en canvi, sí aconseguia una activació del BCR amb una major

senyalització, en intensitat i temps, en la línia cel·lular amb expressió de ZAP-70, induint fosforilació, tant d'Akt com d'ERK1/2. En el cas de l'altra línia cel·lular estable generada (Raji), es va observar una activació constitutiva de ZAP-70, la qual implicava també la fosforilació d'ERK1/2.

L'estudi de la senyalització del BCR va portar a estudiar la internalització del receptor posterior a l'activació d'aquest. Així, vàrem observar, que l'expressió de ZAP-70 retardava la internalització del BCR, tant d'IgM com de la molècula CD79b, on ZAP-70 estaria unida.

Donat que la proteïna ZAP-70 ha estat relacionada amb una major migració *in vitro*, vàrem decidir estudiar si ZAP-70 contribuïa directament en aquests processos. Per aquest motiu vàrem analitzar, posteriorment a l'activació de ZAP-70, l'expressió de diverses molècules d'adhesió, així com diversos receptors de quimioquines (CCR7, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CD44, CD49d i CD62L). Vàrem observar diferències en diverses d'aquestes molècules, però la més destacable, i amb la qual vàrem decidir aprofundir pel seu interès, va ésser l'expressió del receptor CCR7. L'activació del BCR va induir una sobreexpressió del receptor CCR7, major en les línies cel·lulars amb expressió de ZAP-70. Aquesta inducció de l'expressió de CCR7 va resultar dependent de l'activació d'ERK1/2 posterior a la lligació del BCR. Vàrem estudiar també el receptor CCR7 en cèl·lules de pacients amb LLC i vàrem observar que les cèl·lules ZAP-70 positives també presentaven una expressió significativament més elevada en superfície del receptor CCR7 en comparació amb les cèl·lules ZAP-70 negatives del mateix pacient.

Per tal de determinar si el receptor CCR7 augmentat també era funcional, vàrem utilitzar la línia amb expressió estable de ZAP-70, així com la

línia control, per activar CCR7, mitjançant un dels seus lligands, el CCL21. Vàrem observar que l'estimulació de CCR7 induïa la fosforilació tant d'Akt com d'ERK1/2, essent aquestes significativament superiors a les cèl·lules amb expressió de ZAP-70.

A continuació, es va determinar si l'augment d'expressió de CCR7, tot i ésser funcional a nivell de senyalització, també tenia implicacions a nivell de migració cel·lular. Efectivament, vam observar, tant en les línies cel·lulars amb expressió estable de ZAP-70, com en les cèl·lules positives per a l'expressió de ZAP-70 de pacients amb LLC, que l'elevada expressió de CCR7 d'aquestes cèl·lules, implicava una major migració a la quimioquina CCL21.

Els resultats obtinguts permeten concloure que l'expressió de ZAP-70 està associada a la senyalització del BCR a través d'IgM. Aquesta activació del BCR comporta una cascada de senyalització augmentada així com la sobreexpressió del receptor CCR7, depenent de l'activació d'ERK1/2. L'increment d'expressió de CCR7 en les cèl·lules amb elevada expressió de ZAP-70 comporta, alhora, un augment de la migració a la quimioquina CCL21.

Tots aquests resultats aporten un major coneixement de la funció de la proteïna ZAP-70 en els limfòcits B, així com el paper d'aquesta proteïna en el pronòstic desfavorable que presenten aquests pacients.

ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation

Eva Calpe,¹ Carles Codony,² Maria Joao Baptista,¹ Pau Abrisqueta,¹ Cecilia Carpio,¹ Noelia Purroy,¹ *Francesc Bosch,¹ and *Marta Crespo¹

¹Laboratory of Experimental Hematology, Department of Hematology, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; and ²Laboratory of Medical and Experimental Hematology, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain

ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia (CLL) has been associated with enhanced B-cell receptor (BCR) signaling, survival, and migration. We investigated whether ZAP-70 can directly govern migration and the underlying mechanisms. In the ZAP-70 stably transfected Ramos cell line, IgM stimulation, but no IgD, enhanced phosphorylation of ERK1/2, Akt and Syk, and delayed IgM and CD79b internalization. In contrast, in the Raji cell line, where ZAP-70 was constitutively phosphorylated, ERK1/2, but not Akt, was phosphorylated,

suggesting that MAPK pathway mediates ZAP-70 effects. BCR stimulation modulated the expression of CCR7, CXCR4, CXCR5, CD44, CD49d, and CD62L, which were up-regulated in ZAP-70–positive CLL primary subclones. The most dramatic change after BCR engagement in ZAP-70-transfected cells was CCR7 up-regulation, this being impaired by ERK1/2 inhibition and translating into both increased signaling and migration toward CCL21. Primary CLL subclones with high ZAP-70 expression showed increased migration toward

CCL21. In conclusion, ZAP-70 ectopic expression led to enhanced BCR signaling after IgM stimulation and increased the expression of CCR7 predominantly via ERK1/2, increasing the response and migration toward CCL21. In primary CLL samples, cellular subsets with high ZAP-70 expression had increased expression of adhesion molecules and chemokine receptors in addition to an enhanced ability to migrate toward CCL21. (*Blood*. 2011;118(16):4401-4410)

Introduction

ZAP-70 protein is a 70-kDa member of the Syk family of protein tyrosine kinases that was first identified as a crucial element for proximal signaling from the T-cell receptor.¹ Similar to Syk protein after the B-cell receptor (BCR) stimulation, ZAP-70 is recruited to the phosphorylated immunoreceptor tyrosine activation motifs of the ζ - and CD3-chains present in the T-cell receptor, where it subsequently becomes phosphorylated and initiates several signaling cascades.² Expression of ZAP-70 protein was considered to be restricted to T lymphocytes and natural killer cells. However, it has also been found expressed in normal B-cell precursors and in some subsets of activated B cells.³⁻⁶ Among B cell–derived malignancies, ZAP-70 is mainly expressed in chronic lymphocytic leukemia (CLL; 37%-57% of cases),⁷⁻⁹ B-acute lymphoblastic leukemia (B-ALL; 56%-59% of cases)^{4,10} and Burkitt lymphoma (8%-31% of cases).^{11,12}

An increased ZAP-70 expression in CLL has been associated with particular adverse biologic features, such as the presence of unmutated IgHV genes⁷ or high CD38 expression,¹³ and correlates with a poor clinical outcome.⁷⁻⁹ In the same vein, ZAP-70 expression in B-ALL correlates with a short survival as well.¹⁰ Although ZAP-70 expression in B-cell malignancies has an adverse prognostic influence, its role in the biology of the tumoral B cell is not fully defined. In this regard, the expression of ZAP-70 protein in CLL cells has been related to an enhanced BCR signaling.¹³⁻¹⁷ In addition, increased ZAP-70 expression has been associated with increased migration capabilities of CLL cells toward different chemokines, such as CXCL12, CCL19, and CCL21,¹⁸⁻²⁰

and with increased signaling and survival on CXCL12 treatment.^{18,21} However, whether these increased migrative capabilities are a direct effect of ZAP-70 expression or a mere reflection of the distinct biology features of ZAP-70–expressing cells needs to be further investigated.

To ascertain the direct implication of ZAP-70 in B-cell signaling and migration, we analyzed the phenotypic effects of ectopic ZAP-70 expression in a B-cell system and studied the expression of adhesion molecules and chemokine receptors in CLL primary cells with high or low ZAP-70 expression within the same patient. Herein, we report that IgM, but not IgD, stimulation mobilizes and activates ZAP-70, which in turn enhances BCR-induced ERK1/2 and Akt phosphorylation and delays IgM and CD79b internalization. Moreover, we show that ZAP-70 induces the expression of the chemokine receptor CCR7 via ERK1/2 activation, thus directly enhancing the capacity of signaling and migration of the ZAP-70–expressing B cells toward CCL21. Finally, we show that CLL cells with higher ZAP-70 expression within the same patient have a different expression profile of adhesion molecules and chemokine receptors and enhanced migration capacity toward CCL21.

Methods

Cell lines and primary cells

The Burkitt lymphoma B-cell lines Raji and Ramos were obtained from ATCC and were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10%

Submitted January 28, 2011; accepted August 10, 2011. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, August 24, 2011; DOI 10.1182/blood-2011-01-333682.

*F.B. and M.C. contributed equally to this study.

The online version of this article contains a data supplement.

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

© 2011 by The American Society of Hematology

heat-inactivated FBS, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 2mM L-glutamine, and 1mM sodium pyruvate at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Mononuclear cells from peripheral blood of patients with CLL were obtained by Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) density gradient from 40 patients after informed consent. This procedure was done following the requirement of the local clinical investigation ethical committee and the principles of the Declaration of Helsinki.

Constructs, transfections, and stable cell line generation

The GFP-ZAP-70 expression vector (pEGFP-N2ZAP-70) was generated by subcloning the full-length human ZAP-70 coding sequence from the SR α puroZAP-70 plasmid (kindly provided by Dr V. Di Bartolo, Institut Pasteur, Paris, France) into the pGlow-TOPO vector (Invitrogen). The ZAP-70 fragment was then subcloned into the *EcoRI* site at the polylinker of the mammalian expression vector pEGFP-N2 (Clontech), which allowed the expression of a GFP-ZAP-70 fusion protein (97 kDa).

Raji and Ramos cells were stably transfected with plasmids expressing either GFP-ZAP-70 fusion protein or GFP only as a control. For this, cells were resuspended in 200 μ L Optimix electroporation buffer (Thermo Hybaid), electroporated (150 μ F/300 V), subsequently selected for the presence of the plasmids in standard growth medium containing 1.2 mg/mL of G418 (Invitrogen), and further sorted by GFP expression.

Immunoblotting

BCR was stimulated with 5 μ g/mL F(ab')₂ anti-IgM (Invitrogen), or anti-IgD (Southern Biotechnology). CCR7 was stimulated using synthetic human CCL21 (PeproTech). ERK1/2 and Akt were inhibited with PD98059 (Cell Signaling Technology) and LY294002 (Sigma-Aldrich), respectively. Cell lysates from Ramos and Jurkat cells treated with phosphatase-inhibitor pervanadate (3mM H₂O₂/1mM NaVO₄) for 5 minutes at 37°C were used as positive controls for phospho-proteins. Cells were lysed for 30 minutes at 4°C in 100 μ L lysis buffer (20mM Tris pH 7.4, 1mM EDTA, 140mM NaCl, 1% NP-40 supplemented with 2mM sodium vanadate and 1 times protease inhibitor cocktail; Sigma-Aldrich). Protein concentration was determined using the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad). Equal amounts of denatured protein were resolved by 10% SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore). Membranes were blocked for 1 hour at room temperature in 5% milk/TBST. Membranes were incubated overnight with primary antibodies for phospho-ZAP-70^{Tyr319}/Syk^{Tyr352}, phospho-Akt^{Ser473}, phospho-ERK1/2^{Thr202/Tyr204}, Akt, and ERK1/2 (Cell Signaling Technology), ZAP-70 (clone 2F3.2; Upstate Biotechnology), Syk (Santa Cruz Biotechnology), and GAPDH (Abcam). Immunodetection was done with antirabbit or antimouse IgG HRP-linked antibodies (Dako North America) and the ECL chemiluminescence detection system (GE Healthcare). Chemiluminescent images were acquired with the LAS-3000 system and analyzed using Image Gauge Version 4.0 software (Fuji Photo Film).

Flow cytometry

Cell surface antigens were detected using the following fluorochrome-labeled antibodies: IgM-phycoerythrin (PE), IgD-PE, CD19-PE-Texas Red, CD5-PE-cyanine 5.5, CXCR3-allophycocyanin (APC), CXCR4-APC, CD44-APC, CD49d-APC, CD62L-APC (BD Biosciences), CCR7-APC, CXCR5-APC (R&D Systems), CD79b-PE, and CD3-PE-cyanine 7 (Beckman Coulter). For intracellular ZAP-70 detection in primary CLL cells, IntraSure kit and primary antibody anti-ZAP-70-PE (BD Biosciences) were used. Cells were acquired in a Navios cytometer (Beckman Coulter), and the results were analyzed using FCS Express Version 4 software (De Novo Software).

Confocal microscopy

Cells were seeded at a density of 1.2 \times 10⁶ cells/mL in standard growth media on poly-L-lysine-coated glass coverslips for 30 minutes at 37°C and mounted in an Attofour chamber (Invitrogen). The chamber was placed under a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems), and all images were acquired with a 63 \times glycerol immersion objective lens. Cells were stimulated with 20 μ g/mL F(ab')₂ anti-IgM, or IgD at 37°C and 5%

CO₂. Anti-human IgM-PE or IgD-PE was used to detect the receptor on surface. Image treatment was performed using the Image Processing Leica Confocal and ImageJ Version 1.37 software (Wayne Rasband, National Institutes of Health).

Calcium flux measurement

For calcium mobilization measurement, cells were washed 3 times with loading buffer (HBSS, 10mM D-glucose, 1.3mM CaCl₂, 1.1mM MgCl₂) and incubated with 2 μ M Fluo-4 AM (Invitrogen) in the presence of 0.02% Pluronic F-127 (Invitrogen). Afterward, cells were washed twice with loading buffer, resuspended in RPMI with 25mM HEPES, and kept at room temperature for 15 minutes; 250 ng/mL of CCL21 was added to the samples, and the mean fluorescence intensity (MFI) was recorded every 40 seconds for 11 minutes by flow cytometry in a FACSCalibur cytometer.

Chemotaxis assay

Chemotaxis assays were performed across bare polycarbonate membranes. Briefly, for cell lines, a total of 100 μ L containing 5 \times 10⁵ cells was added to the top chamber of a 6.5-mm-diameter transwell culture insert with a pore size of 5 μ m (Corning). Filters were then transferred to wells containing 600 μ L of standard growth medium with or without 1 μ g/mL CCL21. Cells were allowed to migrate for 15 hours at 37°C in 5% CO₂. Transmigrated cells in the lower chamber were resuspended and collected for counting with a FACSCalibur cytometer under a defined flow rate for 5 minutes. The migration index was calculated as the number of cells transmigrating with chemokine divided by the number of transmigrating cells in the absence of chemokine. Chemotaxis assays of primary CLL cells from 7 patients were performed, adding 400 μ L of RPMI-0.5% BSA containing 1.5 \times 10⁷ cells to the top chamber of a 24-mm-diameter transwell culture insert. Cells were allowed to migrate toward media containing 1 μ g/mL CCL21 for 6 hours, and the percentage of CLL cells expressing ZAP-70 was then determined in both upper and lower chambers by flow cytometry.

Statistical analysis

Results are shown as mean \pm SEM of at least 3 replicates. For statistical comparisons between groups, the Mann-Whitney test was used, and $P < .05$ was considered significant. Paired-sample parametric test (t test) was used to compare the differential expression of molecules between the ZAP-70 high and low CLL subpopulations within the same patient. Analyses were performed using the biostatistics software package SPSS Version 17 (IBM). Results were graphed with GraphPad Prism Version 5.0.

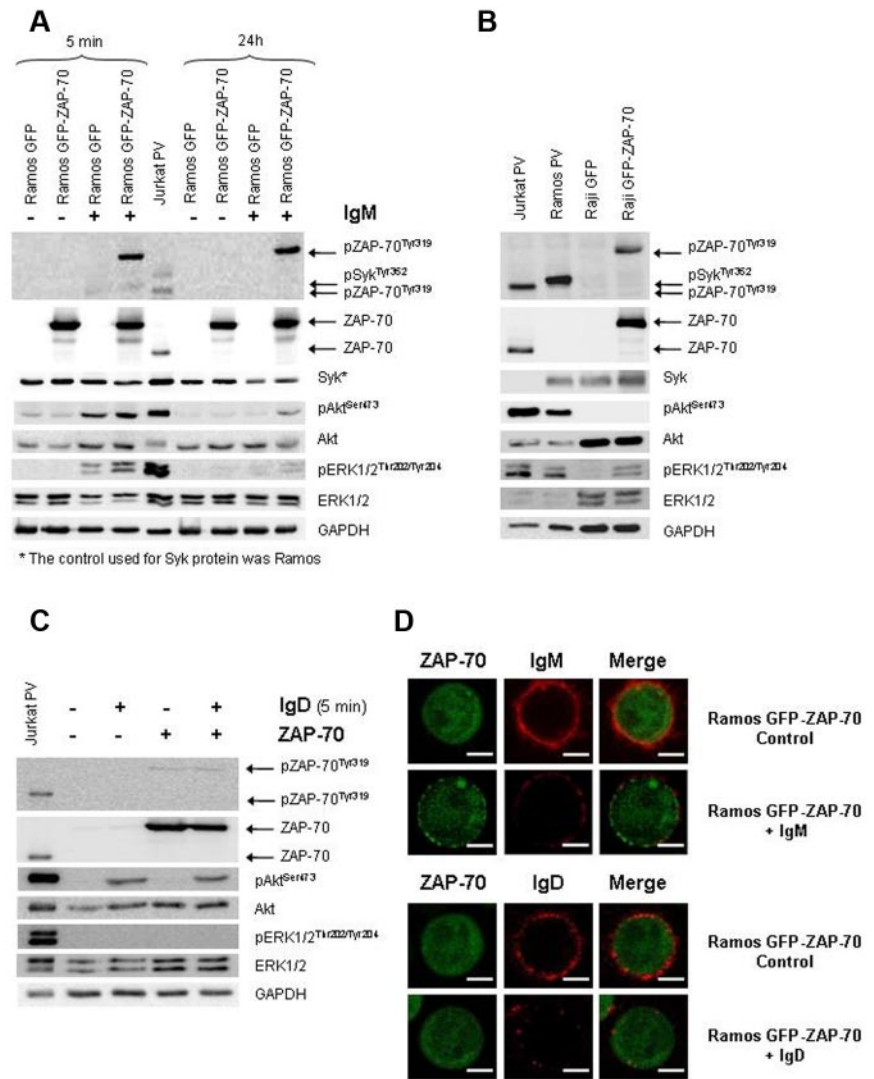
Results

Intensity and duration of Akt and ERK1/2 phosphorylation are enhanced in ZAP-70-expressing B cells after IgM, but not IgD, stimulation

To investigate the phenotypic effects of ZAP-70 expression in B cells, we stably transfected the Burkitt cell lines Ramos and Raji with the pEGFP-N2ZAP-70 vector or the control vector pEGFP-N2. The expression of GFP protein could be detected by flow cytometry in all stable transformants, whereas ZAP-70 expression was only detected in Ramos and Raji stably transfected with the GFP-ZAP-70 expression vector. Proper expression of the 97-kDa fusion protein was verified by Western blot using anti-ZAP-70 antibody in both ZAP-70-transfected B-cell lines (supplemental Figure 1, available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article).

Although most CLL cells coexpress surface IgM and IgD,²² there is much evidence that BCR stimulation can lead to different signaling depending on whether IgM or IgD is stimulated.²³ Remarkably, almost all CLL cases respond to IgD ligation, whereas

Figure 1. ZAP-70 enhances IgM-BCR signaling but does not participate in IgD-BCR signaling. (A) Ramos stable transfectants were stimulated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ F(ab')₂ anti-IgM for 5 minutes and 24 hours. Enhanced Syk, Akt, and ERK1/2 phosphorylation was observed in IgM-BCR stimulated ZAP-70–expressing cells. (B) Immunoblotting analysis of Raji transfectants expressing constitutive phosphorylated ZAP-70 and ERK1/2. Ramos and Jurkat cells treated with pervanadate (PV) were used as positive controls. (C) Ramos stable transfectants were stimulated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ F(ab')₂ anti-IgD for 5 minutes. On IgD stimulation, activation of Akt, but not of ERK1/2 or ZAP-70, was observed. Jurkat cells treated with PV were used as positive control. (D) Confocal microscopy (original magnification $\times 63$). Ramos GFP-ZAP-70 cells were activated with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ F(ab')₂ anti-IgM or IgD for 40 minutes and then stained with anti-IgM-PE or anti-IgD-PE. ZAP-70 was translocated from the cytoplasm to the membrane and remained on surface after IgM activation while IgM internalization was almost complete (top panel). In contrast, while IgD was also internalized, no mobilization of ZAP-70 was observed after IgD stimulation (bottom panel). The scale bar in the image represents 5 μm .



usually only CLL cells expressing unmutated IgHV genes respond to IgM.^{22,24-26} In this regard, the expression of ZAP-70 protein in CLL has been related to an enhanced signaling through the BCR on IgM stimulation.¹³⁻¹⁷ However, the role of ZAP-70 in IgD-BCR signaling has not been investigated. Therefore, we analyzed the effects on BCR signaling of surface IgM and IgD stimulation according to the presence of ZAP-70. First, Ramos cells were stimulated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ F(ab')₂ anti-IgM for 5 minutes and 24 hours, and afterward the phosphorylation of key mediators of BCR signaling was examined by Western blot. In ZAP-70 stable transfectants, we found phosphorylation of ZAP-70 at activating tyrosine Tyr319 along with an increased intensity and duration of the BCR-induced phosphorylation of Syk, Akt, and ERK1/2 kinases (Figure 1A). The selected Raji cell line lacked surface IgM and IgD and constitutively expressed phosphorylated ZAP-70 at Tyr319 after transfection. Remarkably, in this cell line, we observed that ERK1/2 protein, but no Akt protein, was also constitutively phosphorylated (Figure 1B). Altogether, these results confirm the participation of ZAP-70 in the IgM-BCR signaling; they indicate that ZAP-70 is able to activate the MAPK pathway independently of BCR stimulation, and suggest that Akt activation may require BCR stimulation.

To elucidate whether ZAP-70 is also involved in IgD-BCR signaling, Ramos transfectants were stimulated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ goat F(ab')₂ anti-IgD for 5 minutes. In contrast to what we observed after IgM stimulation, IgD did not induce phosphorylation of

ZAP-70 or ERK1/2. However, IgD stimulation induced Akt phosphorylation, which was not enhanced by the presence of ZAP-70 (Figure 1C). Further differences were observed by confocal microscopy after IgM or IgD stimulation of ZAP-70–expressing Ramos cells. After 5 minutes of F(ab')₂ anti-IgM stimulation, we observed mobilization of ZAP-70 from the cytoplasm to the membrane, where it was distributed forming patches (Figure 1D, supplemental Figure 2, supplemental Videos 1-3). Remarkably, 40 minutes later, when the internalization of IgM was almost complete, ZAP-70 still remained associated with the membrane. In contrast, and in accordance with the previous results, BCR stimulation by IgD did not affect the intracellular localization of ZAP-70, thus confirming the lack of ZAP-70 activation on IgD stimulation (Figure 1D). Taken together, these results indicate that the differences between IgD and IgM signaling described in CLL cells could be explained in part by the fact that ZAP-70 has no influence in IgD signaling.

ZAP-70 delays CD79b and IgM internalization after BCR stimulation

The stimulation of the BCR is followed by the activation of several signaling cascades and by a fast internalization of the complex, so that the antigen can be processed and presented to T cells.²⁷

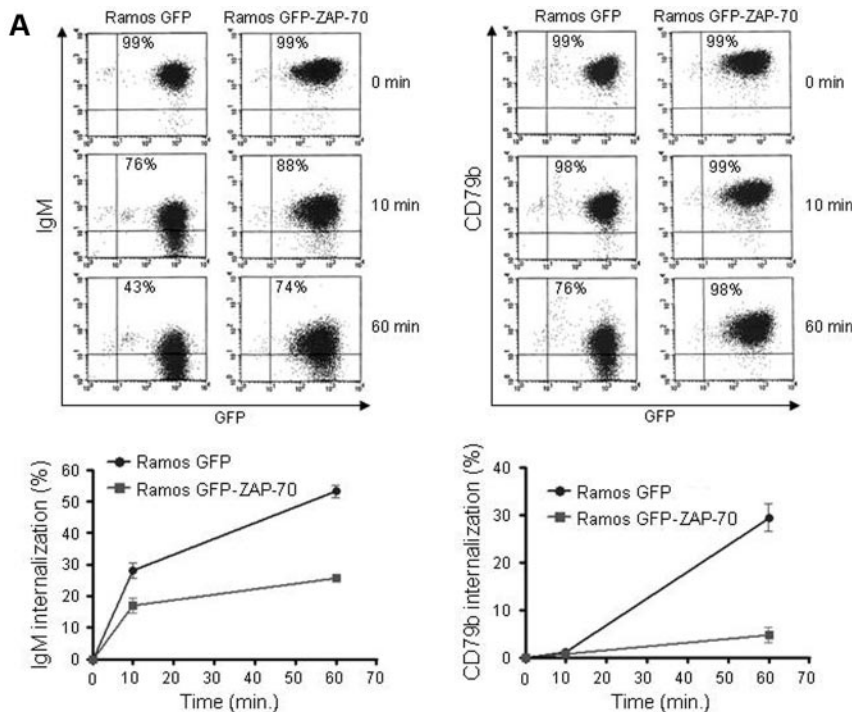
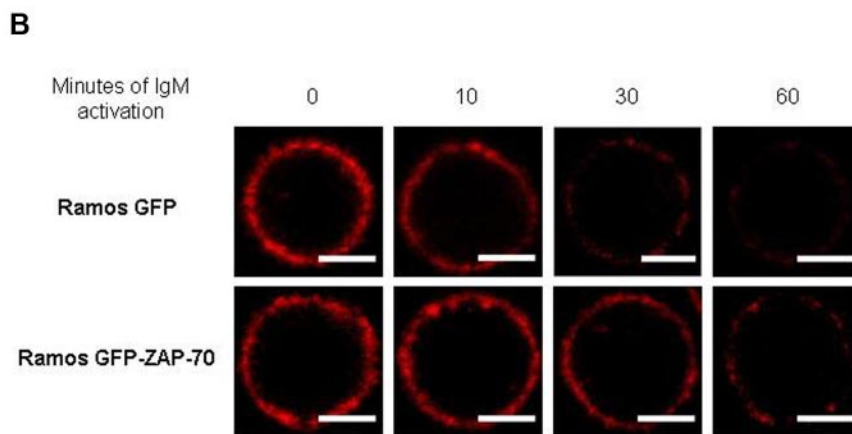


Figure 2. ZAP-70 activation delays IgM and CD79b internalization. (A) Stimulation of Ramos transfectants was performed with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ F(ab')₂ anti-IgM for 10 and 60 minutes at 37°C and stopped at 4°C. Density of IgM and CD79b on surface was analyzed by flow cytometry at the indicated time points with IgM-PE and CD79b-PE antibodies (top panel). The internalization kinetics of IgM differed from that of CD79b. The expression of ZAP-70 delayed the internalization of both IgM and CD79b (bottom panel). (B) Confocal microscopy (original magnification $\times 63$). Ramos transfectants were stimulated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ F(ab')₂ anti-IgM, and sequential images at 0, 10, 30, and 60 minutes after IgM-PE labeling were obtained. Density of surface IgM in Ramos GFP-ZAP-70 cells was higher than in Ramos GFP cells. Scale bar represents 5 μm .



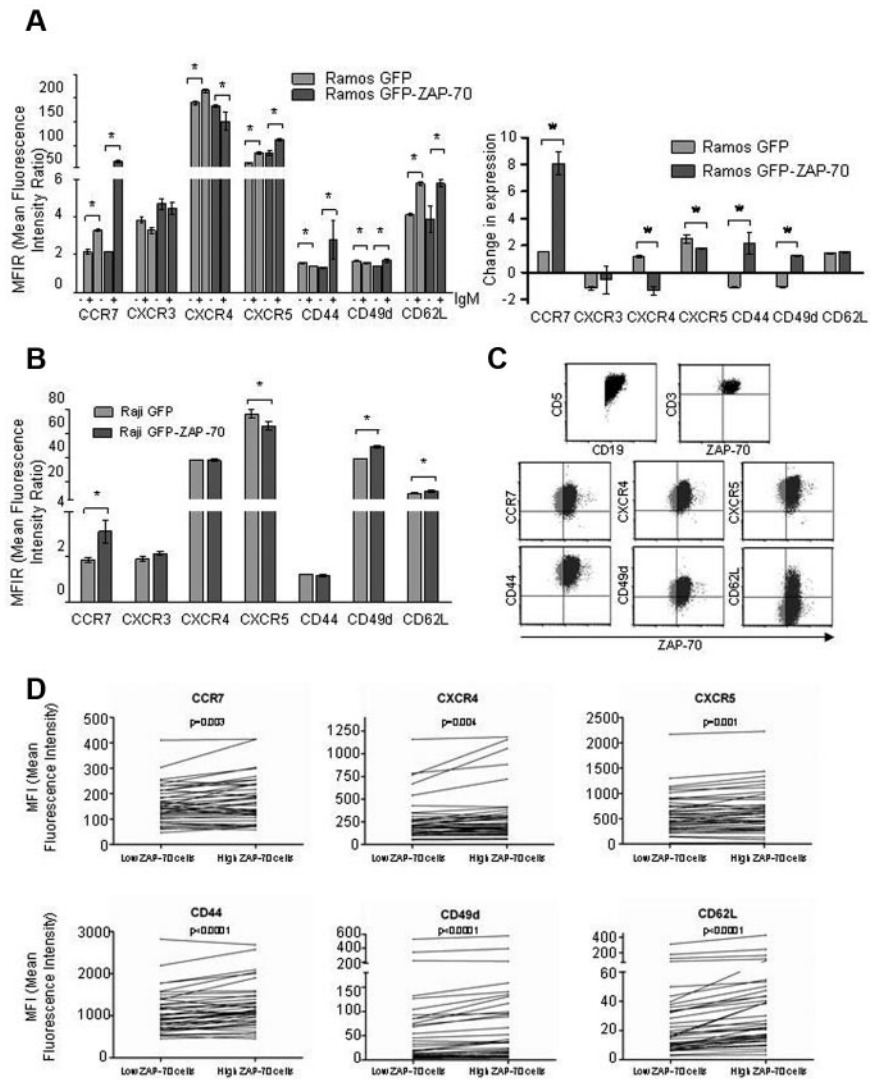
Furthermore, under some conditions of antigen binding, the immunoglobulin is physically uncoupled from the signaling complex formed by CD79a/b molecules,²⁸ being these signaling complexes preferentially retained in the membrane.²⁹ The fact that ZAP-70 binds to CD79a/b phosphorylated immunoreceptor tyrosine activation motifs,¹³ along with our observation that ZAP-70 remained associated with the membrane long after IgM was internalized, prompted us to study the internalization kinetics of surface immunoglobulin and of CD79b on BCR stimulation. For this, we analyzed by flow cytometry the expression of IgM and CD79b on surface at 10 and 60 minutes after BCR stimulation in Ramos stable transfectants. After 60 minutes of BCR stimulation, Ramos GFP internalized $53\% \pm 1.9\%$ of surface IgM and $29.4\% \pm 2.9\%$ of CD79b, whereas in Ramos GFP-ZAP-70 cells the internalization was significantly delayed, with a $25.7\% \pm 0.7\%$ of IgM and $4.7\% \pm 1.5\%$ of CD79b being removed from surface (Figure 2A). These phenomena were further confirmed by confocal microscopy where, after F(ab')₂ anti-IgM stimulation at 10, 30, and 60 minutes, we observed a stronger surface IgM staining in the Ramos GFP-ZAP-70 cells, indicating that the internalization of the

IgM was slower when ZAP-70 was present (Figure 2B). Overall, these results show that after IgM engagement the BCR complex is uncoupled and that the different components are internalized at different rates. In the presence of ZAP-70, the internalization of both IgM and CD79b is significantly delayed.

ZAP-70 signaling induces the expression of CCR7 in B cells through ERK1/2 phosphorylation

Along with enhanced BCR signaling, the expression of ZAP-70 in primary CLL cells has been correlated with an increased response to survival and migratory signals in vitro.¹⁸⁻²¹ Moreover, it has been previously described that patients with CLL with high ZAP-70 expression ($> 20\%$) have an overall increase in expression of CCR7.¹⁸ Despite that, the mechanisms by which ZAP-70 is controlling the migration processes are not well defined. To analyze the influence of ZAP-70 in the expression of chemokine receptors and adhesion molecules, we studied CCR7, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CD44, CD49d, and CD62L surface levels by flow cytometry after ZAP-70 activation by BCR stimulation. The

Figure 3. ZAP-70 enhances CCR7 up-regulation after BCR activation. (A) Expression of CCR7, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CD44, CD49d, and CD62L was assessed by flow cytometry in Ramos transfectants before and after stimulation for 16 hours with 5 μ g/mL F(ab')₂ anti-IgM. Left panel: MFIR (\pm SEM) of expression before and after IgM stimulation. Right panel: Change of expression relative to unstimulated cells in Ramos GFP and Ramos GFP-ZAP-70. **P* < .05. (B) Expression of CCR7, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CD44, CD49d, and CD62L was assessed by flow cytometry in Raji cells with or without ZAP-70 expression. (C) ZAP-70, CCR7, CXCR4, CXCR5, CD44, CD49d, and CD62L expression was assessed by flow cytometry in peripheral blood mononuclear cells obtained from 40 patients with CLL. The expression of ZAP-70 in CD3⁺ gated T cells was used as internal control and allowed for the measurement of expression of chemokine receptors and adhesion molecules in CD19⁺/CD5⁺ gated CLL cells with high (black) or low (gray) ZAP-70 expression. (D) Expression of CCR7, CXCR4, CXCR5, CD44, CD49d, and CD62L was significantly higher in CLL cells with high ZAP-70 expression within the same patient.



stimulation of the BCR in Ramos GFP cells significantly increased the levels of CCR7, CXCR4, CXCR5, and CD62L, whereas we observed a modest down-regulation of CD44 and CD49d and no change of CXCR3 after 16 hours (Figure 3A; supplemental Figure 3). Moreover, BCR stimulation of Ramos GFP-ZAP-70 cells increased the expression of CCR7, CXCR5, CD44, CD49d, and CD62L and decreased the expression of CXCR4, whereas CXCR3 expression remained unmodified (Figure 3A; supplemental Figure 3). Interestingly, BCR stimulation of Ramos GFP cells increased CCR7 expression 1.5-fold (MFIR from 2.13 ± 0.12 to 3.3 ± 0.04 ; *P* = .02), whereas in Ramos GFP-ZAP-70 cells BCR stimulation enhanced the CCR7 expression 8-fold (MFIR from 2.17 ± 0.005 to 17.5 ± 0.9 ; *P* = .028), this molecule being the one with the greatest difference caused by ZAP-70 (Figure 3A right panel). In the Raji cell line, the ectopic expression and activation of ZAP-70 also translated into an increase in CCR7 (MFIR from 1.8 ± 0.09 to 3.1 ± 0.19 ; *P* = .0022), CD49d, and CD62L expression (Figure 3B) and a decrease in CXCR5 expression (MFIR from 76.3 ± 3.36 to 66.3 ± 1.79 ; *P* = .028), whereas its effect on CXCR3, CXCR4, and CD44 expression was not significant. Of note, the stimulation of the BCR through IgD engagement in Ramos cells did not

modulate the levels of CCR7 regardless of ZAP-70 expression, adding more evidence to the differences observed between IgM and IgD signaling (data not shown).

To determine whether Akt or ERK1/2 pathways were involved in the induction of CCR7 expression on BCR stimulation and ZAP-70 activation, Ramos stable cell lines were stimulated with 5 μ g/mL F(ab')₂ anti-IgM after 1 hour of preincubation with either the ERK1/2 inhibitor PD98059 or the Akt inhibitor LY294002 (Figure 4A). As previously observed, BCR stimulation of Ramos GFP-ZAP-70 cells increased the levels of CCR7 expression to MFIR 6.37 ± 0.28 (Figure 4B). Interestingly, after ERK1/2 inhibition by PD98059, the CCR7 up-regulation was significantly impaired, the levels raising only up to MFIR 2.5 ± 0.01 at 100 μ M for Ramos GFP-ZAP-70 (*P* = .002). The inhibition of Akt, although significant, had a biologically negligible effect on the expression of CCR7 (MFIR 5.5 ± 0.17 after LY294002 at 10 μ M; *P* = .026; Figure 4B right panel). The same pattern of inhibition was observed in Ramos GFP cells, even though the increase of CCR7 after IgM stimulation was only to MFIR 1.47 ± 0.08 (Figure 4B left panel). Taken together, these results show that the MAPK pathway has a prominent role in regulating the overexpression of CCR7 induced by IgM-activated ZAP-70.

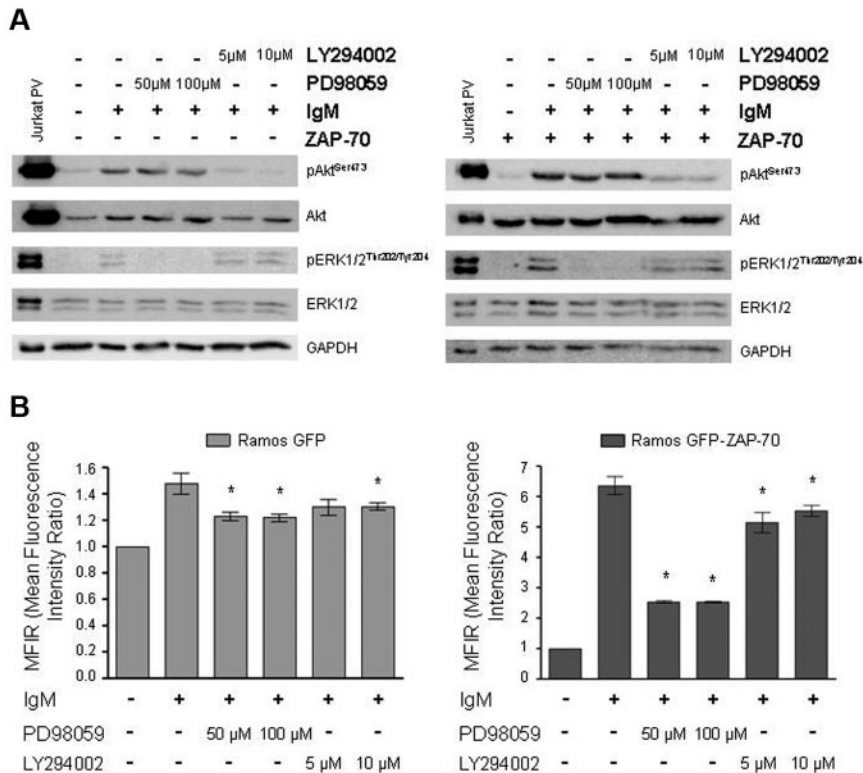


Figure 4. CCR7 up-regulation is dependent on ERK1/2 activation. (A) Ramos GFP (left panel) and Ramos GFP-ZAP-70 (right panel) cells were incubated for 1 hour in the presence of 50 μM or 100 μM PD98059 for ERK1/2 inhibition, and in the presence of 5 μM or 10 μM LY294002 for Akt inhibition before 5 minutes of stimulation with 5 μg/mL F(ab')₂ anti-IgM. Inhibition of phosphorylation of Akt and ERK1/2 was confirmed by immunoblotting. Jurkat cells treated with PV were used as positive control. (B) IgM stimulation was performed for 4 hours after 1 hour of preincubation with Akt and ERK1/2 inhibitors, and the levels of CCR7 were measured by flow cytometry. Inhibition of ERK1/2 phosphorylation with PD98059 significantly reduced the IgM-mediated induction of CCR7 expression, whereas inhibition of Akt had only a minor effect on CCR7 expression. **P* < .05, versus the IgM activated cells. MFI was calculated relative to unstimulated samples.

Differential expression of adhesion molecules and chemokine receptors by ZAP-70-high and ZAP-70-low cells within CLL primary clones

As we observed that ZAP-70 can directly govern the expression of some chemokine receptors and adhesion molecules, we decided to depict the differential expression of these molecules in CLL cells expressing high and low ZAP-70 within the same patient. For this, we compared the expression by flow cytometry of CCR7, CXCR4, CXCR5, CD44, CD49d, and CD62L in ZAP-70-high versus ZAP-70-low CD19⁺/CD5⁺ gated cells from 40 CLL primary cases. The expression of ZAP-70 observed in the CD3⁺ T cells from each sample was used to define the threshold of high versus low ZAP-70, and then the MFI of each corresponding cellular subset was obtained for each molecule (Figure 3C). Interestingly, we found that the expression of all the adhesion molecules and chemokine receptors analyzed was significantly higher in the subset of CLL cells with higher expression of ZAP-70 (Figure 3D).

CCR7 signaling is increased in ZAP-70-expressing B-cell lines

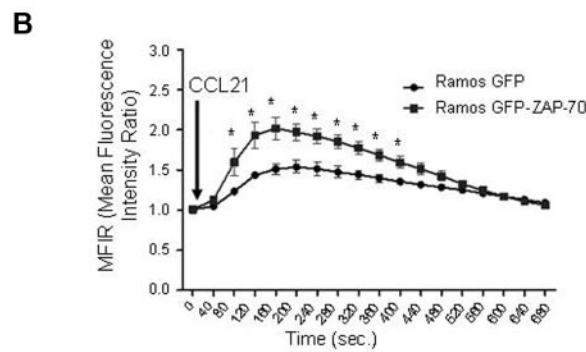
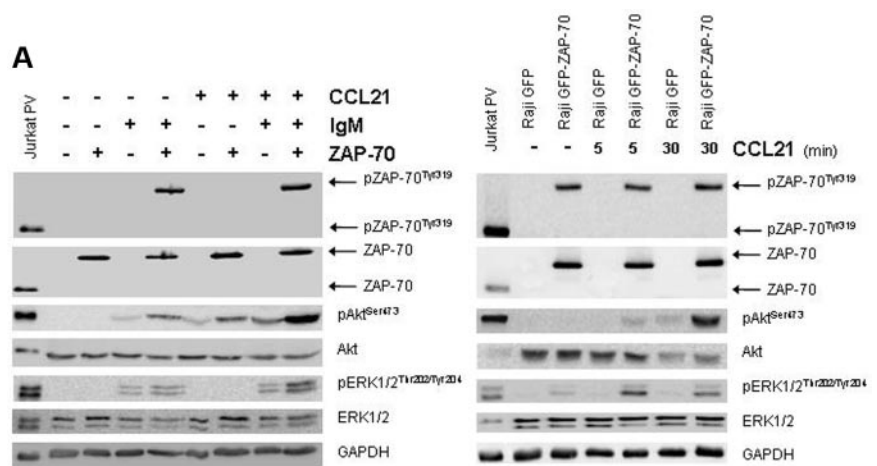
CCR7 ligands (chemokines CCL21 and CCL19) are mainly expressed in high endothelial venules and in the T zones from secondary lymphoid organs.^{30,31} The interaction of CCR7 with its ligands leads to the mobilization of intracellular calcium and activation of the Akt and MAPK pathways.³² To elucidate whether the overexpressed CCR7 in ZAP-70 B cells is functional, we stimulated cells with 1 μg/mL CCL21 for 30 minutes after 4 hours of stimulation with F(ab')₂ anti-IgM (Figure 5A). In Ramos cells with BCR-activated ZAP-70, and therefore increased CCR7 expression, we observed an enhanced phosphorylation of Akt and ERK1/2 on CCL21 stimulation compared with cells with BCR activation only. Moreover, the stimulation of CCR7 after BCR stimulation in Ramos GFP-ZAP-70 cells also induced higher

phosphorylation of Akt and ERK1/2 compared with Ramos GFP cells. Besides, a slight increase in Akt phosphorylation was also observed after CCL21 stimulation in Ramos expressing ZAP-70 before BCR stimulation, this suggesting that ZAP-70 could be directly participating in the CCR7 signaling pathway. Moreover, the increase in intracellular calcium concentration was also higher in B cells with activated ZAP-70 (Figure 5B). This enhanced signaling was also observed in the Raji GFP-ZAP-70 cell line, where phosphorylation of both Akt and ERK1/2 was greatly enhanced after CCR7 stimulation by CCL21 compared with Raji GFP cells (Figure 5A).

Migration toward CCL21 chemokine is increased in B cells expressing activated ZAP-70

CCR7 ligation can mediate migration and survival of tumoral cells from CLL and B-ALL.^{18,33-36} Importantly, the up-regulation of CCR7 alone may not be enough for CCR7-mediated migration; in this regard, it has been shown that, in monocyte-derived dendritic cells and B-ALL, additional stimuli are needed after CCR7 up-regulation for responsiveness to CCL19 or CCL21.^{37,38} Moreover, the levels of chemokine receptors in CLL do not always correlate with the migration toward their ligands.^{20,36,39} We therefore aimed to analyze whether the increased CCR7 expression and signaling observed after ZAP-70 activation did translate into an increased migrative capacity of the B lymphocytes. For this, we performed transmigration assays across bare polycarbonate transwell culture inserts placed on medium with or without CCL21. Before BCR stimulus, we did not find significant differences caused by ZAP-70 expression in the average proportion of transmigrated Ramos cells toward CCL21 chemokine (migration index:

Figure 5. CCR7 signaling is enhanced in B cells expressing activated ZAP-70. (A) Ramos transfectants prestimulated for 4 hours with 5 $\mu\text{g/mL}$ F(ab')₂ anti-IgM were stimulated with 1 $\mu\text{g/mL}$ CCL21 for 30 minutes (left panel). Only in IgM stimulated Ramos ZAP-70 transfectants, CCL21 stimulation increased the phosphorylation of ERK1/2. CCL21 increased Akt phosphorylation with or without the presence of IgM stimulation. Akt phosphorylation was the highest when ZAP-70 was activated. A slight increase in Akt phosphorylation was observed in ZAP-70-expressing cells before IgM stimulation. In Raji transfectants treated with 1 $\mu\text{g/mL}$ CCL21 for 5 and 30 minutes (right panel), the same enhanced signaling was observed. (B) Ramos transfectants prestimulated with 5 $\mu\text{g/mL}$ F(ab')₂ anti-IgM for 4 hours were stimulated with 250 ng/mL CCL21. MFIR was calculated relative to unstimulated samples. Significant increase in calcium mobilization was observed in BCR-stimulated ZAP-70-positive cells. * $P < .05$.



1.09 \pm 0.15 vs 1.09 \pm 0.29; $P = .93$). Moreover, BCR stimulation of Ramos GFP cells, although inducing a significant increase in CCR7 expression (Figure 3A), did not increase the migration toward CCL21 (1.09 \pm 0.15 vs 1.07 \pm 0.12). In contrast, after BCR stimulation, the presence of ZAP-70 increased 2.9 times the migration index (1.07 \pm 0.12 vs

3.15 \pm 0.82; $P = .016$; Figure 6A). In accordance, the migration index of Raji GFP-ZAP-70 cells was 3.2 times higher than the one observed for Raji GFP (1.9 \pm 0.3 vs 6.08 \pm 2.13; $P = .046$; Figure 6B). These results show that, in this cell system, induction of CCR7 expression by ZAP-70 activation is a sufficient condition to increase the B-cell migrative capacity.

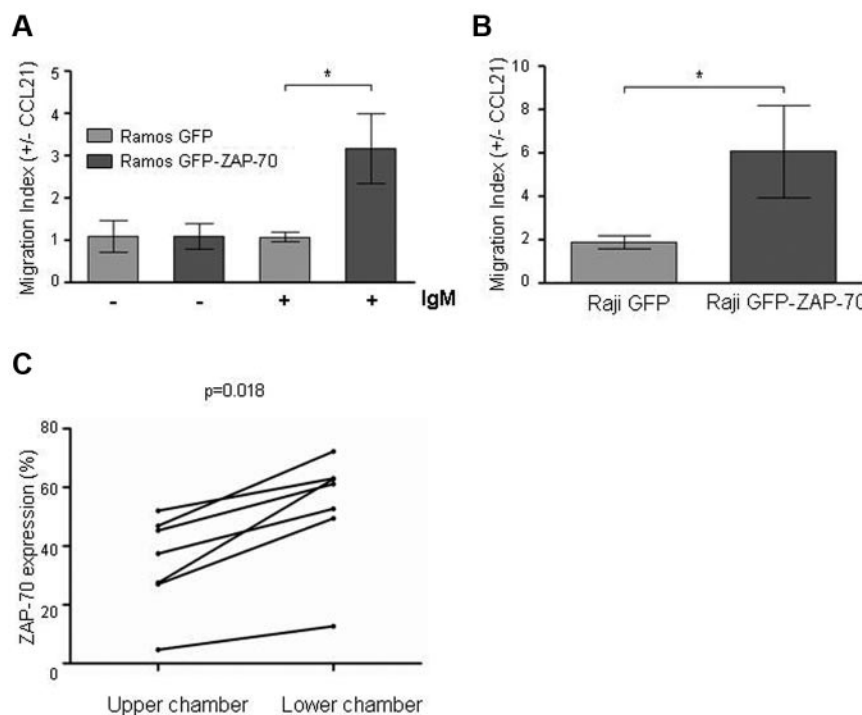


Figure 6. Migration toward CCL21 is enhanced after ZAP-70 activation. (A) Ramos transfectants either stimulated (6 hours, 5 $\mu\text{g/mL}$ F(ab')₂ anti-IgM) or unstimulated, and (B) Raji transfectants were subjected to migration assay toward CCL21 (1 $\mu\text{g/mL}$) for 15 hours at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. The absolute number of transmigrated cells was determined by flow cytometry, acquiring cells under a defined flow rate. Results are expressed as migration index, calculated as the number of cells transmigrating with chemokine divided by the number of transmigrating cells toward media only. ZAP-70-activated cells showed a significantly higher migrative capacity. * $P < .05$. (C) Peripheral blood mononuclear cells from 7 patients with CLL were subjected to migration assay toward CCL21 (1 $\mu\text{g/mL}$) for 6 hours at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. The percentage of CD19⁺/CD5⁺ CLL cells expressing ZAP-70 was determined in the cellular fraction remaining in the upper chamber and in the cellular fraction of transmigrated cells for each patient sample by flow cytometry. CLL cells transmigrating toward CCL21 after 6 hours had a significantly higher percentage of ZAP-70-positive cells ($P = .018$).

Primary CLL cells with high ZAP-70 expression have enhanced migrative capacity toward CCL21 compared with CLL cells with low ZAP-70 expression from the same patient.

Peripheral blood mononuclear cells from patients with CLL and high ZAP-70 expression ($\geq 20\%$) have shown increased migration capacity toward CCL19 and CCL21.¹⁸ In this sense, we found that primary CLL cells with higher expression of ZAP-70 within the same patient had an increased expression of adhesion molecules and chemokine receptors. Therefore, we investigated whether CLL subclones with higher ZAP-70 expression had also increased migratory potential. For this, we performed chemotaxis assays toward CCL21 using peripheral blood mononuclear cells from 7 patients and measured the expression of ZAP-70 of the transmigrated cells. Of note, after 6 hours of migration, we observed that, for all the cases analyzed, the percentage of ZAP-70-positive cells was significantly higher in the cells that had migrated compared with the cells present in the upper chamber, indicating that ZAP-70-positive CLL cells have an enhanced ability to respond to and to migrate toward CCL21 (Figure 6C).

Discussion

The expression of ZAP-70 protein and its correlation with adverse prognosis in some subsets of B lymphocyte-derived malignancies prompted the analysis of its function in a B lymphocyte setting. ZAP-70 and Syk proteins belong to the same protein family and have similar function in T and B lymphocytes, respectively. Therefore, several parallelisms in their role in BCR signaling have been found, with ZAP-70 involved in enhancing the IgM-BCR signaling, thus mimicking the role of Syk.¹³⁻¹⁷ Moreover, in primary CLL cells, other biologic features have been correlated with ZAP-70 expression, such as increased response to migrative and survival stimuli.¹⁸⁻²¹ However, it has not been elucidated whether these features are a reflection of the distinct biologic characteristics of cells expressing ZAP-70 or directly governed by ZAP-70. Therefore, we ascertained the effects on BCR signaling and migration induced by the ectopic expression of ZAP-70.

In our report, we showed that ZAP-70 enhances the signaling through IgM-BCR, increasing and prolonging Akt and ERK1/2 phosphorylation. In contrast, in a B-cell line lacking surface immunoglobulin where ectopic ZAP-70 became constitutively phosphorylated, we found that ERK1/2, but not Akt, was also activated, suggesting that ZAP-70 would downstream signal through the MAPK pathway independently of BCR stimulation. Even though the majority of CLL cases coexpress surface IgM and IgD,²² there is no information on the role of ZAP-70 in IgD BCR signaling. In CLL, BCR signaling mediated by engagement of IgM has been found to be different from that observed after IgD stimulation: whereas only CLL cases with unmutated IgHV genes usually respond to IgM stimulation,^{22,24,25} virtually all cases respond to IgD^{22,24,26}; moreover, the response triggered by IgD or IgM ligation in the same sample can be qualitatively different.²³ ZAP-70 enhances IgM signaling in B cells, as previously described¹³⁻¹⁷ and further confirmed in this report. Intriguingly, however, in our cell system, ZAP-70 did not participate in IgD signaling. On IgD stimulation, ZAP-70 did not become phosphorylated, did not translocate from the cytoplasm to the cellular membrane, and did not enhance Akt phosphorylation. In addition, as opposed to signaling after IgM stimulation, IgD stimulation did

not induce the phosphorylation of ERK1/2 protein. Altogether, these results show that ZAP-70 is not participating in IgD-mediated signaling, this probably being responsible for some of the differences described between IgM and IgD signaling in CLL cells.

In B lymphocytes, ZAP-70 protein binds to the signaling molecules of the BCR, namely, CD79a and CD79b,¹³ and delays BCR internalization after stimulation.¹⁵ Herein, we observed that IgM and CD79b had different internalization kinetics, indicating that in our system BCR components are uncoupled and independently removed from the surface after BCR stimulation. Interestingly, both components of the BCR, particularly CD79b, were retained longer in the membrane of ZAP-70-expressing cells compared with BCR stimulated cells without ZAP-70 expression. These results show that CD79b-bound ZAP-70 is upholding longer the presence of both components of the BCR (CD79b and IgM) in the membrane, thus allowing for a sustained activation of the cells that express ZAP-70.

Several signals from the microenvironment of lymph node and bone marrow, mainly regulated by chemokines, can influence the accumulation and survival of B lymphocytes, including B-ALL and CLL cells.^{33,34,40-43} Of note, in B lymphocytes, the activation of the BCR can lead to a modulation in the expression of different chemokine receptors.^{20,25,44,45} In our B cells without ZAP-70, we found that the stimulation of the BCR caused variable modifications in the surface expression levels of several chemokine receptors and adhesion molecules, including the increase in CCR7 expression. The increase in the expression of CCR7 was regulated by the activation of the MAPK pathway, as it was shown by the impairment of CCR7 up-regulation after ERK1/2 pharmacologic inhibition. This inhibition did not completely abrogate CCR7 up-regulation, indicating that other molecules are also involved in CCR7 regulation. In addition, Raji GFP-ZAP-70 cells, with constitutive ZAP-70 activation, also had a significantly higher level of CCR7 expression. Interestingly, these cells also had phosphorylated ERK1/2 but not phosphorylated Akt, thus supporting again that the MAPK pathway is playing a role in the ZAP-70-dependent up-regulation of the CCR7 receptor. It has been described that CCR7 is variably expressed in B-ALL^{34,38} and overexpressed in CLL, where it has been associated with adverse prognostic characteristics, such as clinical lymphadenopathy and increased ZAP-70 expression.^{18,39,46} However, it has not been depicted whether CLL cells expressing ZAP-70 are those with a high expression of CCR7. In our paper, we found higher CCR7 expression in CLL cells with high ZAP-70 expression within the same patient sample, this indicating that ZAP-70 could be responsible for the increased expression of CCR7 observed in CLL patients with increased ZAP-70 expression as we observed in our cellular system. Moreover, CLL cells with high ZAP-70 had also significantly increased expression of additional adhesion molecules and chemokine receptors that had been found implicated in the interaction of CLL cells with their microenvironment, regarded as having a prominent role in CLL pathogenesis and progression.^{33,34,40-43}

CCR7 ligands, chemokines CCL19 and CCL21, are expressed in secondary lymphoid organs and can increase the migrative capacity and survival of CCR7-positive cells,⁴⁷ including primary cells from patients with B-ALL and CLL.³³⁻³⁶ In this regard, we found that CCR7 signaling after CCL21 ligation was greatly increased in transfected cells with activated ZAP-70, probably because these cells harbor higher levels of CCR7 on surface. However, we cannot exclude a direct participation of ZAP-70

protein in CCR7 signal transduction because we observed enhanced Akt phosphorylation on CCL21 binding without BCR-mediated ZAP-70 activation and, thus, with no up-regulation of the CCR7 levels. Indeed, ZAP-70 and Syk proteins have been implicated in BCR-independent signaling through CXCR4 and CXCR3,⁴⁸⁻⁵⁰ chemokine receptors with a molecular structure similar to that of CCR7.

Although ligation of chemokines to their receptors can induce survival and migration, additional stimuli may be needed to induce cells to migrate, as it has been reported for monocyte-derived dendritic cells and B-ALL cells.^{37,38} In addition, levels of chemokine receptor do not always correlate with migrative capacity toward ligands, as it has been shown for CXCR4 and CCR7 in CLL.^{20,36,39} Remarkably, in our experiments, we did find a significantly higher migration toward CCL21 of B cells expressing activated ZAP-70. Therefore, up-regulated CCR7 expression in ZAP-70-positive cells would induce them to migrate toward a more favorable microenvironment, such as lymph nodes or secondary lymphoid organs, where they would receive additional survival and proliferative signals. Indeed, we did observe a significant enrichment of ZAP-70-positive cells in primary CLL cells migrating toward CCL21 in an in vitro chemotaxis system.

In conclusion, this study described the participation of ZAP-70 in IgM-BCR signaling and the lack of involvement of ZAP-70 in IgD-mediated signaling. Moreover, we showed that ZAP-70 was responsible for an ERK1/2-dependent up-regulation of the chemokine receptor CCR7, this leading to an enhanced signaling and migration on CCR7 ligation with CCL21. ZAP-70 was also involved in the regulation of CXCR4, CXCR5, CD44, CD49d, and CD62L, molecules that had significantly higher levels in CLL primary subclones with high ZAP-70 expression; moreover, the primary CLL subclones with high ZAP-70 expression had enhanced migration capacity toward CCL21. These results are extending the knowledge of ZAP-70 function in B cells and are contributing to explain the adverse clinical outcome of B lymphoproliferative disorders with increased ZAP-70 expression.

References

- Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*. 1992;71(4):649-662.
- Neumeister EN, Zhu Y, Richard S, et al. Binding of ZAP-70 to phosphorylated T-cell receptor zeta and eta enhances its autophosphorylation and generates specific binding sites for SH2 domain-containing proteins. *Mol Cell Biol*. 1995;15(6):3171-3178.
- Nolz JC, Tschumper RC, Pittner BT, et al. ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. *Leukemia*. 2005;19(6):1018-1024.
- Crespo M, Villamor N, Gine E, et al. ZAP-70 expression in normal pro/pre B cells, mature B cells, and in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2006;12(3):726-734.
- Scielzo C, Camporeale A, Geuna M, et al. ZAP-70 is expressed by normal and malignant human B-cell subsets of different maturational stage. *Leukemia*. 2006;20(4):689-695.
- Cutrona G, Colombo M, Matis S, et al. B lymphocytes in humans express ZAP-70 when activated in vivo. *Eur J Immunol*. 2006;36(3):558-569.
- Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(18):1764-1775.
- Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351(9):893-901.
- Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2004;363(9403):105-111.
- Chiaretti S, Guarini A, De Propriis MS, et al. ZAP-70 expression in acute lymphoblastic leukemia: association with the E2A/PBX1 rearrangement and the pre-B stage of differentiation and prognostic implications. *Blood*. 2006;107(1):197-204.
- Admirand JH, Rassidakis GZ, Abruzzo LV, et al. Immunohistochemical detection of ZAP-70 in 341 cases of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Mod Pathol*. 2004;17(8):954-961.
- Carreras J, Villamor N, Colomo L, et al. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. *J Pathol*. 2005;205(4):507-513.
- Chen L, Widhopf G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100(13):4609-4614.
- Chen L, Apgar J, Huynh L, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;105(5):2036-2041.
- Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, et al. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood*. 2007;109(5):2032-2039.
- Chen L, Huynh L, Apgar J, et al. ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;111(5):2685-2692.
- Zum Buschenfelde CM, Wagner M, Lutzny G, et al. Recruitment of PKC-beta1 to lipid rafts mediates apoptosis-resistance in chronic lymphocytic leukemia expressing ZAP-70. *Leukemia*. 2010;24(1):141-152.
- Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, et al. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*. 2006;107(9):3584-3592.
- Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, et al. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood*. 2007;110(12):4012-4021.
- Quiroga MP, Balakrishnan K, Kurtova AV, et al. B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood*. 2009;114(5):1029-1037.
- Messmer D, Fecteau JF, O'Hayre M, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells receive RAF-dependent survival signals in response to CXCL12 that are sensitive to inhibition by sorafenib. *Blood*. 2011;117(3):882-889.

Acknowledgments

The authors thank Dr Vincenzo Di Bartolo (Department of Immunology, Institut Pasteur, Paris, France) who kindly provided SR α puroZAP-70 plasmid; Dr Pablo Engel for discussion of data (Department of Cell Biology, Immunology and Neurosciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain); Neus Abella, Anna Bosch, and Maria Calvo from confocal microscopy facilities (Serveis Científicotècnics, Universitat de Barcelona-IDIBAPS) for technical assistance in the time lapse microscopy experiments; and Isabel Crespo and Cristina López (Unitat de Citòmica-IDIBAPS) for their expert technical assistance in flow cytometry and cell sorting.

This work was supported by Instituto de Salud Carlos III, Fondo de investigaciones Sanitarias (FIS 05/213 and FIS 08/0211), and Fundació Marató de TV3 (05/1810). M.J.B. is a recipient of a PhD fellowship (SFRH/BD/28698/2006) from Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, Portugal.

Authorship

Contribution: E.C. designed the research, performed experiments, analyzed data, designed figures, and wrote the paper; C. Codony designed the research and supervised the study; C. Carpio performed experiments and analyzed data; M.J.B., P.A., and N.P. analyzed data; and F.B. and M.C. designed the research, supervised the study, analyzed data, and revised the manuscript.

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

Correspondence: Francesc Bosch, Department of Hematology, University Hospital Vall d'Hebron, Pg de la Vall d'Hebron 119-129 (08035), Barcelona, Spain; e-mail: fbosch@vhebron.net.

22. Mockridge CI, Potter KN, Wheatley I, et al. Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood*. 2007;109(10):4424-4431.
23. Zupo S, Cutrona G, Mangiola M, Ferrarini M. Role of surface IgM and IgD on survival of the cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99(6):2277-2278.
24. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, et al. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003;101(3):1087-1093.
25. Guarini A, Chiaretti S, Tavoraro S, et al. BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgV H unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood*. 2008;112(3):782-792.
26. Morabito F, Cutrona G, Gentile M, et al. Prognostic relevance of in vitro response to cell stimulation via surface IgD in Binet stage A CLL. *Br J Haematol*. 2010;149(1):160-163.
27. Lanzavecchia A. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 1990;8:773-793.
28. Vilen BJ, Nakamura T, Cambier JC. Antigen-stimulated dissociation of BCR mlg from Ig-alpha/Ig-beta: implications for receptor desensitization. *Immunity*. 1999;10(2):239-248.
29. Kremyanskaya M, Monroe JG. Ig-independent Ig beta expression on the surface of B lymphocytes after B cell receptor aggregation. *J Immunol*. 2005;174(3):1501-1506.
30. Gunn MD, Tangemann K, Tam C, et al. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(1):258-263.
31. Luther SA, Tang HL, Hyman PL, Farr AG, Cyster JG. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the *plt/plt* mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(23):12694-12699.
32. Otero C, Eisele PS, Schaeuble K, Groettrup M, Legler DF. Distinct motifs in the chemokine receptor CCR7 regulate signal transduction, receptor trafficking and chemotaxis. *J Cell Sci*. 2008;121(16):2759-2767.
33. Hu C, Xiong J, Zhang L, et al. PEG10 activation by co-stimulation of CXCR5 and CCR7 essentially contributes to resistance to apoptosis in CD19+CD34+ B cells from patients with B cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia. *Cell Mol Immunol*. 2004;1(4):280-294.
34. Chunsong H, Yuling H, Li W, et al. CXC chemokine ligand 13 and CC chemokine ligand 19 cooperatively render resistance to apoptosis in B cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia CD23+CD5+ B cells. *J Immunol*. 2006;177(10):6713-6722.
35. Ticchioni M, Essafi M, Jeandel PY, et al. Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene*. 2007;26(50):7081-7091.
36. Cuesta-Mateos C, Lopez-Giral S, Alfonso-Perez M, et al. Analysis of migratory and prosurvival pathways induced by the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol*. 2010;38(9):756-764.
37. Scandella E, Men Y, Legler DF, et al. CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood*. 2004;103(5):1595-1601.
38. Corcione A, Arduino N, Ferretti E, et al. Chemokine receptor expression and function in childhood acute lymphoblastic leukemia of B-lineage. *Leuk Res*. 2006;30(4):365-372.
39. Lopez-Giral S, Quintana NE, Cabrero M, et al. Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. *J Leukoc Biol*. 2004;76(2):462-471.
40. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*. 1998;91(7):2387-2396.
41. Burger JA, Tsukada N, Burger M, et al. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 2000;96(8):2655-2663.
42. Pedersen IM, Kitada S, Leoni LM, et al. Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood*. 2002;100(5):1795-1801.
43. Nishio M, Endo T, Tsukada N, 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*. 2005;106(3):1012-1020.
44. Guinamard R, Signoret N, Ishiai M, et al. B cell antigen receptor engagement inhibits stromal cell-derived factor (SDF)-1alpha chemotaxis and promotes protein kinase C (PKC)-induced internalization of CXCR4. *J Exp Med*. 1999;189(9):1461-1466.
45. Vlad A, Deglesne PA, Letestu R, et al. Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer Res*. 2009;69(16):6387-6395.
46. Till KJ, Lin K, Zuzel M, Cawley JC. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood*. 2002;99(8):2977-2984.
47. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*. 1999;99(1):23-33.
48. Ticchioni M, Charvet C, Noraz N, et al. Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood*. 2002;99(9):3111-3118.
49. Dar WA, Knechtle SJ. CXCR3-mediated T-cell chemotaxis involves ZAP-70 and is regulated by signalling through the T-cell receptor. *Immunology*. 2007;120(4):467-485.
50. Buchner M, Baer C, Prinz G, et al. Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(22):4497-4506.

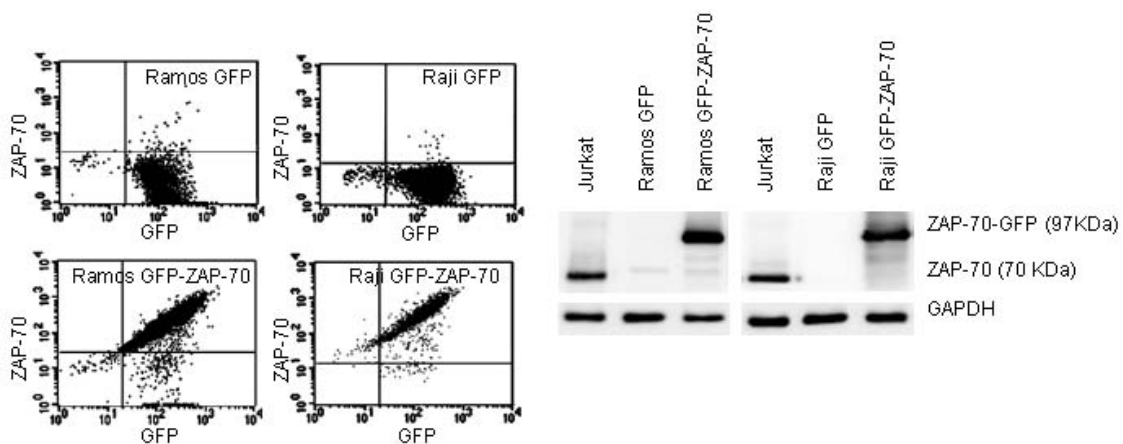
Supplemental Material and methods

Confocal microscopy

Cells were seeded at a density of 1.2×10^6 cells/ml in standard growth media on poly-l-lysine-coated glass coverslips for 30 minutes at 37°C and mounted in an Attoflour chamber (Molecular Probes, Invitrogen). The chamber was placed under a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) and all images were acquired with a 63x glycerol immersion objective lens. Cells were stimulated with 20 $\mu\text{g/ml}$ of F(ab')_2 anti-IgM at 37°C and 5% CO_2 . To stain nucleus and membrane, cells were labeled with 8 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 (Molecular Probes, Invitrogen) specific for double-strand DNA and with 1.6 $\mu\text{g/ml}$ wheat germ agglutinin (Molecular Probes, Invitrogen). For time lapse experiments, stacks of 3 images were taken at 30 seconds intervals for 40 minutes. Image treatment and movie assembly were performed using the Image Processing Leica Confocal and ImageJ Software (Wayne Rasband, Bethesda, MA).

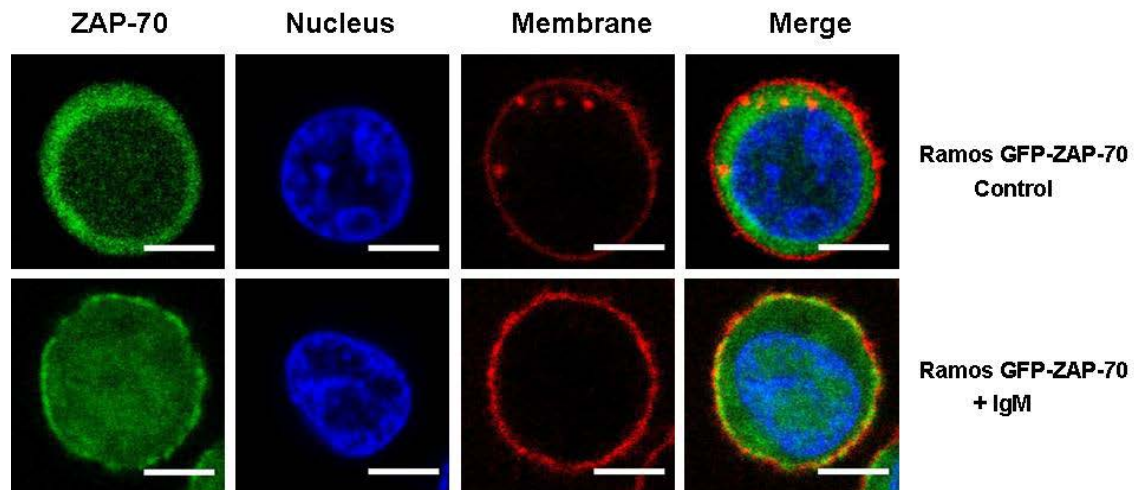
Supplemental Figures

Figure S1. Efficient transfection of Ramos and Raji cell lines with GFP and fusion protein GFP-ZAP-70 expressing vectors.



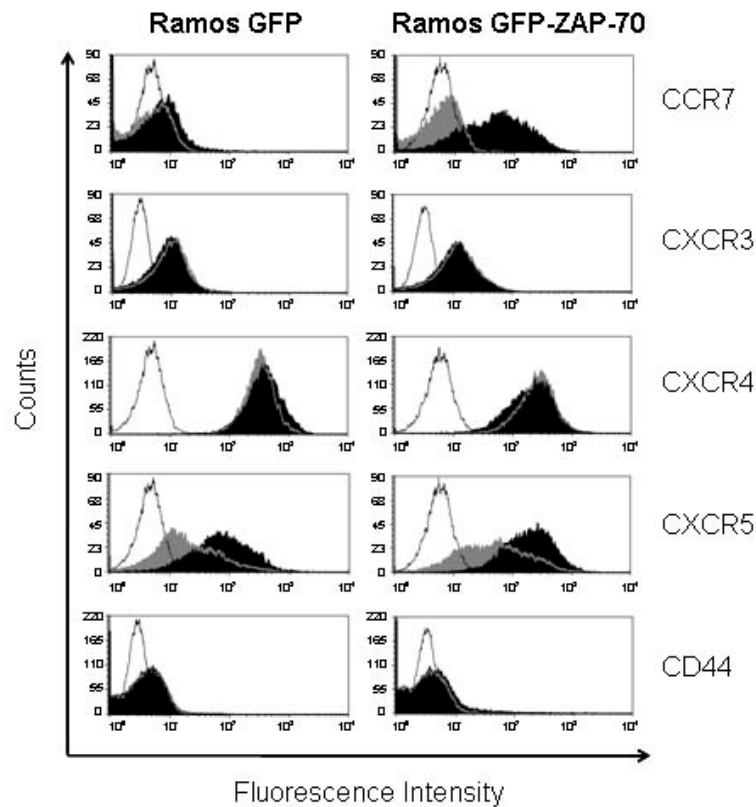
Expression of GFP and fusion protein GFP-ZAP-70 (97 kDa) in Ramos and Raji stable transfectants was confirmed by flow cytometry (left panel) and by immunoblotting with anti-ZAP-70 (right panel).

Figure S2. ZAP-70 locates to the membrane in patches after IgM activation.



Ramos GFP-ZAP-70 cells were seeded at 1.2×10^6 cells/ml in standard growth media on poly-l-lysine-coated glass coverslips and stimulated with 20 $\mu\text{g/ml}$ of F(ab')_2 anti-IgM for 40 minutes at 37°C. To distinguish nucleus from membrane, cells were labeled with 8 $\mu\text{g/ml}$ of blue dye (Hoechst 33342) specific for double-strand DNA and with 1.6 $\mu\text{g/ml}$ red dye (wheat germ agglutinin). After IgM stimulation, ZAP-70 (GFP staining) distributed forming patches in the membrane. The scale bar in the image represents 5 μm . Images were acquired in a Leica TCS SP5 confocal microscope and treated using the Image Processing Leica Confocal and ImageJ Software.

Figure S3. Representative histogram overlays of CCR7, CXCR3, CXCR4, CXCR5 and CD44 staining in Ramos stable transfectants.



Expression of CCR7, CXCR3, CXCR4, CXCR5 and CD44 was assessed by flow cytometry in Ramos transfectants before (grey filled histogram) and after stimulation (black filled histogram) for 16 hours with 5 µg/ml F(ab')₂ anti-IgM. Figure shows histograms from one representative experiment of at least 3 replicates. Control is depicted by an open histogram.

Video 1. Time lapse experiment of ZAP-70 mobilization to the membrane after IgM activation. Ramos GFP-ZAP-70 cells were seeded at 1.2×10^6 cells/ml in standard growth media on poly-l-lysine-coated glass coverslips for 30 minutes at 37°C and stimulated with 20 µg/ml of F(ab')₂ anti-IgM. Stacks of 3 images were collected every 30 seconds from time zero to 40 minutes. After five minutes of IgM stimulation, ZAP-70 was mobilized to the membrane. Images were acquired in a Leica TCS SP5 confocal microscope and treated using the Image Processing Leica Confocal and ImageJ Software.

Video 2. Three-dimensional image of Ramos GFP-ZAP-70 before IgM activation.

Ramos GFP-ZAP-70 cells were seeded at 1.2×10^6 cells/ml in standard growth media on poly-l-lysine-coated glass coverslips for 30 minutes at 37°C. To distinguish nucleus from membrane, cells were labeled with 8 µg/ml of blue dye (Hoechst 33342) specific for double-strand DNA and with 1.6 µg/ml of red dye (wheat germ agglutinin). Prior to IgM stimulation, ZAP-70 remained in the cytoplasm, and the membrane was observed continuously. Images of all cell planes were acquired in a Leica TCS SP5 confocal microscope and 3D reconstruction was performed using the Image Processing Leica Confocal and ImageJ Software.

Video 3. Three-dimensional image of ZAP-70 localization to the membrane in patches after IgM activation.

Ramos GFP-ZAP-70 cells were seeded at 1.2×10^6 cells/ml in standard growth media on poly-l-lysine-coated glass coverslips for 30 minutes at 37°C and stimulated with 20 µg/ml of F(ab')₂ anti-IgM. To distinguish nucleus from membrane, cells were labeled with 8 µg/ml of blue dye (Hoechst 33342) specific for double-strand DNA and with 1.6 µg/ml of red dye (wheat germ agglutinin). After IgM stimulation, ZAP-70 distributed forming patches in the membrane. Images of all cell planes were acquired in a Leica TCS SP5 confocal microscope and 3D reconstruction was performed using the Image Processing Leica Confocal and ImageJ Software.

CAPÍTOL 2

CAPÍTOL 2.

ZAP-70 incrementa la migració dels limfòcits B tumorals al moll de l'os potenciant la senyalització i migració posterior a l'estimulació de CXCR4

L'acumulació dels limfòcits B de la LLC es dona bàsicament a la sang, al moll de l'os i al gangli limfàtic. És en aquests dos últims òrgans on les cèl·lules leucèmiques troben un microambient favorable per a sobreviure i, fins i tot, proliferar.

S'ha descrit prèviament que l'expressió de la proteïna ZAP-70 en la LLC augmenta la senyalització del BCR, i alhora, potencia la resposta a diversos estímuls de supervivència i migració del microambient. L'estimulació del BCR pot desencadenar un efecte en la modulació de l'expressió de receptors de quimioquines i de molècules d'adhesió. El nostre treball previ va poder demostrar que l'expressió de ZAP-70, tenia la capacitat d'influenciar en la modulació d'aquestes molècules i receptors.

La informació bibliogràfica de la que disposàvem prèviament, juntament amb els nostres propis resultats, ens va fer plantejar el repte d'estudiar, *in vivo*, les conseqüències funcionals de l'expressió ectòpica de ZAP-70 en un model xenògraft murí de leucèmia B disseminada.

Per estudiar aquesta infiltració, vàrem inocular a un grup de ratolins immunosuprimits per via intravenosa, la línia cel·lular amb expressió estable de ZAP-70, i a l'altre grup la línia control. La mediana de supervivència d'aquests ratolins va ésser, en tots els casos, de 16 dies, no apreciant diferències pel fet d'expressar ZAP-70. En canvi, l'estudi infiltratiu, sí va poder determinar que l'expressió de ZAP-70 repercutia en la infiltració del moll de

l'os, essent aquesta fins a 23 vegades superior en les cèl·lules amb expressió de la proteïna ZAP-70.

Amb l'observació del patró infiltratiu del moll de l'os vàrem decidir estudiar la quimioquina coneguda que intervé en els processos de migració al moll de l'os, la CXCL12 (o SDF-1 α de l'anglès *Stromal cell-derived factor-1 α*), el receptor de la qual és el CXCR4. Vàrem estudiar *in vitro* la migració de les nostres línies estables a aquesta quimioquina. De forma remarcable vàrem observar que l'expressió de ZAP-70 comportava una major migració a la quimioquina CXCL12, així com a la línia estromal de moll de l'os MS-5, secretora d'aquesta quimioquina.

Els nivells d'expressió de CXCR4 no es varen veure modificats per l'expressió de la proteïna ZAP-70. Per aquest motiu vàrem abordar si el motiu de l'elevada migració provenia d'una major senyalització del receptor CXCR4. Efectivament, l'estimulació de CXCR4, mitjançant CXCL12, implicava una major activació d'Akt i ERK1/2 en la línia amb expressió estable de ZAP-70, donant resposta a l'elevada infiltració del moll de l'os observada *in vivo*. L'estudi *in vitro* amb LLC primàries va confirmar que aquelles cèl·lules amb expressió de ZAP-70 tenien una major capacitat de migració *in vitro* a CXCL12 que les que no l'expressaven.

Per tal de poder confirmar que el tàndem CXCR4/CXCL12 és el responsable de l'elevada migració de les cèl·lules ZAP-70 positives al moll de l'os, vàrem bloquejar el receptor CXCR4 amb un anticòs anti-CXCR4, el que va impedir la migració d'aquestes cèl·lules cap a la quimioquina CXCL12.

Els resultats obtinguts permeten concloure que ZAP-70 potencia la migració dels limfòcits B a microambients més favorables, com és el moll de l'os, mitjançant l'augment en la senyalització i la migració posterior a l'estimulació de CXCR4.

**ZAP-70 promotes the infiltration of malignant B-lymphocytes
into the bone marrow by enhancing signaling and migration
after CXCR4 stimulation**

Eva Calpe, BSc,¹ Noelia Purroy, MD,¹ Cecilia Carpio, MD,¹ Pau Abrisqueta, MD,¹ Júlia Carabia BSc,¹ Carles Palacio, MD,¹ Josep Castellví, MD,² Marta Crespo, PhD^{1*} and Francesc Bosch, MD, PhD^{1*}

¹Laboratory of Experimental Hematology, Department of Hematology, Vall d'Hebron University Hospital. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

²Department of Pathology, Vall d'Hebron University Hospital. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

*M.C. and F.B. contributed equally to this work

Corresponding author: Francesc Bosch, MD, PhD. Department of Hematology, Vall d'Hebron University Hospital, Pg. de la Vall d'Hebron, 119-129 (08035), Barcelona, Spain; E-mail: fbosch@vhebron.net

ABSTRACT

ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia (CLL) is associated with enhanced response to microenvironmental stimuli. We analyzed the functional consequences of ZAP-70 ectopic expression in malignant B-cells in a xenograft mouse model of disseminated B-cell leukemia. Mice injected with B-cells expressing ZAP-70 showed a prominently higher infiltration of the bone marrow. *In vitro* analysis of the response of malignant B-cells to CXCL12, the main attracting chemokine regulating trafficking of lymphocytes to the bone marrow, or to bone marrow stromal cells, revealed that ZAP-70 induces an increased response in terms of signaling and migration. These effects are probably mediated by direct participation of ZAP-70 in CXCL12-CXCR4 signaling since CXCR4 stimulation led to activation of ZAP-70 and downstream signaling pathways, such as MAPK and Akt, whereas ZAP-70 did not alter the expression of the CXCR4 receptor. In addition, subclones of primary CLL cells with high expression of ZAP-70 also showed increased migrative capacity toward CXCL12. Neutralization of CXCR4 with a monoclonal antibody resulted in impaired *in vitro* responses to CXCL12 and bone marrow stromal cells. We conclude that ZAP-70 enhances the migration of malignant B-cells into the supportive microenvironment found in the bone marrow mainly by enhancing signaling and migration after CXCR4 stimulation.

INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells found in the peripheral blood are mainly in the G₀ phase of the cell cycle whereas CLL cells located in lymphoid organs and in the bone marrow find a favorable microenvironment. In these organs CLL cells receive survival, anti-apoptotic and proliferative signals, being the amount of actively proliferating cells directly related to prognosis [1,2]. These stimuli are mainly mediated by cytokine receptors [3,4], the B-cell receptor (BCR) [5] and other surface molecules such as CD40, Toll-like receptors and BAFF-R [6–8].

High expression of ZAP-70 protein is a strong predictor of higher probability of progression and shorter overall survival [9–11]. Despite recent advances, the complete picture of the role of ZAP-70 in the biology of B-cell malignancies is still not fully defined. One of the reasons for this is the confounding effect of many different factors associated with ZAP-70 expression in primary CLL cells. Notwithstanding, there is accumulating data about the role of ZAP-70 in the crosstalk between CLL cells and the microenvironment. Thus, ZAP-70 expression in CLL cells has been related to enhanced signaling through the BCR, and to increased response to diverse migrative and survival stimuli from the microenvironment [12–18]. As previously described for normal B-lymphocytes [19,20], stimulation of the BCR in CLL cells can lead to a modulation of the expression of different chemokine receptors and adhesion molecules [14,21,22], which can be influenced by the presence of ZAP-70 [14].

Against this background, we aimed to ascertain the specific influence of ZAP-70 protein in the infiltrative capacity of malignant B-lymphocytes by using an established xenograft mice model of disseminated B-cell leukemia. In this model, ZAP-70 was the only variable between groups. We found that ectopic expression of ZAP-70 increased the capacity of malignant B-cells to infiltrate the bone marrow via enhancement of the response to CXCR4 stimulation in terms of signaling and migration.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

Animal studies were performed in accordance with the institutional guidelines set by the Vall d'Hebron University Hospital Care and Use Committee (protocol approved under permit number 77/11). All mice were euthanized under anesthesia and experienced no pain or suffering. All patient samples were obtained following a protocol approved by the Clinical Research Ethics Committee (CREC) of the Vall d'Hebron University Hospital according to the principles of the Declaration of Helsinki after written informed consent.

Cell lines and primary cells

The Burkitt's lymphoma B-cell line Raji and the Jurkat T-cell line were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The murine bone marrow stromal cell (BMSC) cell line MS-5 was kindly provided by Dr. Barquinero (Laboratory of Gene and Cell Therapy, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Barcelona, Spain) [23]. Cell lines were cultured in RPMI-1640 or DMEM medium (MS-5) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The GFP-ZAP-70 expression vector (pEGFP-N2ZAP-70) was generated as previously described.[16]. Raji cells were stably transfected with plasmids expressing either GFP-ZAP-70 fusion protein or GFP only as a control as previously described [16]. Briefly, cells were electroporated (150 µF/300 V) and subsequently selected for the presence of the plasmids in standard growth medium containing 1.2 mg/ml of G418 (Invitrogen), and further sorted by GFP expression. Mononuclear cells from peripheral blood from 50 patients with CLL were obtained by Ficoll-Paque Plus (GE healthcare, Buckinghamshire, England) density gradient.

Disseminated B-cell leukemia xenograft model

Seven- to 9-weeks old female C.B-17 SCID mice were purchased from Charles River Laboratories (Barcelona, Spain). To establish the xenograft model, 2×10^6 Raji GFP or Raji GFP-ZAP-70 cells in 200 μ L of Phosphate Buffered Saline (PBS) solution were injected into the tail vein of mice. Mice were examined daily for general condition and hind leg paralysis. Animals were sacrificed when they developed hind leg paralysis, and all efforts were made to minimize suffering.

Immunohistochemistry

Organs from euthanized mice were obtained, and specimens from bone marrow (femur), brain, spleen, lung, liver, kidney, submaxilar lymph node and spinal cord were rinsed with PBS, fixed with 4% formaldehyde and embedded into paraffin blocks. Sections (2-3 μ m thick) were deparaffinized by incubation at 60°C for 1 hour followed by immersion in xylene and rehydrated through graded alcohol washes. The BenchMark[®] XT automated slide processing system (Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ, USA) was used for GFP detection using anti-GFP antibody (Santa Cruz Biotechnology, Shandon, CA, USA) at 1/500 dilution.

Flow cytometry

The expression of cell surface antigens was detected using the following fluorochrome-labeled antibodies: CXCR4-allophycocyanin (APC), CD3-phycoerythrin-cyanine 7 (PE-C7) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD19-PE-Texas Red (ECD) and CD5-PE-cyanine 5.5 (PC5.5) (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). For detection of intracellular ZAP-70 in primary CLL cells, IntraSure kit and primary antibody anti-ZAP-70-PE (Beckman Coulter) were used. GFP expression was analyzed in single cell suspensions from mice organs rinsed with PBS, minced and filtered through a cell strainer. Bone marrow cells were obtained by rinsing the femur cavity with PBS. Peripheral blood was collected from the vena cava of anesthetized mice. Cells were

acquired in a Navios cytometer (Beckman Coulter) and results evaluated using FCS Express Version 4 software (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

Immunoblotting

Stimulation of CXCR4 with 100 ng/mL of CXCL12 (PeproTech, London, England) was performed in Raji cells for the indicated time points. Jurkat cells treated with the phosphatase-inhibitor pervanadate (3mM H₂O₂/1mM NaVO₄) for 5 minutes at 37°C were used as positive controls for phospho-proteins. One million cells were pelleted and then lysed for 30 minutes at 4°C in 100 µL lysis buffer (20mM Tris pH 7.4, 1mM EDTA, 140mM NaCl, 1% NP-40, 2mM sodium vanadate and 1X proteases inhibitor cocktail; Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA). Equal amounts of denatured protein were resolved by 10% SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). Membranes were blocked for 1 hour at room temperature in 5% non-fat milk/TBST (Tris-Buffered Saline Tween-20) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies (phospho-ZAP-70^{Tyr319}/Syk^{Tyr352}, phospho-Akt^{Ser473}, phospho-ERK1/2^{Thr202/Tyr204}, Akt and ERK1/2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), ZAP-70 (clone 2F3.2, Upstate Biotechnology, New York, NY, USA), and β-actin (Abcam, Cambridge, England) as loading control. Immunodetection was done using the ECL chemiluminescence detection system (GE Healthcare) and images were acquired with the LAS-4000 system (Fujifilm Life Science, Carrollton, TX, USA). Quantification of band density was performed using ImageJ software (Wayne Rasband, Bethesda, MA).

Chemotaxis assay

Migration to the chemokine CXCL12 and to the murine BMSC cell line MS-5 was determined in Raji cells by using a transwell migration assay across bare polycarbonate membranes (Corning, New York, NY, USA). A total of 100 µL of RPMI-10% FBS containing 1 x 10⁶ cells was added to the top chamber of a 6.5-mm-diameter

transwell culture insert with a pore size of 5 μm . For migration toward CXCL12, 600 μL of RPMI-10% FBS alone or with 100 ng/mL of CXCL12 were added to the lower chamber. For migration to BMSCs, 1.5×10^5 MS-5 cells seeded and cultured overnight on DMEM-10% FBS or DMEM-10% FBS alone was added to the lower chamber. Chambers were incubated for 4 hours at 37°C in 5% CO_2 and cells in the lower chamber were counted with a Navios cytometer under a defined flow rate for 5 minutes. The migration index was calculated as the number of cells transmigrating with chemokine or stromal cells divided by the number of transmigrating cells with control medium only. Chemotaxis assay of primary CLL cells from 10 patients was performed by adding 1 mL of RPMI-0.5% BSA containing 1.5×10^7 cells to the top chamber of a 24-mm-diameter transwell culture insert. Cells were allowed to migrate toward 2.4 mL of media containing 200 ng/mL CXCL12 for 6 hours, and the percentage of CLL cells expressing ZAP-70 was then determined in both the upper and lower chambers by flow cytometry. For CXCR4 blocking, cells were treated with the monoclonal antibody anti-CXCR4 MAB171 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or the IgG2a isotypic control (BD Biosciences).

Cell proliferation assay

Cell proliferation was measured using the Cell-Titer 96™ Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA), which uses cellular conversion of a tetrazolium salt into a blue formazan product (MTS-assay). A total of 2.5×10^4 Raji cells were seeded per well in a 96-well plate in 100 μL of RPMI-10% FBS alone or with 100 ng/mL of CXCL12. Plates were incubated for 24, 48 and 72 hours and absorbance was measured in a plate reader at 490nm after MTS conversion.

Cell viability

Cell viability was determined by flow cytometry using Annexin V-APC-Propidium Iodide (PI) staining (Bender MedSystems, Vienna, Austria) following the manufacturer's

instructions. Cells were acquired in a Navios cytometer (Beckman Coulter) and results evaluated using FCS Express Version 4 software (De Novo Software).

Statistical analysis

Results are shown as mean \pm standard error of the mean (SEM) of at least 4 replicates or independent experiments. For statistical comparison between groups, the Mann-Whitney test or the non parametric paired-sample test (Wilcoxon) was used, and $P < .05$ was considered significant. Survival curves were generated using the Kaplan and Meier method, and analyzed by the log-rank test. Analyses were performed using the biostatistics software package SPSS Version 17 (IBM, Somers, NY, USA). Results were graphed with GraphPad Prism Version 5.0 (La Jolla, CA, USA).

RESULTS

ZAP-70 expression greatly enhances the capacity of malignant B-cells to infiltrate the bone marrow in a xenograft model

Ectopic expression of ZAP-70 protein in malignant B-cells enhances BCR signaling and increases the expression and signaling of the chemokine receptor CCR7, which translates into an enhanced *in vitro* migration toward the CCL21 chemokine, as we showed in a previous study [16]. To further elucidate the role of ZAP-70 in the interactions between malignant B-cells and the microenvironment, Raji B-cells stably transfected with a vector expressing a GFP-ZAP-70 fusion protein or GFP only as a control, were intravenously injected into SCID mice. This widely described xenograft mouse model of disseminated B-cell leukemia develops hind legs paralysis at around 14 to 19 days after cell injection due to central nervous system infiltration [24,25]. Paralysis precedes death by 1 to 2 days; therefore this event was considered the end point of the study. The expression level of ZAP-70 protein in the cell line was compared to that of a selection of samples from patients with CLL and high expression of ZAP-70

(n=4) in order to discard possible effects due to supra-physiologic levels of ZAP-70 protein. As can be observed in Figure 1A, levels of ZAP-70 were around three fold higher compared to primary CLL cells.

Twelve mice were inoculated with Raji GFP cells and 9 mice with Raji GFP-ZAP-70 cells. Median survival for both groups of mice was 16 days (Figure 1B), indicating that the expression of ZAP-70 does not affect mice survival. In order to assess the influence of ZAP-70 in the infiltrative capacity of B lymphocytes, we analyzed the presence of malignant B-cells in different organs at the time of paralysis by assessing the amount of infiltrating GFP-positive cells by flow cytometry and immunohistochemistry in all animals. Strikingly, a higher infiltration of malignant B-cells was observed in the bone marrow of mice injected with Raji GFP-ZAP-70 cells compared to the bone marrow of mice inoculated with control Raji B-cells, as measured by flow cytometry ($67\% \pm 5.76\%$ vs. $2.9\% \pm 1.49\%$; $P < .001$; Figures 1C and 1D). This was corroborated by immunohistochemical analysis, which further revealed the higher infiltration of GFP-positive cells in the bone marrow from mice injected with Raji GFP-ZAP-70 cells (Figures 2A and 2B).

The percentage of B-cells infiltrating the additional organs analyzed was inferior to the one found in the bone marrow and, for most of the organs analyzed, it was significantly higher in mice injected with Raji GFP-ZAP-70 cells than in mice injected with Raji-GFP cells (Table 1). In agreement, scattered GFP-positive cells in both groups were detected by immunohistochemistry in the additional organs analyzed (Figures 2C and 2D). Of note, however, the analysis of spinal cord samples showed a massive meningeal infiltration in both groups of animals (Figure 2E); this similar pattern of meningeal infiltration by malignant-B lymphocytes regardless of their expression of ZAP-70, probably accounts for the simultaneous onset of the hind legs paralysis and therefore similar survival observed in the two groups. Overall, these results indicate that the expression of ZAP-70 alters the homing of malignant B-cells mainly by inducing a massive infiltration of the bone marrow.

***In vitro* migration toward CXCL12 and to BMSC is increased in B-cells expressing ZAP-70**

The main attracting chemokine regulating trafficking of lymphocytes to the bone marrow is CXCL12, also known as stromal-derived factor-1 α (SDF-1 α) [26,27]. In order to further study the higher bone marrow infiltration found in mice injected with Raji B-cells expressing ZAP-70, we analyzed their expression of CXCR4, the receptor for CXCL12, and their capacity to migrate *in vitro* toward both CXCL12 and the BMSC cell line MS-5. As we had previously observed [16], ZAP-70 ectopic expression did not influence the surface expression of CXCR4 protein (Figure 3A). Subsequently, we analyzed the capacity to migrate toward 100 ng/mL CXCL12 performing transmigration assays across bare polycarbonate membranes. Firstly, in order to rule out a potential chemokinetic effect caused by ZAP-70, we performed a transmigration assay adding CXCL12 on both sides of the membrane. We observed that in the absence of a CXCL12 concentration gradient, there was no difference in the basal rate of transmigration across membranes between the two cell lines (Figure 3B). In contrast, when CXCL12 was present only in the bottom well (Figure 3C) Raji cells expressing ZAP-70 had a migration index 3.5 times higher than Raji cells without ZAP-70 (migration index: 34.6 ± 4.1 vs. 9.9 ± 1.5 ; $P = .0079$). In addition, the migration index toward the BMSC line MS-5 was 2.8 fold higher in Raji GFP-ZAP-70 cells compared to Raji GFP cells (migration index: 27.1 ± 1.6 vs. 9.4 ± 0.7 ; $P = .028$; Figure 3D). These results demonstrate that the expression of ZAP-70 enhances the migration of Raji B-cells toward both CXCL12 and BMSCs, which is in line with the increased infiltration of the bone marrow observed in mice inoculated with Raji GFP-ZAP-70 cells.

Subclones of primary CLL cells expressing ZAP-70 have enhanced migrative capacity toward CXCL12

In order to further study the role of ZAP-70 in B-cell migration toward CXCL12, we analyzed a series of primary cells from patients with CLL. Cells from patients with CLL and high expression of ZAP-70 are reported to have enhanced migration toward CXCL12 upon BCR stimulation [14] and increased signaling and survival upon CXCR4 stimulation compared to cells from patients with low ZAP-70 [12,15]. Despite this, no significant differences in CXCR4 expression have been found between groups of patients with high or low ZAP-70 expression [12,15]. Accordingly, in a larger series comparing CXCR4 expression between patients with high ($\geq 20\%$; n=20) and low (n=20) expression of ZAP-70, we did not find any significant difference as well (Figure 3E). Therefore, we investigated whether the enhanced migrative capacity was related to the differential migration of subclones with higher expression of ZAP-70. For this, chemotaxis assay toward CXCL12 using CLL cells from 10 patients was performed, and the expression of ZAP-70 in the transmigrated CLL cells, defined as CD19+/CD5+/CD3-, was assessed by flow cytometry. In agreement with what we observed in Raji cells, in all cases the percentage of ZAP-70-positive cells was significantly higher in cells that had migrated compared to the unresponsive cells remaining in the upper chamber (Figure 3F). These results indicate that, despite that CXCR4 expression is similar between high and low ZAP-70 expressing CLL cells, ZAP-70-positive CLL cells have an enhanced ability to respond to and to migrate toward CXCL12.

CXCR4 signaling is enhanced in B-cells expressing ZAP-70

We observed that Raji cells and primary CLL cells expressing ZAP-70 protein showed an enhanced migration toward CXCL12, despite having comparable levels of CXCR4 expression, indicating that differences must be because of ZAP-70 influence in downstream signaling after CXCR4 stimulation. In fact, CXCR4 engagement induces enhanced signaling in CLL cells from patients with high ZAP-70 [12,15]. CXCR4 stimulation in malignant B-cells activates different signaling pathways, such as the

MAPK and PI3K-Akt pathways, which, in addition to migration, can lead to cell growth and survival [12,15,28,29]. In order to specifically analyze the involvement of ZAP-70 in CXCR4 signaling, we stimulated Raji GFP and Raji GFP-ZAP-70 cells with 100 ng/mL of CXCL12 and observed an increased phosphorylation of ZAP-70 at activating residue Tyr319 in Raji GFP-ZAP-70, which translated into an enhanced activation of ERK1/2 and Akt proteins compared to Raji GFP (Figure 4A). ERK1/2 protein phosphorylation was increased after 5 minutes of activation, whereas after 30 minutes the level of activation was similar between Raji GFP and Raji GFP-ZAP-70 cells. As for Akt protein, the increased phosphorylation was evident at both 5 and 30 minutes. These results show that ZAP-70 protein can actively participate in the CXCR4 signaling pathway and that it enhances the activation of proteins from the MAPK and PI3K-Akt pathways; this phenomenon may be responsible for the increased response to CXCR4 stimulation in B-cells expressing ZAP-70 in terms of migrative capacity toward the bone marrow observed *in vivo* and toward CXCL12 and BMSCs observed *in vitro*. In addition, the activation status of both MAPK and PI3K pathways after CXCR4 stimulation was compared in Raji and primary CLL cells with high expression of ZAP-70. After stimulation with 100 ng/mL CXCL12 for 2 minutes, similar levels of activation of ERK1/2 and Akt proteins were found (Figure 4B), indicating that it is unlikely that the phenotype observed in Raji cells is due to supra-physiological stimulation of the pathway after ectopic ZAP-70 expression.

Effect of CXCR4 stimulation in the proliferation of Raji transfectants

We observed an increased infiltration of the bone marrow in animals injected with ZAP-70-positive malignant B-cells, which was related to an enhanced capacity to respond to CXCR4 stimulation in terms of migration and signaling. In addition, an increased response in terms of proliferation after exposure to CXCL12 in the bone marrow could also contribute to the observed phenotype. In order to test this hypothesis, we compared the *in vitro* proliferation of Raji GFP and Raji GFP-ZAP-70 cells after 24, 48

and 72 hours of exposition to CXCL12. As depicted in Figure 5, CXCL12 did not affect the proliferation of Raji cells, regardless of ZAP-70 expression indicating that enhanced migration but not proliferation is probably the main contributor to the increased infiltration of the bone marrow observed in mice injected with Raji GFP-ZAP-70 cells.

CXCR4 blockage drastically reduces *in vitro* migration of malignant B-cells toward CXCL12 and to BMSC

To confirm that the increased response to CXCL12 and to BMSCs observed in Raji B-cells expressing ZAP-70 is specifically mediated by CXCR4, we blocked its surface expression with a monoclonal antibody [30]. As depicted in Figures 6A and 6B, a relative reduction of surface expression superior to 95% in both cell lines after treatment with anti-CXCR4 was observed. Moreover, the phosphorylation of Akt and ERK1/2 proteins after stimulation of CXCR4 with CXCL12 was also impaired after treatment with anti-CXCR4 regardless of ZAP-70 expression (Figure 6C). Blocking of CXCR4 caused a severe drop in the number of migrated cells toward CXCL12 (Figure 6D, left panel) in both cell lines Raji GFP and Raji GFP-ZAP-70 (96% and 86% mean reduction, respectively). Similarly, migration toward BMSC MS-5 was also strongly impaired with a mean reduction of 95% for Raji GFP and 98% for Raji GFP-ZAP-70 (Figure 6D, right panel). Importantly, the inhibition of CXCR4 did not affect the survival of the cells (Figure 6E). These results indicate that the CXCL12/CXCR4 axis plays a crucial role in the migration of malignant Raji B-cells toward a bone marrow-like microenvironment.

DISCUSSION

Accumulating evidence demonstrates that the interaction of CLL cells with the microenvironment plays a relevant role in the natural history of the disease by promoting survival, proliferation, and resistance to chemotherapy of the malignant cells [6–8]. Importantly, we and others have reported that ZAP-70 protein, highly expressed

in patients with adverse prognosis, is participating in this crosstalk by enhancing several signals from the microenvironment, such as signaling from the BCR and from diverse chemokines [12–17]. However, the comparison of patients with high vs. low ZAP-70 can mask the actual role of ZAP-70 protein, since many other biological factors can be involved. In addition, the methodology used to define high and low ZAP-70 varies among laboratories. Therefore, with the aim of studying the specific contribution of ZAP-70 protein to the crosstalk between malignant B-cells and the microenvironment, we stably transfected malignant B-cells with ZAP-70 protein and studied the phenotypic effects. Since the establishment of a CLL cell line is still an unsolved issue (reviewed in ref [31]) we used a Burkitt's lymphoma cell line as a model of malignant mature B-lymphocyte, as previously done in several reports [16,32]. Using this model, we previously described the direct role of ZAP-70 protein in enhancing response to the BCR and to CCR7 stimulation [16]. Herein, we studied the role of ZAP-70 in the *in vivo* homing of B-cells in a xenograft model by intravenously inoculating Raji B-cells expressing ZAP-70 into SCID mice. Firstly, we observed that ZAP-70 expression did not influence mice survival since the capacity of Raji cells to infiltrate the central nervous system, which is the main cause of paralysis and death in this mice model, was not altered. By contrast, the capacity of Raji B-cells to infiltrate the bone marrow was greatly enhanced by the expression of ZAP-70. The striking difference prompted us to further study the role of ZAP-70 in the response of malignant B-cells to CXCL12, the main attracting chemokine secreted by stromal cells in the bone marrow [26,27].

As previously described [12,15] in our B-cell system and in primary CLL cells, we observed similar levels of CXCR4 regardless ZAP-70 expression. In spite of that, the capacity of Raji B-cells to migrate toward CXCL12 and to BMSCs *in vitro* was highly enhanced by the expression of ZAP-70. Moreover, despite the similar CXCR4 levels, the analysis of migration toward CXCL12 of primary CLL cells revealed that those CLL cells subclones expressing ZAP-70 were enriched among cells with migrative

capacity, highlighting the role of ZAP-70 in CXCR4-mediated migration also in primary CLL cells. Variable results have been reported about the relationship between ZAP-70 and CXCL12-induced migration in primary CLL samples. In this sense, ZAP-70-positive cells have been also found to be enriched within the fraction of primary CLL cells that migrate towards mesenchymal stromal cells conditioned media [17]; however, CLL cells from patients with high ZAP-70 expression only showed significantly higher migration toward CXCL12 after BCR stimulation [12,14,17]. Since CXCR4 expression seems not to be influenced by ZAP-70, we hypothesized that the differences observed in the migrative capacity both *in vivo* and *in vitro* might be due to increased signaling upon CXCR4 stimulation in cells expressing ZAP-70. In this sense, we observed that, in Raji B-cells, CXCL12 induced a rapid activation of ZAP-70 and, subsequently, downstream signaling elements such as Akt and ERK1/2 proteins showed enhanced activation as well. Although ZAP-70 protein was initially described to specifically participate in T lymphocytes and NK cells signaling [33], it was later found to also participate in the BCR signaling in CLL cells [32,34,35]. In addition, several reports have already shown that ZAP-70 can directly participate in CXCR4 signaling in T lymphocytes [36,37]. Interestingly, other tyrosine kinases participating in the BCR signaling pathway in CLL, such as Syk, BTK, and PI3K have also been implicated in CXCR4 signaling and migration toward CXCL12 in primary CLL cells *in vitro* [38–42]. This is of special interest since the inhibition of BCR-related kinases that also participate in the CXCR4 signaling is showing promising results in preliminary clinical trials in patients with CLL [43–45]. Of note, mobilization of CLL cells into peripheral blood is observed in patients treated with such inhibitors, where an initial lymphocytosis is observed, thus further supporting *in vivo* the involvement of these proteins in the CXCR4 pathway. In our experiments, when we neutralized CXCR4 in Raji B-cells with a monoclonal antibody, *in vitro* migration toward both CXCL12 and the BMSC line was almost completely impaired regardless ZAP-70 expression, highlighting the importance of the CXCL12/CXCR4 axis in driving the migration of B-lymphocytes to the bone marrow.

In summary, this study demonstrates that ZAP-70 protein is responsible for an enhanced cellular migration into the bone marrow caused by an amplified response to CXCR4 stimulation as regards signaling and migration in this cellular model. In patients with CLL, this mechanism would facilitate the access of malignant cells to receive additional survival, anti-apoptotic and proliferative signals that can be found in the supportive microenvironment of the bone marrow. Of note, a correlation between higher bone marrow infiltration and high expression of ZAP-70 has been observed in patients with CLL [46]. Further elucidation of the role and modulation of signals from the microenvironment and especially from CXCR4 can contribute to enlighten the biology behind the adverse clinical outcome of patients with CLL and high expression of ZAP-70, and can potentially be exploited for the development of new treatments.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors would like to thank Teresa Moliné from the Pathology Department in Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, for her technical help.

REFERENCES

1. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, et al. (2005) In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Journal of Clinical Investigation* 115: 755–764.
2. Giné E, Martínez A, Villamor N, López-Guillermo A, Camos M, et al. (2010) Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of

chronic lymphocytic leukemia (“accelerated” chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica* 95: 1526–1533.

3. Ticchioni M, Essafi M, Jeandel PY, Davi F, Cassuto JP, et al. (2007) Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene* 26: 7081–7091.
4. Ghamlouch H, Ouled-Haddou H, Damaj G, Royer B, Gubler B, et al. (2013) A Combination of Cytokines Rescues Highly Purified Leukemic CLL B-Cells from Spontaneous Apoptosis In Vitro. *PLoS ONE* 8: e60370.
5. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, et al. (2003) Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 101: 1087–1093.
6. Caligaris-Cappio F (2003) Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology* 123: 380–388.
7. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F (2009) The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 114: 3367–3375.
8. Ferretti E, Bertolotto M, Deaglio S, Tripodo C, Ribatti D, et al. (2011) A novel role of the CX3CR1/CX3CL1 system in the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and tumor microenvironment. *Leukemia* 25: 1268–1277.
9. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, et al. (2003) ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine* 348: 1764–1775.
10. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, et al. (2004) ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor

of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine* 351: 893–901.

11. Dürig J, Nüchel H, Cremer M, Führer A, Halfmeyer K, et al. (2003) ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 17: 2426–2434.
12. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, Alexander HD, Carey BS, et al. (2006) ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 107: 3584.
13. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Bergui L, D'Arena G, et al. (2007) CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* 110: 4012–4021.
14. Quiroga MP, Balakrishnan K, Kurtova AV, Sivina M, Keating MJ, et al. (2009) B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood* 114: 1029–1037.
15. Messmer D, Fecteau JF, O'Hayre M, Bharati IS, Handel TM, et al. (2011) Chronic lymphocytic leukemia cells receive RAF-dependent survival signals in response to CXCL12 that are sensitive to inhibition by sorafenib. *Blood* 117: 882–889.
16. Calpe E, Codony C, Baptista MJ, Abrisqueta P, Carpio C, et al. (2011) ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood* 118: 4401–4410.
17. Stamatopoulos B, Haibe-Kains B, Equeter C, Meuleman N, Sorée A, et al. (2009) Gene expression profiling reveals differences in microenvironment interaction

between patients with chronic lymphocytic leukemia expressing high versus low ZAP70 mRNA. *Haematologica* 94: 790–799.

18. Zum Büschenfelde CM, Wagner M, Lutzny G, Oelsner M, Feuerstacke Y, et al. (2009) Recruitment of PKC- β II to lipid rafts mediates apoptosis-resistance in chronic lymphocytic leukemia expressing ZAP-70. *Leukemia* 24: 141–152.
19. Guinamard R, Signoret N, Ishiai M, Marsh M, Kurosaki T, et al. (1999) B cell antigen receptor engagement inhibits stromal cell-derived factor (SDF)-1 α chemotaxis and promotes protein kinase C (PKC)-induced internalization of CXCR4. *The Journal of experimental medicine* 189: 1461.
20. Casamayor-Pallejà M, Mondière P, Verschelde C, Bella C, Defrance T (2002) BCR ligation reprograms B cells for migration to the T zone and B-cell follicle sequentially. *Blood* 99: 1913–1921.
21. Guarini A, Chiaretti S, Tavolaro S, Maggio R, Peragine N, et al. (2008) BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgVH unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood* 112: 782–792.
22. Vlad A, Deglesne PA, Letestu R, Saint-Georges S, Chevallier N, et al. (2009) Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer research* 69: 6387.
23. Itoh K, Tezuka H, Sakoda H, Konno M, Nagata K, et al. (1989) Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. *Exp Hematol* 17: 145-53

24. Zhao X, Lapalombella R, Joshi T, Cheney C, Gowda A, et al. (2007) Targeting CD37-positive lymphoid malignancies with a novel engineered small modular immunopharmaceutical. *Blood* 110: 2569–2577.
25. Chang CH, Sapra P, Vanama SS, Hansen HJ, Horak ID, et al. (2005) Effective therapy of human lymphoma xenografts with a novel recombinant ribonuclease/anti-CD74 humanized IgG4 antibody immunotoxin. *Blood* 106: 4308–4314.
26. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA (1996) A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *The Journal of experimental medicine* 184: 1101–1109.
27. Vaisitti T, Aydin S, Rossi D, Cottino F, Bergui L, et al. (2010) CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 24: 958–969.
28. Burger M, Hartmann T, Krome M, Rawluk J, Tamamura H, et al. (2005) 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* 106: 1824–1830.
29. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, et al. (2005) Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 α . *Blood* 106: 1012–1020.
30. Bertolini F, Dell’Agnola C, Mancuso P, Rabascio C, Burlini A, et al. (2002) CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin’s lymphoma. *Cancer Research* 62: 3106–3112.

31. Bertilaccio MTS, Scielzo C, Simonetti G, Hacken ET, Apollonio B, et al. (2012) Xenograft models of chronic lymphocytic leukemia: problems, pitfalls and future directions. *Leukemia* 27: 534–540.
32. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Sica S, Leone G, et al. (2007) ZAP-70 enhances B-cell–receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood* 109: 2032–2039.
33. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A (1992) ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71: 649–662.
34. Chen L, Apgar J, Huynh L, Dicker F, Giago-McGahan T, et al. (2005) ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 105: 2036–2041.
35. Chen L, Huynh L, Apgar J, Tang L, Rassenti L, et al. (2008) ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111: 2685–2692.
36. Ticchioni M, Charvet C, Noraz N, Lamy L, Steinberg M, et al. (2002) Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood* 99: 3111–3118.
37. Kremer KN, Humphreys TD, Kumar A, Qian NX, Hedin KE (2003) Distinct role of ZAP-70 and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa in the prolonged activation of extracellular signal-regulated protein kinase by the stromal cell-derived factor-1 α /CXCL12 chemokine. *The Journal of Immunology* 171: 360.
38. Niedermeier M, Hennessy BT, Knight ZA, Henneberg M, Hu J, et al. (2009) Isoform-selective phosphoinositide 3'-kinase inhibitors inhibit CXCR4 signaling

- and overcome stromal cell-mediated drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: a novel therapeutic approach. *Blood* 113: 5549–5557.
39. Buchner M, Baer C, Prinz G, Dierks C, Burger M, et al. (2010) Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine-and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 115: 4497–4506.
 40. Ponader S, Chen SS, Buggy JJ, Balakrishnan K, Gandhi V, et al. (2012) The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood* 119: 1182–1189.
 41. De Rooij MFM, Kuil A, Geest CR, Eldering E, Chang BY, et al. (2012) The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor-and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119: 2590-4.
 42. Hoellenriegel J, Coffey GP, Sinha U, Pandey A, Sivina M, et al. (2012) Selective, novel spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitors suppress chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and migration. *Leukemia* 26: 1576–1583.
 43. Byrd JC, Furman RR, Coutre S, Flinn IW, Burger JA, et al. (2012) The Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor Ibrutinib (PCI-32765) Promotes High Response Rate, Durable Remissions, and Is Tolerable in Treatment Naive (TN) and Relapsed or Refractory (RR) Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) or Small Lymphocytic Lymphoma (SLL) Patients Including Patients with High-Risk (HR) Disease: New and Updated Results of 116 Patients in a Phase Ib/II Study. *ASH Annual Meeting Abstracts* 120: 189.
 44. Furman RR, Byrd JC, Brown JR, Coutre SE, Benson DM, et al. (2010) CAL-101, An Isoform-Selective Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase P110 δ , Demonstrates Clinical Activity and Pharmacodynamic Effects In Patients with

Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. ASH Annual Meeting Abstracts 116: 55.

45. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, Johnston PB, Vose JM, et al. (2010) Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 115: 2578–2585.
46. Muntañola A, Bosch F, Arguis P, Arellano-Rodrigo E, Ayuso C, et al. (2007) Abdominal Computed Tomography Predicts Progression in Patients With Rai Stage 0 Chronic Lymphocytic Leukemia. *JCO* 25: 1576–1580.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. ZAP-70 ectopic expression enhances the capacity of malignant B-cells to infiltrate the bone marrow. SCID mice were intravenously injected with 2×10^6 stably transfected Raji cells (12 mice with control Raji GFP cells and 9 mice with Raji GFP-ZAP-70 cells). (A) ZAP-70 expression levels were compared by western blotting in Raji transfectants and primary CLL samples. (B) Survival curves according to Kaplan and Meier method. (C) Percentage of GFP-positive cells as assessed by flow cytometry in the bone marrow from mice injected with Raji GFP-ZAP-70 cells (n=9) and Raji GFP cells (n=12). Graph shows the mean percentage \pm SEM (D) Flow cytometry dot plot showing percentage of GFP-positive cells in the bone marrow from two representative mice.

Figure 2. GFP expression in bone marrow, kidney, lung and brain from mice injected with Raji B-cells. GFP expression (*brown*) was analyzed by immunohistochemistry in fixed specimens of bone marrow Raji GFP (A), bone marrow Raji GFP-ZAP-70 (B), kidney (C), lung (D) (x20) and brain (E) (x4.2) from mice injected

with Raji B-cells. Images from bone marrow show a representative mouse from each group and representative specimens from mice injected with Raji-GFP-ZAP-70 cells are shown in the other images. Slides were counterstained with hematoxylin.

Figure 3. ZAP-70-positive cells have increased migrative capacity toward CXCL12 and the BMSC cell line MS-5. (A) Mean fluorescence intensity ratio (MFIR) of CXCR4 surface staining in Raji GFP and Raji GFP-ZAP-70. (B) Raji transfectants were subjected to migration assay for 4 hours at 37°C in 5% CO₂ with medium containing CXCL12 (100ng/mL) in the upper and lower chamber. Migrated cells were counted with a Navios cytometer under a defined flow rate for 5 minutes. (C).Raji transfectants were subjected to migration assay toward CXCL12 (100 ng/mL) or the stromal cell line MS-5 (D) for 4 hours at 37°C in 5% CO₂ and cells in the lower chamber were counted with a Navios cytometer under a defined flow rate for 5 minutes. * $P < .05$ (Mann-Whitney test). Results are shown as the mean \pm SEM of at least 4 independent experiments. (E) MFIR of CXCR4 surface staining in 20 patients with low ZAP-70 expression and 20 patients with high ZAP-70 expression. Results in the graph show mean \pm SEM. (F) Peripheral blood mononuclear cells from 10 patients with CLL were subjected to migration assays toward CXCL12 (100 ng/mL) for 6 hours at 37°C in 5% CO₂. The percentage of CD19+/CD5+/CD3- CLL cells expressing ZAP-70 was determined in the cellular fraction remaining in the upper chamber and in the cellular fraction of transmigrated cells for each patient by flow cytometry. Wilcoxon test was used, and $P < .05$ was considered significant.

Figure 4. CXCR4 signaling is enhanced in B-cells expressing ZAP-70. (A) Raji transfectants were stimulated with 100 ng/mL of CXCL12 for 5 or 30 minutes and protein phosphorylation was analyzed by western blotting. Enhanced phosphorylation of ZAP-70, Akt and ERK1/2 was observed in the Raji GFP-ZAP-70 cells stimulated with CXCL12. The figure shows a representative example of 3 independent experiments.

(B) Raji transfectants and primary CLL cells were stimulated with 100 ng/mL of CXCL12 for 2 minutes and protein phosphorylation was analyzed by western blotting. Similar activation of Akt and ERK1/2 proteins was observed between Raji and primary CLL cells. Jurkat cells treated with pervanadate (PV) were used as positive controls. Note that ZAP-70-GFP fusion protein expressed by Raji GFP-ZAP-70 cells is 97 KDa..

Figure 5. CXCL12 does not affect proliferation of Raji cells. Proliferation of Raji cells exposed to chemokine CXCL12 after 24, 48 and 72 hours was measured by MTS-assay. The mean optical density (OD) values at 490nm \pm SEM from 5 replicates are depicted in the graph.

Figure 6. Anti-CXCR4 antibody reduces CXCR4 surface expression, and blocks migration toward CXCL12 and BMSCs. (A) Relative MFIR of CXCR4 surface staining after incubation of Raji transfectants with 100 μ g/mL of anti-CXCR4 antibody for 30 minutes. (B) Flow cytometry histograms showing the reduction in CXCR4 expression after incubation with neutralizing anti-CXCR4 antibody. White histograms represent negative unstained controls. (C) CXCR4-blocked cells were stimulated with 100 ng/mL of CXCL12 for 5 minutes and activation of Akt and ERK1/2 proteins analyzed by western blotting. (D) CXCR4-blocked cells were subjected to migration assay for 4 hours at 37°C in 5% CO₂ toward 100 ng/mL of CXCL12 (left panel) or the stromal MS-5 cell line (right panel). Cells in the lower chamber were counted by flow cytometry under a defined flow rate for 5 minutes. Number of migrated cells treated with isotypic control was considered 100%. Results are shown as the mean \pm SEM of 4 independent experiments. (E) Cell viability was measured by Annexin V-PI staining in cells incubated with 100 μ g/mL of anti-CXCR4 or isotypic control for 48 hours. Results are shown as the mean \pm SEM of 4 independent experiments

TABLES

Table 1. Percentage of GFP-positive cells in the organs from mice injected with Raji GFP or Raji GFP-ZAP-70 cells as assessed by flow cytometry.

	Raji GFP (%)	Raji GFP-ZAP-70 (%)	Fold change	<i>P</i>
Bone marrow	2.91 ± 1.49	67.07 ± 5.7	23.1	<0.001
Brain	0.03 ± 0.017	0.19 ± 0.05	5.4	0.006
Spleen	0.02 ± 0.003	0.09 ± 0.017	5.2	<0.001
Lung	0.10 ± 0.046	0.24 ± 0.079	2.37	0.007
Liver	0.02 ± 0.006	0.05 ± 0.012	1.9	0.028
Kidney	0.01 ± 0.018	0.06 ± 0.03	4.17	0.095
Submaxilar LN	0.02 ± 0.045	0.05 ± 0.02	3.29	0.069
Blood	0.58 ± 0.26	1.03 ± 0.46	1.15	0.095

Results are shown as mean ± SEM. LN: lymph node.

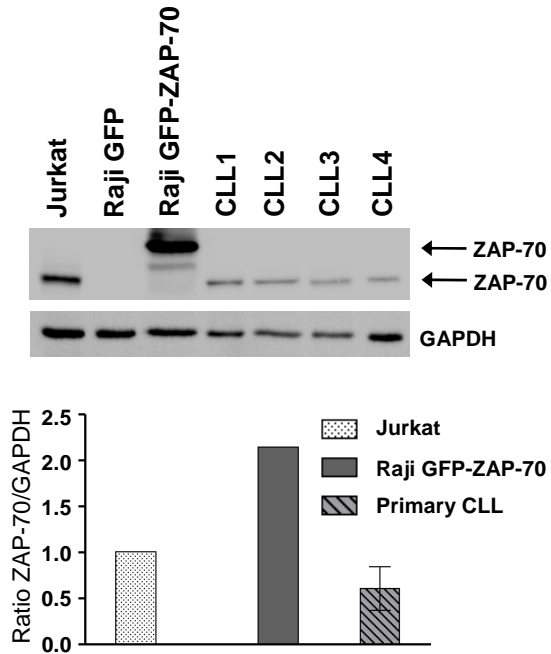
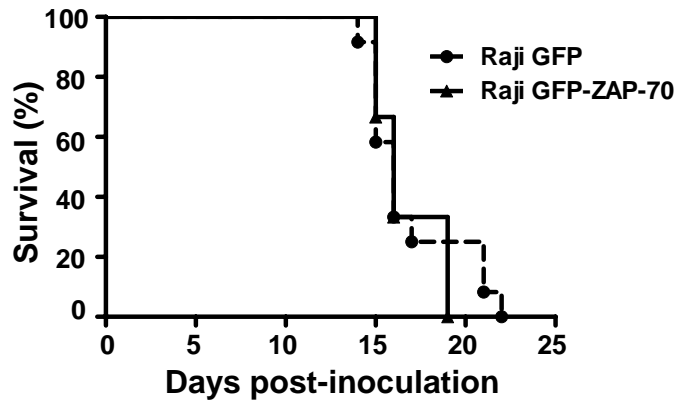
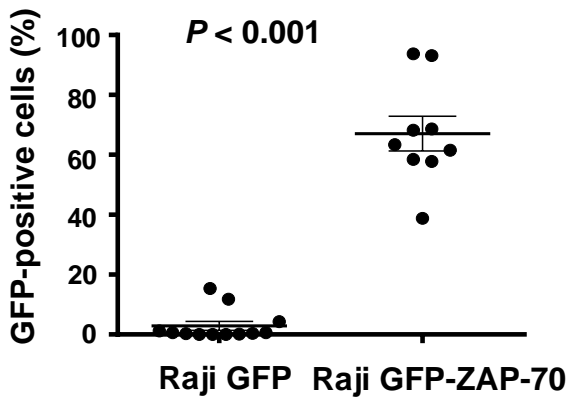
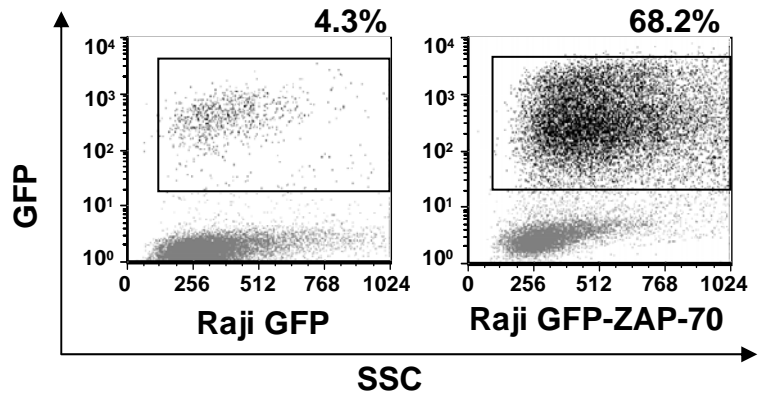
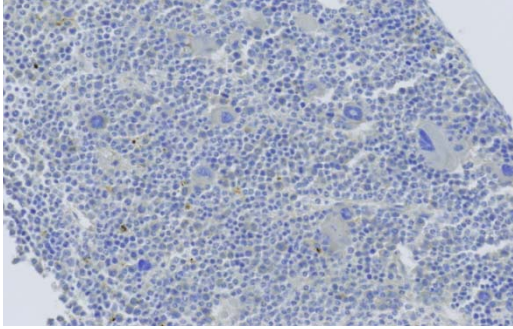
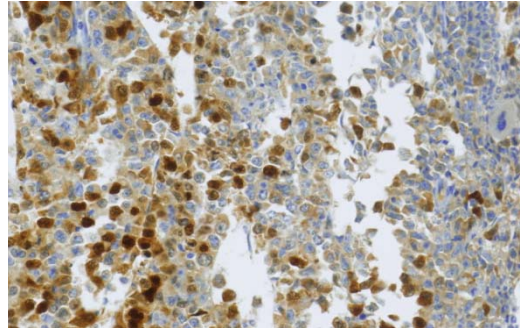
A**B****C****D**

Figure 1

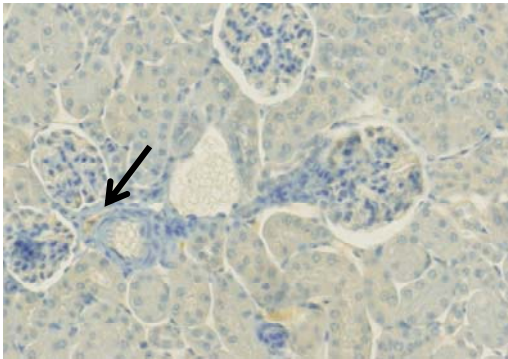
A



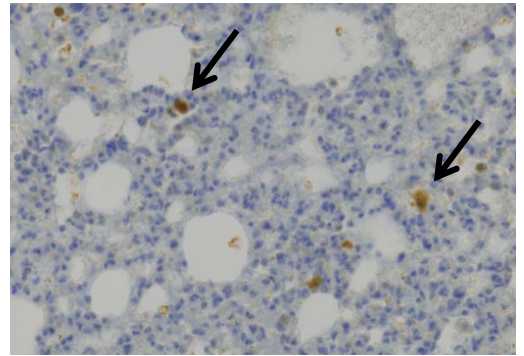
B



C



D



E

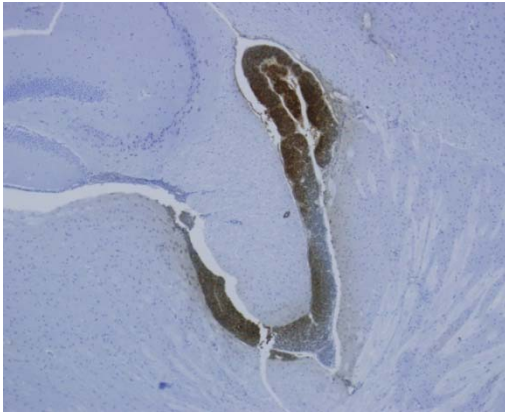


Figure 2

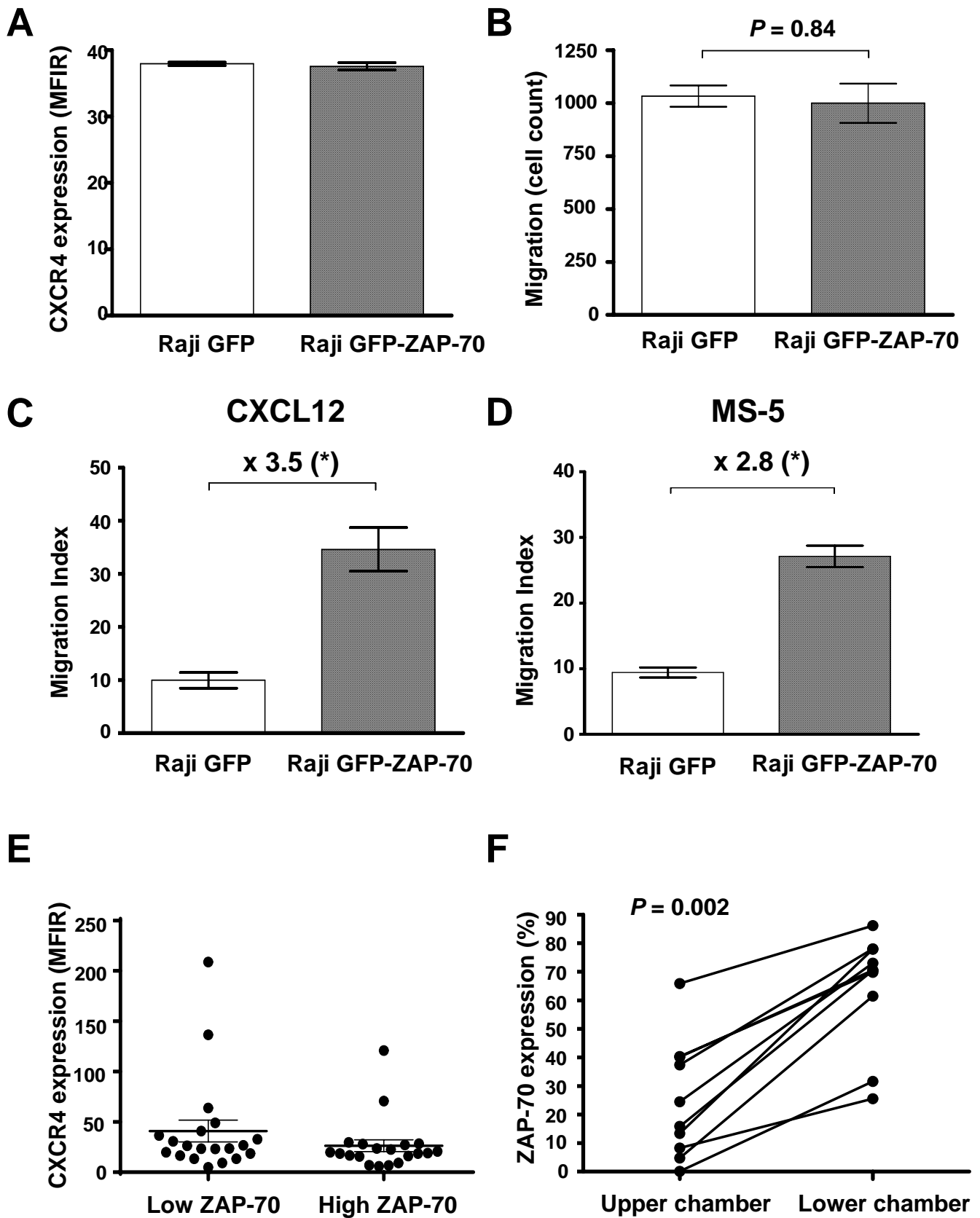


Figure 3

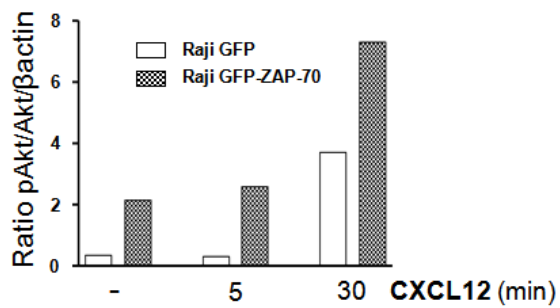
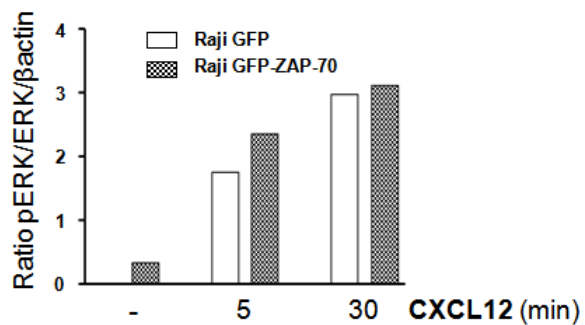
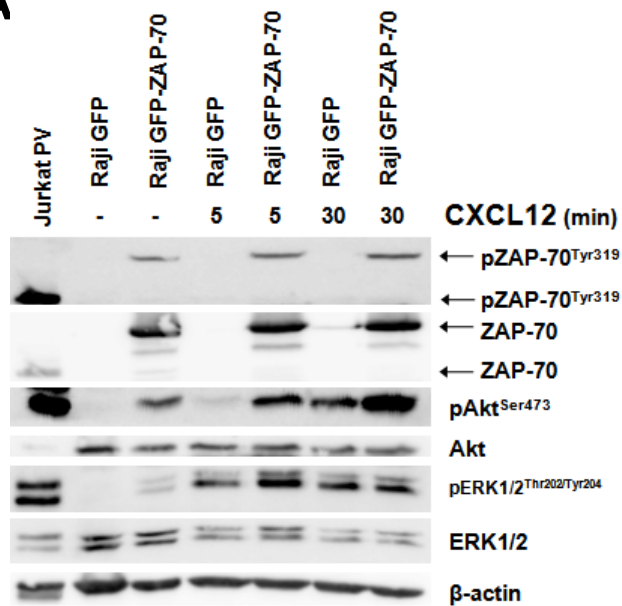
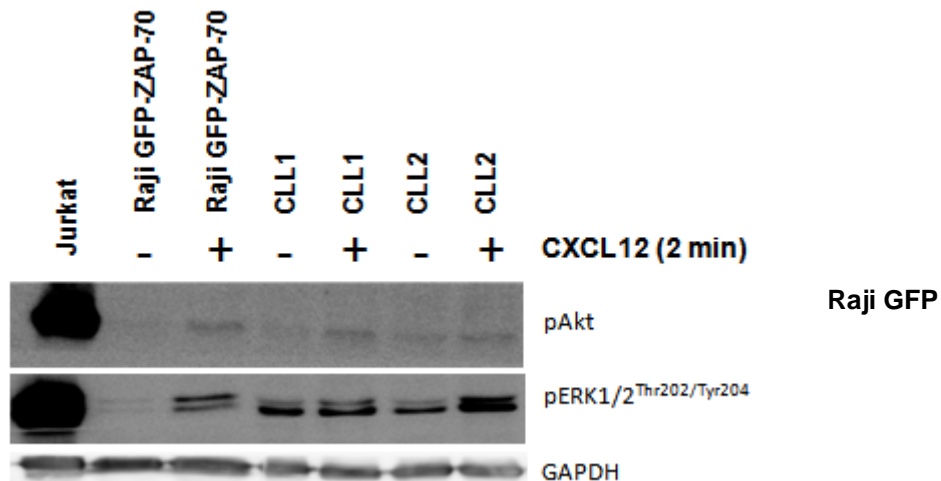
A**B**

Figure 4

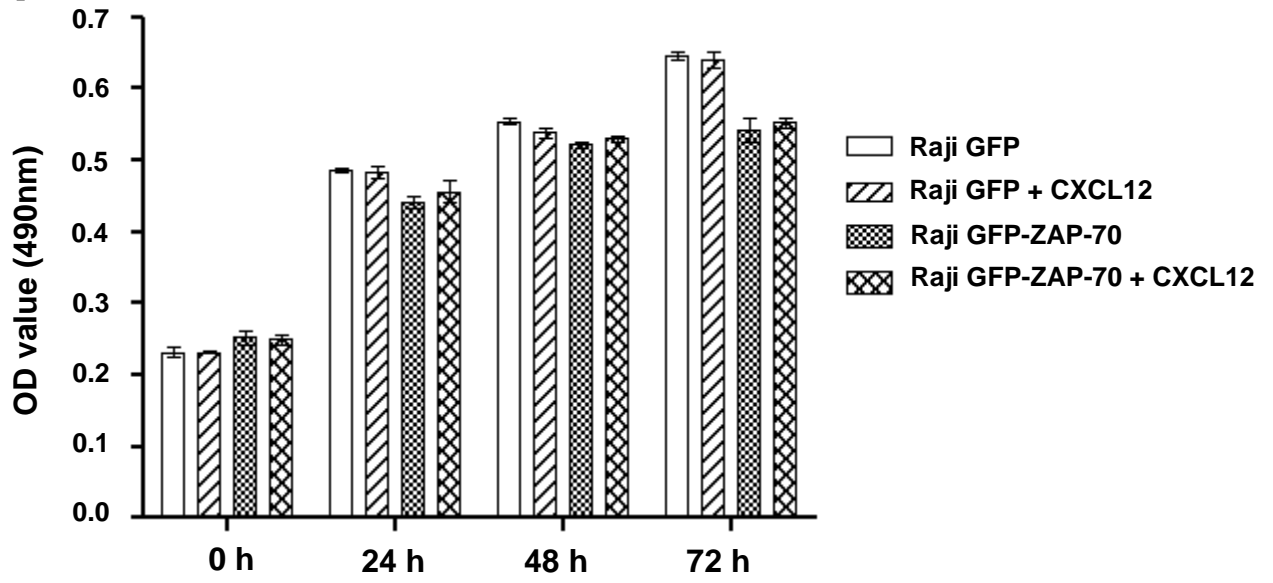
A

Figure 5

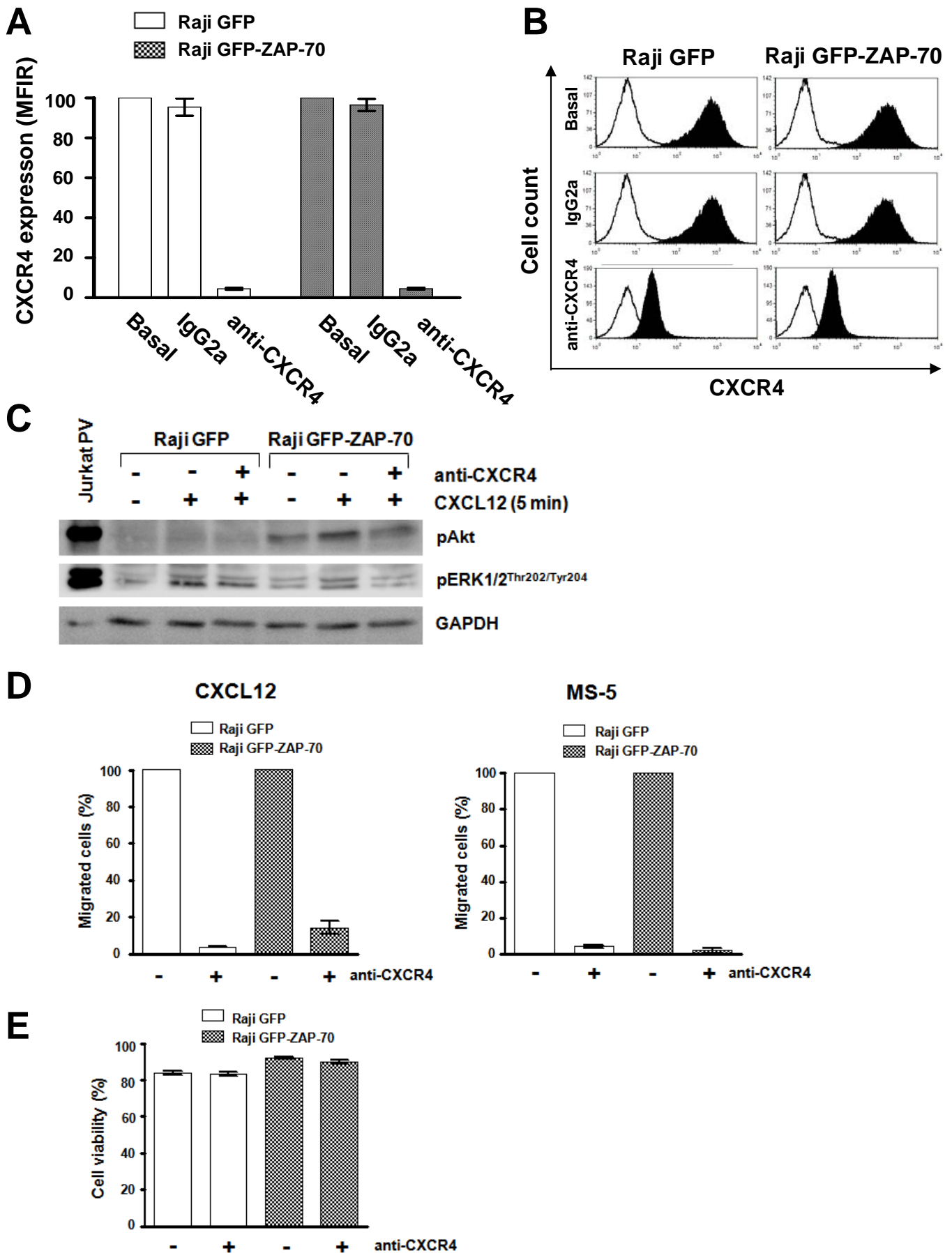


Figure 6



DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

La leucèmia limfàtica crònica (LLC) és un síndrome límfoproliferatiu B molt heterogeni en quant a l'evolució i pronòstic dels malalts que la pateixen. Aquests pacients poden presentar una malaltia estable, amb una supervivència no inferior a la del seu corresponent grup d'edat, o per contra, tenir una evolució més agressiva i sobreviure poc temps. Estudis previs del nostre grup han permès determinar que l'expressió de la proteïna ZAP-70 correlaciona amb l'estat mutacional de les immunoglobulines, i que pacients amb elevada expressió de la proteïna ($\geq 20\%$) presenten un pitjor pronòstic.^{73,74}

L'expressió de la proteïna ZAP-70 en la LLC i la correlació amb un mal pronòstic de la malaltia ha portat a l'estudi de les funcions d'aquesta proteïna en el limfòcit B. Les proteïnes ZAP-70 i SYK pertanyen a la mateixa família de proteïnes, les tirosina quinasa, i tenen funcions similars en els limfòcits T i B, respectivament. En cèl·lules de LLC, la proteïna ZAP-70 està involucrada en l'augment de la senyalització de l'IgM-BCR, simulant així el paper de SYK. De la mateixa manera, en cèl·lules primàries de LLC, l'elevada expressió de ZAP-70 s'ha correlacionat amb altres característiques biològiques, com un augment de la resposta a estímuls de supervivència i migració. No obstant, fins el moment, no s'ha pogut determinar si aquestes característiques són reflex d'una biologia diferent de les cèl·lules amb alta expressió de ZAP-70 o si és la proteïna ZAP-70 qui té algun paper directe en aquests processos.

La LLC ha estat clàssicament descrita com una malaltia d'acumulació més que de proliferació, però actualment es descarta com a una malaltia estàtica.¹⁷ El clon leucèmic de la LLC s'acumula i prolifera, principalment, en el

moll de l'os i en els ganglis limfàtics, concretament als centres de proliferació o pseudofol·licles.²⁰⁷ D'altra banda, les cèl·lules de la LLC esdevenen apoptòtiques espontàniament quan són cultivades *in vitro*, suggerint, que la resistència a l'apoptosi de les cèl·lules leucèmiques no és intrínseca i no són de caràcter immortal, sinó que requereixen senyals originades a través de receptors de superfície per a mantenir la viabilitat. En conseqüència, el microambient de les cèl·lules leucèmiques en el moll de l'os o en els òrgans limfoides secundaris contribueix a la supervivència, proliferació i resistència als tractaments quimioteràpics de les cèl·lules de LLC.

Amb aquests coneixements, vàrem plantejar la hipòtesi que l'expressió de la proteïna ZAP-70 en els limfòcits B de la LLC, estaria modificant la capacitat d'interactuar amb el microambient. Donat que fins el moment la generació d'una línia cel·lular derivada d'un limfòcit de LLC no ha estat possible,²⁰⁸ vàrem fer servir una línia cel·lular de limfoma de Burkitt com a model de limfòcit B madur maligne, a la que li vàrem transfectar la proteïna ZAP-70 de manera estable per abordar la hipòtesi plantejada.

Els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral mostren que ZAP-70 augmenta la senyalització a través d'IgM-BCR, fosforilant Akt i ERK1/2 amb major intensitat i durant més temps. A més, l'activació constitutiva de ZAP-70 així com d'ERK1/2, i no d'Akt, en una de les línies cel·lular amb expressió ectòpica de ZAP-70 suggereix que ZAP-70 senyalitza a través de la via de les MAPK, independentment de l'estimulació del receptor.

Tot i que la majoria de casos de LLC coexpressen IgM-BCR i IgD-BCR,²⁰⁹ no hi ha informació del paper de la proteïna ZAP-70 en la senyalització a través d'IgD-BCR. En la LLC, s'ha descrit, que la senyalització del BCR a través d'IgM és

diferent a l'observat amb l'estimulació d'IgD. Es coneix que l'estimulació a través d'IgD en cèl·lules de LLC es dona en tots els casos,²⁰⁹⁻²¹¹ mentre que l'estimulació a través d'IgM només és efectiva en els pacients amb immunoglobulines no mutades.^{209,210,212}

En aquests treballs hem pogut confirmar que l'estimulació d'IgM és superior amb l'expressió de ZAP-70.¹⁹⁴⁻¹⁹⁸ En canvi, al estudiar l'activació amb IgD, ZAP-70 no té cap efecte. Amb l'estimulació d'IgD, ZAP-70 no es fosforila, no es transloca del citoplasma a la membrana cel·lular, i no augmenta la fosforilació d'Akt. Per altra banda, contràriament al que vàrem observar amb IgM, l'estimulació d'IgD no indueix cap tipus de fosforilació d'ERK1/2. Tots aquests resultats indiquen que ZAP-70 no participa en la senyalització a través d'IgD, explicant probablement la diferent senyalització entre els dos tipus de BCRs a les cèl·lules de LLC.

En limfòcits B, la proteïna ZAP-70 s'uneix a les molècules senyalitzadores del BCR anomenades CD79a i CD79b i retarda la internalització del BCR posterior a l'estimulació. Els nostres resultats han permès observar que la cinètica d'internalització d'IgM i de CD79b és diferent, indicant que aquests dos components del BCR no es troben covalentment units, i que són eliminats de la superfície cel·lular, posteriorment a l'estimulació del BCR, de manera independent. Va resultar interessant observar que els dos components, sobretot CD79b, es mantenen per més temps a la membrana cel·lular en les cèl·lules amb expressió de ZAP-70. Aquestes observacions indiquen que la proteïna ZAP-70, unida a CD79b, manté el BCR (CD79b i IgM) més temps a la membrana, aconseguint l'elevada activació descrita en les cèl·lules amb expressió de ZAP-70.

L'adhesió i la migració de les cèl·lules malignes són aspectes centrals en la fisiopatologia dels desordres limfoproliferatius crònics, donat que poden explicar perquè algunes patologies estan localitzades en un nombre limitat d'òrgans mentre que altres, com la LLC, es presenten en nombroses estructures. D'altra banda, el microambient dins el moll de l'os i els teixits limfoides dóna suport a l'hematopoesi, al reclutament i a l'activació dels limfòcits; tant és així, que les quimioquines produïdes per les cèl·lules estromals juguen un paper primordial en aquests processos.

Les quimioquines són unes molècules essencials en el microambient al moll de l'os i als teixits limfoides, amb capacitat d'influenciar en l'acumulació i la supervivència dels limfòcits B de la LLC.^{91,98,213,214} El fet que l'activació del BCR sigui capaç de modular l'expressió dels receptors d'aquestes quimioquines,^{169,212,215,216} ens va fer plantejar estudiar si ZAP-70 tenia també un efecte en l'expressió de receptors de quimioquines i molècules d'adhesió. En aquest sentit, la sobreexpressió de CCR7 en les cèl·lules amb expressió de ZAP-70 activada és l'efecte més destacat. Estudis d'inhibició de les vies activades, posteriorment a l'estimulació del BCR, varen determinar que la via de senyalització que propicia aquest canvi d'expressió de CCR7 és la de les MAPK amb l'activació d'ERK1/2. El fet que la inhibició d'ERK1/2 no redueixi l'increment del receptor CCR7 en la seva totalitat fa pensar que altres vies de senyalització també intervenen en la regulació de l'expressió d'aquest receptor. S'ha descrit que el receptor CCR7 està sobreexpressat en la LLC, on s'ha associat amb característiques de mal pronòstic, com la presència de limfadenopaties i l'augment d'expressió de ZAP-70. Tot i així, no s'ha determinat si les cèl·lules amb expressió de ZAP-70 són les que exhibeixen

elevada expressió de CCR7. El nostre estudi ha permès identificar en mostres primàries que els subclons amb expressió de ZAP-70 presenten una major expressió de CCR7. Això indica que ZAP-70 podria estar relacionada amb l'increment de CCR7 en pacients amb elevada ZAP-70, així com nosaltres hem observat en el nostre sistema de línies cel·lulars. A més, les cèl·lules amb elevada expressió de ZAP-70 tenen major expressió d'altres receptors de quimioquines, així com de molècules d'adhesió, implicades en la interacció de les cèl·lules de LLC amb el microambient.

Tot i que l'expressió de la majoria de quimioquines s'indueix en processos infecciosos i d'inflamació, algunes quimioquines, incloent la CCL19 i la CCL21 (ligands de CCR7), s'expressen constitutivament i controlen la migració cel·lular durant l'homeòstasi.²¹⁷ Ambdós ligands s'expressen als òrgans limfoides secundaris i contribueixen a la migració de les cèl·lules amb expressió de CCR7,²¹⁸ com s'ha vist a les cèl·lules de la LLC.^{213,214,219,220} Així, aquestes cèl·lules migren a un ambient més favorable, com els ganglis limfàtics o el moll de l'os, on reben senyals de supervivència i proliferació addicionals.

En aquesta direcció, els nostres resultats han permès observar que la senyalització del CCR7, posterior a la lligació de CCL21, és major en les cèl·lules amb expressió de ZAP-70, probablement com a conseqüència dels elevats nivells de CCR7 abans observats. No obstant això, no podem excloure una participació directa de ZAP-70 en la senyalització de CCR7, ja que vàrem observar que l'addició de CCL21, sense estimulació prèvia del BCR, i per tant sense cap increment de CCR7, contribueix a un augment de la fosforilació d'Akt, essent aquesta de major grau amb expressió de ZAP-70. Com havíem

vist anteriorment, de nou, sembla que ZAP-70 és capaç d'intervenir en la senyalització intracel·lular independentment de l'estimulació del BCR. En aquest sentit, hi ha publicacions que han descrit que tant ZAP-70 com SYK estarien implicades en la senyalització de CXCR4 i de CXCR3, receptors de quimioquines amb estructura similar a CCR7.^{205,206,221}

Tot i que la lligació de les quimioquines als seus receptors poden induir supervivència i migració, estímuls addicionals poden ésser necessaris per promoure la migració cel·lular, tal i com s'ha descrit a les cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits i a les cèl·lules de LLA (Leucèmia Limfoblàstica Aguda). D'altra banda, els nivells dels receptors de quimioquines no sempre correlacionen amb la capacitat de migració, com s'ha observat per CXCR4 i CCR7 en LLC.^{122,169,220} Cal destacar, que en els nostres experiments, sí s'ha observat una major expressió de CCR7 i un augment de la migració de les cèl·lules amb expressió de ZAP-70 a la quimioquina CCL21.

Basant-nos en els resultats del primer treball, vàrem decidir estudiar si la proteïna ZAP-70 pot influir en la capacitat infiltrativa dels limfòcits B malignes en un model *in vivo*. Vàrem utilitzar la nostra línia cel·lular estable generada per al primer estudi²²² (amb expressió de ZAP-70 activada constitutivament) per a ser inoculada via intravenosa en ratolins. Vàrem observar que l'expressió de ZAP-70 no afecta la supervivència dels ratolins donat que la capacitat d'infiltració del sistema nerviós central, causa principal de paràlisi i mort dels ratolins, de les cèl·lules inoculades, no es veu alterada. En canvi, la infiltració del moll de l'os és fins a 23 vegades superior en els ratolins inoculats amb la línia cel·lular amb expressió estable de ZAP-70.

La quimioquina CXCL12, lligand del receptor CXCR4, és la principal quimioquina expressada per les cèl·lules estromals al moll de l'os.^{223,224} Diverses publicacions han demostrat el seu paper rellevant, juntament amb altres quimioquines, en el reclutament de les cèl·lules de LLC als òrgans limfoides^{92,113,225} així com la seva capacitat per incrementar la supervivència del clon leucèmic.^{92,98} No obstant, l'impacte diferencial que podria tenir CXCL12 sobre les cèl·lules de LLC ZAP-70 positives o negatives en la migració al moll de l'os resulta novedós.

L'estudi de l'expressió del receptor CXCR4 en les línies cel·lulars generades no mostra diferències entre la línia amb expressió estable de ZAP-70 i la línia control. Tampoc s'observen diferències en l'expressió de CXCR4 entre mostres primàries de pacients amb ZAP-70 elevada respecte a mostres primàries amb ZAP-70 baixa. Tot i els nivells similars de CXCR4, la migració a la quimioquina CXCL12 i a les BMSCs *in vitro* és clarament superior en aquelles cèl·lules amb expressió ectòpica de ZAP-70. El mateix s'observa a les mostres primàries de LLC. Així, els subclons ZAP-70 positius tenen major índex de migració que els ZAP-70 negatius d'un mateix pacient de LLC.

El fet que l'expressió de ZAP-70 no impliqui variacions en l'expressió del receptor CXCR4, però en canvi sí es detecti un efecte en la migració a CXCL12, indica que les diferències observades en aquesta migració, tant *in vivo* com *in vitro*, podrien ser degudes a una major senyalització a través del CXCR4 en les cèl·lules amb expressió de ZAP-70. En aquest sentit, vàrem observar que la lligació de la quimioquina CXCL12 al CXCR4 indueix una ràpida activació de ZAP-70 amb les subseqüents activacions d'Akt i ERK1/2. Anàlogament a les observacions de la senyalització de CCR7 en el primer treball, ZAP-70 és també

capaç d'influenciar la senyalització del CXCR4, independentment de l'activació del BCR. Altres publicacions han demostrat igualment que ZAP-70 és capaç de participar directament en la senyalització de CXCR4 en limfòcits T.^{205,226} És interessant comentar que altres proteïnes tirosina quinasa com la proteïna SYK, BTK (de l'anglès *Bruton's tyrosine kinase*) i PI3K, estan també implicades en la senyalització del CXCR4 i en la migració de cèl·lules de LLC a CXCL12.^{221,227-230} Això resulta interessant donat que la inhibició de quinases del BCR que participen en la senyalització del CXCR4 està donant resultats preliminars prometedors en assajos clínics en pacients amb LLC.²³¹⁻²³³ La mobilització de les cèl·lules de LLC des dels nòduls limfàtics a la sang perifèrica, on s'observa una limfocitosi inicial, dóna suport a la implicació d'aquestes proteïnes en la senyalització del CXCR4.

Per tal de comprovar que CXCR4 intervé en la migració a CXCL12 vàrem bloquejar *in vitro* aquest receptor amb un anticòs monoclonal. Així vàrem poder observar, que independentment de l'expressió de ZAP-70, el bloqueig d'aquest receptor impossibilita la migració d'aquestes cèl·lules a CXCL12 o a la línia estromal del moll de l'os MS-5, destacant la importància del tàndem CXCR4/CXCL12 en la migració dels limfòcits B al moll de l'os.

Actualment, l'estudi dels receptors de quimioquines està sorgint com un nou camp a explorar per tal d'obtenir noves dianes terapèutiques. Diverses drogues bloquejants de receptors de quimioquines es troben en fase d'assajos clínics en diversos tipus de càncer. Algunes d'aquestes drogues són Maraviroc (antagonista de CCR5), Mogamulizmab (anti-CCR4) i Plerixafor (antagonista de CXCR4). Plerixafor està essent estudiat per a la LLC en combinació amb agents quimioteràpics com la Lenalidomida o el Rituximab. Estudis pre-clínics en LLC

han demostrat que l'ús d'antagonistes de CXCR4 permeten eliminar els efectes favorables proporcionats pel moll de l'os, essent aquestes cèl·lules, en el nou entorn, més susceptibles de mort espontània o mitjançada per algun tipus de droga.⁸⁵

Un major coneixement de la funció de ZAP-70 en relació a la modulació de les senyals del microambient, especialment de CXCR4, pot contribuir al coneixement de la biologia que s'amaga darrera el pronòstic desfavorable dels pacients amb LLC i elevada expressió de ZAP-70.



CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. L'expressió de la proteïna ZAP-70 augmenta la senyalització a través de l'IgM-BCR, i no de l'gD, mitjançant l'increment en la fosforilació de les proteïnes Akt i ERK1/2 i el retard en la internalització de IgM i CD79b.
2. L'expressió de la proteïna ZAP-70 modifica la modulació de l'expressió de molècules d'adhesió i de receptors de quimioquines produïda per l'activació del BCR, especialment potenciant l'augment en l'expressió de CCR7, via activació de la via MAPK.
3. L'increment d'expressió del receptor CCR7 en les cèl·lules amb presència de ZAP-70 comporta una major activació de la senyalització del CCR7 i major migració a la quimioquina CCL21.
4. L'expressió de la proteïna ZAP-70 no influeix en la supervivència dels animals inoculats amb limfòcits B neoplàsics.
5. L'expressió de ZAP-70 afavoreix la infiltració del moll de l'os per part dels limfòcits B neoplàsics en models xenografts murins.
6. Les cèl·lules neoplàsiques amb expressió ectòpica de ZAP-70 tenen major capacitat de migració *in vitro* cap a CXCL12 i cap les BMSCs.
7. Les cèl·lules B amb expressió ectòpica de ZAP-70 responen més intensament a l'estimulació del CXCR4 amb CXCL12, tot i no tenir canvis en la expressió superficial de CXCR4.
8. La neutralització de CXCR4 inhibeix l'activació d'Akt i ERK1/2 posterior a l'estimulació amb CXCL12, i la migració a CXCL12 i a les BMSCs.



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Matthias P, Rolink AG. Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5(6):497–508.
2. Domen J, Wagers A, Weissman IL. 2. Bone marrow (Hematopoietic) stem cells. *Regen. Med.* 2006;13.
3. Laiosa CV, Stadtfeld M, Graf T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:705–738.
4. Wang LD, Clark MR. B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development. *Immunology.* 2003;110(4):411–420.
5. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología celular y molecular. 2007.
6. Hystad ME, Myklebust JH, Bø TH, et al. Characterization of early stages of human B cell development by gene expression profiling. *J. Immunol.* 2007;179(6):3662–3671.
7. Parkhouse RME, Cooper MD. A Model for the Differentiation of B Lymphocytes with Implications for the Biological Role of IgD. *Immunol. Rev.* 1977;37(1):105–126.
8. Dorshkind K, Rawlings DJ. B-Cell Development: The hematopoietic hierarchy and B-lineage commitment. *Hematol. Basic Princ. Pract. 4 Churchill Livingstone Elsevier Phila.* 2005;
9. Kleinstein SH, Louzoun Y, Shlomchik MJ. Estimating hypermutation rates from clonal tree data. *J. Immunol.* 2003;171(9):4639–4649.
10. Paus D, Phan TG, Chan TD, et al. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J. Exp. Med.* 2006;203(4):1081–1091.
11. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1995;333(16):1052–1057.
12. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2005;352(8):804–815.
13. Hamblin AD, Hamblin TJ. The immunodeficiency of chronic lymphocytic leukaemia. *Br. Med. Bull.* 2008;87(1):49–62.
14. Oscier D, Fegan C, Hillmen P, et al. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2004;125(3):294–317.

15. Catovsky D, Fooks J, Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. *Br. J. Haematol.* 1989;72(2):141-149.
16. Alfarano A, Indraccolo S, Circosta P, et al. An alternatively spliced form of CD79b gene may account for altered B-cell receptor expression in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;93(7):2327-2335.
17. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Clin. Invest.* 2005;115(3):755-764.
18. Bofill M, Janossy G, Janossa M, et al. Human B cell development. II. Subpopulations in the human fetus. *J. Immunol.* 1985;134(3):1531-1538.
19. Antin JH, Emerson SG, Martin P, Gadol N, Ault KA. Leu-1+(CD5+) B cells. A major lymphoid subpopulation in human fetal spleen: phenotypic and functional studies. *J. Immunol.* 1986;136(2):505-510.
20. Caligaris-Cappio F. B-chronic lymphocytic leukemia: a malignancy of anti-self B cells. *Blood.* 1996;87(7):2615-2620.
21. Dono M, Cerruti G, Zupo S. The CD5+ B-cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004;36(11):2105-2111.
22. Schroeder HW, Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol. Today.* 1994;15(6):288-294.
23. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J. Clin. Invest.* 1998;102(8):1515.
24. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94(6):1848-1854.
25. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia Presented in part at the 40th Annual Meeting of The American Society of Hematology, held in Miami Beach, FL, December 4-8, 1998. *Blood.* 1999;94(6):1840-1847.

26. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J. Exp. Med.* 2001;194(11):1625–1638.
27. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes Presented in part at the 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 1-5, 2000, San Francisco, CA. *Blood.* 2002;99(11):4087–4093.
28. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* 2001;194(11):1639–1648.
29. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin (s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood.* 2011;117(6):1781–1791.
30. Ferrarini M, Chiorazzi N. Recent advances in the molecular biology and immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Hematol.* 2004;41:207.
31. William J, Euler C, Christensen S, Shlomchik MJ. Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science.* 2002;297(5589):2066–2070.
32. Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, et al. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* 2012;209(12):2183–2198.
33. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell.* 2011;20(2):246–259.
34. Slager SL, Rabe KG, Achenbach SJ, et al. Genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus at 6p21.3 among familial CLL. *Blood.* 2011;117(6):1911–1916.
35. Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, et al. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of “indolent” chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood.* 2002;100(2):635–639.

36. Marti GE, Carter P, Abbasi F, et al. B-cell monoclonal lymphocytosis and B-cell abnormalities in the setting of familial B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2003;52(1):1–12.
37. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2008;359(6):575–583.
38. Garcia JA, Giraldo P, López J, Ríos E, Sastre JL. Guías de consenso nacionales para el manejo de pacientes con leucemia linfocítica crónica. In Science Communications; 2012.
39. Ghia P, Ferreri AJ, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2007;64(3):234–246.
40. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1975;46(2):219–234.
41. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer.* 1981;48(1):198–206.
42. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood.* 1996;87(12):4990–4997.
43. Rai KR. A critical analysis of staging in CLL. *Chronic Lymphocytic Leuk. Recent Prog. Future Dir. N. Y. Alan R Liss.* 1987;252–64.
44. Gribben JG. How I treat CLL up front. *Blood.* 2010;115(2):187–197.
45. Vinolas N, Reverter JC, Urbano-Ispizua A, Montserrat E, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: an update of its prognostic significance. *Blood Cells.* 1987;12(2):457.
46. Han T, Barcos M, Emrich L, 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;2(6):562–570.
47. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, 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. *Blood.* 2008;111(12):5446–5456.

48. Molica S, Reverter JC, Alberti A, Montserrat E. Timing of diagnosis and lymphocyte accumulation patterns in chronic lymphocytic leukemia: analysis of their clinical significance. *Eur. J. Haematol.* 1990;44(5):277–281.
49. Montserrat E, Villamor N, Reverter J-C, et al. Bone marrow assessment in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: aspirate or biopsy? A comparative study in 258 patients. *Br. J. Haematol.* 1996;93(1):111–116.
50. Gentile M, Cutrona G, Neri A, et al. Predictive value of β 2-microglobulin (β 2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica.* 2009;94(6):887–888.
51. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, et al. Serum β 2-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk. Lymphoma.* 1996;22(5-6):439–447.
52. Delgado J, Pratt G, Phillips N, et al. Beta2-microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia if adjusted according to glomerular filtration rate. *Br. J. Haematol.* 2009;145(6):801–805.
53. Gronowitz JS, Hagberg H, Källander CF, Simonsson B. The use of serum deoxythymidine kinase as a prognostic marker, and in the monitoring of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Cancer.* 1983;47(4):487.
54. Källander CF, Simonsson B, Hagberg H, Gronowitz JS. Serum deoxythymidine kinase gives prognostic information in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 1984;54(11):2450–2455.
55. Magnac C, Porcher R, Davi F, et al. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia.* 2003;17(1):133–137.
56. Molica S, Levato D, Dell'Olio M, et al. Cellular expression and serum circulating levels of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Implications for prognosis. *Haematologica.* 1996;81(5):428–433.
57. Sarfati M, Chevret S, Chastang C, et al. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1996;88(11):4259–4264.
58. Cramer P, Hallek M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia—what do we need to know? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2010;8(1):38–47.

59. Bergmann MA, Eichhorst BF, Busch R, et al. Prospective evaluation of prognostic parameters in early stage chronic lymphocytic leukemia (CLL): results of the CLL1-protocol of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Blood*; 2007;110(11):625.
60. Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood*. 1987;69(3):929–936.
61. Van Bockstaele F, Verhasselt B, Philippe J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev*. 2009;23(1):25–47.
62. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;112(5):1923–1930.
63. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2000;343(26):1910–1916.
64. Klein U, Lia M, Crespo M, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*. 2010;17(1):28–40.
65. Boultonwood J. Ataxia telangiectasia gene mutations in leukaemia and lymphoma. *J. Clin. Pathol*. 2001;54(7):512–516.
66. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin. Cancer Res*. 2009;15(3):995–1004.
67. Bargonetti J, Manfredi JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr. Opin. Oncol*. 2002;14(1):86–91.
68. Mowat MR. p53 in tumor progression: life, death, and everything. *Adv. Cancer Res*. 1998;74:25–48.
69. Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, et al. CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2003;102(6):2146–2155.
70. Mehta K, Shahid U, Malavasi F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J*. 1996;10(12):1408–1417.
71. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic

- lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002;99(3):1023–1029.
72. Ghia P, Guida G, Scielzo C, Geuna M, Caligaris-Cappio F. CD38 modifications in chronic lymphocytic leukemia: are they relevant? *Leukemia*. 2004;18(10):1733–1735.
73. Del Principe MI, Del Poeta G, Buccisano F, et al. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006;108(3):853–861.
74. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2003;348(18):1764–1775.
75. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475(7354):101–105.
76. Villamor N, Conde L, Martinez-Trillos A, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia*. 2012;
77. Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 2011;44(1):47–52.
78. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2011;365(26):2497–2506.
79. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119(12):2854–2862.
80. Ramsay AJ, Quesada V, Foronda M, et al. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 2013;45(5):526–530.
81. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2010;470(7332):115–119.
82. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2007;7(5):353–364.

83. Herishanu Y, Katz B-Z, Lipsky A, Wiestner A. Biology of Chronic Lymphocytic Leukemia in Different Microenvironments. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2013;27(2):173–206.
84. Rosati S, Kluin PM. Chronic lymphocytic leukaemia: a review of the immun-architecture. *Chronic Lymphocytic Leuk.* 2005;90–107.
85. Burger M, Hartmann T, Krome M, 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.* 2005;106(5):1824–1830.
86. Friedberg JW. CLL microenvironment: macro important. *Blood.* 2011;117(2):377–378.
87. Beyer M, Kochanek M, Darabi K, et al. Reduced frequencies and suppressive function of CD4⁺ CD25^{hi} regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood.* 2005;106(6):2018–2025.
88. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J. Clin. Invest.* 2008;118(7):2427.
89. D’Arena G, Simeon V, D’Auria F, et al. Regulatory T-cells in chronic lymphocytic leukemia: actor or innocent bystander? *Am. J. Blood Res.* 2013;3(1):52.
90. 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;92(1):97–103.
91. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood.* 1998;91(7):2387–2396.
92. 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;94(11):3658–3667.
93. Caligaris-Cappio F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2003;123(3):380–388.

94. Patten PE, Buggins AG, Richards J, et al. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood*. 2008;111(10):5173–5181.
95. De Toter D, Reato G, Mauro F, et al. IL4 production and increased CD30 expression by a unique CD8+ T-cell subset in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 1999;104(3):589–599.
96. Bagnara D, Kaufman MS, Calissano C, et al. A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease. *Blood*. 2011;117(20):5463–5472.
97. Pedersen IM, Kitada S, Leoni LM, et al. Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood*. 2002;100(5):1795–1801.
98. Burger JA, Tsukada N, Burger M, et al. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 2000;96(8):2655–2663.
99. Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of “nurselike” cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99(3):1030–1037.
100. Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of “nurselike” cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99(3):1030–1037.
101. Nishio M, Endo T, Tsukada N, 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-1 α . *Blood*. 2005;106(3):1012–1020.
102. Bhattacharya N, Diener S, Idler IS, et al. Non-malignant B cells and chronic lymphocytic leukemia cells induce a pro-survival phenotype in CD14+ cells from peripheral blood. *Leukemia*. 2011;25(4):722–726.
103. Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, et al. Monocytic population in chronic lymphocytic leukemia shows altered composition and deregulation of genes involved in phagocytosis and inflammation. *Haematologica*. 2013;haematol.2012.073080.
104. Mainou-Fowler T, Prentice AG. Modulation of apoptosis with cytokines in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk. Lymphoma*. 1996;21(5-6):369–377.

105. Crawford DH, Catovsky D. In vitro activation of leukaemic B cells by interleukin-4 and antibodies to CD40. *Immunology*. 1993;80(1):40.
106. Dancescu M, Rubio-Trujillo M, Biron G, et al. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J. Exp. Med.* 1992;176(5):1319–1326.
107. Buschle M, Campana D, Carding SR, et al. Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* 1993;177(1):213–218.
108. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2000;52(1):145–176.
109. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:787–820.
110. Colantonio L, Recalde H, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Modulation of chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness during differentiation of human naive T cells into Th1 or Th2 cells. *Eur. J. Immunol.* 2002;32(5):1264–1273.
111. Stamatopoulos B, Haibe-Kains B, Equeter C, et al. Gene expression profiling reveals differences in microenvironment interaction between patients with chronic lymphocytic leukemia expressing high versus low ZAP70 mRNA. *Haematologica*. 2009;94(6):790–799.
112. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, et al. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood*. 2007;110(12):4012–4021.
113. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, et al. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*. 2006;107(9):3584.
114. Caligaris-Cappio F, Ghia P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J. Clin. Oncol.* 2008;26(27):4497–4503.
115. Möhle R, Failenschmid C, Bautz F, Kanz L. Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia*. 1999;13(12):1954–1959.
116. Dürig J, Schmücker U, Dührsen U. Differential expression of chemokine receptors in B cell malignancies. *Leukemia*. 2001;15(5):752–756.

117. Barretina J, Junca J, Llano A, et al. CXCR4 and SDF-1 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and stage of the disease. *Ann. Hematol.* 2003;82(8):500–505.
118. Till KJ, Lin K, Zuzel M, Cawley JC. The chemokine receptor CCR7 and $\alpha 4$ integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood.* 2002;99(8):2977–2984.
119. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- κ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011;117(2):563–574.
120. Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss FW, Cyster JG. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat. Immunol.* 2007;9(1):54–62.
121. Reif K, Ekland EH, Ohl L, et al. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature.* 2002;416(6876):94–99.
122. López-Giral S, Quintana NE, Cabrerizo M, et al. Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. *J. Leukoc. Biol.* 2004;76(2):462–471.
123. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, et al. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood.* 2009;113(13):3050–3058.
124. Pascutti MF, Jak M, Tromp JM, et al. IL-21 and CD40L signals from autologous T cells can induce antigen-independent proliferation of CLL cells. *Blood.* 2013;
125. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002;3(9):639–650.
126. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat. Immunol.* 2001;2(2):129–134.
127. Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, et al. Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003;111(6):1185–1199.
128. Kehrl JH. Chemoattractant receptor signaling and the control of lymphocyte migration. *Immunol. Res.* 2006;34(3):211–227.
129. Girard J-P, Springer TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol. Today.* 1995;16(9):449–457.

130. Park C, Hwang I-Y, Sinha RK, et al. Lymph node B lymphocyte trafficking is constrained by anatomy and highly dependent upon chemoattractant desensitization. *Blood*. 2012;119(4):978–989.
131. Ohl L, Bernhardt G, Pabst O, Förster R. Chemokines as organizers of primary and secondary lymphoid organs. *Semin. Immunol.* 2003;15:249–255.
132. Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:127–159.
133. Molica S, Cutrona G, Vitelli G, et al. Markers of increased angiogenesis and their correlation with biological parameters identifying high-risk patients in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Res.* 2007;31(11):1575–1578.
134. Piechnik A, Dmoszynska A, Omiotek M, et al. The VEGF receptor, neuropilin-1, represents a promising novel target for chronic lymphocytic leukemia patients. *Int. J. Cancer.* 2013;
135. Maffei R, Martinelli S, Santachiara R, et al. Angiopoietin-2 plasma dosage predicts time to first treatment and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;116(4):584–592.
136. Smolej L, Benesova P. Role of angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2006;107(11):2742–2743.
137. Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2000;2(10):737–744.
138. Redondo-Muñoz J, Escobar-Díaz E, Samaniego R, et al. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by $\alpha 4\beta 1$ integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood*. 2006;108(9):3143–3151.
139. Redondo-Muñoz J, Ugarte-Berzal E, García-Marco JA, et al. $\alpha 4\beta 1$ integrin and 190-kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells. *Blood*. 2008;112(1):169–178.
140. Redondo-Muñoz J, Terol MJ, García-Marco JA, García-Pardo A. Matrix metalloproteinase-9 is up-regulated by CCL21/CCR7 interaction via extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling and is involved in CCL21-driven B-cell chronic lymphocytic leukemia cell invasion and migration. *Blood*. 2008;111(1):383–386.

- 141.Lobb RR, Hemler ME. The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *J. Clin. Invest.* 1994;94(5):1722.
- 142.Teixido J, Hemler ME, Greenberger JS, Anklesaria P. Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma. *J. Clin. Invest.* 1992;90(2):358.
- 143.Arroyo AG, Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Differential requirements for α 4 integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell.* 1996;85(7):997–1008.
- 144.Till KJ, Spiller DG, Harris RJ, et al. CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and α 4 β 1 integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium. *Blood.* 2005;105(12):4813–4819.
- 145.Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, et al. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2008;111(2):865–873.
- 146.Redondo-Muñoz J, Ugarte-Berzal E, Terol MJ, et al. Matrix metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia b cell survival through its hemopexin domain. *Cancer Cell.* 2010;17(2):160–172.
- 147.Garcia-Gila M, Lopez-Martin EM, Garcia-Pardo A. Adhesion to fibronectin via α 4 integrin (CD49d) protects B cells from apoptosis induced by serum deprivation but not via IgM or Fas/Apo-1 receptors. *Clin. Exp. Immunol.* 2002;127(3):455–462.
- 148.Endo T, Nishio M,ENZLER T, et al. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF- κ B pathway. *Blood.* 2007;109(2):703–710.
- 149.Kern C, Cornuel J-F, Billard C, et al. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood.* 2004;103(2):679–688.
- 150.Muzio M, Fonte E, Caligaris-Cappio F. Toll-like Receptors in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2012;4(1):
- 151.Fluckiger AC, Rossi JF, Bussel A, et al. Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia B cells activated via surface Igs or CD40 to B-cell tropic factors. *Blood.* 1992;80(12):3173–3181.

152. Plander M, Seegers S, Ugocsai P, et al. Different proliferative and survival capacity of CLL-cells in a newly established in vitro model for pseudofollicles. *Leukemia*. 2009;23(11):2118–2128.
153. Kater AP, Evers LM, Remmerswaal EBM, et al. CD40 stimulation of B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells enhances the anti-apoptotic profile, but also Bid expression and cells remain susceptible to autologous cytotoxic T-lymphocyte attack. *Br. J. Haematol.* 2004;127(4):404–415.
154. Tromp JM, Tonino SH, Elias JA, et al. Dichotomy in NF- κ B signaling and chemoresistance in immunoglobulin variable heavy-chain-mutated versus unmutated CLL cells upon CD40/TLR9 triggering. *Oncogene*. 2010;29(36):5071–5082.
155. Efremov DG, Gobessi S, Longo PG. Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Autoimmun. Rev.* 2007;7(2):102–108.
156. Kipps TJ. The B-cell receptor and ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. *Baillières Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2007;20(3):415–424.
157. Del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R, Nuñez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*. 1997;278(5338):687–689.
158. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998;282(5392):1318–1321.
159. Petlickovski A, Laurenti L, Li X, et al. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2005;105(12):4820–4827.
160. Efremov DG, Gobessi S, Longo PG. Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Autoimmun. Rev.* 2007;7(2):102–108.
161. Oppezzo P, Dighiero G. Role of the B-cell receptor and the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia'. *Blood Cancer J.* 2013;3(9):e149.
162. Bléry M, Tze L, Miosge LA, Jun JE, Goodnow CC. Essential role of membrane cholesterol in accelerated BCR internalization and uncoupling from NF- κ B in B cell clonal anergy. *J. Exp. Med.* 2006;203(7):1773–1783.

163. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood*. 2008;111(3):1524–1533.
164. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted V λ 2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood*. 2003;101(12):4952–4957.
165. Dühren-von Minden M, Übelhart R, Schneider D, et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature*. 2012;489(7415):309–312.
166. Hervé M, Xu K, Ng Y-S, et al. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J. Clin. Invest.* 2005;115(6):1636–1643.
167. Seiler T, Woelfle M, Yancopoulos S, et al. Characterization of structurally defined epitopes recognized by monoclonal antibodies produced by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2009;114(17):3615–3624.
168. Gauld SB, Benschop RJ, Merrell KT, Cambier JC. Maintenance of B cell anergy requires constant antigen receptor occupancy and signaling. *Nat. Immunol.* 2005;6(11):1160–1167.
169. Quiroga MP, Balakrishnan K, Kurtova AV, et al. B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood*. 2009;114(5):1029–1037.
170. Chan AC, Irving BA, Fraser JD, Weiss A. The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991;88(20):9166–9170.
171. Vivier E, da Silva AJ, Ackerly M, et al. Association of a 70-kDa tyrosine phosphoprotein with the CD16: ζ : γ complex expressed in human natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 1993;23(8):1872–1876.

172. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*. 1992;71(4):649–662.
173. Chan AC, Van Oers NS, Tran A, et al. Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *J. Immunol.* 1994;152(10):4758–4766.
174. Ku G, Malissen B, Mattei M-G. Chromosomal location of the Syk and ZAP-70 tyrosine kinase genes in mice and humans. *Immunogenetics*. 1994;40(4):300–302.
175. Yamasaki S, Takamatsu M, Iwashima M. The kinase, SH3, and SH2 domains of Lck play critical roles in T-cell activation after ZAP-70 membrane localization. *Mol. Cell. Biol.* 1996;16(12):7151–7160.
176. Zhao Q, Williams BL, Abraham RT, Weiss A. Interdomain B in ZAP-70 regulates but is not required for ZAP-70 signaling function in lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 1999;19(1):948–956.
177. Bu J-Y, Shaw AS, Chan AC. Analysis of the interaction of ZAP-70 and syk protein-tyrosine kinases with the T-cell antigen receptor by plasmon resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995;92(11):5106–5110.
178. Neumeister EN, Zhu Y, Richard S, et al. Binding of ZAP-70 to phosphorylated T-cell receptor zeta and eta enhances its autophosphorylation and generates specific binding sites for SH2 domain-containing proteins. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15(6):3171–3178.
179. Mège D, Di Bartolo V, Germain V, et al. Mutation of tyrosines 492/493 in the kinase domain of ZAP-70 affects multiple T-cell receptor signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 1996;271(51):32644–32652.
180. Luper Jr ML, Songyang Z, Shoelson SE, Cantley LC, Band H. The Cbl Phosphotyrosine-binding Domain Selects a D (N/D) XpY Motif and Binds to the Tyr292 Negative Regulatory Phosphorylation Site of ZAP-70. *J. Biol. Chem.* 1997;272(52):33140–33144.
181. Rao N, Dodge I, Band H. The Cbl family of ubiquitin ligases: critical negative regulators of tyrosine kinase signaling in the immune system. *J. Leukoc. Biol.* 2002;71(5):753–763.

182. Bartolo VD, Malissen M, Dufour E, et al. Tyrosine 315 determines optimal recruitment of ZAP-70 to the T cell antigen receptor. *Eur. J. Immunol.* 2002;32(2):568–575.
183. Williams BL, Irvin BJ, Sutor SL, et al. Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C- γ 1 and Ras activation. *EMBO J.* 1999;18(7):1832–1844.
184. Palacios EH, Weiss A. Distinct roles for Syk and ZAP-70 during early thymocyte development. *J. Exp. Med.* 2007;204(7):1703–1715.
185. Au-Yeung BB, Deindl S, Hsu L-Y, et al. The structure, regulation, and function of ZAP-70. *Immunol. Rev.* 2009;228(1):41–57.
186. Finco TS, Kadlecsek T, Zhang W, Samelson LE, Weiss A. LAT is required for TCR-mediated activation of PLC γ 1 and the Ras pathway. *Immunity.* 1998;9(5):617–626.
187. Crespo M, Villamor N, Giné E, et al. ZAP-70 expression in normal pro/pre B cells, mature B cells, and in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2006;12(3):726–734.
188. Scielzo C, Camporeale A, Geuna M, et al. ZAP-70 is expressed by normal and malignant human B-cell subsets of different maturational stage. *Leukemia.* 2006;20(4):689–695.
189. Nolz JC, Tschumper RC, Pittner BT, et al. ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. *Leukemia.* 2005;19(6):1018–1024.
190. Kong G-H, Bu J-Y, Kurosaki T, Shaw AS, Chant AC. Reconstitution of Syk function by the ZAP-70 protein tyrosine kinase. *Immunity.* 1995;2(5):485–492.
191. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet.* 2004;363(9403):105–111.
192. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004;351(9):893–901.
193. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood.* 2003;101(12):4944–4951.

194. Chen L, Widhopf G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100(13):4609–4614.
195. Chen L, Apgar J, Huynh L, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;105(5):2036–2041.
196. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, et al. ZAP-70 enhances B-cell–receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood*. 2007;109(5):2032–2039.
197. Chen L, Huynh L, Apgar J, et al. ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;111(5):2685–2692.
198. Zum Büschenfelde CM, Wagner M, Lutzny G, et al. Recruitment of PKC- β II to lipid rafts mediates apoptosis-resistance in chronic lymphocytic leukemia expressing ZAP-70. *Leukemia*. 2009;24(1):141–152.
199. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*. 2004;103(12):4389–4395.
200. Law C-L, Sidorenko SP, Chandran KA, et al. Molecular cloning of human Syk. AB cell protein-tyrosine kinase associated with the surface immunoglobulin MB cell receptor complex. *J. Biol. Chem*. 1994;269(16):12310–12319.
201. Sefton BM, Taddie JA. Role of tyrosine kinases in lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol*. 1994;6(3):372–379.
202. Lankester AC, van Schijndel GM, Van der Schoot CE, et al. Antigen receptor nonresponsiveness in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 1995;86(3):1090–1071.
203. Semichon M, Merle-Beral H, Lang V, Bismuth G. Normal Syk protein level but abnormal tyrosine phosphorylation in B-CLL cells. *Leukemia*. 1997;11(11):1921–1928.
204. Kong G-H, Bu J-Y, Kurosaki T, Shaw AS, Chant AC. Reconstitution of Syk function by the ZAP-70 protein tyrosine kinase. *Immunity*. 1995;2(5):485–492.
205. Ticchioni M, Charvet C, Noraz N, et al. Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood*. 2002;99(9):3111–3118.
206. Dar WA, Knechtle SJ. CXCR3-mediated T-cell chemotaxis involves ZAP-70 and is regulated by signalling through the T-cell receptor. *Immunology*. 2007;120(4):467–485.

207. Caligaris-Cappio F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2003;123(3):380–388.
208. Bertilaccio MTS, Scielzo C, Simonetti G, et al. Xenograft models of chronic lymphocytic leukemia: problems, pitfalls and future directions. *Leukemia.* 2012;
209. Mockridge CI, Potter KN, Wheatley I, et al. Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood.* 2007;109(10):4424–4431.
210. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, et al. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2003;101(3):1087–1093.
211. Morabito F, Cutrona G, Gentile M, et al. Prognostic relevance of in vitro response to cell stimulation via surface IgD in binet stage a CLL. *Br. J. Haematol.* 2010;149(1):160–163.
212. Guarini A, Chiaretti S, Tavolaro S, et al. BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgVH unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood.* 2008;112(3):782–792.
213. Hu C, Xiong J, Zhang L, et al. PEG10 Activation by Co-Stimulation of CXCR5 and CCR7 Essentially Contributes to Resistance to Apoptosis in CD19+CD34+ B Cells from Patients with B Cell Lineage Acute and Chronic Lymphocytic Leukemia. 2004;
214. Chunsong H, Yuling H, Li W, et al. CXC chemokine ligand 13 and CC chemokine ligand 19 cooperatively render resistance to apoptosis in B cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia CD23+ CD5+ B cells. *J. Immunol.* 2006;177(10):6713–6722.
215. Guinamard R, Signoret N, Ishiai M, et al. B cell antigen receptor engagement inhibits stromal cell-derived factor (SDF)-1 α chemotaxis and promotes protein kinase C (PKC)-induced internalization of CXCR4. *J. Exp. Med.* 1999;189(9):1461.
216. Vlad A, Deglesne PA, Letestu R, et al. Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer Res.* 2009;69(16):6387.
217. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:891–928.

218. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*. 1999;99(1):23–33.
219. Tichioni M, Essafi M, Jeandel PY, et al. Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene*. 2007;26(50):7081–7091.
220. Cuesta-Mateos C, López-Giral S, Alfonso-Pérez M, et al. Analysis of migratory and prosurvival pathways induced by the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Exp. Hematol*. 2010;38(9):756–764.
221. Buchner M, Baer C, Prinz G, et al. Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(22):4497–4506.
222. Calpe E, Codony C, Baptista MJ, et al. ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood*. 2011;118(16):4401–4410.
223. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med*. 1996;184(3):1101–1109.
224. Vaisitti T, Aydin S, Rossi D, et al. CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2010;24(5):958–969.
225. Bürkle A, Niedermeier M, Schmitt-Gräff A, et al. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007;110(9):3316–3325.
226. Kremer KN, Humphreys TD, Kumar A, Qian NX, Hedin KE. Distinct role of ZAP-70 and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa in the prolonged activation of extracellular signal-regulated protein kinase by the stromal cell-derived factor-1 α /CXCL12 chemokine. *J. Immunol*. 2003;171(1):360.
227. Niedermeier M, Hennessy BT, Knight ZA, et al. Isoform-selective phosphoinositide 3'-kinase inhibitors inhibit CXCR4 signaling and overcome stromal cell-mediated drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: a novel therapeutic approach. *Blood*. 2009;113(22):5549–5557.

228. Ponader S, Chen SS, Buggy JJ, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood*. 2012;119(5):1182–1189.
229. De Rooij MFM, Kuil A, Geest CR, et al. The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;
230. Hoellenriegel J, Coffey GP, Sinha U, et al. Selective, novel spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitors suppress chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and migration. *Leukemia*. 2012;26(7):1576–1583.
231. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(13):2578–2585.
232. Herman SE, Johnson AJ. Molecular Pathways: Targeting Phosphoinositide 3-Kinase p110-Delta in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin. Cancer Res*. 2012;18(15):4013–4018.
233. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood*. 2011;117(23):6287–6296.