

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Papel de microambiente en la respuesta de células de
leucemia linfocítica crónica a trióxido de arsénico:
mecanismos de resistencia**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Irene Amigo Jiménez

Directora

María de los Ángeles García Pardo

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina



**PAPEL DEL MICROAMBIENTE EN LA RESPUESTA DE
CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA A
TRIÓXIDO DE ARSÉNICO: MECANISMOS DE
RESISTENCIA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

M^a Irene Amigo Jiménez

BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DOCTORA

M^a de los Ángeles García Pardo

Madrid, 2015



Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Bioquímica,
Biología Molecular y Biomedicina

La Dra. M^a de los Ángeles García Pardo, investigadora principal del grupo de Mecanismos Patológicos en Neoplasias Hematológicas Humanas en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, CSIC) de Madrid.

CERTIFICA

Que el trabajo titulado "**Papel del microambiente en la respuesta de células de leucemia linfocítica crónica a trióxido de arsénico: Mecanismos de resistencia**", que presenta M^a Irene Amigo Jiménez para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizado bajo su dirección en el CIB, y reúne la calidad y contenidos suficientes para ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Para que así conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Madrid a 17 de Junio de 2015.

Fdo. M^a de los Ángeles García Pardo

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC
Departamento de Medicina
Celular y Molecular



La presente tesis doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) con los proyectos SAF2009-07035, SAF2012-31613 (AGP) y RTICC (Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer) RD06/0020/0011 (AGP), y por la Comunidad de Madrid/Unión Europea con el proyecto S2010/BMD-2314-Neoplasbim (AGP).

M^a Irene Amigo Jiménez ha disfrutado de una beca JAE-Predoc del Programa Junta de Ampliación de Estudios (JAEPred2010-00607) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Unión Europea y de un contrato financiado por el proyecto SAF-2012-31613, MINECO.

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

Marcel Proust

*A las musas que me han inspirado
durante la escritura de este libro...*

...A mi madre, a María, a mi gente

Agradecimientos

La verdad, no sé a ciencia cierta cuándo llegará "El Gran Día", sin embargo, hoy he sentido la necesidad imperante de escribir los agradecimientos de mi tesis o, como yo la he bautizado, "El Libro de Mi Vida". Pues vamos a ello: GRACIAS, GRACIAS A TODOS LOS QUE DE UNO U OTRO MODO HAN CONTRIBUIDO AL DESARROLLO DE ESTA MI TESIS DOCTORAL. Ya está. Noooo, es broma. Creo que tengo algo más que decir...

Gracias, a la Dra. M^a de los Ángeles García Pardo, mi directora de tesis, por haberme acogido en su laboratorio, dándome así la oportunidad de desarrollar el presente trabajo, y por enseñarme a ser mejor persona tanto personal como laboralmente.

Gracias a "Peter" (Pedro Lastres Varo), el "citometrero" del CIB, por todo lo que me ha enseñado: Horas y horas hablando de experimentos intercalados con relatos de... "la vida misma", y ajustando la sensibilidad de los detectores para poder ver a la escurridiza e insufrible MMP-9 (tan famosa que le hicimos una canción y todo: "La MMMMMMP-9, como me gusta, la MMMMMMP-9, by Stefi").

Gracias a los miembros de los otros servicios del CIB que han hecho posible el desarrollo del presente trabajo. En especial, gracias a Gema y a Maite, del servicio de microscopía confocal, que, aunque sólo he visitado en ciertas ocasiones, siempre han hecho de la "oscuridad " un sitio acogedor en el que dejarte los ojos intentando ver proteínas que no se ven...

Gracias al Dr. José A. García Marco, nuestro "médico de familia", por el envío de las muestras de las valiosas muestras de pacientes sin las cuales este trabajo no hubiera sido posible. Gracias, también, a Carol Lozano Santos, con quien he colaborado codo con codo; gracias por su paciencia para conmigo, por escucharme siempre y valorarme tanto personal como profesionalmente.

Gracias, también, a la Dra. María José Terol por el envío de muestras de pacientes, y al Dr. Francisco Sánchez Madrid por la donación de anticuerpos.

Gracias a "La Hermandad 141-142", como la ha bautizado "Solecito", así como a los miembros de los laboratorios anexos (y no tan anexos) por acogerme como era y quererme como soy; por apoyarme siempre y por enseñarme que el compañerismo y el trabajo en equipo son los pilares básicos de cualquier actividad humana. Gracias por brindarme un hombro en el que llorar las derrotas del día a día; por hacerme reír y reiros conmigo; por aconsejarme y enseñarme a ser mejor personal y profesionalmente. Gracias por hacerme crecer, por ser un apoyo incondicional entre estas cuatro paredes de un gris tan familiar que ya no parece tan gris y a las que, después de tanto tiempo, se les coge un cariño insospechable...Gracias chic@s por hacer mi "Viaje al centro de la Tesis" un poquito más llevadero...

En particular, gracias a Estefi y a Elvira, porque sin ellas nada de esto hubiera sido posible; gracias por darme fuerzas para continuar en la lucha y ayudarme a vencer cada batalla...Gracias a Noemí Aguilera porque ella es el mayor remanso de paz que nunca he conocido; gracias por escucharme siempre; gracias por tus palabras, por tus consejos, por tus sonrisas; gracias por transmitirme tu aparente tranquilidad y sosiego en los malos momentos, por entenderme y comprender siempre...Gracias a Rubén Bartolomé, porque tú me ayudaste a "ver La luz"; gracias por tu apoyo, por tus bromas y, en definitiva por estar siempre dispuesto a escuchar, aconsejar y consolar con el "uaua" (con o sin palmadita en la espalda) a pequeñas mentes moldeables...Gracias a Sole por comprenderme siempre desde una realidad paralela. Gracias a Martita por desprender alegría en el pasillo y saludarme siempre con una sonrisa. Gracias a Silvia porque con sus manualidades nos ha hecho reír a todos y por ser una tía de esas, biotecnólogas, que ya no quedan. Gracias a Mónica Martínez por enseñarme a reír y ser "una tía molonga" donde las haya...Gracias a Clara "sexy" porque "sufrirme en silencio" en mi época de "Síndrome pretésico", entre otros; espero que hayas aprendido mucho y te lo hayas pasado mejor con "las Geli's". No olvides nunca que "las cosas del *lab* se hacen con cariño", también...Gracias a Emi (te echamos tanto de menos cuando te fuiste del labo al "zulito" -snif, sniff-, librándote de la divertida tarea de hacer geles y *bufferes*) por dejar el

pasillo lleno de sonrisas cada vez que pasas por él; gracias por todos los consejos que me has dado y por todo lo que me has ayudado durante estos años; por animarme en momentos malos MALOS, y por "meterme caña" siempre para mejorar determinados aspectos tanto personales como laborales...Gracias a la Nohemí (con "h") porque pase lo que pase siempre sonríes y das una visión más realista y optimista de las cosas que, en determinados momentos (cuando no ves "la luz al final del túnel"), siempre...,es esencial... Gracias a Mónica Aceves por ayudarme a forjar una paciencia infinita...Gracias también a otros "CIB-eros" que estuvieron y ya no están, o que aún siguen estando: A los chic@s de Santiago y a Santiago, a los chicos de Jesús del Mazo, especialmente a Jesús, gracias por "prohibirme" decir palabras *frikis* fuera del trabajo: Desconectar es muy importante si no quieres pasar de "loco por la Ciencia" a "científico loco". A nuestra manchega (ahora "fifty-fifty" manchego-americana) M^a Ángeles, por enseñarme una sabia forma de ver la vida basada en "La Teoría de la Teja"...A Ana Dios que con su coraza de "femme fatal" me enseñó a decir NO y a sacar sonrisas imposibles...A Pablito, que aunque sólo coincidí brevemente con él, es un chico encantador y un "libro abierto" al que podías preguntarle casi por cualquier cosa (y yo le pregunté muchas)...A los chic@s de Ignacio Casal (Irene, Sofía, Alberto, Roi, Bea, y también Rubén, que ya es la segunda vez que lo menciono)...A Lucía (mi paisana) por las conversaciones de las 8 y pico de la tarde, y los círculos viciosos de agobios retroalimentados (insanos y poco productivos, pero necesarios en esta época de "sonrisas y lágrimas")...A Helga (mi "Angry bird" particular) por los buenos momentos que hemos pasado juntas y por apoyarme en periodos vitales complicados...A todos los chic@s que conocí en mi periodo de rebeldía en la "Plataforma InvestigAcción" (Miguel, Héctor, Gonzalo...)...En definitiva, gracias a todos aquellos "cibereros" que me habéis dado fuerzas (con una sonrisa por el pasillo, un mero saludo...) durante este brevemente eterno periodo de tiempo...GRACIAS. Os echaré mucho de menos allá donde vaya, siempre.

Gracias a mis hermanos, Jose y David, porque somos el "perfecto pack de 3", como uno de esos *packs* indivisibles que hay en el supermercado...un *pack* imperfecto y

de lo más heterogéneo y que, durante muchos años hemos estado "más revueltos que juntos", pero que en nuestro corazón no hay 2 sin 3. Gracias por enseñarme a no querer ser perfecta y por los debates sobre Ciencia. David, aprovecho para decirte que tus ideas sobre la curación del cáncer son dignas de una película de nanotecnología y robótica; de lo más ingenioso que he escuchado, pero, siento decirte que "los pequeños robots que luchan contra las células tumorales", hoy por hoy, no son del todo viables. Y a ti Jose, mi "McGiver" particular, deja de idear cosas que cualquier día vas a volar la casa. En serio, gracias por enseñarme a tomarme las cosas "de otra manera" (no sé si mejor, pero sí menos dañina para la salud), por transmitirme la tranquilidad que te caracteriza con tus "pero si no lo haces no se va a acabar el mundo" (¡Pues también es verdad!). En fin, que os quiero mucho...

Gracias a mi tía, Tere, por guiarme en el camino de la vida; gracias por transmitirme tu sosiego y por tus valiosos consejos; gracias también por apoyarme siempre y por los baños de sinceridad aplastante que siempre vienen bien..., al menos, no del todo mal. Gracias también a Adriana, con su personalidad de "minipersonita", porque su nacimiento me ayudó a sobrellevar un momento complicado de mi vida, donde nada llegaba ni siquiera a gris...

Gracias al resto de mi familia porque de una u otra manera me ha apoyado en los momentos duros. En especial, gracias a Chuchi y Roge porque han sido nuestros segundos padres, y a mis abuelos maternos, que nos han acogido mayorcitos y nos han ayudado a construir de nuevo un futuro prometedor...

Gracias a María porque, desde que te conozco, hasta lo más malo me parece lo más bueno; gracias por tu apoyo incondicional y por comprenderme siempre...; gracias por ser el mayor pilar en el peor momento...Gracias por escucharme, por consolarme; por querer aprender "cosas de ciencia" para comprenderme aún mejor...Gracias por tu sensibilidad para con todo, para conmigo...; gracias por valorar y disfrutar cada pequeño detalle, cada pequeña cosa...Gracias por apoyar mi vertiente "minichef" (¡nunca se sabe

dónde acabará uno!), por decirme siempre que todo está rico; por valorar todo lo que he tratado de enseñarte y por querer aprender...Gracias por las llamadas, los mensajes y los detalles reparadores...Y disculpa que, a veces, sólo a veces, aunque muchas veces..., no haya sabido entenderte como te lo merecías...Gracias por enseñarme a disfrutar de la vida un poquito más, y hacerme una personita un poco más "humana" (de esas que duermen y comen...); por comprender y respetar mi modo de ser y de entender el mundo...Gracias por valorar mi esfuerzo y sacrificio en lugar de reprocharme falta de tiempo...GRACIAS...

Y, finalmente GRACIAS a mi madre, Rosa (o "Minimeryrouse" como yo te llamo), por apoyarme siempre en todo aquello que he emprendido en mi vida y, también, por preguntarme insistentemente durante estos cinco años "si he descubierto algo"; y también, por intentar ayudarme con los experimentos con aquello de "no pasa nada cariño, tú lo repites despacito y ya verás como te sale"...o aquello otro: "Pero, ¿por qué no te sale? Hazlo despacito pensando lo que haces, ya verás como te sale bien". Me gustaría, también, disculparme por todo lo que te he hecho sufrir, así como decirte que te quiero mucho, que eres la mejor madre del mundo y que tu coraje, tu valía, tu fuerza de voluntad y tu alma de luchadora nata, eso y sólo eso, es lo que ha hecho posible que yo esté hoy aquí, a punto de ser doctora. La "mujer coraje", la más fuerte de las que conozco, y en base a lo que, día tras día, lucho por explotar al máximo mi genética para conseguir parecerme a ti aunque sólo sea un poquito...

Estos cinco años me han enseñado muchas cosas, habiendo crecido más como persona y profesional que con nada en toda mi vida. Pero, sobre todo, he aprendido que... *Vísteme despacio que tengo prisa y la paciencia es la madre de la ciencia...*es decir, que a veces, muchas veces (de hecho la mayoría de las veces), es necesario salir de la tormenta de ideas y sucesos encadenados que te envuelve, y parar (PARAR: estar literalmente quieto en el espacio y en el tiempo), para mirar hacia atrás, hacia el pasado, y ver el camino recorrido, analizarlo, y así construir un camino más sólido que recorrer en un futuro cercano...tan cercano que, a veces, siempre..., asusta...

Índices

ÍNDICE DE CONTENIDOS

SUMMARY	37
RESUMEN	43
1. INTRODUCCIÓN	49
1.1. LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA B: GENERALIDADES	49
1.1.1. Epidemiología y principales características.....	49
1.1.2. Estratificación del riesgo. Marcadores pronóstico	49
1.1.2.1. Sistemas de clasificación de Rai y Binet.....	50
1.1.2.2. Marcadores pronóstico	51
1.1.3. Resistencia a la apoptosis vs proliferación.....	53
1.2. APOPTOSIS	53
1.2.1. Cambios morfológicos y bioquímicos durante la apoptosis.....	55
1.2.2. Vías de la apoptosis	55
1.2.3. La familia Bcl-2.....	57
1.2.3.1. Clasificación de las proteínas de la familia Bcl-2	57
1.2.3.2. Regulación de las proteínas de la familia Bcl-2	59
1.3. EL MICROAMBIENTE DE LA LLC	62
1.3.1. Los escenarios de la LLC: Definiendo el microambiente.....	63
1.3.1.1. Sangre periférica.....	64
1.3.1.2. Médula ósea	64
1.3.1.3. Tejidos linfoides secundarios	64
1.3.2. Interacciones entre las células LLC y su microambiente.....	65
1.3.2.1. Estimulación del BCR	65
1.3.2.2. Interacciones entre células LLC y MSCs	65
1.3.2.3. Interacciones entre células LLC y células T.....	66
1.3.2.4. Interacción entre células LLC y células FDCs	67
1.3.2.5. Interacciones entre células LLC y NLCs	67
1.3.2.6. Interacciones entre células LLC y células endoteliales.....	68
1.3.2.7. Otras interacciones	69

1.3.3. La MMP-9 como componente clave del microambiente de la LLC.....	70
1.3.3.1. Expresión y regulación.....	70
1.3.3.2. Funciones	71
1.4. TRATAMIENTO DE LA LLC	73
1.4.1. Visión panorámica del tratamiento de la LLC.....	73
1.4.2. Resistencias al tratamiento: Integración.....	75
1.4.3. El trióxido de arsénico como potencial terapia para la LLC.....	76
2. OBJETIVOS.....	81
3. MATERIAL Y MÉTODOS	85
3.1. Pacientes, células y cultivos celulares	85
3.2. Anticuerpos y reactivos.....	88
3.2.1. Anticuerpos.....	88
3.2.2. Reactivos.....	89
3.3. RT-PCR y ensayos de estabilidad de RNA.....	91
3.4. PCR cuantitativa.....	92
3.5. Silenciamiento génico	92
3.6. Ensayos de viabilidad celular/apoptosis	93
3.7. Fraccionamiento membrana-citosol.....	94
3.8. Análisis de la expresión de MMP-9.....	95
3.9. Zimografía.....	96
3.10. Inmunoprecipitación y <i>Western blotting</i>.....	96
3.11. Cocultivos	98
3.12. Inmunofluorescencia	98
3.13. <i>Microarrays</i> de RNA.....	99

3.14. Análisis estadísticos.....	100
4. RESULTADOS.....	103
4.1. Efecto citotóxico del ATO en células de LLC	103
4.2. Perfil de expresión génica en células LLC en respuesta a ATO	105
4.2.1. Genes diferencialmente expresados en células de LLC en respuesta a ATO	105
4.2.2. Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados en respuesta al tratamiento con ATO	108
4.2.3. Análisis funcional de los genes inducidos por ATO y relacionados con la regulación de la apoptosis	113
4.3. Papel de la hemooxigenasa-1 en la apoptosis inducida por ATO	115
4.3.1. La expresión de hemooxigenasa-1 se induce fuertemente en células de LLC tras el tratamiento con ATO	115
4.3.2. HMOX-1 favorece el efecto citotóxico del ATO	116
4.4. Papel de MMP-9 en la respuesta de células LLC a agentes citotóxicos	117
4.4.1. ATO induce la expresión de MMP-9 a nivel transcripcional en células de LLC a través de la activación de AP-1 (c-Fos/c-Jun).....	117
4.4.2. La MMP-9 inducida por ATO se localiza principalmente en la membrana celular a través de la interacción con el complejo receptor integrina $\alpha 4\beta 1/CD44$	120
4.4.3. La MMP-9 inducida en respuesta a ATO está asociada al proceso apoptótico	122
4.4.4. El tratamiento con Fludarabina también induce la transcripción y localización en membrana de la MMP-9.....	125
4.4.5. La MMP-9, aislada o presente en el estroma, induce resistencia de células LLC a ATO y Fludarabina	126
4.4.6. Las células MEC-1 también inducen MMP-9 en respuesta a ATO y Fludarabina.....	129
4.4.7. La sobreexpresión de MMP-9 en células MEC-1 reduce la sensibilidad a ATO y Fludarabina	130
4.4.8. La MMP-9 induce resistencia a fármacos mediante la modulación del balance entre las proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl-2.....	133
4.4.9. La MMP-9 también regula el balance entre los miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 en células LLC primarias tratadas con ATO	137

4.5. Papel del estroma de médula ósea en la resistencia a ATO en células LLC	140
4.5.1. Las células estromales protegen a las células LLC de la apoptosis inducida por ATO..	140
4.5.2. La protección frente a ATO inducida por estroma implica interacciones con las células LLC a través de las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_L\beta_2$, así como factores solubles.	142
4.5.3. Vías de señalización inducidas en células LLC cocultivadas con células estromales y efecto del tratamiento con ATO	146
4.5.4. Modulación de las proteínas de la familia Bcl-2 en células LLC cocultivadas con células estromales y expuestas a ATO	149
4.5.5. Implicación de PI3K y PKC en la resistencia a ATO inducida por estroma	152
4.5.6. El bloqueo de las vías PI3K δ /PKC β -Akt-NF- κ B/STAT3 inhibe la inducción de Mcl-1 y la resistencia a ATO inducida por estroma en células LLC	155
4.5.7. El silenciamiento de Mcl-1 revierte la resistencia a ATO inducida por estroma en células LLC.....	158
5. DISCUSIÓN	163
6. CONCLUSIONES	177
7. REFERENCIAS.....	181
7.1. Artículos científicos	181
7.2. Otras fuentes	203
8. ABREVIATURAS.....	207
9. ANEXOS	215

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación entre apoptosis y necrosis.....	54
Figura 2. Vías de la apoptosis.....	56
Figura 3. La familia Bcl-2.....	58
Figura 4. Modelos de control del "interruptor apoptótico".....	59
Figura 5. Microambiente de la LLC: Compartimentos.....	63
Figura 6. Interacciones moleculares en el microambiente de la LLC.....	68
Figura 7. Funciones de la MMP-9 en LLC.....	72
Figura 8. Principales tratamientos de la LLC y sus dianas moleculares.....	74
Figura 9. Mecanismo de acción del ATO en células LLC.....	77
Figura 10. Estados secuenciales de muerte por apoptosis <i>in vitro</i> y detección mediante Anexina V-FITC/PI.....	93
Figura 11. Apoptosis inducida por ATO en células MEC-1.....	104
Figura 12. Genes diferencialmente expresados en respuesta a ATO en células LLC.....	106
Figura 13. Análisis funcional de los genes reprimidos por el tratamiento con ATO.....	108
Figura 14. Análisis funcional de los genes inducidos por el tratamiento con ATO.....	109
Figura 15. Genes inducidos por ATO e implicados en la regulación de la apoptosis.....	113
Figura 16. Expresión de HMOX-1 en células LLC en respuesta a ATO.....	115
Figura 17. Modulación de la actividad HMOX-1 en células LLC y respuesta a ATO.....	116
Figura 18. ATO induce transcripcionalmente la expresión de MMP-9 en células LLC.....	118
Figura 19. ATO induce transcripcionalmente la expresión de <i>c-Fos</i> y <i>c-Jun</i> en células LLC.....	119
Figura 20. ATO induce la expresión a nivel de proteína de c-Fos y la fosforilación de c-Jun.....	120
Figura 21. La MMP-9 inducida por ATO se localiza en la superficie celular.....	121
Figura 22. La integrina $\alpha_4\beta_1$ y CD44 actúan como receptores para la MMP-9 inducida por ATO.....	122

Figura 23. La MMP-9 se localiza en la membrana de las células apoptóticas tempranas en respuesta a ATO.....	123
Figura 24. La inducción de MMP-9 y su localización en membrana está ligada a la apoptosis inducida por ATO.....	123
Figura 25. La inducción de MMP-9 y su localización en membrana es una respuesta inicial de las células LLC a la acción citotóxica del ATO.....	124
Figura 26. La Fludarabina induce la expresión y localización en membrana de MMP-9 en células LLC.....	125
Figura 27. La MMP-9 exógena induce resistencia a ATO y Fludarabina en células LLC.....	126
Figura 28. La MMP-9 presente en el estroma de médula ósea induce resistencia a ATO en células LLC.....	128
Figura 29. Efecto citotóxico del ATO y la Fludarabina en células MEC-1.....	129
Figura 30. ATO induce la transcripción y localización en membrana de MMP-9 en células MEC-1.....	130
Figura 31. Expresión de MMP-9 en células Mock- y MMP-9-MEC-1.....	131
Figura 32. Respuesta de células Mock- y MMP-9-MEC-1 a ATO y Fludarabina.....	132
Figura 33. Silenciamiento de MMP-9 en transfectantes de MEC-1 y respuesta a ATO.....	133
Figura 34. La sobreexpresión de MMP-9 en células MEC-1 previene la reducción de los niveles de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 en respuesta a ATO.....	134
Figura 35. En células MMP-9-MEC-1, Mcl-1 se encuentra bloqueando Bim incluso en presencia de ATO.....	135
Figura 36. La sobreexpresión de MMP-9 en células MEC-1 previene la reducción de los niveles de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 en respuesta a Fludarabina.....	136
Figura 37. La adhesión a MMP-9 previene la reducción de los niveles de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 en respuesta a ATO en células LLC.....	138
Figura 38. Mecanismo de resistencia a fármacos inducido por MMP-9 en células de LLC.....	139
Figura 39. Las células estromales protegen a las células LLC de la apoptosis inducida por ATO.....	142
Figura 40. Expresión de VCAM-1 y ICAM-1 en los diferentes tipos de células estromales.....	143

Figura 41. Las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_L\beta_2$ están implicadas en la resistencia a ATO inducida por estroma en células LLC.....	144
Figura 42. La resistencia a ATO inducida por estroma también implica factores solubles.....	145
Figura 43. Quinasas activadas en células LLC cultivadas con células estromales y efecto del ATO.....	147
Figura 44. NF- κ B y STAT3 están activados en células LLC cocultivadas con células estromales incluso en presencia de ATO.....	148
Figura 45. Akt está completamente activo en células LLC cocultivadas con células estromales.....	149
Figura 46. Modulación de las proteínas de la familia Bcl-2 en células LLC cocultivadas con células HS-27A y efecto del ATO.....	150
Figura 47. Modulación de las proteínas de la familia Bcl-2 en células LLC cocultivadas con células HS-5 y efecto del ATO.....	151
Figura 48. Ratios entre los miembros antiapoptóticos y proapoptóticos de la familia Bcl-2 en células LLC cocultivadas con estroma y efecto del ATO.....	152
Figura 49. Las vías PI3K/Akt y PKC y los factores de transcripción NF- κ B y STAT3 están implicados en la resistencia a ATO inducida por estroma en células de LLC.....	153
Figura 50. PI3K δ and PKC β están implicadas en la resistencia a ATO inducida por estroma en células LLC.....	154
Figura 51. PI3K δ y PKC β están implicadas en la activación de Akt, NF- κ B y STAT3 en células de LLC cultivadas con estroma.....	155
Figura 52. El bloqueo de PI3K δ o PKC β inhibe el aumento de Mcl-1 y Bcl-xL y la resistencia a ATO inducidos por estroma en células LLC.....	156
Figura 53. El efecto de los pan-inhibidores LY y Bis I sobre los niveles de Mcl-1 y Bcl-xL en células LLC cocultivadas con estroma es similar al producido por Idelalisib y Sotrastaurina.....	157
Figura 54. El bloqueo de NF- κ B y STAT3 inhibe el aumento de Mcl-1 y la resistencia a ATO inducidos por estroma en células LLC.....	158
Figura 55. Mcl-1 juega un papel clave en la resistencia a ATO inducida por estroma.....	159
Figura 56. Mecanismos subyacentes a la resistencia a ATO inducida por estroma y estrategias para revertirla.....	160

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificaciones de Rai y Binet. Correspondencias y valor pronóstico.....	50
Tabla 2. Principales marcadores pronóstico en LLC.....	52
Tabla 3. Perfiles de interacción entre las proteínas de la familia Bcl-2.....	60
Tabla 4. Características clínicas de los pacientes de LLC.....	86
Tabla 5. Anticuerpos utilizados en el presente trabajo.....	88
Tabla 6. Reactivos utilizados en el presente trabajo.....	89
Tabla 7. Relación de los 15 genes más regulados en respuesta a ATO.....	107
Tabla 8. Análisis funcional detallado de los 15 genes más inducidos por ATO.....	110
Tabla 9. Análisis funcional detallado de los 15 genes más reprimidos por ATO.....	111
Tabla 10. Genes inducidos por ATO e implicados en la regulación de la apoptosis.....	113
Tabla 11. Análisis funcional detallado de los genes inducidos por ATO e implicados en la regulación de la apoptosis.....	114
Tabla 12. Características de los modelos de estroma de médula ósea.....	140

Summary

SUMMARY

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the accumulation of malignant CD5+ B lymphocytes (CLL cells) in the peripheral blood. The progression of the disease is determined by CLL cell infiltration in lymphoid organs, mainly lymph nodes and bone marrow, where they receive survival signals from common components of these tissue microenvironments, such as MMP-9 and stromal cells. These survival signals impair therapy, indeed, despite the efforts made, CLL remains an incurable disease, becoming crucial to continue searching for new therapeutic options based on the contribution of the microenvironment to the disease progression. Arsenic trioxide (ATO) is successfully employed for the treatment of acute promyelocytic leukemia and is being trialed for other hematological malignancies, including CLL. Indeed, ATO induces apoptosis in all CLL cases and could constitute an efficient therapy for this disease.

Objectives

In this context, the work that makes up this Doctoral Thesis is organized around three main objectives:

- Molecular characterization of the ATO effect in CLL cells.
- Determination of the role of MMP-9 in the CLL cell response to ATO.
- Analysis of the influence of other molecules and signaling pathways induced by the microenvironment in the CLL cell response to ATO.

Methodology

We used B lymphocytes from the peripheral blood of 47 CLL patients (CLL cells) and MEC-1 cells (CLL-derived), both the parental cell line as MMP-9 stable transfectants. We used also co-cultures of CLL cells and bone marrow stromal cells (BMSCs), as well as BMSC-conditioned medium. The effect of drugs (ATO and fludarabine) was determined by

flow cytometry, using Annexin V-FITC/propidium iodide, and by the MTT assay. The global gene expression profile of MEC-1 cells in response to ATO was analyzed by RNA microarrays. Expression of mRNA was measured by RT-PCR and qPCR. Secreted and cell-bound MMP-9 was analyzed by gelatin zymography and flow cytometry, respectively. Protein expression and association was analyzed by Western blotting and immunoprecipitation, respectively. Gene silencing was performed by nucleofection of specific siRNAs. Statistical analyses were performed using the two-tailed Student's t-test and a p value of ≤ 0.05 was considered significant.

Results

The gene expression profile induced by ATO in CLL cells reflects an antioxidant and defensive response. Indeed, among the most significantly enriched Gene Ontology terms in the group of upregulated genes were found regulation of apoptosis, response to wounding and response to oxidative stress. Since the main effect of ATO in CLL cells is the induction of apoptosis, we were interested in the genes related to regulation of this process (*HMOX1*, *HSPA1B*, *CLU*, *TNFRSF9*, *GCLM*, *NQO1*, *SQSTM1*, *CTSB* and *MMP9*), particularly in those encoding HMOX-1 and MMP-9 due to their roles on oxidative stress regulation and CLL cell survival, respectively. We have studied the role of HMOX-1 and MMP-9 in the CLL cell response to ATO and found that this agent upregulates HMOX-1 (mRNA and protein) in CLL cells and this seem to favor its cytotoxic effect, thus suggesting a proapoptotic role for HMOX-1 in response to ATO. On the other hand, ATO also upregulates MMP-9 (mRNA and protein) and its localization at the surface of early apoptotic cells, being both processes dependent on apoptosis onset. These results suggest a role for MMP-9 in the CLL cell response to these drugs. Indeed, isolated or stromal MMP-9 induce CLL cell resistance to ATO and fludarabine, which is also achieved by overexpressing MMP-9 in MEC-1 cells and is reversed by *MMP9* gene silencing. The molecular mechanism underlying MMP-9-induced drug resistance involves modulation of the balance between the anti- and pro-apoptotic Bcl-2 family members.

Culturing CLL cells on BMSCs also protects CLL cells from the ATO-induced apoptosis and this protection is overcome by blocking MMP-9 or $\alpha_4\beta_1$ and/or $\alpha_L\beta_2$ integrins. The BMSC-conditioned medium also partially protects CLL cells against ATO-induced apoptosis, indicating that both cell-cell interactions and soluble factors are contributing to BMSC-induced resistance to ATO in CLL cells. We have studied the molecular mechanism involved in this protection and found that BMSCs induce PI3K/Akt, PKC, Lyn and ERK activation, as well as NF- κ B and STAT3, and also upregulates Mcl-1 and Bcl-xL in CLL cells. Using inhibitors of these pathways, we demonstrated that PI3K and PKC are involved in the stroma-induced resistance to ATO. Further, blocking PI3K δ or PKC β isoforms with Idelalisib or Sotrastaurin, respectively, inhibits Akt phosphorylation, NF- κ B/STAT3 activation and Mcl-1 upregulation and restores CLL cell sensitivity to ATO. Likewise, *MCL1* gene silencing also overcomes the protecting effect of stroma and confirms the key role of this protein in the mechanism of stroma-induced resistance to ATO in CLL cells.

Conclusions

In CLL cells, ATO induces expression of genes related with an antioxidant and defensive response. HMOX-1 seems to favor the cytotoxic effect of ATO, while MMP-9 promotes cell survival via modulation of the balance between the pro and antiapoptotic members of the Bcl-2 family. BMSCs also induce resistance to ATO in CLL cells and this protection is overcome by blocking MMP-9 or the integrins $\alpha_4\beta_1$ or $\alpha_L\beta_2$. The molecular mechanism underlying this resistance involves activation of the PI3K δ /PKC β →Akt→NF- κ B/STAT3→Mcl-1, and blocking PI3K δ and PKC β restores sensitivity to ATO. Taken together, our results indicate that combination of ATO with specific inhibitors for MMP-9 and/or PI3K δ and PKC β may constitute an efficient alternative/complementary therapy for CLL.

Resumen

RESUMEN

Introducción

La leucemia linfocítica crónica (LLC) se caracteriza por acumulación en sangre periférica de linfocitos B aberrantes CD5+ (células LLC). La enfermedad progresa cuando estas células infiltran los órganos linfoides, principalmente los ganglios linfáticos y la médula ósea, donde reciben señales de supervivencia procedentes de componentes comunes de estos microambientes tisulares, como la MMP-9 y las células estromales. Estas señales de supervivencia dificultan la terapia, de hecho, a pesar de los avances realizados, la LLC continúa siendo una enfermedad incurable, tornándose necesario desarrollar nuevas terapias sobre la base de esta contribución del microambiente a la progresión de la enfermedad. El trióxido de arsénico (ATO) se está empleando con éxito en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda y se está ensayando en otras neoplasias hematológicas, incluyendo la LLC. De hecho, el ATO induce apoptosis en todos los casos de LLC y podría constituir una eficiente terapia para esta enfermedad.

Objetivos

En este contexto, el trabajo que conforma la presente Tesis Doctoral se organiza en torno a tres objetivos principales:

- Caracterización molecular del efecto del ATO en células LLC.
- Determinación del papel de MMP-9 en la respuesta de células LLC a ATO.
- Análisis de la influencia de otras moléculas y rutas de señalización inducidas por el microambiente en la respuesta de células LLC a ATO.

Metodología

Se han utilizado linfocitos B procedentes de la sangre periférica de 47 pacientes de LLC (células LLC) y células MEC-1 (derivadas de LLC), tanto la línea parental como transfectantes estables de MMP-9. También se han utilizado cocultivos de células LLC con

células estromales de médula ósea (BMSCs), así como medio condicionado de BMSCs. El efecto de los fármacos (ATO y Fludarabina) se determinó por citometría de flujo, usando Anexina V-FITC/yoduro de propidio, y por el ensayo de MTT. El perfil global de expresión génica de células MEC-1 en respuesta a ATO se analizó mediante *microarrays* de RNA. La expresión de mRNA se determinó mediante RT-PCR y qPCR. La MMP-9 secretada y la ligada a la superficie celular se analizaron mediante zimografía y citometría de flujo, respectivamente. La expresión y la asociación de proteínas se determinaron mediante *Western blotting* e inmunoprecipitación, respectivamente. Los silenciamientos génicos se realizaron mediante nucleofección de siRNAs específicos. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el test t de Student de dos colas y considerando significativo un p valor ≤ 0.05 .

Resultados

El perfil de expresión génica inducido por ATO en células LLC refleja una respuesta antioxidante y defensiva. De hecho, entre los términos de Ontología Génica más significativamente enriquecidos en el grupo de genes inducidos por ATO se encontraron regulación de la apoptosis, respuesta a daño y respuesta a estrés oxidativo. Dado que el principal efecto del ATO en las células LLC es la inducción de apoptosis, nos interesamos en los genes relacionados con la regulación de este proceso (*HMOX1*, *HSPA1B*, *CLU*, *TNFRSF9*, *GCLM*, *NQO1*, *SQSTM1*, *CTSB* y *MMP9*), particularmente en los codificantes de HMOX-1 y MMP-9, por sus papeles en la regulación del estrés oxidativo y la supervivencia de las células LLC, respectivamente. Hemos estudiado el papel de HMOX-1 y MMP-9 en la respuesta de células LLC a ATO, encontrando que este agente induce HMOX-1 (mRNA y proteína) en células LLC y esto parece favorecer su efecto citotóxico, sugiriendo un papel proapoptótico para la HMOX-1 en respuesta a ATO. Por otra parte, ATO también induce MMP-9 (mRNA y proteína) y su localización en la superficie de células apoptóticas tempranas, estando ambos efectos ligados al proceso apoptótico. Estos resultados sugieren un papel para la MMP-9 en la respuesta de las

células LLC a estos fármacos. De hecho, la MMP-9 aislada o presente en el estroma induce resistencia de células LLC a ATO y Fludarabina, efecto que también se consigue sobreexpresando MMP-9 en células MEC-1 y puede revertirse silenciando MMP-9. El mecanismo molecular subyacente a la resistencia a fármacos inducida por MMP-9 implica modulación del balance entre los miembros anti y proapoptóticos de la familia Bcl-2.

El cultivo con BMSCs también protege a las células LLC de la apoptosis inducida por ATO y esta protección se revierte por el bloqueo de MMP-9 o de las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y/o $\alpha_L\beta_2$. El medio condicionado de BMSCs también protege parcialmente a las células LLC de la apoptosis inducida por ATO, indicando que tanto interacciones célula-célula como factores solubles contribuyen a la resistencia de células LLC a ATO inducida por BMSCs. Hemos estudiado el mecanismo molecular implicado en esta protección, encontrando que las BMSCs inducen activación de PI3K/Akt, PKC, Lyn y ERK, así como de NF- κ B y STAT3, y también aumentan la expresión de Mcl-1 y Bcl-xL, en células LLC. Utilizando inhibidores de estas vías, demostramos que PI3K y PKC están implicadas en la resistencia a ATO inducida por estroma. Además, el bloqueo de las isoformas PI3K δ o PKC β con Idelalisib o Sotrastaurina, respectivamente, inhibe la fosforilación de Akt, la activación de NF- κ B/STAT3 y la inducción de Mcl-1, restaurando la sensibilidad a ATO en células LLC. El silenciamiento de Mcl-1 también revierte el efecto protector del estroma, confirmando el papel esencial de esta proteína en el mecanismo de resistencia a ATO inducido por estroma en células LLC.

Conclusiones

En células LLC, ATO induce la expresión de genes relacionados con una respuesta antioxidante y defensiva como los codificantes de HMOX-1 y MMP-9. HMOX-1 parece favorecer el efecto citotóxico del ATO, mientras que MMP-9 promueve la supervivencia celular a través de la modulación del balance entre los miembros anti y proapoptóticos de la familia Bcl-2. Las BMSCs también inducen resistencia a ATO en células LLC y esta protección se revierte bloqueando MMP-9 o las integrinas $\alpha_4\beta_1$ o $\alpha_L\beta_2$.

El mecanismo molecular subyacente a esta resistencia consiste en la activación de la vía PI3K δ /PKC β →Akt→NF- κ B/STAT3→Mcl-1, y la inhibición de PI3K δ o PKC β restaura la sensibilidad a ATO. En conjunto, nuestros resultados indican que la combinación de ATO con inhibidores específicos de MMP-9 y/o PI3K δ y PKC β podría constituir una eficiente terapia alternativa/complementaria para la LLC.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA B: GENERALIDADES

1.1.1. Epidemiología y principales características

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la leucemia de adultos más frecuente en países occidentales ^{1,2}, diagnosticándose 3-5 nuevos casos por cada 100.000 habitantes y año ³. La edad media de diagnóstico es de 65 años y la prevalencia ligeramente superior en varones que en mujeres⁴. Se caracteriza por proliferación clonal, resistencia a la apoptosis *in vivo* y consiguiente acumulación en sangre periférica de linfocitos B monoclonales, morfológicamente maduros pero inmunológicamente inmaduros ^{5,6}. Estos linfocitos expresan CD19, CD22 y CD23, así como algunos antígenos de linaje T como CD5, y presentan una menor expresión de CD20 y CD79b que los linfocitos B normales ⁷. La progresión de la enfermedad se produce cuando estos linfocitos aberrantes (en adelante, células LLC) infiltran gradualmente los órganos linfoides, principalmente la médula ósea y los ganglios linfáticos ⁸⁻¹², ocasionando, finalmente, el fallo de los sistemas inmune y hematopoyético ^{11,13}. Muchos pacientes son asintomáticos, por lo que es frecuente que el diagnóstico se realice a través de un análisis de sangre convencional con un recuento de células B en sangre $\geq 5 \times 10^6/\text{mL}$ ¹⁴.

1.1.2. Estratificación del riesgo. Marcadores pronóstico

El curso clínico de la LLC es muy heterogéneo, existiendo pacientes en los que la enfermedad progresa rápidamente y mueren en dos o tres años a pesar de recibir tratamiento, mientras que otros viven durante décadas con la enfermedad sin necesidad de ser tratados ¹⁵. Dada esta heterogeneidad, para facilitar el manejo clínico, los pacientes se clasifican en grupos con pronóstico diferencial, siguiendo los sistemas de Rai y Binet ^{15,16}.

1.1.2.1. Sistemas de clasificación de Rai y Binet

El sistema de Rai distingue cinco estadios (0-IV, de menor a mayor riesgo) según los siguientes parámetros: linfocitosis ($> 15 \times 10^9$ linfocitos/L), anemia (nivel de hemoglobina en sangre periférica < 110 g/L), trombocitopenia ($< 100 \times 10^9$ plaquetas/L), y presencia o no de linfadenopatía, hepato y/o esplenomegalia ¹⁵ (Tabla 1). El sistema de Binet comprende tres estadios clínicos (A, B y C, en orden creciente de riesgo), según el número de áreas con infiltración linfoide y la presencia o no de linfocitosis y/o trombocitopenia ¹⁶ (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificaciones de Rai y Binet. Correspondencias y valor pronóstico.

SISTEMA DE CLASIFICACIÓN DE RAI				
Estadio	Parámetros			
0	Linfocitosis en SP y MO sin linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, anemia o trombocitopenia.			
I	Linfocitosis con linfadenopatía sin hepatoesplenomegalia, anemia o trombocitopenia.			
II	Linfocitosis con hepatomegalia o esplenomegalia, con/sin linfadenopatía			
III	Linfocitosis y anemia, puede o no haber linfadenopatía, hepatomegalia y/o esplenomegalia			
IV	Linfocitosis y trombocitopenia, con/sin linfadenopatía, hepatoesplenomegalia y/o anemia			
SISTEMA DE CLASIFICACIÓN DE BINET				
Estadio clínico	Parámetros			
A	< 3 sitios infiltrados, sin anemia ni trombocitopenia			
B	≥ 3 sitios infiltrados, sin anemia ni trombocitopenia			
C	> 3 sitios infiltrados, anemia y trombocitopenia			
INTEGRACIÓN DE LOS SISTEMAS DE RAI Y BINET				
Riesgo	Rai	Binet	Supervivencia media (años)	Tratamiento
Bajo	0	A	≥ 10	No
Intermedio	I/II	B	7 – 9	A veces
Alto	III/IV	C	1.5 a 5	Sí

SP: sangre periférica; MO: Médula ósea; Hb: Nivel de hemoglobina en SP.

Los sistemas de Rai y Binet suelen integrarse para dar lugar a un sistema simplificado de estratificación del riesgo que permite clasificar a los pacientes en tres grupos: bajo riesgo (Rai 0, Binet A), riesgo intermedio (Rai I/II, Binet B) y alto riesgo (Rai

II/IV y Binet C). El grupo de bajo riesgo comprende en torno al 80% de los pacientes diagnosticados *de novo* ¹⁷ y cuya supervivencia media supera los 10 años sin necesidad de tratamiento; los pacientes con riesgo intermedio pueden o no requerir tratamiento y viven entre 7 y 9 años; y los de alto riesgo, a pesar de que siempre son tratados, poseen una esperanza de vida de entre 1.5 y 5 años.

1.1.2.2. Marcadores pronóstico

Los sistemas de Rai y Binet se siguen usando en la actualidad, pero poseen algunas deficiencias ¹⁸, por lo que se complementan con determinados marcadores pronóstico (Tabla 2), consiguiéndose una mejor estratificación del riesgo ¹⁹⁻²³.

El estado mutacional de los genes codificantes de las regiones variables de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (genes *IGHV*) permite clasificar a los pacientes en dos grupos de pronóstico diferencial: *IGHV* mutado y *IGHV* no mutado ²⁴. Este último se asocia con una enfermedad más agresiva, una menor esperanza de vida y, en definitiva, un peor pronóstico ²³.

La presencia de ciertas anomalías citogenéticas también es clínicamente relevante en LLC. La delección 13q14 es la anomalía más frecuente y se asocia con una mayor supervivencia de los pacientes, a pesar de que implica pérdida de los miRNAs 15a y 16-1, reguladores negativos de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 ²⁵. La delección 11q23, la segunda anomalía genética más común en LLC, implica la pérdida del gen *ATM*, cuyo producto proteico es un importante regulador del ciclo celular y la reparación del DNA en respuesta a daño. Por ello, esta aberración se asocia con mal pronóstico y necesidad temprana de tratamiento ²¹. Otra anomalía recurrente es la delección 17p13 que implica la pérdida del gen *TP53*, lo que conduce a una desregulación del ciclo celular y se asocia con mal pronóstico y supervivencia reducida de los pacientes ²¹. Finalmente, la trisomía 12 da lugar a una forma "atípica" de la LLC y se asocia con mejor pronóstico que las aberraciones del17p y del11q23 y peor que la del13q14 ²¹. Sin embargo, las lesiones citogenéticas no explican completamente la base genética de la

heterogeneidad clínica de la LLC. De hecho, la presencia de mutaciones en los genes *TP53*, *ATM* ²⁶⁻³³, *NOTCH1*, *SF3B1* y *BIRC3* ³⁴⁻⁴¹ se ha asociado con sensibilidad a los tratamientos y progresión de la enfermedad, y su determinación en el momento del diagnóstico permite una clasificación más refinada de los pacientes con fines pronóstico-terapéuticos ⁴².

Tabla 2. Principales marcadores pronóstico en LLC.

MARCADOR	ESTADO	PRONÓSTICO
Estado mutacional de los genes <i>IGHV</i>	Mutado	Favorable
	No mutado	Desfavorable
Anomalías citogenéticas	del17p13 [<i>TP53</i>]	Desfavorable
	del11q23 [<i>ATM</i>]	Desfavorable
	Trisomía 12	Favorable
	del13q14 [miR-15a, miR-16-1]	Favorable
Mutaciones en los genes <i>TP53</i> , <i>ATM</i> , <i>Nocth1</i> , <i>SF3B1</i> , <i>BIRC3</i>	Mutado	Desfavorable
	No mutado	Favorable
Expresión de ZAP-70	Positiva (> 20%*)	Desfavorable
	Negativa (< 20%*)	Favorable
Expresión de CD38	Positiva (> 30%*)	Desfavorable
	Negativa (< 30%*)	Favorable
Expresión de α_4	Positiva (> 30%*)	Desfavorable
	Negativa (< 30%*)	Favorable

* Porcentaje de células que expresan el marcador respecto del total de células CD19+.

ZAP-70 es una quinasa implicada en la activación y diferenciación de células T y una expresión en células LLC mayor del 20% se asocia con progresión de la enfermedad y menor supervivencia de los pacientes ¹⁹, correlacionando con el estado *IGHV* no mutado ^{43,44}.

Otro marcador de mal pronóstico en LLC, independiente del estado mutacional de los genes *IGHV* ⁴⁵, es CD38. CD38 es una proteína transmembrana que funciona como receptor de CD31 y media de señales de proliferación y supervivencia en células LLC ⁴⁶⁻⁴⁸.

Una expresión de CD38 superior al 30% correlaciona con una LLC más agresiva y menor supervivencia de los pacientes ^{20,49}.

La alta expresión (> 30%) de la subunidad α_4 de la integrina $\alpha_4\beta_1$ por las células LLC se asocia, también, con progresión de la enfermedad y supervivencia reducida de los pacientes ⁵⁰⁻⁵³. De hecho, recientemente, se ha catalogado como uno de los marcadores pronóstico más importantes en LLC, junto con el estado mutacional de los genes *IGHV* ⁵⁰.

1.1.3. Resistencia a la apoptosis vs proliferación

Las células LLC circulantes en sangre periférica están paradas en fase G_0/G_1 del ciclo celular ⁵⁴, presentando perfiles de expresión de células quiescentes ⁵⁵ y características consistentes con un defecto en la apoptosis y una supervivencia prolongada *in vivo*. Clásicamente, esta observación condujo a concebir la LLC como una enfermedad de células quiescentes no proliferantes, cuya acumulación progresiva se debía más a la resistencia a la apoptosis que a un incremento en la proliferación celular ^{5,6,56}. No obstante, estudios recientes sobre la longitud de los telómeros ⁵⁷ y medidas *in vivo* de la cinética de las células LLC ⁵⁸ demuestran que una proporción significativa del clon leucémico (0.1 - 1 %/día), concretamente la localizada en nichos permisivos dentro de los órganos linfoides, prolifera activamente contribuyendo a la progresión de la enfermedad ⁵⁸. Por tanto, actualmente, se considera que en la LLC existe un equilibrio dinámico entre células LLC quiescentes y resistentes a la apoptosis, que circulan en sangre periférica, y células LLC en proliferación activa localizadas en nichos de los tejidos linfoides ^{58,59}. Sin embargo, puesto que la gran mayoría del clon leucémico no prolifera ^{58,60-62}, continúa considerándose que la apoptosis deficiente contribuyente más a la patología de la LLC.

1.2. APOPTOSIS

En células de mamíferos existen diferentes formas de muerte celular, siendo la apoptosis y la necrosis las mejor estudiadas ⁶³. La apoptosis, al igual que una forma de

necrosis denominada necroptosis ⁶⁴, es un mecanismo de muerte celular programado para la eliminación de células "no deseadas". Se desencadena en respuesta a diversos estímulos, tanto fisiológicos como patológicos ^{65,66}. Así, ocurre de forma normal durante el desarrollo, el envejecimiento y el control de la homeostasis tisular, pero también puede desencadenarse en respuesta a reacciones inmunes, enfermedad o agentes citotóxicos como radiaciones ionizantes o quimioterapia ⁶⁷.

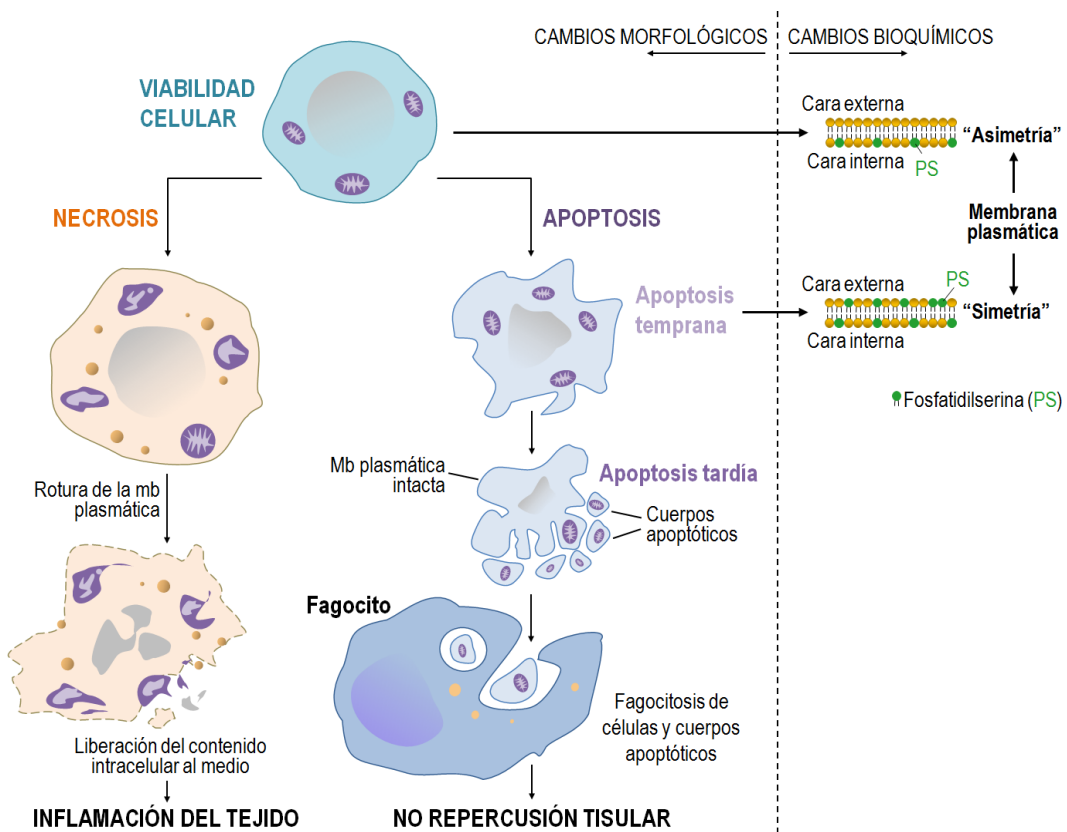


Figura 1. Comparación entre apoptosis y necrosis. A la izquierda, esquema representativo de los principales cambios morfológicos de la apoptosis y la necrosis. A la derecha, cambio en la simetría de la membrana plasmática asociado al proceso apoptótico: Exposición de fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana plasmática. Mb o mb, membrana.

1.2.1. Cambios morfológicos y bioquímicos durante la apoptosis

Durante el proceso apoptótico la célula sufre una serie de cambios morfológicos característicos ⁶⁸, como reducción del volumen celular, *blebbing* de la membrana plasmática y fragmentación nuclear y citoplasmática con formación de pequeños corpúsculos rodeados de membrana (cuerpos apoptóticos). También se producen cambios bioquímicos, incluyendo la fragmentación del DNA genómico, y la pérdida del potencial mitocondrial y de la asimetría de la membrana plasmática. Esta última implica la exposición en la cara externa de la membrana plasmática de residuos de fosfatidilserina, lo que permite que las células apoptóticas sean reconocidas y fagocitadas por células especializadas, principalmente macrófagos ⁶⁹. Este hecho es quizás el aspecto más importante de todo el proceso apoptótico y marca la gran diferencia con la necrosis, ya que permite la eliminación de la célula con la membrana plasmática intacta, previniendo así la liberación de componentes celulares al medio y la consiguiente inflamación del tejido ^{70,71} (Figura 1).

1.2.2. Vías de la apoptosis

Atendiendo a la procedencia, externa o interna, de las señales de muerte, se distinguen dos vías de apoptosis: la vía extrínseca y la vía intrínseca. La vía extrínseca se desencadena tras la unión de ligandos extracelulares a receptores de membrana de la superfamilia del TNF ⁷². Estos receptores poseen un dominio citosólico, el dominio de muerte (DD, *Death domain*), responsable de la activación del proceso apoptótico ⁷³. La vía intrínseca o mitocondrial se induce intracelularmente por señales diversas (incluyendo estrés celular, exposición a compuestos citotóxicos, radiación o privación de factores de crecimiento esenciales ⁷⁴) y está estrechamente regulada por proteínas de la familia Bcl-2. Si el proceso apoptótico progresa, se produce la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, lo que conduce a la liberación de citocromo c y otras proteínas del espacio intermembrana de la mitocondria.

Las dos vías de la apoptosis convergen en la activación de proteasas específicas, las caspasas. En la vía extrínseca, tras la unión del ligando al receptor, se reclutan proteínas adaptadoras que secuestra y activan caspasa-8. La caspasa-8, a su vez, activa a las caspasas -3 y -7. En la vía intrínseca, el citocromo c, una vez en el citosol, se une a la proteína Apaf-1 y el complejo recluta y activa a la caspasa-9 que, a su vez, activa a las caspasas-3 y -7. La activación de estas caspasas por cualquiera de las dos vías culmina con la muerte de la célula diana ^{75,76}.

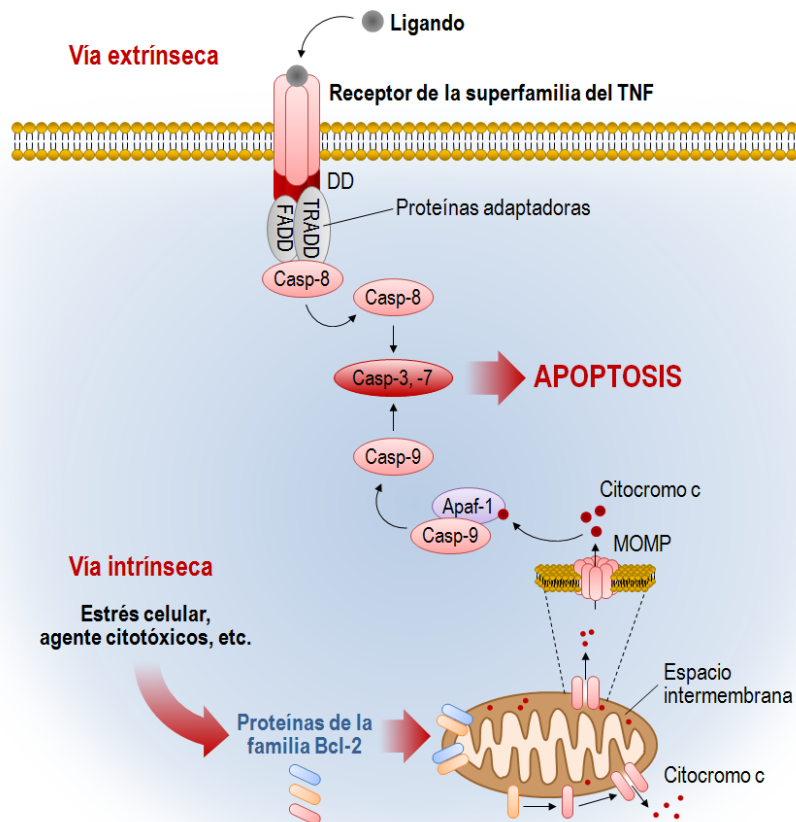


Figura 2. Vías de la apoptosis. Esquema representando los actores principales de las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis. DD, Dominios de muerte, *death domains*; Casp: caspasa; TRADD y FADD: proteínas adaptadoras.

1.2.3. La familia Bcl-2

La familia Bcl-2 es un grupo de proteínas evolutivamente muy conservadas, que funcionan como reguladores (positivos o negativos) de la vía intrínseca de la apoptosis ⁷⁷, y que desempeñan un papel clave en la LLC, estando implicadas en la respuesta a la terapia, la progresión de la enfermedad y, en definitiva, el pronóstico clínico ⁷⁸⁻⁸³.

1.2.3.1. Clasificación de las proteínas de la familia Bcl-2

Atendiendo a criterios funcionales (función pro o antiapoptótica) y estructurales (presencia de uno o varios dominios de homología con la proteína prototipo Bcl-2: BH, *Bcl-2 homology*), las proteínas de esta familia se clasifican en tres subgrupos o subfamilias: proteínas proapoptóticas “sólo BH3”, proteínas proapoptóticas multidominio y proteínas antiapoptóticas (Figura 3).

Todos los miembros de la subfamilia “sólo BH3” contienen el dominio de homología BH3. Además Bim, Bik y Hrk poseen un dominio transmembrana, encontrándose frecuentemente asociadas a membranas, principalmente la mitocondrial. Las proteínas de este grupo desempeñan funciones “iniciadoras” de la apoptosis al transmitir las señales de estrés. Para llevar a cabo esta función, Bid, a diferencia de los otros miembros de la subfamilia, precisa ser activado proteolíticamente, principalmente por caspasa-8, generando la forma troncada activa, tBid ^{75,76}.

Las proteínas proapoptóticas multidominio contienen los dominios de homología BH1 a BH3, así como un dominio transmembrana. En células viables, Bak se encuentra asociado a la membrana mitocondrial externa a través de este dominio ⁸⁴, mientras que Bax posee una localización principalmente citosólica manteniendo su dominio transmembrana oculto en la estructura proteica. En respuesta a señales inductoras de apoptosis, Bax expone su dominio transmembrana, translocándose a la membrana mitocondrial externa ⁸⁵. Una vez en ella, las formas monoméricas inertes Bax y Bak se asocian formando homooligómeros que permeabilizan la membrana mitocondrial externa,

con la consiguiente salida de citocromo c, activación de caspasas y muerte celular ⁸⁶. Por ello, Bax y Bak se consideran “efectores” o “ejecutores” de la apoptosis.

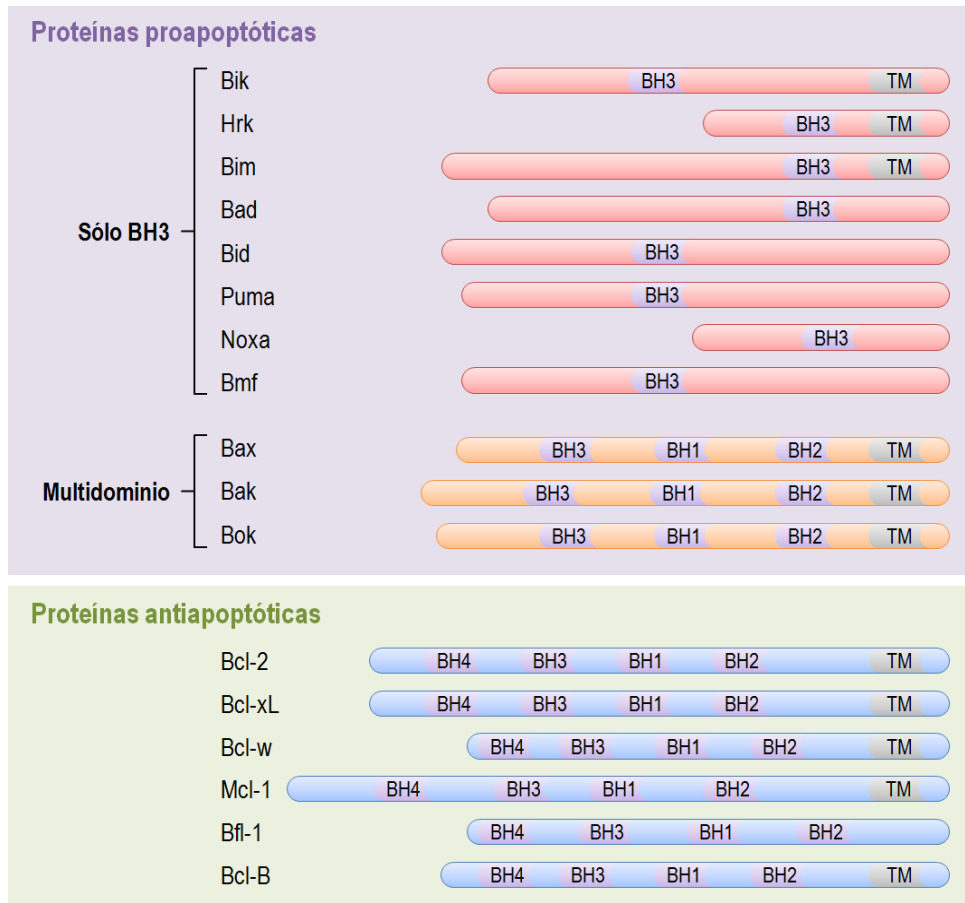


Figura 3. La familia Bcl-2. Clasificación y representación estructural simplificada de los miembros antiapoptóticos y proapoptóticos de la familia Bcl-2. Modificada de ⁸⁶. TM: dominio transmembrana.

Finalmente, las proteínas antiapoptóticas contienen los cuatro dominios de homología con Bcl-2 (BH1 a BH4), así como un dominio transmembrana (a excepción de Bfl-1), por lo que se encuentran típicamente asociadas a membranas. Funcionalmente se consideran los “guardianes” o defensores celulares frente a la apoptosis al prevenir la permeabilización mitocondrial por Bax y Bak.

1.2.3.2. Regulación de las proteínas de la familia Bcl-2

El balance o equilibrio entre los miembros anti y proapoptóticos de la familia Bcl-2 determina el destino celular ⁶⁰. Por ello, las proteínas de la familia Bcl-2 están estrechamente reguladas a varios niveles y por diversos mecanismos, destacando las interacciones entre los miembros pro y antiapoptóticos ⁸⁷.

Interacciones entre miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2

Constituyen el principal mecanismo regulador de la vía intrínseca de la apoptosis y, para entenderlas se han propuesto tres modelos principales: activación directa, activación indirecta y modelo unificado (Figura 4) ⁸⁷.

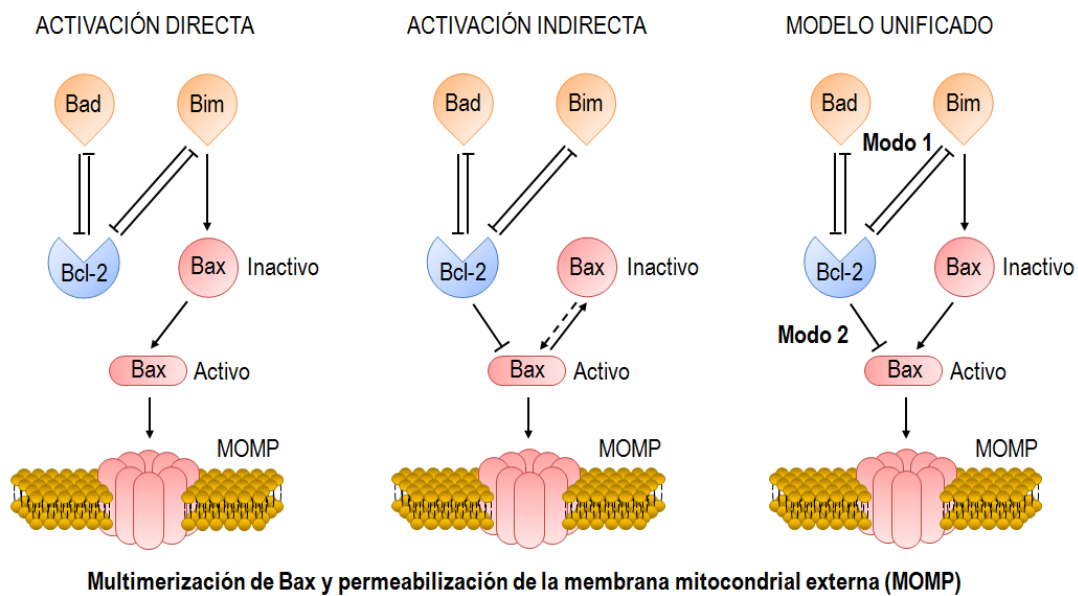


Figura 4. Modelos de control del “interruptor apoptótico”. Estos modelos explican cómo a través de la interacción entre los miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 se regula el inicio de la apoptosis. Modificada de ⁸⁷.

En el modelo de activación directa, algunas proteínas “sólo BH3”, denominadas “activadoras” (tBid, Bim, Puma), se unen directamente tanto a las proteínas antiapoptóticas como a las proapoptóticas Bax y Bak ⁸⁸, bloqueando a las primeras y activando a las segundas con la consiguiente permeabilización de la membrana mitocondrial externa ⁸⁹. Las proteínas “sólo BH3” que carecen de esta función activadora

(Bad, Bmf, Bik, Hrk, Noxa) se denominan “sensibilizadoras”, ya que se unen a las proteínas antiapoptóticas, promoviendo así la liberación de las “activadoras”⁹⁰.

El modelo de activación indirecta⁹¹⁻⁹³ asume que los miembros antiapoptóticos son capaces también de secuestrar a Bax y Bak^{94,95}, previamente activadas. Por tanto, para que Bax y Bak sean liberados y puedan permeabilizar la mitocondria, todas las proteínas antiapoptóticas deben estar neutralizadas por proteínas “sólo BH3”⁹¹⁻⁹³.

El modelo unificado incluye los dos anteriores y es el más aceptado actualmente⁹⁶. Este modelo asume que las proteínas antiapoptóticas son capaces de interactuar tanto con las proteínas “sólo BH3” (modo 1) como con las formas activadas de Bax y Bak (modo 2). Además, la interacción entre los miembros de la familia Bcl-2 está determinada por un equilibrio competitivo, siendo la concentración relativa y las condiciones celulares específicas las que determinan las interacciones imperantes⁹⁷.

Tabla 3. Perfiles de interacción entre las proteínas de la familia Bcl-2 (Modificada de^{90,91}).

		Proteínas proapoptóticas	
		Multidominio	Sólo BH3
Proteínas antiapoptóticas	Bcl-2	Bax	Bim, Puma, tBid, Bmf, Bad
	Bcl-XL	Bax, Bak	Bim, Puma, tBid, Bik, Hrk
	Mcl-1	Bax, Bak	Bim, Puma, tBid, Noxa, Hrk
	Bcl-w	Bax, Bak	Bim, Puma, tBid, Bmf, Bad, Bik, Hrk
	Bfl-1	Bax, Bak	Bim, Puma, tBid, Noxa, Bid, Bik, Hrk

Los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 poseen diferentes capacidades de unión a los miembros antiapoptóticos. En general, Bim, Puma y tBid son capaces de interactuar con todas las proteínas antiapoptóticas, mientras que otras, como Bad y Noxa, son más selectivas (Tabla 3)⁹¹.

Otras formas de regulación de la familia Bcl-2

Además de las interacciones entre miembros de función opuesta, las proteínas de la familia Bcl-2 están sometidas también a otras formas de regulación, como las que cursan a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional ⁸⁷.

Las señales y los factores de transcripción implicados en la regulación transcripcional de la familia Bcl-2 dependen de la proteína en cuestión y el tipo celular, entre otros. Así, el daño en el DNA induce la expresión de Noxa, Puma, Bad y Bid de forma TP53-dependiente en varios tipos celulares⁹⁸⁻¹⁰², pero también pueden ser regulados de forma TP53-independiente. De hecho, el factor de transcripción FOXO3A media la expresión de Puma en ausencia de citoquinas o factores de crecimiento en linfocitos T ¹⁰³. La ausencia de citoquinas induce también la expresión de Bim dependiente de FOXO3A en células B ¹⁰⁴ y, en células de carcinoma de próstata, la transcripción de Bcl-2 es dependiente de NF-κB ¹⁰⁵.

A nivel traduccional, el *splicing* alternativo da lugar a formas estructural y funcionalmente diferentes de los miembros la familia Bcl-2. Así, las dos formas de *splicing* de Bcl-x (Bcl-xL y Bcl-xS ¹⁰⁶) y Mcl-1 (Mcl-1L y Mcl-1S, ¹⁰⁷) poseen funciones opuestas, anti y proapoptótica, respectivamente. Por su parte, la forma larga de Bcl-2 (Bcl-2a) posee una actividad antiapoptótica más potente que la forma corta (Bcl-2b) ¹⁰⁸, mientras que la forma corta de Bim (BimS) presenta una actividad proapoptótica muy superior a la de las formas larga (BimL) y extralarga (BimEL) ¹⁰⁹.

Las proteínas de la familia Bcl-2 sufren también gran variedad de modificaciones postraduccionales con amplia repercusión funcional. Así, en respuesta a señales de muerte, Bid es degradado por varias proteasas, principalmente caspasa-8, generando la forma troncada activa (tBid) ^{75,76}. La presencia de factores de crecimiento induce la fosforilación de Bad en varios residuos, lo que determina su secuestro y bloqueo por las proteínas 14-3-3 ^{110,111}. La fosforilación de Bim dependiente de ERK1/2 conduce a su degradación vía proteasoma ¹¹². Por el contrario, la fosforilación de Bcl-2 en determinados residuos incrementa su afinidad por Bak y Bim, lo que resulta en una mayor resistencia a

la quimioterapia ¹¹³. La estabilidad de Mcl-1, cuya vida media es inferior a 30 minutos ^{114,115}, está controlada mayoritariamente por la vía ubiquitina-proteasoma ¹¹⁵⁻¹¹⁷; la fosforilación de Mcl-1 por ERK1/2 incrementa su vida media ¹¹⁸, mientras que la fosforilación por GSK3 ¹¹⁹ o por CDK1 ¹²⁰ promueve su degradación por proteasoma. Bcl-2 y Bcl-xL pueden ser degradados por caspasa-3 generando formas truncadas de estas proteínas (tBcl-2 y tBcl-xL, respectivamente) que aceleran el proceso apoptótico ^{121,122}.

1.3. EL MICROAMBIENTE DE LA LLC

En LLC, el término “microambiente” hace referencia a los componentes celulares, estructurales y solubles de los compartimentos anatómicos en los que residen las células LLC. Esto incluye células no neoplásicas residentes en estos lugares, vasos sanguíneos, factores solubles y proteínas de la matriz extracelular que, a través del contacto directo célula-célula y la comunicación molecular activa, proporcionan soporte estructural y funcional a las células neoplásicas ¹²³⁻¹²⁵. Por otra parte, los términos “células estromales” y “estroma” se refieren a la población heterogénea de células adherentes no neoplásicas presentes en los compartimentos anatómicos en los que residen las células LLC y que se encuentran en estrecho contacto con las mismas ¹²⁶. Finalmente, el “nicho” es el “hábitat”, entendido como lugar o ambiente con condiciones de proliferación y supervivencia apropiadas, que ocupa una determinada célula LLC en el organismo ¹²⁷.

Como en la mayoría de las neoplasias, el microambiente juega un papel crítico en la LLC ^{11,124,128-132}. De hecho, aunque las células LLC circulantes en sangre periférica son resistentes a la apoptosis *in vivo* ⁸⁰, mueren rápidamente por apoptosis espontánea cuando se cultivan *ex vivo* ^{130,133-135}. Esto sugiere que la supervivencia prolongada no es una característica intrínseca a la célula LLC, sino que depende de señales extrínsecas procedentes del microambiente.

1.3.1. Los escenarios de la LLC: Definiendo el microambiente

La LLC cursa en tres compartimientos anatómicos diferentes: la sangre periférica, la médula ósea y los tejidos linfoides secundarios, fundamentalmente el bazo y los ganglios linfáticos ¹³⁶ (Figura 5). En cada uno de estos compartimientos existe una comunicación bidireccional entre las células LLC y el microambiente ¹³⁷, de forma que, el microambiente proporciona señales a las células LLC afectando su biología *in vivo* ¹³⁸ y, las células LLC envían señales al microambiente modificándolo activamente para su propio beneficio ^{123,137,139}.

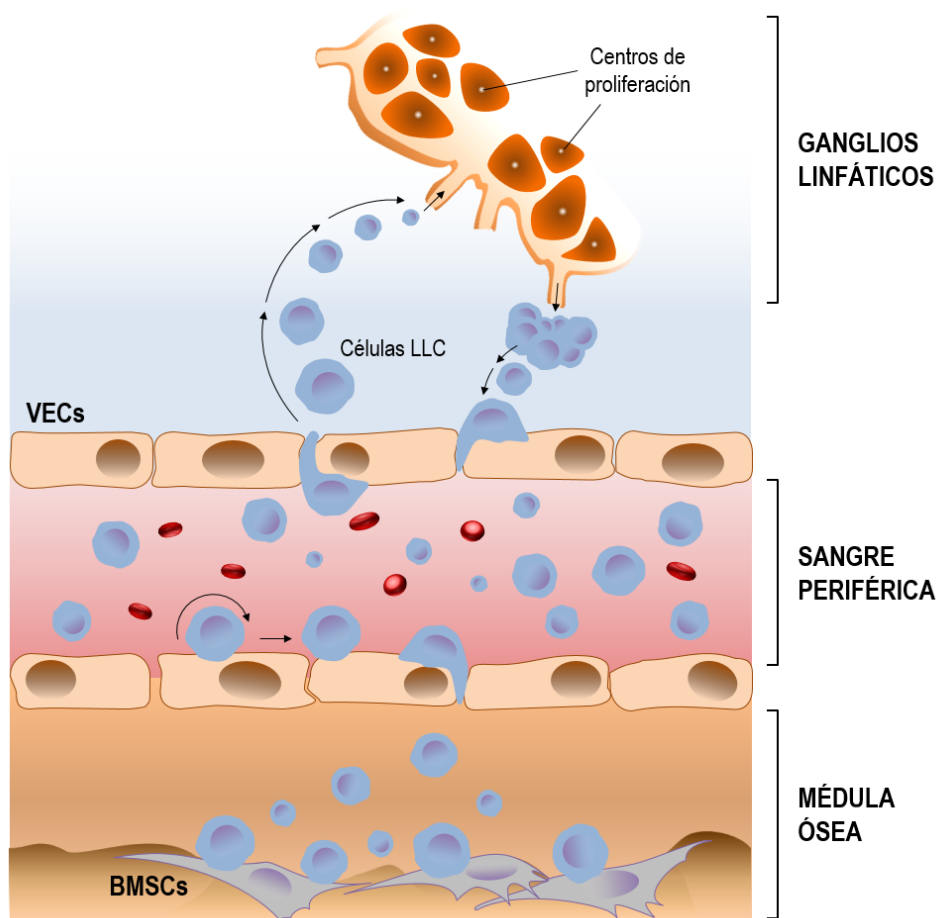


Figura 5. Microambiente de la LLC: Compartimentos. Se representan los principales compartimentos en los que se desarrolla la LLC: la médula ósea, los tejidos linfoides secundarios (ganglios linfáticos) y la sangre periférica. VECs: Células endoteliales vasculares, *Vascular endothelial cells*, BMSCs: Células estromales de médula ósea, *Bone marrow stromal cells*. Modificada de ¹⁴⁰.

1.3.1.1. Sangre periférica

Clásicamente, la sangre periférica se ha considerado un compartimento transitorio pasivo que permitía a las células LLC acceder a los compartimentos verdaderamente relevantes de la médula ósea y los tejidos linfoides secundarios ^{6,141}. Sin embargo, actualmente, se sabe que el endotelio de los vasos sanguíneos también proporciona importantes señales a las células LLC ^{142,143}.

1.3.1.2. Médula ósea

El microambiente de médula ósea comprende células accesorias [incluyendo células estromales, células endoteliales, células T, macrófagos y células dendríticas foliculares (FDCs)], proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento y citoquinas ^{124,144}. Las células estromales de médula ósea (BMSCs) son una población heterogénea de células estromales de origen mesenquimal (MSCs), que representan el principal componente del microambiente de médula ósea, y juegan papel crucial en la LLC ^{126,131,145,146}. Las BMSCs crean nichos dentro de la médula ósea donde las células LLC se alojan, alimentan y protegen de la apoptosis, tanto espontánea como inducida por agentes citotóxicos ^{147,148}. De hecho, se considera que la médula ósea es clave en la resistencia a fármacos observada *in vivo* ¹⁴⁷.

1.3.1.3. Tejidos linfoides secundarios

Los tejidos linfoides secundarios, en particular los ganglios linfáticos, son enclaves esenciales en la patogénesis de la LLC, ya que es en áreas especializadas de los ganglios linfáticos (y a una menor extensión en la médula ósea) donde se produce la mayor parte de la proliferación de las células LLC ¹³⁸. Estas áreas reciben el nombre de centros de proliferación o pseudofolículos y son características de la histopatología de la LLC ¹⁴⁹. El microambiente de los centros de proliferación está formado por un conjunto de células accesorias [incluyendo células T activadas, MSCs, FDCs y células nodriza de estirpe mieloide (NLCs)], proteínas de la matriz extracelular, citoquinas y quimioquinas ¹²⁹. En este microambiente, el receptor de células B (BCR) de las células LLC es activado por

antígenos o de manera antígeno-independiente ¹⁵⁰, lo que, junto con señales coestimuladoras adecuadas, pone en marcha una cascada de señalización que conduce a proliferación celular y consiguiente expansión del clon leucémico ^{139,151}. Las células LLC localizadas en estos nichos reciben también señales de supervivencia que las protegen frente a la apoptosis espontánea e inducida por agentes citotóxicos ^{152,153}.

1.3.2. Interacciones entre las células LLC y su microambiente

1.3.2.1. Estimulación del BCR

La señalización a través del BCR es clave en la supervivencia y la proliferación de las células LLC y, por consiguiente, en la patogénesis de la enfermedad ^{11,154}. Concretamente, la estimulación del BCR conduce a movilización intracelular de calcio, activación de las rutas MEK/ERK, Akt/mTOR y NF- κ B y, finalmente, a un incremento de la expresión de proteínas antiapoptóticas como Mcl-1 y Bcl-xL ¹⁵⁵⁻¹⁵⁹. Además, junto con señales coestimuladoras adecuadas (CD154, BAFF, APRIL, Plexina B1) procedentes del microambiente de los centros de proliferación, promueve la proliferación de las células LLC ^{139,151} por medio de la expresión de c-Myc dependiente de ERK ^{238,249} (Figura 6).

1.3.2.2. Interacciones entre células LLC y MSCs

Las MSCs son un componente celular esencial de los microambientes tisulares de la LLC. Están presentes en la médula ósea (BMSCs) y los tejidos linfoides secundarios, donde se localizan de forma difusa a través del tejido y en áreas perivasculares ¹⁶⁰. Los estudios iniciales demostraron que las células LLC cocultivadas con BMSCs son rescatadas de la apoptosis espontánea ^{128,131,141} e inducida por agentes citotóxicos ^{128,131,161}, siendo el contacto directo célula-célula esencial para este efecto protector ^{131,141,146,161}. La adhesión de las células LLC a las MSCs está mediada simultáneamente por la interacción entre las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_L\beta_2$, expresadas por las células LLC, y sus respectivos ligandos, VCAM-1 y ICAM-1, expresados por las células estromales ¹⁴¹. Las MSCs expresan altos niveles de VCAM-1 ¹⁶², y la unión de la integrina $\alpha_4\beta_1$ a VCAM-1 protege a las células LLC de la apoptosis espontánea a través de la vía PI3K/Akt y la

regulación al alza de Bcl-xL ¹⁶³. De hecho, la activación sostenida de la vía PI3K/Akt/NF- κ B es crítica para la supervivencia de las células LLC, al mantener niveles elevados de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL, así como de los inhibidores de caspasas c-FLIP y XIAP ¹⁶⁴. Otras interacciones, como las mediadas por los receptores (Notch-1-4) y ligandos de Notch (Jagged-1,-2, DLL-1, -3 y -4), expresados tanto en las BMSC como en las células LLC, también protegen a las últimas de la apoptosis espontánea e inducida por varios agentes citotóxicos, por un mecanismo que implica incremento de la expresión de NF- κ B y Bcl-2 y disminución de caspasa-3 en las células LLC¹⁶⁵ (Figura 6).

Además del contacto directo célula-célula, diversos factores solubles secretados por las MSCs participan también en la protección de las células LLC frente a la apoptosis ^{141,165-168}. De hecho, las MSCs producen grandes cantidades de la quimioquina CXCL12 ¹⁶⁹. La biodisponibilidad de esta quimioquina regula negativamente la expresión de su receptor CXCR4 ¹⁷⁰ que, en consecuencia, es expresado en altos niveles por las células LLC circulantes en sangre periférica y en bajos por las residentes en los tejidos linfoides ^{138,170}. CXCL12 juega un papel crucial en el reclutamiento de las células LLC a la médula ósea ¹⁷¹ y, además, induce supervivencia de las células LLC a través de la activación de las vías MEK/ERK ^{167,168} y PI3K ¹⁷⁰ y de la fosforilación de STAT3 ¹²⁸. Las MSCs cocultivadas con células LLC secretan también grandes cantidades de VEGF ¹⁷², un factor proangiogénico que también protege a las células LLC frente a la apoptosis espontánea ¹⁷² e inducida por agentes citotóxicos, a través de la activación de STAT3 y la inducción de Mcl-1 y XIAP ^{173,174} (Figura 6).

1.3.2.3. Interacciones entre células LLC y células T

En la LLC, las células T CD4+ forman parte sustancial del infiltrado linfóide en la médula ósea y los ganglios linfáticos ¹⁷⁵, siendo esenciales para la proliferación y supervivencia de las células LLC ^{176,177}. Más concretamente, la interacción entre CD40L/CD154, expresado por las células T, y CD40, expresado por las células LLC ^{154,178} protege a las últimas de la apoptosis espontánea e inducida ^{179,180} y, en conjunción con la

activación del BCR, promueve su proliferación ^{181,182}. Estos efectos están mediados por activación de las vías PI3K/Akt, MEK/ERK ^{164,183} y NF- κ B ^{164,180,184,185} en las células LLC, que conduce a la regulación al alza de moléculas antiapoptóticas como Mcl-1, Bcl-xL, Bfl-1 y Survivina ^{179,183,186,187}. Las células T, además, secretan factores solubles que también contribuyen a la proliferación (IL-15 ¹⁸⁸, TNF α ^{189,190}) y supervivencia (IL-4 ¹⁹¹, IL-13 ¹⁹², el IFN- α ¹³⁵ e IFN- γ ¹⁹³) de las células LLC (Figura 6).

1.3.2.4. Interacción entre células LLC y células FDCs

Las FDCs están presentes en los centros de proliferación de los ganglios linfáticos ^{154,194} y la médula ósea de pacientes de LLC con implicación nodular ¹⁹⁵, donde interactúan directamente con las células LLC, a través de moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1 o Plexina B1 ^{154,196}, promoviendo la supervivencia de las mismas por un mecanismo dependiente de la inducción de Mcl-1¹⁵³. Además, las FDCs secretan factores solubles (BAFF, IL-15) que también contribuyen a la supervivencia y proliferación de las células LLC (Figura 6).

1.3.2.5. Interacciones entre células LLC y NLCs

Las NLCs se diferencian *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica cocultivados a altas densidades con células LLC durante 7-14 días, y representan un modelo *in vitro* de macrófagos asociados a tumor específicos de LLC ^{167,197,198}. Células de fenotipo similar se han detectado en los órganos linfoides secundarios de pacientes con LLC ¹⁹⁸ y su importancia en la progresión de la enfermedad se ha puesto de manifiesto recientemente ¹⁹⁹. Las NLCs protegen a las células LLC de la apoptosis espontánea e inducida mediante secreción de factores solubles (CXCL12 ^{167,168}, BAFF, APRIL¹⁶⁸) y estimulación del BCR ²⁰⁰. Además, las NLCs expresan CD31 y Plexina B1 que, a través de la interacción con sus receptores en las células LLC (CD38 y CD100, respectivamente), inducen proliferación y supervivencia de las mismas ⁴⁸. Las NLCs también participan en la atracción de las células LLC a los microambientes tisulares ^{209,219}, a través de la secreción

de las quimioquinas CXCL12¹⁶⁷ y CXCL13²⁰¹, que interactúan con sus respectivos receptores, CXCR4¹⁷⁰ y CXCR5²⁰¹, en las células LLC (Figura 6).

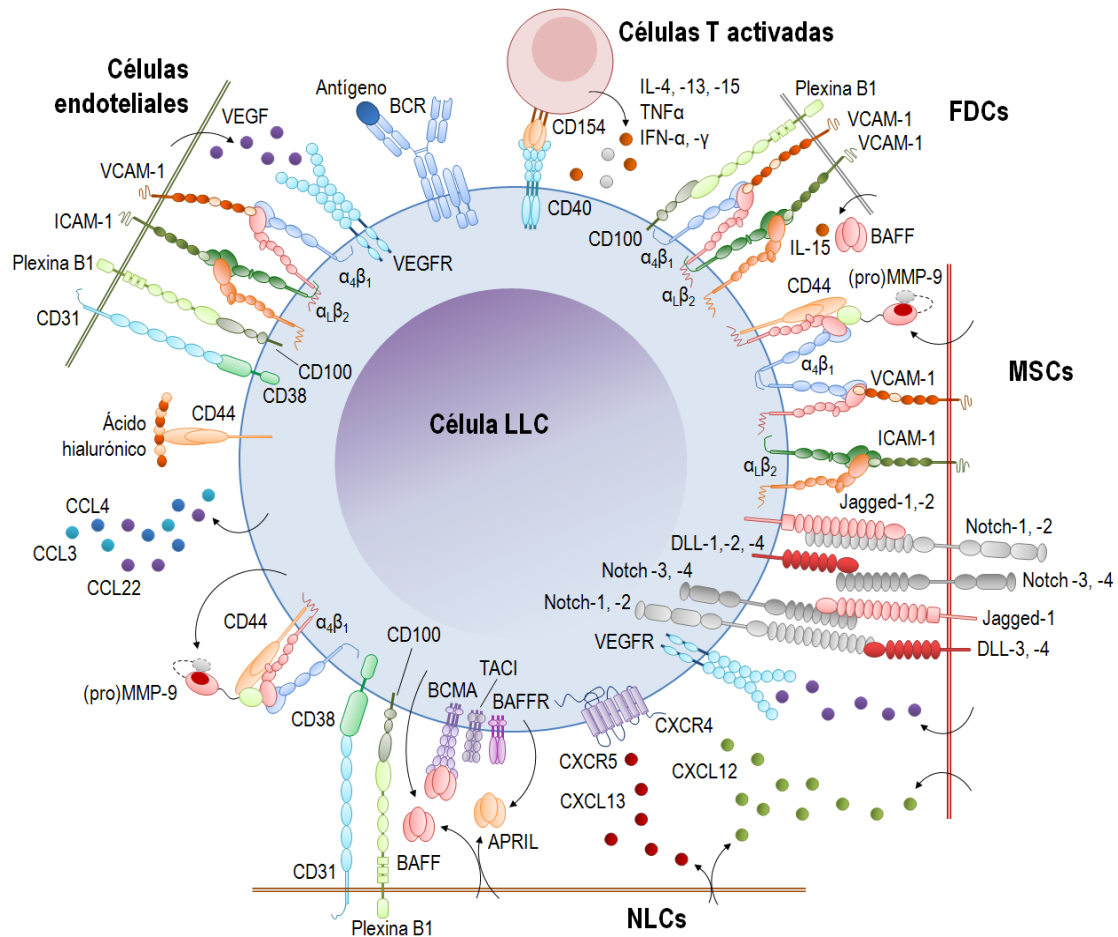


Figura 6. Interacciones moleculares en el microambiente de la LLC. Interacciones moleculares entre las células LLC y las células accesorias de los microambientes tisulares de la médula ósea y los ganglios linfáticos, que son consideradas importantes para la supervivencia, proliferación, migración hacia los tejidos y retención en los nichos tisulares de las células LLC. Modificada de ¹³⁹.

1.3.2.6. Interacciones entre células LLC y células endoteliales

La interacción de las células LLC con el endotelio activado es esencial durante el paso de la sangre periférica a la médula ósea y los órganos linfoides secundarios. Una vez localizadas en los nichos tisulares, las células LLC interactúan con las células endoteliales de la microvasculatura recibiendo señales de supervivencia ¹⁴² y, además,

secretan factores proangiogénicos (FGF, VEGF, Angiopoyetina) que promueven la formación de nuevos vasos, asegurando un aporte sanguíneo adecuado para el mantenimiento y la diseminación de la enfermedad ^{147,202}. *In vitro*, se ha demostrado que las células endoteliales protegen a las células LLC de la apoptosis, tanto espontánea como inducida, por un mecanismo dependiente del contacto directo célula-célula ^{142,203,204} mediado por interacciones $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 y $\alpha_L\beta_2$ /ICAM-1 ²⁰⁴, y que implica, además, activación de NF- κ B e inducción de Bcl-2, Mcl-1 y Bcl-xL en las células LLC ¹⁴³. Otras interacciones, como las mediadas por Plexina B1 ²⁰⁵ y CD31 ²⁰⁶, expresadas en las células endoteliales, también proporcionan señales de supervivencia y proliferación a las células LLC ^{48,207}. Además, las células endoteliales de las vénulas de los ganglios linfáticos expresan altos niveles de las quimioquinas CCL19 y CCL21, que promueven el reclutamiento a los mismos de las células LLC CCR7+ circulantes en sangre periférica ^{208,209} (Figura 6).

1.3.2.7. Otras interacciones

Las células LLC expresan CD44 que, a través de interacciones con el ácido hialurónico de la matriz extracelular, proporciona señales de supervivencia a las mismas dependientes de la activación de PI3K ¹³⁸. BAFF y APRIL y sus receptores (BAFFR, BCMA y TACI) ^{210,211} también son expresados por las células LLC ¹⁶⁸. BAFF y APRIL inducen resistencia a la apoptosis en células LLC de forma tanto autocrina ²¹⁰ como paracrina ¹⁶⁸, a través de la activación de NF- κ B ²¹² y la inducción de Mcl-1 ^{168,210}. Además, BAFF puede inducir la expresión de c-Myc, contribuyendo a la proliferación de las células LLC ²¹³. Las células LLC secretan CCL3, CCL4 ²⁰⁰ y CCL22 ¹⁷⁸ lo que les permite reclutar linfocitos T, macrófagos y otras células accesorias a los microambientes tisulares ^{200,214}, contribuyendo activamente a la formación de un microambiente favorable ¹³⁹. Además, CCL3 y CCL4, junto con las interacciones CD38/CD31 e integrina $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1, forman parte de una cadena de eventos consecutivos que conducen a la supervivencia de las células LLC ²¹⁴ (Figura 6).

1.3.3. La MMP-9 como componente clave del microambiente de la LLC

La metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9) pertenece a la familia de endopeptidasas dependientes de zinc conocidas como metaloproteinasas de matriz (MMPs). Se trata de una proteína de secreción y, como el resto de MMPs, se sintetiza como un zimógeno inactivo (proMMP-9, 92 kDa) compuesto por tres dominios principales: un propéptido o prodominio, responsable de bloquear el sitio activo manteniendo la enzima en estado latente; un dominio catalítico, que contiene el sitio activo; y un dominio hemopexina (PEX9), responsable de la unión a sustratos (Figura 7). La generación de la forma activa (MMP-9) requiere de exposición del sitio activo mediante liberación o separación del prodominio (Figura 7), proceso que puede tener lugar por diversos mecanismos (rotura enzimática, autodigestión, oxidación, cambio conformacional) ²¹⁵⁻²¹⁷.

1.3.3.1. Expresión y regulación

La MMP-9 se encuentra ampliamente expresada en muchos tejidos y tipos celulares, incluyendo los de linaje linfóide ^{215,218,219}. En nuestro laboratorio hemos descrito que las células LLC presentes en la médula ósea y los ganglios linfáticos expresan mayores niveles de MMP-9 en superficie que las circulantes en sangre periférica. Esta MMP-9 puede proceder de las propias células LLC activadas por estímulos procedentes del microambiente y/o de las células accesorias adyacentes ²²⁰.

La actividad proteolítica de esta MMP está muy regulada por diversos mecanismos y a varios niveles (expresión génica, compartimentalización, activación, acción de inhibidores específicos, secreción, etc.), siendo fundamental el control de la expresión génica, particularmente el transcripcional ²²¹. Las vías de señalización que regulan la expresión de los genes *MMP* son diversas, destacando las rutas de las MAPKs (p38MAPK y ERK1/2), que pueden tanto estimular como inhibir la expresión de las diferentes MMPs ²²². También, se ha sugerido que la PKC está implicada en la regulación transcripcional de los genes *MMP* en respuesta a factores de crecimiento ²²³. Muchas de estas vías de señalización convergen en el factor de transcripción AP-1 cuyo sitio de unión

está presente en la región promotora de la mayoría de genes *MMP*. AP-1 está compuesto por homómeros u heterodímeros de miembros de las familias de factores de transcripción Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2) y Jun (c-Jun, JunB y JunD) ²²⁴, y proporciona un mecanismo general para la transactivación de la expresión de las *MMPs* en células tumorales. Además de AP-1, otros factores de transcripción cooperan en la activación o represión de la expresión de los genes *MMP*, incluyendo NF- κ B, la familia STAT y TP53 ^{222,225}.

En cuanto a la regulación específica de la *MMP-9* en LLC, en nuestro laboratorio hemos demostrado que la interacción entre la integrina $\alpha_4\beta_1$, expresada en las células LLC, y sus ligandos Fibronectina y VCAM-1, abundantes en el microambiente, regula positivamente la expresión de *MMP-9*, siendo este efecto dependiente de la activación de la vía PI3K/Akt/NF- κ B ¹⁶³. Asimismo, los ejes CXCL12/CXCR4 y CCL21/CCR7 incrementan la expresión de *MMP-9* en células LLC por un mecanismo dependiente de la vía ERK1/2/c-fos ^{163,226}. Finalmente, altas concentraciones de VEGF reducen la expresión de *MMP-9* por un mecanismo que implica interacción de VEGF con su receptor VEGFR2, expresado en las células LLC, y activación de STAT1 ²²⁷.

1.3.3.2. Funciones

Clásicamente, se ha considerado que la principal función de la *MMP-9* es degradar componentes de la matriz extracelular, aunque actualmente se sabe que entre los sustratos de esta *MMP* se encuentran también proteínas implicadas en migración/invasión, apoptosis/supervivencia y angiogénesis, así como proteínas intracelulares ^{216,228-230}. Además, varios estudios recientes han demostrado que tanto la *MMP-9* como otras *MMPs* pueden desempeñar funciones no proteolíticas, en las que el dominio hemopexina (Figura 7) juega un papel fundamental. Debido a esta gran variedad de funciones, la *MMP-9* está implicada en multitud de procesos, tanto fisiológicos como patológicos ²¹⁷. De hecho, es la principal *MMP* encontrada en ciertos tipos de neoplasias de células B, incluyendo la LLC. Las células LLC producen mayoritariamente pro*MMP-9* ^{163,231}, y niveles elevados de esta *MMP* correlacionan con un estadio avanzado y menor

supervivencia de los pacientes ²³², sugiriendo una contribución de la MMP-9 a la patogénesis de la LLC. Trabajos realizados en nuestro laboratorio y por otros investigadores han demostrado que la MMP-9, a través de su actividad catalítica, juega un importante papel en la migración transendotelial y la invasión de la membrana basal en respuesta a quimioquinas (CXCL12, CCL21) en células de LLC ^{163,226,232}. La MMP-9, también se ha implicado en la protección frente a la apoptosis espontánea que ejerce el estroma de médula ósea sobre las células LLC, sugiriéndose que en este efecto podrían estar implicados mecanismos tanto catalíticos ²³³ como no catalíticos ²²⁰ (Figura 7).

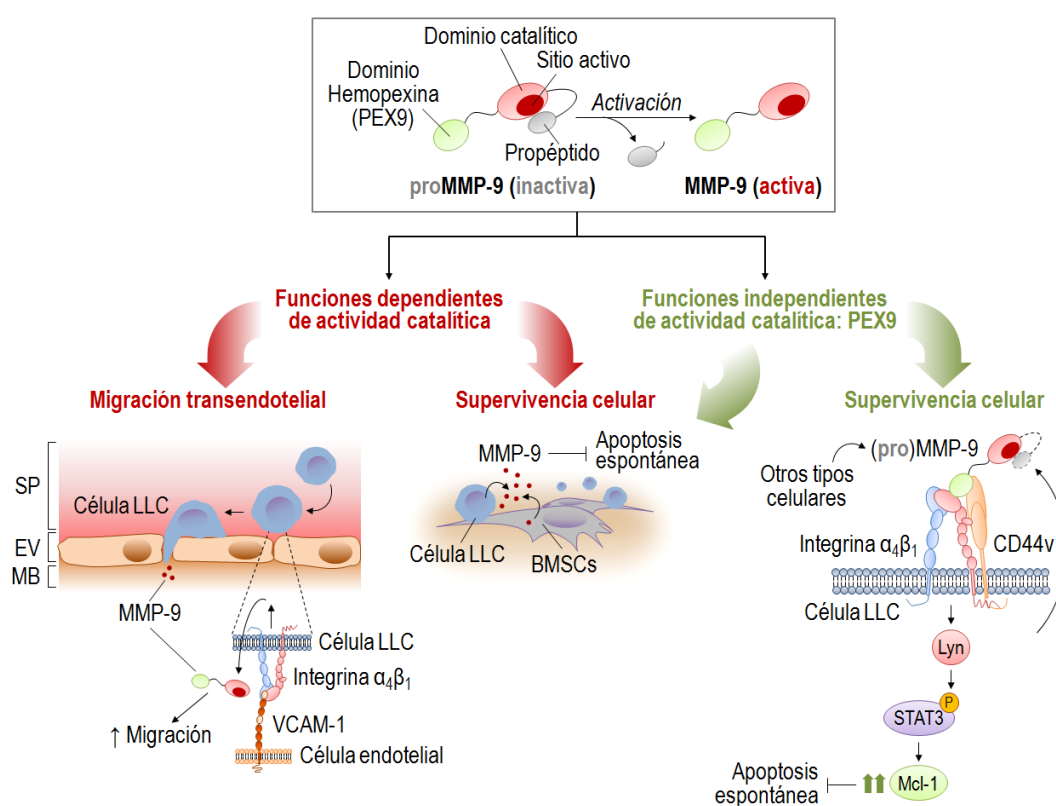


Figura 7. Funciones de la MMP-9 en LLC. Los esquemas representan las diferentes funciones, tanto dependientes como independientes de actividad catalítica, descritas para la MMP-9 en LLC. SP: sangre periférica, EV: Endotelio vascular, MB: Membrana basal.

Por otra parte, aunque la (pro)MMP-9 es una proteasa secretada y no se une a los linfocitos B normales ²³⁴, ha sido detectada consistentemente en la superficie de las

células LLC ^{163,232,234}. La unión de (pro)MMP-9 a las células LLC está mediada por la interacción entre el dominio PEX9 de la proteína y un complejo receptor formado por la integrina $\alpha_4\beta_1$ y una variante de 190 kDa de CD44 (CD44v) ²³⁴. Esta interacción inhibe la migración de las células LLC por un mecanismo dependiente de la actividad catalítica de la MMP-9 ²³⁴. Además, previene la apoptosis espontánea a través de la activación, no proteolítica, de la vía Lyn/STAT3 y la regulación al alza de Mcl-1 en las células LLC ²²⁰ (Figura 7).

1.4. TRATAMIENTO DE LA LLC

1.4.1. Visión panorámica del tratamiento de la LLC

Durante más de tres décadas, el tratamiento estándar para la LLC se basó en agentes alquilantes, principalmente Clorambucil y, en menor medida Ciclofosfamida ²³⁵. Posteriormente, la aplicación de los análogos de purina (Fludarabina monofosfato, 2-clorodesoxiadenosina y Pentostatina) ^{236,237}, sobre todo Fludarabina, mejoró en gran medida los resultados obtenidos con los regímenes clásicos ^{236,238}. Desde entonces, la Fludarabina se consideró, y aún se sigue considerando, un pilar básico para la elaboración de nuevos esquemas de tratamiento en combinación con agentes alquilantes, como Ciclofosfamida y/o Mitoxantrona ²³⁹⁻²⁴¹. Más recientemente, se han añadido a estas pautas terapéuticas los anticuerpos (Acs) monoclonales, dando lugar a un incremento de la eficacia de los tratamientos con lo que se ha denominado quimioinmunoterapia. Así, el estándar para el tratamiento de primera línea de pacientes aptos es la combinación del anticuerpo (Ac) monoclonal anti-CD20 Rituximab con los agentes citostáticos Fludarabina y Ciclofosfamida (FCR) o con Bendamustina (BR) ^{14,242-244}. Tomando como base el Rituximab, se han ido mejorando (humanización, glicoingeniería) y desarrollando nuevos Acs monoclonales. Así, el Ofatumumab es un Ac monoclonal anti-CD20 de segunda generación que, a diferencia de Rituximab, es eficaz tanto en monoterapia ²⁴⁵ como en combinación con agentes quimioterapéuticos, incluyendo Fludarabina y Clorambucil ^{246,247}. Asimismo, el Obinutuzumab (GA101), un Ac monoclonal anti-CD20 de tercera generación,

es más potente que Rituximab y está indicado, en combinación con Clorambucil, para el tratamiento de pacientes de LLC con comorbilidades y que no han recibido tratamiento previo ²⁴⁸. Tras demostrar su eficacia en varios estudios, el Ac monoclonal anti-CD52 Alemtuzumab está indicado para el tratamiento de pacientes con LLC refractaria a Fludarabina ²⁴⁹⁻²⁵². Además de los anteriores, se están estudiando para su uso en LLC otros Acs monoclonales, incluyendo Bevacizumab y Natalizumab. Bevacizumab actúa como inhibidor de la angiogénesis al bloquear VEGF ²⁵³ y Natalizumab bloquea la subunidad α_4 de las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_4\beta_7$, impidiendo las interacciones entre estas integrinas y sus ligandos y, por consiguiente, bloqueando la adhesión al endotelio vascular y la migración de las células LLC hacia los microambientes tisulares ^{53,254} (Figura 8).

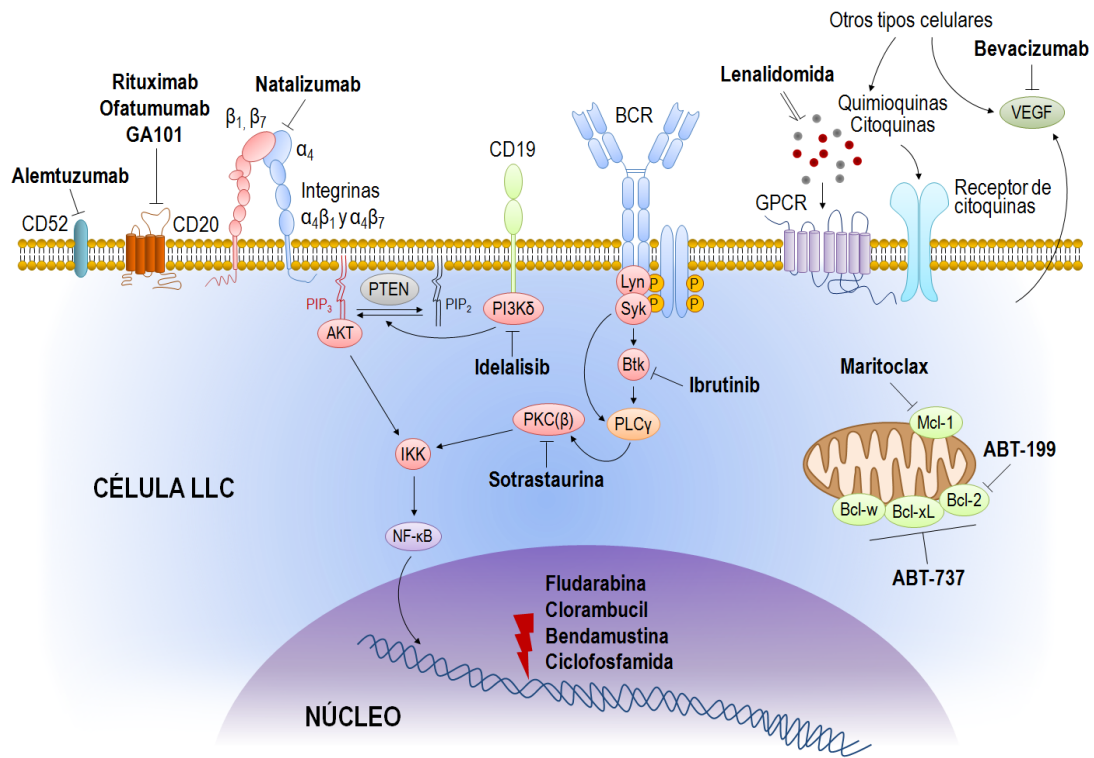


Figura 8. Principales tratamientos de la LLC y sus dianas moleculares. Modificada de ²⁵⁵.

En los últimos años, se están ensayando un gran número de compuestos nuevos para el tratamiento de la LLC. Cabe destacar los agentes inmunomoduladores, como la Lenalidomida, un sucesor de la Talidomida con potencia mejorada y menores efectos adversos ²⁵⁶; los "miméticos de BH3" que son capaces de reactivar la apoptosis en LLC al inhibir los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (Maritoclax inhibe Mcl-1 ²⁵⁷; ABT-199 inhibe Bcl-2 ²⁵⁸; ABT-737 inhibe Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w ²⁵⁹); e inhibidores de quinasas como Ibrutinib (inhibidor de la BTK) ^{260,261}, Idelalisib (inhibidor de la PI3K δ)^{262,263} o Sotrastaurina (inhibidor de PKC)²⁶⁴ (Figura 8). Algunos de estos compuestos se encuentran actualmente en ensayos clínicos y están dando muy buenos resultados.

1.4.2. Resistencias al tratamiento: Integración

En cáncer, la resistencia a los tratamientos es una de las principales causas de recaída de los pacientes y, por consiguiente, de incurabilidad ²⁶⁵. En el caso de la LLC, la resistencia a la terapia se debe a una combinación de señales de supervivencia intrínsecas y extrínsecas a la célula LLC; las primeras son consecuencia de alteraciones genéticas o epigenéticas y las segundas de las interacciones con el microambiente *in vivo* ²⁶⁶. Desde el punto de vista de las alteraciones genéticas, determinadas anomalías cromosómicas (incluyendo del17p13 [*TP53*] y del11q23 [*ATM*] ²⁶⁷) y/o mutaciones en los genes *TP53*, *BIRC3*, *NOTCH1* o *SF3B1* ²⁶⁸ indentifican grupos de pacientes de alto riesgo inicialmente resistentes a los estándares actuales de tratamiento ⁸. En cuanto al microambiente, existe una creciente evidencia de su indiscutible contribución a la supervivencia de las células LLC y, por consiguiente, a la resistencia a la terapia ^{123,139}. Así, aunque los tratamientos son normalmente efectivos en la inducción de apoptosis en las células LLC en sangre periférica, la efectividad se ve reducida en los microambientes tisulares, especialmente la médula ósea y los ganglios linfáticos, donde las células reciben señales de supervivencia ¹⁴⁰. Como consecuencia, una fracción de las células LLC alojadas en estos nichos resiste a la terapia, representando probablemente la base de la enfermedad residual mínima y de la recaída tras el tratamiento ²⁶⁹. Muchas de las señales

de supervivencia procedentes del microambiente convergen en una regulación al alza en las células LLC de varios miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2, incluyendo Mcl-1^{153,168,270}, Bcl-2^{153,270,271} y Bcl-xL²⁷⁰, y niveles elevados de estas proteínas se han asociado con resistencia incrementada a la terapia^{80,266,272}. Esto sugiere un papel clave para el microambiente y las proteínas de la familia Bcl-2 en la resistencia a los tratamientos y, por consiguiente, en la progresión de la LLC.

1.4.3. El trióxido de arsénico como potencial terapia para la LLC

A pesar de los avances realizados, la LLC continúa siendo una enfermedad incurable y, en muchos casos, mortal^{4,273,274}, lo que hace imprescindible continuar la búsqueda de nuevas terapias y dianas terapéuticas. En este sentido, tanto en nuestro laboratorio como en otros, se ha comenzado a estudiar el trióxido de arsénico (ATO) como potencial terapia para la LLC, sólo o en combinación otros agentes y/o estrategias terapéuticas^{275,276}. El uso terapéutico del arsénico se remonta a la medicina tradicional china, aunque su actividad antileucémica no se describió hasta finales del siglo XIX²⁷⁷. Actualmente, el ATO está aprobado como monoterapia para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda refractaria a quimioterapia con retinoides y antraciclinas, y se está estudiando en combinación con ácido trans-retinoico (ATRA) para pacientes diagnosticados *de novo*²⁷⁸. Además, actualmente, se está ensayando como monoterapia o terapia combinada en otras neoplasias hematológicas, incluyendo leucemia mieloide crónica, síndrome mielodisplásico y leucemia mieloide aguda²⁷⁹.

El efecto citotóxico del ATO implica complejos mecanismos, muchos de los cuales aún no se conocen completamente. En nuestro laboratorio, se ha caracterizado que el mecanismo por el que el ATO induce apoptosis en células LLC consiste en la activación de la quinasa JNK y la inhibición la vía de supervivencia PI3K/Akt/NF-κB. Esto da lugar a una disminución de los niveles de NF-κB y de la proteína antiapoptótica XIAP, dos supresores de PTEN, con el consiguiente incremento en la expresión de esta fosfatasa. En última instancia, la activación de JNK conduce a la producción de especies reactivas

de oxígeno (ROS), generando estrés oxidativo y liberación de citocromo c de la mitocondria con la consiguiente activación de caspasas y, finalmente, muerte de la célula por apoptosis (Figura 9). Además, otros autores han descrito que varios compuestos de arsénico, incluido el ATO, inducen fuertemente la expresión de la hemooxigenasa-1 (HMOX-1) en varios sistemas celulares, incluyendo células de mieloma múltiple ²⁸⁰⁻²⁸⁴. La HMOX-1 es la forma inducible de la principal enzima celular de respuesta a estrés oxidativo, la HMOX, y se ha asociado con una respuesta celular, generalmente protectora, frente a la al daño oxidativo inducido ²⁸⁵.

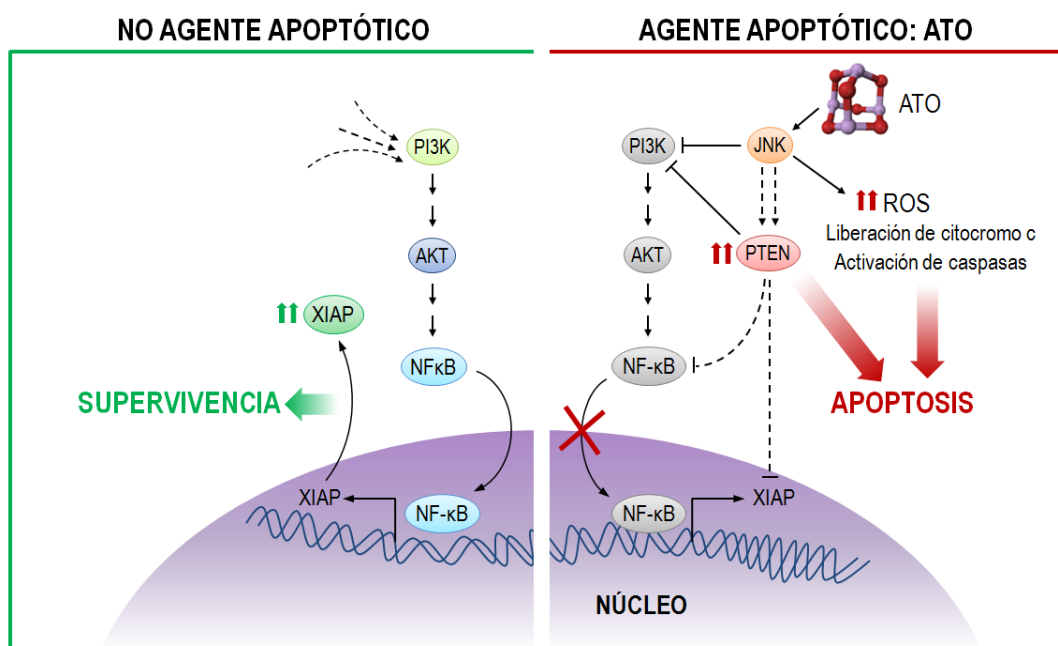


Figura 9. Mecanismo de acción del ATO en células LLC. Modificada de ²⁷⁶.

Por otra parte, cabe destacar que el ATO induce selectivamente apoptosis de células LLC sin afectar significativamente a los linfocitos B normales ²⁷⁶, probablemente como consecuencia de la mayor sensibilidad de las células tumorales al estrés oxidativo ²⁸⁶⁻²⁸⁸. Asimismo, se ha descrito que ATO promueve apoptosis preferentemente en casos de LLC con mal pronóstico ²⁸⁹.

Objetivos

2. OBJETIVOS

El ATO es capaz de inducir selectiva y eficientemente apoptosis en células de LLC *in vitro*. Con el fin de estudiar la posible utilización de este compuesto en el tratamiento de la LLC, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Caracterización molecular del efecto del ATO en células LLC.

- 1.1. Determinación del perfil de expresión génica inducido por ATO en células de LLC.
- 1.2. Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados en respuesta a ATO.

2. Determinación del posible papel de MMP-9, componente abundante del microambiente tumoral, en la respuesta de células LLC a ATO.

- 2.1. Estudio de la modulación de la expresión de MMP-9 por ATO.
- 2.2. Papel de MMP-9 en la respuesta a la apoptosis inducida por ATO en células LLC.

3. Análisis de la posible influencia de otras moléculas y rutas de señalización inducidas por el microambiente en la respuesta de células LLC a ATO.

- 3.1. Influencia del cocultivo con células estromales de médula ósea sobre el efecto citotóxico del ATO en células LLC.
- 3.2. Caracterización de los mecanismos moleculares implicados en la resistencia a ATO inducida por células estromales y estudio de estrategias para revertirlos.

Material y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Pacientes, células y cultivos celulares

Todos los estudios presentados en esta Tesis Doctoral han sido aprobados por la Comisión de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Los 47 pacientes de LLC (Tabla 4) participantes en los mismos no recibieron tratamiento en los 6 meses previos a la extracción de las muestras y firmaron un consentimiento informado antes de susodicha extracción. Se purificaron los linfocitos B (fracción mononuclear) a partir de las muestras de sangre periférica mediante centrifugación en gradiente de Ficoll (Ficoll-Paque™ PLUS, GE Healthcare Bio-Science) y, cuando fue necesario, selección negativa con esferas magnéticas (Dynabeads, Invitrogen Dynal AS) conjugadas con un Ac anti-CD3. La población de células B resultante fue $\geq 90\%$ CD19+, según determinaciones mediante citometría de flujo en un aparato Coulter Epics XL flow cytometer (Beckman Coulter). Las células obtenidas mediante el procedimiento anterior, se conservaron congeladas en N₂ líquido hasta su uso. Las células estromales primarias se obtuvieron a partir de un aspirado de médula ósea de un paciente con LLC (P5, Tabla 4), cultivando la fracción mononuclear resultante durante 3 semanas en medio IMDM (Lonza)/20% suero bovino fetal (FBS). Una vez establecidas, estas células se cultivaron en medio IMDM/15% FBS y fueron usadas durante un máximo de 4 semanas. Las líneas celulares estromales HS-5 y HS-27A, establecidas a partir de médula ósea de donantes normales ²⁹⁰, fueron obtenidas, respectivamente, del Dr. Atanasio Pandiella (Instituto de Biología Celular y Molecular del Cáncer, IBMCC, Salamanca, España) y del biobanco ATCC (*American Type Culture Collection*), y cultivadas en RPMI/10% FBS. La línea celular MEC-1, establecida a partir de un paciente de LLC ²⁹¹, fue proporcionada por el Dr. Enrique Ocio (Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, IBMCC, Salamanca). Las células MMP-9-MEC-1 y Mock-MEC-1 se generaron en el laboratorio mediante transfección estable con lentivirus ²⁹². Brevemente, la secuencia de DNA codificante de la proMMP-9 se clonó en el vector pEGFP-N1, se amplificó mediante PCR usando la DNA polimerasa de alta fidelidad Pfu

(Agilent Technologies), y se insertó en el vector pCR-Blunt (Blunt Zero PCR cloning kit, Invitrogen). Tras la digestión con enzimas de restricción, las secuencias de DNA correspondientes se insertaron en el vector lentiviral pRRL sin18.CMV.IRES.eGFP (Dr. Juan Carlos Ramírez, Viral Vector Unit, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, CNIC, Madrid). Las construcciones control (Mock) se obtuvieron de manera idéntica con el vector pEGFP-N1 vacío. Las células MEC-1 se infectaron con concentrados de lentivirus conteniendo las construcciones anteriores y obtenidos en células HEK293T. La población de células GFP positivas resultante se enriqueció hasta > 95% en sucesivas etapas de selección por citometría de flujo en un aparato FACS Vantage cell Sorter (Becton Dickinson). Tanto la línea parental MEC-1 como los transfectantes estables se cultivaron en medio IMDM/10% FBS.

Tabla 4. Características clínicas de los pacientes de LLC.

Paciente	Sexo/Edad	Binet/Rai	Estado IGHV	CD38/ZAP70	% α_4	% β_1
1	M/57	C/IV	ND	-/+	ND	ND
2	M/69	C/IV	ND	-/+	37.0	72.7
3	F/72	C/IV	Mut	-/+	74.9	99.2
4	M/71	B/I	NM	-/+	75.5	66.8
5	M/67	B/II	Mut	-/+	ND	ND
6	M/65	A/I	Mut	-/-	78.5	92.0
7	M/79	A/I	NM	-/+	95.1	99.2
8	M/ND	B/III	ND	+/+	82.4	95.0
9	M/79	B/II	NM	+/-	47.3	95.7
10	M/77	A/O	NM	+/ND	45.0	67.0
11	F/55	B/II	NM	-/-	89.0	89.4
12	M/44	B/II	NM	-/+	10.5	63.8
13	M/68	A/O	Mut	-/+	12.5	41.2
14	M/59	C/IV	NM	+/+	29.9	33.2
15	M/85	C/IV	NM	+/-	25.7	47.1
16	F/73	A/II	Mut	-/-	75.9	47.8
17	ND	ND	ND	-/ND	39.8	16.8
18	M/ND	ND	ND	+/ND	37.0	80.3

Materiales y Métodos

19	M/80	B/II	NM	-/+	20.0	37.5
20	F/ND	ND	ND	-/ND	97.9	17.5
21	M/58	A/II	Mut	-/ND	50.0	99.0
22	M/48	B/I	NM	+/+	21.0	66.1
23	M/68	ND	NM	+/+	35.9	57.8
24	F/54	B/II	NM	+/-	92.5	82.5
25	ND	ND	ND	ND	ND	ND
26	F/82	C/IV	NM	+/-	99.2	99.5
27	M/73	B/II	NM	+/+	94.1	98.0
28	F/70	C/IV	ND	+/ND	80.7	78.2
29	M/72	C/IV	NM	+/ND	48.9	54.3
30	M/44	B/II	NM	-/+	18.6	35.0
31	M/61	C/IV	NM	+/ND	60.9	70.9
32	F/69	C/IV	NM	+/ND	99.0	97.4
33	M/71	B/II	Mut	-/+	78.5	99.5
34	M/79	A/I	ND	-/+	94.0	99.9
35	M/62	ND	ND	+/ND	89.7	97.8
36	M/68	C/IV	Mut	-/ND	34.2	45.5
37	F/38	C/III	NM	+/+	95.3	91.7
38	F/67	B/II	NM	+/-	97.1	99.3
39	F/55	B/II	Mut	+/+	98.7	97.0
40	F/65	A/I	NM	-/+	19.8	53.5
41	M/65	B/II	Mut	-/ND	97.1	92.5
42	M/50	A/0	ND	-/+	40.5	32.5
43	F/69	B/II	ND	-/+	63.2	51.4
44	M/74	B/II	NM	+/+	34.9	51.3
45	M/74	B/II	Mut	+/ND	26.1	40.9
46	M/73	A/0	ND	-/-	58.3	68.9
47	M/80	A/I	Mut	+/+	36.2	87.4

IGHV, genes codificantes de la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. M, masculino; F, femenino; Mut: Mutado; NM: No mutado; ND: No determinado/No disponible.

3.2. Anticuerpos y reactivos

3.2.1. Anticuerpos

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en el presente trabajo.

Proteína reconocida (particularidades)	Procedencia	Referencia	Especie reconocida	Grado de especificidad
Anticuerpos primarios				
Actina	Sigma-Aldrich	A3853	Ratón	Monoclonal
Akt	Santa Cruz Biotechnology	sc-5298	Ratón	Monoclonal
Bax	Santa Cruz Biotechnology	sc-526	Conejo	Policlonal
Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology	sc-509	Ratón	Monoclonal
Bcl-xL	Santa Cruz Biotechnology	sc-634	Conejo	Policlonal
Bim	BD Pharmingen	559685	Conejo	Policlonal
CD19	Diaclone	854.143.020	Ratón	Monoclonal
CD3 (clon T3B)	Donación*	ND	Ratón	Monoclonal
CD38 (clon 16BDH)	Donación*	ND	Ratón	Monoclonal
CD44 (clon HP2/9)	Donación*	ND	Ratón	Monoclonal
CD45	Donación*	ND	Ratón	Monoclonal
CD5	Diaclone	854.040.000	Ratón	Monoclonal
Fibronectina	Preparado en el laboratorio	ND	Conejo	Policlonal
HMOX-1	Santa Cruz Biotechnology	sc-136961	Ratón	Monoclonal
Integrina α 4 (clon HP1/7)	Donación*	ND	Ratón	Monoclonal
Integrina α 4 (clon HP2/1)	Donación*	ND	Ratón	Monoclonal
Integrina β 1 (Alex 1/4)	Donación*	ND	Ratón	Monoclonal
Integrina β 2	BD Pharmingen	556084	Conejo	Policlonal
I κ B α	Santa Cruz Biotechnology	sc-1643	Ratón	Monoclonal
Lyn	Santa Cruz Biotechnology	sc-7274	Ratón	Monoclonal
Mcl-1	Santa Cruz Biotechnology	sc-819	Conejo	Policlonal
MMP-9	Santa Cruz Biotechnology	sc-6841R	Conejo	Policlonal
Noxa	Santa Cruz Biotechnology	sc-52	Conejo	Policlonal
p-Akt (S473)	Cell Signaling Technology	4060S	Conejo	Policlonal
p-Akt (T308)	Cell Signaling Technology	2965S	Conejo	Policlonal
p-ERK1/2 (T202/Y204)	Cell Signaling Technology	9101S	Conejo	Policlonal
p-I κ B α (S32/36)	Cell Signaling Technology	9246S	Conejo	Policlonal

PKC	Santa Cruz Biotechnology	sc-10800	Conejo	Policlonal
p-Lyn (Y396)	Abcam	ab40660	Conejo	Monoclonal
p-PKC (pan, β II S660)	Cell Signaling Technology	9371S	Conejo	Policlonal
p-STAT3 (Y705)	BD Biosciences	612356	Ratón	Monoclonal
RhoGDI	Santa Cruz Biotechnology	sc-360	Conejo	Policlonal
STAT3	Santa Cruz Biotechnology	sc-482	Conejo	Policlonal
VCAM-1	Santa Cruz Biotechnology	sc-8304	Conejo	Policlonal
Vinculina	Sigma-Aldrich	V9131	Ratón	Monoclonal
Anticuerpos secundarios				
Igs de conejo (marcado con Alexa 488/Alexa 647)	Molecular Probes	ND	Conejo	Policlonal
Igs de conejo (marcado con HRP)	Dako	P0448	Conejo	Policlonal
Igs de conejo no reducidas, Rabbit TrueBlot®	Rockland Immunochemicals	18-8816-31	Conejo	Policlonal
Igs de ratón (marcado con Alexa 488)	Molecular Probes	ND	Ratón	Policlonal
Igs de ratón (marcado con HRP)	Dako	P0447	Ratón	Policlonal

El anticuerpo anti- α 4 clon HP1/7, no bloqueante, se usó como control de isotipo para los anticuerpos bloqueantes HP2/1, HP2/9 y anti- β 2. ND, no disponible. Igs, inmunoglobulinas. *, Donación del Dr. Francisco Sánchez Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid, España).

3.2.2. Reactivos

Tabla 6. Reactivos utilizados en el presente trabajo.

Descripción (abreviatura)	Procedencia	Referencia	Aplicación
Actinomicina D	Sigma-Aldrich	A9415	Estabilidad de mRNA
Albúmina de suero bovino (BSA)	Roche Diagnostics	10735086001	Control de adhesión celular
Anexina V marcada con FITC (Anexina V-FITC)	Immunostep	ANXVF-200T	Determinación de viabilidad celular/apoptosis
Bisindolilmaleimida I (Bis I)	Calbiochem	203293	Inhibición de PKCs
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)	Sigma-Aldrich	M2128	Determinación de viabilidad celular/proliferación
Bromuro de etidio	Sigma-Aldrich	E1510	Tinción de DNA
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich	D2650	Vehículo

Materiales y Métodos

Factor α de necrosis tumoral (TNF α)	R&D Systems	210-TA-020	Estimulación de células estromales
Fludarabina (2-fluoroadenina-9- β -D-arabinofuranósido)	Sigma-Aldrich	F2773	Inducción de apoptosis
Gelatina porcina (tipo A)	Sigma-Aldrich	G1890	Elaboración de geles para zimografía
Idelalisib/CAL-101	Selleck Chemicals	S2226	Inhibición de PI3K δ
Igs G policlonales de conejo	Immunostep	RBPLPU-01MG	Control de isotipo para Acs policlonales de conejo
Inhibidor de la activación de NF- κ B	Calbiochem	481407	Inhibición de NF- κ B
Inhibidores de fosfatasa (cóctel, PhosSTOP)	Roche Diagnostics	04906837001	Inhibición de fosfatasa en lisados celulares
Inhibidores de proteasas (cóctel, cOplete, Mini)	Roche Diagnostics	04693124001	Inhibición de proteasas en lisados celulares
iQTM SYBR [®] Green Supermix	Bio-Rad	170-8880	qPCR
LY294002 (LY)	Calbiochem	440204	Inhibición de PI3Ks
Metaloproteinasas de matriz-9 (MMP-9)	Purificada Δ	ND	Sustrato para adhesión celular
Paraformaldehído	Sigma-Aldrich	P6148	Fijación/permeabilización celular
Poli-L-lisina	Sigma-Aldrich	P4707	Sustrato para adhesión celular
PP2	Calbiochem	P0042	Inhibición de SFK
Proteína A-sefarosa [™] CL-4B	GE Healthcare	17-0780-01	Inmunoprecipitación
Protoporfirina de cobalto (CoPP)	Donación*	ND	Inducción y activación de HMOX-1
Protoporfirina de cobre (CuPP)	Donación*	ND	Control inactivo de protoporfirinas
Protoporfirina de estaño (SnPP)	Donación*	ND	Inhibición de HMOX-1
Solución de gelatina tipo B	Sigma-Aldrich	G1393	Sustrato para cultivo de células estromales
Sotrastaurina	Selleck Chemicals	S2791	Inhibición de PKCs, incluida PKC β
Stattic	Selleck Chemicals	S7024	Inhibición de STAT3
Transcriptasa reversa M-MuLV	Fermentas GmbH	ND	RT-PCR
TRI Reagent [®]	Sigma-Aldrich	T9424	Aislamiento de RNA
Triciribina/API-2	Calbiochem	124038	Inhibición de Akt
Trióxido de arsénico (ATO)	Sigma-Aldrich	A1010	Inducción de apoptosis
UO126 (UO)	Calbiochem	662009	Inhibición de MEK

Yoduro de propidio (PI)	Sigma-Aldrich	P4170	Determinación de viabilidad celular
Z-VAD-fmk	Sigma-Aldrich	V116	Inhibición de caspasas/apoptosis

Igs: inmunoglobulinas. FITC, isotiocianato de fluoresceína, *fluorescein isothiocyanate*. SFK, quinasas de la familia Src, *Src family kinases*. *, Donación del Dr. Ángel Luis Corbí (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España).
^Δ, Purificada en el laboratorio como se describe en ²⁹³.

3.3. RT-PCR y ensayos de estabilidad de RNA

El RNA total de 10-15 x 10⁶ células LLC o 5 x 10⁶ células MEC-1 se aisló con TRI Reagent® siguiendo las instrucciones del fabricante y, posteriormente, se convirtió a cDNA usando la transcriptasa reversa M-MuLV. Los sucesivos análisis por PCR se llevaron a cabo en las siguientes condiciones: Para *MMP-9* y *GAPDH*, 25 ciclos de amplificación consistentes en 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de anillamiento a 59°C, 1 min de polimerización a 72°C; para *c-Fos* y *c-Jun*, 25 ciclos consistentes en 30 s de desnaturalización a 95°C, 30 s de anillamiento a 60°C y 45 s de polimerización a 72°C. Las secuencias sentido y antisentido, respectivamente, de los oligonucleótidos empleados (adquiridos de Sigma-Aldrich) son las siguientes: *MMP-9*: 5'-TGGGCTACGTGACCTATGAC-3' y 5'-CAAAGGTGAGAAGAGAGGGC-3'; *c-Fos*: 5'-TACTACCACTCACCCGCAGA-3' y 5'-CAGGTTGGCAATCTCGGTCT-3'; *c-Jun*: 5'-CGACAAGTAAGAGTGCGGGA-3' y 5'-CCCGTTGCTGGACTGGATTA-3'; *GAPDH*: 5'-GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCA-3' y 5'-CGGCCATCACGCCACAGTTTC-3'. Para evaluar la estabilidad del mRNA, 10-15 x 10⁶ células LLC se cultivaron con o sin 3 μM ATO. Tras 20 h, se adicionó Actinomicina D (5 μM) para boquear la transcripción *de novo* y se recogieron muestras a varios tiempos. Los niveles de mRNA de *MMP-9* y *GAPDH* se midieron mediante por RT-PCR. En todos los casos, las bandas se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio y se cuantificaron con el programa MultiGauge V3.0 (Fujifilm Global Lifescience). Los resultados muestran los niveles relativos del mRNA de interés respecto de los niveles de mRNA de *GAPDH* (control interno).

3.4. PCR cuantitativa

La extracción del RNA total y la obtención del correspondiente cDNA se llevaron a cabo como se describe en la sección anterior. Los análisis por PCR cuantitativa (qPCR) se realizaron por triplicado, usando iQTM SYBR® Green Supermix según las indicaciones del fabricante y los siguientes oligonucleótidos (adquiridos de Sigma-Aldrich): *MMP-9*: los mismos que para RT-PCR; *HMOX-1*: sentido, 5'-GGGTGATAGAAGAGGCCAAGA-3', y antisentido, 5'-AGCTCCTGCAACTCCTCAAA-3'. Los resultados se expresaron mediante el método $\Delta\Delta CT$ para cuantificaciones relativas, usando como control interno los niveles de mRNA de la proteína de unión a caja TATA (TBP).

3.5. Silenciamiento génico

Los siguientes siRNAs (secuencias sentido) se obtuvieron de Sigma-Aldrich: *MMP-9*, 5'-CAUCACCUAUUGGAUCCAAAdTdT-3'; *Mcl-1*, 5'-GGACUUUUUAUACCUGUUAUdTdT-3'; y control negativo, 5'-AUUGUAUGCGAUCGCAGACdTdT-3'. 15 x 10⁶ células Mock- o *MMP-9-MEC-1* o 24 x 10⁶ células LLC (primarias) se nucleofectaron con los correspondientes siRNAs (200-400 nM/10⁶ células) en un dispositivo Nucofactor I (Amaxa). Se usó la disolución V de Lonza y el programa T-01 para las células *MEC-1*, y la disolución Human B Cell Nucleofector de Lonza y el programa U-15 para las células LLC. Tras la nucleofección, las células Mock- y *MMP-9-MEC-1* se incubaron con IMDM puro durante 24 h a 37°C. Transcurrido este tiempo, las células se trataron con ATO, Fludarabina o vehículo y fueron incubadas adicionalmente durante 24 h (ATO) o 48 h (Fludarabina). En el caso de las células LLC, inmediatamente después de la nucleofección, se plaquearon 12 x 10⁶ células sobre monocapas confluentes preestablecidas de células HS-27A y el cocultivo se incubó a 37°C en RPMI puro durante 16 h. Transcurrido este tiempo, las células se incubaron adicionalmente con o sin ATO durante 24 h. La eficiencia de la transfección se confirmó mediante análisis por zimografía (células Mock- y *MMP-9-MEC-1*) y mediante *Western blotting* (células *MMP-9-MEC-1* y LLC).

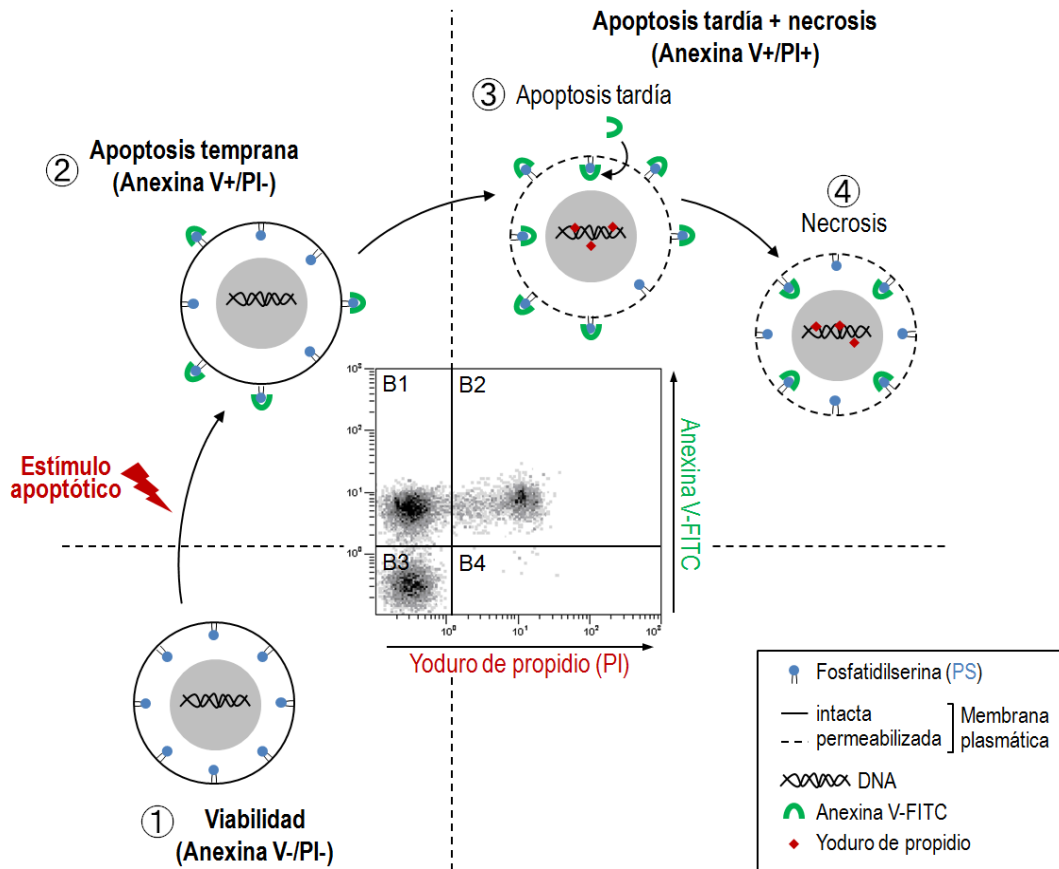


Figura 10. Estados secuenciales de muerte por apoptosis *in vitro* y detección mediante Anexina V-FITC/PI. En el centro, diagrama biparamétrico (Anexina V-FITC vs PI) obtenido mediante citometría de flujo. Los números (1-4) indican los estados secuenciales de viabilidad-muerte, según el marcaje para Anexina V-FITC/PI, por los que pasa una célula sometida a un estímulo apoptótico *in vitro*. La Anexina V se une a los residuos de fosfatidilserina (PS, *phosphatidylserine*) que se exponen en la cara externa de la membrana plasmática de células apoptóticas. *In vitro*, al no existir un sistema de eliminación de células apoptóticas (*in vivo*: fagocitos), toda célula apoptótica (Anexina V+) termina permeabilizando la membrana plasmática y, por consiguiente, marcándose con PI. Además, toda célula necrótica con la membrana plasmática permeabilizada (PI+) es marcada inespecíficamente (en la cara interna de la membrana) por Anexina V. Por tanto, las células apoptóticas tardías y necróticas son ambas dobles positivas para Anexina V-FITC y PI e indistinguibles mediante esta técnica.

3.6. Ensayos de viabilidad celular/apoptosis

2 x 10⁵ células LLC en 100 µl RPMI/0.1% FBS o 1.5 x 10⁵ células MEC-1 en 100 µl IMDM/0.1% FBS se incubaron con ATO, Fludarabina o vehículo durante de 24 h (ATO)

o 48 h (Fludarabina). La viabilidad celular se determinó en un citómetro de flujo Coulter Epics XL (Beckman Coulter), usando Anexina V-FITC (1 μ l/tubo) y PI (1.5 μ g/ml) (Figura 10). En algunos experimentos, las células LLC se incubaron (1 h, 37°C), antes de la adición del ATO, con protoporfirinas (PP) moduladoras de la actividad HMOX-1 [50 μ M SnPP (inhibidor) y 3 μ M CoPP (inductor y activador)], una PP inactiva [3 y 50 μ M CuPP (control negativo)] o con vehículo. En otros casos, se realizó una preincubación (1 h, 37°C) con 50 μ M Z-VAD-fmk o vehículo antes del tratamiento con ATO durante 24 h.

Para los ensayos de MTT, 7.5 x 10⁴ células MEC-1, Mock- o MMP-9-MEC-1 en 100 μ l de IMDM/0.1% FBS se incubaron con ATO, Fludarabina o vehículo. A las 24 h (ATO) o 48 h (Fludarabina), se adicionó MTT (50 μ g/pocillo) y las células se incubaron adicionalmente durante 4 horas en oscuridad. El precipitado azul de formazán se disolvió en isopropanol-HCl (24:1) y la absorbancia se midió a 540 nm en un espectrofotómetro Multiskan Bichromatic microplate reader (Labsystems).

3.7. Fraccionamiento membrana-citosol

30 x 10⁶ células LLC, mantenidas 1 h a 37°C en medio RPMI sin suero, se incubaron en presencia o ausencia de 3 μ M ATO durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las células se recogieron, se lavaron con PBS 1x frío y se lisaron (15 min a 4°C) en 250 μ l de tampón hipotónico de lisis con digitonina frío (5 mM Tris pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 20 μ g/ml digitonina), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las fracciones citosólica (soluble) y de membrana (insoluble, *pellet*) se separaron por centrifugación (10 min, 5000 rpm, 4°C + 5 min, 13000 rpm, 4°C). El *pellet* se lavó con PBS 1x frío y se incubó 20 min a 4°C en 125 μ l tampón de lisis con NP-40 (10 mM Tris pH 7.5, 40 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1% NP-40), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Finalmente, los lisados se clarificaron por centrifugación (15 min, 13000 rpm, 4°C). Para el fraccionamiento de los transfectantes estables de células MEC-1, 5 x 10⁶ células Mock- o MMP-9-MEC-1, mantenidas 3 h en medio IMDM sin suero, se lavaron con PBS 1x frío y se lisaron 15 min a 4°C en 500 μ l de tampón hipotónico de lisis

con digitonina (misma composición que la mencionada arriba, pero con 40 µg/ml digitonina). Las fracciones citosólica y de membrana se separaron por centrifugación (30 min, 13000 rpm, 4°C). El *pellet*, previo lavado con PBS 1x frío, se incubó con 100 µl de tampón de lisis con NP-40 (el mismo que el descrito, a excepción de que contuvo 0.2% NP-40) durante 20 min a 4°C y los lisados se clarificaron por centrifugación (15 min, 13000 rpm, 4°C). La cantidad de proteína en las fracciones se cuantificó mediante el sistema Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) y la actividad de MMP-9 se detectó por zimografía. La expresión de RhoGDI (proteína citosólica) y CD45 (proteína de membrana), determinadas mediante *Western blotting* en las fracciones, se usaron como controles internos del procedimiento.

3.8. Análisis de la expresión de MMP-9

La MMP-9 secretada se analizó mediante zimografía del medio condicionado de 5×10^6 células LLC tratadas o no con 3 µM ATO, o 5×10^6 células Mock- o MMP-9-MEC-1. La MMP-9 unida a la superficie celular se determinó mediante incubación (1 h a 4°C) de 2×10^5 células LLC (previamente tratadas 24 h con 3 µM ATO o 48 h con 3 µM Fludarabina o vehículo) o 1.5×10^5 células MEC-1-Mock o MEC-1-MMP-9 con un Ac anti-MMP-9 o un Ac control, seguida de la incubación (20 min a 4°C, en oscuridad) con Acs secundarios marcados con los fluorocromos Alexa 488 o Alexa 647, según el ensayo. Las determinaciones se realizaron en un aparato Coulter Epics XL flow cytometer (Beckman Coulter). En algunos experimentos, las células se preincubaron 1 h previa adición del ATO, con el inhibidor de caspasas Z-VAD-fmk (50 µM) o vehículo, o con Acs bloqueantes de la integrina α_4 (HP2/1) y de CD44 (HP2/9) o con un control de isotipo (HP1/7) y, posteriormente, se analizó la expresión de MMP-9 en superficie como se describe arriba. En otros casos, la expresión de MMP-9 en superficie se determinó de forma independiente en las poblaciones de células viables (Anexina V-/PI-) y apoptóticas tempranas (Anexina V+/PI-) en un aparato FACS Vantage cell sorter (Becton Dickinson). Los valores de expresión de MMP-9 se representan mediante el parámetro Fluorescencia Específica

(SF), definido como el producto del porcentaje de células MMP-9 positivas por la intensidad media de fluorescencia (MFI).

3.9. Zimografía

Se recogieron las fracciones citosólica y de membrana o el medio condicionado de células Mock- y MMP-9-MEC-1, o células LLC tratadas o no con ATO. El medio condicionado se concentró 10 (transfectantes MEC-1) o 20 veces (células LLC) a idénticos volúmenes finales, usando columnas de ultrafiltración equipadas con una membrana de 30 kDa de umbral de peso molecular (MWCO) (Sartorius Stedim Biotech GmbH). En todos los casos, la actividad de la MMP-9 se analizó en geles de 7.5% poliacrilamida conteniendo 0.1% de gelatina. Tras la electroforesis SDS-PAGE, los geles se sometieron a 4 lavados de 30 min en agitación, los tres primeros en 2.5% Triton X-100 y el cuarto en agua destilada. A continuación, se incubaron toda la noche a 37°C en 50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂. Finalmente, los geles se tiñeron con 0.2% azul de Coomassie y se destiñeron con 20% metanol/5% ácido acético. Las áreas de actividad gelatinolítica se visualizaron como bandas transparentes y se cuantificaron usando el programa MultiGauge V3.0 (Fujifilm Global Lifescience).

3.10. Inmunoprecipitación y *Western blotting*

Para la obtención de lisados celulares totales, 3-5 x 10⁶ células Mock- o MMP-9-MEC-1 (previamente mantenidas en medio sin suero durante 2 h a 37°C) o 8-10 x 10⁶ células LLC se incubaron con o sin ATO, Fludarabina o vehículo. A las 24 h (ATO) o 48 h (Fludarabina), las células se lisaron (20 min a 4° C) en 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 137 mM NaCl, 10% glicerol, 1% NP-40, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas.

Para inmunoprecipitación, 30 x 10⁶ células Mock- o MMP-9-MEC-1, mantenidas 3 h en medio sin suero, se incubaron en presencia o ausencia de 5 μM ATO. A las 24 h, las células se lisaron (20 min, 4°C) en tampón de inmunoprecipitación (tampón IP: 20 mM

Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM PMSF) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Una vez cuantificados, los lisados se incubaron, primero, con 25 μ l de esferas de proteína A-sefarosa™ 1.5 h a 4°C (*precleaning*) y, posteriormente, con 3 μ g de los Acs primario anti-Mcl-1 o control 16 h a 4°C. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 25 μ l de esferas de proteína A-sefarosa™ a los lisados y, éstos, se incubaron adicionalmente durante 2 h a 4°C. Los *pellets*, conteniendo los inmunocomplejos, se lavaron con tampón IP y las proteínas se extrajeron mediante incubación de las muestras 5 min a 95°C en tampón de carga Laemmli.

Para el *Western blotting*, los inmunoprecipitados y los lisados celulares totales se sometieron a electroforesis SDS-PAGE, seguida de transferencia a membranas de PVDF (Bio-Rad) (inmunoprecipitados) o nitrocelulosa (Bio-Rad) (lisados totales). Las membranas se bloquearon con 5% BSA en TBS-0.1% Tween®20 (TBS-T) durante 1 h, antes de la incubación con los correspondientes Acs primarios 16 h a 4°C. A continuación, las membranas se lavaron 3 veces x 5 min en TBS-T y se incubaron 1 h a temperatura ambiente (RT) con los correspondientes Acs secundarios marcados con HRP (lisados totales) o Rabbit TrueBlot® (inmunoprecipitados).

Para detectar múltiples proteínas en la misma membrana, después de la identificación de la primera proteína, se realizaron 5 lavados de las membranas en agitación a RT; el primero de 10 min con TBS-T, seguido de 3 lavados de 30 min con 1% glicina pH 2.2, 1% SDS, 0.0005% NP-40 y, un último lavado de 10 min con TBS-T. Tras este proceso, las membranas se bloquearon 1 h con 5% BSA en TBS-T y se volvieron a incubar con los correspondientes Acs primarios y secundarios. Para la visualización de las proteínas se empleó el método ECL (Amersham) y la adquisición de las imágenes se llevó a cabo en un aparato LAS-3000 (Fujifilm Global Lifescience). Las bandas de expresión se cuantificaron con el programa MultiGauge V3.0 y se representan los niveles relativos de cada proteína, usando Vinculina (y, en algunos casos, Actina) como control interno.

3.11. Cocultivos

Las células estromales (HS-5, HS-27A o estroma primario) se plaquearon sobre pocillos tapizados con 0.2% gelatina en PBS 1x estéril. En el caso de las células HS-27A, que precisan ser estimuladas para la expresión del ligando de integrinas VCAM-1, después de 4-6 h a 37°C, se estimularon con 15-20 ng/ml TNF α durante 16 h a 37°C. Todas las células estromales se incubaron 16 h a 37°C para permitir el establecimiento de monocapas confluentes. Células LLC (2-5 x10⁶/ml), preincubadas (1 h a 37°C) o no con Acs inhibidores o inhibidores químicos (según se indica), se plaquearon sobre las monocapas estromales (ratio de cocultivo 1:5 a 1:10) o se cultivaron en suspensión para comparar. Los cocultivos se mantuvieron 2 h a 37°C para permitir la adhesión firme de las células LLC a las células estromales y, posteriormente, se incubaron 24 o 48 h, en presencia o ausencia de 2 μ M ATO. La recogida selectiva de las células LLC para posterior análisis se llevó a cabo mediante lavados suaves con PBS 1x estéril o RPMI puro. La integridad de las monocapas estromales tras la recuperación de las células LLC se comprobó por microscopía de contraste de fases. La contaminación residual con células estromales en las muestras de LLC se determinó por citometría de flujo, siendo en todos los casos \leq 1%.

3.12. Inmunofluorescencia

Se tapizaron (16 h, 4°C) cubreobjetos de vidrio esterilizados (15 min, luz ultravioleta) con 10 μ g/ml poli-L-lisina en 0.1 M NaHCO₃ pH 8.5. Se adicionaron 2 x 10⁵ células HS-5 o 1.5 x 10⁵ células HS-27A en 500 μ l RPMI/10% FBS a los cristales, previamente lavados con RPMI puro. Después de 4-6 h de incubación a 37°C, las células se estimularon con 20 ng/ml TNF α durante 16 h a 37°C y, posteriormente, se fijaron con 4% paraformaldehído durante 15 min a RT. Los cristales se lavaron 2 veces con PBS 1x, se bloquearon (1 h a RT) con PBS 1x/1% BSA y se incubaron (1 h a RT) con los Acs primarios anti-Fibronectina, anti-VCAM-1 o control (todos a 10 μ g/ml en PBS 1x/1% BSA). Tras 3-4 lavados, los cristales se incubaron 1 h a RT con el Ac secundario marcado con

Alexa488 y, finalmente, las muestras se lavaron 3-4 veces, se montaron en los portaobjetos con Mowiol + DAPI y se analizaron en un microscopio láser confocal espectral (CLSM) TCS-SP5-AOBS (Leica) con un objetivo 63x de inmersión en aceite.

3.13. *Microarrays* de RNA

5 x 10⁶ células MEC-1 se cultivaron durante 24 h en IMDM/0.1% FBS, en presencia o ausencia de 5 µM ATO, y el RNA total se extrajo mediante el sistema RNeasy® Mini kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. De esta forma se obtuvieron 3 muestras de RNA control y 3 tratadas con ATO, cuya concentración, pureza y calidad se determinó, preliminarmente en un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific) y, posteriormente, en un equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). El cDNA de doble cadena y el cRNA biotinilado se sintetizaron secuencialmente usando el oligonucleótido T7-polyT y el sistema BioArray RNA labeling kit (Enzo Life Sciences), respectivamente (Unidad de Genómica del IBMCC, Salamanca, España). El RNA marcado se fragmentó e hibridó, siguiendo las instrucciones del fabricante, con un *microarray* de RNA Human Gene 1.0 ST GeneChip™ (Affymetrix), que posee cobertura completa para todo el transcriptoma humano (Unidad de Genómica del IBMCC, Salamanca, España).

Para el procesamiento y análisis de los datos derivados del *microarray*, se empleó el algoritmo RMA para la corrección del fondo, la normalización intra- e inter-*microarray*, y el cálculo de la señal de expresión^{294,295}. Una vez calculada la señal de expresión absoluta para cada gen (es decir, el valor de la señal para cada conjunto de sondas) en cada *microarray*, se aplicó el método SAM²⁹⁶ para calcular los valores de expresión significativamente diferenciales entre las muestras control y las muestras tratadas, y encontrar así los conjuntos de sondas (genes) cuya expresión era inducida o reprimida por el tratamiento con ATO. Este método emplea permutaciones para realizar una inferencia estadística robusta de la mayoría de los genes significativamente modulados y proporciona p valores ajustados a esta comparación múltiple, mediante el empleo de la

tasa de falsos positivos (FDR) o proporción de falsos positivos esperada en las pruebas estadísticamente significativas ²⁹⁷. Fijando FDR = 0.1 (10 % falsos positivos), se obtuvo el grupo de genes diferencialmente expresados de forma significativa entre las muestras control y las muestras tratadas con ATO. Aquellos cuya expresión era dos o más veces superior o inferior en las muestras tratadas respecto de las muestras control ($0.5 \geq R \text{ fold} \geq 2$) se filtraron manualmente. El conjunto resultante se analizó mediante la herramienta DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID, NIH) v6.7, usando como *background* el Genoma Humano. Esta herramienta permite la agrupación funcional de los genes según la Ontología Génica (GO), es decir, según su participación en procesos biológicos, la función molecular con la que se relacionan y la localización celular/subcelular de las funciones o proteínas codificadas por los mismos (componentes celulares). En todos los casos, se usaron las categorías GO FAT que comprenden términos más específicos. Se consideraron significativamente enriquecidas las categorías de cada término de GO FAT con un p valor ≤ 0.05 . Los *heat maps* se elaboraron con la herramienta MeV (TIGR Multiexperiment Viewer) v4.9 obtenida de TM4 *Microarray* Software Suite (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA).

3.14. Análisis estadísticos

La normalidad de los datos se comprobó con el test de Shapiro-Wilk usando el procedimiento univariante del software SASv9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA). La significación estadística se determinó, sólo cuando el tamaño muestral (n) fue ≥ 3 , mediante el test t de Student de dos colas. Los análisis se realizaron con el programa GraphPad InStat v3.06 (GraphPad Software) y se consideró estadísticamente significativo un p valor ≤ 0.05 . Todos los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (σ), a excepción de los datos de qPCR que se muestran como media \pm error estándar de la media (σ/\sqrt{n}).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Efecto citotóxico del ATO en células de LLC

Para establecer las condiciones óptimas para estudiar la acción del ATO, células LLC ($2 \times 10^6/\text{ml}$) se cultivaron en presencia o ausencia de varias concentraciones de ATO durante 24 o 48 h, y la viabilidad celular/apoptosis se determinó mediante citometría de flujo, usando Anexina V-FITC/PI. Las Figuras 11A y 11B muestran que el ATO disminuía la viabilidad celular (células Anexina V-/PI-) de forma dosis dependiente y esto correlacionaba con un incremento, también dependiente de la dosis, en la apoptosis temprana (células Anexina V+/PI-). Estos efectos eran claros a 24 h (Figura 11A) y más acentuados a 48 h (Figura 11B). El porcentaje de apoptosis tardía + necrosis (células Anexina V+/PI+), sin embargo, era similar a todas las dosis de ATO ensayadas y superior al observado en las células no tratadas. A 24 h, el 33.9% y el 46.2% de las células eran apoptóticas tempranas en presencia de 2 y 3 μM ATO, respectivamente. Estos niveles intermedios de apoptosis parecían adecuados, por lo que seleccionamos 2-3 μM ATO y 24 h como condiciones óptimas para los estudios posteriores, salvo cuando se indica lo contrario.

Se realizaron el mismo tipo de ensayos con la línea celular MEC-1, observándose de nuevo una reducción de la viabilidad (células Anexina V-/PI-) dependiente de la dosis de ATO, que correlacionaba con un incremento de la apoptosis (células Anexina V+) tanto a 24 h (Figura 11C) como a 48 h (Figura 11D). Se muestran conjuntamente las células Anexina V+/PI- (apoptóticas tempranas) y Anexina V+/PI+ (apoptóticas tardías y necróticas), ya que la población Anexina V+/PI- era muy reducida en estas células. Las condiciones seleccionadas para posteriores estudios, en este caso, fueron 3 y 5 μM ATO a 24 h, que inducían un 31% y 51.4% de apoptosis, respectivamente.

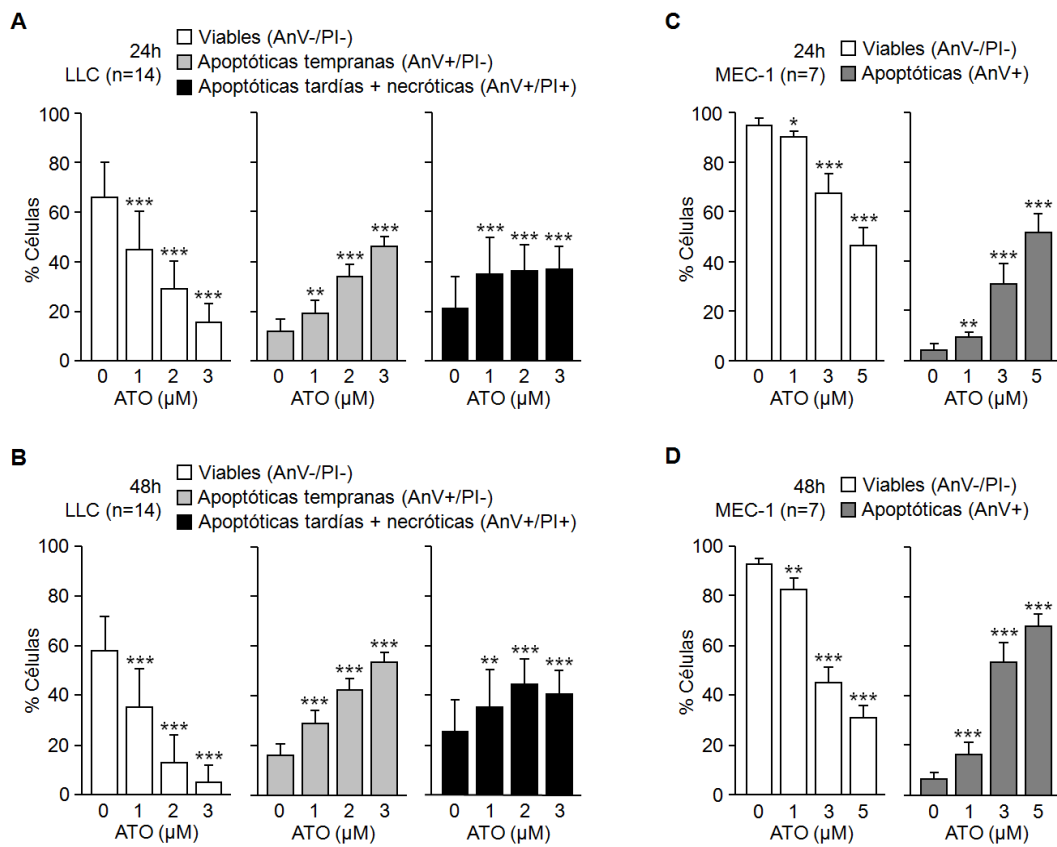


Figura 11. Apoptosis inducida por ATO en células MEC-1. (A-D) Células LLC (A, B) o células MEC-1 (C, D) se cultivaron en presencia o ausencia de las indicadas concentraciones de ATO durante 24 (A, C) o 48 h (B, D), y la viabilidad/muerte celular se determinó por citometría de flujo, usando Anexina V-FITC/PI (AnV/PI). Se muestran los % medios de células en los diferentes "estadios de muerte". *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001. Los símbolos * indican comparaciones con los correspondientes valores control (-ATO).

4.2. Perfil de expresión génica en células LLC en respuesta a ATO

4.2.1. Genes diferencialmente expresados en células de LLC en respuesta a ATO

Para profundizar en el estudio de las bases moleculares de la apoptosis inducida por ATO en células de LLC, en primer lugar, analizamos el perfil global de expresión génica en respuesta a ATO, utilizando células MEC-1 como modelo. Para ello, el RNA total de células MEC-1 (5×10^6 /punto), incubadas en presencia o ausencia de $5 \mu\text{M}$ de ATO durante 24 h, se analizó mediante *microarrays* de RNA. El procesamiento de los datos resultantes proporcionó un total de 738 genes diferencialmente expresados de forma significativa en las muestras tratadas con ATO respecto de las muestras control, siendo el número de genes inducidos y reprimidos por el tratamiento muy similar (354 y 384, respectivamente) (Figura 12A). De todos ellos, se seleccionaron para posterior análisis aquellos cuya expresión se incrementó o redujo dos o más veces tras el tratamiento (Figura 12A). El grupo de 148 genes (86 inducidos y 62 reprimidos) resultante, se sometió a un segundo proceso de filtrado (eliminación de genes codificantes para proteínas no caracterizadas o para transcritos con escasa/nula evidencia a nivel de proteína, así como los pseudogenes y los genes codificantes para Y RNA), obteniéndose un total de 131 genes (79 inducidos y 52 reprimidos) (Figura 12A), cuyos valores de expresión quedan gráficamente representados en el *heat map* de la Figura 12B. En la Tabla 5 se recogen los 15 genes más inducidos y los 15 más reprimidos por el tratamiento con ATO, indicándose en cada caso el nombre completo de la proteína codificada, así como el número de veces que se alteró su expresión respecto de las muestras control (R.fold) y la significación estadística (p valor) asociada a ese cambio.

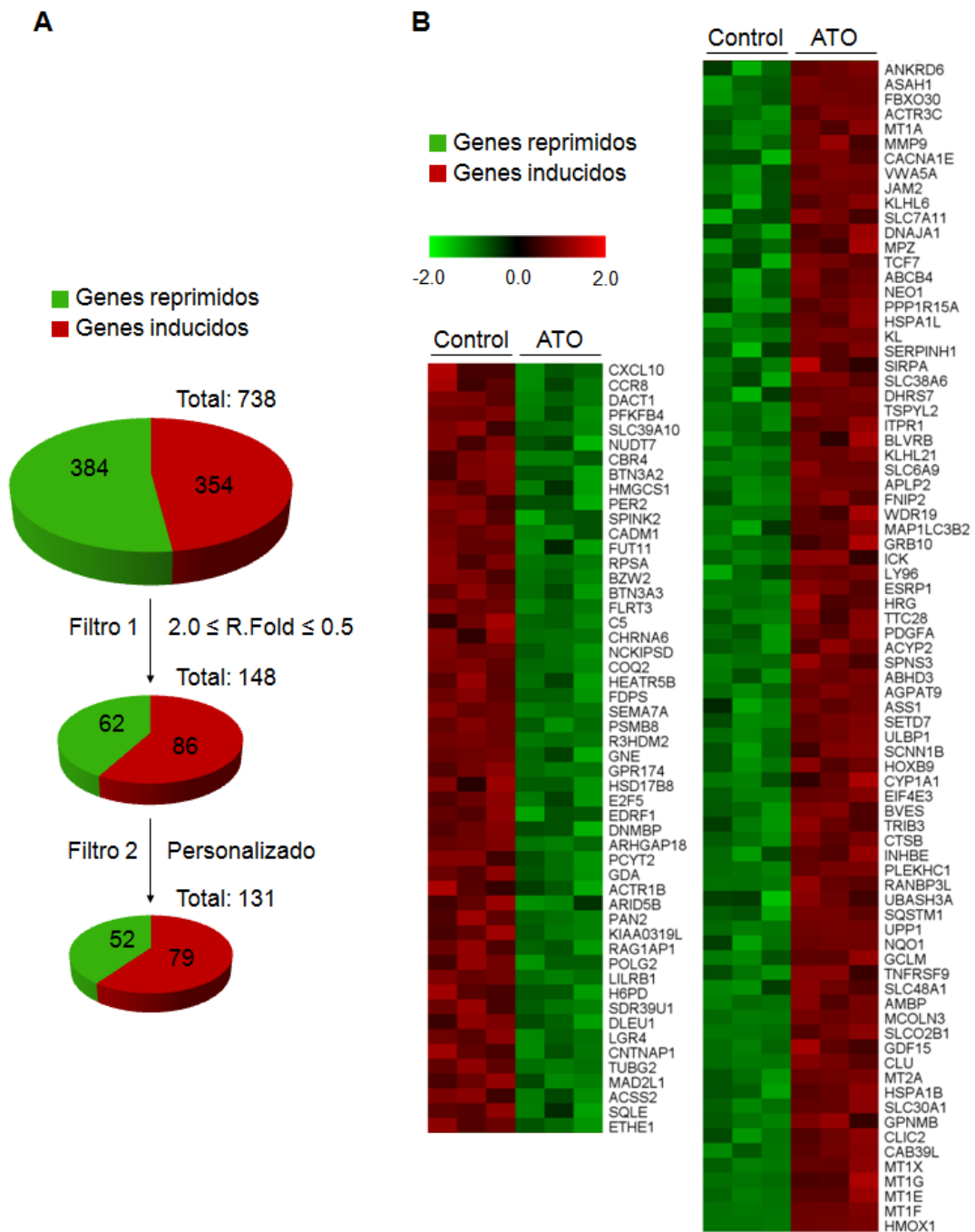


Figura 12. Genes diferencialmente expresados en respuesta a ATO en células LLC. (A) Diagramas de sectores mostrando el número inicial de genes diferencialmente expresados en las muestras tratadas con ATO vs control, según los resultados de los *microarrays*, así como el número de genes posteriormente seleccionados tras las dos etapas de filtrado (Filtro 1 y 2). (B) *Heat map* representando los valores de expresión de los 131 genes seleccionados en (A). Filas: genes; columnas: tres pares de muestras (3 control, 3 ATO) analizadas.

Tabla 7. Relación de los 15 genes más regulados en respuesta a ATO.

Gen	Proteína codificada	R.Fold	p-valor
Genes inducidos por ATO			
<i>HMOX1</i>	Hemooxigenasa 1	34.9	0.000004
<i>MT1F</i>	Metalotioneína 1 F	27.3	0.00002
<i>MT1E</i>	Metalotioneína 1 E	15.3	0.00055
<i>MT1G</i>	Metalotioneína 1 G	14.4	0.0011
<i>MT1X</i>	Metalotioneína 1 X	9.82	0.0002
<i>CAB39L</i>	Proteína similar a la proteína 39 de unión a calcio	6.71	0.00038
<i>CLIC2</i>	Canal de cloro intracelular 2	6.51	0.0017
<i>GPNMB</i>	Glicoproteína transmembrana nmb	6.38	0.0009
<i>SLC30A1</i>	Miembro 1 de la familia 30 de transportadores de solutos (transportador de zinc)	5.13	0.0007
<i>HSPA1B</i>	Proteínas de choque térmico de 70kDa 1A/1B	4.98	0.0018
<i>MT2A</i>	Metalotioneína 2A	4.82	0.00012
<i>CLU</i>	Clusterina	4.76	0.00013
<i>GDF15</i>	Factor 15 de crecimiento y diferenciación	4.54	0.0019
<i>SLCO2B1</i>	Miembro 2B1 transportador de solutos de la familia de transportadores de aniones orgánicos	4.23	0.00056
<i>MCOLN3</i>	Mucolipina 3	4.05	0.000032
Genes reprimidos por ATO			
<i>CXCL10</i>	Quimioquina 10 con el motivo C-X-C	0.147	0.0041
<i>CCR8</i>	Receptor 8 de quimioquinas con el motivo C-C	0.205	0.0038
<i>DACT1</i>	Homólogo 1, antagonista de β -catenina, de <i>Dapper</i>	0.235	0.00055
<i>PFKFB4</i>	6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa 4	0.237	0.00024
<i>SLC39A10</i>	Miembro 10 de la familia 39 de transportadores de solutos (transportador de zinc)	0.266	0.0013
<i>NUDT7</i>	Difosfatasa NUDT7 de la coenzima A peroxisomal	0.327	0.004
<i>CBR4</i>	Miembro 4 de la familia carbonilo reductasa	0.329	0.0012
<i>BTN3A2</i>	Miembro A2 de la subfamilia 3 de butirofilinas	0.329	0.0022
<i>HMGCS1</i>	2-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A sintasa 1 (soluble)	0.337	0.0034
<i>PER2</i>	Homólogo 2 de la proteína de periodo circadiano (<i>Drosophila melanogaster</i>)	0.338	0.0031
<i>SPINK2</i>	Inhibidor tipo 2 de serina peptidasas Kazal/inhibidor de acrosina-tripsina	0.344	0.00072
<i>CADM1</i>	Molécula 1 de adhesión celular	0.347	0.00061
<i>FUT11</i>	α -1,3-fucosiltransferasa 11	0.348	0.0041
<i>RPSA</i>	Proteína ribosomal SA de 40S	0.353	0.00045
<i>BZW2</i>	Proteína 2 con cremallera de leucinas y motivo W2	0.366	0.00012

4.2.2. Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados en respuesta al tratamiento con ATO

Los 131 genes finalmente seleccionados, se sometieron a analizarlos funcionalmente en términos de Ontología Génica, empleando la herramienta DAVID y realizando análisis independientes para los genes inducidos y reprimidos por el tratamiento con ATO. La Figura 13 muestra que en el grupo de los genes reprimidos los procesos biológicos significativamente enriquecidos eran metabolismo lipídico (15.1%, $p = 3.3 \times 10^{-5}$), respuesta inmune (13.2%, $p = 1.3 \times 10^{-2}$) y adhesión celular (11.3%, $p = 4.9 \times 10^{-2}$). En la categoría de componentes celulares figuraban el citosol (17%, $p = 3.9 \times 10^{-2}$) y la matriz mitocondrial (7.5%, $p = 3.0 \times 10^{-2}$), y en cuanto a función molecular, exclusivamente la actividad preniltransferasa (3.8%, $p = 4.0 \times 10^{-2}$) (Figura 13).

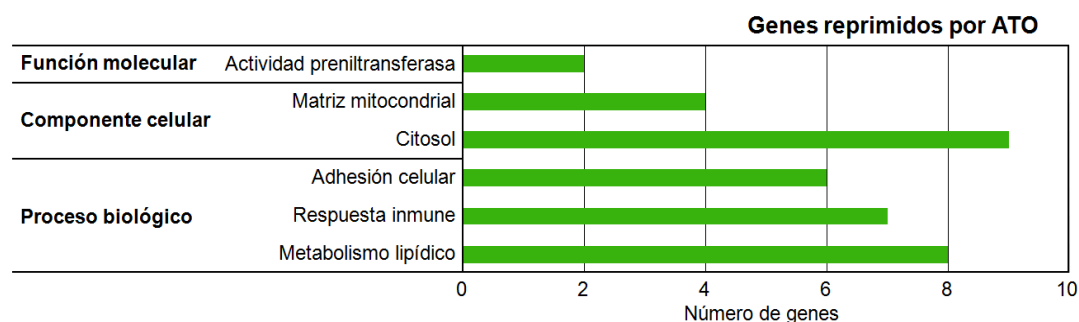


Figura 13. Análisis funcional de los genes reprimidos por el tratamiento con ATO. Los 53 genes reprimidos por ATO seleccionados se analizaron en términos de Ontología Génica (GO), usando la herramienta DAVID, las categorías GO FAT y el Genoma Humano como *background*. La gráfica muestra el número de genes asociados a los términos de GO significativamente enriquecidos dentro de cada categoría (proceso biológico, componente celular, función molecular).

En el grupo de los genes inducidos, los procesos biológicos significativamente enriquecidos eran respuesta a sustancias orgánicas (15.2%, $p = 5.9 \times 10^{-4}$), homeostasis celular (11.4%, $p = 2.7 \times 10^{-2}$), regulación de la apoptosis (11.4%, $p = 3.8 \times 10^{-2}$), respuesta a daño (10.1%, $p = 1.3 \times 10^{-2}$), respuesta a proteínas mal plegadas (6.3%, $p = 3.7 \times 10^{-4}$), respuesta a hipoxia (6.3%, $p = 3.9 \times 10^{-3}$), respuesta a estrés oxidativo (5.1%, $p = 4.4 \times 10^{-2}$), metabolismo de porfirinas (3.8%, $p = 8.5 \times 10^{-3}$), respuesta a toxinas (3.8%, $p = 3.5 \times 10^{-2}$) y catabolismo de compuestos nitrogenados (3.8%, $p = 4.1 \times 10^{-2}$). En la

categoría componentes celulares figuraban membrana plasmática (29.1%, $p = 3.4 \times 10^{-2}$), fracción celular (12.7%, $p = 2.9 \times 10^{-2}$), vesículas citoplásmicas (8.9%, $p = 4.5 \times 10^{-2}$) y lumen de vesículas (3.8%, $p = 1.5 \times 10^{-2}$). En la categoría función molecular, los términos significativamente enriquecidos eran unión de iones de cadmio (6.3%, $p = 6.9 \times 10^{-8}$) y de cobre (6.3%, $p = 2.3 \times 10^{-4}$), inhibición enzimática (6.3%, $p = 3.1 \times 10^{-2}$), inhibición de endopeptidasas de tipo serina (5.1%, $p = 7.6 \times 10^{-3}$), unión a colágeno (3.8%, $p = 1.1 \times 10^{-2}$) y transporte transmembrana de aminoácidos (2.0%, $p = 1.3 \times 10^{-2}$) (Figura 14).

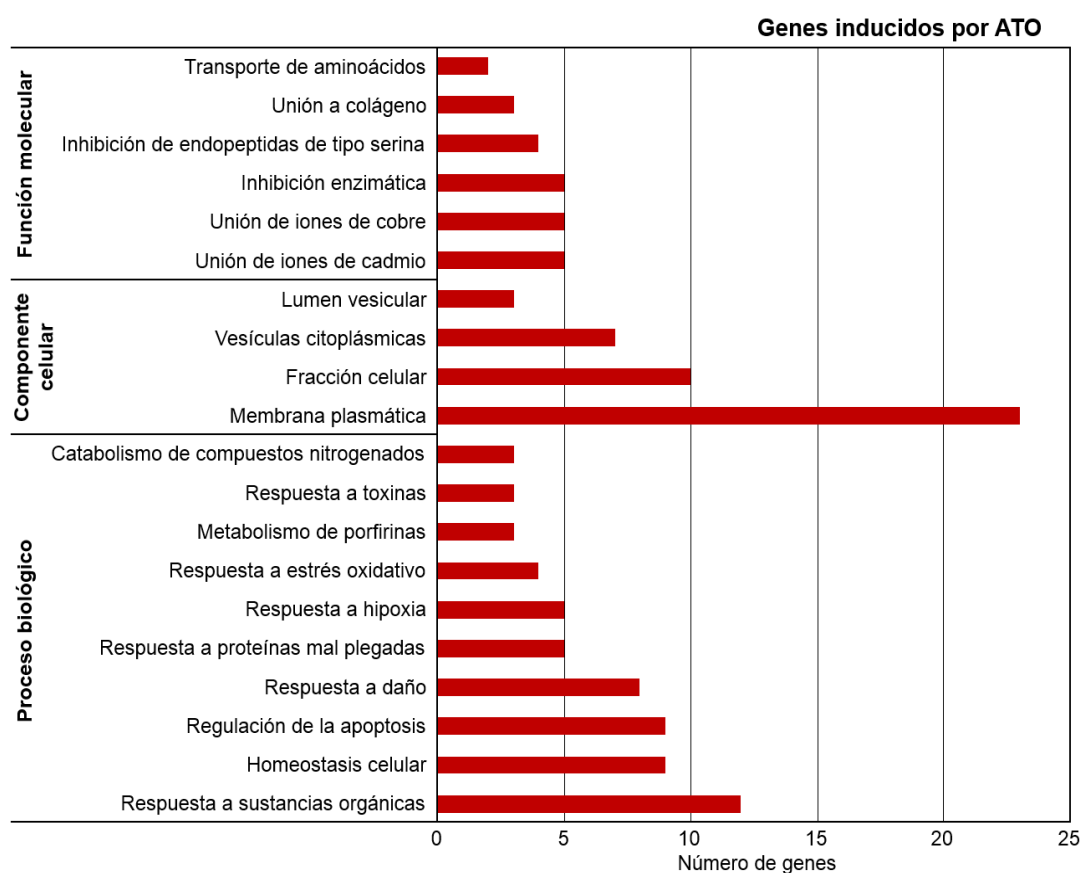


Figura 14. Análisis funcional de los genes inducidos por el tratamiento con ATO. Los 79 genes inducidos por ATO seleccionados se analizaron como se describe en la Figura 13. La gráfica muestra el número de genes asociados a los términos de GO significativamente enriquecidos dentro de cada categoría (proceso biológico, componente celular, función molecular).

Para un análisis funcional más exhaustivo, los 15 genes más inducidos y los 15 más reprimidos por el tratamiento con ATO se anotaron manualmente, en términos de GO (proceso biológico, función molecular y localización celular), empleando las bases de datos UniProt, GeneCards y NCBI Nucleotide (Tablas 8 y 9). Cabe destacar que los genes más fuertemente inducidos por ATO eran *HMOX1* y varias metalotioneínas, lo que reflejaba una respuesta celular defensiva, particularmente antioxidante y de detoxificación (Tabla 8), en concordancia con la fuerte inducción de ROS y consiguiente estrés oxidativo causado por el ATO en células LLC ²⁷⁶, y con el carácter dual de metaloide y xenobiótico del arsénico.

Tabla 8. Análisis funcional detallado de los 15 genes más inducidos por ATO.

Gen	Proceso biológico	Función molecular	Localización
<i>HMOX1</i>	Angiogénesis; homeostasis de Fe, apoptosis; respuesta celular a As y Cd, hipoxia y estrés oxidativo; migración leucocitaria; metabolismo de porfirinas, biosíntesis de quimioquinas; regulación transcripcional y de la señalización vía NF- κ B y GTPasas	Actividad hemooxigenasa; unión a enzimas, iones metálicos y grupo hemo; transducción de señales	Microsoma, ER, citosol, núcleo
<i>MT1F</i>	Respuesta celular a metales pesados, a estrés oxidativo y a xenobióticos	Unión a metales (Cd, Zn, Cu) y xenobióticos (As)	Citosol, núcleo
<i>MT1E</i>			
<i>MT1G</i>			
<i>MT1X</i>	Respuesta celular a metales, detoxificación de Cu, transducción de señales vía NO, homeostasis de Zn, respuesta a estrés oxidativo		
<i>MT2A</i>	Respuesta celular a metales, a estrés oxidativo, a xenobióticos y a IL-3; vía de señalización de IFN γ		
<i>CAB39L</i>	Parada del ciclo celular, señalización vía receptor de insulina	Unión y activación de STK11	Citosol
<i>CLIC2</i>	Oxidación-reducción, liberación de Ca, transducción de señales, transporte iónico	Canal iónico dependiente de voltaje (Cl), actividad glutatión peroxidasa	Citosol, Mb
<i>GPNMB</i>	Adhesión y proliferación celulares	Unión a glicosaminoglicanos	MbP

<i>SLC30A1</i>	Transporte iónico transMb (Zn, Cd), homeostasis de iones (Ca, Zn), detoxificación de Cd	Inhibición de canales de Ca, actividad transportadora transMb de iones (Zn, Cd).	MbP
<i>HSPA1B</i>	Respuesta celular a calor y estrés oxidativo, expresión génica, apoptosis, proliferación celular, ubiquitinación y plegado de proteínas, catabolismo de mRNA	Unión e hidrólisis de ATP; unión a HSPs, GPCRs, proteínas mal plegadas y ubiquitina ligasa	Citosol, agresoma, exosomas, núcleo, ER, mitocondria
<i>CLU</i>	Estabilización y plegado de proteínas vía chaperonas, regulación de la actividad de NF- κ B, apoptosis	Unión a chaperonas, unión a ubiquitina ligasa	Núcleo, MbM, vesículas citosólicas, EE, agresoma
<i>GDF15</i>	Señalización célula-célula, transducción de señales, señalización vía TGF β R, regulación de la cascada de MAPKs	Actividad citoquina, unión al TGF β R	EE, exosomas
<i>SLCO2B1</i>	Transporte de aniones orgánicos independiente de Na, transporte transMb	Actividad transportadora transMb de aniones orgánicos independiente de Na	MbP
<i>MCOLN3</i>	Transporte iónico transMb (Ca ²⁺)	Actividad de canal iónico	Mb

Mb, Membrana; transMb, transmembrana; MbPL, Membrana plasmática; MbM, Membrana mitocondrial; ER, retículo endoplásmico, *endoplasmic reticulum*; EE, espacio extracelular; NO, óxido nítrico; HSPs, proteínas de choque térmico, *Heat shock proteins*; GPCRs, receptores acoplados a proteínas G, *G protein-coupled receptors*; MAPKs, quinasas activadas por mitógenos, *Mitogen-activated protein kinase*; STK11/LKB1, quinasa de serina/treonina 11/quinasa de hígano B1, *serine/threonine kinase 11/Liver kinase B1*. Las indicaciones Fe, As, Cd, Zn, Cu, Ca, Na y Cl hacen referencia a los símbolos de la tabla periódica para los correspondientes elementos químicos.

Tabla 9. Análisis funcional detallado de los 15 genes más reprimidos por ATO.

Gen	Proceso biológico	Función molecular	Localización
<i>CXCL10</i>	Respuesta a LPS, señalización vía GPCR/quimioquinas y cAMP, quimiotaxis de leucocitos y monocitos, angiogénesis, proliferación celular	Actividad reguladora de PKA, actividad quimioquina, unión a CXCR3 y a glicosaminoglicanos	MbP
<i>CCR8</i>	Adhesión celular, quimiotaxis, señalización vía GPCR/quimioquinas, homeostasis celular de Ca	Actividad receptora de quimioquinas, actividad correceptora	MbP
<i>DACT1</i>	Regulación del ciclo celular, la transcripción y varias vías de señalización (WNT, JNK); importación nuclear de β -catenina; estabilidad de proteínas	Unión a β - y δ -catenina, a PKA y PKC	Citosol, núcleo

<i>PFKFB4</i>	Metabolismo de glúcidos y de moléculas pequeñas	Actividad quinasa de fructosa 6-fosfato y fosfatasa de fructosa-2,6-bifosfato	Citosol
<i>SLC39A10</i>	Transporte transMb de iones metálicos	Actividad transportadora transMb de iones metálicos (Zn ²⁺)	Mb
<i>NUDT7</i>	Catabolismo de acetil-CoA, catabolismo de CoA, diferenciación de adipocitos	Hidrólisis de acetil-CoA, unión a Mg ²⁺ y Mn ²⁺	Peroxisoma
<i>CBR4</i>	Metabolismo de Doxorubicina y Daunorubicina, biosíntesis de ácidos grasos	Actividad NAD(P)H deshidrogenasa, unión a NADPH	Matriz mitocondrial
<i>BTN3A2</i>	Secreción de IFN γ , inmunidad mediada por linfocitos T	Unión a proteínas	MbP
<i>HMGCS1</i>	Respuesta celular a lípidos (colesterol) y lipoproteínas, a fármacos y vitamina E; metabolismo de lípidos (colesterol, isoprenoides) y moléculas pequeñas	Unión a fármacos, actividad hidroximetilglutaril-CoA sintasa, actividad isomerasa, unión a ácidos orgánicos	Citosol, núcleo
<i>PER2</i>	Regulación circadiana de la expresión génica, desacetilación de histona H3, ubiquitinación, metabolismo de ácidos grasos	Actividad transductora de señales y coactivadora; unión a factores de transcripción, DNA, pre-mRNA y ubiquitina	Núcleo, citosol
<i>SPINK2</i>	Regulación de la actividad endopeptidasa	Inhibición de endopeptidasas de tipo serina	EE
<i>CADM1</i>	Adhesión célula-célula independiente de Ca ²⁺ , recepción de estímulos, secreción de citoquinas, diferenciación celular	Unión al dominio PDZ, unión a receptores	MbP
<i>FUT11</i>	Glicosilación de proteínas	Actividad α -1,3-fucosiltransferasa	AG
<i>RPSA</i>	Adhesión celular, rotura endonucleolítica, expresión génica, ensamblaje de la subunidad pequeña del ribosoma, traducción	Receptor de laminina, componente estructural del ribosoma, unión a la cola poliA de RNA	Citosol, Mb
<i>BZW2</i>	Diferenciación celular, neurogénesis	-	Mb

Mb, Membrana; transMb, transmembrana; MbP, Membrana plasmática; EE, espacio extracelular; AG, aparato de Golgi. Las indicaciones Ca, Zn, Mg y Mn hacen referencia a los símbolos de la tabla periódica para los correspondientes elementos químicos.

4.2.3. Análisis funcional de los genes inducidos por ATO y relacionados con la regulación de la apoptosis

Tabla 10. Genes inducidos por ATO e implicados en la regulación de la apoptosis.

Gen	Proteína	R.Fold	p-valor
<i>HMOX1</i>	Hemooxigenasa 1	34.9	0.000004
<i>HSPA1B</i>	Proteínas de choque térmico de 70kDa 1A/1B	4.98	0.0018
<i>CLU</i>	Clusterina	4.76	0.00013
<i>TNFRSF9</i>	Miembro 9 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral	3.65	0.0029
<i>GCLM</i>	Subunidad modificadora de la glutamato cisteína ligasa	3.60	0.0011
<i>NQO1</i>	NAD(P)H deshidrogenasa (quinona) 1	3.37	0.00083
<i>SQSTM1</i>	Sequestosoma 1/p62	3.23	0.00082
<i>CTSB</i>	Catepsina B	2.88	0.00034
<i>MMP9</i>	Metaloproteinasa de matriz-9	2.08	0.0013

Puesto que el principal efecto del ATO en las células de LLC es la inducción de apoptosis, nos centramos en los genes implicados en la regulación de este proceso (Tabla 10), cuyos niveles de expresión quedan gráficamente representados en el *heat map* de la Figura 15. Como aproximación inicial a su estudio, realizamos una anotación manual en términos de GO (proceso biológico, función molecular y localización celular), usando las bases de datos UniProt, GeneCards y NCBI Nucleotide (Tabla 11). Finalmente, se eligieron dos genes para estudiar en profundidad, ambos claramente inducidos por ATO: el gen codificante de HMOX-1, por su papel regulador del estrés oxidativo ²⁹⁸, y el codificante de MMP-9, dada su importancia en la fisiopatología de la LLC en general y, en particular, en la protección de las células LLC frente a la apoptosis espontánea ²²⁰.

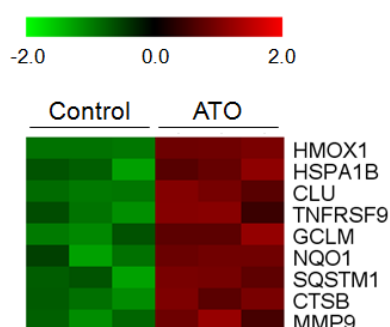


Figura 15. Genes inducidos por ATO e implicados en la regulación de la apoptosis. *Heat map* representando los valores de expresión de los 9 genes relacionados con la apoptosis e inducidos por ATO. Verde: represión génica, rojo: inducción génica.

Tabla 11. Análisis funcional detallado de los genes inducidos por ATO e implicados en la regulación de la apoptosis.

Gen	Proceso biológico	Función molecular	Localización
<i>HMOX1</i>			
<i>HSPA1B</i>		Tabla 8	
<i>CLU</i>			
<i>TNFRSF9</i>	Apoptosis, regulación de la secreción de IL-10 e IL-12	Receptor de TNFSF9/4-1BBL	Mb
<i>GCLM</i>	Apoptosis, metabolismo de compuestos nitrogenados, biosíntesis de glutatión, regulación de la actividad glutamato-cisteína ligasa y de la despolarización mitocondrial, respuesta a estrés oxidativo, metabolismo de moléculas pequeñas y xenobióticos (As)	Actividad reguladora de enzimas, actividad glutamato-cisteína ligasa	Citosol
<i>NQO1</i>	Apoptosis, respuesta a nutrientes y a sustancias tóxicas metabolismo de aminoácidos, de moléculas pequeñas y de xenobióticos, biosíntesis de NO,	Actividad citocromo b5 reductasa, actividad NAD(P)H deshidrogenasa, actividad superóxido dismutasa	Citosol
<i>SQSTM1</i>	Autofagia, apoptosis, diferenciación celular, regulación transcripcional y de la actividad I κ B/NF- κ B, organización y degradación mitocondrial, señalización vía Ras, respuesta a estrés, catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitinación, transporte endosomal, transducción de señales	Unión a PKC, RTKs, ubiquitina, quinasas, dominio SH ₂ , Zn; actividad serina/treonina quinasa	Citosol, lisosoma, núcleo, autofagosoma, ER
<i>CTSB</i>	Catabolismo de colágeno, organización de la matriz extracelular, proteólisis, apoptosis, vía de señalización por TLRs, respuesta inmune, regulación de la actividad catalítica	Unión a colágeno, actividad (endo)peptidasa de tipo cisteína, unión a proteoglicanos	EE, (endo)lisosomas, exosomas, mitocondria
<i>MMP-9</i>	Organización/desensamblaje de la matriz extracelular, catabolismo de colágeno, diferenciación de macrófagos, apoptosis, proteólisis, señalización vía receptores de efrinas, migración de leucocitos	Unión a colágeno, a proteínas y a Zn ²⁺ ; actividad metalo(endo)peptidasa	EE, exosomas

Mb, Membrana; ER, retículo endoplásmico, *endoplasmic reticulum*; EE, espacio extracelular; TNFSF, superfamilia del factor de necrosis tumoral, *TNF superfamily*; RTKs, receptores con actividad tirosina quinasa; TLRs: receptores tipo *Toll*, *Toll-like receptors*. Las indicaciones As y Zn hacen referencia a los símbolos de la tabla periódica para los correspondientes elementos químicos.

4.3. Papel de la hemoxygenasa-1 en la apoptosis inducida por ATO

4.3.1. La expresión de hemoxygenasa-1 se induce fuertemente en células de LLC tras el tratamiento con ATO

Para validar los resultados proporcionados por los *microarrays*, se incubaron células LLC primarias o células MEC-1 con las indicadas concentraciones de ATO durante 24 h y se analizó por qPCR la expresión de mRNA de *HMOX-1*. En respuesta a ATO, los niveles de mRNA de *HMOX-1* incrementaban significativamente de forma dosis dependiente, tanto en las células MEC-1 (Figura 16A) como en las células primarias (Figura 16B), confirmando los resultados de los *microarrays*. La expresión de mRNA de *HMOX-1* era muy baja en los controles, en concordancia con su carácter inducible.

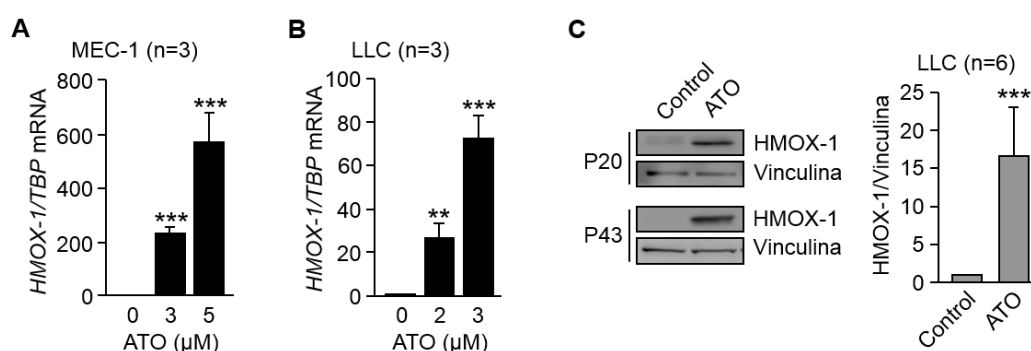


Figura 16. Expresión de HMOX-1 en células LLC en respuesta a ATO. (A, B) Se analizó mediante qPCR la expresión de mRNA de *HMOX-1* en células MEC-1 (A) o células LLC (B), tratadas o no con las indicadas concentraciones de ATO durante 24 h. Control interno: expresión de mRNA de *TBP*. Se muestran valores medios tras normalizar la expresión de mRNA de *HMOX-1* en ausencia de ATO a 1. (C) Se analizó la expresión proteica de *HMOX-1* mediante *Western blotting* en células LLC tratadas o no con 2 μM ATO durante 24 h. Control interno: Vinculina. Se muestran los resultados de dos pacientes representativos y los valores medios normalizados (control = 1) de los seis pacientes analizados. **P ≤ 0.01; ***P ≤ 0.001. Los símbolos * indican comparaciones con los valores control/-ATO.

Para determinar si esta modulación transcripcional se correlacionaba con un incremento en la expresión a nivel de proteína, analizamos mediante *Western blotting* los niveles de *HMOX-1* en seis pacientes de LLC tratados o no con 2 μM ATO durante 24 h. La Figura 16C muestra que la expresión de la proteína *HMOX-1* incrementaba significativamente (16.6 veces de media) en respuesta a ATO, mientras que sus niveles eran muy bajos en las muestras control.

4.3.2. HMOX-1 favorece el efecto citotóxico del ATO

Para determinar el papel funcional de HMOX-1 en la respuesta a ATO, se incubaron células LLC con un inhibidor (SnPP) o un activador (CoPP) de la actividad de HMOX-1, un control inactivo (CoPP) o vehículo durante 1 h y, posteriormente, se trataron o no con ATO. A las 24 h, se determinó la viabilidad celular mediante citometría de flujo. En estos experimentos, se redujo la concentración de ATO a 1 y 2 μM para asegurar una tasa de apoptosis que permitiera la observación del efecto de los moduladores de HMOX-1. En presencia de SnPP, la viabilidad era significativamente superior en las células tratadas con 1 μM de ATO respecto de las células control (- ATO), perdiéndose el efecto a 2 μM ATO, probablemente debido a que la elevada tasa de apoptosis (71% células Anexina V+, no mostrado) impedía observar diferencias. Por su parte, el tratamiento con CoPP aumentaba significativamente el efecto citotóxico del ATO a las dos concentraciones ensayadas, mientras que CuPP no tenía efecto (Figura 17). A pesar de la baja expresión de HMOX-1 en ausencia de ATO (Figura 16), la acción de los moduladores en estas condiciones era similar a la descrita arriba (Figura 17). En conjunto, estos resultados sugieren que HMOX-1 favorece la apoptosis espontánea e inducida por ATO en células LLC. Estos estudios se están ampliando actualmente en el laboratorio.

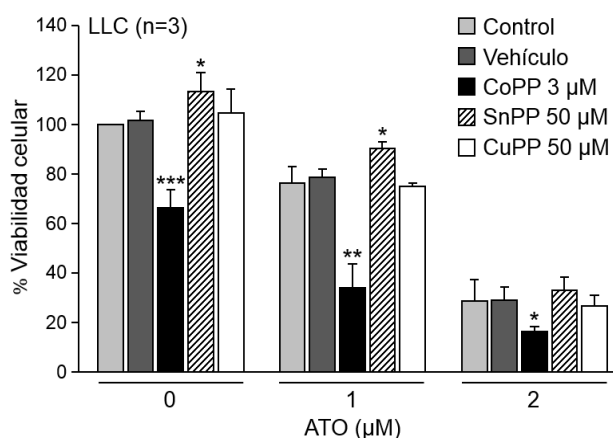


Figura 17. Modulación de la actividad HMOX-1 en células LLC y respuesta a ATO. Células LLC, preincubadas 1 h con 3 μM CoPP, 50 μM SnPP, 50 μM CuPP o vehículo, se trataron o no con 1 o 2 μM ATO durante 24 h. La viabilidad celular se determinó por citometría de flujo con Anexina V-FITC/PI. Se muestran % de viabilidad medios normalizados (controles = 100). * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$. Los símbolos * indican comparaciones con los correspondientes controles.

4.4. Papel de MMP-9 en la respuesta de células LLC a agentes citotóxicos

4.4.1. ATO induce la expresión de MMP-9 a nivel transcripcional en células de LLC a través de la activación de AP-1 (c-Fos/c-Jun)

Para estudiar si el incremento en la expresión de mRNA de *MMP-9* observado en los análisis mediante *microarrays* correlacionaba con un papel de la proteína en la respuesta a ATO, se incubaron células LLC ($5 \times 10^6/\text{ml}$) en presencia o ausencia de $3 \mu\text{M}$ ATO. Después de 24 h, se analizó por RT-PCR la expresión de mRNA de *MMP-9*, observándose un incremento significativo tras 8 y 24 h de exposición a ATO, en comparación con las células control (Figura 18 A). Debido a la producción endógena de *MMP-9* por las células LLC, los niveles de mRNA en los controles a 8 y 24 h eran ligeramente superiores a los basales (0 h). Para confirmar estos resultados, las mismas muestras se analizaron por qPCR, observándose, análogamente, un incremento significativo en la expresión de mRNA de *MMP-9* de 2.4 y 9.3 veces, tras 8 y 24 h de tratamiento, respectivamente (Figura 18B). El porcentaje medio de células apoptóticas tempranas (Anexina V+/PI-) en presencia de ATO era 23.6% (8 h) y 37.6% (24 h), en comparación con el 15% (tanto a 8 como 24 h) en los controles (no mostrado).

Para determinar si el incremento del mRNA de *MMP-9* en respuesta a ATO era consecuencia de una estabilización más que de una inducción de la transcripción, células LLC, tratadas con $3 \mu\text{M}$ ATO durante 20 h, se incubaron con o sin Actinomicina D (bloqueante de la transcripción). El análisis de estas muestras por RT-PCR a diferentes tiempos mostró que los niveles relativos de mRNA de *MMP-9* (*MMP-9/GAPDH*) disminuyeron progresivamente en el tiempo tras la adición de la Actinomicina D, mientras que los niveles de mRNA de *GAPDH* se mantuvieron constantes. Estos resultados confirmaban que ATO estaba induciendo activamente la transcripción *MMP-9* en las células LLC.

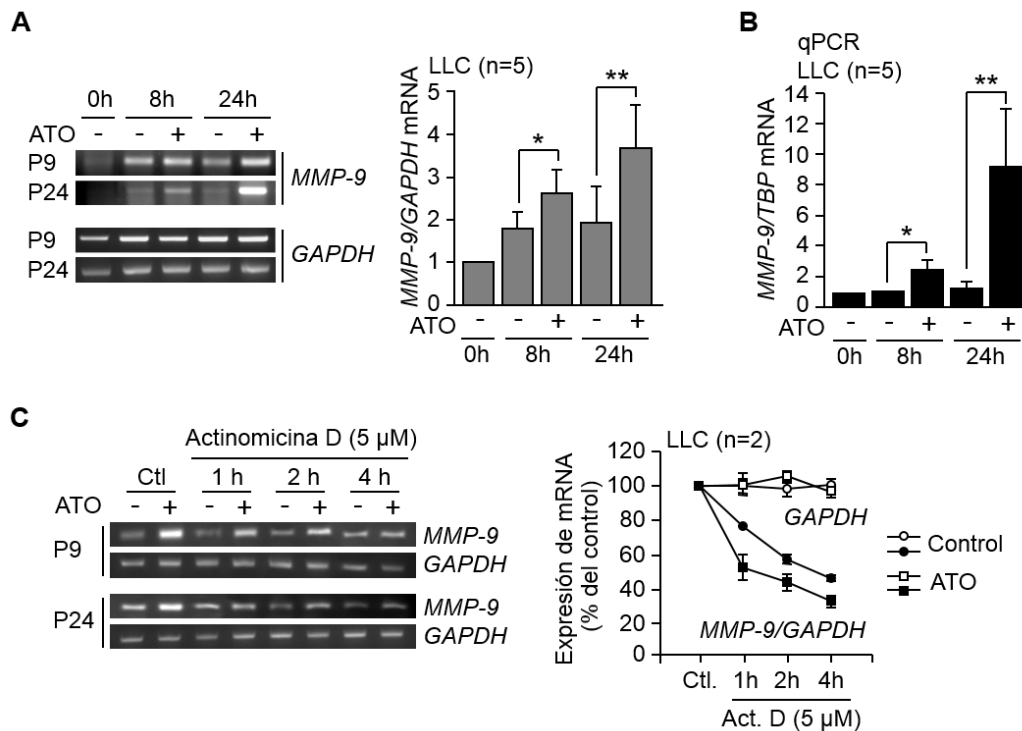


Figura 18. ATO induce transcripcionalmente la expresión de MMP-9 en células LLC. (A, B) Se determinó la expresión de mRNA de *MMP-9* mediante RT-PCR (A) y qPCR (B) en células LLC tratadas o no con 3 μM ATO durante los tiempos indicados. Como controles internos se usaron los niveles de mRNA de *GAPDH* (RT-PCR) y *TBP* (qPCR). Se muestran los resultados de la PCR para dos pacientes representativos (A) y los valores de expresión medios de los cinco pacientes analizados, tras normalizar la expresión de *MMP-9* en ausencia de ATO a 0 h a 1 (A, B). (C) Células LLC, incubadas o no con 3 μM ATO durante 20 h, se trataron con o sin 5 μM Actinomicina D y la expresión de mRNA de *MMP-9* y *GAPDH* (control interno) se determinó mediante RT-PCR a los tiempos indicados. Se muestran los resultados de la PCR y los valores medios de expresión de mRNA de *MMP-9* (*MMP-9/GAPDH*) y *GAPDH* de las dos muestras analizadas tras normalizar los valores control a 100. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

Varios factores de transcripción poseen sitios de unión en el promotor del gen *MMP-9*, incluyendo NF-κB y AP-1²⁹³. Puesto que, previamente, en nuestro laboratorio se había demostrado que el ATO regula negativamente NF-κB y activa JNK en células LLC²⁷⁶, y que c-Fos está implicado en la expresión de *MMP-9* en células LLC en respuesta a CCL21/CCR7²²⁶, estudiamos si el ATO estaba regulando c-Fos y c-Jun, efectores de JNK y componentes del factor de transcripción heterodimérico AP-1²⁹⁹. El análisis mediante RT-PCR reveló que los niveles de mRNA de *c-Fos* y *c-Jun* incrementaban significativamente en respuesta a 3 μM ATO, alcanzando valores máximos tras 2 h de

tratamiento. A tiempos mayores de exposición, estos niveles disminuían aunque permanecían más elevados que los controles, incluso a 24 h en el caso de *c-Jun* (Figura 19).

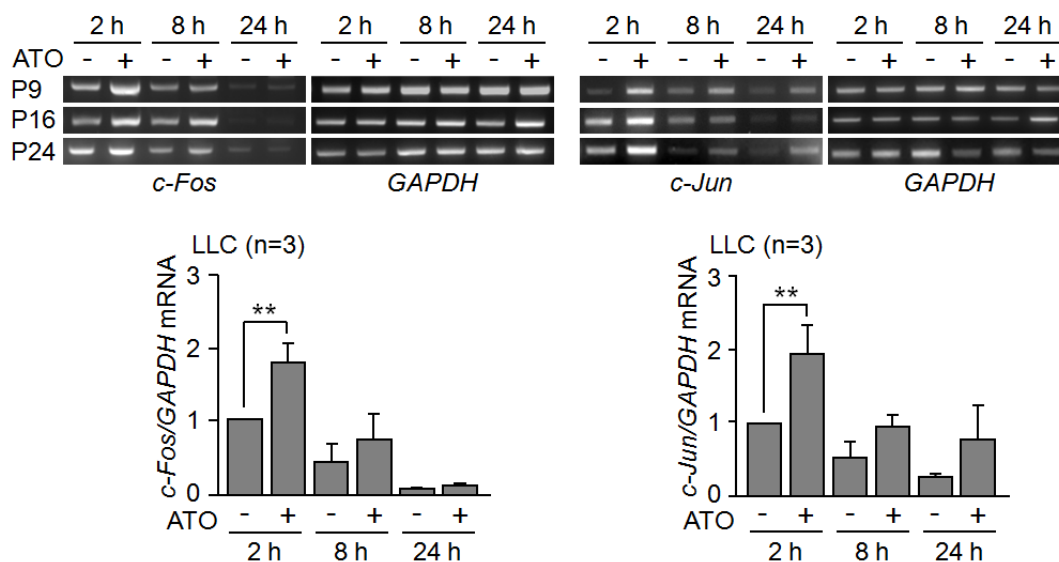


Figura 19. ATO induce transcripcionalmente la expresión de *c-Fos* y *c-Jun* en células LLC. Se determinó la expresión de mRNA de *c-Fos* y *c-Jun* por RT-PCR en células LLC tratadas o no con 3 μ M ATO durante los indicados tiempos. Los niveles de expresión de *GAPDH* se usaron como control interno. Se muestran los resultados de la PCR para las tres muestras representativas y los valores medios normalizados (control 2h = 1) resultantes de su cuantificación. **P \leq 0.01.

Para determinar si esta modulación del mRNA de *c-Fos* y *c-Jun* se correlacionaba con un incremento en la expresión a nivel de proteína, se analizó mediante *Western blotting* la expresión de *c-Fos* y *c-Jun* en células LLC procedentes de los mismos pacientes y tratadas con 3 μ M ATO durante 24 h. La Figura 20 muestra que el incremento en los niveles de expresión de *c-Fos* en las células tratadas con ATO respecto de las no tratadas, era visible a las 2 h, alcanzando su máximo a las 8 h, y permaneciendo más elevado que el control incluso después de 24 h (Figura 20). Por su parte, la fosforilación de *c-Jun* era superior en las muestras tratadas que en las control tras 8 h y 24 h de exposición a ATO (Figura 20). Puesto que los tiempos a los que se inducía la expresión de *c-Fos* y la fosforilación de *c-Jun* correlacionaban con la inducción transcripcional de MMP-

9, nuestros resultados sugerían fuertemente que ATO regula MMP-9 a través de la activación del factor de transcripción AP-1.

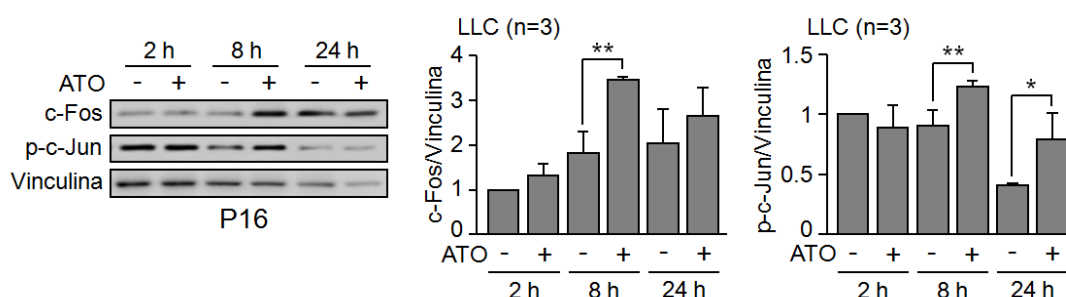


Figura 20. ATO induce la expresión a nivel de proteína de c-Fos y la fosforilación de c-Jun. Células LLC se trataron o no con 3 μ M ATO. A los tiempos indicados, se determinó la expresión de c-Fos y p-c-Jun mediante *Western blotting*; Vinculina: control interno. Se muestran los resultados del *Western blot* para una muestra representativa y los valores medios normalizados (controles a 2 h =1) de las tres muestras estudiadas. *P \leq 0.05; **P \leq 0.01.

4.4.2. La MMP-9 inducida por ATO se localiza principalmente en la membrana celular a través de la interacción con el complejo receptor integrina $\alpha 4\beta 1$ /CD44

Para determinar si el ATO también regulaba MMP-9 a nivel de proteína, y dado que la MMP-9 es una proteína mayoritariamente secretada, se analizó mediante zimografía el medio condicionado de células LLC (5×10^6) incubadas en presencia o ausencia de 3 μ M ATO durante 24 h. La Figura 21A muestra que, al contrario de lo que cabría esperar, los niveles de MMP-9 secretada eran significativamente menores (2.6 veces de media) en las células tratadas con ATO que en las no tratadas. Dado que las células LLC también expresan MMP-9 en superficie²³⁴, estudiamos si esta fracción de MMP-9 incrementaba en respuesta a ATO. Para ello, células LLC, tratadas o no con 3 μ M ATO durante 24 h, se incubaron con un Ac anti-MMP-9 o un Ac control, y la expresión de MMP-9 se determinó por citometría de flujo. La población de células PI+ (apoptóticas tardías y necróticas) se excluyó de estos análisis para evitar falsos positivos debidos a la unión inespecífica de los Acs a células con la membrana dañada. En la Figura 21B se observa que la expresión de MMP-9 en la superficie celular incrementaba significativamente en las células tratadas con ATO en comparación con las células control.

Experimentos de fraccionamiento membrana-citosol confirmaron una mayor presencia de MMP-9 en la fracción de membrana que en la fracción citosólica de células tratadas con ATO (Figura 21C). El análisis paralelo del medio condicionado de las mismas muestras confirmó que la MMP-9 secretada era menor (1.4 veces) en las células tratadas con ATO que en las células control (Figura 21C).

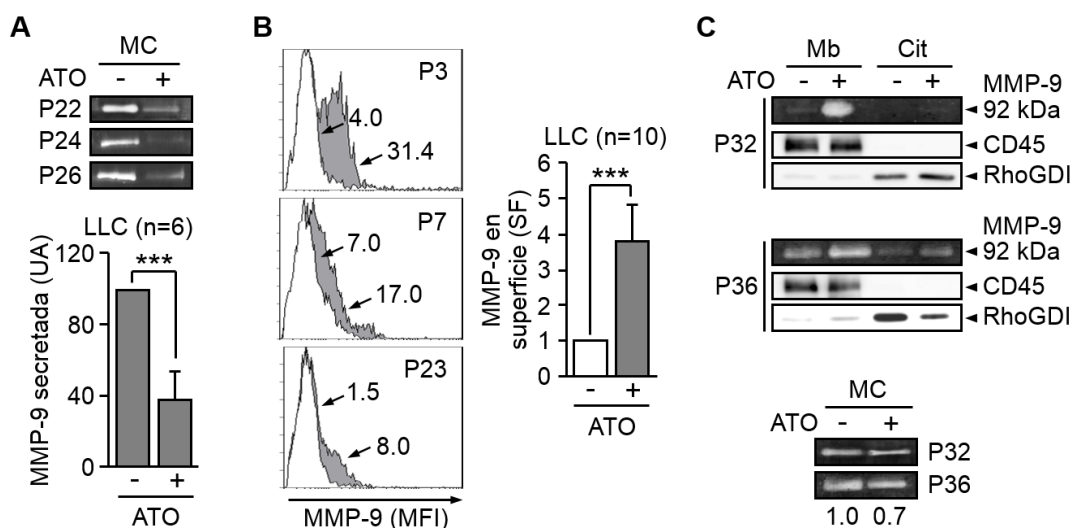


Figura 21. La MMP-9 inducida por ATO se localiza en la superficie celular. (A) Análisis por zimografía del medio condicionado (MC) de células LLC tratadas o no con 3 μ M ATO, 24 h. Se muestran los resultados de tres muestras representativas y la media de la cuantificación de las seis muestras analizadas (UA, unidades arbitrarias). (B) Se determinó por citometría de flujo la expresión de MMP-9 en la superficie de células LLC tratadas o no con 3 μ M ATO, 24 h. Se muestran los histogramas de tres casos representativos y los valores de fluorescencia específica (SF) medios normalizados (control = 1) de las diez muestras analizadas; áreas blancas: - ATO, áreas grises: + ATO, flechas: SF, MFI: Intensidad de fluorescencia media. (C) Análisis por zimografía de las fracciones citosólica (Cit) y de membrana (Mb), y del medio condicionado de células LLC de dos pacientes diferentes, tratadas o no con 3 μ M ATO, 24 h. Control interno: expresión de RhoGDI (proteína citosólica) y CD45 (proteína de Mb) en las fracciones. Se muestran los resultados de las zimografías y los *Western blots*, y las cuantificaciones para el MC. **P \leq 0.01; ***P \leq 0.001.

A continuación, determinamos si la asociación de MMP-9 a la membrana de las células LLC tenía lugar a través de sus receptores específicos, la integrina $\alpha_4\beta_1$ y CD44²²⁰. La Figura 22 muestra que la preincubación con los Acs bloqueantes de estas moléculas antes de la adición de ATO, reducía significativamente los niveles de MMP-9 en la superficie celular, mientras que el Ac control no tenía efecto. Esta disminución, sin embargo, no iba acompañada de un aumento significativo de MMP-9 en el medio

condicionado de estas células (analizado por zimografía, no mostrado), quizá debido a que las diferencias de expresión quedaban por debajo del umbral de detección de la técnica.

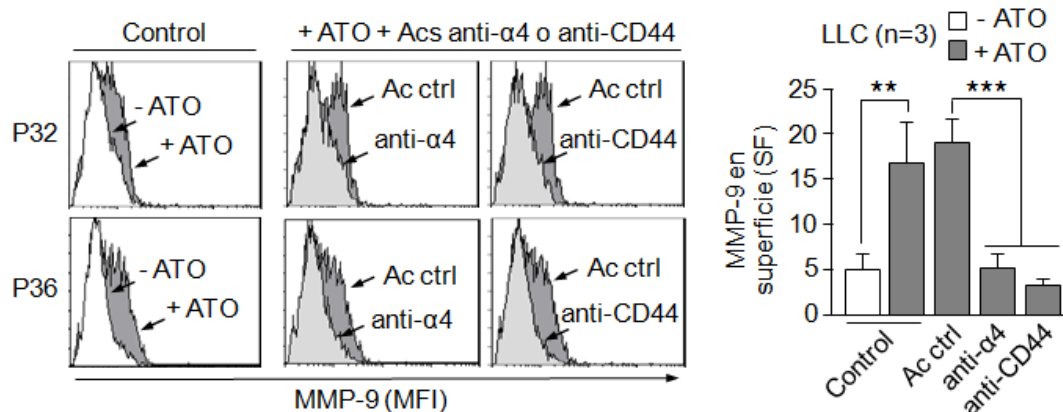


Figura 22. La integrina $\alpha_4\beta_1$ y CD44 actúan como receptores para la MMP-9 inducida por ATO. Células LLC, preincubadas 1 h con o sin los Acs indicados, se trataron o no con 3 μ M ATO durante 24 h y la expresión de MMP-9 en superficie se determinó por citometría de flujo. Se muestran los histogramas de dos casos representativos y los valores medios de fluorescencia específica (SF) de los tres casos analizados; áreas blancas: -ATO; áreas grises (claras y oscuras): +ATO. MFI: Intensidad de fluorescencia media. ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

4.4.3. La MMP-9 inducida en respuesta a ATO está asociada al proceso apoptótico

Para determinar si el incremento en la expresión y localización en membrana de MMP-9 estaba asociado a la apoptosis inducida por ATO en las células LLC, analizamos la expresión de MMP-9 simultáneamente en la población de células viables (Anexina V-/PI-) y en la de células apoptóticas (Anexina V+/PI-), excluyendo las células PI-positivas (apoptóticas tardías y necróticas) para prevenir falsos positivos. Además, la concentración de ATO en estos experimentos se redujo a 2 μ M para evitar una disminución excesiva en la viabilidad celular, y conseguir, por tanto, una distribución más equitativa de las células entre las poblaciones viable y apoptótica temprana, facilitando así tanto las determinaciones como las comparaciones. La Figura 23 muestra, para dos casos representativos, que el incremento de MMP-9 en membrana en respuesta a ATO (35.3% y 37.5% células positivas vs 7.5% y 10.1%, respectivamente, en los controles) coincidía claramente con la población de células apoptóticas tempranas (Anexina V+).

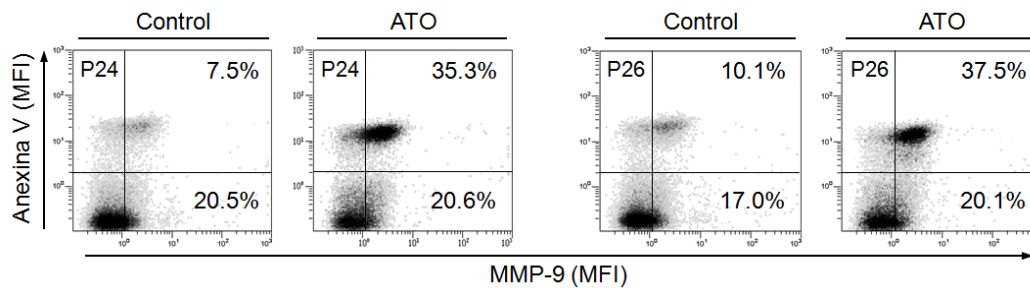


Figura 23. La MMP-9 se localiza en la membrana de las células apoptóticas tempranas en respuesta a ATO. Se determinó la expresión en superficie de MMP-9 en células LLC tratadas o no con 2 μ M ATO, 24 h, analizando por separado las células viables (Anexina V-/PI-) y las apoptóticas tempranas (Anexina V+/PI-). Se muestran los diagramas biparamétricos Anexina V vs MMP-9 de las dos muestras estudiadas. Los números indican el % de células MMP-9+ en los compartimentos de apoptosis temprana (superiores) y viabilidad (inferiores). MFI: Intensidad de fluorescencia media.

Para confirmar estos resultados, se incubaron células LLC con el inhibidor de caspasas Z-VAD-fmk antes de la adición de 2 μ M ATO. Este tratamiento prevenía la inducción de apoptosis y la localización de MMP-9 en superficie en respuesta a ATO (Figura 24A), así como la inducción transcripcional de la proteína, determinada en las mismas muestras por qPCR (Figura 24B). Estos resultados indicaban que la inducción de MMP-9 y su localización en membrana están ligadas a la apoptosis inducida por ATO.

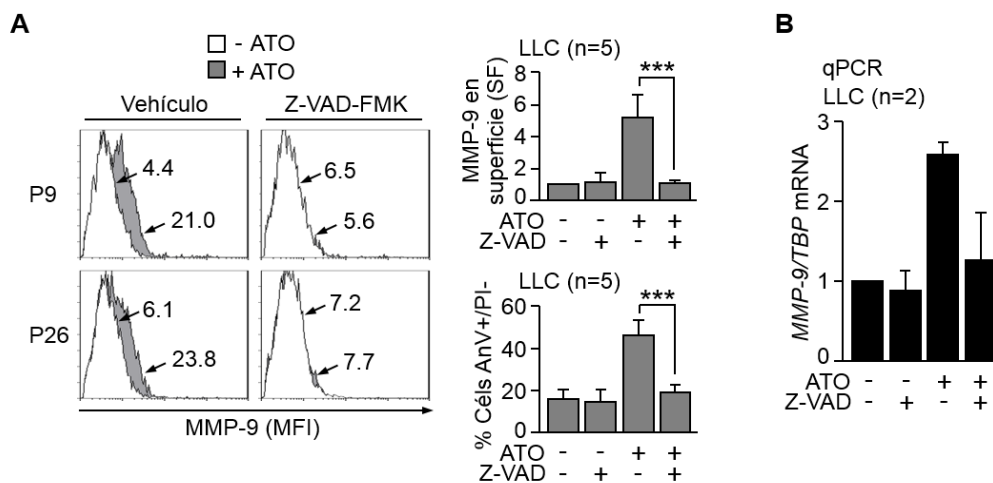


Figura 24. La inducción de MMP-9 y su localización en membrana está ligada a la apoptosis inducida por ATO. (A) Células LLC, preincubadas con 50 μ M Z-VAD-fmk o vehículo, se trataron o no con 2 μ M ATO. A las 24 h, se determinó la expresión en superficie de MMP-9 en las células PI negativas. Se muestran los histogramas de dos muestras representativas; flechas: fluorescencia específica (SF); MFI: Intensidad de fluorescencia media. También se muestran los valores de SF medios normalizados (controles =1) y el % medio de células apoptóticas tempranas de las cinco muestras analizadas. (B) Se determinó por qPCR la expresión de mRNA de MMP-9 en células LLC tratadas como en (A), usando TBP como control interno. Se muestran los valores medios normalizados (controles = 1). ***P \leq 0.001.

A continuación, analizamos si la inducción y localización en membrana de MMP-9 era anterior o una consecuencia del proceso apoptótico. Para ello, la concentración de ATO se redujo a 1 μ M, dosis a la que la inducción de apoptosis es mínima (Figura 11). Los análisis mediante RT-PCR y qPCR de dos muestras diferentes mostraban un claro incremento en la expresión de mRNA de *MMP-9* tras el tratamiento con ATO (Figuras 25A y 25B). Además, la expresión de MMP-9 en membrana en estas muestras aumentaba (de un 8.8% a un 20.4%) en respuesta a 1 μ M ATO (Figura 24C). Determinaciones paralelas mostraron que el tratamiento con 1 μ M ATO no afectaba a la viabilidad celular (P9, 75% vs 79%; P16, 54% vs 55%, en células control vs tratadas, respectivamente; datos no mostrados). Considerados conjuntamente, estos resultados sugieren que la inducción de la expresión de MMP-9 y su localización en membrana es una respuesta temprana de las células LLC frente a estímulos apoptóticos como el ATO. Esta respuesta es anterior al establecimiento del proceso apoptótico pero está estrechamente ligada al mismo, como se deduce de la aumentada expresión de MMP-9 en las células apoptóticas.

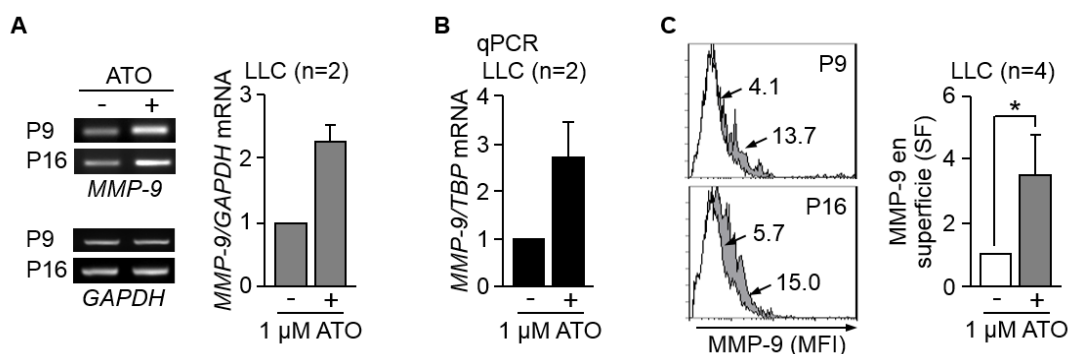


Figura 25. La inducción de MMP-9 y su localización en membrana es una respuesta inicial de las células LLC a la acción citotóxica del ATO. (A, B) Células LLC se incubaron con o sin 1 μ M ATO durante 24 h, y la expresión de mRNA de *MMP-9* se analizó por RT-PCR (A) y qPCR (B), usando *GAPDH* y *TBP* como controles internos, respectivamente. Se muestran los resultados de la PCR (A) y los valores medios normalizados (controles = 1) (A, B). (C) Se analizó la expresión en membrana de MMP-9 mediante citometría de flujo en células LLC tratadas como en (A, B). Se muestran los histogramas de las mismas muestras que en (A, B); áreas blancas: -ATO, áreas grises: +ATO; flechas: fluorescencia específica (SF); MFI: Intensidad de fluorescencia media. Se muestran también los valores de SF medios normalizados (controles = 1) de las cuatro muestras estudiadas. * $P \leq 0.05$.

4.4.4. El tratamiento con Fludarabina también induce la transcripción y localización en membrana de la MMP-9

Para determinar si la modulación de MMP-9 era una respuesta específica a ATO o una respuesta más general frente a la apoptosis inducida por compuestos citotóxicos, estudiamos el efecto de la Fludarabina sobre la expresión de MMP-9. Para ello, se analizó por RT-PCR la expresión de mRNA de *MMP-9* en células LLC incubadas en presencia o ausencia de 3 o 5 μM Fludarabina durante 48 h. La Figura 26A muestra que el tratamiento con Fludarabina aumentaba los niveles de mRNA de *MMP-9* de forma dosis dependiente, en comparación con las células control. Estos resultados se confirmaron por qPCR de las mismas muestras, observándose un incremento en los niveles de mRNA de MMP-9 de 4.9 y 17.5 veces, en respuesta a 3 y 5 μM Fludarabina, respectivamente (Figura 26B). El porcentaje medio de células apoptóticas tempranas en estas muestras era 45.2% y 48%, para 3 y 5 μM Fludarabina, respectivamente (no mostrado). Además, y como se observaba en el caso de ATO, la expresión de MMP-9 en superficie aumentaba significativamente (de un 15.5% a un 26.6%) tras el tratamiento con 3 μM Fludarabina (Figura 26C). En conjunto, estos resultados indican que la regulación positiva de MMP-9 en correlación con la apoptosis de células LLC no es específica del ATO, sino una respuesta más general.

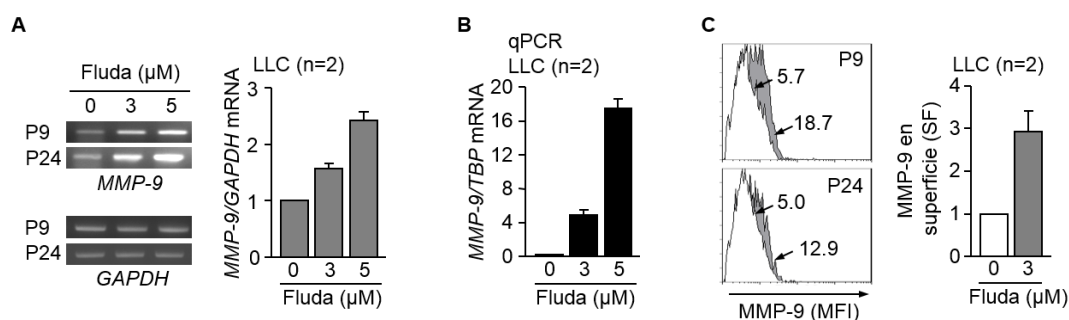


Figura 26. La Fludarabina induce la expresión y localización en membrana de MMP-9 en células LLC. (A, B) Células LLC se trataron con 3 y 5 μM Fludarabina (Fluda) o vehículo durante 24 h y la expresión de mRNA de *MMP-9* se determinó por RT-PCR (A) y qPCR (B); *GAPDH* y *TBP*: controles internos. Se muestran los resultados de la PCR y los valores medios normalizados (controles = 1) resultantes de la cuantificación. (C) Células LLC de los mismos pacientes que en (A, B) se incubaron con 3 μM Fluda o vehículo durante 48 h y la expresión de MMP-9 en superficie se determinó por citometría de flujo. Se muestran los histogramas y los valores de fluorescencia específica (SF) medios normalizados (controles = 1); áreas blancas: -Fluda, áreas grises: +Fluda; flechas: valores de SF; MFI: Intensidad de fluorescencia media.

4.4.5. La MMP-9, aislada o presente en el estroma, induce resistencia de células LLC a ATO y Fludarabina

Habiendo establecido la modulación y localización de MMP-9 en respuesta a ATO y Fludarabina, nos propusimos determinar si la MMP-9 desempeñaba algún papel en la respuesta celular a estos fármacos. Este estudio era particularmente relevante dado el papel dual que juegan las MMPs en la apoptosis^{228,300}. Para llevarlo a cabo, células LLC se cultivaron sobre BSA o MMP-9 (150 nM) durante 1 h previa adición de ATO o Fludarabina. Las concentraciones de ATO y Fludarabina en estos experimentos se redujeron para evitar una reducción excesiva de la viabilidad celular y permitir comparaciones. En la Figura 27 se observa que, en ausencia de fármaco, las células cultivadas sobre MMP-9 mostraban una viabilidad significativamente superior que las células cultivadas sobre BSA, en concordancia con resultados previos del laboratorio que demostraron que la MMP-9 protege a las células LLC frente a la apoptosis espontánea²²⁰. En presencia de ATO o Fludarabina, las células cultivadas sobre MMP-9 también mostraron una viabilidad significativamente superior que las células cultivadas sobre BSA (Figura 27), indicando que la adhesión a MMP-9 protege parcialmente a las células LLC del efecto citotóxico del ATO y la Fludarabina.

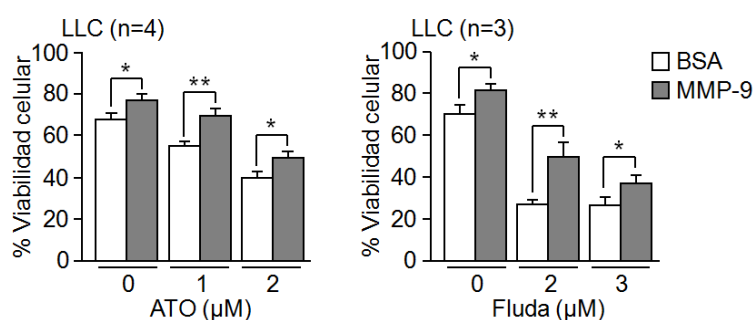


Figura 27. La MMP-9 exógena induce resistencia a ATO y Fludarabina en células LLC. Células LLC, cultivadas sobre 0.5% BSA o 150 nM MMP-9, se trataron con las indicadas concentraciones de ATO o Fludarabina (Fluda) durante 24 h (ATO) o 48 h (Fluda). Se determinó la viabilidad celular mediante citometría de flujo, usando Anexina V-FITC/PI. *P ≤ 0.05; **P ≤ 0.01.

La MMP-9 es un componente abundante de los microambientes tisulares en los que se desarrolla la LLC. Las células estromales son componentes claves de esos

microambientes y contribuyen a la resistencia de las células LLC a una amplia variedad de tratamientos^{301,302}. En base a estos datos, estudiamos si el cocultivo con células estromales afectaba a la respuesta de células LLC a ATO y si esto implicaba a la MMP-9 de algún modo. Para ello, se preincubaron células LLC con un Ac bloqueante de la MMP-9 o un Ac control antes de ser cultivadas en suspensión o sobre células estromales HS-5, en presencia o ausencia de 2 μ M ATO. A las 48 h, se determinó la viabilidad celular mediante citometría de flujo. La viabilidad de las células LLC cultivadas sobre estroma en ausencia de ATO (69.2% de media) se consideró 100. En ausencia de ATO, el Ac anti-MMP-9 redujo significativamente (1.5 veces) la viabilidad de las células LLC cultivadas sobre células HS-5 en comparación con las células sin tratar, mientras que el Ac control no tuvo efecto (Figura 28A). Asimismo, el tratamiento con ATO redujo en un 74.4% la viabilidad de las células cultivadas en suspensión y sólo un 32.8% en las células cultivadas sobre estroma (Figura 28A), indicando que las células estromales ejercían un efecto protector frente al ATO. El Ac anti-MMP-9 revertía esta protección, reduciendo la viabilidad celular en presencia de ATO a 15.5% (equiparable al efecto del ATO en células en suspensión, 18.6% células viables), mientras que el Ac control no tenía efecto (Figura 28A).

Para confirmar y validar estos resultados, se llevaron a cabo los mismos experimentos en cocultivos de células LLC y células estromales primarias (BMSC), establecidas a partir de médula ósea de un paciente con LLC. Las BMSC protegían a las células LLC de la apoptosis espontánea, y esta protección era revertida por el Ac anti-MMP-9, pero no por el Ac control. El cocultivo con BMSC también inducía resistencia a ATO en las células LLC (67.1% viabilidad celular *versus* 14.5% en células en suspensión) y el tratamiento con el Ac anti-MMP-9 revertía claramente esta protección, reduciendo la viabilidad celular a un 18.8% (similar al efecto del ATO en las células en suspensión, 16.2% células viables) (Figura 28B). Para confirmar la especificidad de estos resultados, analizamos la expresión de MMP-9 en las células estromales HS-5 y primarias mediante *Western blotting*. En los lisados de estroma primario se detectaron 4 bandas mayoritarias de los siguientes pesos moleculares: 150 kDa, probablemente correspondiente a

complejos MMP-9/lipocalina³⁰³; 92 kDa, zimógeno proMMP-9; y 50 y 40 kDa, que podrían corresponder a productos de degradación (Figura 28 C). En el caso de las células HS-5, además de bandas mencionadas, aparecían otras de pesos moleculares intermedios, quizás correspondientes a productos de degradación (Figura 28 C). En las células HS-5, la expresión de MMP-9 se comprobó también mediante inmunofluorescencia (Figura 28D).

Considerados conjuntamente, los resultados anteriores establecían que las células estromales protegen a las células LLC frente al efecto citotóxico del ATO y que la MMP-9 desempeña un rol en esta protección.

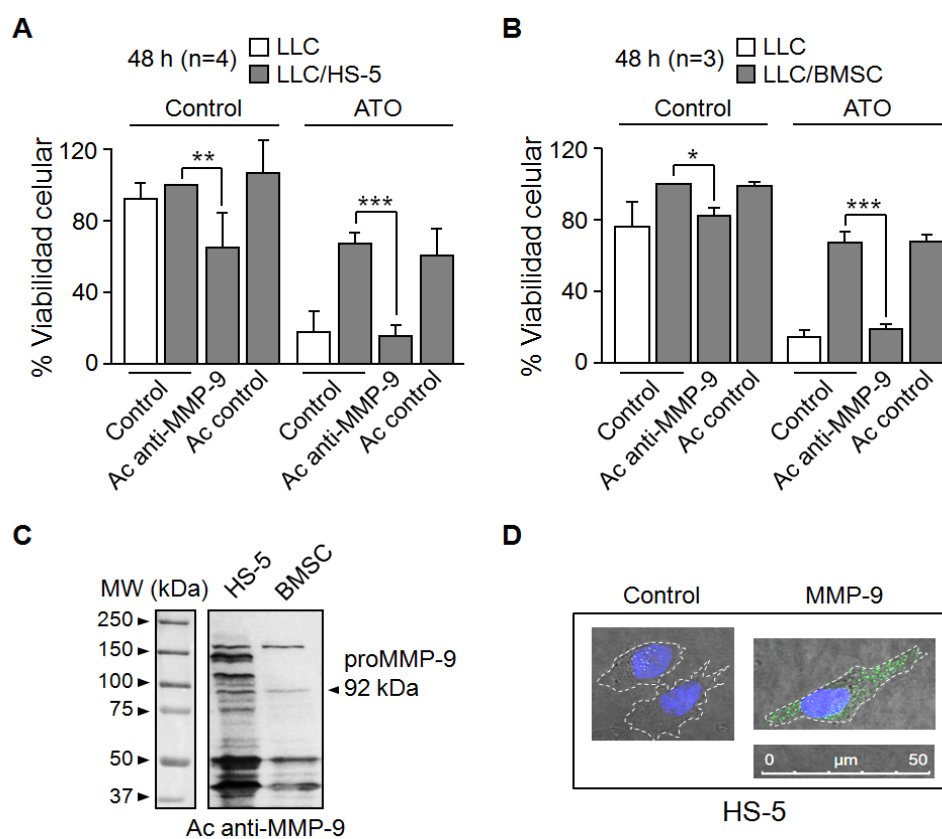


Figura 28. La MMP-9 presente en el estroma de médula ósea induce resistencia a ATO en células LLC. (A, B) Células LLC, preincubadas o no un Ac bloqueante de MMP-9 o un Ac control, se cultivaron en suspensión o sobre células HS-5 o estroma primario (BMSC) durante 48 h, en presencia o ausencia de 2 μ M ATO. Se determinó la viabilidad celular mediante citometría de flujo. Se muestran los % de viabilidad medios normalizados, considerando 100 la viabilidad de las células cocultivadas en ausencia de ATO. **(C, D)** Se analizó la expresión de MMP-9 mediante *Western blotting* e inmunofluorescencia en células BMSC **(C)** y HS-5 **(C, D)**. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

4.4.6. Las células MEC-1 también inducen MMP-9 en respuesta a ATO y Fludarabina

Para establecer definitivamente el papel de la MMP-9 en la resistencia de las células de LLC a fármacos, empleamos la línea celular MEC-1, derivada de un paciente con LLC y con una expresión constitutiva de MMP-9 muy baja. En primer lugar, se determinó si estas células se comportaban de forma análoga a las células LLC primarias analizando su respuesta a ATO y Fludarabina. La viabilidad de las células sin tratar después de 24 h o 48 h se normalizó a 100. La Figura 29 muestra que el tratamiento con ATO (Figura 29A) o Fludarabina (Figura 29B) durante 24 o 48 h, respectivamente, reducía la viabilidad de las células MEC-1, medida por el ensayo de MTT, de forma dosis dependiente, siendo esta disminución estadísticamente significativa para todas las dosis ensayadas. Determinaciones paralelas mediante citometría de flujo, usando Anexina V-FITC/PI, mostraron resultados similares (disminución de la viabilidad: 39%, 58% y 79% para 3, 5, 8 μ M ATO, respectivamente, y 13%, 29% y 32% para 3, 5 y 8 μ M Fludarabina, respectivamente, no mostrado), confirmando la validez del método de MTT para evaluar la viabilidad celular.

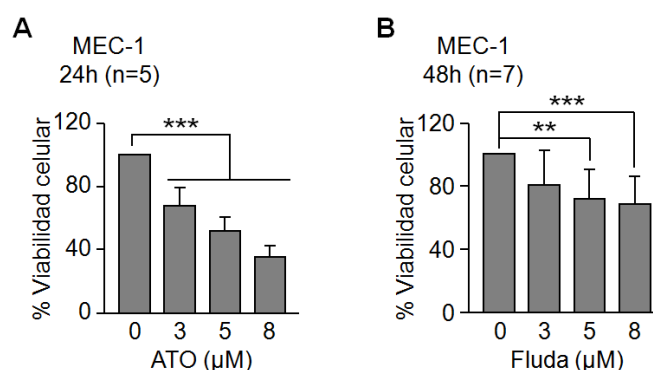


Figura 29. Efecto citotóxico del ATO y la Fludarabina en células MEC-1. (A, B) Células MEC-1 se trataron con las indicadas concentraciones de ATO (A) o Fludarabina (Fluda, B). A las 24 h, se determinó viabilidad celular por el ensayo de MTT. Se muestran los porcentajes de viabilidad medios normalizados (controles = 100). **P \leq 0.01; ***P \leq 0.001.

A continuación, estudiamos si el ATO también modulaba la expresión de MMP-9 en las células MEC-1. Para ello, estas células se trataron o no con 3 μ M ATO durante 24 h, y se analizó la expresión de mRNA de *MMP-9* mediante RT-PCR. El tratamiento con

ATO indujo, respecto de los controles, un incremento significativo en la expresión de mRNA de *MMP-9*, tanto a 8 h como a 24 h (Figura 30). La confirmación de estos resultados por qPCR reveló un incremento en la expresión de mRNA de *MMP-9* de 4.2 y 4.4 veces, tras 8 y 24 h de tratamiento con ATO, respectivamente, y en comparación con los correspondientes controles (Figura 30B). Además, la expresión de *MMP-9* en la superficie celular también incrementaba significativamente (de 15.6% a 34.1%) tras el tratamiento con ATO (Figura 30C). Conjuntamente, estos resultados confirmaron que las respuestas a ATO de células MEC-1 y células LLC primarias eran similares, validando el sistema celular MEC-1 para posteriores estudios.

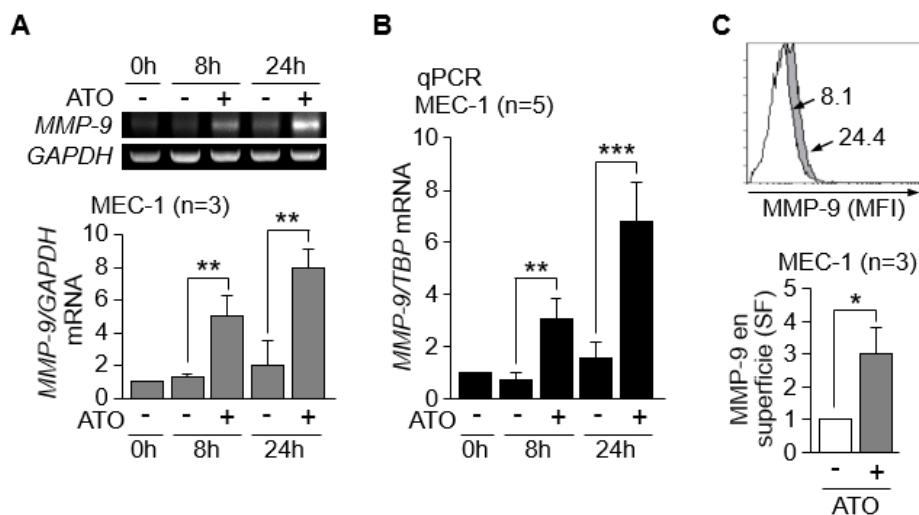


Figura 30. ATO induce la transcripción y localización en membrana de *MMP-9* en células MEC-1. (A, B) Células MEC-1 se trataron o no con 3 μ M ATO y, a los tiempos indicados, la expresión de mRNA de *MMP-9* se analizó por RT-PCR (A) y qPCR (B), usando *GAPDH* y *TBP* como controles internos, respectivamente. Se muestran los resultados de la PCR de un ensayo representativo (A) y los valores medios normalizados (controles a 0 h = 1) de todos los ensayos realizados (A, B). (C) Se determinó por citometría de flujo la expresión en superficie de *MMP-9* en células MEC-1 tratadas como en (A, B). Se muestra el histograma de un experimento representativo y los valores medios normalizados (controles = 1) de fluorescencia específica (SF) de las tres muestras analizadas; áreas blancas: -ATO, áreas grises: +ATO; flechas: SF; MFI: Intensidad de fluorescencia media. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

4.4.7. La sobreexpresión de *MMP-9* en células MEC-1 reduce la sensibilidad a ATO y Fludarabina

Nuestro grupo ha establecido recientemente transfectantes estables de células MEC-1 que expresan GFP (células Mock-MEC-1) o GFP y *MMP-9* (células *MMP-9*-MEC-

1) ³⁰⁴, representando, por tanto, un sistema óptimo para el estudio de las funciones de la MMP-9 en la LLC. De hecho, la expresión de MMP-9 en las células MMP-9-MEC-1 es similar a la de las células LLC primarias ²³⁴. Confirmamos estos resultados previos analizando por zimografía la expresión de MMP-9 en las fracciones citosólica y de membrana, así como en el medio condicionado de células Mock- y MMP-9-MEC-1. La Figura 31A muestra claramente la presencia de MMP-9 en la membrana celular (formas de 92 kDa y 86 kDa), el citosol (forma de 92 kDa) y el medio condicionado (MC) de células MMP-9-MEC-1 y su ausencia en las células Mock-MEC-1. Análisis paralelos mediante citometría de flujo confirmaron la presencia de MMP-9 unida a la superficie de las células MMP-9-MEC-1 y su ausencia en las células Mock-MMP-9 (Figura 31B).

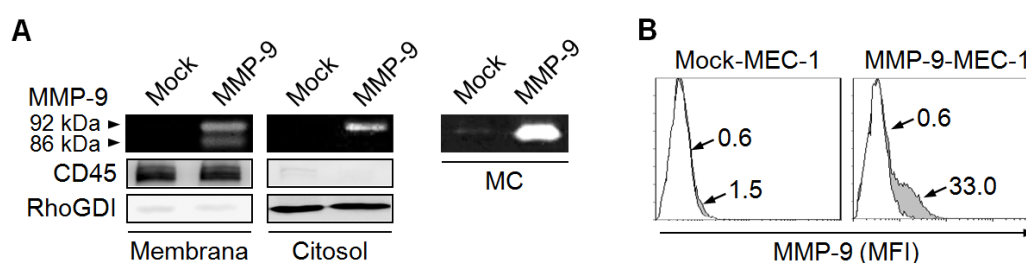


Figura 31. Expresión de MMP-9 en células Mock- y MMP-9-MEC-1. (A) Se analizó mediante zimografía la expresión de MMP-9 en las fracciones citosólica y de membrana y el medio condicionado (MC) de células Mock- y MMP-9-MEC-1. La expresión de RhoGDI y CD45 en las fracciones, determinada por *Western blotting*, se usó como control interno. (B) Se analizó por citometría de flujo la expresión en superficie de MMP-9 (áreas grises) en células Mock- y MMP-9-MEC-1; áreas blancas: control negativo. Se muestran los histogramas de un experimento representativo; flechas: valores de fluorescencia específica; MFI: Intensidad de fluorescencia media.

Células Mock- y MMP-9-MEC-1 se incubaron con varias concentraciones de ATO (24 h), Fludarabina (48 h) o vehículo, y la viabilidad celular se determinó por el ensayo de MTT. En ausencia de fármaco, los valores de viabilidad de las células MEC-1-Mock y MEC-1-MMP-9 eran muy similares (155% vs 149% a 24 h y 154% vs 152% a 48 h, en comparación con los valores iniciales) y se normalizaron a 100 con objeto de evaluar el efecto neto de los fármacos. Los tratamientos con ATO (Figura 32A) o Fludarabina (Figura 32B) disminuían la viabilidad de forma dosis dependiente en ambos tipos celulares, pero, a todas las dosis ensayadas, las células MEC-1-MMP-9 mostraban una viabilidad significativamente superior las células MEC-1-Mock.

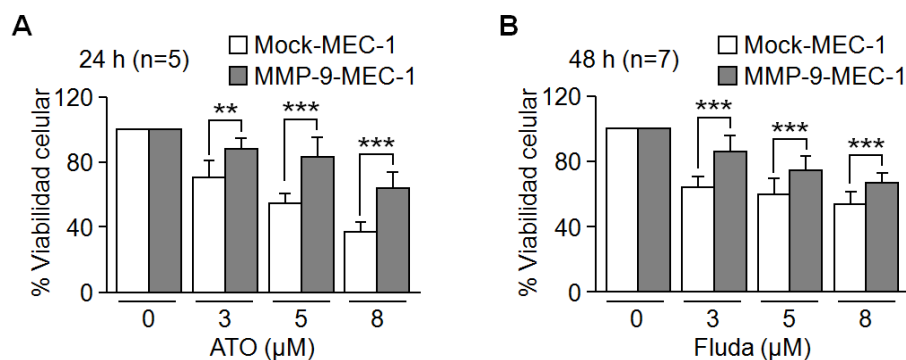


Figura 32. Respuesta de células Mock- y MMP-9-MEC-1 a ATO y Fludarabina. (A, B) Células Mock- o MMP-9-MEC-1 se trataron con las indicadas concentraciones de ATO (A), Fludarabina (Fluda, B) o vehículo, y la viabilidad celular se determinó a las 24 h (ATO) o 48 h (Fluda) mediante el ensayo de MTT. Se muestran los porcentajes de viabilidad medios normalizados, considerando 100 la viabilidad en ausencia de fármaco. **P ≤ 0.01; ***P ≤ 0.001.

Los resultados anteriores sugerían que la sobreexpresión de MMP-9 protege a las células MMP-9-MEC-1 del efecto citotóxico del ATO y la Fludarabina. Para comprobarlo, se transfectaron ambos tipos celulares con un siRNA específico de MMP-9 o un siRNA control. La eficiencia del silenciamiento se comprobó por zimografía del medio condicionado, observándose que el silenciamiento de MMP-9 inhibía la ya baja expresión de MMP-9 en las células Mock-MEC-1 y reducía en un 75% la expresión de MMP-9 en las células MMP-9-MEC-1, confirmada, en este caso, mediante *Western blotting* (Figura 33A). Las células transfectadas con los siRNAs control y de MMP-9, se incubaron con varias concentraciones de ATO y la viabilidad celular se analizó a las 24 h por el ensayo de MTT. Aunque el efecto citotóxico del ATO fue menor en estos experimentos, se observaron diferencias claras entre las células Mock- y MMP-9-MEC-1. El ATO reducía la viabilidad de las células Mock-MEC-1 de forma dosis dependiente y sin diferencias significativas entre las células transfectadas con el siRNA control y las transfectadas con el siRNA de MMP-9. La ausencia de efecto funcional en este caso probablemente era debida a la baja expresión constitutiva de MMP-9 en las células Mock-MEC-1 (véase Figura 31). Por el contrario, el ATO disminuía significativamente la viabilidad de las células MMP-9-MEC-1 transfectadas con el siRNA de MMP-9 en comparación con las células transfectadas con el siRNA control (Figura 32C). Estos resultados demostraban que la MMP-9 contribuye a la resistencia de las células de LLC a compuestos citotóxicos como el ATO.

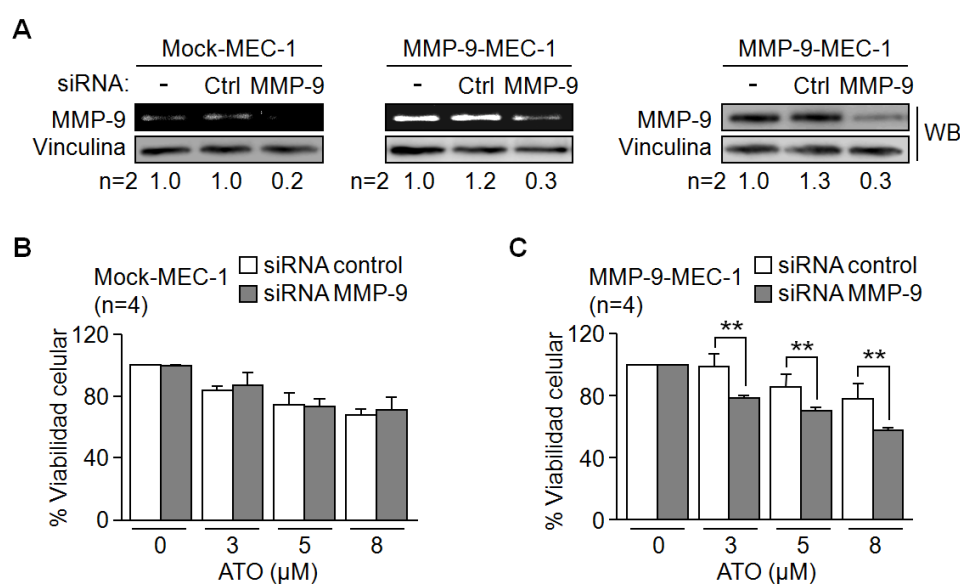


Figura 33. Silenciamiento de MMP-9 en transfectantes de MEC-1 y respuesta a ATO. (A) Células Mock- o MMP-9-MEC-1 se nucleofectaron con un siRNA de MMP-9 o un siRNA control. A las 24 h, se determinó la expresión de MMP-9 por zimografía y *Western blotting*. Se muestran los resultados de un experimento representativo y los números indican los valores medios normalizados (células no nucleofectadas = 1) de los ratios MMP-9/Vinculina de los dos experimentos realizados. (B, C) Células Mock- y MMP-9-MEC-1, nucleofectadas como en (A), se trataron con las indicadas concentraciones de ATO durante 24 h, y la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT. Se muestran los porcentajes de viabilidad medios normalizados (controles = 100). **P ≤ 0.01.

4.4.8. La MMP-9 induce resistencia a fármacos mediante la modulación del balance entre las proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl-2

Para determinar las bases moleculares del efecto protector de la MMP-9 frente a compuestos citotóxicos, analizamos la expresión de miembros prototípicos de la familia Bcl-2, actores principales en la regulación de la apoptosis en LLC^{266,305}. Para ello, células Mock- y MMP-9-MEC-1 tratadas o no con 5 µM ATO durante 24 h se lisaron y analizaron mediante *Western blotting*. La Figura 34A muestra que, en las células Mock-MEC-1 el ATO provocaba una disminución significativa de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-xL, pero no Bcl-2, en comparación con los correspondientes controles. Sin embargo, en las células MMP-9-MEC-1 los niveles de estas proteínas se mantenían sin cambios significativos (Mcl-1) o incrementaban significativamente (Bcl-xL, Bcl-2) en las células tratadas respecto de las células control. Además, en presencia de ATO, los niveles de las

proteínas antiapoptóticas Mcl-1, Bcl-xL y Bcl-2 eran significativamente superiores en las células MMP-9-MEC-1 que en las células Mock-MEC-1 (Figura 34A). Análisis similares de proteínas proapoptóticas seleccionadas mostraron una expresión significativamente aumentada de Bax y Bim en las células Mock-MEC-1 tratadas con ATO, en comparación con los controles, mientras que la expresión de Noxa no se modulaba (Figura 34A). Sin embargo, la expresión de Bax y Bim era menor en las células MMP-9-MEC-1 tratadas con ATO que en las no tratadas, mientras que Noxa no se modulaba significativamente. Además, en presencia de ATO, los niveles de Bax y Bim eran significativamente menores en las células MMP-9-MEC-1 que en las células Mock-MEC-1 (Figura 34A).

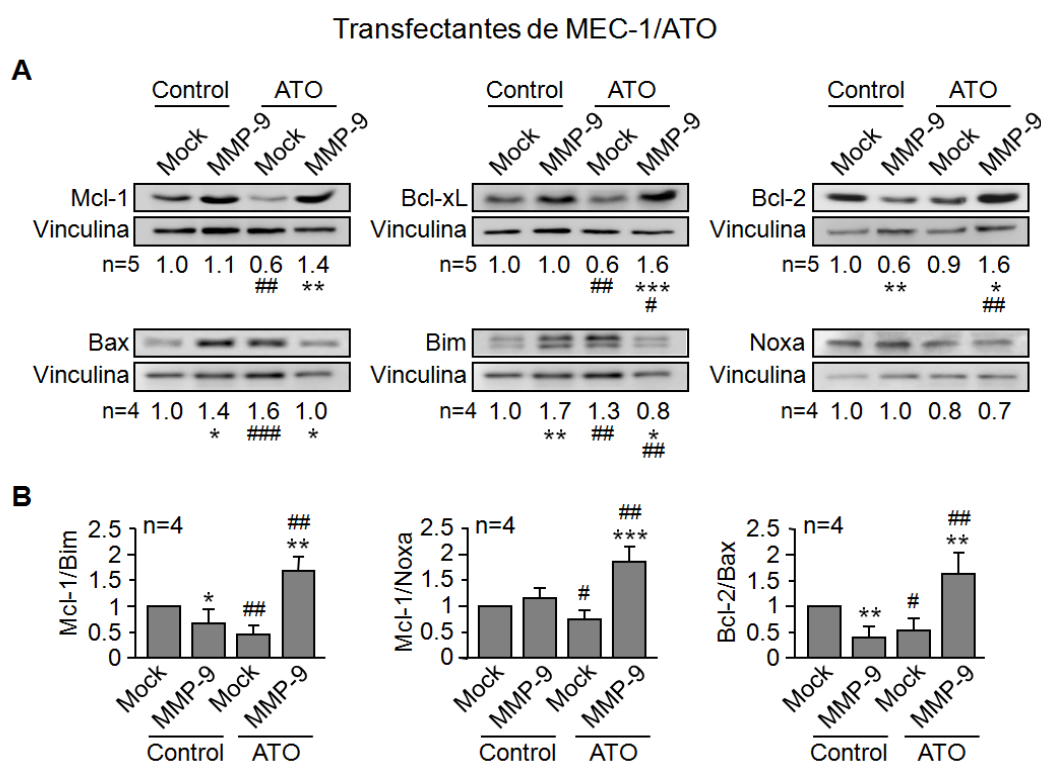


Figura 34. La sobreexpresión de MMP-9 en células MEC-1 previene la reducción de los niveles de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 en respuesta a ATO. (A) Se analizó mediante *Western blotting* la expresión de las proteínas indicadas en células Mock- o MMP-9-MEC-1 tratadas o no con 5 μ M ATO, 24 h. Vinculina: control interno. Se muestran los resultados de un experimento representativo; los números indican los valores medios normalizados (Mock-MEC-1 no tratadas=1) de todos los experimentos realizados. (B) Se muestran los ratios antiapoptótico/proapoptótico indicados. * o #P \leq 0.05; ** o ##P \leq 0.01; *** o ###P \leq 0.001. Símbolos: *, células Mock- vs MMP-9-MEC-1; #, células Mock- o MMP-9-MEC-1 tratadas con ATO vs los correspondientes controles.

Dado que el control de la apoptosis/supervivencia implica el balance entre los miembros anti y proapoptóticos de la familia Bcl-2, más que los niveles individuales de cada proteína ⁸⁷, también determinamos los ratios proapoptótico/antiapoptótico en las células Mock- y MMP-9-MEC-1, en presencia y ausencia de ATO. La Figura 34B muestra que en presencia de ATO, los ratios Mcl-1/Bim, Mcl-1/Noxa y Bcl-2/Bax eran significativamente mayores en las células MMP-9-MEC-1 que en las células Mock-MEC-1. Estos ratios también eran significativamente mayores en las células MMP-9-MEC-1 tratadas con ATO respecto de las no tratadas, mientras que disminuían significativamente tras el tratamiento con ATO en las células Mock-MEC-1 (Figura 34B).

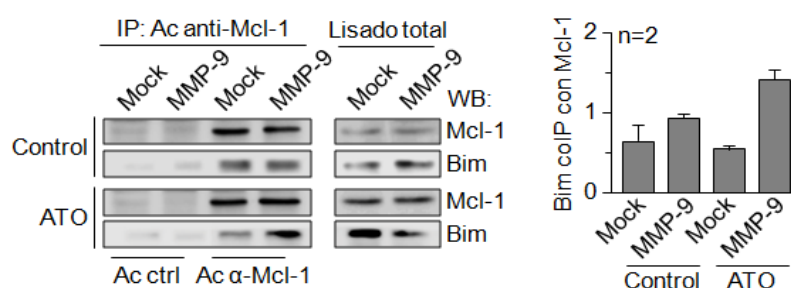


Figura 35. En células MMP-9-MEC-1, Mcl-1 se encuentra bloqueando Bim incluso en presencia de ATO. Lisados de células Mock- o MMP-9-MEC-1, tratadas o no con 5 μ M ATO durante 24 h, se inmunoprecipitaron con un Ac anti-Mcl-1 (Ac α -Mcl-1) o un Ac control (Ac ctrl) y los inmunoprecipitados se analizaron por *Western blotting*. Se muestran los resultados de un experimento representativo y los valores medios normalizados (células Mock-MEC-1 = 1) de la cantidad de Bim coimmunoprecipitada (coIP) con Mcl-1 en los dos experimentos realizados.

Mcl-1 es una molécula clave en la supervivencia de las células LLC y desempeña su función a través del secuestro de proteínas proapoptóticas “sólo BH3” como Bim ³⁰⁶. Así, nos propusimos estudiar si Mcl-1 y Bim estaban interaccionando en las células MMP-9-MEC-1 expuestas a ATO. Para ello, lisados de células Mock- y MMP-9-MEC-1 previamente tratadas o no con 5 μ M ATO durante 24 h, se inmunoprecipitaron con un Ac anti-Mcl-1 o un Ac control y se analizaron mediante *Western blotting*. La Figura 35 muestra que, en ausencia de ATO, las cantidades de Bim coimmunoprecipitadas con Mcl-1 eran similares en células Mock- y MMP-9-MEC-1. Sin embargo, en presencia de ATO, la cantidad de Bim que coimmunoprecipitaba con Mcl-1 disminuía en las células Mock-MEC-

1, mientras que Bim permanecía unido a Mcl-1, incluso en mayor medida, en las células MMP-9-MEC-1 (Figura 35). En concordancia con esto, los niveles de Bim en el lisado total en presencia de ATO eran superiores en las células Mock-MEC-1 que en las células MMP-9-MEC-1 (Figura 35). Estos resultados sugieren que, en respuesta a ATO, Bim se está liberando de Mcl-1 para desempeñar su función apoptótica en las células Mock-MEC-1, mientras que permanece unido, y por tanto inactivo, en las células MMP-9-MEC-1, en concordancia con la menor sensibilidad de las mismas al efecto citotóxico del ATO.

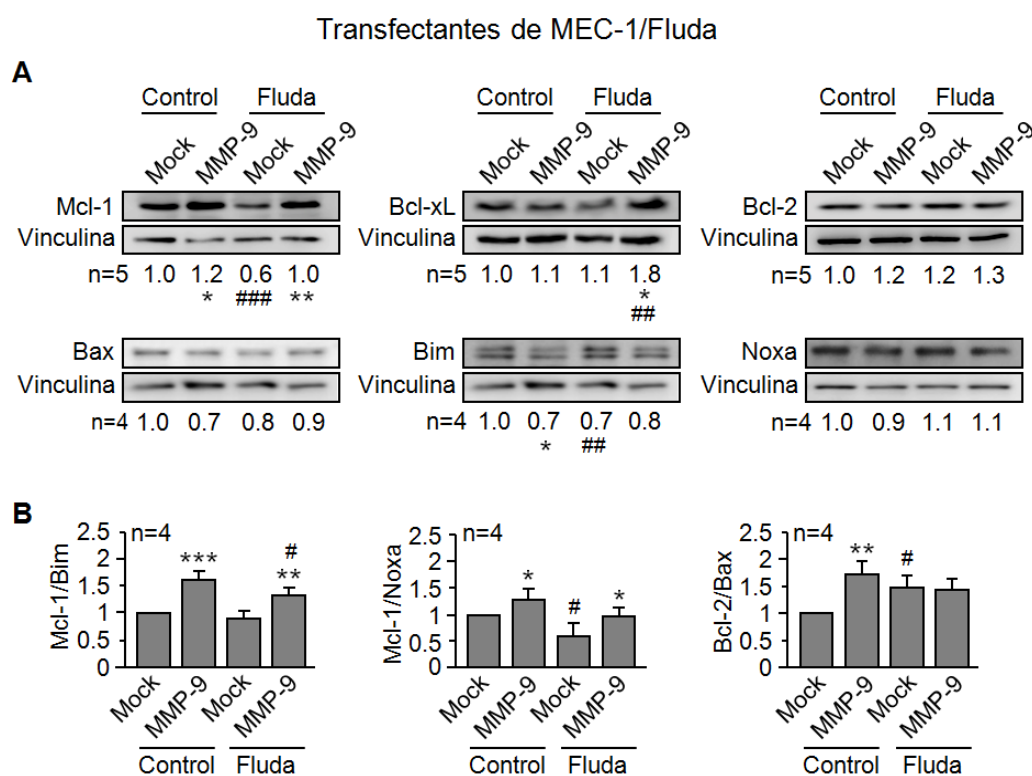


Figura 36. La sobreexpresión de MMP-9 en células MEC-1 previene la reducción de los niveles de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 en respuesta a Fludarabina. (A, B) La expresión de las proteínas (A) y los ratios indicados (B) se analizó como en la figura 34 en células Mock- y MMP-9-MEC-1 tratadas o no con 5 μ M Fludarabina (Fluda), 48 h. * o #P \leq 0.05; ** o ##P \leq 0.01; *** o ###P \leq 0.001. Los símbolos son: *, células Mock- vs MMP-9-MEC-1; #, células Mock- o MMP-9-MEC-1 tratadas con Fluda vs los correspondientes controles.

Se obtuvieron resultados similares tratando células Mock- y MMP-9-MEC-1 con 5 μ M Fludarabina. Como se muestra en la Figura 36A, en presencia de Fludarabina, los

niveles de Mcl-1 y Bcl-xL eran también significativamente superiores en células MMP-9-MEC-1 que en células Mock-MEC-1. Bcl-2 no parecía desempeñar un papel en este caso, ya que su expresión era similar en ambos tipos celulares, tanto en ausencia como en presencia de Fludarabina (Figura 36A). Los ratios Mcl-1/Bim y Mcl-1/Noxa eran también significativamente mayores en células MMP-9-MEC-1 que en células Mock-MEC-1, tanto en ausencia como en presencia de Fludarabina, mientras que el balance Bcl-2/Bax no parecía estar implicado en la respuesta a Fludarabina (Figura 36B).

4.4.9. La MMP-9 también regula el balance entre los miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 en células LLC primarias tratadas con ATO

Para confirmar y dar relevancia a los resultados obtenidos en los transfectantes de MEC-1, estudiamos si la MMP-9 también modulaba las proteínas de la familia Bcl-2 en células LLC primarias. Para ello, se analizó la expresión de las mismas proteínas en células LLC cultivadas durante 24 h sobre BSA o MMP-9 (150 nM) y en presencia o ausencia de 3 μ M ATO. La figura 37A muestra, que en las células cultivadas sobre MMP-9 respecto de las cultivadas sobre BSA, los niveles de Mcl-1 eran significativamente superiores, tanto en presencia como en ausencia de ATO, mientras que los de Bcl-xL y Bcl-2 sólo eran superiores en presencia de ATO (Figura 37A). Los ratios Mcl-1/Bim y Mcl-1/Noxa eran también significativamente más elevados en las células cultivadas sobre MMP-9 que en las cultivadas sobre BSA, tanto en presencia como en ausencia de ATO, mientras que el ratio Bcl-2/Bax no se modulaba (Figura 37B). Considerados conjuntamente, estos resultados indican que la MMP-9 induce resistencia a compuestos citotóxicos en células LLC mediante la modulación de miembros clave de la familia Bcl-2.

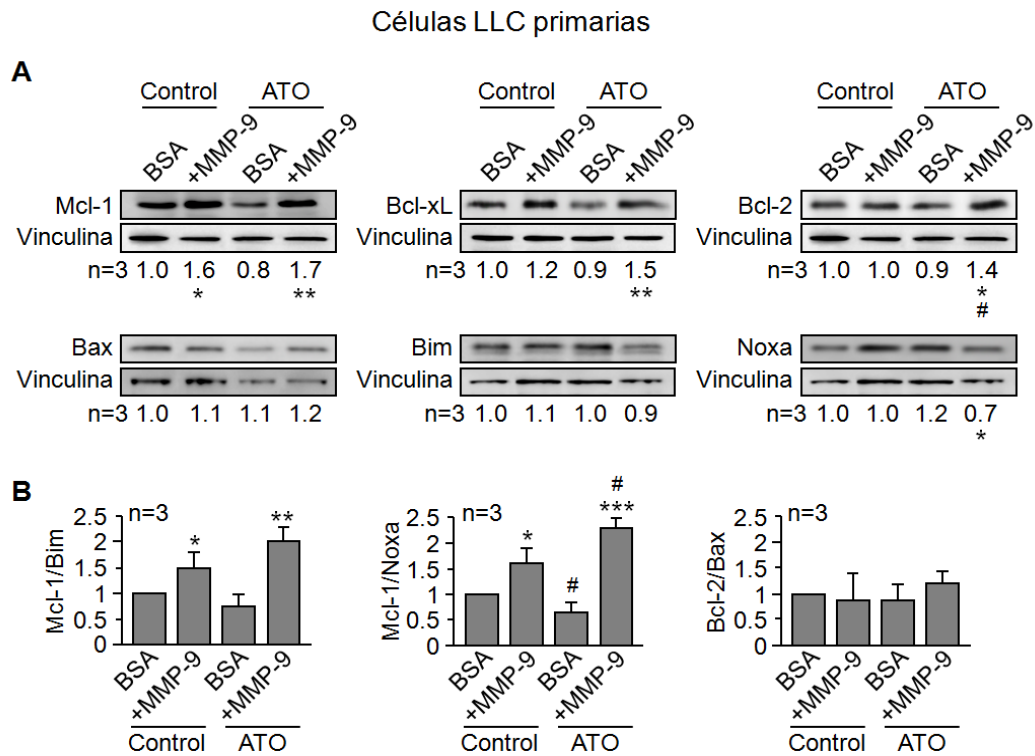


Figura 37. La adhesión a MMP-9 previene la reducción de los niveles de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 en respuesta a ATO en células LLC. (A, B) La expresión de las proteínas (A) y los ratios indicados (B) se analizó como en la Figura 34 en células LLC (primarias) cultivadas sobre BSA (0.5%) o MMP-9 (150 nM) durante 24 h, en presencia o ausencia de 3 μ M ATO. * o #P \leq 0.05; ** o ##P \leq 0.01; *** o ###P \leq 0.001. Símbolos: *, células LLC sobre BSA vs células LLC sobre MMP-9; #, células LLC tratadas con ATO en comparación con los correspondientes controles sin tratar.

La Figura 38 muestra una representación esquemática del mecanismo de resistencia a ATO (y Fludarabina) inducido por MMP-9 en células LLC.

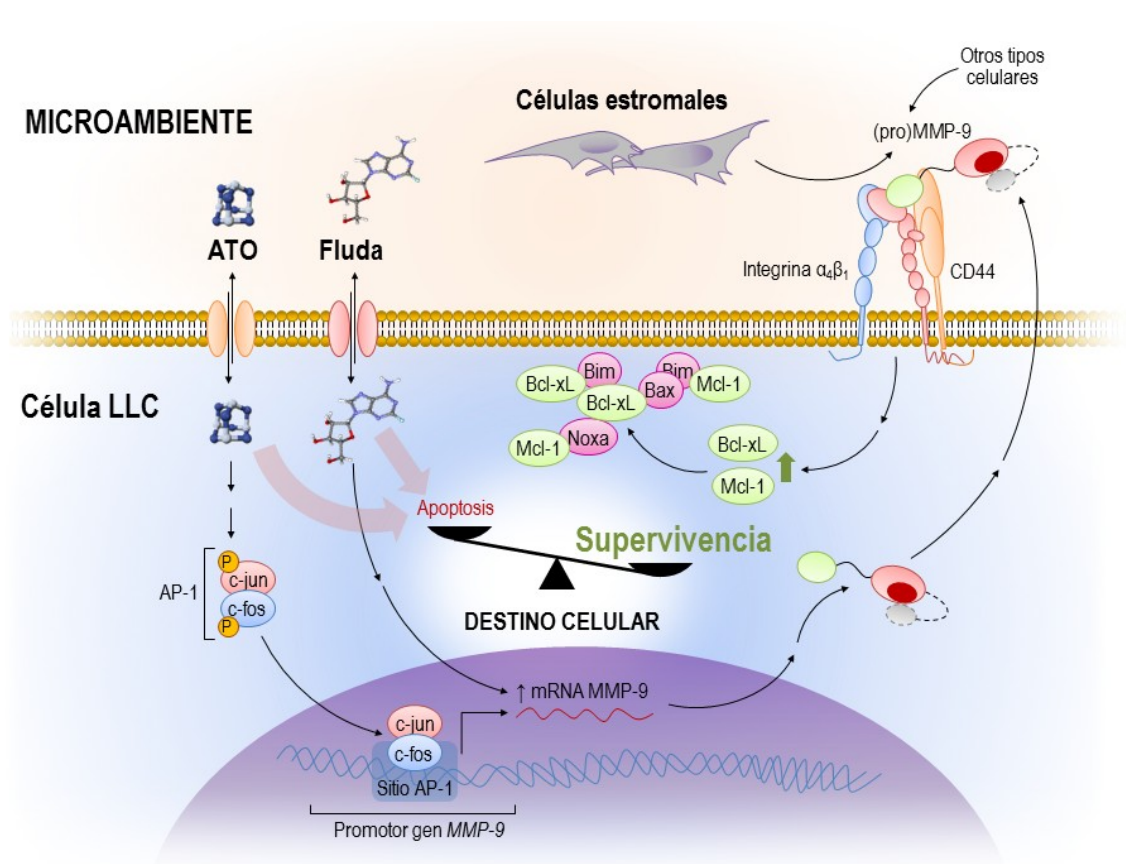


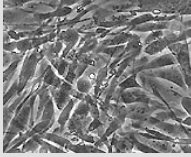
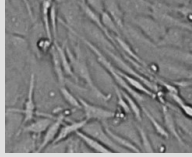
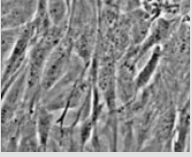
Figura 38. Mecanismo de resistencia a fármacos inducido por MMP-9 en células de LLC. Se muestra un esquema representativo del mecanismo de resistencia a ATO y Fludarabina (Fluda) inducido por MMP-9 en células de LLC.

4.5. Papel del estroma de médula ósea en la resistencia a ATO en células LLC

4.5.1. Las células estromales protegen a las células LLC de la apoptosis inducida por ATO

Haciendo establecido que la MMP-9, un componente del microambiente, protege a las células LLC de la apoptosis inducida por ATO, nos propusimos estudiar la influencia de otras señales del microambiente en la respuesta de células LLC a este agente. Previamente, habíamos demostrado en un grupo reducido de muestras que el cocultivo con estroma de médula ósea protege a las células LLC de la apoptosis inducida por ATO (consúltense Figuras 28A y 28B). Dada la importancia de la médula ósea en la progresión de la LLC y, puesto que el principal componente de este microambiente son las células estromales^{126,131,145,146}, decidimos profundizar en los mecanismos de resistencia a ATO inducidos por estroma de médula ósea. Para ello, empleamos cocultivos de células LLC y varios tipos de células estromales de médula ósea (HS-5, HS-27A o estroma primario) (Tabla 12), un modelo que simula *in vitro* el microambiente de médula ósea *in vivo*.

Tabla 12. Características de los modelos de estroma de médula ósea.

	Células HS-5	Células HS-27A	Estroma primario
Tipo celular	Línea celular, un único tipo celular		Células primarias, varios tipos celulares
Establecimiento	Transformación con oncogenes E6/E7 del VPH16		Aspirado de médula ósea de un paciente con LLC
Morfología	Fibroblastoide 	Epitelioide 	Mixta 
VCAM-1 (C/I)	-, +/-, +	+ /++++	++++/ND
ICAM-1 (C/I)	+++ /+++	++ /+++	+++ /ND
Secreción de FS (C/I)	++++ /ND	- /+	++++ /ND

VPH: Virus del papiloma humano; ND: No determinado; FS: factores solubles; C: constitutivo; I: Inducible. Modificada de²⁹⁰. Se muestran imágenes de contraste de fases de la apariencia de los diferentes tipos celulares.

En experimentos iniciales, se cultivaron células LLC en suspensión o sobre células HS-5 (propiedades fibroblastoides ²⁹⁰), en presencia o ausencia de 1 o 2 μ M ATO, y se determinó la viabilidad celular por citometría de flujo a las 24 y 48 h. La viabilidad constitutiva de las muestras (82% de media) se normalizó a 100. La Figura 39A muestra que el ATO disminuía la viabilidad de las células LLC en suspensión de manera dosis dependiente, conduciendo a un 68% y un 88% de muerte celular a las 24 y 48 h de exposición a 2 μ M ATO, respectivamente. El cocultivo con células HS-5 protegía significativamente a las células LLC del efecto citotóxico del ATO, a las dos concentraciones testadas, siendo más patente a 2 μ M ATO. A esta concentración el ATO sólo reducía la viabilidad celular a 69% y 54%, después de 24 y 48 h, respectivamente (Figura 39A). Puesto que el efecto protector de las células estromales se observaba mejor a 2 μ M ATO, se seleccionó esta concentración para los siguientes experimentos, salvo cuando se indica. En experimentos control, 2 μ M ATO tenía un efecto despreciable sobre la viabilidad de las células HS-5 (4% y 8% de reducción tras 24 y 48 h de exposición, respectivamente, no mostrado).

A continuación, estudiamos si las células HS-27A (morfología epitelioide y diferentes propiedades funcionales que las HS-5 ²⁹⁰) producían el mismo efecto sobre las células LLC expuestas a ATO. Las células HS-27A prevenían significativamente la apoptosis inducida por 2 μ M ATO en las células LLC, resultando en valores de viabilidad de 71% (24 h) y 67% (48 h), en comparación con 26% y 13%, respectivamente, en las células cultivadas en suspensión (Figura 39B).

Realizamos los mismos experimentos en cocultivos de células LLC y estroma primario (BMSC), establecido a partir de un aspirado de médula ósea de un paciente con LLC (P5, Tabla 4). La Figura 39C muestra que el estroma primario también protegía a las células LLC de la apoptosis inducida por ATO, ya que tras 24 h de exposición, 2 μ M ATO sólo reducía en un 21% la viabilidad de las células LLC cocultivadas con estroma, en comparación con un 63% de reducción en las células en suspensión. Tras 48 h de exposición a este agente, los valores de viabilidad eran 61% y 14% para células LLC

cultivadas sobre estroma y en suspensión, respectivamente (Figura 39C). En conjunto, estos resultados indicaban que las células estromales de médula ósea protegen a las células LLC del efecto apoptótico del ATO, contribuyendo, por tanto, a su supervivencia y a la resistencia a la terapia.

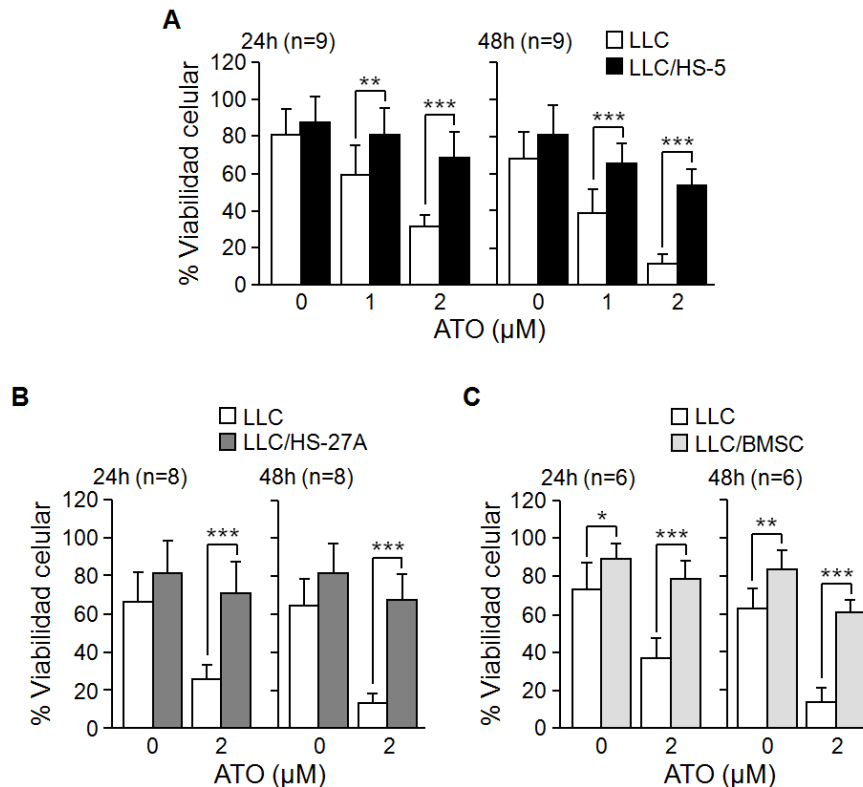


Figura 39. Las células estromales protegen a las células LLC de la apoptosis inducida por ATO. (A-C) Células LLC se cultivaron en suspensión o sobre células HS-5 (A), HS-27A (B) o BMSC (C), en presencia o ausencia de 1 y/o 2 μM ATO. A las 24 y 48 h, se determinó la viabilidad celular por citometría de flujo con Anexina V-FITC/PI. Se muestran los % de viabilidad medios normalizados (viabilidad constitutiva = 100, no mostrado). *P ≤ 0.05; **P ≤ 0.01; ***P ≤ 0.001.

4.5.2. La protección frente a ATO inducida por estroma implica interacciones con las células LLC a través de las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_L\beta_2$, así como factores solubles.

A continuación, estudiamos si el contacto físico entre las células LLC y las células estromales era necesario para el efecto de supervivencia observado. Estas interacciones están principalmente mediadas por las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_L\beta_2$, expresadas en las células LLC (Tabla 4, ³⁰⁷), y sus correspondientes ligandos, VCAM-1 y ICAM-1, expresados en las

células estromales ¹⁴¹. Para confirmar este punto, analizamos la expresión de VCAM-1 y ICAM-1 en monocapas de células HS-5, HS-27A o BMSC estimuladas (16 h a 37°C) o no con 20 ng/ml TNF α . El análisis mediante *Western blotting* de los lisados de estas células reveló que las células HS-5 y HS-27A no expresaban VCAM-1 basalmente o lo hacían a niveles muy bajos, mientras que las BMSC mostraban alta expresión constitutiva de VCAM-1 (Figura 40A, ²⁹⁰). La estimulación con TNF α inducía claramente la expresión de VCAM-1 en las células HS-27A, pero no en las HS-5 (Figura 40A). Los tres tipos celulares expresaban constitutivamente niveles elevados de ICAM-1 y el tratamiento con TNF α incrementaba ligeramente esta expresión en las células HS-27A, pero no en las HS-5 (Figura 40A). Las BMSC no se estimularon puesto que expresaban constitutivamente VCAM-1 y ICAM-1 (Figura 40A). Los resultados de expresión de VCAM-1 se comprobaron mediante inmunofluorescencia en las células HS-5 y HS-27A (Figura 40B).

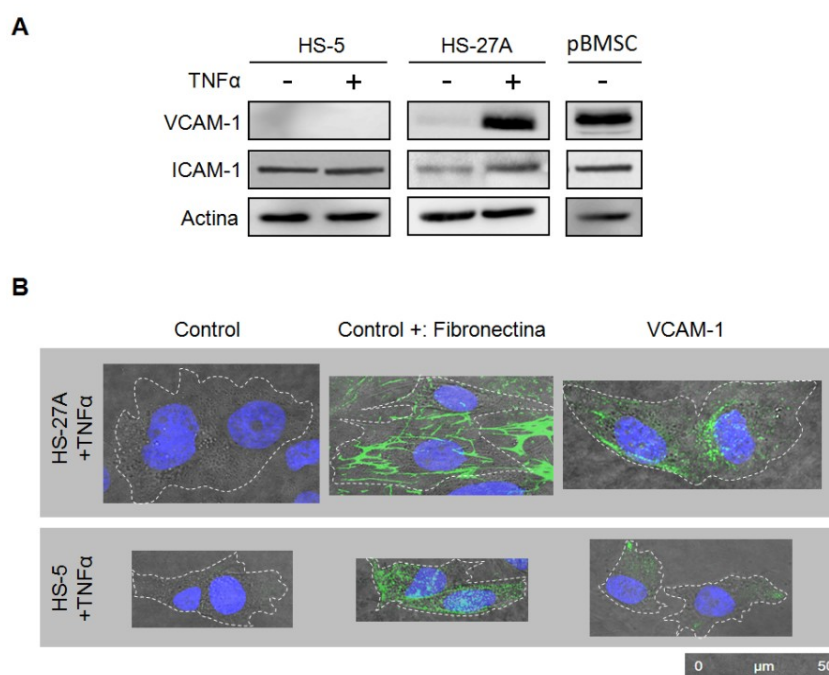


Figura 40. Expresión de VCAM-1 y ICAM-1 en los diferentes tipos de células estromales. (A) Se determinó la expresión de VCAM-1 y ICAM-1 mediante *Western blotting* en células HS-5 y HS-27A (estimuladas o no con 20 ng/ml TNF α , 16h, 37°C) o BMSC. Actina: control interno. Se muestran los resultados de un experimento representativo. (B) Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de VCAM-1 en células HS-5 y HS-27A; Fibronectina: control positivo. Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se solapan las señales de fluorescencia con las imágenes de contraste de fases. Las líneas punteadas indican el contorno celular.

A continuación, examinamos el efecto de bloquear las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_L\beta_2$ en las células LLC. Para ello, células LLC (2×10^5 /condición) procedentes de al menos tres pacientes diferentes se trataron con Acs bloqueantes de las integrinas α_4 , β_2 o ambas, antes del cocultivo con células HS-5 durante 48 h, en presencia o ausencia de $2 \mu\text{M}$ ATO. La viabilidad media de las células control (sin Acs) a este tiempo era 82% y se normalizó a 100. En ausencia de ATO, el bloqueo de las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_L\beta_2$ no afectaba significativamente la viabilidad de las células LLC cocultivadas con células HS-5 (Figura 41A). Sin embargo, en presencia de ATO, los Acs anti- α_4 y anti- β_2 reducían significativamente la viabilidad las células cocultivadas al 53% y 57%, respectivamente, mientras que el Ac control no tenía ningún efecto (Figura 41A). El bloqueo simultáneo de ambas integrinas incrementaba el efecto del bloqueo individual, reduciendo la viabilidad de las células LLC en cocultivo a 32% (Figura 41A), acercándose al efecto del ATO en las células en suspensión (19%, no mostrado).

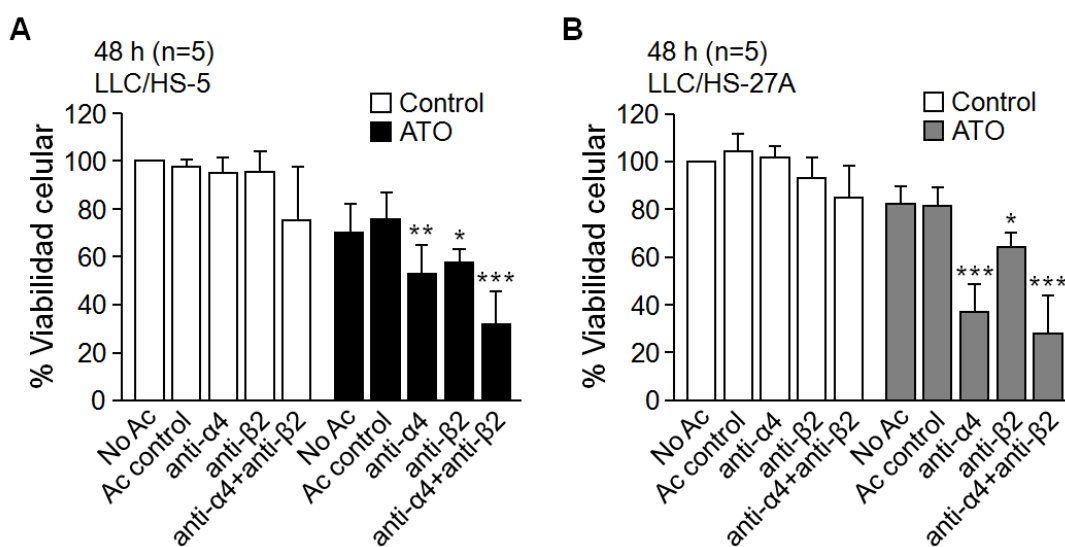


Figura 41. Las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_L\beta_2$ están implicadas en la resistencia a ATO inducida por estroma en células LLC. (A, B) Células LLC, preincubadas con los Ac indicados, se cultivaron sobre células HS-5 (A) o HS-27A (B), en presencia o ausencia de $2 \mu\text{M}$ ATO. A las 48 h, se determinó la viabilidad celular por citometría de flujo. Se muestran los % de viabilidad medios normalizados (Viabilidad de las células cocultivadas sin Acs = 100) de al menos tres experimentos diferentes. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$. Los símbolos * indican comparaciones con los valores correspondientes al Ac control.

Se obtuvieron resultados similares en cocultivos de células LLC con células estromales HS-27A (Figura 41B). Mientras que el tratamiento con Acs no afectaba a la viabilidad de las células LLC cocultivadas en ausencia de ATO, en presencia de este agente, el Ac anti- α_4 era incluso más efectivo que en los cocultivos con células HS-5, reduciendo la viabilidad celular a 37%, y 28% (similar al efecto del ATO en células en suspensión, 23% de células viables, no mostrado) cuando se combinó con el Ac anti- β_2 (Figura 41B). El mayor efecto del Ac anti- α_4 podría explicarse por el hecho de que las células HS-27A expresan altos niveles de VCAM-1 tras estimulación con TNF- α , a diferencia de las células HS-5 (véase Figura 40). En conjunto, estos resultados establecían que el contacto directo célula-célula es necesario para la resistencia de células LLC a ATO inducida por estroma.

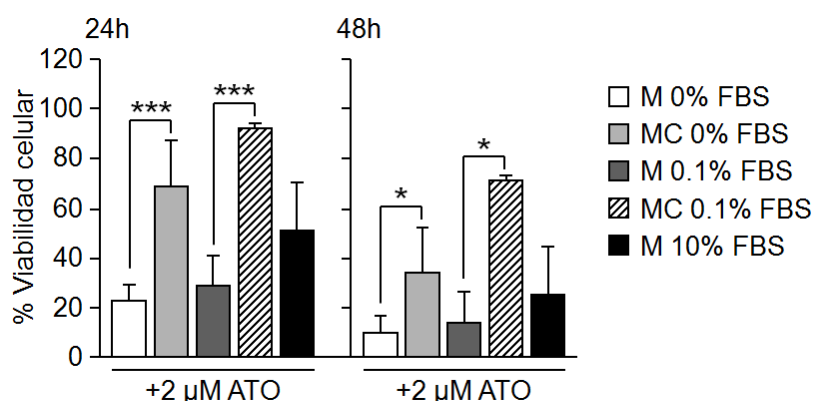


Figura 42. La resistencia a ATO inducida por estroma también implica factores solubles. Células LLC se incubaron en medio de cultivo (M) o medio condicionado (MC) por células HS-5, conteniendo las cantidades indicadas de suero (FBS), y en presencia o ausencia de 2 μ M ATO. A las 24 h y 48 h, se determinó la viabilidad celular mediante citometría de flujo usando Anexina V-FITC/PI. Todos los valores de viabilidad en ausencia de ATO se consideraron 100, por lo que se muestra el efecto neto del ATO en las diferentes condiciones. * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$.

Estudiamos también la posible implicación de factores solubles secretados por las células estromales en la protección frente a ATO observada. Para ello, obtuvimos medio condicionado de células HS-5, que secretan grandes cantidades de factores solubles ²⁹⁰, cultivando durante 24 h monocapas confluentes de estas células en medio de cultivo al 0% y 0.1% FBS. Las células LLC, se cultivaron 2 h a 37°C en medio fresco o medio condicionado, conteniendo ambos la misma cantidad de suero, o medio completo (10%

FBS) y, posteriormente, se trataron o no con 2 μ M ATO. A las 24 y 48 h, se determinó la viabilidad de las células LLC mediante citometría de flujo. En la Figura 42 se muestra que, en presencia de ATO, y tanto a 24 como a 48 h, la viabilidad de las células cultivadas en medio condicionado (tanto al 0% como al 0.1% FBS) era significativamente superior a la de las células cultivadas en medio fresco con las mismas cantidades de suero, y también a la de las células cultivadas en medio completo. Estos resultados indicaban que ciertos factores solubles secretados por las células estromales también contribuyen a la resistencia a ATO inducida por estroma en células LLC.

Dado que las células HS-5 y HS-27A se comportaban de forma análoga y, como las células HS-27A representan, *a priori*, un mejor modelo de estroma de médula ósea (Tabla 12, Figura 40), se utilizaron estas células para subsiguientes experimentos, relegando el uso de la línea HS-5 a ciertas comprobaciones.

4.5.3. Vías de señalización inducidas en células LLC cocultivadas con células estromales y efecto del tratamiento con ATO

Para determinar las rutas de supervivencia inducidas por las células estromales y posibles contribuyentes a la resistencia a ATO, en primer lugar, analizamos la activación de quinasas importantes en la supervivencia de las células LLC, concretamente ERK, PI3K/Akt, PKC y Lyn^{138,158,166,220,264}, en células LLC cultivadas en suspensión o con células HS-27A, y en presencia o ausencia de ATO durante 24 h. En las células LLC cultivadas en suspensión, la fosforilación de Akt, PKC y Lyn no cambiaba o se reducía tras el tratamiento con ATO, en comparación con las células control (Figura 43 A). Los niveles de ERK fosforilado en las muestras estudiadas eran muy bajos en estas condiciones. El cocultivo de células LLC con células HS-27A incrementaba significativamente la fosforilación de Akt, PKC, ERK y Lyn y estas quinasas permanecían activadas, incluso en mayor medida, en presencia de 2 μ M ATO (Figura 43A). Se obtuvieron resultados similares en cocultivos de células LLC con células HS-5 (Figura 43B).

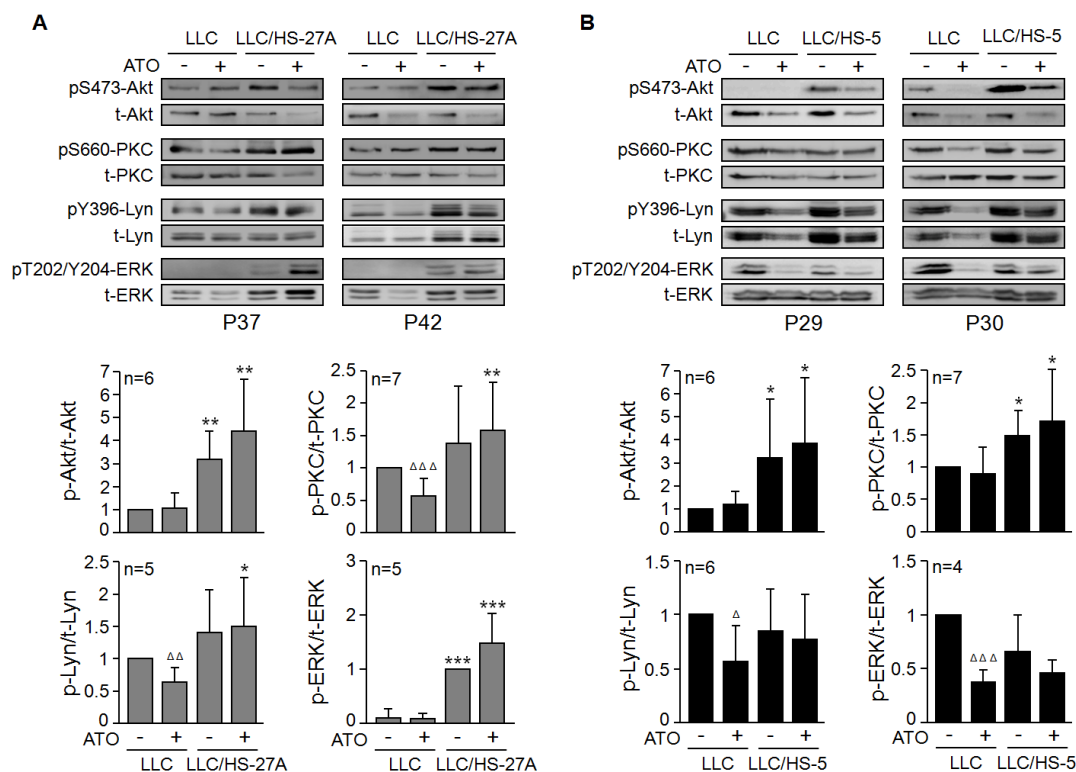


Figura 43. Quinasas activadas en células LLC cultivadas con células estromales y efecto del ATO. (A, B) Se analizó por *Western blotting* la expresión de las proteínas indicadas en células LLC cultivadas 24 h en suspensión o con células HS-27A (A) o HS-5 (B), y en presencia o ausencia de 2 μ M ATO. Vinculina: control interno. Se muestran los resultados de dos muestras representativas y los valores medios normalizados (células en suspensión no tratadas = 1) resultantes de la cuantificación de todas las muestras estudiadas. * o Δ P \leq 0.05; ** o $\Delta\Delta$ P \leq 0.01; *** o $\Delta\Delta\Delta$ P \leq 0.001. Los símbolos son: *, Cultivo en suspensión vs cocultivo; Δ , Células tratadas con ATO vs células control.

También examinamos la posible activación de los factores de transcripción NF- κ B y STAT3, dianas reconocidas de algunas de estas quinasas^{164,220,308}. La activación de NF- κ B se determinó mediante el análisis de los niveles de fosforilación de su inhibidor I κ B α ; la fosforilación de I κ B α determina su degradación vía proteasoma y consiguiente liberación de NF- κ B³⁰⁹. La fosforilación de I κ B α y STAT3 en las células LLC aumentaba en presencia de células HS-27A respecto de las células en suspensión, manteniéndose elevada incluso en presencia de 2 μ M ATO (Figura 44A). Se obtuvieron resultados similares en cocultivos de células LLC y células HS-5 (Figura 44B). Considerados conjuntamente, estos resultados indicaban que el estroma de médula ósea induce varias rutas de supervivencia en las células LLC y que esta señalización no es inhibida por ATO.

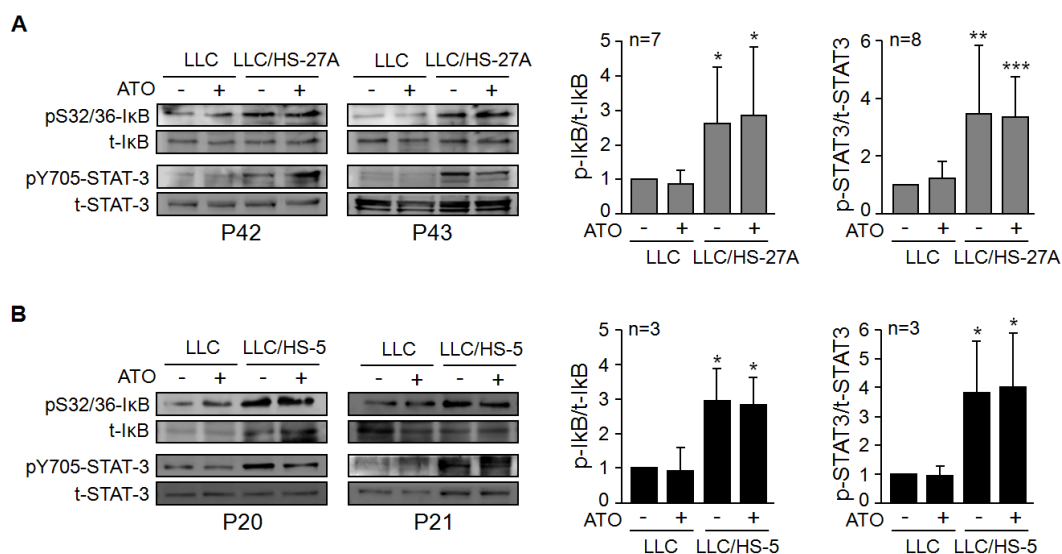


Figura 44. NF-κB y STAT3 están activados en células LLC cocultivadas con células estromales incluso en presencia de ATO. (A, B) Se analizó por *Western blotting* la fosforilación de IκBα y STAT3 en células LLC cultivadas 24 h en suspensión o con células estromales HS-27A (A) o HS-5 (B), y en presencia o no de 2 μM ATO. Vinculina: control interno. Se muestran los resultados de dos muestras representativas y los valores medios normalizados (células en suspensión no tratadas = 1) de todas las muestras estudiadas. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$. Los símbolos * indican comparaciones entre células en suspensión y células cocultivadas con estroma.

Finalmente, dado el papel clave de Akt en la supervivencia de las células LLC¹⁵⁸, estudiamos si el estroma estaba activando plenamente esta quinasa. La activación completa de Akt requiere de fosforilación en los residuos T308 y S473. PDK1 fosforila Akt en T308 de forma dependiente de PI3K. La fosforilación en S473 puede ser PI3K-dependiente (modo 1: a través de mTOR) o PI3K-independiente (modo 2: a través de otras quinasas como PKC)³¹⁰ (Figura 45A). La Figura 45B muestra que el residuo T308 de Akt está fosforilado en células LLC cocultivadas con células HS-27A, tanto en presencia como en ausencia de 2 μM ATO. Previamente, habíamos demostrado la fosforilación de Akt en S473 (Figura 43A), por lo que, podemos afirmar que Akt está completamente activo en las células LLC en presencia de células estromales.

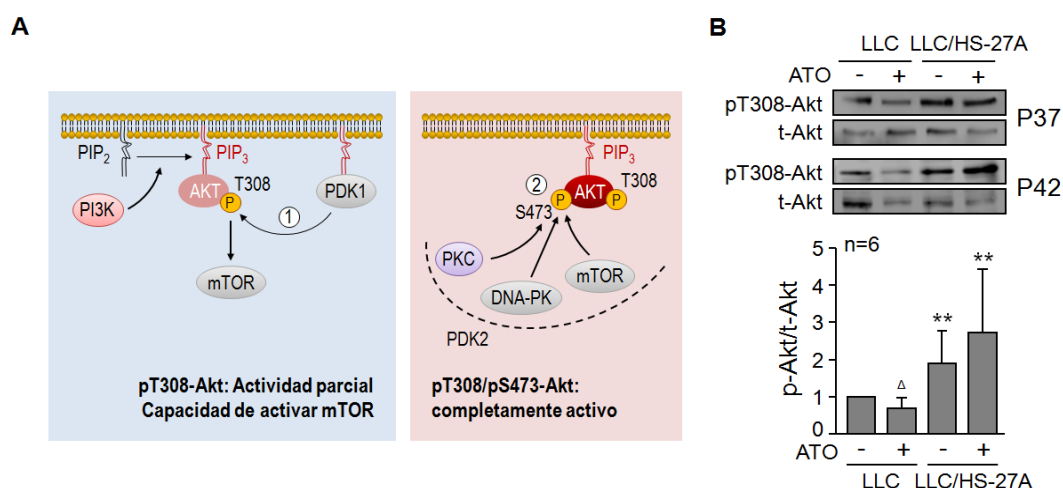


Figura 45. Akt está completamente activo en células LLC cocultivadas con células estromales. (A) Esquema representativo de la activación de Akt. (B) Se cultivaron células LLC en suspensión o con células HS-27A, en presencia o ausencia de 2 μ M ATO. A las 24 h, se analizó por *Western blotting* la fosforilación de Akt en T308. Vinculina: control interno. Se muestran los resultados de dos pacientes representativos y los valores medios normalizados (células en suspensión no tratadas = 1) de los seis pacientes analizados. * o $\Delta P \leq 0.05$; ** o $\Delta\Delta P \leq 0.01$; *** o $\Delta\Delta\Delta P \leq 0.001$. Los símbolos son: *, Cultivo en suspensión vs cocultivo; Δ , Células tratadas con ATO vs células control.

4.5.4. Modulación de las proteínas de la familia Bcl-2 en células LLC cocultivadas con células estromales y expuestas a ATO

Para caracterizar mejor los mecanismos moleculares subyacentes a la resistencia a ATO inducida por estroma en células LLC, analizamos la modulación de las proteínas de la familia Bcl-2, actores principales en la regulación de la apoptosis en LLC^{266,305} y, cuya expresión, en algunos casos, está regulada por los factores de transcripción NF- κ B y/o STAT3. Para ello, células LLC se cultivaron durante 24 h en suspensión o con células HS-27A y en presencia o ausencia de 2 μ M ATO. La Figura 46 muestra que la expresión de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-xL incrementaba significativamente en las células LLC cultivadas con células HS-27A, respecto de las cultivadas en suspensión, mientras que Bcl-2 no variaba. Además, los niveles de Mcl-1 y Bcl-xL no disminuían tras el tratamiento con ATO (Figura 46), correlacionando con la resistencia observada a este compuesto (que sólo disminuyó la viabilidad en un 18% en estas condiciones, no mostrado) y sugiriendo que ambas proteínas podrían estar implicadas en la misma.

También estudiamos en las mismas muestras la posible modulación de varios miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 (Bim, Noxa, Bax), que intervienen en la regulación de la apoptosis mediante la interacción con los miembros antiapoptóticos ⁸⁷. La Figura 46 muestra que, en ausencia de estroma, el tratamiento con 2 μ M ATO incrementaba significativamente los niveles de Bim y Noxa (2.8 y 3.5 veces, respectivamente, en comparación con las células control), pero no de Bax. Este incremento correlacionaba con la inducción de apoptosis por ATO, demostrada por la presencia de un 66% de células Anexina V+ en estos cultivos (no mostrado). El cultivo con células estromales HS-27A inhibía claramente la inducción de Bim y Noxa tras el tratamiento con ATO (Figura 46), en concordancia con la menor tasa de apoptosis (35% de células Anexina V+) observada en estas células.

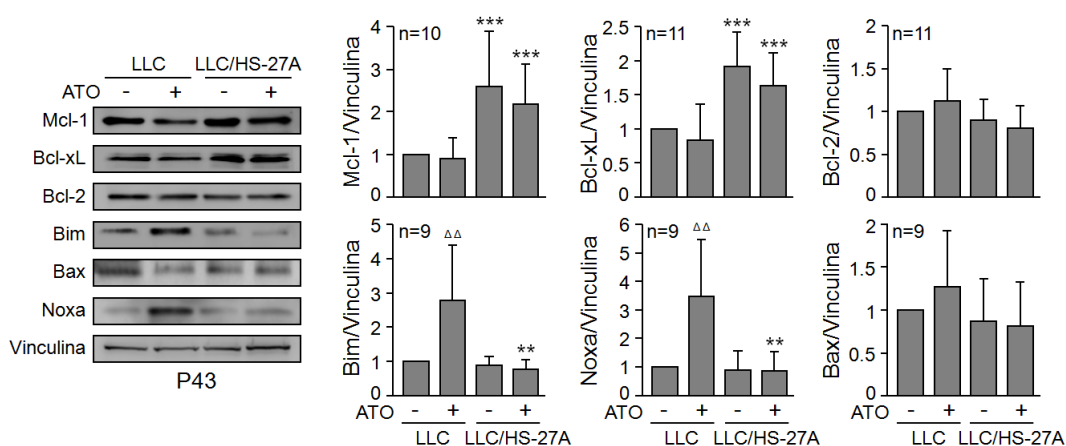


Figura 46. Modulación de las proteínas de la familia Bcl-2 en células LLC cocultivadas con células HS-27A y efecto del ATO. Se analizó por *Western blotting* la expresión de las proteínas indicadas en células LLC cultivadas 24 h en suspensión o con células HS-27A, y en presencia o ausencia de 2 μ M ATO. Vinculina: control interno. Se muestran los resultados de una muestra representativa y los valores medios normalizados (células en suspensión no tratadas = 1) de todas las muestras estudiadas. * o Δ P \leq 0.05; ** o $\Delta\Delta$ P \leq 0.01; *** o $\Delta\Delta\Delta$ P \leq 0.001. Los símbolos son: *, Células cultivadas en suspensión vs células cultivadas con estroma; Δ , Células tratadas con ATO vs células control.

Resultados similares se observaron en los cocultivos de células LLC con células estromales HS-5 (Figura 47).

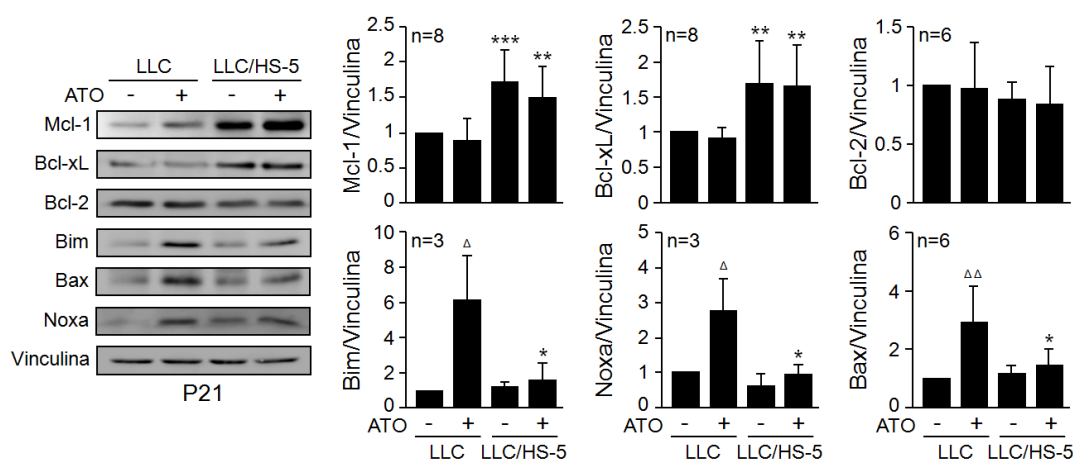


Figura 47. Modulación de las proteínas de la familia Bcl-2 en células LLC cocultivadas con células HS-5 y efecto del ATO. Se analizó la expresión de las proteínas indicadas en células LLC cultivadas en suspensión o con células HS-5 como se describe en la Figura 46. Se muestran los resultados de un paciente representativo y los valores medios normalizados (células en suspensión no tratadas = 1) de todos los pacientes estudiados. * o $\Delta P \leq 0.05$; ** o $\Delta\Delta P \leq 0.01$; *** o $\Delta\Delta\Delta P \leq 0.001$. Símbolos: *, Células en suspensión vs cocultivo; Δ , Células tratadas con ATO vs células control.

Dado que el destino celular (apoptosis/supervivencia) está determinado por el balance entre los miembros antiapoptóticos y proapoptóticos de la familia Bcl-2⁸⁷, también determinamos los correspondientes ratios antiapoptótico/proapoptótico en células LLC cultivadas en suspensión y con estroma, y en ausencia o presencia de ATO. La Figura 48 muestra que los ratios Mcl-1/Bim, Mcl-1/Noxa, Bcl-xL/Bim y Bcl-xL/Bax, parejas bien establecidas⁹⁷, disminuían significativamente en presencia de ATO en las células en suspensión. Sin embargo, estos ratios eran significativamente más elevados en las células LLC cocultivadas con células estromales HS-27A (Figura 48A) o HS-5 (Figura 48B), respecto de las cultivadas en suspensión, y no disminuían en presencia de ATO. Aunque el ratio Mcl-1/Noxa también incrementaba tras el cocultivo de células LLC con células HS-5, este incremento no era significativo, quizás debido al tamaño muestral y/o a la gran dispersión observada en las muestras estudiadas (Figura 48B). Considerados conjuntamente, estos resultados sugieren que Mcl-1 y Bcl-xL podrían estar implicados en la resistencia de células LLC a ATO inducida por estroma de médula ósea.

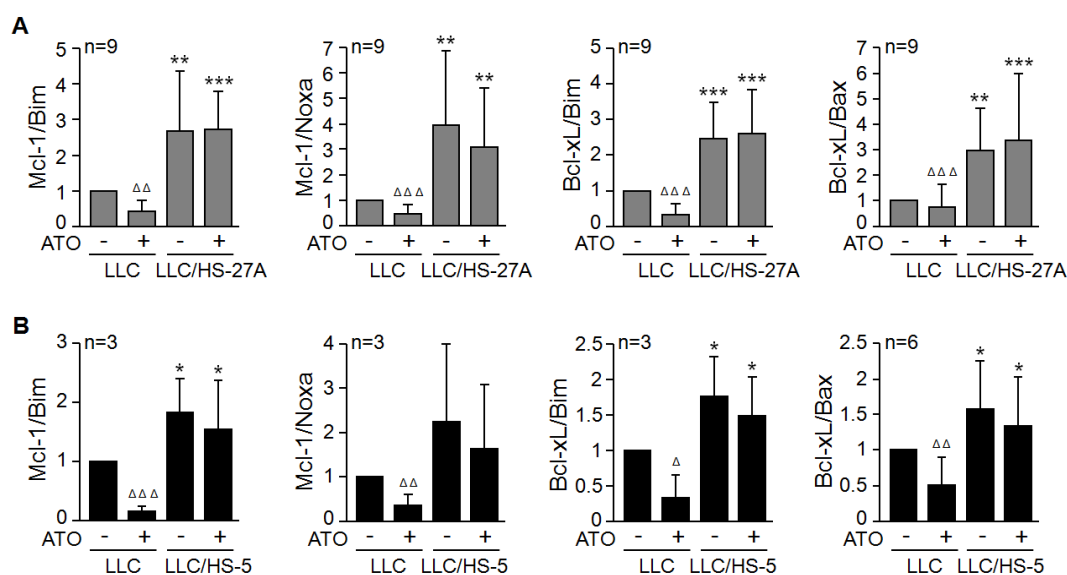


Figura 48. Ratios entre los miembros antiapoptóticos y proapoptóticos de la familia Bcl-2 en células LLC cocultivadas con estroma y efecto del ATO. (A, B) Se determinaron los ratios antiapoptótico/proapoptótico con los valores de expresión de las proteínas indicadas, cuya determinación se recoge en las Figuras 46 (A) y 47 (B). Se representan valores medios normalizados (células cultivadas en suspensión no tratadas = 1). * o $\Delta P \leq 0.05$; ** o $\Delta\Delta P \leq 0.01$; *** o $\Delta\Delta\Delta P \leq 0.001$. Símbolos: *, Células en suspensión vs cocultivo; Δ , Células tratadas con ATO vs células control.

4.5.5. Implicación de PI3K y PKC en la resistencia a ATO inducida por estroma

Para determinar cuáles de las rutas de supervivencia observadas estaban específicamente implicadas en la resistencia a ATO, analizamos, en primer lugar, el efecto de inhibir específicamente las quinasas y factores de transcripción previamente identificados. Para ello, células LLC, preincubadas con los correspondientes inhibidores específicos o con vehículo, se cultivaron con células HS-27A o HS-5, en presencia o ausencia de 2 μM ATO durante 24 h. La viabilidad de las células LLC no tratadas (controles) osciló entre el 40% y el 75% y se normalizó a 100. En ausencia de ATO, sólo la inhibición de PI3K o STAT3 tenía efecto en las células LLC cocultivadas con células HS-27A, reduciendo la viabilidad celular en un 17% y un 28%, respectivamente (Figura 49A). Sin embargo, en presencia de ATO, el bloqueo de PI3K, Akt, PKC, NF- κB o STAT3 revertía eficientemente la protección inducida por las células estromales, tanto HS-27A (Figura 49A) como HS-5 (Figura 49B), validando la implicación específica de estas

proteínas en la resistencia a ATO inducida por estroma. En contraste, la inhibición de MEK/ERK y de las quinasas de la familia Src (SFK), incluida Lyn, no afectaba a la viabilidad celular, a pesar de que estos inhibidores bloqueaban eficientemente la activación de estas quinasas (Figura 49C). Estos resultados sugerían que las vías de MEK/ERK y Lyn/SFK no están implicadas en la protección frente a ATO inducida por estroma. En base a esto, el inhibidor de MEK (UO126) se usó como control inactivo en los subsiguientes experimentos.

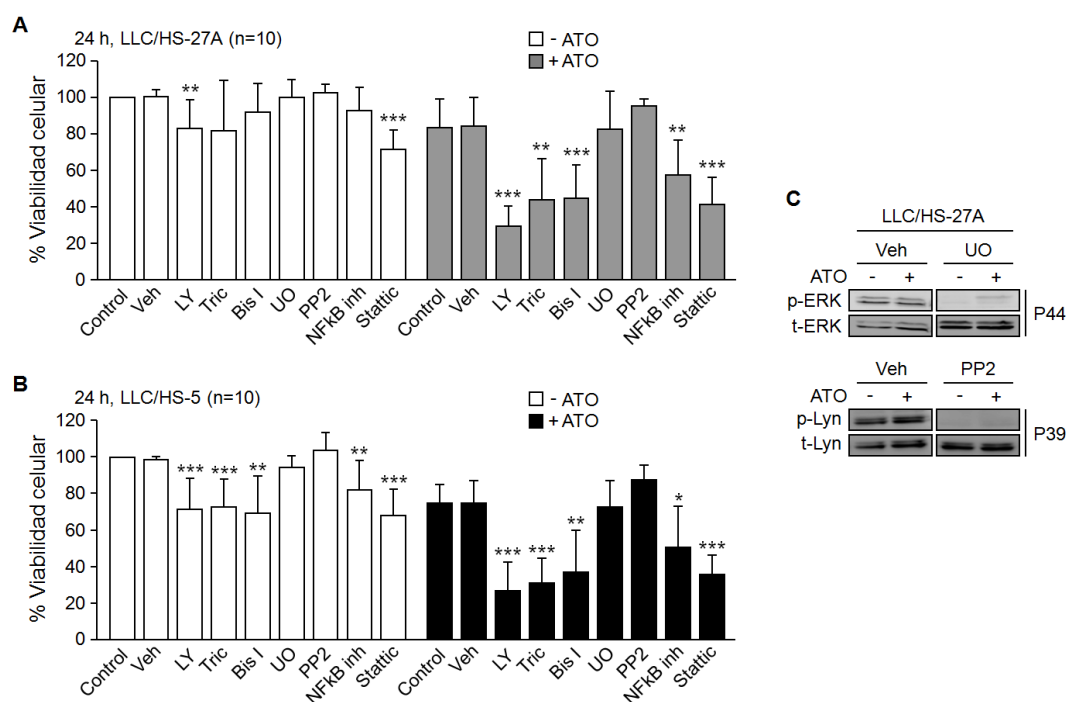


Figura 49. Las vías PI3K/Akt y PKC y los factores de transcripción NF-κB y STAT3 están implicados en la resistencia a ATO inducida por estroma en células de LLC. (A, B) Células LLC, preincubadas con o sin los indicados inhibidores (todos a 5 μM, excepto Stattic: 2.5 μM), se cultivaron con células estromales HS-27A (A) o HS-5 (B), en presencia o ausencia de 2 μM ATO. A las 24 h, se determinó la viabilidad celular por citometría de flujo. Se muestran los % de viabilidad medios normalizados (viabilidad de las células cocultivadas sin ningún tratamiento = 100). Vehículo (Veh): DMSO. Inhibidores: LY, LY294002 (pan-PI3K); Tric, Triciribina (Akt); Bis I, Bisindolilmaleimida I (pan-PKC); UO, UO126 (MEK); PP2 (quinasas de la familia Src), NF-κB inh, inhibidor de NF-κB (NF-κB); Stattic (STAT3). (C) Se determinaron mediante *Western blotting* los niveles de fosforilación de ERK y Lyn en células de LLC tratadas con 5 μM UO, 5 μM PP2 o vehículo antes de la incubación con o sin 2 μM ATO durante 24 h. *P ≤ 0.05; **P ≤ 0.01; ***P ≤ 0.001. Los símbolos * indican comparaciones con los respectivos controles .

Los resultados anteriores indicaban que la señalización a través de PI3K/Akt y PKC era esencial para la resistencia de células LLC a ATO inducida por estroma de

médula ósea. Las isoformas PI3K δ y PKC β de estas quinasas constituyen dianas terapéuticas de interés, y algunos de sus antagonistas se encuentran actualmente en ensayos clínicos ^{264,311-313}. Así, estudiamos si el bloqueo específico de estas isoformas poseía algún efecto en la resistencia a ATO observada. Para ello, células LLC, preincubadas con concentraciones crecientes de Idelalisib (inhibidor de PI3K δ) o Sotrastaurina (inhibidor de PKC β), se cultivaron con células HS-27A durante 24 h, en presencia o ausencia de 2 μ M ATO. La Figura 50 muestra que, en ausencia de ATO, estos inhibidores poseían un efecto limitado en la viabilidad de las células LLC cocultivadas con estroma. Sin embargo, en presencia de ATO, el pretratamiento con Idelalisib (Figura 50A) o Sotrastaurina (Figura 50B) reducía significativamente, y de forma dosis dependiente, la viabilidad de las células LLC cultivadas con células HS-27A. El bloqueo simultáneo de PI3K δ y PKC β no incrementaba significativamente el efecto individual de cada inhibidor (no mostrado).

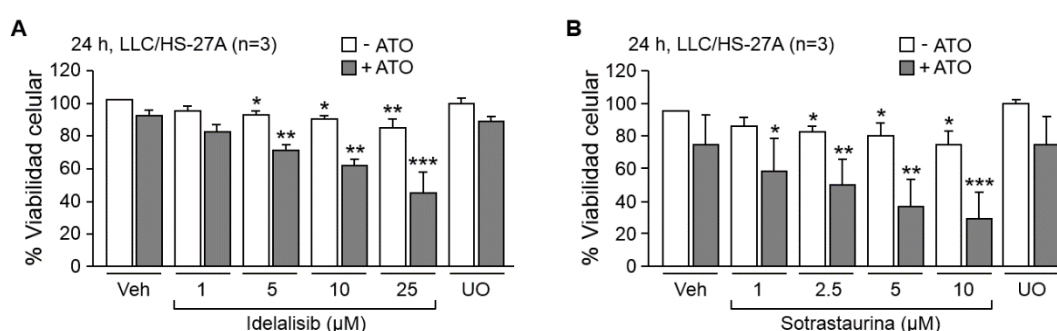


Figura 50. PI3K δ and PKC β están implicadas en la resistencia a ATO inducida por estroma en células LLC. (A, B) Células LLC, preincubadas con las indicadas concentraciones de Idelalisib (inhibidor de PI3K δ) (A) o Sotrastaurina (inhibidor de PKC β), se cultivaron con células HS-27A en presencia o ausencia de 2 μ M ATO. A las 24 h, se determinó la viabilidad celular por citometría de flujo. *P \leq 0.05; **P \leq 0.01; ***P \leq 0.001. Los símbolos * indican comparaciones con las células incubadas con vehículo (Veh).

Para confirmar el papel de PI3K δ y PKC β en la resistencia de células LLC a ATO inducida por estroma, así como para profundizar en el mecanismo molecular subyacente a esta resistencia, estudiamos si el tratamiento con Idelalisib y Sotrastaurina afectaba a la activación de Akt, NF- κ B y STAT3. En el caso de Akt, analizamos el residuo S473, cuya fosforilación puede ser dependiente o independiente (implicación de PKC) de la actividad

PI3K (Figura 45A, ³¹⁰). La Figura 51 muestra que la inhibición de PI3K δ y PKC β reducía significativamente la fosforilación de Akt en S473 inducida por estroma, tanto en presencia como en ausencia de 2 μ M ATO. El bloqueo de estas dos quinasas, también disminuía significativamente la activación de STAT3 y NF- κ B, esta última estudiada indirectamente a través del incremento en los niveles de expresión de su inhibidor I κ B α ³⁰⁹ (Figura 51). El bloqueo de la vía MEK/ERK con UO126 no tenía efecto (Figura 51). En conjunto, estos resultados confirmaban la implicación específica de PI3K δ y PKC β en la resistencia a ATO inducida por estroma y, concretamente, en la activación de Akt, NF- κ B y STAT3.

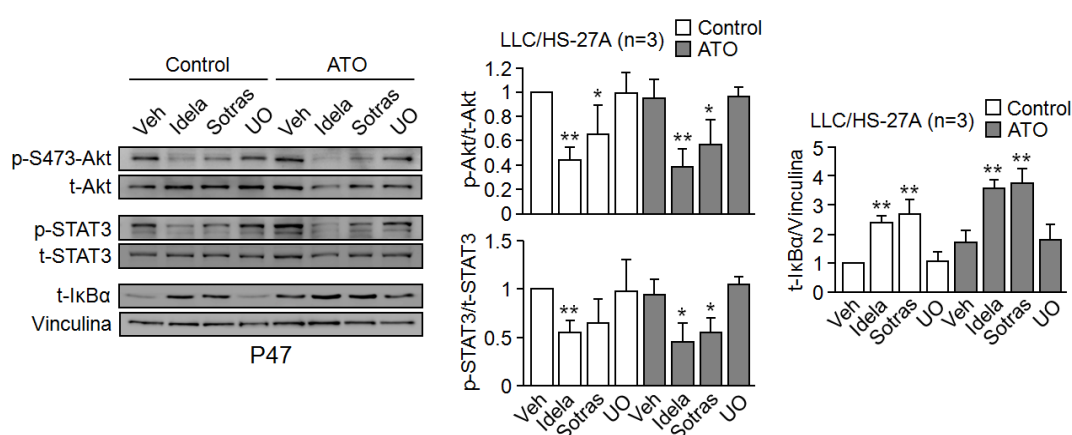


Figura 51. PI3K δ y PKC β están implicadas en la activación de Akt, NF- κ B y STAT3 en células de LLC cultivadas con estroma. Células LLC, preincubadas con 25 μ M Idelalisib (Idela), 10 μ M Sotrastaurina (Sotras), 5 μ M UO126 (UO) o vehículo (Veh), se cultivaron con células HS-27A en presencia o ausencia de 2 μ M ATO. A las 24 h, se analizó la fosforilación/expresión de las proteínas indicadas por *Western blotting*, usando los niveles totales de proteína específica o Vinculina como controles internos. Se muestran los resultados de un paciente representativo y los valores medios normalizados (Veh/-ATO = 1) de los tres pacientes analizados. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$. Los símbolos * indican comparaciones entre el tratamiento con Idela o Sotras y vehículo.

4.5.6. El bloqueo de las vías PI3K δ /PKC β -Akt-NF- κ B/STAT3 inhibe la inducción de Mcl-1 y la resistencia a ATO inducida por estroma en células LLC

A continuación, determinamos si PI3K δ y PKC β eran también responsables de la inducción de Mcl-1 y Bcl-xL por estroma. Para ello, células LLC, preincubadas con 25 μ M Idelalisib, 10 μ M Sotrastaurina, 5 μ M UO126 o vehículo, se cultivaron sobre células HS-27A durante 24 h, en presencia o ausencia de 2 μ M ATO. En la Figura 52 se observa que tanto Idelalisib como Sotrastaurina, pero no UO126, disminuían significativamente los

niveles de Mcl-1 en las células control, y este efecto era aún más marcado en las células tratadas con ATO. La expresión de Bcl-xL también se reducía significativamente en presencia de estos inhibidores, aunque sólo en presencia de ATO y a una menor extensión que Mcl-1, mientras que Bcl-2 no se modulaba (Figura 52). El descenso en la expresión de Mcl-1 y Bcl-xL en presencia de Idelalisib/ATO o Sotrastaurina/ATO correlacionaba con una disminución de la viabilidad celular (59% y 42% de reducción, respectivamente, no mostrado) similar a la inducida por ATO en células cultivadas en suspensión (53% de reducción) (no mostrado).

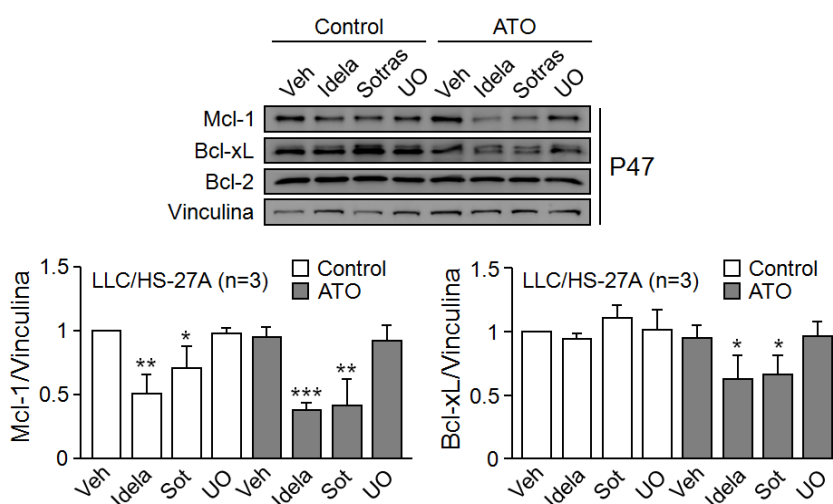


Figura 52. El bloqueo de PI3K δ o PKC β inhibe el aumento de Mcl-1 y Bcl-xL y la resistencia a ATO inducidos por estroma en células LLC. Se analizó mediante *Western blotting* la expresión de las proteínas indicadas en células LLC tratadas como se describe en la Figura 51. Se muestran los resultados de un paciente representativo y los valores medios normalizados (Veh/ATO = 1) de los tres pacientes analizados. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$. Los símbolos * indican comparaciones entre el tratamiento con Idela o Sotras y vehículo.

Para determinar si el efecto de Idelalisib y Sotrastaurina era similar al de los pan-inhibidores LY294002 y Bis I, respectivamente, células LLC, preincubadas 1 h con 5 μ M LY294002, Bis I, UO126 o vehículo, se cultivaron con células HS-27A durante 24 h, en presencia o ausencia de 2 μ M ATO. La Figura 53 muestra que, al igual que sucedía con Idelalisib y Sotrastaurina, en presencia de LY o Bis I, los niveles de Mcl-1 disminuían significativamente independientemente de la presencia de ATO, mientras que los de Bcl-

xL sólo lo hacían en presencia de este agente. Además, esta reducción correlacionaba con el descenso de la viabilidad inducido por LY/ATO o Bis/ATO (66% y 42% de reducción para LY y Bis I, respectivamente) que era similar al inducido por este agente en células LLC en suspensión (53% de reducción, no mostrado). En conjunto, estos resultados indicaban que los efectos de Idelalisib y Sotrastaurina eran muy similares a los producidos por los pan-inhibidores LY y Bis I, respectivamente, indicando que las isoformas PI3K δ y PKC β son las principales responsables de la modulación de Mcl-1 y Bcl-xL en células LLC cultivadas con estroma y, por consiguiente, de la resistencia a ATO observada en estas condiciones.

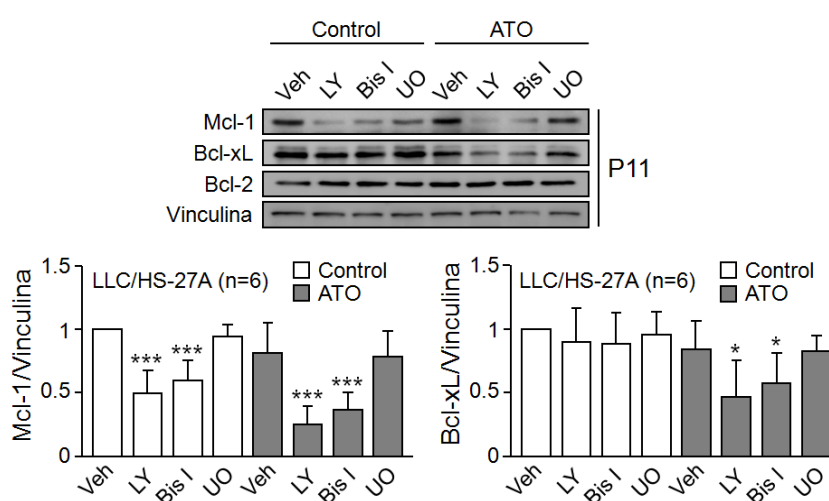


Figura 53. El efecto de los pan-inhibidores LY y Bis I sobre los niveles de Mcl-1 y Bcl-xL en células LLC cocultivadas con estroma es similar al producido por Idelalisib y Sotrastaurina. (A) Células LLC, preincubadas con LY, Bis I, UO (todos a 5 μ M) o vehículo (Veh), se cultivaron con células HS-27A en presencia o ausencia de 2 μ M ATO. A las 24 h, se analizó por *Western blotting* la expresión de las proteínas indicadas. Se muestran los resultados de un paciente representativo y los valores medios normalizados (Veh/-ATO = 1) de los seis pacientes analizados. * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$. Los símbolos * indican comparaciones entre el tratamiento con LY o Bis I y vehículo.

Para determinar si PI3K δ y PKC β estaban regulando Mcl-1 y Bcl-xL a través de los factores de transcripción NF- κ B y STAT3, analizamos si la inhibición de estos factores afectada a los niveles de Mcl-1 y Bcl-xL. En la Figura 54 se observa que el bloqueo de NF- κ B y STAT3 reducía significativamente los niveles de Mcl-1, particularmente en presencia de ATO, mientras que la expresión de Bcl-xL no variaba, sugiriendo mecanismos de

regulación alternativas o una mayor estabilidad de la proteína. Los niveles de Bcl-2 tampoco se modulaban en estas condiciones (Figura 54). La reducción de los niveles de Mcl-1 en presencia de NF- κ B inh/ATO y Stattic/ATO correlacionaba con un descenso de la viabilidad celular (38% y 46% reducción, respectivamente, no mostrado) similar al producido por ATO en células LLC en suspensión (54% de reducción, no mostrado). Estos resultados indicaban que la inducción de Mcl-1 a través de la activación de NF- κ B/STAT3 por la vía PI3K/PKC-Akt era el principal mecanismo subyacente a la resistencia de células LLC a ATO inducida por estroma de médula ósea.

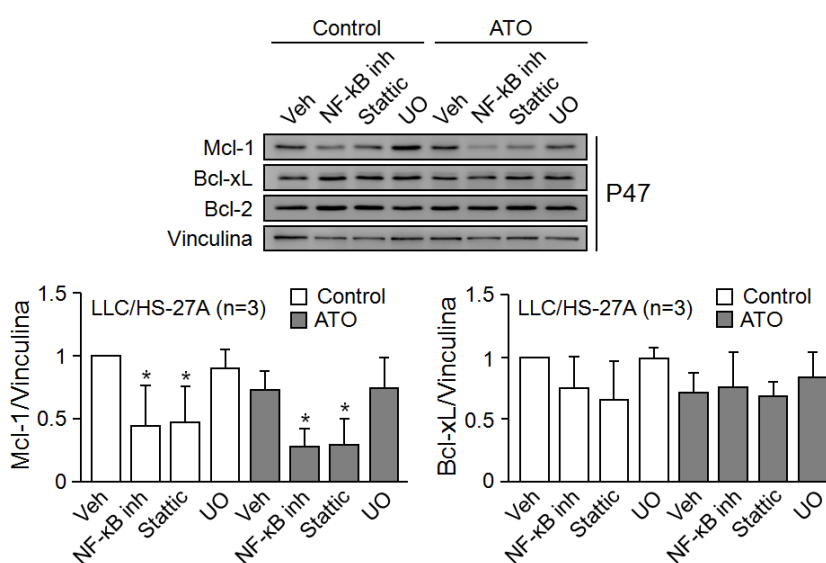


Figura 54. El bloqueo de NF- κ B y STAT3 inhibe el aumento de Mcl-1 y la resistencia a ATO inducidos por estroma en células LLC. (A) Células LLC, preincubadas con el inhibidor de NF- κ B (NF- κ B inh, 5 μ M), de STAT3 (Stattic, 2.5 μ M), UO126 (5 μ M) o vehículo (Veh), se cultivaron con células HS-27A en presencia o ausencia de 2 μ M ATO. A las 24 h, se analizó por *Western blotting* la expresión de las proteínas indicadas. Vinculina: control interno. Se muestran los resultados de un paciente representativo y los valores medios normalizados (Veh/-ATO = 1) de los tres pacientes analizados. * P \leq 0.05. Los símbolos * comparan el tratamiento con NF- κ B inh o Stattic y vehículo.

4.5.7. El silenciamiento de Mcl-1 revierte la resistencia a ATO inducida por estroma en células LLC

Para confirmar el papel clave de Mcl-1 en la resistencia de células LLC a ATO inducida por estroma, silenciamos Mcl-1 en las células LLC, mediante nucleofección de un siRNA específico para la proteína o un siRNA control, antes del cocultivo con células HS-

27A y del tratamiento con 2 μ M ATO. Las células LLC transfectadas con el siRNA control se cultivaron también en suspensión en presencia o ausencia de 2 μ M ATO y se usaron como controles del efecto basal del ATO y del propio proceso de nucleofección. La Figura 55A muestra que, en ausencia de ATO, el siRNA de Mcl-1 reducía la expresión de Mcl-1 en un 50% en comparación con los niveles de proteína en las células transfectadas con el siRNA control. En presencia de ATO, la expresión de Mcl-1 permanecía sin cambios en las células transfectadas con el siRNA control, pero se reducía aún más (70% de reducción) en las células transfectadas con el siRNA de Mcl-1 (Figura 55A).

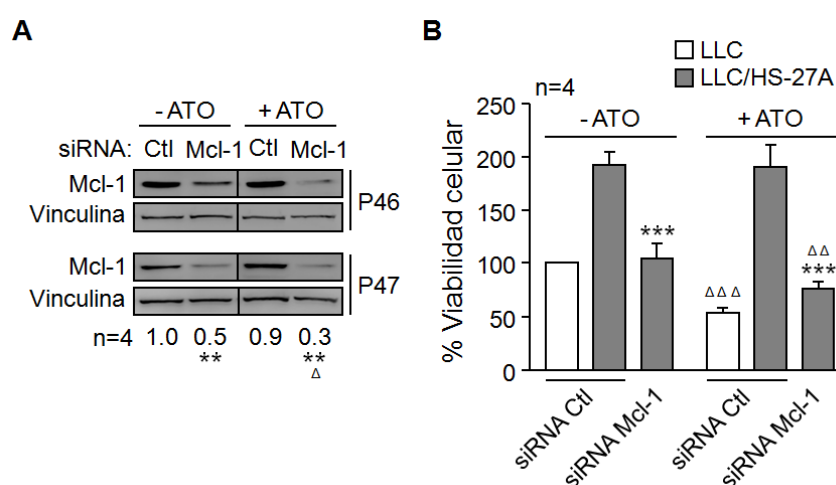


Figura 55. Mcl-1 juega un papel clave en la resistencia a ATO inducida por estroma. (A, B) Células LLC nucleofectadas con un siRNA específico para Mcl-1 o un siRNA control (Ctl) se cultivaron en suspensión o sobre células HS-27A. A las 16 h, se adicionó 2 μ M ATO y las células se incubaron durante 24 h adicionales. Se analizó la viabilidad celular mediante citometría de flujo (B) y la expresión de Mcl-1 mediante *Western blotting*. Vinculina: control interno (A). Se muestran los resultados del *Western blot* de dos muestras representativas; los números indican los valores de expresión medios normalizados (siRNA Ctl/-ATO = 1) de las cuatro muestras estudiadas (A). También se muestran los % de viabilidad medios normalizados, considerando 100 la viabilidad de las células nucleofectadas con siRNA Ctl y cultivadas en suspensión sin ATO. ** o $\Delta\Delta P \leq 0.01$; *** o $\Delta\Delta\Delta P \leq 0.001$. Los símbolos son: *, Células transfectadas con el siRNA control vs células transfectadas con el siRNA de Mcl-1; Δ , Células tratadas con ATO respecto de los correspondientes controles.

Determinaciones paralelas de la viabilidad celular en las mismas muestras revelaron que el cocultivo con células HS-27A incrementaba la viabilidad de las células LLC transfectadas con el siRNA control aproximadamente 2 veces, tanto en presencia como en ausencia de ATO, en comparación con la viabilidad de las células en suspensión, que se consideró 100 (Figura 55B). Sin embargo, la transfección con el siRNA de Mcl-1

reducía la viabilidad de las células cultivadas sobre estroma a los niveles alcanzados por las células en suspensión, revirtiendo casi completamente el efecto de supervivencia inducido por el estroma, tanto en presencia como en ausencia de ATO (Figura 55B). Estos resultados establecían que Mcl-1 juega un papel fundamental en la resistencia a ATO inducida por estroma de médula ósea.

La Figura 56 muestra un esquema representativo del mecanismo de resistencia a ATO inducido por estroma de médula ósea en células LLC, así como los puntos de actuación de los inhibidores Idelalisib y Sotrastaurina.

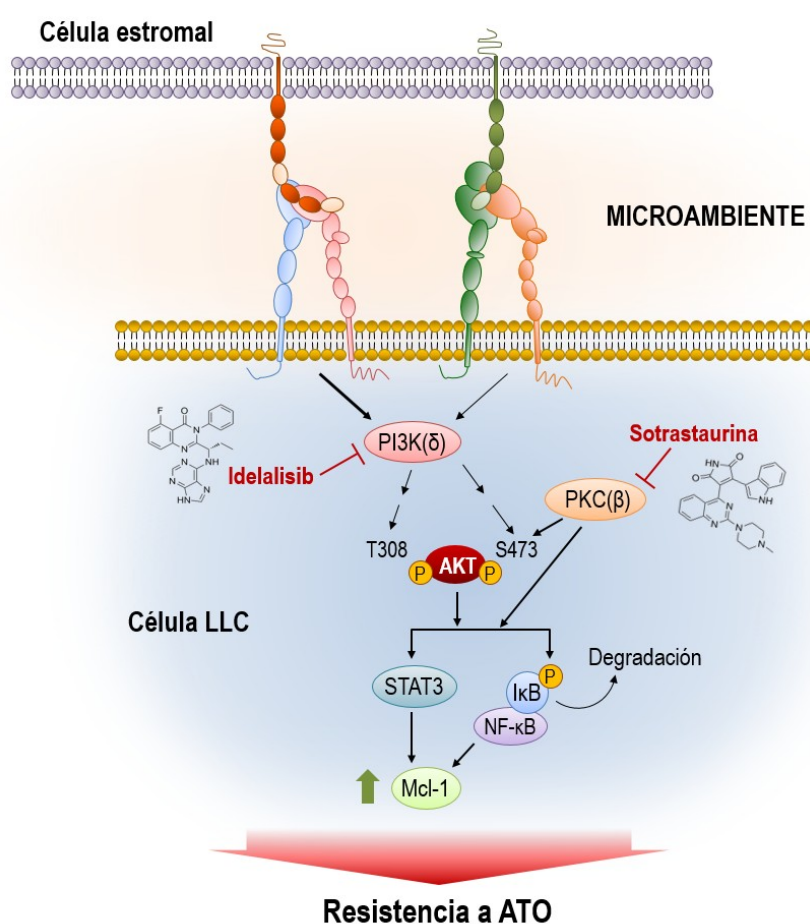


Figura 56. Mecanismos subyacentes a la resistencia a ATO inducida por estroma y estrategias para revertirla. Representación esquemática de los mecanismos moleculares responsables de la protección frente al efecto citotóxico del ATO inducida por estroma de médula ósea en células LLC. También se muestran los puntos de actuación de Idelalisib y Sotrastaurina, cuya acción bloquea el efecto protector observado.

Discusión

5. DISCUSIÓN

A pesar de los avances realizados en los últimos años, la LLC continúa siendo una enfermedad incurable y, en muchos casos, mortal ^{4,273,274}. Por ello, es esencial continuar la búsqueda de nuevos tratamientos y dianas terapéuticas, así como comprender más y mejor la enfermedad. En este sentido, el ATO, un fármaco aprobado para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda, es capaz de inducir eficientemente apoptosis en todos los casos de LLC, incluidos los de mal pronóstico ^{276,314}. En esta Tesis Doctoral, hemos analizado en profundidad la respuesta de células LLC a ATO, describiendo por primera vez: 1) el perfil de expresión génica de células de LLC en respuesta a ATO; 2) un nuevo papel de la MMP-9 en la resistencia de células LLC a la apoptosis inducida por agentes citotóxicos, a través de la modulación de las proteínas de la familia Bcl-2; 3) el mecanismo de resistencia a ATO inducido por estroma de médula ósea en células LLC, que implica regulación al alza de Mcl-1 mediada por activación de la vía PI3Kδ/PKCβ→Akt→NF-κB/STAT3.

El perfil de expresión génica de células de LLC (línea celular MEC-1) en respuesta a ATO es consistente con una respuesta antioxidante y de resistencia a este agente. De hecho, los genes más fuertemente inducidos por el tratamiento eran *HMOX1* y varias metalotioneínas, con funciones de respuesta a estrés oxidativo y detoxificación bien establecidas ^{315,316}. Previamente, otros autores han descrito que la exposición a compuestos de arsénico induce genes relacionados con estrés, resistencia o muerte en varios tipos celulares ^{284,317-319}. En nuestro estudio, también se inducían genes relacionados con la regulación de la apoptosis, incluyendo los codificantes de HMOX-1 y MMP-9. La inducción de HMOX-1 por arsénico está bien documentada y se ha asociado con una respuesta celular al daño oxidativo inducido ^{280-283,320}. Sin embargo, la naturaleza pro/antioxidante o pro/antiapoptótica de esta respuesta no está clara. De hecho, Ryter y Tyrrel propusieron que la HMOX-1 puede desempeñar funciones tanto pro como antioxidantes ³²¹ y, por consiguiente, de forma indirecta, pro o antiapoptóticas. Nuestros

resultados, aunque preliminares, muestran que, la HMOX-1 favorece el efecto citotóxico del ATO, desempeñando, por tanto, un papel proapoptótico en la respuesta de células LLC a este agente. La inducción de MMP-9 era un efecto más inesperado, y no descrito previamente en respuesta a ATO, aunque sí a otros agentes, como las radiaciones ionizantes, en varios tipos celulares ³²²⁻³²⁴. También existen estudios que describen una inhibición de MMP-9 en respuesta a agentes antitumorales. Por ejemplo, el ATO inhibe la expresión de MMP-9 en tumores sólidos, reduciendo el potencial invasivo estimulado por radiación ionizante ³²⁵. Asimismo, la Talidomida bloquea la inducción de MMP-9 mediada por interacciones $\alpha_4\beta_1$ /Fibronectina en varios modelos celulares de neoplasias de células B ³²⁶. Esta diferente modulación (inducción o inhibición) de la expresión de MMP-9 en respuesta a agentes terapéuticos, probablemente, sea un reflejo del papel dual que desempeñan esta y otras MMPs en la apoptosis ³⁰⁰.

Hemos estudiado si la MMP-9 estaba implicada en la respuesta de células LLC a ATO, y para comparar, Fludarabina. En presencia de estos agentes apoptóticos, además de inducirse su expresión a nivel transcripcional, MMP-9 se localizaba en la superficie celular. Ambos efectos formaban parte de una respuesta temprana al tratamiento, precediendo a la detección de la apoptosis, pero estando necesariamente asociados a la misma. De hecho, el bloqueo de la apoptosis con el pan-inhibidor de caspasas Z-VAD-fmk prevenía la inducción de MMP-9 y su localización en la superficie celular en respuesta a ATO. La asociación de la MMP-9 a la membrana celular era específica, ya que estaba mediada por la integrina $\alpha_4\beta_1$ y CD44, dos receptores de MMP-9 en LLC previamente descritos ²³⁴. Además, la población celular con mayor expresión de MMP-9 en membrana en respuesta a ATO coincidía con la de células apoptóticas tempranas, sugiriendo que la MMP-9 permanece mayoritariamente unida a la superficie de estas células tras la secreción y modula la respuesta apoptótica. Dado que la MMP-9 y otras MMPs pueden desempeñar funciones tanto pro como antiapoptóticas ^{228,300}, una interpretación de nuestros resultados podría ser que la inducción de MMP-9 favorece el proceso apoptótico actuando sobre sustratos o vías apropiados. Una explicación alternativa es que la MMP-9

antagoniza la respuesta apoptótica a compuestos citotóxicos, representando, por tanto, un mecanismo compensatorio. Apoyando esta explicación, varios estudios previos han descrito mecanismos compensatorios o de supervivencia inducidos por MMP-9 en diferentes sistemas celulares. Por ejemplo, en células de melanoma y de carcinoma de mama, la inhibición de MMP-9 (o MMP-2) incrementa la apoptosis inducida por ligandos de receptores de la superfamilia del TNFR ³²⁷. Asimismo, el bloqueo de MMP-9 sensibiliza células de adenocarcinoma de colon a ésteres de forbol ³²⁸ y células de glioma a la apoptosis inducida por Fas ³²⁹. En otro estudio llevado a cabo en un modelo murino de xenotransplante, el tratamiento de células de carcinoma de pulmón con Paclitaxel incrementaba la expresión de MMP-9 y la metástasis tumoral, y estos efectos eran bloqueados con un inhibidor de MMP-9 ³³⁰.

Usando dos aproximaciones diferentes, hemos obtenido resultados que apoyan fuertemente un papel antiapoptótico de la MMP9 en células de LLC en respuesta a ATO y Fludarabina. Primero, la mayor viabilidad en presencia de ATO y Fludarabina observada en células LLC cultivadas sobre MMP-9 respecto de células cultivadas sobre BSA. Este papel antiapoptótico de la MMP-9 también se observó en cocultivos de células LLC y células estromales de médula ósea, donde el bloqueo de MMP-9 con un Ac específico revertía completamente la resistencia a ATO inducida por estroma. En este sentido, previamente en el laboratorio, hemos descrito que la MMP-9 está implicada en el efecto protector frente a la apoptosis espontánea ejercido por el estroma en células LLC *in vitro* ²²⁰. Otros investigadores han demostrado la implicación de varias proteínas (integrinas, quimioquinas, proteínas de la familia Bcl-2) en la resistencia a ciertos agentes terapéuticos inducida por estroma ^{145,331,332}. Nosotros mostramos ahora, por primera vez, que las células estromales de médula ósea inducen resistencia a ATO en células LLC y que la MMP-9 juega un importante papel en esta resistencia.

Una evidencia adicional del papel prosupervivencia de la MMP-9 en respuesta a compuestos citotóxicos procede del hecho de que los transfectantes MMP-9-MEC-1, que expresan MMP-9 a niveles similares a las células LLC primarias y representan un sistema

óptimo para estudiar las funciones de esta proteína, mostraban consistentemente una mayor viabilidad en presencia de ATO y Fludarabina que los correspondientes controles (células Mock-MEC-1). Este efecto estaba mediado por MMP-9, ya que su silenciamiento revertía la ventaja de supervivencia de las células MMP-9-MEC-1, incrementando su sensibilidad a ATO hasta niveles similares a los observados en las células control. Se desconoce si los efectos de supervivencia ejercidos por la MMP-9 sobreexpresada en las células MEC-1 y la MMP-9 inducida por estímulos apoptóticos en células LLC primarias implican los mismos o diferentes mecanismos, pero nuestros resultados apoyan fuertemente la implicación de MMP-9 en un mecanismo de supervivencia compensatorio en LLC.

Hemos estudiado también las bases moleculares subyacentes al observado efecto de resistencia a fármacos inducido por MMP-9, centrándonos en las proteínas de la familia Bcl-2, reguladores de la apoptosis bien establecidos ⁸⁷. La sobreexpresión de varios miembros antiapoptóticos de esta familia se ha implicado consistentemente en la resistencia a la apoptosis espontánea e inducida por citotóxicos en LLC ^{80,270}. Además, se ha demostrado que la acción apoptótica del ATO implica disminución de los niveles de la proteína antiapoptótica Mcl-1 en varios sistemas celulares, incluyendo células de mieloma múltiple ³³³ y de leucemia mieloide aguda ³³⁴ y, en muchos casos, inducción de las proteínas antiapoptóticas Bax y/o Bim ^{333,335,336}. Nuestros resultados muestran claramente que la MMP-9, tanto en los transfectantes de células MEC-1 como en las células LLC primarias, no sólo prevenía la disminución de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Mcl-1, Bcl-xL, Bcl-2) en respuesta a ATO, sino que también aumentaba su expresión respecto de los niveles basales. Dado que esto iba acompañado de una disminución (o no alteración) de los niveles de varias proteínas proapoptóticas (Bim, Bax), el balance antiapoptótico/proapoptótico resultante era elevado en presencia de MMP-9. Previamente, en el laboratorio, demostramos que la protección de células LLC frente a la apoptosis espontánea inducida por MMP-9 implica la regulación al alza de Mcl-1, pero no de Bcl-xL ni Bcl-2 ²²⁰. Ahora mostramos que, en presencia de ATO, MMP-9 modula varias proteínas

de la familia Bcl-2 y, esta modulación es probablemente la responsable del efecto de supervivencia observado. En este sentido, nuestros resultados también muestran que Mcl-1, una proteína antiapoptótica muy importante en LLC ³⁰⁶, no se disociaba de Bim en respuesta a ATO en células MMP-9-MEC-1, previniendo así la acción proapoptótica de Bim. Además, Mcl-1 y Bcl-xL también se inducían por MMP-9 en respuesta a Fludarabina, en concordancia con un trabajo previo de nuestro grupo que describe la implicación de estas proteínas en la resistencia a Fludarabina, inducida por interacciones integrina $\alpha_4\beta_1$ /Fibronectina, en células LLC ³³⁷. Como sucedía en el caso del ATO, MMP-9 también elevaba el balance entre los miembros anti y proapoptóticos de la familia Bcl-2 en presencia de Fludarabina, sugiriendo que el efecto protector de la MMP-9 frente a la apoptosis podría ser una respuesta general de las células LLC frente a compuestos citotóxicos.

Habiendo establecido el papel de la MMP-9, presente consistentemente en los nichos de la LLC ³³⁸, en la resistencia de células LLC a agentes citotóxicos (ATO, Fludarabina), estudiamos la influencia de otros componentes de este microambiente. Dada la importancia del compartimento de médula ósea en la patogénesis de la LLC ¹⁴⁷, y puesto que las células estromales (BMSC) son en principal componente celular de este microambiente y juegan un papel crucial en la LLC ^{126,131,145,146}, nos propusimos estudiar la influencia del estroma de médula ósea en la respuesta de células LLC a ATO. Cocultivando células LLC con varios tipos de BMSC, comprobamos resultados previos mostrados en la presente tesis, que indicaban que el estroma protegía las células LLC del efecto citotóxico del ATO. La protección frente a la apoptosis espontánea ^{128,131,141} e inducida por varios agentes citotóxicos ^{128,131,161} mediada por BMSC en células LLC ha sido ampliamente estudiada por otros autores. Por ejemplo, Kurtova y colaboradores demostraron que células estromales de diverso origen protegen a las células LLC de la apoptosis espontánea e inducida por Fludarabina ¹⁶¹.

La protección frente a ATO mediada por BMSC era dependiente de interacciones $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 y $\alpha_L\beta_2$ /ICAM-1¹⁴¹, ya que el bloqueo con Acs específicos de las integrinas α_4

o β_2 en las células LLC restauraba la sensibilidad a ATO en presencia de estroma. Existe una sólida evidencia de que el contacto directo célula-célula, mediado por las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_L\beta_2$ ¹⁴⁶, es esencial para el efecto protector frente a la apoptosis, espontánea e inducida, ejercido por el estroma en células LLC ^{131,141,146,161}. Además de las interacciones directas, nuestros resultados indican que ciertos factores solubles secretados por las células estromales también contribuyen a la observada resistencia a ATO. En el presente trabajo no hemos caracterizado los factores concretos implicados en el efecto protector observado, pero se sabe que las BMSC producen grandes cantidades de CXCL12 ¹⁶⁹, VEGF ¹⁷² y MMP-9 ^{220,233}, entre otros, y que estos factores promueven la supervivencia de las células LLC. Además, se ha descrito que una combinación fisiológica de citoquinas (IL-2, -6, -10, -12, -15, -21, BAFF y APRIL) protege a las células LLC de la apoptosis espontánea *in vitro* ³³⁹.

En la actualidad, está bien establecido que el cocultivo de células LLC con células estromales conduce a la activación recíproca de varias vías de señalización que, en el caso de las células LLC, promueve supervivencia y resistencia a la terapia ^{302,340}. Nuestros resultados muestran que el cocultivo con células estromales inducía activación en las células LLC de las vías PI3K/AKT, MEK/ERK, PKC y Lyn, así como de los factores de transcripción NF- κ B y STAT3. Usando inhibidores específicos, observamos que PI3K, Akt, PKC, NF- κ B y STAT3, pero no ERK o Lyn, estaban implicados en la resistencia a ATO inducida por BMSC. En concordancia con estos resultados, las vías de PI3K/Akt ^{164,341-348}, MEK/ERK ^{164,183}, NF- κ B ^{164,180,184,185,349,350} y PKC ^{341,351} se han implicado consistentemente en la resistencia a la apoptosis espontánea e inducida por citotóxicos en células LLC ³⁵¹. Más concretamente, se ha descrito que la vía PI3K/Akt promueve supervivencia de estas células en respuesta a una amplia variedad de estímulos, incluyendo activación del BCR ¹⁵⁸, CD154 ¹⁶⁴, VCAM-1 ²²⁰, CCL19 y CCL21 ³⁵². Asimismo, en respuesta a TPA e IL-4 ³⁴¹ y señalización vía BCR ³⁵³, PKC media señales de supervivencia en células LLC; y NF- κ B lo hace en respuesta a señalización por BCR ¹⁵⁹ o CD40 ^{164,180,184}, exposición a citoquinas (BAFF, APRIL ¹⁶⁸) y cocultivo con células estromales ¹⁶⁴, entre otros. La activación de

STAT3 también está implicada en la supervivencia de células LLC en respuesta a varios estímulos, incluyendo MMP-9²²⁰, IL-6³⁵⁴ y activación del BCR³⁵⁵.

En cuanto a la vía MEK/ERK en LLC, se ha descrito que transmite señales de supervivencia en respuesta a CXCL12^{167,168}, sin embargo, no parece ejercer un efecto en la resistencia a ATO inducida por estroma, según nuestros resultados. En concordancia con esto, se ha descrito que la vía MEK/ERK no es necesaria para la protección de células LLC frente a la apoptosis espontánea *in vitro*¹⁵⁸. Por el contrario, Crassini y colaboradores demostraron que la señalización a través de MEK/ERK es importante en la resistencia de células LLC a Fludarabina observada en condiciones que mimetizan el microambiente tumoral³⁵⁶. Esta diferencia con nuestros resultados probablemente radique en las diferencias entre el mecanismo de acción del ATO y la Fludarabina. Además, esta contraposición de resultados, sugiere que las vías de supervivencia responsables de resistencia en LLC pueden ser diferentes entre terapias, apoyando el uso de terapias combinadas que, de hecho, es la estrategia terapéutica más empleada en la actualidad en el tratamiento de la LLC y otras neoplasias.

Lyn se ha implicado consistentemente en la protección frente a la apoptosis espontánea de células LLC^{220,357-359}. Por ejemplo, en nuestro laboratorio demostramos que la protección frente a la apoptosis espontánea inducida por MMP-9 implica activación de la vía Lyn/STAT3 e incremento en la expresión de Mcl-1²²⁰. Asimismo, la inhibición de las quinasas de la familia Src con Dasatinib induce apoptosis de células LLC, preferentemente en aquellos casos de mal pronóstico³⁶⁰. Nuestros resultados indican que Lyn no estaba implicado en la resistencia de células LLC a ATO inducida por estroma, pero esto no contradice los estudios anteriores, ya que éstos hacen referencia a apoptosis espontánea (no inducida) y son llevados a cabo en ausencia de estroma.

Hemos estudiado, también, la implicación de varias proteínas de la familia Bcl-2 en la resistencia de células LLC a ATO inducida por estroma. Nuestros resultados muestran que el cocultivo con células estromales induce la expresión de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-xL, pero no de Bcl-2, en las células LLC, e impide la inducción

de las proteínas proapoptóticas Bim y Noxa en respuesta a ATO. Burger y colaboradores han descrito recientemente un incremento de Mcl-1, pero no de Bcl-xL, en células LLC en cocultivo con estroma de médula ósea ³⁶¹. Esta disparidad en los resultados probablemente sea debida al uso de modelos de estroma diferentes, así como a divergencias en las condiciones particulares de realización de los experimentos. Concretamente, estos autores emplean las células estromales NKtert y ratios de cocultivos 1:100 (célula LLC:célula estromal), mientras que en nuestro caso empleamos células HS-5, HS-27A o estroma primario y ratios de cocultivo 1:5-1:10. Particularmente, un ratio de cocultivo demasiado alto puede limitar las interacciones entre las células LLC y las células estromales dificultando la observación de algunos efectos.

Las células LLC cocultivadas con estroma mostraban, también, ratios Mcl-1/Bim, Mcl-1/Noxa, Bcl-xL/Bim y Bcl-xL/Bax, parejas bien establecidas ⁹⁷, más elevados que las células LLC cultivadas en suspensión, lo que apoyaba la resistencia a la apoptosis observada en estas condiciones. En concordancia con esto, se ha descrito que el balance Mcl-1/Bim es determinante en la respuesta a ATO de células de mieloma ³³³ y en la resistencia a Fludarabina de células de leucemia linfocítica aguda y crónica ³⁶². Asimismo, el ratio Mcl-1/Noxa determina resistencia al mimético de BH3 ABT-737 en carcinoma de piel de células escamosas ³⁶³ y en células de LLC estimuladas vía CD40/CD154 ³⁶⁴. Este ratio además, regula la susceptibilidad a la apoptosis en células T bajo condiciones de limitación de glucosa ³⁶⁵.

Puesto que la señalización a través de las vías PI3K/Akt y PKC era esencial para la resistencia de células LLC a ATO inducida por estroma, también estudiamos, qué isoformas específicas de estas quinasas eran responsables de la observada resistencia, centrándonos en PI3K δ y PKC β por su particular relevancia en LLC. La expresión de PI3K δ está restringida mayoritariamente al sistema hematopoyético ³⁶⁶, constituyendo un paradigma de diana específica. Además, está constitutivamente activa en las células LLC y es esencial en la integración y transducción de señales procedentes del microambiente, así como en la proliferación, supervivencia, adhesión y migración de las células LLC ²⁶².

Por su parte, PKC β está constitutivamente activa y sobreexpresada en las células LLC respecto de las células B normales ³⁶⁷ y, contribuye a su supervivencia al jugar un importante papel en la señalización a través del BCR ^{310,341,368,369}. Además, se ha descrito que PKC β es esencial en la supervivencia de las células LLC en presencia de células estromales ³⁷⁰, así como, en el desarrollo y progresión de la LLC ³⁷¹.

Utilizando los inhibidores Idelalisib (PI3K δ) y Sotrastaurina (PKC β), actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de la LLC y otras neoplasias ^{266,308-310}, hemos visto que las isoformas de PI3K δ y PKC β son las principales responsables del efecto protector frente a ATO mediado por estroma. De hecho, el bloqueo de ambas quinasas revertía la inducción de Mcl-1 y Bcl-xL por estroma, restableciendo la sensibilidad a ATO. Este efecto era análogo al obtenido con los pan-inhibidores LY294002 y Bis I, respectivamente, apoyando la implicación específica de PI3K δ y PKC β en la resistencia a ATO inducida por estroma. El hecho de que no observamos un efecto sinérgico o aditivo cuando combinamos Idelalisib y Sotrastaurina sugiere que PI3K δ y PKC β son activadas de forma independiente convergiendo posteriormente en una misma ruta de señalización. Apoyando esta explicación, el bloqueo de estas quinasas impedía la fosforilación de Akt en S473, así como la activación de los factores de transcripción NF- κ B y STAT3, sugiriendo que la activación de Akt es el punto de convergencia de la ruta de supervivencia inducida por estroma en células LLC. De hecho, ambas quinasas pueden fosforilar directa o indirectamente Akt en los residuos T308 y S473 ^{310,372}, así como activar los factores de transcripción NF- κ B y STAT3 ^{164,368,373,374}.

En nuestro estudio, hemos considerado Idelalisib y Sotrastaurina como inhibidores específicos de PI3K δ y PKC β , respectivamente. La selectividad de Idelalisib está ampliamente contrastada ³¹³, pero Sotrastaurina se ha descrito como un inhibidor general de PKC, que bloquea eficientemente PKC α , β y θ , y en menor medida la PKC η , δ , ϵ , careciendo de actividad contra la PKC ζ ²⁶⁴. Sin embargo, puesto que las células LLC expresan mayoritariamente PKC β II y PKC ζ ^{367,375}, y puesto que esta última no es diana de Sotrastaurina, podemos asumir que, a dosis moderadas como las empleadas en nuestros

experimentos, este inhibidor está actuando mayoritariamente sobre PKC β en este sistema celular ²⁶⁴.

El empleo de inhibidores específicos de NF- κ B y STAT3 también bloqueaba el incremento de Mcl-1, pero no de Bcl-xL, en presencia de estroma. A pesar de que los niveles de Bcl-xL se mantuvieron elevados, estos inhibidores restauraban la sensibilidad de las células LLC a la apoptosis inducida por ATO, apoyando un papel principal de Mcl-1 en la resistencia a este compuesto inducida por estroma. Estos resultados apoyan también una regulación transcripcional de Mcl-1 a través de NF- κ B y STAT3. En este sentido, se ha descrito que STAT3 induce Mcl-1 a nivel transcripcional en células de leucemia mieloide crónica en respuesta a IL-6 ³⁷⁶ y VEGF ¹⁷⁴. Además, se ha sugerido que la activación de STAT3 es absolutamente necesaria para la supervivencia de macrófagos mediada por Mcl-1 ³⁷⁷. En células de LLC, STAT3 induce Mcl-1 en respuesta a la señalización antiapoptótica inducida por MMP-9 ²²⁰. Asimismo, la inducción Mcl-1 a través de NF- κ B media supervivencia en células de carcinoma de esófago de células escamosas ³⁷⁸, y la inhibición de NF- κ B por el inhibidor de CDKs CR8 reduce los niveles de Mcl-1 y XIAP e induce apoptosis de células de LLC ³⁷⁹.

Mediante experimentos de silenciamiento génico, hemos confirmado que la inducción de Mcl-1 por estroma es el principal mecanismo responsable de la protección frente a la apoptosis espontánea e inducida por ATO en células de LLC. La importancia de Mcl-1 en la supervivencia de las células LLC está bien documentada ^{114,153,158,159,220,361,380}. Por ejemplo, se ha descrito que diferentes tipos de células estromales inducen y mantienen elevados los niveles de Mcl-1 en células LLC y protegen a las mismas de la apoptosis espontánea e inducida por F-ara-A ¹⁴⁵ y Fludarabina ¹⁶¹. Además, el bloqueo de ese Mcl-1 con AT-101 sensibiliza a las células LLC frente a la apoptosis espontánea e inducida por Fludarabina ¹⁶¹. Asimismo, Maritoclax, un inhibidor específico de Mcl-1, induce apoptosis de células de leucemia mieloide aguda ³⁸¹ e incrementa la eficacia de ABT-737 en células de mieloma ³⁸².

En resumen, nuestro estudio es el primero en describir el perfil global de expresión génica inducido por ATO en células de LLC, así como un nuevo papel de la MMP-9 en la resistencia de células LLC a la apoptosis inducida por agentes citotóxicos, como ATO y fludarabina, a través de la modulación del balance entre los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2. También hemos descrito por primera vez el mecanismo completo de resistencia a ATO inducido por estroma de médula ósea, que implica la regulación positiva de Mcl-1 a través de la activación de la vía $PI3K\delta/PKC\beta \rightarrow Akt \rightarrow NF-\kappa B/STAT3$. El conocimiento de los mecanismos responsables de la resistencia a agentes citotóxicos en células LLC es esencial para el desarrollo de estrategias para revertirlos y, por consiguiente, terapias más eficientes. En este sentido, el bloqueo de MMP-9 y de las quinasas $PKC\beta$ y $PI3K\delta$, en combinación con otras estrategias o agentes terapéuticos, podría mejorar la respuesta a los tratamientos en pacientes de LLC.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1.- En células de LLC, ATO induce un perfil de expresión génica que refleja una respuesta antioxidante y de resistencia a este agente, destacando la inducción de HMOX-1 y MMP-9.

2.- El ATO induce la expresión de HMOX-1 (mRNA y proteína) en células de LLC, y esta proteína parece que estar favoreciendo la apoptosis inducida por este compuesto.

3.- ATO induce la transcripción de MMP-9 y su localización en la membrana de células LLC apoptóticas tempranas, en correlación con el proceso apoptótico. La Fludarabina produce los mismos efectos siendo, por tanto, una respuesta celular general a compuestos citotóxicos.

4.- La MMP-9 aislada o presente en el estroma tumoral protege a las células LLC de la apoptosis inducida por ATO y Fludarabina. La sobreexpresión de MMP-9 en células MEC-1 también induce resistencia a estos agentes y el silenciamiento de MMP-9 revierte esta resistencia.

5.- MMP-9 induce resistencia a agentes citotóxicos a través de la modulación de proteínas de la familia Bcl-2, manteniendo/aumentado los niveles de miembros antiapoptóticos y los correspondientes ratios miembros antiapoptóticos/miembros proapoptóticos.

6.- El estroma de médula ósea protege a las células LLC de la apoptosis inducida por ATO por un mecanismo dependiente de las interacciones entre las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_L\beta_2$, expresadas en las células LLC, y sus respectivos ligandos, VCAM-1 y ICAM-1, expresados en las células estromales. En esta protección también están implicados factores solubles producidos por las células estromales.

7.- El cocultivo con células estromales induce activación de las vías PI3K/Akt, PKC, Lyn y MEK/ERK y de los factores de transcripción NF- κ B y STAT3, pero Lyn y MEK/ERK no están implicadas en el efecto protector frente al ATO.

8.- El cocultivo LLC/estroma también induce la expresión de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-xL, pero no de Bcl-2, y previene el incremento de las proteínas proapoptóticas Bim y Noxa en respuesta a ATO.

9.- PI3K δ y PKC β son las principales isoformas responsables del efecto protector frente a ATO mediado por estroma de médula ósea, y su bloqueo previene la activación de Akt, NF- κ B y STAT3, así como el incremento de Mcl-1 y Bcl-xL inducido por estroma, y restaura la sensibilidad a ATO.

10.- La inhibición de NF- κ B y STAT3 previene la inducción de Mcl-1, pero no de Bcl-xL, y restaura la sensibilidad a ATO, apoyando un papel esencial de Mcl-1 en la resistencia a este agente.

11.- El silenciamiento de Mcl-1 revierte completamente el efecto protector del estroma frente a la apoptosis espontánea e inducida por ATO en células LLC, corroborando el papel crucial de esta proteína en la supervivencia de las células LLC y, en particular, en la respuesta a agentes citotóxicos como el ATO.

12.- El mecanismo por el que el estroma induce resistencia a ATO en células LLC consiste en el aumento de la expresión de Mcl-1 a través de la activación de la vía PI3K δ /PKC β →Akt→NF- κ B/STAT3, y la resistencia se revierte con inhibidores de PI3K δ y PKC β .

Referencias

7. REFERENCIAS

7.1. Artículos científicos

1. Dighiero, G. and Binet, J.L. When and how to treat chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1799-1801.
2. O'Brien, S.; del Giglio, A. and Keating, M. Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1995; 85: 307-318.
3. Maurer, C. and Hallek, M. [Chronic lymphocytic leukemia]. *Dtsch Med Wochenschr* 2013; 138: 2153-2166.
4. Rozman, C. and Montserrat, E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995; 333: 1052-1057.
5. Bannerji, R. and Byrd, J.C. Update on the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 22-29.
6. Jurlander, J. The cellular biology of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 1998; 27: 29-52.
7. Mauro, F.R.; Foa, R.; Giannarelli, D.; Cordone, I.; Crescenzi, S.; Pescarmona, E., *et al.* Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood* 1999; 94: 448-454.
8. Gaidano, G.; Foa, R. and Dalla-Favera, R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2012; 122: 3432-3438.
9. Zenz, T.; Mertens, D.; Kupperts, R.; Dohner, H. and Stilgenbauer, S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 37-50.
10. Bertilaccio, M.T.; Scielzo, C.; Muzio, M. and Caligaris-Cappio, F. An overview of chronic lymphocytic leukaemia biology. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; 23: 21-32.
11. Chiorazzi, N.; Rai, K.R. and Ferrarini, M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352: 804-815.
12. Kay, N.E.; Hamblin, T.J.; Jelinek, D.F.; Dewald, G.W.; Byrd, J.C.; Farag, S., *et al.* Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002: 193-213.
13. Caligaris-Cappio, F. and Ghia, P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J Clin Oncol* 2008; 26: 4497-4503.
14. Hallek, M.; Cheson, B.D.; Catovsky, D.; Caligaris-Cappio, F.; Dighiero, G.; Dohner, H., *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111: 5446-5456.
15. Rai, K.R. The natural history of CLL and new prognostic markers. *Clin Adv Hematol Oncol* 2008; 6: 4-5; quiz 10-12.
16. Binet, J.L.; Auquier, A.; Dighiero, G.; Chastang, C.; Piguët, H.; Goasguen, J., *et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48: 198-206.
17. Van Bockstaele, F.; Verhasselt, B. and Philippe, J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev* 2009; 23: 25-47.
18. Zenz, T.; Frohling, S.; Mertens, D.; Dohner, H. and Stilgenbauer, S. Moving from prognostic to predictive factors in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; 23: 71-84.

19. Crespo, M.; Bosch, F.; Villamor, N.; Bellosillo, B.; Colomer, D.; Rozman, M., *et al.* ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348: 1764-1775.
20. Damle, R.N.; Wasil, T.; Fais, F.; Ghiotto, F.; Valetto, A.; Allen, S.L., *et al.* Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840-1847.
21. Dohner, H.; Stilgenbauer, S.; Benner, A.; Leupolt, E.; Krober, A.; Bullinger, L., *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1910-1916.
22. Weinberg, J.B.; Volkheimer, A.D.; Chen, Y.; Beasley, B.E.; Jiang, N.; Lanasa, M.C., *et al.* Clinical and molecular predictors of disease severity and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2007; 82: 1063-1070.
23. Hamblin, T.J.; Davis, Z.; Gardiner, A.; Oscier, D.G. and Stevenson, F.K. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1848-1854.
24. Dighiero, G. Autoantibody activity and V gene usage by B-cell malignancies. *Adv Exp Med Biol* 1994; 347: 125-133.
25. Calin, G.A. and Croce, C.M. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. *Semin Oncol* 2006; 33: 167-173.
26. Austen, B.; Powell, J.E.; Alvi, A.; Edwards, I.; Hooper, L.; Starczynski, J., *et al.* Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood* 2005; 106: 3175-3182.
27. Dicker, F.; Herholz, H.; Schnittger, S.; Nakao, A.; Patten, N.; Wu, L., *et al.* The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2009; 23: 117-124.
28. Guarini, A.; Marinelli, M.; Tavoraro, S.; Bellacchio, E.; Magliozzi, M.; Chiaretti, S., *et al.* ATM gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica* 2012; 97: 47-55.
29. Malcikova, J.; Smardova, J.; Rocnova, L.; Tichy, B.; Kuglik, P.; Vranova, V., *et al.* Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood* 2009; 114: 5307-5314.
30. Rossi, D.; Cerri, M.; Deambrogi, C.; Sozzi, E.; Cresta, S.; Rasi, S., *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: 995-1004.
31. Schaffner, C.; Stilgenbauer, S.; Rappold, G.A.; Dohner, H. and Lichter, P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 748-753.
32. Stankovic, T.; Weber, P.; Stewart, G.; Bedenham, T.; Murray, J.; Byrd, P.J., *et al.* Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1999; 353: 26-29.
33. Zenz, T.; Krober, A.; Scherer, K.; Habe, S.; Buhler, A.; Benner, A., *et al.* Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 2008; 112: 3322-3329.
34. Fabbri, G.; Rasi, S.; Rossi, D.; Trifonov, V.; Khiabanian, H.; Ma, J., *et al.* Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011; 208: 1389-1401.

35. Puente, X.S.; Pinyol, M.; Quesada, V.; Conde, L.; Ordóñez, G.R.; Villamor, N., *et al.* Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011; 475: 101-105.
36. Quesada, V.; Conde, L.; Villamor, N.; Ordóñez, G.R.; Jares, P.; Bassaganyas, L., *et al.* Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2011; 44: 47-52.
37. Rossi, D.; Brusca, A.; Spina, V.; Rasi, S.; Khiabanian, H.; Messina, M., *et al.* Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* 2011; 118: 6904-6908.
38. Rossi, D.; Fangazio, M.; Rasi, S.; Vaisitti, T.; Monti, S.; Cresta, S., *et al.* Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; 119: 2854-2862.
39. Rossi, D.; Rasi, S.; Fabbri, G.; Spina, V.; Fangazio, M.; Forconi, F., *et al.* Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; 119: 521-529.
40. Sportoletti, P.; Baldoni, S.; Cavalli, L.; Del Papa, B.; Bonifacio, E.; Ciurnelli, R., *et al.* NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *Br J Haematol* 2010; 151: 404-406.
41. Wang, L.; Lawrence, M.S.; Wan, Y.; Stojanov, P.; Sougnez, C.; Stevenson, K., *et al.* SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2011; 365: 2497-2506.
42. Foa, R.; Del Giudice, I.; Guarini, A.; Rossi, D. and Gaidano, G. Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2013; 98: 675-685.
43. Durig, J.; Nuckel, H.; Cremer, M.; Fuhrer, A.; Halfmeyer, K.; Fandrey, J., *et al.* ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2003; 17: 2426-2434.
44. Wiestner, A.; Rosenwald, A.; Barry, T.S.; Wright, G.; Davis, R.E.; Henrickson, S.E., *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: 4944-4951.
45. Hamblin, T.J.; Orchard, J.A.; Ibbotson, R.E.; Davis, Z.; Thomas, P.W.; Stevenson, F.K., *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: 1023-1029.
46. Malavasi, F.; Deaglio, S.; Funaro, A.; Ferrero, E.; Horenstein, A.L.; Ortolan, E., *et al.* Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev* 2008; 88: 841-886.
47. Deaglio, S.; Capobianco, A.; Bergui, L.; Durig, J.; Morabito, F.; Duhrsen, U., *et al.* CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2003; 102: 2146-2155.
48. Deaglio, S.; Vaisitti, T.; Bergui, L.; Bonello, L.; Horenstein, A.L.; Tamagnone, L., *et al.* CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 2005; 105: 3042-3050.
49. Durig, J.; Naschar, M.; Schmucker, U.; Renzing-Kohler, K.; Holter, T.; Huttmann, A., *et al.* CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2002; 16: 30-35.
50. Gattei, V.; Bulian, P.; Del Principe, M.I.; Zucchetto, A.; Maurillo, L.; Buccisano, F., *et al.* Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 111: 865-873.

51. Shanafelt, T.D.; Geyer, S.M.; Bone, N.D.; Tschumper, R.C.; Witzig, T.E.; Nowakowski, G.S., *et al.* CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *Br J Haematol* 2008; 140: 537-546.
52. Rossi, D.; Zucchetto, A.; Rossi, F.M.; Capello, D.; Cerri, M.; Deambrogi, C., *et al.* CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2008; 93: 1575-1579.
53. Majid, A.; Lin, T.T.; Best, G.; Fishlock, K.; Hewamana, S.; Pratt, G., *et al.* CD49d is an independent prognostic marker that is associated with CXCR4 expression in CLL. *Leuk Res* 2011; 35: 750-756.
54. Andreeff, M.; Darzynkiewicz, Z.; Sharpless, T.K.; Clarkson, B.D. and Melamed, M.R. Discrimination of human leukemia subtypes by flow cytometric analysis of cellular DNA and RNA. *Blood* 1980; 55: 282-293.
55. Rosenwald, A.; Alizadeh, A.A.; Widhopf, G.; Simon, R.; Davis, R.E.; Yu, X., *et al.* Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194: 1639-1647.
56. Kroft, S.H.; Finn, W.G. and Peterson, L.C. The pathology of the chronic lymphoid leukaemias. *Blood Rev* 1995; 9: 234-250.
57. Damle, R.N.; Temburni, S.; Calissano, C.; Yancopoulos, S.; Banapour, T.; Sison, C., *et al.* CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood* 2007; 110: 3352-3359.
58. Messmer, B.T.; Messmer, D.; Allen, S.L.; Koltitz, J.E.; Kudalkar, P.; Cesar, D., *et al.* In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 2005; 115: 755-764.
59. Calissano, C.; Damle, R.N.; Hayes, G.; Murphy, E.J.; Hellerstein, M.K.; Moreno, C., *et al.* In vivo intracloal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; 114: 4832-4842.
60. Kolb, J.P.; Kern, C.; Quiney, C.; Roman, V. and Billard, C. Re-establishment of a normal apoptotic process as a therapeutic approach in B-CLL. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2003; 3: 261-286.
61. Binet, J.L.; Plunkett, W.; Robertson, B.; Merle-Beral, H.; Mentz, F.; Hoffbrand, A.V., *et al.* What does apoptosis mean in CLL? *Leuk Lymphoma* 1996; 22 Suppl 2: 47-52.
62. Danilov, A.V.; Danilova, O.V.; Klein, A.K. and Huber, B.T. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Mol Med* 2006; 6: 665-675.
63. Yuan, J. and Kroemer, G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev* 2010; 24: 2592-2602.
64. Vandenabeele, P.; Galluzzi, L.; Vanden Berghe, T. and Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 700-714.
65. Kerr, J.F.; Wyllie, A.H. and Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
66. Wyllie, A.H.; Kerr, J.F. and Currie, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
67. Norbury, C.J. and Hickson, I.D. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 367-401.
68. Hacker, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 2000; 301: 5-17.
69. Kerr, J.F.; Winterford, C.M. and Harmon, B.V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-2026.
70. Savill, J. and Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000; 407: 784-788.

71. Rock, K.L. and Kono, H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 99-126.
72. Locksley, R.M.; Killeen, N. and Lenardo, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104: 487-501.
73. Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1308.
74. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516.
75. Tait, S.W. and Green, D.R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 621-632.
76. Yuan, J. Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 247-251.
77. Siddiqui, W.A.; Ahad, A. and Ahsan, H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch Toxicol* 2015;
78. Pepper, C.; Thomas, A.; Hoy, T.; Cotter, F. and Bentley, P. Antisense-mediated suppression of Bcl-2 highlights its pivotal role in failed apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999; 107: 611-615.
79. Bellosillo, B.; Villamor, N.; Lopez-Guillermo, A.; Marce, S.; Bosch, F.; Campo, E., *et al.* Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 1810-1816.
80. Kitada, S.; Andersen, J.; Akar, S.; Zapata, J.M.; Takayama, S.; Krajewski, S., *et al.* Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with *In vitro* and *In vivo* chemoresponses. *Blood* 1998; 91: 3379-3389.
81. Robertson, L.E.; Plunkett, W.; McConnell, K.; Keating, M.J. and McDonnell, T.J. Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia* 1996; 10: 456-459.
82. Pepper, C.; Thomas, A.; Hoy, T. and Bentley, P. Antisense oligonucleotides complementary to Bax transcripts reduce the susceptibility of B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells to apoptosis in a bcl-2 independent manner. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 2003-2009.
83. Pepper, C.; Thomas, A.; Hoy, T. and Bentley, P. Chlorambucil resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia is mediated through failed Bax induction and selection of high Bcl-2-expressing subclones. *Br J Haematol* 1999; 104: 581-588.
84. Griffiths, G.J.; Dubrez, L.; Morgan, C.P.; Jones, N.A.; Whitehouse, J.; Corfe, B.M., *et al.* Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak *in vivo* precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 1999; 144: 903-914.
85. Suzuki, M.; Youle, R.J. and Tjandra, N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 2000; 103: 645-654.
86. Taylor, R.C.; Cullen, S.P. and Martin, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 231-241.
87. Czabotar, P.E.; Lessene, G.; Strasser, A. and Adams, J.M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 49-63.
88. Kim, H.; Rafiuddin-Shah, M.; Tu, H.C.; Jeffers, J.R.; Zambetti, G.P.; Hsieh, J.J., *et al.* Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 1348-1358.
89. Kim, H.; Tu, H.C.; Ren, D.; Takeuchi, O.; Jeffers, J.R.; Zambetti, G.P., *et al.* Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 2009; 36: 487-499.

90. Letai, A.; Bassik, M.C.; Walensky, L.D.; Sorcinelli, M.D.; Weiler, S. and Korsmeyer, S.J. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002; 2: 183-192.
91. Chen, L.; Willis, S.N.; Wei, A.; Smith, B.J.; Fletcher, J.I.; Hinds, M.G., *et al.* Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 2005; 17: 393-403.
92. Willis, S.N.; Fletcher, J.I.; Kaufmann, T.; van Delft, M.F.; Chen, L.; Czabotar, P.E., *et al.* Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 2007; 315: 856-859.
93. Willis, S.N.; Chen, L.; Dewson, G.; Wei, A.; Naik, E.; Fletcher, J.I., *et al.* Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 2005; 19: 1294-1305.
94. Wang, K.; Gross, A.; Waksman, G. and Korsmeyer, S.J. Mutagenesis of the BH3 domain of BAX identifies residues critical for dimerization and killing. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6083-6089.
95. Fletcher, J.I.; Meusburger, S.; Hawkins, C.J.; Riglar, D.T.; Lee, E.F.; Fairlie, W.D., *et al.* Apoptosis is triggered when prosurvival Bcl-2 proteins cannot restrain Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 18081-18087.
96. Llambi, F.; Moldoveanu, T.; Tait, S.W.; Bouchier-Hayes, L.; Temirov, J.; McCormick, L.L., *et al.* A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol Cell* 2011; 44: 517-531.
97. Shamas-Din, A.; Kale, J.; Leber, B. and Andrews, D.W. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: a008714.
98. Michalak, E.M.; Villunger, A.; Adams, J.M. and Strasser, A. In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute. *Cell Death Differ* 2008; 15: 1019-1029.
99. Nakano, K. and Vousden, K.H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 2001; 7: 683-694.
100. Oda, E.; Ohki, R.; Murasawa, H.; Nemoto, J.; Shibue, T.; Yamashita, T., *et al.* Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; 288: 1053-1058.
101. Jiang, P.; Du, W.; Heese, K. and Wu, M. The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 9071-9082.
102. Sax, J.K.; Fei, P.; Murphy, M.E.; Bernhard, E.; Korsmeyer, S.J. and El-Deiry, W.S. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 842-849.
103. You, H.; Pellegrini, M.; Tsuchihara, K.; Yamamoto, K.; Hacker, G.; Erlacher, M., *et al.* FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med* 2006; 203: 1657-1663.
104. Dijkers, P.F.; Medema, R.H.; Lammers, J.W.; Koenderman, L. and Coffey, P.J. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* 2000; 10: 1201-1204.
105. Catz, S.D. and Johnson, J.L. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* 2001; 20: 7342-7351.
106. Boise, L.H.; Gonzalez-Garcia, M.; Postema, C.E.; Ding, L.; Lindsten, T.; Turka, L.A., *et al.* bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74: 597-608.

107. Bingle, C.D.; Craig, R.W.; Swales, B.M.; Singleton, V.; Zhou, P. and Whyte, M.K. Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J Biol Chem* 2000; 275: 22136-22146.
108. Hockenbery, D.M.; Oltvai, Z.N.; Yin, X.M.; Millman, C.L. and Korsmeyer, S.J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75: 241-251.
109. O'Connor, L.; Strasser, A.; O'Reilly, L.A.; Hausmann, G.; Adams, J.M.; Cory, S., *et al.* Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo J* 1998; 17: 384-395.
110. Kutuk, O. and Letai, A. Regulation of Bcl-2 family proteins by posttranslational modifications. *Curr Mol Med* 2008; 8: 102-118.
111. Elkholi, R.; Floros, K.V. and Chipuk, J.E. The Role of BH3-Only Proteins in Tumor Cell Development, Signaling, and Treatment. *Genes Cancer* 2011; 2: 523-537.
112. Luciano, F.; Jacquelin, A.; Colosetti, P.; Herrant, M.; Cagnol, S.; Pages, G., *et al.* Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene* 2003; 22: 6785-6793.
113. Dai, H.; Ding, H.; Meng, X.W.; Lee, S.H.; Schneider, P.A. and Kaufmann, S.H. Contribution of Bcl-2 phosphorylation to Bak binding and drug resistance. *Cancer Res* 2013; 73: 6998-7008.
114. Quinn, B.A.; Dash, R.; Azab, B.; Sarkar, S.; Das, S.K.; Kumar, S., *et al.* Targeting Mcl-1 for the therapy of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2011; 20: 1397-1411.
115. Nijhawan, D.; Fang, M.; Traer, E.; Zhong, Q.; Gao, W.; Du, F., *et al.* Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 2003; 17: 1475-1486.
116. Thomas, L.W.; Lam, C. and Edwards, S.W. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett* 2010; 584: 2981-2989.
117. Derouet, M.; Thomas, L.; Cross, A.; Moots, R.J. and Edwards, S.W. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J Biol Chem* 2004; 279: 26915-26921.
118. De Biasio, A.; Vrana, J.A.; Zhou, P.; Qian, L.; Bieszczad, C.K.; Braley, K.E., *et al.* N-terminal truncation of antiapoptotic MCL1, but not G2/M-induced phosphorylation, is associated with stabilization and abundant expression in tumor cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 23919-23936.
119. Maurer, U.; Charvet, C.; Wagman, A.S.; Dejardin, E. and Green, D.R. Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* 2006; 21: 749-760.
120. Chu, R.; Terrano, D.T. and Chambers, T.C. Cdk1/cyclin B plays a key role in mitotic arrest-induced apoptosis by phosphorylation of Mcl-1, promoting its degradation and freeing Bak from sequestration. *Biochem Pharmacol* 2012; 83: 199-206.
121. Cheng, E.H.; Kirsch, D.G.; Clem, R.J.; Ravi, R.; Kastan, M.B.; Bedi, A., *et al.* Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 1997; 278: 1966-1968.
122. Clem, R.J.; Cheng, E.H.; Karp, C.L.; Kirsch, D.G.; Ueno, K.; Takahashi, A., *et al.* Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 554-559.
123. Burger, J.A.; Ghia, P.; Rosenwald, A. and Caligaris-Cappio, F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 2009; 114: 3367-3375.
124. Munk Pedersen, I. and Reed, J. Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 2365-2372.

125. Albini, A. and Sporn, M.B. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 139-147.
126. Nagasawa, T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 107-116.
127. Fecteau, J.F. and Kipps, T.J. Structure and function of the hematopoietic cancer niche: focus on chronic lymphocytic leukemia. *Front Biosci (Schol Ed)* 2012; 4: 61-73.
128. Burger, M.; Hartmann, T.; Krome, M.; Rawluk, J.; Tamamura, H.; Fujii, N., *et al.* Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2005; 106: 1824-1830.
129. Caligaris-Cappio, F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 123: 380-388.
130. Collins, R.J.; Verschuer, L.A.; Harmon, B.V.; Prentice, R.L.; Pope, J.H. and Kerr, J.F. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol* 1989; 71: 343-350.
131. Panayiotidis, P.; Jones, D.; Ganeshaguru, K.; Foroni, L. and Hoffbrand, A.V. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol* 1996; 92: 97-103.
132. Herishanu, Y.; Katz, B.Z.; Lipsky, A. and Wiestner, A. Biology of chronic lymphocytic leukemia in different microenvironments: clinical and therapeutic implications. *Hematol Oncol Clin North Am* 2013; 27: 173-206.
133. McConkey, D.J.; Aguilar-Santelises, M.; Hartzell, P.; Eriksson, I.; Mellstedt, H.; Orrenius, S., *et al.* Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *J Immunol* 1991; 146: 1072-1076.
134. Panayiotidis, P.; Ganeshaguru, K.; Jabbar, S.A. and Hoffbrand, A.V. Interleukin-4 inhibits apoptotic cell death and loss of the bcl-2 protein in B-chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol* 1993; 85: 439-445.
135. Panayiotidis, P.; Ganeshaguru, K.; Jabbar, S.A. and Hoffbrand, A.V. Alpha-interferon (alpha-IFN) protects B-chronic lymphocytic leukaemia cells from apoptotic cell death in vitro. *Br J Haematol* 1994; 86: 169-173.
136. Friedberg, J.W. CLL microenvironment: macro important. *Blood* 2011; 117: 377-378.
137. Plander, M.; Ugocsai, P.; Seegers, S.; Orso, E.; Reichle, A.; Schmitz, G., *et al.* Chronic lymphocytic leukemia cells induce anti-apoptotic effects of bone marrow stroma. *Ann Hematol* 2011; 90: 1381-1390.
138. Herishanu, Y.; Perez-Galan, P.; Liu, D.; Biancotto, A.; Pittaluga, S.; Vire, B., *et al.* The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 117: 563-574.
139. Burger, J.A. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011: 96-103.
140. Davids, M.S. and Burger, J.A. Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Open J Hematol* 2012; 3
141. Lagneaux, L.; Delforge, A.; Bron, D.; De Bruyn, C. and 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: 2387-2396.
142. Badoux, X.; Bueso-Ramos, C.; Harris, D.; Li, P.; Liu, Z.; Burger, J., *et al.* Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and bone marrow endothelial cells: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hum Pathol* 2011; 42: 1989-2000.

143. Buggins, A.G.; Pepper, C.; Patten, P.E.; Hewamana, S.; Gohil, S.; Moorhead, J., *et al.* Interaction with vascular endothelium enhances survival in primary chronic lymphocytic leukemia cells via NF-kappaB activation and de novo gene transcription. *Cancer Res* 2010; 70: 7523-7533.
144. Mayani, H.; Guilbert, L.J. and Janowska-Wieczorek, A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 1992; 49: 225-233.
145. Balakrishnan, K.; Burger, J.A.; Wierda, W.G. and Gandhi, V. AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance. *Blood* 2009; 113: 149-153.
146. Lagneaux, L.; Delforge, A.; De Bruyn, C.; Bernier, M. and Bron, D. Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 1999; 35: 445-453.
147. Kay, N.E.; Shanafelt, T.D.; Strege, A.K.; Lee, Y.K.; Bone, N.D. and Raza, A. Bone biopsy derived marrow stromal elements rescue chronic lymphocytic leukemia B-cells from spontaneous and drug induced cell death and facilitates an "angiogenic switch". *Leuk Res* 2007; 31: 899-906.
148. Plander, M.; Seegers, S.; Ugocsai, P.; Diermeier-Daucher, S.; Ivanyi, J.; Schmitz, G., *et al.* Different proliferative and survival capacity of CLL-cells in a newly established in vitro model for pseudofollicles. *Leukemia* 2009; 23: 2118-2128.
149. Rosati, S. and Kluin, P.M. Chronic lymphocytic leukaemia: a review of the immuno-architecture. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 294: 91-107.
150. Chiorazzi, N. and Efremov, D.G. Chronic lymphocytic leukemia: a tale of one or two signals? *Cell Res* 2013; 23: 182-185.
151. Stevenson, F.K.; Krysov, S.; Davies, A.J.; Steele, A.J. and Packham, G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 118: 4313-4320.
152. Ding, W.; Nowakowski, G.S.; Knox, T.R.; Boysen, J.C.; Maas, M.L.; Schwager, S.M., *et al.* Bi-directional activation between mesenchymal stem cells and CLL B-cells: implication for CLL disease progression. *Br J Haematol* 2009; 147: 471-483.
153. Pedersen, I.M.; Kitada, S.; Leoni, L.M.; Zapata, J.M.; Karras, J.G.; Tsukada, N., *et al.* Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood* 2002; 100: 1795-1801.
154. Stevenson, F.K. and Caligaris-Cappio, F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004; 103: 4389-4395.
155. Chen, L.; Widhopf, G.; Huynh, L.; Rassenti, L.; Rai, K.R.; Weiss, A., *et al.* Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 4609-4614.
156. Hivroz, C.; Geny, B.; Brouet, J.C. and Grillo-Courvalin, C. Altered signal transduction secondary to surface IgM cross-linking on B-chronic lymphocytic leukemia cells. Differential activation of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Immunol* 1990; 144: 2351-2358.
157. Krysov, S.; Potter, K.N.; Mockridge, C.I.; Coelho, V.; Wheatley, I.; Packham, G., *et al.* Surface IgM of CLL cells displays unusual glycans indicative of engagement of antigen in vivo. *Blood* 2010; 115: 4198-4205.
158. Longo, P.G.; Laurenti, L.; Gobessi, S.; Sica, S.; Leone, G. and Efremov, D.G. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2008; 111: 846-855.
159. Petlickovski, A.; Laurenti, L.; Li, X.; Marietti, S.; Chiusolo, P.; Sica, S., *et al.* Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2005; 105: 4820-4827.

160. Ruan, J.; Hyjek, E.; Kermani, P.; Christos, P.J.; Hooper, A.T.; Coleman, M., *et al.* Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5622-5631.
161. Kurtova, A.V.; Balakrishnan, K.; Chen, R.; Ding, W.; Schnabl, S.; Quiroga, M.P., *et al.* Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood* 2009; 114: 4441-4450.
162. Pittenger, M.F.; Mackay, A.M.; Beck, S.C.; Jaiswal, R.K.; Douglas, R.; Mosca, J.D., *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
163. Redondo-Munoz, J.; Escobar-Diaz, E.; Samaniego, R.; Terol, M.J.; Garcia-Marco, J.A. and Garcia-Pardo, A. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood* 2006; 108: 3143-3151.
164. Cuni, S.; Perez-Aciego, P.; Perez-Chacon, G.; Vargas, J.A.; Sanchez, A.; Martin-Saavedra, F.M., *et al.* A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 2004; 18: 1391-1400.
165. Nwabo Kamdje, A.H.; Bassi, G.; Pacelli, L.; Malpeli, G.; Amati, E.; Nichele, I., *et al.* Role of stromal cell-mediated Notch signaling in CLL resistance to chemotherapy. *Blood Cancer J* 2012; 2: e73.
166. Bertrand, F.E.; Spengeman, J.D.; Shelton, J.G. and McCubrey, J.A. Inhibition of PI3K, mTOR and MEK signaling pathways promotes rapid apoptosis in B-lineage ALL in the presence of stromal cell support. *Leukemia* 2005; 19: 98-102.
167. Burger, J.A.; Tsukada, N.; Burger, M.; Zvaifler, N.J.; Dell'Aquila, M. and Kipps, T.J. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 2000; 96: 2655-2663.
168. Nishio, M.; Endo, T.; Tsukada, N.; Ohata, J.; Kitada, S.; Reed, J.C., *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: 1012-1020.
169. Orimo, A.; Gupta, P.B.; Sgroi, D.C.; Arenzana-Seisdedos, F.; Delaunay, T.; Naeem, R., *et al.* Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121: 335-348.
170. Burger, J.A.; Burger, M. and Kipps, T.J. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* 1999; 94: 3658-3667.
171. Burger, J.A. and Kipps, T.J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 2006; 107: 1761-1767.
172. Gehrke, I.; Gandhirajan, R.K.; Poll-Wolbeck, S.J.; Hallek, M. and Kreuzer, K.A. Bone marrow stromal cell-derived vascular endothelial growth factor (VEGF) rather than chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell-derived VEGF is essential for the apoptotic resistance of cultured CLL cells. *Mol Med* 2011; 17: 619-627.
173. Lee, Y.K.; Bone, N.D.; Strega, A.K.; Shanafelt, T.D.; Jelinek, D.F. and Kay, N.E. VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2004; 104: 788-794.

174. Lee, Y.K.; Shanafelt, T.D.; Bone, N.D.; Strege, A.K.; Jelinek, D.F. and Kay, N.E. VEGF receptors on chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells interact with STAT 1 and 3: implication for apoptosis resistance. *Leukemia* 2005; 19: 513-523.
175. Pizzolo, G.; Chilosi, M.; Ambrosetti, A.; Semenzato, G.; Fiore-Donati, L. and Perona, G. Immunohistologic study of bone marrow involvement in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1983; 62: 1289-1296.
176. Bagnara, D.; Kaufman, M.S.; Calissano, C.; Marsilio, S.; Patten, P.E.; Simone, R., *et al.* A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease. *Blood* 2011; 117: 5463-5472.
177. Devereux, S. Two-faced T cells in CLL. *Blood* 2011; 117: 5273-5274.
178. Ghia, P.; Strola, G.; Granziero, L.; Geuna, M.; Guida, G.; Sallusto, F., *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1403-1413.
179. Kitada, S.; Zapata, J.M.; Andreeff, M. and Reed, J.C. Bryostatin and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999; 106: 995-1004.
180. Romano, M.F.; Lamberti, A.; Tassone, P.; Alfinito, F.; Costantini, S.; Chiurazzi, F., *et al.* Triggering of CD40 antigen inhibits fludarabine-induced apoptosis in B chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1998; 92: 990-995.
181. von Bergwelt-Baildon, M.; Maecker, B.; Schultze, J. and Gribben, J.G. CD40 activation: potential for specific immunotherapy in B-CLL. *Ann Oncol* 2004; 15: 853-857.
182. Fluckiger, A.C.; Rossi, J.F.; Bussel, A.; Bryon, P.; Banchereau, J. and Defrance, T. Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia B cells activated via surface Igs or CD40 to B-cell tropic factors. *Blood* 1992; 80: 3173-3181.
183. Hallaert, D.Y.; Jaspers, A.; van Noesel, C.J.; van Oers, M.H.; Kater, A.P. and Eldering, E. c-Abl kinase inhibitors overcome CD40-mediated drug resistance in CLL: implications for therapeutic targeting of chemoresistant niches. *Blood* 2008; 112: 5141-5149.
184. Furman, R.R.; Asgary, Z.; Mascarenhas, J.O.; Liou, H.C. and Schattner, E.J. Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol* 2000; 164: 2200-2206.
185. Vogler, M.; Butterworth, M.; Majid, A.; Walewska, R.J.; Sun, X.M.; Dyer, M.J., *et al.* Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; 113: 4403-4413.
186. Granziero, L.; Ghia, P.; Circosta, P.; Gottardi, D.; Strola, G.; Geuna, M., *et al.* Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 97: 2777-2783.
187. Li, F.; Ambrosini, G.; Chu, E.Y.; Plescia, J.; Tognin, S.; Marchisio, P.C., *et al.* Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396: 580-584.
188. Trentin, L.; Cerutti, A.; Zambello, R.; Sancretta, R.; Tassinari, C.; Facco, M., *et al.* Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Blood* 1996; 87: 3327-3335.
189. Foa, R.; Massaia, M.; Cardona, S.; Tos, A.G.; Bianchi, A.; Attisano, C., *et al.* Production of tumor necrosis factor-alpha by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: a possible regulatory role of TNF in the progression of the disease. *Blood* 1990; 76: 393-400.

190. Reittie, J.E.; Yong, K.L.; Panayiotidis, P. and Hoffbrand, A.V. Interleukin-6 inhibits apoptosis and tumour necrosis factor induced proliferation of B-chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 1996; 22: 83-90, follow 186, color plate VI.
191. Dancescu, M.; Rubio-Trujillo, M.; Biron, G.; Bron, D.; Delespesse, G. and Sarfati, M. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J Exp Med* 1992; 176: 1319-1326.
192. Chaouchi, N.; Wallon, C.; Goujard, C.; Tertian, G.; Rudent, A.; Caput, D., *et al.* Interleukin-13 inhibits interleukin-2-induced proliferation and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from in vitro apoptosis. *Blood* 1996; 87: 1022-1029.
193. Buschle, M.; Campana, D.; Carding, S.R.; Richard, C.; Hoffbrand, A.V. and Brenner, M.K. Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 1993; 177: 213-218.
194. Schmid, C. and Isaacson, P.G. Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (B-CLL): an immunophenotypic study. *Histopathology* 1994; 24: 445-451.
195. Chilosi, M.; Pizzolo, G.; Caligaris-Cappio, F.; Ambrosetti, A.; Vinante, F.; Morittu, L., *et al.* Immunohistochemical demonstration of follicular dendritic cells in bone marrow involvement of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1985; 56: 328-332.
196. Park, C.S. and Choi, Y.S. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology* 2005; 114: 2-10.
197. Filip, A.A.; Cisel, B.; Koczkodaj, D.; Wasik-Szczepanek, E.; Piersiak, T. and Dmoszynska, A. Circulating microenvironment of CLL: are nurse-like cells related to tumor-associated macrophages? *Blood Cells Mol Dis* 2013; 50: 263-270.
198. Tsukada, N.; Burger, J.A.; Zvaifler, N.J. and Kipps, T.J. Distinctive features of "nurse-like" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99: 1030-1037.
199. Reinart, N.; Nguyen, P.H.; Boucas, J.; Rosen, N.; Kvasnicka, H.M.; Heukamp, L., *et al.* Delayed development of chronic lymphocytic leukemia in the absence of macrophage migration inhibitory factor. *Blood* 2013; 121: 812-821.
200. Burger, J.A.; Quiroga, M.P.; Hartmann, E.; Burkle, A.; Wierda, W.G.; Keating, M.J., *et al.* High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurse-like cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* 2009; 113: 3050-3058.
201. Burkle, A.; Niedermeier, M.; Schmitt-Graff, A.; Wierda, W.G.; Keating, M.J. and Burger, J.A. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 110: 3316-3325.
202. Molica, S.; Vacca, A.; Ribatti, D.; Cuneo, A.; Cavazzini, F.; Levato, D., *et al.* Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 3344-3351.
203. Long, B.W.; Witte, P.L.; Abraham, G.N.; Gregory, S.A. and Plate, J.M. Apoptosis and interleukin 7 gene expression in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 1416-1420.
204. Maffei, R.; Fiorcari, S.; Bulgarelli, J.; Martinelli, S.; Castelli, I.; Deaglio, S., *et al.* Physical contact with endothelial cells through beta1- and beta2-integrins rescues chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug-induced apoptosis and induces a peculiar gene expression profile in leukemic cells. *Haematologica* 2011; 97: 952-960.

205. Elhabazi, A.; Marie-Cardine, A.; Chabbert-de Ponnat, I.; Bensussan, A. and Bousmell, L. Structure and function of the immune semaphorin CD100/SEMA4D. *Crit Rev Immunol* 2003; 23: 65-81.
206. Patten, P.E.; Buggins, A.G.; Richards, J.; Wotherspoon, A.; Salisbury, J.; Mufti, G.J., *et al.* CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood* 2008; 111: 5173-5181.
207. Granziero, L.; Circosta, P.; Scielzo, C.; Frisaldi, E.; Stella, S.; Geuna, M., *et al.* CD100/Plexin-B1 interactions sustain proliferation and survival of normal and leukemic CD5+ B lymphocytes. *Blood* 2003; 101: 1962-1969.
208. Lopez-Giral, S.; Quintana, N.E.; Cabrerizo, M.; Alfonso-Perez, M.; Sala-Valdes, M.; De Soria, V.G., *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: 462-471.
209. Till, K.J.; Lin, K.; Zuzel, M. and Cawley, J.C. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood* 2002; 99: 2977-2984.
210. Kern, C.; Cornuel, J.F.; Billard, C.; Tang, R.; Rouillard, D.; Stenou, V., *et al.* Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood* 2004; 103: 679-688.
211. Novak, A.J.; Bram, R.J.; Kay, N.E. and Jelinek, D.F. Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood* 2002; 100: 2973-2979.
212. Endo, T.; Nishio, M.; Enzler, T.; Cottam, H.B.; Fukuda, T.; James, D.F., *et al.* BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway. *Blood* 2007; 109: 703-710.
213. Zhang, W.; Kater, A.P.; Widhopf, G.F., 2nd; Chuang, H.Y.; Enzler, T.; James, D.F., *et al.* B-cell activating factor and v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-Myc) influence progression of chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 18956-18960.
214. Zucchetto, A.; Benedetti, D.; Tripodo, C.; Bomben, R.; Dal Bo, M.; Marconi, D., *et al.* CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res* 2009; 69: 4001-4009.
215. Stamenkovic, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 2003; 200: 448-464.
216. Cauwe, B.; Van den Steen, P.E. and Opdenakker, G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007; 42: 113-185.
217. Kessenbrock, K.; Plaks, V. and Werb, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; 141: 52-67.
218. Opdenakker, G.; Van den Steen, P.E. and Van Damme, J. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol* 2001; 22: 571-579.
219. Deryugina, E.I. and Quigley, J.P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 9-34.
220. Redondo-Munoz, J.; Ugarte-Berzal, E.; Terol, M.J.; Van den Steen, P.E.; Hernandez del Cerro, M.; Roderfeld, M., *et al.* Matrix metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia b cell survival through its hemopexin domain. *Cancer Cell* 2010; 17: 160-172.

221. Chakraborti, S.; Mandal, M.; Das, S.; Mandal, A. and Chakraborti, T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 2003; 253: 269-285.
222. Puente, X.S.; Sanchez, L.M.; Gutierrez-Fernandez, A.; Velasco, G. and Lopez-Otin, C. A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 331-334.
223. McDonnell, S.E.; Kerr, L.D. and Matrisian, L.M. Epidermal growth factor stimulation of stromelysin mRNA in rat fibroblasts requires induction of proto-oncogenes c-fos and c-jun and activation of protein kinase C. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4284-4293.
224. Shaulian, E. and Karin, M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001; 20: 2390-2400.
225. Vincenti, M.P. and Brinckerhoff, C.E. Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? *J Cell Physiol* 2007; 213: 355-364.
226. Redondo-Munoz, J.; Jose Terol, M.; Garcia-Marco, J.A. and Garcia-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: 383-386.
227. Ugarte-Berzal, E.; Redondo-Munoz, J.; Eroles, P.; Del Cerro, M.H.; Garcia-Marco, J.A.; Terol, M.J., *et al.* VEGF/VEGFR2 interaction down-regulates matrix metalloproteinase-9 via STAT1 activation and inhibits B chronic lymphocytic leukemia cell migration. *Blood* 2010; 115: 846-849.
228. Egeblad, M. and Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161-174.
229. Van den Steen, P.E.; Dubois, B.; Nelissen, I.; Rudd, P.M.; Dwek, R.A. and Opdenakker, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002; 37: 375-536.
230. Xu, D.; Suenaga, N.; Edelmann, M.J.; Fridman, R.; Muschel, R.J. and Kessler, B.M. Novel MMP-9 substrates in cancer cells revealed by a label-free quantitative proteomics approach. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 2215-2228.
231. Bauvois, B.; Dumont, J.; Mathiot, C. and Kolb, J.P. Production of matrix metalloproteinase-9 in early stage B-CLL: suppression by interferons. *Leukemia* 2002; 16: 791-798.
232. Kamiguti, A.S.; Lee, E.S.; Till, K.J.; Harris, R.J.; Glenn, M.A.; Lin, K., *et al.* The role of matrix metalloproteinase 9 in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2004; 125: 128-140.
233. Ringshausen, I.; Dechow, T.; Schneller, F.; Weick, K.; Oelsner, M.; Peschel, C., *et al.* Constitutive activation of the MAPkinase p38 is critical for MMP-9 production and survival of B-CLL cells on bone marrow stromal cells. *Leukemia* 2004; 18: 1964-1970.
234. Redondo-Munoz, J.; Ugarte-Berzal, E.; Garcia-Marco, J.A.; del Cerro, M.H.; Van den Steen, P.E.; Opdenakker, G., *et al.* Alpha4beta1 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: 169-178.
235. Hansen, M.M.; Andersen, E.; Christensen, B.E.; Christiansen, I.; Geisler, C.; Kristensen, D., *et al.* CHOP versus prednisolone + chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia (CLL): preliminary results of a randomized multicenter study. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 433-436.
236. Dillman, R.O.; Mick, R. and McIntyre, O.R. Pentostatin in chronic lymphocytic leukemia: a phase II trial of Cancer and Leukemia group B. *J Clin Oncol* 1989; 7: 433-438.

237. Keating, M.J.; O'Brien, S.; Lerner, S.; Koller, C.; Beran, M.; Robertson, L.E., *et al.* Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood* 1998; 92: 1165-1171.
238. Rai, K.R.; Peterson, B.L.; Appelbaum, F.R.; Kolitz, J.; Elias, L.; Shepherd, L., *et al.* Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1750-1757.
239. Bosch, F.; Ferrer, A.; Lopez-Guillermo, A.; Gine, E.; Bellosillo, B.; Villamor, N., *et al.* Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2002; 119: 976-984.
240. Flinn, I.W.; Byrd, J.C.; Morrison, C.; Jamison, J.; Diehl, L.F.; Murphy, T., *et al.* Fludarabine and cyclophosphamide with filgrastim support in patients with previously untreated indolent lymphoid malignancies. *Blood* 2000; 96: 71-75.
241. O'Brien, S.M.; Kantarjian, H.M.; Cortes, J.; Beran, M.; Koller, C.A.; Giles, F.J., *et al.* Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1414-1420.
242. Hallek, M. State-of-the-art treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009: 440-449.
243. Fischer, K.; Cramer, P.; Busch, R.; Bottcher, S.; Bahlo, J.; Schubert, J., *et al.* Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 2012; 30: 3209-3216.
244. Keating, M.J.; O'Brien, S.; Albitar, M.; Lerner, S.; Plunkett, W.; Giles, F., *et al.* Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4079-4088.
245. Wierda, W.G.; Kipps, T.J.; Mayer, J.; Stilgenbauer, S.; Williams, C.D.; Hellmann, A., *et al.* Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1749-1755.
246. Castillo, J.; Milani, C. and Mendez-Allwood, D. Ofatumumab, a second-generation anti-CD20 monoclonal antibody, for the treatment of lymphoproliferative and autoimmune disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; 18: 491-500.
247. Wierda, W.G.; Kipps, T.J.; Durig, J.; Griskevicius, L.; Stilgenbauer, S.; Mayer, J., *et al.* Chemoimmunotherapy with O-FC in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 117: 6450-6458.
248. Goede, V.; Fischer, K.; Busch, R.; Engelke, A.; Eichhorst, B.; Wendtner, C.M., *et al.* Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med* 2014; 370: 1101-1110.
249. Rai, K. and Hallek, M. Future prospects for alemtuzumab (MabCampath). *Med Oncol* 2002; 19 Suppl: S57-63.
250. Stilgenbauer, S. and Dohner, H. Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy. *N Engl J Med* 2002; 347: 452-453.
251. Faderl, S.; Thomas, D.A.; O'Brien, S.; Garcia-Manero, G.; Kantarjian, H.M.; Giles, F.J., *et al.* Experience with alemtuzumab plus rituximab in patients with relapsed and refractory lymphoid malignancies. *Blood* 2003; 101: 3413-3415.
252. Keating, M.J.; Flinn, I.; Jain, V.; Binet, J.L.; Hillmen, P.; Byrd, J., *et al.* Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood* 2002; 99: 3554-3561.
253. Bogusz, J.; Majchrzak, A.; Medra, A.; Cebula-Obrzut, B.; Robak, T. and Smolewski, P. Mechanisms of action of the anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab on chronic lymphocytic leukemia cells. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2013; 67: 107-118.

254. Walsby, E.; Buggins, A.; Devereux, S.; Jones, C.; Pratt, G.; Brennan, P., *et al.* Development and characterization of a physiologically relevant model of lymphocyte migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; 123: 3607-3617.
255. Tausch, E.; Mertens, D. and Stilgenbauer, S. Advances in treating chronic lymphocytic leukemia. *F1000Prime Rep* 2014; 6: 65.
256. Sharma, R.A.; Steward, W.P.; Daines, C.A.; Knight, R.D.; O'Byrne, K.J. and Dalglish, A.G. Toxicity profile of the immunomodulatory thalidomide analogue, lenalidomide: phase I clinical trial of three dosing schedules in patients with solid malignancies. *Eur J Cancer* 2006; 42: 2318-2325.
257. Doi, K.; Li, R.; Sung, S.S.; Wu, H.; Liu, Y.; Manieri, W., *et al.* Discovery of marinopyrrole A (maritoclax) as a selective Mcl-1 antagonist that overcomes ABT-737 resistance by binding to and targeting Mcl-1 for proteasomal degradation. *J Biol Chem* 2012; 287: 10224-10235.
258. Souers, A.J.; Levenson, J.D.; Boghaert, E.R.; Ackler, S.L.; Catron, N.D.; Chen, J., *et al.* ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 2013; 19: 202-208.
259. Vogler, M.; Dinsdale, D.; Sun, X.M.; Young, K.W.; Butterworth, M.; Nicotera, P., *et al.* A novel paradigm for rapid ABT-737-induced apoptosis involving outer mitochondrial membrane rupture in primary leukemia and lymphoma cells. *Cell Death Differ* 2008; 15: 820-830.
260. Badar, T.; Burger, J.A.; Wierda, W.G. and O'Brien, S. Ibrutinib: a paradigm shift in management of CLL. *Expert Rev Hematol* 2014; 7: 705-717.
261. Byrd, J.C.; Furman, R.R.; Coutre, S.E.; Flinn, I.W.; Burger, J.A.; Blum, K.A., *et al.* Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013; 369: 32-42.
262. Yang, Q.; Modi, P.; Newcomb, T.; Queva, C. and Gandhi, V. Idelalisib: First-in-Class PI3K Delta Inhibitor for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia, Small Lymphocytic Leukemia, and Follicular Lymphoma. *Clin Cancer Res* 2015;
263. Khan, M.; Saif, A.; Sandler, S. and Mirrahimov, A.E. Idelalisib for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *ISRN Oncol* 2014; 2014: 931858.
264. El-Gamal, D.; Williams, K.; LaFollette, T.D.; Cannon, M.; Blachly, J.S.; Zhong, Y., *et al.* PKC-beta as a therapeutic target in CLL: PKC inhibitor AEB071 demonstrates preclinical activity in CLL. *Blood* 2014; 124: 1481-1491.
265. Li, Z.W. and Dalton, W.S. Tumor microenvironment and drug resistance in hematologic malignancies. *Blood Rev* 2006; 20: 333-342.
266. Packham, G. and Stevenson, F.K. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* 2005; 114: 441-449.
267. Sagatys, E.M. and Zhang, L. Clinical and laboratory prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Control* 2012; 19: 18-25.
268. Rossi, D. and Gaidano, G. Molecular genetics of high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Hematol* 2012; 5: 593-602.
269. Meads, M.B.; Gatenby, R.A. and Dalton, W.S. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 665-674.
270. Buggins, A.G. and Pepper, C.J. The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res* 2010; 34: 837-842.
271. Mudry, R.E.; Fortney, J.E.; York, T.; Hall, B.M. and Gibson, L.F. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood* 2000; 96: 1926-1932.

272. Davids, M.S.; Deng, J.; Wiestner, A.; Lannutti, B.J.; Wang, L.; Wu, C.J., *et al.* Decreased mitochondrial apoptotic priming underlies stroma-mediated treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; 120: 3501-3509.
273. Hernandez, J.A.; Gonzalez, M. and Hernandez, J.M. [Chronic lymphocytic leukemia]. *Med Clin (Barc)* 2010; 135: 172-178.
274. Montserrat, E.; Bosch, F. and Rozman, C. B-cell chronic lymphocytic leukemia: recent progress in biology, diagnosis, and therapy. *Ann Oncol* 1997; 8 Suppl 1: 93-101.
275. Biswas, S.; Zhao, X.; Mone, A.P.; Mo, X.; Vargo, M.; Jarjoura, D., *et al.* Arsenic trioxide and ascorbic acid demonstrate promising activity against primary human CLL cells in vitro. *Leuk Res* 2010; 34: 925-931.
276. Redondo-Munoz, J.; Escobar-Diaz, E.; Hernandez Del Cerro, M.; Pandiella, A.; Terol, M.J.; Garcia-Marco, J.A., *et al.* Induction of B-chronic lymphocytic leukemia cell apoptosis by arsenic trioxide involves suppression of the phosphoinositide 3-kinase/Akt survival pathway via c-jun-NH2 terminal kinase activation and PTEN upregulation. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 4382-4391.
277. Emadi, A. and Gore, S.D. Arsenic trioxide - An old drug rediscovered. *Blood reviews* 2010; 24: 191-199.
278. Iland, H.J. and Seymour, J.F. Role of arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol* 2013; 14: 170-184.
279. Murgo, A.J. Clinical trials of arsenic trioxide in hematologic and solid tumors: overview of the National Cancer Institute Cooperative Research and Development Studies. *Oncologist* 2001; 6 Suppl 2: 22-28.
280. Liu, J.; Kadiiska, M.B.; Liu, Y.; Lu, T.; Qu, W. and Waalkes, M.P. Stress-related gene expression in mice treated with inorganic arsenicals. *Toxicol Sci* 2001; 61: 314-320.
281. Rea, M.A.; Gregg, J.P.; Qin, Q.; Phillips, M.A. and Rice, R.H. Global alteration of gene expression in human keratinocytes by inorganic arsenic. *Carcinogenesis* 2003; 24: 747-756.
282. Wu, J.; Liu, J.; Waalkes, M.P.; Cheng, M.L.; Li, L.; Li, C.X., *et al.* High dietary fat exacerbates arsenic-induced liver fibrosis in mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233: 377-384.
283. Yih, L.H.; Peck, K. and Lee, T.C. Changes in gene expression profiles of human fibroblasts in response to sodium arsenite treatment. *Carcinogenesis* 2002; 23: 867-876.
284. Zhou, P.; Kalakonda, N. and Comenzo, R.L. Changes in gene expression profiles of multiple myeloma cells induced by arsenic trioxide (ATO): possible mechanisms to explain ATO resistance in vivo. *Br J Haematol* 2005; 128: 636-644.
285. Ryter, S.W.; Kvam, E. and Tyrrell, R.M. Heme oxygenase activity. Current methods and applications. *Methods Mol Biol* 2000; 99: 369-391.
286. Cabello, C.M.; Bair, W.B., 3rd and Wondrak, G.T. Experimental therapeutics: targeting the redox Achilles heel of cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 2007; 8: 1022-1037.
287. Kong, Q.; Beel, J.A. and Lillehei, K.O. A threshold concept for cancer therapy. *Med Hypotheses* 2000; 55: 29-35.
288. Pelicano, H.; Carney, D. and Huang, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004; 7: 97-110.
289. Merkel, O.; Heyder, C.; Asslaber, D.; Hamacher, F.; Tinhofer, I.; Holler, C., *et al.* Arsenic trioxide induces apoptosis preferentially in B-CLL cells of patients with unfavourable prognostic factors including del17p13. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2008; 86: 541-552.

290. Roecklein, B.A. and Torok-Storb, B. Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. *Blood* 1995; 85: 997-1005.
291. Stacchini, A.; Aragno, M.; Vallario, A.; Alfano, A.; Circosta, P.; Gottardi, D., *et al.* MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leuk Res* 1999; 23: 127-136.
292. Bailon, E.; Ugarte-Berzal, E.; Amigo-Jimenez, I.; Van den Steen, P.; Opdenakker, G.; Garcia-Marco, J.A., *et al.* Overexpression of progelatinase B/proMMP-9 affects migration regulatory pathways and impairs chronic lymphocytic leukemia cell homing to bone marrow and spleen. *J Leukoc Biol* 2014; 96: 185-199.
293. Morodomi, T.; Ogata, Y.; Sasaguri, Y.; Morimatsu, M. and Nagase, H. Purification and characterization of matrix metalloproteinase 9 from U937 monocytic leukaemia and HT1080 fibrosarcoma cells. *Biochem J* 1992; 285 (Pt 2): 603-611.
294. Irizarry, R.A.; Bolstad, B.M.; Collin, F.; Cope, L.M.; Hobbs, B. and Speed, T.P. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: e15.
295. Bolstad, B.M.; Irizarry, R.A.; Astrand, M. and Speed, T.P. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 2003; 19: 185-193.
296. Tusher, V.G.; Tibshirani, R. and Chu, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 5116-5121.
297. Benjamini, Y.; Drai, D.; Elmer, G.; Kafkafi, N. and Golani, I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* 2001; 125: 279-284.
298. Shibahara, S. The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism. *Tohoku J Exp Med* 2003; 200: 167-186.
299. Karin, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995; 270: 16483-16486.
300. Mannello, F.; Luchetti, F.; Falcieri, E. and Papa, S. Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis. *Apoptosis* 2005; 10: 19-24.
301. Burger, J.A. Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape. *Curr Opin Oncol* 2012; 24: 643-649.
302. Burger, J.A. and Gribben, J.G. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol* 2014; 24: 71-81.
303. Triebel, S.; Blaser, J.; Reinke, H. and Tschesche, H. A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett* 1992; 314: 386-388.
304. Bailon, E.; Ugarte-Berzal, E.; Amigo-Jimenez, I.; Van den Steen, P.; Opdenakker, G.; Garcia-Marco, J.A., *et al.* Overexpression of progelatinase B/proMMP-9 affects migration regulatory pathways and impairs chronic lymphocytic leukemia cell homing to bone marrow and spleen. *J Leukoc Biol* 2014;
305. Balakrishnan, K. and Gandhi, V. Bcl-2 antagonists: a proof of concept for CLL therapy. *Invest New Drugs* 2013; 31: 1384-1394.
306. Gandhi, V.; Balakrishnan, K. and Chen, L.S. Mcl-1: the 1 in CLL. *Blood* 2008; 112: 3538-3540.
307. Vincent, A.M.; Cawley, J.C. and Burthem, J. Integrin function in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1996; 87: 4780-4788.

308. Jain, N.; Zhang, T.; Kee, W.H.; Li, W. and Cao, X. Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner. *J Biol Chem* 1999; 274: 24392-24400.
309. Beg, A.A. and Baldwin, A.S., Jr. The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev* 1993; 7: 2064-2070.
310. Barragan, M.; de Frias, M.; Iglesias-Serret, D.; Campas, C.; Castano, E.; Santidrian, A.F., *et al.* Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C{beta}. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 1473-1479.
311. Brown, J.R.; Byrd, J.C.; Coutre, S.E.; Benson, D.M.; Flinn, I.W.; Wagner-Johnston, N.D., *et al.* Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110delta, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; 123: 3390-3397.
312. Chang, J.E. and Kahl, B.S. PI3-kinase inhibitors in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2014; 9: 33-43.
313. Flinn, I.W.; Kahl, B.S.; Leonard, J.P.; Furman, R.R.; Brown, J.R.; Byrd, J.C., *et al.* Idelalisib, a selective inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase-delta, as therapy for previously treated indolent non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2014; 123: 3406-3413.
314. Merkel, O.; Heyder, C.; Asslaber, D.; Hamacher, F.; Tinhofer, I.; Holler, C., *et al.* Arsenic trioxide induces apoptosis preferentially in B-CLL cells of patients with unfavourable prognostic factors including del17p13. *J Mol Med (Berl)* 2008; 86: 541-552.
315. Poss, K.D. and Tonegawa, S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 10925-10930.
316. Carpena, E.; Andreani, G. and Isani, G. Metallothionein functions and structural characteristics. *J Trace Elem Med Biol* 2007; 21 Suppl 1: 35-39.
317. Albores, A.; Koropatnick, J.; Cherian, M.G. and Zelazowski, A.J. Arsenic induces and enhances rat hepatic metallothionein production in vivo. *Chem Biol Interact* 1992; 85: 127-140.
318. Del Razo, L.M.; Quintanilla-Vega, B.; Brambila-Colombres, E.; Calderon-Aranda, E.S.; Manno, M. and Albores, A. Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 177: 132-148.
319. Ercal, N.; Gurer-Orhan, H. and Aykin-Burns, N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 2001; 1: 529-539.
320. Liu, J.; Benbrahim-Tallaa, L.; Qian, X.; Yu, L.; Xie, Y.; Boos, J., *et al.* Further studies on aberrant gene expression associated with arsenic-induced malignant transformation in rat liver TRL1215 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 216: 407-415.
321. Ryter, S.W. and Tyrrell, R.M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 289-309.
322. Kumar, A.; Collins, H.M.; Scholefield, J.H. and Watson, S.A. Increased type-IV collagenase (MMP-2 and MMP-9) activity following preoperative radiotherapy in rectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 82: 960-965.
323. Nirmala, C.; Jasti, S.L.; Sawaya, R.; Kyritsis, A.P.; Konduri, S.D.; Ali-Osman, F., *et al.* Effects of radiation on the levels of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 during morphogenic glial-endothelial cell interactions. *Int J Cancer* 2000; 88: 766-771.
324. Hovdenak, N.; Wang, J.; Sung, C.C.; Kelly, T.; Fajardo, L.F. and Hauer-Jensen, M. Clinical significance of increased gelatinolytic activity in the rectal mucosa during external beam radiation therapy of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 53: 919-927.

325. Wei, L.H.; Lai, K.P.; Chen, C.A.; Cheng, C.H.; Huang, Y.J.; Chou, C.H., *et al.* Arsenic trioxide prevents radiation-enhanced tumor invasiveness and inhibits matrix metalloproteinase-9 through downregulation of nuclear factor kappaB. *Oncogene* 2005; 24: 390-398.
326. Segarra, M.; Lozano, E.; Corbera-Bellalta, M.; Vilardell, C.; Cibeira, M.T.; Esparza, J., *et al.* Thalidomide decreases gelatinase production by malignant B lymphoid cell lines through disruption of multiple integrin-mediated signaling pathways. *Haematologica* 2010; 95: 456-463.
327. Nyormoi, O.; Mills, L. and Bar-Eli, M. An MMP-2/MMP-9 inhibitor, 5a, enhances apoptosis induced by ligands of the TNF receptor superfamily in cancer cells. *Cell Death Differ* 2003; 10: 558-569.
328. Meyer, E.; Vollmer, J.Y.; Bovey, R. and Stamenkovic, I. Matrix metalloproteinases 9 and 10 inhibit protein kinase C-potentiated, p53-mediated apoptosis. *Cancer Res* 2005; 65: 4261-4272.
329. Chetty, C.; Lakka, S.S.; Bhoopathi, P.; Gondi, C.S.; Veeravalli, K.K.; Fassett, D., *et al.* Urokinase plasminogen activator receptor and/or matrix metalloproteinase-9 inhibition induces apoptosis signaling through lipid rafts in glioblastoma xenograft cells. *Mol Cancer Ther* 2010; 9: 2605-2617.
330. Gingis-Velitski, S.; Loven, D.; Benayoun, L.; Munster, M.; Bril, R.; Voloshin, T., *et al.* Host response to short-term, single-agent chemotherapy induces matrix metalloproteinase-9 expression and accelerates metastasis in mice. *Cancer Res* 2011; 71: 6986-6996.
331. Zeng, Z.; Samudio, I.J.; Munsell, M.; An, J.; Huang, Z.; Estey, E., *et al.* Inhibition of CXCR4 with the novel RCP168 peptide overcomes stroma-mediated chemoresistance in chronic and acute leukemias. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 3113-3121.
332. Buchner, M.; Baer, C.; Prinz, G.; Dierks, C.; Burger, M.; Zenz, T., *et al.* Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010; 115: 4497-4506.
333. Lunghi, P.; Giuliani, N.; Mazzer, L.; Lombardi, G.; Ricca, M.; Corradi, A., *et al.* Targeting MEK/MAPK signal transduction module potentiates ATO-induced apoptosis in multiple myeloma cells through multiple signaling pathways. *Blood* 2008; 112: 2450-2462.
334. Wang, R.; Xia, L.; Gabrilove, J.; Waxman, S. and Jing, Y. Downregulation of Mcl-1 through GSK-3beta activation contributes to arsenic trioxide-induced apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 2013; 27: 315-324.
335. Baysan, A.; Yel, L.; Gollapudi, S.; Su, H. and Gupta, S. Arsenic trioxide induces apoptosis via the mitochondrial pathway by upregulating the expression of Bax and Bim in human B cells. *Int J Oncol* 2007; 30: 313-318.
336. Morales, A.A.; Gutman, D.; Lee, K.P. and Boise, L.H. BH3-only proteins Noxa, Bmf, and Bim are necessary for arsenic trioxide-induced cell death in myeloma. *Blood* 2008; 111: 5152-5162.
337. de la Fuente, M.T.; Casanova, B.; Moyano, J.V.; Garcia-Gila, M.; Sanz, L.; Garcia-Marco, J., *et al.* Engagement of alpha4beta1 integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 495-502.
338. Vandooren, J.; Van den Steen, P.E. and Opdenakker, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2013; 48: 222-272.
339. Ghamlouch, H.; Ouled-Haddou, H.; Damaj, G.; Royer, B.; Gubler, B. and Marolleau, J.P. A combination of cytokines rescues highly purified leukemic CLL B-cells from spontaneous apoptosis in vitro. *PLoS One* 2013; 8: e60370.

340. ten Hacken, E. and Burger, J.A. Microenvironment dependency in Chronic Lymphocytic Leukemia: The basis for new targeted therapies. *Pharmacol Ther* 2014; 144: 338-348.
341. Barragan, M.; Bellosillo, B.; Campas, C.; Colomer, D.; Pons, G. and Gil, J. Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2002; 99: 2969-2976.
342. Bernal, A.; Pastore, R.D.; Asgary, Z.; Keller, S.A.; Cesarman, E.; Liou, H.C., *et al.* Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood* 2001; 98: 3050-3057.
343. Hu, X.; Haney, N.; Kropp, D.; Kabore, A.F.; Johnston, J.B. and Gibson, S.B. Lysophosphatidic acid (LPA) protects primary chronic lymphocytic leukemia cells from apoptosis through LPA receptor activation of the anti-apoptotic protein AKT/PKB. *J Biol Chem* 2005; 280: 9498-9508.
344. Jones, D.T.; Ganeshaguru, K.; Anderson, R.J.; Jackson, T.R.; Bruckdorfer, K.R.; Low, S.Y., *et al.* Albumin activates the AKT signaling pathway and protects B-chronic lymphocytic leukemia cells from chlorambucil- and radiation-induced apoptosis. *Blood* 2003; 101: 3174-3180.
345. Nedellec, S.; Renaudineau, Y.; Bordron, A.; Berthou, C.; Porakishvili, N.; Lydyard, P.M., *et al.* B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients. *J Immunol* 2005; 174: 3749-3756.
346. Plate, J.M. PI3-kinase regulates survival of chronic lymphocytic leukemia B-cells by preventing caspase 8 activation. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 1519-1529.
347. Ringshausen, I.; Schneller, F.; Bogner, C.; Hipp, S.; Duyster, J.; Peschel, C., *et al.* Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood* 2002; 100: 3741-3748.
348. Wickremasinghe, R.G.; Ganeshaguru, K.; Jones, D.T.; Lindsay, C.; Spanswick, V.J.; Hartley, J.A., *et al.* Autologous plasma activates Akt/protein kinase B and enhances basal survival and resistance to DNA damage-induced apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 2001; 114: 608-615.
349. Hewamana, S.; Alghazal, S.; Lin, T.T.; Clement, M.; Jenkins, C.; Guzman, M.L., *et al.* The NF-kappaB subunit Rel A is associated with in vitro survival and clinical disease progression in chronic lymphocytic leukemia and represents a promising therapeutic target. *Blood* 2008; 111: 4681-4689.
350. Pickering, B.M.; de Mel, S.; Lee, M.; Howell, M.; Habens, F.; Dallman, C.L., *et al.* Pharmacological inhibitors of NF-kappaB accelerate apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Oncogene* 2007; 26: 1166-1177.
351. Barragan, M.; Campas, C.; Bellosillo, B. and Gil, J. Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 1865-1870.
352. Cuesta-Mateos, C.; Lopez-Giral, S.; Alfonso-Perez, M.; de Soria, V.G.; Loscertales, J.; Guasch-Vidal, S., *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: 756-764, 764 e751-754.
353. zum Buschenfelde, C.M.; Wagner, M.; Lutzny, G.; Oelsner, M.; Feuerstacke, Y.; Decker, T., *et al.* Recruitment of PKC-beta11 to lipid rafts mediates apoptosis-resistance in chronic lymphocytic leukemia expressing ZAP-70. *Leukemia* 2010; 24: 141-152.

354. Lu, K.; Fang, X.S.; Feng, L.L.; Jiang, Y.J.; Zhou, X.X.; Liu, X., *et al.* The STAT3 inhibitor WP1066 reverses the resistance of chronic lymphocytic leukemia cells to histone deacetylase inhibitors induced by interleukin-6. *Cancer Lett* 2015; 359: 250-258.
355. Rozovski, U.; Wu, J.Y.; Harris, D.M.; Liu, Z.; Li, P.; Hazan-Halevy, I., *et al.* Stimulation of the B-cell receptor activates the JAK2/STAT3 signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2014; 123: 3797-3802.
356. Crassini, K.; Stevenson, W.S.; Mulligan, S.P. and Best, O.G. The MEK1/2 inhibitor, MEKi-1, induces cell death in Chronic Lymphocytic Leukemia cells under conditions that mimic the tumor microenvironment and is synergistic with fludarabine. *Leuk Lymphoma* 2015: 1-29.
357. Contri, A.; Brunati, A.M.; Trentin, L.; Cabrelle, A.; Miorin, M.; Cesaro, L., *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 369-378.
358. Zonta, F.; Pagano, M.A.; Trentin, L.; Tibaldi, E.; Frezzato, F.; Gattazzo, C., *et al.* Lyn-mediated procaspase 8 dimerization blocks apoptotic signaling in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; 123: 875-883.
359. Tibaldi, E.; Brunati, A.M.; Zonta, F.; Frezzato, F.; Gattazzo, C.; Zambello, R., *et al.* Lyn-mediated SHP-1 recruitment to CD5 contributes to resistance to apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2011; 25: 1768-1781.
360. Veldurthy, A.; Patz, M.; Hagist, S.; Pallasch, C.P.; Wendtner, C.M.; Hallek, M., *et al.* The kinase inhibitor dasatinib induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro with preference for a subgroup of patients with unmutated IgVH genes. *Blood* 2008; 112: 1443-1452.
361. Balakrishnan, K.; Burger, J.A.; Fu, M.; Doifode, T.; Wierda, W.G. and Gandhi, V. Regulation of Mcl-1 expression in context to bone marrow stromal microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasia* 2014; 16: 1036-1046.
362. Sharma, A.; Singh, K.; Mazumder, S.; Hill, B.T.; Kalaycio, M. and Almasan, A. BECN1 and BIM interactions with MCL-1 determine fludarabine resistance in leukemic B cells. *Cell Death Dis* 2013; 4: e628.
363. Geserick, P.; Wang, J.; Feoktistova, M. and Leverkus, M. The ratio of Mcl-1 and Noxa determines ABT737 resistance in squamous cell carcinoma of the skin. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1412.
364. Tromp, J.M.; Geest, C.R.; Breijl, E.C.; Elias, J.A.; van Laar, J.; Luijckx, D.M., *et al.* Tipping the Noxa/Mcl-1 balance overcomes ABT-737 resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 487-498.
365. Alves, N.L.; Derks, I.A.; Berk, E.; Spijker, R.; van Lier, R.A. and Eldering, E. The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells. *Immunity* 2006; 24: 703-716.
366. Vanhaesebroeck, B.; Welham, M.J.; Kotani, K.; Stein, R.; Warne, P.H.; Zvelebil, M.J., *et al.* P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 4330-4335.
367. Abrams, S.T.; Lakum, T.; Lin, K.; Jones, G.M.; Treweek, A.T.; Farahani, M., *et al.* B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells is regulated by overexpressed active protein kinase Cbeta1. *Blood* 2007; 109: 1193-1201.
368. Saijo, K.; Mecklenbrauer, I.; Santana, A.; Leitger, M.; Schmedt, C. and Tarakhovskiy, A. Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the I kappaB kinase alpha. *J Exp Med* 2002; 195: 1647-1652.
369. Kang, S.W.; Wahl, M.I.; Chu, J.; Kitaura, J.; Kawakami, Y.; Kato, R.M., *et al.* PKCbeta modulates antigen receptor signaling via regulation of Btk membrane localization. *EMBO J* 2001; 20: 5692-5702.

370. Lutzny, G.; Kocher, T.; Schmidt-Suppran, M.; Rudelius, M.; Klein-Hitpass, L.; Finch, A.J., *et al.* Protein kinase c-beta-dependent activation of NF-kappaB in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vivo. *Cancer Cell* 2013; 23: 77-92.
371. Holler, C.; Pinon, J.D.; Denk, U.; Heyder, C.; Hofbauer, S.; Greil, R., *et al.* PKCbeta is essential for the development of chronic lymphocytic leukemia in the TCL1 transgenic mouse model: validation of PKCbeta as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; 113: 2791-2794.
372. Alessi, D.R. and Cohen, P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 55-62.
373. Vogt, P.K. and Hart, J.R. PI3K and STAT3: a new alliance. *Cancer Discov* 2011; 1: 481-486.
374. Allen, J.C.; Talab, F.; Zuzel, M.; Lin, K. and Slupsky, J.R. c-Abl regulates Mcl-1 gene expression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2011; 117: 2414-2422.
375. Kabir, N.N.; Ronnstrand, L. and Kazi, J.U. Protein kinase C expression is deregulated in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013; 54: 2288-2290.
376. Puthier, D.; Bataille, R. and Amiot, M. IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur J Immunol* 1999; 29: 3945-3950.
377. Liu, H.; Ma, Y.; Cole, S.M.; Zander, C.; Chen, K.H.; Karras, J., *et al.* Serine phosphorylation of STAT3 is essential for Mcl-1 expression and macrophage survival. *Blood* 2003; 102: 344-352.
378. Liu, H.; Yang, J.; Yuan, Y.; Xia, Z.; Chen, M.; Xie, L., *et al.* Regulation of Mcl-1 by constitutive activation of NF-kappaB contributes to cell viability in human esophageal squamous cell carcinoma cells. *BMC Cancer* 2014; 14: 98.
379. Cosimo, E.; McCaig, A.M.; Carter-Brzezinski, L.J.; Wheadon, H.; Leach, M.T.; Le Ster, K., *et al.* Inhibition of NF-kappaB-mediated signaling by the cyclin-dependent kinase inhibitor CR8 overcomes prosurvival stimuli to induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 2393-2405.
380. Pepper, C.; Lin, T.T.; Pratt, G.; Hewamana, S.; Brennan, P.; Hiller, L., *et al.* Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood* 2008; 112: 3807-3817.
381. Doi, K.; Liu, Q.; Gowda, K.; Barth, B.M.; Claxton, D.; Amin, S., *et al.* Maritoclax induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells with elevated Mcl-1 expression. *Cancer Biol Ther* 2014; 15: 1077-1086.
382. Pandey, M.K.; Gowda, K.; Doi, K.; Sharma, A.K.; Wang, H.G. and Amin, S. Proteasomal degradation of Mcl-1 by maritoclax induces apoptosis and enhances the efficacy of ABT-737 in melanoma cells. *PLoS One* 2013; 8: e78570.

7.2. Otras fuentes

DAVID: <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>

Gene Cards® The Human Gene Compendium: <http://www.genecards.org/>

UniProt: <http://www.uniprot.org/>

Abreviaturas

8. ABREVIATURAS

14-3-3: *Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein*, proteína activadora de tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa

Ac, Acs: Anticuerpo, anticuerpos

AP-1: *Activating protein-1*, proteína activadora 1

Apaf-1: *Apoptosis protease-activating factor-1*, factor 1 activador de proteasas de apoptosis

APRIL: *A proliferation-inducing ligand*, ligando que induce proliferación

ATM: *Ataxia telangiectasia mutated*, mutado en ataxia telangiectasia

ATO: *Arsenic trioxide*, trióxido de arsénico

ATP: *Adenosine triphosphate*, adenosina trifosfato

ATRA: *All-trans retinoic acid*, ácido trans-retinoico

Bad: *Bcl-2-antagonist of cell death*, antagonista de Bcl-2 en la muerte celular

BAFF: *B-cell activating factor*, factor activador de células B

BAFFR: *B-cell activating factor receptor*, receptor de BAFF

Bak: *Bcl-2-antagonist/killer-1*, antagonista de Bcl-2/asesino-1

Bax: *Bcl-2-associated X protein*, proteína X asociada a Bcl-2

BCA: *Bicinchoninic acid*, ácido bicinconínico

Bcl-2: *B cell lymphoma protein 2*, proteína 2 de linfoma de células B

Bcl-2: *B-cell lymphoma protein 2*, proteína 2 de linfoma de células B

Bcl-2a: *Bcl-2 isoform a*, isoforma a de Bcl-2

Bcl2b: *Bcl-2 isoform b*, isoforma b de Bcl-2

Bcl-B: *Apoptosis regulator Bcl-B/Bcl-2-like protein 10*, regulador de la apoptosis Bcl-B/proteína 10 similar a Bcl-2

Bcl-w: *Bcl-2-like 2 protein*, proteína 2 similar a Bcl-2

Bcl-x: *Bcl-2-like protein 1*, proteína 1 similar a Bcl-2

Bcl-xL: *Bcl-2-related protein long form of Bcl-x*, proteína relacionada con Bcl-2 forma larga de Bcl-x

Bcl-xS: *Bcl-2-related protein short isoform*, isoforma corta de la proteína relacionada con Bcl-2

BCMA: *B-cell maturation protein*, proteína de maduración de células B

BCR: *B-cell receptor*, receptor de célula B

Abreviaturas

- Bfl-1: *Bcl-2 related gene in fetal liver/Bcl-2-related protein A1*, gen relacionado con Bcl-2 en hígado fetal
- BH: *Bcl-2 homology domain*, dominio de homología a Bcl-2
- Bid: *BH3-interacting domain death agonist*, dominio agonista de muerte que interacciona con BH3
- Bik: *Bcl-2-interacting killer*, asesino que interacciona con Bcl-2
- Bim: *Bcl-2-interacting mediator of cell death*, mediador de muerte celular que interacciona con Bcl-2
- BimEL: *Bim extra long isoform*, isoforma extra larga de Bim
- BimL: *Bim long isoform*, isoforma larga de Bim
- BimS: *Bim short isoform*, isoforma corta de Bim
- BIRC3, *Baculoviral IAP (Inhibitor of apoptosis protein) repeat-containing protein 3*, proteína 3 conteniendo la repetición de IAP (proteína inhibidora de la apoptosis) baculoviral
- Bmf: *Bcl-2 modifying factor*, factor modificador de Bcl-2
- BMSCs: *Bone marrow stromal cells*, células estromales de médula ósea
- Bok: *Bcl-2 related ovarian killer*, asesino de ovario relacionado con la familia Bcl-2
- BSA: *Bovine serum albumin*, albúmina de suero bovino
- Btk: *Bruton tyrosine kinase*, tirosina quinasa de Bruton
- cAMP: *Cyclic adenosine monophosphate*, adenosina monofosfato cíclica
- Caspasa: *CysteinyI aspartic acid protease*, cisteín-ácido aspártico proteasas
- CCL: *Chemokine (C-C motif) ligand*, ligando quimioquina con el motivo C-C
- CCR: *C-C chemokine receptor*, receptores de quimioquinas C-C
- CDKs: *Cyclin-dependent kinases*, quinasas dependientes de ciclinas
- cDNA: *Complementary DNA*, DNA complementario
- c-FLIP: *FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-like inhibitory protein*, proteína inhibidora similar a FLICE
- CoA: Coenzima A
- CoPP: Protoporfirina de cobalto
- cRNA: *Complementary RNA*, RNA complementario
- CuPP: Protoporfirina de cobre
- CXCL: *Chemokine (C-X-C motif) ligand*, ligando quimioquina con el motivo C-X-C
- CXCR: *C-X-C chemokine receptor*, receptor de quimioquinas C-X-C
- DD: *Death domain*, dominio de muerte

- DLL: *Delta-like ligand*, ligando similar a Delta (de *Drosophila melanogaster*)
- DMSO: *Dimethyl sulfoxide*, dimetilsulfóxido
- DNA: *Desoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico
- ECL: *Enhanced chemiluminescence*, método de quimioluminiscencia mejorada
- EGTA: *Ethylene glycol tetraacetic acid*, ácido etilenglicol tetraacético
- ERK: *Extracellular signal-regulated kinase*, quinasa regulada por señales extracelulares
- FBS: *Fetal bovine serum*, suero bovino fetal
- FDCs: *Follicular dendritic cells*, células Dendríticas Foliculares
- FDR: *False discovery rate*, tasa de falsos positivos
- FGF: *Fibroblast growth factor*, factor de crecimiento de fibroblastos
- FITC: *Fluorescein isothiocyanate*, isotiocianato de fluoresceína
- FOXO3A: *Forkhead box protein O3A*, proteína O3A con caja "forkhead"
- GAPDH: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
- GO: *Gene ontology*, Ontología Génica
- GPCRs: *G protein-coupled receptors*, receptores asociados a proteínas G
- GSK3: *Glycogen synthase kinase*, quinasa de glucógeno sintasa
- HMOX: *Hemeoxygenase*, hemooxigenasa
- Hrk: *Harakiri/death protein 5*, proteína de muerte 5/"harakiri"
- HRP: *Horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano picante
- HSPs: *Heat shock proteins*, proteínas de choque térmico
- ICAM-1: *Intercellular adhesion molecule 1*, molécula 1 de adhesión intercelular
- IFN γ : *Interferon gamma*, interferón gamma
- Ig, Igs: Inmunoglobulina, inmunoglobulinas
- IGHV: *Immunoglobulin heavy-chain variable region*, región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas
- IL: *Interleukin*, interleuquina
- IP: inmunoprecipitación
- I κ B α : *NF-kappa-B inhibitor alpha*, inhibidor alfa de NF- κ B
- Jagged: *human homolog of the Drosophila jagged protein*, homólogo humano de la proteína Jagged de *Drosophila melanogaster*

- JNK: *Jun N-terminal kinase*, quinasa de Jun en N-terminal
- LLC: Leucemia linfocítica crónica B
- LPS: Lipopolisacárido
- Lyn: *Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase/Tyrosine-protein kinase Lyn*, nueva proteína tirosina quinasa relacionada con Lck/Yes/tirosina quinasa Lyn
- MAPKs: *Mitogen-activated protein kinases*, quinasas activadas por mitógenos
- Mcl-1: *Myeloid cell leukemia sequence 1*, secuencia 1 de leucemia de células mieloides
- Mcl-1L: *Myeloid cell leukemia 1 long isoform*, isoforma larga de Mcl-1
- Mcl-1S: *Myeloid cell leukemia 1 short isoform*, isoforma corta de Mcl-1
- MEK: *Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1*, quinasa 1 de especificidad dual de MAPK
- MFI: *Mean fluorescence intensity*, intensidad de fluorescencia media
- MMP: *Matrix metalloproteinase*, metaloproteínasa de matriz
- MMP-9: *Matrix Metalloproteinase-9*, metaloproteínasa de matriz-9
- MOMP: *Mitochondrial outer membrane permeabilization*, permeabilización de la membrana mitocondrial externa
- mRNA: *Messenger RNA*, RNA mensajero
- MSCs: *Mesenchymal stromal cells*, células estromales de origen mesenquimal
- mTOR: *Mammalian Target of Rapamycin*, diana de Rapamicina de mamíferos
- MTT: *3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide*, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- MWCO: *Molecular weight cut off*, umbral de peso molecular
- NAD(P)H: *Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)*, dinucleótido (fosfato) de nicotinamida y adenina
- NF-κB: *Nuclear factor κ B*, factor nuclear κ B
- NLCs: *Nurse-like cells*, células nodriza (de estirpe mieloides)
- NOTCH1: *Neurogenic locus notch homolog protein 1*, proteína 1 homóloga del *locus* neurogénico *notch* (de *Drosophila melanogaster*)
- Noxa: *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*, proteína 1 inducida por forbol-12-miristato-13-acetado (PMA)
- PBS: *Phosphate-buffered saline*, tampón fosfato salino
- PCR: *Polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa
- PEX9: *MMP-9 hemopexin domain*, dominio hemopexina de la MMP-9

Abreviaturas

- PI: *Propidium iodide*, yoduro de propidio
- PI3K: *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase*, quinasa de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
- PKA: *Protein kinase A*, proteína quinasa A
- PKC: *Protein kinase C*, proteína quinasa C
- PMA: *Phorbol-12-myristate-13-acetate*, forbol-12-miristato-13-acetado
- PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride*, fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- PP: Protoporfirina
- PS: *Phosphatidylserine*, fosfatidilserina
- PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*, fosfatasa y homólogo de tensina
- Puma: *TP53 upregulated modulator of apoptosis/Bcl-2 binding component 3*, modulador de la apoptosis inducido por TP53/componente 3 de unión a Bcl-2
- PKB/Akt: *Protein kinase B/Akt*, proteína quinasa B/Akt
- qPCR: *quantitative PCR*, PCR cuantitativa
- RhoGDI: *Rho GDP-dissociation inhibitor*, inhibidor de la disociación de GDP de Rho GTPasas
- RMA: *Robust Multi-Array Average*, media robusta multi-array
- RNA: *Ribonucleic acid*, ácido ribonucleico
- ROS: *Reactive oxygen species*, especies reactivas de oxígeno
- RT: *Room temperature*, temperatura ambiente
- RTKs: receptores con actividad tirosina quinasa
- RT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction*, PCR con transcripción reversa
- SAM: *Significance Analysis of Microarray*, análisis de significación de *microarrays*
- SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
- SF: *Specific fluorescence*, fluorescencia específica
- SF3B1: *Splicing factor 3b, subunit 1*; subunidad 1 del factor de *splicing* 3b
- SFK: *Src family kinases*, quinasas de la familia de Src
- SnPP: Protoporfirina de estaño
- STAT: *Signal transducer and activator of transcription*, transductor de señales y activador de la transcripción
- STAT3: *Signal transducer and activator of transcription 3*, transductor de señales y activador de la transcripción 3

Abreviaturas

- TAC1: *Transmembrane activator and CAML interactor*, activador transmembrana que interacciona con CAML
- tBcl-2: *Truncated Bcl-2*, Bcl-2 truncado
- tBcl-xL: *Truncated Bcl-2*, Bcl-2 truncado
- tBid: *Truncated Bid*, Bid truncado
- TBP: *TATA-binding protein*, proteína de unión a la caja TATA
- TBS: *Tris-buffered saline*, tampón tris salino
- TBS-T: TBS-0.1% Tween®20
- TGFβR: *Transforming growth factor beta receptor*, receptor del factor de crecimiento transformante beta
- TLRs: *Toll-like receptors*, receptores tipo *Toll*
- TNF: *Tumor necrosis factor*, factor de necrosis tumoral
- TNFR: *Tumor necrosis factor receptor*, receptor del factor de necrosis tumoral
- TNFSF: *TNF superfamily*, superfamilia del TNF
- TNF-α, *Tumor necrosis factor alpha*, factor de necrosis tumoral alfa
- TNFα: *Tumor necrosis factor alpha*, factor alfa de necrosis tumoral
- TP53: *Cellular tumor antigen p53*, antígeno tumoral celular p53
- TPA: *12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate*, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
- VCAM-1: *Vascular cell adhesion molecule 1*, molécula 1 de adhesión de células vasculares
- VECs: *Vascular endothelial cells*, células endoteliales vasculares
- VEGF: *Vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento del endotelio vascular
- VEGFR2: *Vascular endothelial growth factor receptor 2*, receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular
- WNT: *Wingless-type MMTV (mouse mammary tumor virus) integration site family*, familia génica relacionada con el gen *Wingless* (de *Drosophila melanogaster*) que contiene un sitio de integración para el virus de tumor mamario de ratón
- XIAP: *X-chromosome-linked IAP*, proteína inhibidora de la apoptosis (IAP) ligada al cromosoma X
- ZAP-70: *70 kDa ξ-associated protein*, proteína asociada ξ de 70 kDa

Anexos

9. ANEXOS

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral han dado lugar a una serie de publicaciones científicas:

1. **Amigo-Jiménez, I.**; Bailón, E.; Ugarte-Berzal, E.; Aguilera-Montilla, N.; García-Marco, J.A. and García-Pardo, A. Matrix metalloproteinase-9 is involved in chronic lymphocytic leukemia cell response to fludarabine and arsenic trioxide. *PloS One*, 2014; 9(6):e99993.
2. Lozano-Santos, C.*; **Amigo-Jiménez, I.***; Nova-Gurumeta, S.; Pérez-Sanz, N.; García-Pardo, A.# and García-Marco, J.A.# Arsenic trioxide synergistically potentiates the cytotoxic effect of fludarabine in chronic lymphocytic leukemia cells by further inactivating the Akt and ERK signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015; 461(2): 243-248. * o #: *autores de equivalente contribución*.
3. **Amigo-Jiménez, I.**; Bailón, E.; Aguilera-Montilla, N.; Terol, M.J.; García-Marco, J.A. and García-Pardo, A. Bone marrow stroma-induced resistance of chronic lymphocytic leukemia cells to arsenic trioxide involves Mcl-1 upregulation and is overcome by inhibiting the PI3K δ or PKC β signaling pathways. (Enviado a publicación).
4. **Amigo-Jiménez, I.**; Aguilera-Montilla, N.; Bailón, E.; García-Pardo, A. Gene expression profile associated to apoptosis induced by arsenic trioxide in chronic lymphocytic leukemia cells: Focusing on hemoxygenase-1. (Manuscrito en preparación).

Además, el autor de esta Tesis Doctoral ha colaborado en otros proyectos del grupo, dando lugar a las siguientes publicaciones:

5. Ugarte-Berzal, E.; Bailón, E.; **Amigo-Jiménez, I.**; Vituri, C.L.; del Cerro, M.H.; Terol, M.J.; Albar, J.P.; García-Marco, J.A. and García-Pardo, A. A 17-residue sequence from the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) hemopexin domain binds $\alpha 4\beta 1$ integrin and inhibits MMP-9-induced functions in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Journal of Biochemical Chemistry*, 2012; 287(33):27601-27613.

6. Bailón, E.; Ugarte-Berzal, E.; **Amigo-Jiménez, I.**; Van den Steen, P.; Opdenakker, G.; García-Marco, J.A.; Terol, M.J.; Van den Steen, P.; Opdenakker, G.; García-Marco, J.A. and García-Pardo, A. Overexpression of progelatinase B/proMMP-9 affects migration regulatory pathways and impairs chronic lymphocytic leukemia cell homing to bone marrow and spleen. *Journal of Leukocyte Biology*, 2014; 96(2):185-199.
7. Ugarte-Berzal, E.; Bailón, E.; **Amigo-Jiménez, I.**; García-Marco, J.A. and García-Pardo, A. A novel CD44-binding peptide from the pro-matrix metalloproteinase-9 hemopexin domain impairs adhesion and migration of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Journal of Biochemical Chemistry*, 2014; 289(22):15340-15349.



Matrix Metalloproteinase-9 Is Involved in Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Response to Fludarabine and Arsenic Trioxide

Irene Amigo-Jiménez¹, Elvira Bailón¹, Estefanía Ugarte-Berzal¹, Noemí Aguilera-Montilla¹, José A. García-Marco², Angeles García-Pardo^{1*}

1 Cellular and Molecular Medicine Department, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain, **2** Hematology Unit, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain

Abstract

Background: Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) contributes to chronic lymphocytic leukemia (CLL) pathology by regulating cell migration and preventing spontaneous apoptosis. It is not known if MMP-9 is involved in CLL cell response to chemotherapy and we address this in the present study, using arsenic trioxide (ATO) and fludarabine as examples of cytotoxic drugs.

Methods: We used primary cells from the peripheral blood of CLL patients and MEC-1 cells stably transfected with an empty vector or a vector containing MMP-9. The effect of ATO and fludarabine was determined by flow cytometry and by the MTT assay. Expression of mRNA was measured by RT-PCR and qPCR. Secreted and cell-bound MMP-9 was analyzed by gelatin zymography and flow cytometry, respectively. Protein expression was analyzed by Western blotting and immunoprecipitation. Statistical analyses were performed using the two-tailed Student's t-test.

Results: In response to ATO or fludarabine, CLL cells transcriptionally upregulated MMP-9, preceding the onset of apoptosis. Upregulated MMP-9 primarily localized to the membrane of early apoptotic cells and blocking apoptosis with Z-VAD prevented MMP-9 upregulation, thus linking MMP-9 to the apoptotic process. Culturing CLL cells on MMP-9 or stromal cells induced drug resistance, which was overcome by anti-MMP-9 antibodies. Accordingly, MMP-9-MEC-1 transfectants showed higher viability upon drug treatment than Mock-MEC-1 cells, and this effect was blocked by silencing MMP-9 with specific siRNAs. Following drug exposure, expression of anti-apoptotic proteins (Mcl-1, Bcl-xL, Bcl-2) and the Mcl-1/Bim, Mcl-1/Noxa, Bcl-2/Bax ratios were higher in MMP-9-cells than in Mock-cells. Similar results were obtained upon culturing primary CLL cells on MMP-9.

Conclusions: Our study describes for the first time that MMP-9 induces drug resistance by modulating proteins of the Bcl-2 family and upregulating the corresponding anti-apoptotic/pro-apoptotic ratios. This is a novel role for MMP-9 contributing to CLL progression. Targeting MMP-9 in combined therapies may thus improve CLL response to treatment.

Citation: Amigo-Jiménez I, Bailón E, Ugarte-Berzal E, Aguilera-Montilla N, García-Marco JA, et al. (2014) Matrix Metalloproteinase-9 Is Involved in Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Response to Fludarabine and Arsenic Trioxide. PLoS ONE 9(6): e99993. doi:10.1371/journal.pone.0099993

Editor: Andreas Villunger, Innsbruck Medical University, Austria

Received: November 29, 2013; **Accepted:** May 21, 2014; **Published:** June 23, 2014

Copyright: © 2014 Amigo-Jiménez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants SAF2012-31613 (AGP) and RTICC (Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer) RD12/0036/0061 (AGP), from the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO), Spain; S2010/BMD-2314-Neoplasim (AGP) from the Comunidad de Madrid/European Union; and by a grant from the Fundación Puerta de Hierro, Madrid (JAGM). IAJ and EB were supported by the Junta de Ampliación de Estudios program, CSIC/EU, Spain. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: agarciapardo@cib.csic.es

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the accumulation of malignant CD5⁺ B lymphocytes in the peripheral blood and their progressive infiltration of lymphoid tissues [1,2]. Frontline therapies for CLL consist in the administration of the purine analogue fludarabine, alone or in combination with other drugs such as anti-CD20 monoclonal antibodies or kinase inhibitors [3–5]. Because CLL is a heterogeneous disease, patients carrying specific molecular markers such as del17p13, unmutated IgV_H and/or high expression of ZAP-70 or CD38, do not respond well to these treatments [4], making it crucial to continue

searching for new compounds useful in these cases. In this regard, arsenic trioxide (ATO), an efficient therapy in acute promyelocytic leukemia [6,7], has been shown to induce apoptosis in all CLL cases including those with unfavorable prognosis [8]. We previously reported that the mechanism by which ATO induces CLL cell death is via c-jun N-terminal kinase activation and PI3K/Akt downregulation and this was observed in all samples tested, regardless of their prognostic markers [9]. ATO may thus constitute an efficient alternative/complementary treatment for CLL.

As with most tumors, CLL cell response to therapy is influenced by the microenvironment, whose cellular and molecular components

provide survival signals that favor drug resistance [10,11]. A consistent component of CLL niches is matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) [12], which is also produced by CLL cells and upregulated by several stimuli [13–15]. Endogenous or/and exogenous MMP-9 binds to CLL cells via specific docking receptors and regulates cell migration [16]. Surface-bound MMP-9 also prevents CLL cell spontaneous apoptosis by a non-catalytic mechanism, consisting in Lyn/STAT3 activation and Mcl-1 upregulation [17], thus contributing to CLL progression.

It is not known if MMP-9 affects CLL cell response to chemotherapy. This is important to elucidate since MMP-9, as other MMPs, may play dual roles in apoptosis, either facilitating or antagonizing drug action [18,19]. To approach this issue, we have studied whether MMP-9 is modulated by fludarabine or ATO treatment and whether it is involved in the CLL cell response to these compounds. Using primary CLL cells and a CLL-derived cell line stably expressing MMP-9 [20], we show that MMP-9 contributes to chemoresistance by preventing downregulation of anti-apoptotic proteins.

Materials and Methods

Patients, cells and cell culture

Approval was obtained from the CSIC Bioethics Review Board for these studies. All patients signed an informed consent before blood was drawn. B-lymphocytes were purified from the 20 CLL samples listed in Table 1 as reported [9,17], using Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) centrifugation and, if necessary, negative selection with anti-CD3-conjugated Dynabeads (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway). The resulting B cell population was mostly >90% CD19⁺, determined on a Coulter Epics XL flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Primary stromal cells were obtained from a bone marrow sample of one CLL patient after 3 week culture in IMDM (Lonza, Amboise, France)/15% FBS, and used for up to 4 weeks. The HS-5 stromal cell line was obtained from Dr. Atanasio Pandiella (Cancer Research Center, Salamanca, Spain) and cultured in RPMI/10% FBS. The MEC-1 cell line, established from a CLL patient [21], was obtained from Dr. Enrique Ocio (Cancer Research Center, Salamanca), authenticated by short tandem repeat DNA typing (Secugen S.L., Madrid, Spain) and cultured in IMDM/10% FBS. MMP-9- and Mock-MEC-1 cells were generated by lentiviral transfection exactly as described [20]. Briefly, full-length human proMMP-9 DNA cloned in the pEGFP-N1 vector was amplified by PCR using cloned Pfu DNA polymerase (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and inserted into the pCR-Blunt vector (Blunt Zero PCR cloning kit, Invitrogen). After restriction enzyme digestion, DNA sequences were inserted into the pRRL sin18.CMV.IRES.eGFP lentiviral vector (Dr. Juan Carlos Ramirez, Viral Vector Unit, Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid). Control constructs (Mock) contained only GFP DNA. Viral stocks were obtained after vector transfection of HEK293T cells and used to infect MEC-1 cells. GFP-expressing cells were selected by several cell sorting steps until more than 95% of the cells were clearly positive for expression. Cells were maintained in IMDM medium (Lonza, Basel, Switzerland), 10% fetal bovine serum (FBS).

Antibodies and reagents

Rabbit polyclonal antibodies (RpAb) to MMP-9 (sc-6841R), Mcl-1 (sc-819), Bax (sc-526), Noxa (sc-52), Bcl-xL (sc-634), RhoGDI (sc-360), and mouse monoclonal Ab (mAb) to Bcl-2 (sc-509) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). RpAb to Bim (559685) was from BD Pharmingen (Franklin Lakes,

NJ). Rp IgG (isotype control for flow cytometry) was from Immunostep (Salamanca, Spain). mAb to vinculin (#V9131) was from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). mAbs to CD19 and CD5 were from Diaclone (Besançon, France). mAbs against CD38 (16BDH), CD44 (HP2/9), $\alpha 4$ integrin subunit (HP2/1, function blocking), $\alpha 4$ integrin subunit (HP1/7, inactive control, isotype matched for HP2/1 and HP2/9), CD45, and $\beta 1$ integrin subunit (Alex1/4) were from Dr. F. Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid, Spain). HRP-labeled Abs to rabbit or mouse Ig (used for Western blotting) were from Dako (Glostrup, Denmark). Alexa 488- and Alexa 647-labeled Abs (used for flow cytometry) were from Molecular Probes (Eugene, OR). Rabbit TrueBlot (18-8816-31) was from Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA). Bovine serum albumin (BSA) was from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany). Propidium iodide (PI), MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide), actinomycin D, arsenic trioxide (ATO), fludarabine (2-fluoroadenine-9- β -D-arabinofuranoside) and the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK were from Sigma-Aldrich. FITC-Annexin V was from Immunostep. MMP-9 was isolated from the conditioned medium of MMP-9-MEC-1 transfectants by gelatin-Sepharose affinity chromatography, as previously reported [17,22]. Purity and identity of the protein was assessed by gelatin zymography and Western blotting analyses (see below).

RT-PCR and RNA stabilization assays

Total RNA isolation and cDNA amplification were performed as described [17] using the following primers: MMP-9: 5'-TGGGCTACGTGACCTATGAC-3' and 5'-CAAAGGTGA-GAAGAGAGGGC-3'; *c-fos*: 5'-TACTACCACTACCCG-CAGA-3' and 5'-CAGGTTGGCAATCTCGGTCT-3'; *c-jun*: 5'-CGACAAGTAAGAGTGCGGGA-3' and 5'-CCCCGTGC-TGGACTGGATTA-3'; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): 5'-GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTA-3' and 5'-CGGCCATCACGCCACAGTTTC-3'. PCR analyses were performed for 25 cycles consisting of 1 min denaturation-95°C, 1 min annealing-59°C, 1 min polymerization-72°C (MMP-9/GAPDH) or 30 s denaturation-95°C, 30 s annealing-60°C, 45 s polymerization-72°C (*c-fos/c-jun*). To assess mRNA stability, CLL cells were cultured with or without 3 μ M ATO and after 20 h, 5 μ M actinomycin D was added. At various time points samples were collected and mRNA levels of MMP-9 and GAPDH were measured by RT-PCR. Bands were visualized by ethidium bromide staining and quantified using the MultiGauge V3.0 program (Fujifilm Global Lifescience, Düsseldorf, Germany).

Quantitative PCR (qPCR)

Quantitative PCR (qPCR) was performed using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the primers described above for MMP-9. The primers for TATA binding protein (TBP) were: 5'-CGGCTGTTAACTTCG-CCTTC-3' and 5'-CACACGCCAAGAACAGTGA-3'. Triplicate assays were performed, and results were normalized according to the expression levels of TBP RNA and expressed by using the $\Delta\Delta$ CT method for quantization.

RNA interference experiments

The siRNA sequence targeting human proMMP-9 was: sense 5'-CAUACCCUAUUGGAUCCAAdTdT-3' (targets bases 377–403); the siRNA sequence for negative control was: sense 5'-AUUGUAUGCGAUCGCAGACdTdT-3'. siRNA duplexes were verified to be specific for their targets by Blast search against the

Table 1. Clinical characteristics of CLL patients.

Patient	Sex/Age	Stage ^a	CD19 ^b	CD5 ^b	CD38/ZAP70 ^c	Membrane MMP-9 ^b	Ig Status	p53 status
P1	M/69	C/IV	88.0	11.2	-/+	15.8	ND	ND
P2	F/72	C/IV	95.0	97.6	-/+	18.4	Mutated	-
P3	M/70	B/II	91.5	99.5	+/+	2.5	Unmutated	-
P4	M/65	A/I	86.7	98.8	-/-	11.7	Mutated	-
P5	M/79	A/I	96.4	98.1	-/+	14.5	Unmutated	-
P6	M/79	B/II	96.2	83.2	+/+	6.6	Unmutated	-
P7	M/77	A/0	90.0	ND	+/ND	4.9	Unmutated	del-/mut+
P8	M/59	C/IV	95.9	86.6	+/+	1.0	ND	del-/mut+
P9	M/85	C/IV	91.5	5.0	+/ND	18.4	Unmutated	-
P10	F/73	A/II	97.3	26.2	-/-	1.9	Mutated	del-/mut+
P11	M/48	B/I	97.0	15.8	+/+	8.4	Unmutated	ND
P12	M/68	ND	95.6	26.6	+/ND	2.7	ND	-
P13	F/54	A/0	96.4	73.6	+/ND	15.8	Unmutated	-
P14	F/82	ND	95.3	52.9	+/ND	6.8	Unmutated	del-/mut+
P15	F/70	C/IV	93.0	91.0	+/ND	7.3	ND	ND
P16	F/ND	ND	93.1	95.1	+/ND	ND	ND	ND
P17	M/71	B/II	91.3	98.8	+/+	9.1	ND	-
P18	M/80	ND	90.1	44.1	+/ND	15.5	ND	ND
P19	M/62	ND	90.8	84.8	+/ND	11.5	ND	ND
P20	M/68	C/IV	90.7	83.7	-/ND	20.4	Mutated	-

^aClinical stage according to references [1,2].
^bPercentage of cells expressing this marker.
^cThe coexpression of CD38 and ZAP-70 has clinical prognostic value [1,2].
 ND, not determined.
 doi:10.1371/journal.pone.0099993.t001

human genome and were custom-made by Sigma-Aldrich. 1.5×10^6 Mock- or MMP-9-MEC-1 cells were nucleofected with 30 nM siRNAs using solution V and programme T-01 (Amaxa, Cologne, Germany), and assayed 24 h after transfection. Efficiency of transfection was confirmed by gelatin zymography and Western blot analyses.

Cell viability assays

1.5×10^5 CLL cells in RPMI/0.1% FBS were incubated with ATO, fludarabine or vehicle and cell viability was determined after 24 (ATO) or 48 (fludarabine) h on a Coulter Epics XL flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA), using FITC-Annexin V and PI. In some experiments, live (Annexin V⁻/PI⁻) and early apoptotic (Annexin V⁺/PI⁻) cells were separated on a FACS Vantage cell sorter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). For MTT assays, 0.75×10^5 MEC-1 cells in IMDM/0.1% FBS were incubated with 50 μ g MTT for 4 h in the dark. The blue MTT formazan precipitate was dissolved in isopropanol-HCl (24:1) and the absorbance at 540 nm was determined on a Multiskan Bichromatic microplate reader (Labsystems, Helsinki, Finland).

Cell fractionation

30×10^6 CLL cells were serum-starved for 1 h and incubated with 3 μ M ATO or vehicle for 24 h. Cells were collected, washed 1 \times with cold PBS, and incubated (15 min, 4°C) in 250 μ l of ice-cold hypotonic digitonin buffer (5 mM Tris pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 20 μ g/ml digitonin), containing a protease/phosphatase inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Cytosolic (soluble) and membrane (pellet) fractions were separated by centrifugation. The pellet was washed 1 \times with ice-cold PBS and extracted with 125 μ l of NP-40 lysis buffer (10 mM Tris pH 7.5, 40 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1% NP-40, protease inhibitors). After 20 min at 4°C lysates were clarified by centrifugation. For MEC-1 transfectants, 5×10^6 Mock- or MMP-9-cells were serum-starved for 3 h, washed with cold PBS, and incubated in 500 μ l of ice-cold hypotonic digitonin buffer (containing 40 μ g/ml digitonin). After separation of the cell fractions the pellet was extracted in 100 μ l of NP-40 lysis buffer (containing 0.2% NP-40) and analysis continued as above. Soluble proteins in membrane and cytosolic fractions were quantitated using the Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL) and analyzed by gelatin zymography. RhoGDI (typical cytosolic protein) and CD45 (typical membrane protein) were visualized by Western blotting and used as internal controls for the procedure.

Gelatin zymography

The conditioned medium of ATO untreated or treated CLL cells was collected and concentrated 20 \times using ultrafiltration spin columns fitted with 30 kDa MWCO membranes (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany). This medium, as well as membrane and cytosolic cellular fractions were analysed on 7.5% polyacrylamide gels containing 0.1% gelatin (Sigma-Aldrich). After electrophoresis gels were rinsed 3 \times 30 min in 2.5% Triton X-100 and 1 \times 30 min in distilled water, followed by overnight incubation in 50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ at 37°C. Gels were stained with 0.2% Coomassie blue and areas of gelatinolytic activity were visualized as transparent bands. Bands were quantitated using the MultiGauge V3.0 program.

Analysis of MMP-9 protein expression

5×10^6 CLL cells were cultured with or without 3 μ M ATO (24 h) or 3 and/or 5 μ M fludarabine (48 h). Secreted MMP-9 in the conditioned medium was analyzed by gelatin zymography. Surface-bound MMP-9 was determined by flow cytometry on the same cells, upon incubation with the anti-MMP-9 Ab or control rabbit IgG (1 h, 4°C), followed by Alexa 488- or 647- labeled Abs (20 min, 4°C). In some experiments, live (Annexin V⁻/PI⁻) and early apoptotic (Annexin V⁺/PI⁻) cells were separately analyzed for MMP-9 expression on a FACS Vantage cell sorter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Cells were also pre-incubated with anti- $\alpha 4$ integrin or anti-CD44 Abs for 1 h prior to ATO exposure, and subsequently analyzed for surface-bound MMP-9 by flow cytometry. Specific fluorescence (SF), also called "Generalized Integrated Mean Fluorescence Intensity (GiMFI)" [23] and defined as mean fluorescence intensity (MFI) \times % of positive cells, was chosen to represent MMP-9 expression. SF/GiMFI measurements have been previously used [24], as they may be more accurate than the individual MFI or % of positive cells values.

Immunoprecipitation and Western blotting

For immunoprecipitation, 3×10^7 Mock- or MMP-9-cells were serum-starved for 3 h and incubated with or without 5 μ M ATO for 24 h. Cells were lysed in ice-cold 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM PMSF, and protease inhibitors (IP buffer). After protein quantitation lysates were pre-cleared by incubating (1.5 h, 4°C) with 25 μ l protein A-Sepharose (GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, Sweden). Pre-cleared lysates were incubated (16 h, 4°C) with 3 μ g primary or control Abs and mixed with 25 μ l protein A-Sepharose for 2 h at 4°C. Pellets containing the immune complexes were washed with IP buffer and proteins extracted by boiling for 5 min in Laemmli buffer.

For Western blotting, samples were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose or PVDF membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). After electrophoresis, membranes were blocked with 5% BSA/TBS-Tween 20 for 1 h and incubated (4°C, 16 h) with primary Abs, followed by incubation for 1 h at room temperature with Rabbit TrueBlot HRP-labeled Abs (immune complexes) or HRP-labeled secondary Abs (whole lysates). To detect multiple proteins on the same membrane, after identification of the first protein, membranes were washed with TBS/0.1% Tween 20 for 10 min, followed by 3 \times 30 min incubation in 1% glycine pH 2.2, 1% SDS, 0.0005% NP-40, at room temperature. Membranes were washed 1 \times 10 min with TBS/Tween, blocked with 5% BSA for 1 h, and re-probed with subsequent primary and secondary Abs. Protein bands were developed using the enhanced chemiluminescent detection method (Amersham) and quantitated as above.

Statistical analyses

Normal distribution of the data was confirmed by the Shapiro-Wilk's normality test, using the univariate procedure of SAS 9.3 software (SAS Institute, Cary, NC). Statistical significance of the data was determined using the two-tailed Student's t-test. A p value of ≤ 0.05 was considered significant. Analyses were performed using the GraphPad InStat v3.06 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All values are expressed as means \pm standard deviation, except for the qPCR assays in which means \pm standard error are shown.

Results

ATO transcriptionally upregulates MMP-9 in CLL cells via c-fos/c-jun activation

To first establish the best conditions to study ATO action, CLL cells (1.5×10^6 /ml) were cultured for 24 h with or without various concentrations of ATO and apoptosis measured by flow cytometry, using FITC-Annexin V and PI. Figure 1A shows that the percentage of apoptotic cells (Annexin V⁺PI⁻) increased in a dose-dependent manner, reaching average values of 46.2% at 3 μ M ATO (Figure 1A). 16.6% of the remaining cells were viable (Annexin V⁻PI⁻) and 37% were necrotic cells (Annexin V⁺PI⁺). As the 46.2% level of apoptosis seemed appropriate for biochemical studies, we chose 3 μ M ATO concentration for subsequent experiments, except when indicated.

We next studied whether MMP-9, a protein previously shown to contribute to CLL survival [17], was modulated by ATO and involved in the cellular response to this agent. In initial experiments, $10\text{--}15 \times 10^6$ /ml CLL cells from three different patients were treated or not with 3 μ M ATO and MMP-9 mRNA analyzed by RT-PCR. Figure 1B shows that MMP-9 mRNA expression increased after 8 or 24 h of ATO treatment, compared to control cells. Due to the endogenous MMP-9 production in CLL cell cultures, MMP-9 mRNA was also slightly elevated in untreated cells compared to constitutive values, with similar levels at 8 and 24 h (Figure 1B). The same samples were then analyzed by qPCR, which also showed a significant increase in MMP-9 mRNA expression of 2.4-fold and 9.3-fold, respectively, after 8 or 24 h treatment (Figure 1C). The average percentage of Annexin V⁺PI⁻ in ATO-treated cells at these times was 23.6% (8 h) and

37.6% (24 h), compared to 15% (8 and 24 h) in untreated cells (not shown).

To next study whether ATO affected the stability of MMP-9 mRNA, actinomycin D was added to CLL cells previously treated with 3 μ M ATO for 20 h. RT-PCR analysis of these samples at various time points revealed that the increase in MMP-9 was not due to stabilization of MMP-9 mRNA (Figure 1D), indicating that ATO regulated MMP-9 at the transcriptional level.

Several transcription factors can activate the MMP-9 promoter including NF- κ B and AP-1 [25]. Because we previously showed that ATO downregulates NF- κ B and activates c-Jun N-terminal kinase (JNK) in CLL cells [9], we studied whether ATO regulated the JNK downstream effectors *c-fos* and *c-jun*, two components of the AP-1 heterodimer. RT-PCR analyses indicated that both, *c-fos* and *c-jun* mRNAs, were significantly upregulated upon cell exposure to 3 μ M ATO, with maximum levels after 2 h (Figure 2A). At longer times expression declined but remained higher than control cells even at 24 h in the case of *c-jun* (Figure 2A). To determine whether this transcriptional modulation correlated with increased c-Fos and c-Jun protein expression, CLL cells from the same patients were treated with 3 μ M ATO for various times, lysed and analyzed by Western blotting. Figure 2B shows the Western blot results for a representative sample and the average quantitation of the 3 patients studied. As observed, c-Fos increase was visible after 2 h, was maximal after 8 h and remained higher than the control after 24 h. Likewise, c-Jun phosphorylation was clearly observed after 8 h and remained elevated after 24 h of ATO treatment, compared to controls. As these times for c-Fos and phospho-c-Jun protein induction correlated with the upregulation of MMP-9 gene expression, these results strongly suggested that ATO regulated MMP-9 via AP-1 activation.

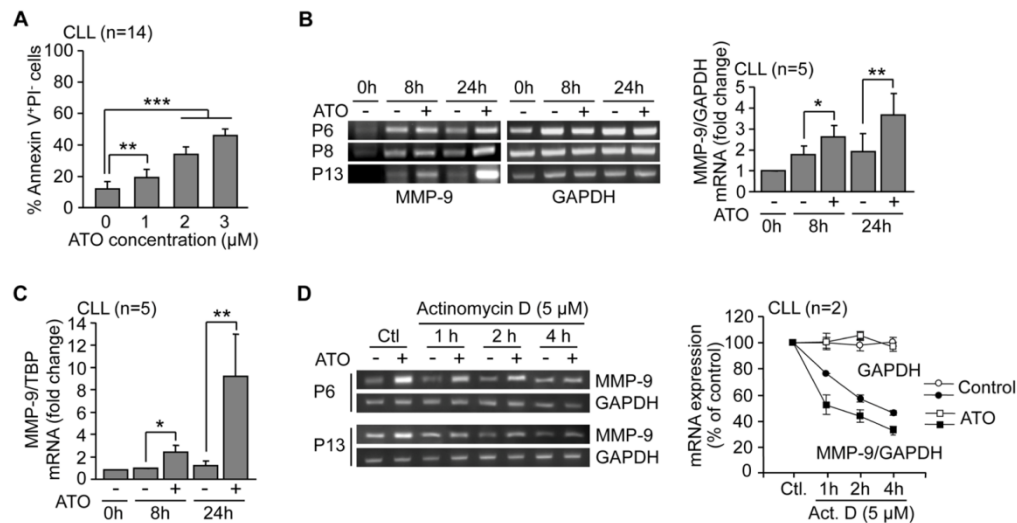


Figure 1. ATO transcriptionally upregulates MMP-9 in CLL cells. (A) 1.5×10^5 CLL cells in RPMI/0.1%FBS were incubated with or without the indicated concentrations of ATO. After 24 h, cells were analyzed by flow cytometry using FITC-Annexin V and PI. (B) $10\text{--}15 \times 10^6$ CLL cells were treated with 3 μ M ATO for the indicated times and MMP-9 mRNA expression was analyzed by RT-PCR, using GAPDH mRNA as internal control. Normalized average values (fold change) are shown. (C) The same mRNA samples were also analyzed by qPCR using TBP as internal control and normalized average values (fold change) are shown. (D) $10\text{--}15 \times 10^6$ CLL cells were cultured with or without 3 μ M ATO for 20 h. Cells were then treated or not (Control, Ctl) with 5 μ M actinomycin D and mRNA expression was analyzed at the indicated times. Values represent the average MMP-9/GAPDH ratio from the two samples after normalizing control values to 100. Values for GAPDH mRNA are also shown. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0099993.g001

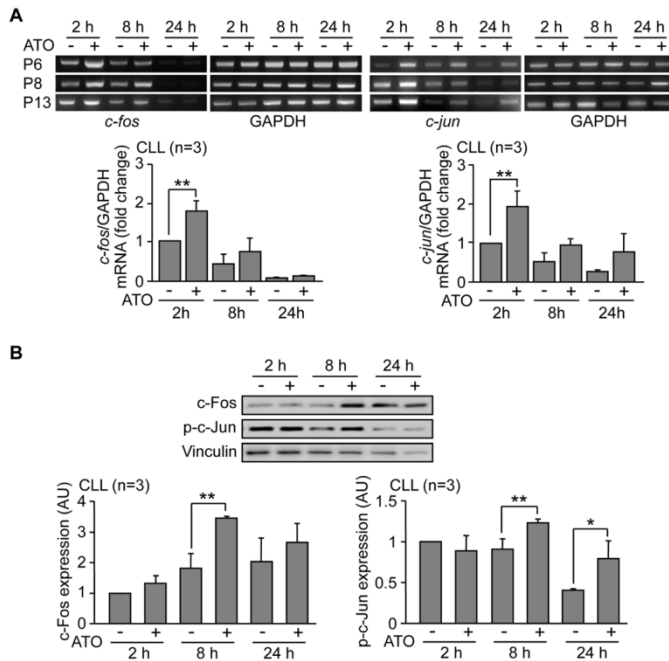


Figure 2. ATO treatment of CLL cells induces activation of the c-fos/c-jun transcription factors. (A) $10\text{--}15 \times 10^6$ CLL cells in RPMI/0.1%FBS from three different patients were treated with $3 \mu\text{M}$ ATO or vehicle. At the indicated times, *c-fos* and *c-jun* mRNA was analyzed by RT-PCR, using GAPDH as an internal control. Average values (fold change) were normalized with respect to the control at 2 h. (B) $10\text{--}15 \times 10^6$ CLL cells were treated as above, lysed at the indicated times and analyzed by Western blotting, using vinculin as internal control. The results for one representative sample and the normalized average values for the 3 samples studied, compared to the control at 2 h are shown. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$. doi:10.1371/journal.pone.0099993.g002

ATO-induced MMP-9 mainly localizes at the cell membrane via interaction with $\alpha 4\beta 1$ integrin and CD44

To determine if ATO also regulated MMP-9 at the protein level and because MMP-9 is mostly a secreted protein, we analyzed by gelatin zymography the conditioned media of equal number of CLL cells incubated with or without $3 \mu\text{M}$ ATO for 24 h. Figure 3A shows that, in contrast to what was expected, the levels of secreted MMP-9 in cells treated with ATO were significantly lower (2.6-fold average) than those in untreated cells. Since CLL cells also express MMP-9 on their surface [16] we studied whether cell-associated MMP-9 increased upon ATO treatment. CLL cells treated or not with ATO for 24 h were incubated with isotype control or anti-MMP-9 antibodies and analyzed by flow cytometry. The PI^+ (necrotic) cell population was excluded from these analyses to avoid false results due to non-specific antibody capture. As shown in Figure 3B for 6 representative patients and quantitated for all 10 cases studied, surface-bound MMP-9 was significantly increased in cells treated with ATO (24% average positive cells) compared to control cells (10%). Moreover, cell fractionation analyses on two representative CLL samples confirmed that, upon ATO treatment, expression of MMP-9 was much higher in the membrane fraction than in the cytosolic fraction (Figure 3C). Parallel zymographic analyses of the conditioned media of the same samples confirmed that secreted MMP-9 was reduced on ATO-treated cells compared to controls (Figure 3C).

To then study whether the observed MMP-9 membrane association was via interaction with its reported receptors $\alpha 4\beta 1$ integrin and CD44v [16], we blocked these receptors with specific antibodies prior to cell incubation with $3 \mu\text{M}$ ATO. As shown in Figure 3D for 2 representative patients and quantitated for the 3 cases studied, these antibodies significantly reduced the levels of MMP-9 found at the cell surface from 30.4% to 11.5% and 8.1%, respectively, for anti- $\alpha 4$ and anti-CD44 Abs upon ATO treatment. Moreover, these Abs also decreased cell viability by 19% (anti- $\alpha 4$) and 20% (anti-CD44) with respect to the effect of the control Ab (results not shown), suggesting a correlation between cell-bound MMP-9 and increased cell viability. In parallel gelatin zymography analyses of the conditioned media of these cells we did not observe an increase in soluble MMP-9, compared to control cells (not shown). This is likely due to the small variation of secreted MMP-9 under these conditions, with the consequent difficulty in quantitating differences.

Next, we determined if increased transcription and surface expression of MMP-9 was associated to apoptosis, the main effect of ATO in CLL cells. To this end, live (Annexin $\text{V}^- \text{PI}^-$) and apoptotic (Annexin $\text{V}^+ \text{PI}^-$) cells were analyzed on a cell sorter for MMP-9 surface expression after ATO exposure. The concentration of ATO in these experiments was adjusted to $2 \mu\text{M}$ to allow a more similar distribution between live and apoptotic cells and facilitate comparisons. Figure 4A shows for two representative cases that increased MMP-9 expression in response to ATO

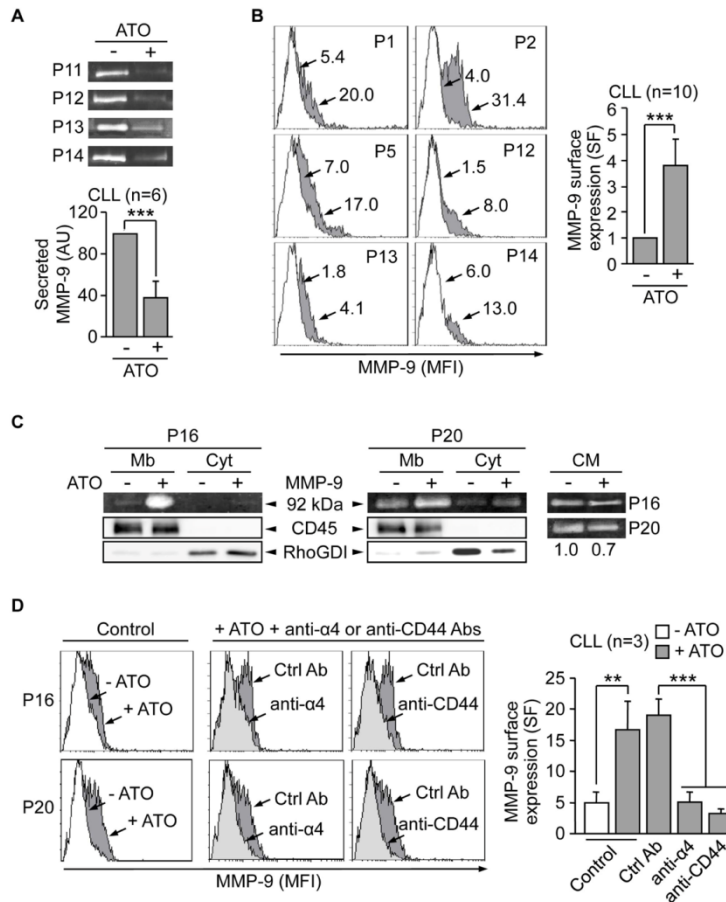


Figure 3. MMP-9 localizes to the CLL cell surface in response to ATO and in correlation with induction of apoptosis. (A) 5×10^6 CLL cells in RPMI/0.1% FBS were treated or not with $3 \mu\text{M}$ ATO for 24 h. The conditioned media was collected, concentrated $20 \times$ and analyzed by gelatin zymography. The results from four representative samples and the average normalized values (arbitrary units, AU) from all six samples studied are shown. (B) 1.5×10^5 CLL cells were incubated with or without $3 \mu\text{M}$ ATO for 24 h. MMP-9 surface expression was analyzed by flow cytometry using an anti-MMP-9 pAb or a control pAb. Histograms from six representative cases are shown, where white areas correspond to control/untreated cells and grey areas to ATO treated cells. Arrows indicate specific fluorescence (SF). Average normalized values from all ten samples analyzed are also shown. (C) 30×10^5 CLL cells in RPMI/0.1%FBS were incubated with or without $3 \mu\text{M}$ ATO for 24 h. Membrane (Mb) and cytosolic (Cyt) fractions were separated and analyzed by gelatin zymography. RhoGDI and CD45 detected by Western blotting in the same lysates were used as controls for the procedure. The conditioned media (CM) of these cells was also analyzed by gelatin zymography and the normalized average values of the quantitated bands are shown (D) 1.5×10^5 CLL cells in RPMI/0.1%FBS were incubated for 1 h with or without the indicated antibodies. $3 \mu\text{M}$ ATO was added and after 24 h, surface-bound MMP-9 was determined by flow cytometry using an anti-MMP-9 pAb or a control pAb. Histograms for two representative cases are shown. White areas correspond to untreated cells (–ATO) and grey areas (both light and dark) to ATO-treated cells (+ATO). Average normalized SF values are also shown. $**P \leq 0.01$; $***P \leq 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0099993.g003

(35.3% and 37.5% positive cells, respectively, compared to 7.5% and 10.1%, respectively, in controls) was clearly coincident with the apoptotic cell population. To confirm these results CLL cells were incubated with the caspase-inhibitor Z-VAD-FMK prior to exposure to $2 \mu\text{M}$ ATO. This treatment prevented apoptosis and MMP-9 localization to the cell surface (Figure 4B). Moreover, the absence of membrane-bound MMP-9 correlated with the lack of

MMP-9 mRNA upregulation by ATO, determined by qPCR analyses on these Z-VAD-FMK treated samples (Figure 4C).

To then determine if the observed MMP-9 gene induction and membrane localization preceded or was a consequence of the ongoing apoptosis, we lowered the ATO concentration to $1 \mu\text{M}$, which had been previously shown to result in minimal apoptosis (see Figure 1A). Initial analysis by RT-PCR on 2 different samples clearly showed an increase in MMP-9 mRNA upon ATO

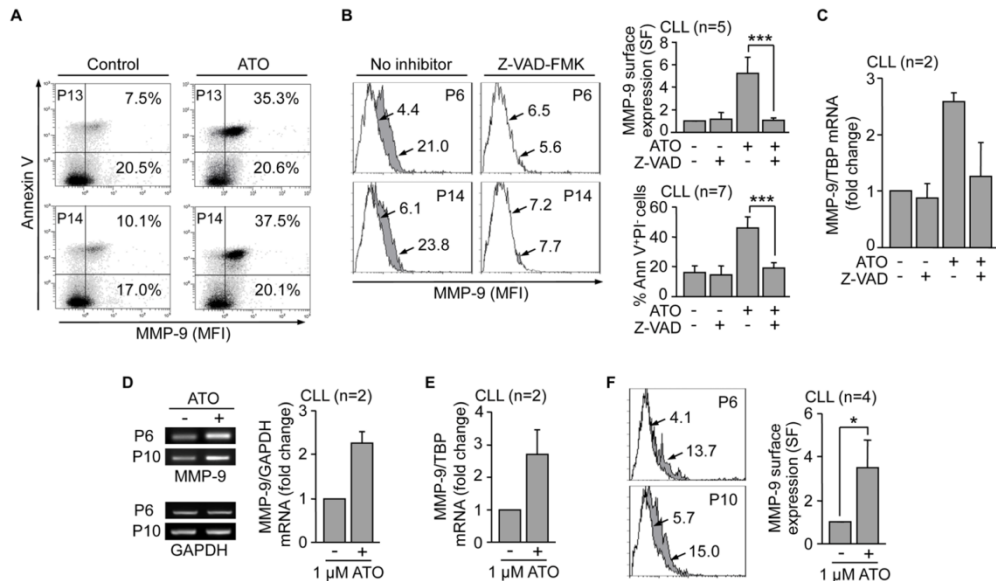


Figure 4. Upregulation and membrane localization of MMP-9 is an initial CLL cell response to the cytotoxic action of ATO. (A) Cell sorter biparametric diagrams of PI^{-} CLL cells (1.5×10^5) treated or not with ATO for 24 h and analyzed for MMP-9 expression. Numbers indicate the percentage of cells expressing MMP-9 in the early apoptotic (Annexin V^{+} , top) and live (Annexin V^{-} , bottom) cell compartments. (B) Flow cytometric analysis of MMP-9 expression in control or ATO-treated CLL cells with or without previous incubation with 50 μ M Z-VAD-FMK. Histograms from two representative cases are shown. White areas: control cells; grey areas: ATO-treated cells. Arrows indicate specific fluorescence (SF). Normalized average values for all five samples analyzed are shown. The average % of early apoptotic (Ann V^{+}/PI^{-}) cells in these samples is also shown. (C) $10-15 \times 10^6$ CLL cells treated as in (B) were analyzed for MMP-9 mRNA expression by qPCR, using TBP as an internal control. Average normalized values (fold change) are shown. (D,E) $10-15 \times 10^6$ CLL cells were treated with 1 μ M ATO for 24 h and MMP-9 mRNA expression analyzed by RT-PCR (D) and qPCR (E). Normalized average values (fold change) are shown. (F) CLL cells treated as in (D, E) were analyzed for MMP-9 surface expression by flow cytometry with an anti-MMP-9 pAb or a control pAb. Histograms for the same samples used in (D, E) are shown. Arrows, white and grey areas are as in (B). Normalized average SF values of all four samples studied are shown. * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0099993.g004

treatment (Figure 4D). These results were further confirmed by qPCR, which showed a 2.4-fold average increase in MMP-9 mRNA for the 2 patients studied (Figure 4E). Moreover, flow cytometric analyses of these and 2 additional samples demonstrated the enhanced presence (from 8.8% to 20.4% positive cells) of MMP-9 at the cell surface (Figure 4F). Parallel viability analyses showed that, at the time studied, 1 μ M ATO did not decrease cell viability with respect to control cells (P6: 75% vs 79%; P10: 54% vs 55%, not shown). Altogether these results suggested that CLL cells responded to an apoptotic stimulus like ATO, by first upregulating MMP-9 and its membrane localization. Upon the onset of apoptosis, MMP-9 remained specifically associated to apoptotic cells.

MMP-9 upregulation and cell membrane localization in response to fludarabine treatment of CLL cells

To determine whether MMP-9 modulation was a particular feature of ATO exposure or a more general response to drug-induced apoptosis, we studied the effect of fludarabine, a front-line treatment for CLL, on MMP-9. CLL cells were incubated with or without 3 or 5 μ M fludarabine for 48 h and MMP-9 mRNA analyzed by RT-PCR. Figure 5A shows that fludarabine increased MMP-9 transcription in a dose-dependent manner, compared to control cells. These results were confirmed by qPCR, which

showed an increase on MMP-9 mRNA of 4.9-fold and 17.5-fold, respectively, for 3 and 5 μ M fludarabine (Figure 5B). Parallel flow cytometric analyses indicated that the average percentage of apoptotic cells at this time was 45.2% and 48%, respectively, for 3 and 5 μ M fludarabine (not shown). As observed in the case of ATO, MMP-9 expression at the cell surface was enhanced (15.5% to 26.6% positive cells) upon fludarabine treatment (Figure 5C). These results indicated that MMP-9 upregulation in correlation with CLL cell apoptosis was not restricted to ATO action.

MMP-9, isolated or present in stroma, induces resistance of CLL cells to ATO and fludarabine

Having established that MMP-9 was modulated by ATO and fludarabine and localized to the CLL cell surface, we aimed to determine whether MMP-9 had a role in the cellular response to these drugs. This was particularly relevant, given the dual role played by MMPs in apoptosis [18,19]. CLL cells were cultured on BSA (a control substrate that does not mediate cell adhesion or induce intracellular signaling) or MMP-9-coated wells for 1 h prior to exposure to ATO or fludarabine. Drug concentrations were lowered in these experiments to avoid excessive reduction in cell viability and allow comparisons. In control experiments in the absence of drug, MMP-9-cultures had significantly more live cells (Annexin $V^{-}PI^{-}$) than BSA-cultures (Figure 6A), in agreement

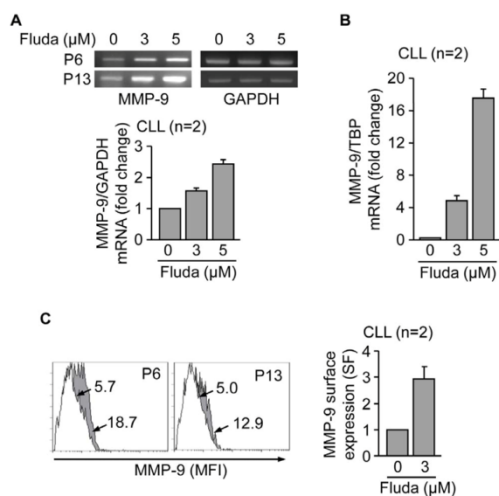


Figure 5. Fludarabine transcriptionally upregulates MMP-9 and induces its localization to the CLL cell membrane. (A,B) $10\text{--}15 \times 10^6$ CLL in RPMI/0.1% FBS cells from two different patients were treated with 3 or 5 μM fludarabine (Fluda) for 48 h and MMP-9 mRNA expression was analyzed by RT-PCR (A) and qPCR (B). Normalized average values (fold change) are shown. (C) 1.5×10^5 CLL cells from two different patients were incubated with or without 3 μM fludarabine for 48 h and MMP-9 surface expression was analyzed by flow cytometry. White areas, control/untreated cells; grey areas, fludarabine treated cells. Arrows indicate specific fluorescence (SF) values for each cell population. Normalized average values are also shown. doi:10.1371/journal.pone.0099993.g005

with our previous results in which MMP-9 prevented CLL cell spontaneous apoptosis [17]. Importantly, cells cultured on MMP-9 and treated with ATO or, for comparison, with fludarabine, also showed significantly higher viability compared to cells cultured on BSA (Figure 6A).

The above results indicated that adhesion to MMP-9 induced CLL cell resistance to ATO and to the commonly used drug fludarabine. MMP-9 is an abundant component of the stroma found in the CLL microenvironment and stromal cells contribute to CLL cell resistance to certain drugs [10,26]. We therefore studied whether stromal cells influenced the response of CLL cells to ATO and whether this involved MMP-9. CLL cells from 4 different patients were incubated on BSA (control) or HS-5 stromal cells and treated with or without ATO. Cell viability was determined after 48 h by flow cytometry and values for cells cultured on stromal cells in the absence of ATO (69.2% average) were normalized to 100. Figure 6B shows that in the absence of ATO, the anti-MMP-9 Ab significantly reduced the viability of CLL cells cultured on HS-5 cells compared to cells in the absence of Ab, while a control Ab had no effect. As in the case of isolated MMP-9 (Figure 6A), this confirmed our previous report showing that MMP-9 protects CLL cells from spontaneous apoptosis in culture [17]. Treatment with ATO reduced the viability of CLL cells cultured on BSA by 74.4% but had a limited effect (32.8% reduction) on HS-5 cultured-CLL cells (Figure 6B), indicating a protective effect by stromal cells. This was completely overcome by the anti-MMP-9 Ab, which reduced CLL viability to 15.5%, while a control Ab had no effect (Figure 6B).

To confirm and validate these results, the same experiments were carried out on CLL cells cultured on primary stromal cells derived from a CLL patient. Primary stromal cells protected CLL cells from spontaneous apoptosis (undergone in suspended cells) and this was significantly reverted by an anti-MMP-9 Ab, but not by a control Ab. Primary stromal cells also significantly induced CLL cell resistance to ATO (67.1% cell viability compared to 14.5% on suspended cells) and the anti-MMP-9 Ab clearly overcame this protective effect, reducing the stroma-induced survival to 18.8% (Figure 6C). Altogether these results established that stromal cells protected CLL cells from the cytotoxic effect of ATO and that MMP-9 had a role in this protection.

MEC-1 cells also upregulate MMP-9 in response to ATO and fludarabine

To further establish that MMP-9 conferred drug resistance in CLL cells we used the MEC-1 cell line, derived from a CLL patient and expressing very low constitutive levels of MMP-9. To first determine if these cells behave like primary CLL cells, we studied the response of MEC-1 cells to ATO and, for comparison, to fludarabine. The viability of untreated cells after 24 h and 48 h was 146% and 154%, respectively, compared to initial viability normalized to 100 (due to cell proliferation), and these values were normalized to 100. Figure 7A,B shows that after 24 h (ATO) or 48 h (fludarabine) treatment, the viability of MEC-1 cells, measured by the MTT assay, decreased in a dose-dependent manner. Because this assay primarily determines cell proliferation and, indirectly, cell viability, we also measured MEC-1 cell viability after ATO or fludarabine treatment by flow cytometry, using FITC-Annexin V and PI. In results not shown, ATO decreased cell viability by 39%, 58% and 79%, at 3, 5, and 8 μM , respectively. Likewise, fludarabine treatment reduced viability by 13%, 29%, and 32%, at 3, 5 and 8 μM , respectively. These results were very similar to those shown in Figure 7A,B, thus confirming the validity of the MTT assay to assess cell viability.

We next studied whether ATO also modulated MMP-9 in MEC-1 cells. Indeed, and as observed in primary CLL cells, ATO upregulated MMP-9 mRNA on MEC-1 cells after 8 and 24 h, compared to control cells (Figure 7C). These results were confirmed by qPCR, which showed a 4.2-fold and 4.4-fold MMP-9 mRNA increase, respectively, after 8 or 24 h treatment (Figure 7D). Moreover, MMP-9 surface expression on these cells also significantly increased (from 15.6% to 34.1% positive cells) upon ATO treatment (Figure 7E). These results confirmed the similar response of MEC-1 and primary CLL cells to ATO and validated the MEC-1 cell system for subsequent studies.

MMP-9 expression in MEC-1 cells confers resistance to ATO and fludarabine

Using the MEC-1 cell line, we recently established [20] stable transfectants expressing a GFP-lentiviral vector (Mock-cells) or a vector containing GFP-MMP-9 (MMP-9-cells), thus representing an unambiguous system to study MMP-9 functions. As recently reported [20], MMP-9-cells expressed cell-associated MMP-9, determined by flow cytometry (Figure 8A), thus resembling primary CLL cells [16]. This expression was further confirmed by cell fractionation, which clearly showed the presence of MMP-9 on the membrane (92 kDa and 86 kDa forms) and cytosol (92 kDa form) fractions of MMP-9-cells and its absence on Mock-cells (Figure 8B). Additionally, MMP-9-cells secreted high levels of MMP-9 into the medium, while secretion was very low in untransfected or MEC-1 Mock-cells (Figure 8B).

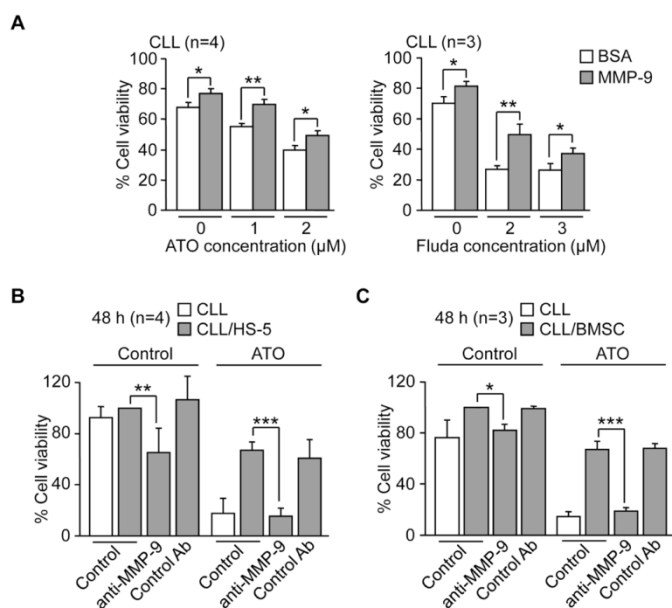


Figure 6. MMP-9, isolated or present in stroma, induces resistance of CLL cells to ATO and fludarabine. (A) 1.5×10^5 CLL cells RPMI/0.1% FBS were cultured on 0.5% BSA or 150 nM MMP-9 for 1 h prior to adding the indicated concentrations of ATO or fludarabine (Fluda). After 24 h (ATO) or 48 h (Fluda) cell viability was determined by flow cytometry using FITC-Annexin V and PI. (B) 1.5×10^5 CLL cells were treated or not with anti-MMP-9 pAbs or control pAbs for 1 h and added to wells coated with 0.5% BSA, HS-5 cells or primary stromal cells (BMSC). After 2 h at 37°C, 2 μ M ATO was added and cells further incubated for 48 h. Cell viability was determined by flow cytometry using FITC-Annexin V and PI. The viability of CLL cells cultured over stroma in the absence of ATO was normalized to 100 and average values are shown. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0099993.g006

Mock- and MMP-9-cells were then incubated with various concentrations of ATO (24 h) or fludarabine (48 h) or vehicle and viability measured by the MTT assay. In the absence of drug, the viability of Mock-cells and MMP-9-cells was similar (155% vs 149% at 24 h and 154% vs 152% at 48 h, compared to initial viability) and these values were normalized to 100, for better assessment of the effect of the drugs. Treatment with ATO (Figure 8C) or fludarabine (Figure 8D) decreased cell viability in a dose-dependent manner in both cell types, but at all doses tested MMP-9-cells showed significantly higher viability than Mock-cells. To further confirm that this was due to the presence of MMP-9 (cell-associated and in soluble form), we performed gene silencing experiments using a specific siRNA for MMP-9 or a control siRNA. Gelatin zymographic analyses indicated that MMP-9 silencing inhibited the already low MMP-9 expression in Mock-cells, and produced an average 75% reduction in MMP-9-cells, also confirmed by Western blotting (Figure 8E). This procedure equally affected the viability of either transfectant cell type (35% reduction). siRNA-transfected Mock- and MMP-9-cells were then treated with several concentrations of ATO and the viability measured after 24 h by MTT. Although the effect of ATO was milder in these experiments, there were clear differences between Mock- and MMP-9-cells. As shown in Figure 8F, the viability of Mock-cells upon ATO exposure decreased in a dose-dependent manner with no differences between MMP-9 siRNA-transfected or control siRNA-transfected cells for all doses tested. The lack of functional effect of MMP-9 silencing in Mock-cells could be explained by the very low constitutive levels of MMP-9 in these

cells (see Figure 8E). Thus, modulation of these levels is therefore unlikely to produce a detectable functional effect. In contrast, silencing MMP-9 in MMP-9-cells significantly decreased cell viability with respect to control siRNA-transfected cells, thus reverting the protective effect of MMP-9 on these cells (Figure 8F). These results clearly indicated that MMP-9 contributed to CLL cell resistance to ATO.

MMP-9 induces drug resistance by modulating the balance of anti- and pro-apoptotic proteins from the Bcl-2 family

To determine the molecular bases responsible for the observed drug-protecting effect of MMP-9, we analyzed whether the expression of prototype Bcl-2 family members was modulated by MMP-9. In initial experiments, Mock- and MMP-9-cells were treated with 5 μ M ATO or vehicle and, after 24 h, lysed and analyzed by Western blotting. Figure 9A shows that upon ATO exposure, expression of the anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-xL decreased in Mock-cells compared to their untreated counterpart, while Bcl-2 remained unchanged. In MMP-9-cells, however, all three proteins remained similar (Mcl-1) or were elevated (Bcl-xL, Bcl-2) with respect to untreated MMP-9-cells. Moreover, Mcl-1, Bcl-xL and Bcl-2 in ATO-treated MMP-9-cells were significantly upregulated compared to ATO-treated Mock-cells (Figure 9A). Similar analysis of selected pro-apoptotic proteins showed that Bax and Bim significantly increased in Mock-cells treated with ATO, compared to untreated cells, while Noxa

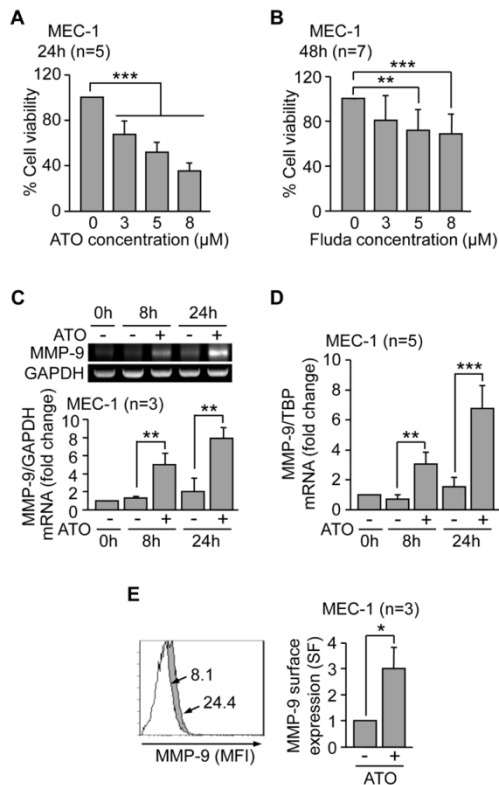


Figure 7. Effect of ATO and fludarabine on MEC-1 cells. (A, B) 7.5×10^5 MEC-1 cells in IMDM/0.1% FBS were treated or not with the indicated concentrations of ATO (A) or fludarabine (Fluda) (B). After 24 h (ATO) or 48 h (Fluda), cell viability was determined by the MTT assay. Control cell viability was normalized to 100 and average values are shown. (C,D) 5×10^6 MEC-1 cells were treated with 3 μ M ATO for the indicated times and MMP-9 mRNA expression was analyzed by RT-PCR, using GAPDH as internal control (C) and qPCR, using TBP as internal control (D). Normalized average values (fold change) are shown. (E) 1.5×10^5 MEC-1 cells were treated or not with 3 μ M ATO for 24 h and MMP-9 surface expression was analyzed by flow cytometry, using an anti-MMP-9 pAb or a control pAb. Histograms from a representative experiment and normalized average values for the three experiments performed are shown. White areas, control/untreated cells; grey areas, ATO-treated cells. Arrows indicate the specific fluorescence. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0099993.g007

expression was not significantly altered (Figure 9A). In contrast, the expression of Bax and Bim in MMP-9-cells treated with ATO was lower than in untreated MMP-9-cells. Moreover, Bax and Bim in ATO-treated MMP-9-cells were significantly lower than in ATO-treated Mock-cells (Figure 9A).

Since regulation of apoptosis/survival involves the balance of anti- and pro-apoptotic Bcl-2 family members, rather than individual levels [27], we also determined the ratios of these proteins in Mock and MMP-9-cells, before and after exposure to ATO. Figure 9B shows that, upon ATO treatment, the balance Mcl-1/Bim, Mcl-1/Noxa and Bcl-2/Bax, were all significantly

increased in MMP-9-cells, compared to Mock-cells. These ratios were also significantly higher compared to untreated MMP-9-cells. However, these ratios were diminished in ATO-treated Mock-cells, compared to untreated Mock-cells (Figure 9B).

Mcl-1 is a critical molecule in CLL cell survival and exerts its function by sequestering BH3-only pro-apoptotic proteins such as Bim [28]. We therefore studied whether Mcl-1 and Bim were complexed in MMP-9 transfectants upon ATO exposure. Lysates of Mock or MMP-9-cells that had been treated or not with 5 μ M ATO for 24 h, were immunoprecipitated with anti-Mcl-1 Abs and analyzed by Western blotting. Figure 9C shows that in untreated cells, similar amounts of Bim were pooled down by the anti-Mcl-1 Ab in both, Mock and MMP-9 transfectants. In contrast, upon ATO treatment, very little Bim co-immunoprecipitated with Mcl-1 in Mock-cells, while Bim remained bound to Mcl-1 and even increased in MMP-9 cells (Figure 9C).

Similar results were obtained for Mock- and MMP-9-cells treated with 5 μ M fludarabine. As shown in Figure 10A, Mcl-1 and Bcl-xL were also significantly higher in MMP-9-cells compared to Mock-cells. Bcl-2 did not seem to play a role in this case, as its expression remained similar for both cell types, either in the absence or presence of fludarabine. As observed in the case of ATO, the ratios Mcl-1/Bim and Mcl-1/Noxa upon fludarabine treatment were significantly higher in MMP-9-cells than in Mock-cells, while the balance Bcl-2/Bax did not seem to play a role (Figure 10B).

MMP-9 regulates the balance of Bcl-2 family proteins in primary CLL cells treated with ATO

We next determined whether MMP-9 also modulated Bcl-2 family members in primary CLL cells. Cells from 3 different patients were cultured on BSA or MMP-9 for 1 h prior to adding 3 μ M ATO. After 24 h, cells were lysed and lysates analyzed by Western blotting. Figure 11A shows that Mcl-1 was significantly upregulated, both in the absence or presence of ATO, in cells cultured on MMP-9 compared to cells cultured on BSA. Bcl-xL and Bcl-2 were also significantly increased on MMP-9-cultured CLL cells upon ATO treatment, compared to BSA-cultured cells. The ratios Mcl-1/Bim and Mcl-1/Noxa were also upregulated in MMP-9-cultured cells, both in the absence or presence of ATO, while the Bcl-2/Bax ratio was not modulated under these conditions (Figure 11B). Altogether these results indicated that MMP-9 induced drug resistance in CLL cells by regulating the expression and function of crucial anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins of the Bcl-2 family.

Discussion

We have studied whether MMP-9 plays a role in CLL cell response to cytotoxic drugs, such as arsenic trioxide and fludarabine. We report for the first time the following findings: 1) upon an apoptotic stimulus, MMP-9 is transcriptionally upregulated and localizes to the surface of early apoptotic cells; 2) MMP-9 by itself or present in stroma induces CLL cell drug resistance; 3) MEC-1 cells stably transfected with MMP-9 show increased survival upon drug treatment; 4) the MMP-9 anti-apoptotic effect involves modulation of anti- and pro-apoptotic proteins from the Bcl-2 family.

Upregulation and membrane localization of MMP-9 was an early response to drug exposure that preceded detection of apoptosis and was necessarily associated to this process. Evidence for this comes from the fact that preventing cell death with the Z-VAD-FMK caspase inhibitor blocked MMP-9 mRNA induction and its cell surface localization upon ATO treatment. MMP-9

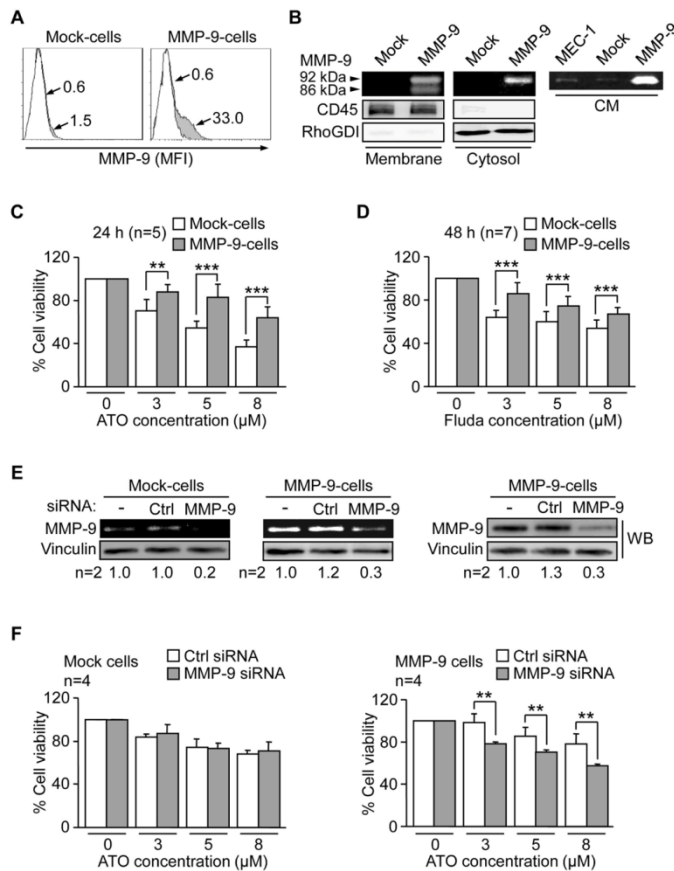


Figure 8. Effect of ATO and fludarabine on MEC-1 Mock-cells and MMP-9-cells. (A) 1.5×10^5 Mock- or MMP-9-cells were analysed by flow cytometry using an anti-MMP-9 pAb or a control pAb. Histograms for two representative experiments are shown. White areas: negative control; grey areas: MMP-9 surface expression. Arrows indicate the specific fluorescence (SF). (B) The membrane and cytosolic fractions from 5×10^6 Mock- or MMP-9-cells were separated and analyzed by gelatin zymography. RhoGDI and CD45 were visualized by Western blotting of the same lysates and used as controls for the procedure. The conditioned medium (CM) of the same cells was also analyzed by gelatin zymography. (C,D) 7.5×10^4 Mock- or MMP-9-cells in IMDM/0.1% FBS were treated or not with the indicated concentrations of ATO (C) or Fluda (D) and cell viability was determined after 24 h (ATO) or 48 h (Fluda) using the MTT assay. The viability in the absence of drugs was normalized to 100 and average values are shown. (E) 15×10^6 MEC-1 transfectants were nucleofected with MMP-9 or control siRNAs and analyzed after 24 h by gelatin zymography and Western blotting. Average quantitation of the MMP-9/vinculin ratios is also shown. (F) 7.5×10^4 siRNA-transfected Mock- or MMP-9-cells were treated or not with the indicated concentrations of ATO. After 24 h cell viability was determined by MTT. The viability in the absence of drugs was normalized to 100 and average values are shown. ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0099993.g008

membrane association was a specific event and involved interaction with $\alpha 4\beta 1$ integrin and CD44, two reported MMP-9 receptors in CLL [16]. Additionally, the cell population with increased surface MMP-9 was coincident with that of early apoptotic cells, suggesting that MMP-9 remained mostly surface-bound to these cells upon secretion and modulated the apoptotic response. As MMP-9, as other MMPs, may play dual roles in apoptosis [18,19], one interpretation of our results could be that upregulation of MMP-9 facilitates the apoptotic process by targeting appropriate substrates or pathways. An alternative explanation is that MMP-9 antagonizes the apoptotic cell response to cytotoxic drugs, thus representing a survival compensatory

mechanism. In support of this explanation, several previous studies have reported compensatory or survival response for MMP-9 in various cell systems. For example, in melanoma and breast carcinoma cells, apoptosis induced by TNF receptor ligands was clearly enhanced by inhibiting MMP-9 (or MMP-2) [29]. Similarly, blocking MMP-9 function sensitized colon adenocarcinoma cells to phorbol-esters [30] and glioma cells to Fas-induced apoptosis [31]. In another report using a xenograft model in mice, treatment of carcinoma cells with the chemotherapeutic agent paclitaxel increased MMP-9 expression and tumor cell metastasis, and this was also blocked with an MMP-9 inhibitor [32].

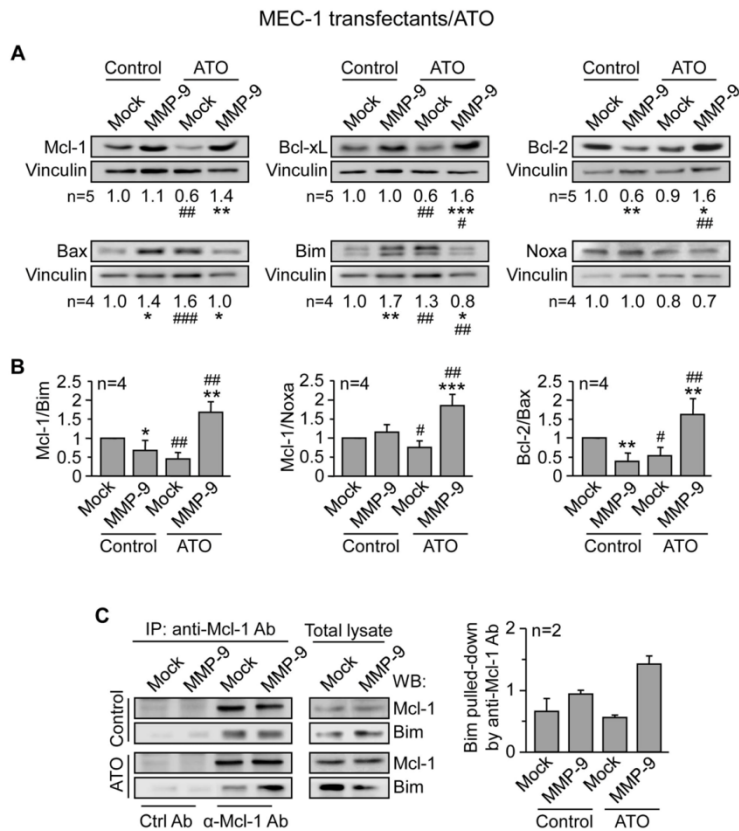


Figure 9. MMP-9 expression in MEC-1 cells prevents downregulation of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins in response to ATO. (A) 5×10^5 Mock- or MMP-9-MEC-1 cells were treated or not with $5 \mu\text{M}$ ATO. After 24 h cells were lysed and the expression of the indicated proteins was analyzed by Western blotting, using vinculin as an internal control. A representative experiment is shown for each case and numbers indicate the average values from all experiments performed, after normalizing Mock control values to 1. (B) The indicated ratios of anti-apoptotic/pro-apoptotic proteins are shown. (C) 3×10^7 Mock- or MMP-9-cells were treated or not with $5 \mu\text{M}$ ATO for 24 h. Cells were lysed and lysates immunoprecipitated with anti-Mcl-1 or control Abs and analyzed by Western blotting. Values indicate the amount of Bim found in the Mcl-1 immunoprecipitates in both types of MEC-1 transfectants. * or # $P \leq 0.05$; ** or ## $P \leq 0.01$; *** or ### $P \leq 0.001$. Symbols are: *, Mock- vs MMP-9-cells; #, Mock- or MMP-9-cells treated with ATO compared to their respective untreated counterparts. doi:10.1371/journal.pone.0099993.g009

Using two different approaches we have obtained strong evidence to support an anti-apoptotic role for MMP-9 in the CLL cell response to ATO and fludarabine. First, the higher viability observed on cells cultured on MMP-9 during drug treatment compared to cells cultured on BSA. Notably, this anti-apoptotic role of MMP-9 was also observed in co-cultures of CLL and stromal cells, where blocking MMP-9 with antibodies completely reverted the stroma-induced drug resistance. We previously reported a role for MMP-9 in the protective effect of stroma against CLL cell spontaneous apoptosis in culture [17]. Other investigators have shown the involvement of several proteins (integrins, chemokines, Bcl-2 family proteins) in the resistance to certain therapeutic agents induced by stroma [33–35]. We now show for the first time that stromal cells induce CLL cell resistance to ATO and that MMP-9 has a prominent role in this resistance.

Further evidence for a survival role for MMP-9 in response to cytotoxic drugs comes from the fact that MEC-1-MMP-9 transfectants, representing an unambiguous system to identify MMP-9 functions, consistently showed higher viability in the presence of ATO or fludarabine than their corresponding MEC-1-Mock controls. Indeed, this effect was mediated by MMP-9 as silencing this protein reverted the survival advantage of the MMP-9 transfectants. Since our results show that MMP-9 is present in these transfectants as a cell-associated form as well as in the conditioned medium, it is possible that both fractions contribute to the increased survival of these cells. It is not known if the MMP-9 survival effect involves the same or different mechanisms as MMP-9 upregulation upon apoptotic stimuli, but the results of our study strongly support a compensatory survival role for MMP-9 in CLL.

We have addressed the molecular bases accounting for this drug-resistance effect of MMP-9 and have focused on molecules

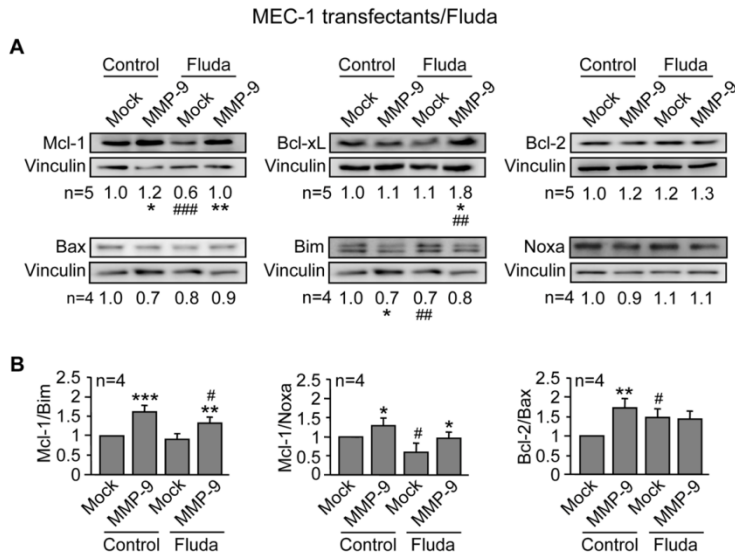


Figure 10. MMP-9 expression in MEC-1 cells prevents downregulation of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins in response to fludarabine. (A,B) 5×10^5 Mock- or MMP-9-cells were treated or not with $5 \mu\text{M}$ fludarabine (Fluda). After 48 h cells were lysed and the indicated proteins (A) and ratios (B) analyzed as in Figure 9. * or # $P \leq 0.05$; ** or ## $P \leq 0.01$; *** or ### $P \leq 0.001$. Symbols are: *, Mock- vs MMP-9 cells; #, Mock- or MMP-9-cells treated with Fluda compared to their respective untreated counterparts.
doi:10.1371/journal.pone.0099993.g010

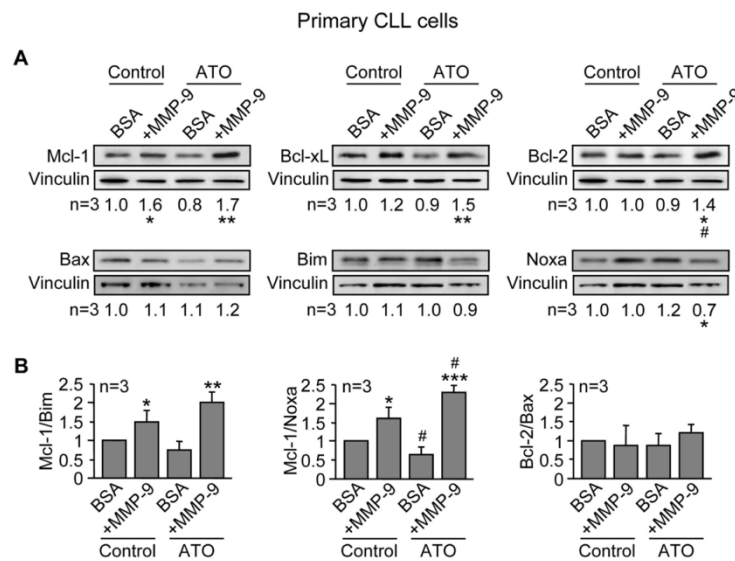


Figure 11. Culturing CLL cells on MMP-9 modulates Bcl-2 family proteins in response to ATO, preventing downregulation of Mcl-1, Bcl-xL and Bcl-2. (A,B) 10×10^6 primary CLL cells in RPMI/0.1% FBS were incubated on BSA- or 150 nM MMP-9-coated wells for 1 h prior to adding $3 \mu\text{M}$ ATO or vehicle. After 24 h, cell were lysed and the indicated proteins (A) and ratios (B) analyzed by Western blotting as explained. * or # $P = 0.05$; ** or ## $P \leq 0.01$; *** or ### $P \leq 0.001$. Symbols are: *, CLL cells on BSA vs CLL cells on MMP-9; #, ATO-treated cells compared to their respective untreated controls.
doi:10.1371/journal.pone.0099993.g011

from the Bcl-2 family, well-known regulators of apoptosis [27]. The apoptotic action of ATO has been shown to involve downregulation of the anti-apoptotic protein Mcl-1 in several cell systems, including myeloma [36] and myeloid leukemia cells [37] and, in many cases, upregulation of the pro-apoptotic proteins Bax and/or Bim [36,38,39]. Indeed the balance Mcl-1/Bim was shown to be determinant in myeloma cell response to ATO [36] and in the resistance of acute and chronic leukemic cells to fludarabine [40]. Our present results clearly show that MMP-9, both in MEC-1 transfectants and in primary CLL cells, not only prevented downregulation of anti-apoptotic proteins (Mcl-1, Bcl-xL, Bcl-2) in response to ATO but also upregulated their levels with respect to basal expression. As this was accompanied by downregulation (or no alteration) of pro-apoptotic proteins (Bim, Bax), the anti-apoptotic/pro-apoptotic balance was clearly elevated in the presence of MMP-9, likely contributing to the MMP-9 survival effect. We previously reported that prevention of CLL cell spontaneous apoptosis by MMP-9 involved upregulation of Mcl-1 but not Bcl-xL or Bcl-2 [17]. We now show that, in the presence of ATO, MMP-9 seems to affect several of these proteins, perhaps to amplify the compensatory survival effect. In this regard, our results also indicate that Mcl-1, a crucial anti-apoptotic protein in CLL [28] was not dissociated from Bim upon ATO exposure on MMP-9-transfected cells, thus preventing Bim from causing mitochondrial

damage and apoptosis. Our results further show that Mcl-1 and Bcl-xL were also upregulated by MMP-9 in response to fludarabine. This is in agreement with our previous report showing the involvement of these proteins in the fibronectin/ α 4 β 1 integrin-induced CLL cell resistance to fludarabine [41]. As in the case of ATO, the anti-apoptotic/pro-apoptotic protein ratio was elevated, suggesting that the protective effect of MMP-9 against apoptosis may be a general CLL cell response to cytotoxic drugs. In conclusion, our study is the first to establish that MMP-9 induces drug-resistance in CLL by modulating the balance of Bcl-2 family members. Targeting MMP-9 in combination with therapeutic agents may thus improve the CLL response to treatment.

Acknowledgments

We thank all the CLL patients who donated samples for this study, Guillermo Padilla for help with the statistical analyses, and Dr. Pedro Lastres for valuable help with the flow cytometry analyses.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AGP IAJ EB. Performed the experiments: IAJ EB EUB NAM. Analyzed the data: AGP IAJ EB EUB NAM JAGM. Contributed reagents/materials/analysis tools: JAGM. Wrote the paper: AGP.

References

- Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S (2010) From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 10: 37–50.
- Gaidano G, Foa D, Dalla-Favera R (2012) Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 122: 3432–3438.
- Pleyer L, Egle A, Hartmann TN, Greil R (2009) Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nat Rev Clin Oncol* 6: 405–418.
- Hallek M (2013) Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol* 88: 803–816.
- Stephens DM, Byrd JC (2013) Improving the treatment outcome of patients with chronic lymphocytic leukemia through targeted antibody therapy. *Hematol Oncol Clin North Am* 27: 303–327.
- Wang Z-Y, Chen Z (2008) Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 111: 2505–2515.
- Mi JQ, Li JM, Shen ZX, Chen SJ, Chen Z (2012) How to manage acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 26: 1743–1751.
- Merkel O, Heyder C, Asslaber D, Hamacher F, Tinhofer I, et al. (2008) Arsenic trioxide induces apoptosis preferentially in B-CLL cells of patients with unfavourable prognostic factors including del17p13. *J Mol Med* 86: 541–552.
- Redondo-Muñoz J, Escobar-Díaz E, Hernández del Cerro M, Pandiella A, Terol MJ, et al. (2010) Induction of B-chronic lymphocytic leukemia cell apoptosis by arsenic trioxide involves suppression of the phosphoinositide 3-kinase/Akt survival pathway via c-jun-NH2 terminal kinase activation and PTEN upregulation. *Clin Cancer Res* 16: 4382–4391.
- Burger JA (2012) Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape. *Curr Opin Oncol* 24: 643–649.
- Ramsay AD, Rodriguez-Justo M (2013) Chronic lymphocytic leukemia—the role of the microenvironment pathogenesis and therapy. *Br J Haematol* 162: 15–24.
- Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G (2013) Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48: 222–272.
- Bauvois B, Dumont J, Mathiot C, Kolb JP (2002) Production of matrix metalloproteinase-9 in early stage B-CLL: suppression by interferons. *Leukemia* 16: 791–798.
- Redondo-Muñoz J, Escobar-Díaz E, Samaniego R, Terol MJ, García-Marco JA, et al. (2006) MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood* 108: 3143–3151.
- Redondo-Muñoz J, Terol MJ, García-Marco JA, García-Pardo A (2008) 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* 111: 383–386.
- Redondo-Muñoz J, Ugarte-Berzal E, García-Marco JA, Hernández del Cerro M, Van den Steen PE, et al. (2008) α 4 β 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* 112: 169–178.
- Redondo-Muñoz J, Ugarte-Berzal E, Terol MJ, Van den Steen PE, Hernández del Cerro M, et al. (2010) Matrix Metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia B cell survival through its hemopexin domain. *Cancer Cell* 17: 160–172.
- Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* 2: 161–174.
- Mannello F, Luchetti E, Falcieri E, Papa S (2005) Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis. *Apoptosis* 10: 19–24.
- Bailón E, Ugarte-Berzal E, Amigo-Jiménez I, Van den Steen P, Opdenakker G, et al. (2014) Overexpression of pro-gelatinase B/proMMP-9 affects migration regulatory pathways and impairs chronic lymphocytic leukemia cell homing to bone marrow and spleen. *J Leuk Biol*, in press.
- Stacchini A, Aragno M, Vallario A, Alfaro A, Circosta P (1999) MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in polyclonal transformation. *Leuk Res* 23: 127–136.
- Morodomi T, Ogata Y, Sasaguri Y, Morimatsu M, Nagase H (1992) Purification and characterization of matrix metalloproteinase 9 from U937 monocytic leukemia and HT1080 fibrosarcoma cells. *Biochem J* 285: 603–611.
- Shoostari P, Fortunato ES, Blimkie D, Yu M, Gupta A, et al. (2010) Correlation Analysis of Intracellular and Secreted Cytokines via the Generalized Integrated Mean Fluorescence Intensity (GIMFI). *Cytometry A* 77: 873–880.
- Jayo A, Conde I, Lastres P, Martínez C, Rivera J, et al. (2010) L718P mutation in the membrane-proximal cytoplasmic tail of β 3 promotes abnormal α IIb β 3 clustering and lipid microdomain coalescence, and associates with a thrombathenia-like phenotype. *Haematologica* 95: 1158–1166.
- Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA (2002) Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37: 375–536.
- Burger JA, Gribben JG (2014) The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol* 24:71–81.
- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 49–63.
- Gandhi V, Balakrishnan K, Chen LS (2008) Mcl-1: the 1 in CLL. *Blood* 112: 3538–3540.
- Nyormoi O, Mills L, Bar-Eli M (2003) An MMP-2/MMP-9 inhibitor, 5a, enhances apoptosis induced by ligands of the TNF receptor superfamily in cancer cells. *Cell Death Differ* 10: 558–569.
- Meyer E, Vollmer JY, Boyer R, Stamenkovic (2005) Matrix metalloproteinases 9 and 10 inhibit protein kinase C-potentiated, p53-mediated apoptosis. *Cancer Res* 65: 4261–4272.
- Chetty C, Lakka SS, Bhoopathi P, Gondi CS, Veeravalli KK (2010) Urokinase plasminogen activator receptor and/or matrix metalloproteinase-9 inhibition induces apoptosis signaling through lipid rafts in glioblastoma xenograft cells. *Mol Cancer Ther* 9: 2605–2617.
- Gingis-Velitski S, Loven D, Benayoun L, Munster M, Bril R (2011) Host response to short-term, single-agent chemotherapy induces matrix metallopro-

MMP-9 Involvement in CLL Cell Drug Resistance

- teinase-9 expression and accelerates metastasis in mice. *Cancer Research* 71: 6986–6996.
33. Zeng Z, Samudio IJ, Munsell M, An J, Huang Z, et al. (2006) Inhibition of CXCR4 with the novel RCP168 peptide overcomes stroma-mediated chemoresistance in chronic and acute leukemias. *Mol Cancer Ther* 5: 3113–3121.
 34. Balakrishnan K, Burger JA, Wierda WG, Gandhi V (2009) AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance. *Blood* 113: 149–153.
 35. 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.
 36. Lunghi P, Giuliani N, Mazzeri L, Lombardi G, Ricca M (2008) Targeting MEK/MAPK signal transduction module potentiates ATO-induced apoptosis in multiple myeloma cells through multiple signaling pathways. *Blood* 112: 2450–2460.
 37. Wang R, Xia L, Gabrilove J, Waxman S, Jing Y (2013) Downregulation of Mcl-1 through GSK-3 β activation contributes to arsenic trioxide-induced apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 27: 315–324.
 38. Baysan A (2007) Arsenic trioxide induces apoptosis via the mitochondrial pathway by upregulating the expression of Bax and Bim in human B cells. *Int J Oncol* 30: 313–318.
 39. Morales AA, Gutman D, Boise LH (2008) BH3-only proteins Noxa, Bmf, and Bim are necessary for arsenic trioxide-induced cell death in myeloma. *Blood* 111: 5152–5162.
 40. Sharma A, Singh K, Mazumder S, Hill BT, Kalaycio M, et al. (2013) BECN1 and BIM interactions with MCL-1 determine fludarabine resistance in leukemic B cells. *Cell Death Dis* 4: e628.
 41. de la Fuente MT, Casanova B, Moyano JV, Garcia-Gila M, Sanz L, et al. (2002) Engagement of α 4 β 1 integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. *J Leukoc Biol* 71: 495–502.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Arsenic trioxide synergistically potentiates the cytotoxic effect of fludarabine in chronic lymphocytic leukemia cells by further inactivating the Akt and ERK signaling pathways



Carol Lozano-Santos^{a,1}, Irene Amigo-Jiménez^{b,1}, Sara Nova-Gurumeta^a,
Nuria Pérez-Sanz^a, Angeles García-Pardo^{b,*}, José A. García-Marco^{a,**,2}

^a Molecular Cytogenetics Unit, Hematology Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda and IDIPHIM, Madrid, Spain

^b Cellular and Molecular Medicine Department, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 March 2015
Available online 11 April 2015

Keywords:
CLL
Arsenic trioxide
Fludarabine
Synergistic effect
Combined therapies
Survival pathways

ABSTRACT

CLL remains an incurable disease, making it crucial to continue searching for new therapies efficient in all CLL cases. We have studied the effect of combining arsenic trioxide (ATO) with fludarabine, a frontline drug in CLL. We have found a synergistic interaction between 1 μ M ATO and 5 μ M fludarabine that significantly enhanced the cytotoxic effect of the individual drugs. Importantly, ATO sensitized fludarabine-resistant cells to the action of this drug. The mechanism behind this effect included the downregulation of phospho-Akt, phospho-ERK, and the Mcl-1/Bim and Bcl-2/Bax ratios. The combination of ATO and fludarabine partially overcame the survival effect induced by co-culturing CLL cells with stromal cells. Therefore, low concentrations of ATO combined with fludarabine may be an efficient therapeutic strategy in CLL patients.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the accumulation of CD5⁺ B-lymphocytes in peripheral blood and lymphoid tissues [1,2]. Albeit being a common type of leukemia, CLL remains incurable. Current therapies include the use of the purine analogue fludarabine, alone or combined with anti-CD20 monoclonal antibodies or kinase inhibitors [3–5]. Although these treatments control the disease in many cases, patients carrying bad prognostic markers (del17p13, unmutated IgH_V) do not respond well to therapy, making it crucial to continue searching for new compounds, efficient in CLL patients who have indication for treatment.

Arsenic trioxide (ATO) is a successful treatment for acute promyelocytic leukemia and it is being trialed for its possible use in other hematologic and non-hematologic malignancies, generally in combined therapies [6–8]. We and others have shown that ATO, at 2–4 μ M concentration or higher, effectively induces *in vitro* apoptosis of CLL cells, including those cases with unfavorable prognosis [9–11]. It is not known whether the combination of low doses of ATO with the frontline therapeutic agent fludarabine, could be an efficient treatment for CLL, particularly in those cases with known resistance to fludarabine. In the present report we show that 1 μ M ATO synergistically interacts with fludarabine and enhances the cytotoxic effect of fludarabine on all CLL cases studied. We further show that this is due to the down-regulation of important survival pathways and that the combination of ATO and fludarabine partially overcomes the CLL cell survival effect induced by stroma.

2. Materials and methods

2.1. Patients, cells and cell cultures

Approval was obtained from the Hospital Puerta de Hierro and the CSIC Bioethics Review Boards for these studies. All patients

* Corresponding author. Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.

** Corresponding author. Hematology Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Manuel de Falla 1, 28222 Majadahonda, Madrid, Spain.

E-mail addresses: agarciapardo@cib.csic.es (A. García-Pardo), jagarciam@aehh.org (J.A. García-Marco).

¹ These authors contributed equally to this work.

² These two senior authors contributed equally to this work.

signed an informed consent before blood was drawn. B-lymphocytes were purified from the 35 CLL samples listed in Table 1 by centrifugation, using Ficoll gradient (Rafer, S.L. Zaragoza, Spain). The resulting B cell population was >90% CD19⁺, determined on a BD FACScalibur flow cytometer (San Jose, CA, USA). The human stromal cell lines HS-5 (fibroblastoid) and HS-27A (epithelioid) [12] were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA) and cultured in RPMI/10% FBS. For CLL-stromal cell co-culture, stromal cells were seeded onto gelatin-coated wells for 4–6 h and stimulated with 15–20 ng/ml TNF α overnight at 37 °C, 5% CO₂. CLL cells were added to the confluent stromal cell monolayers or cultured in suspension for comparison. After 2 h at 37 °C, 1 μ M ATO, 5 μ M fludarabine, both drugs together, or vehicle was added and cells further incubated for 48 h. CLL cells were gently collected with culture medium for further analyses.

2.2. Antibodies and reagents

Rabbit polyclonal antibodies (RpAbs) to Mcl-1 (sc-819), Bax (sc-526) and mouse monoclonal Ab (mAb) to Bcl-2 (sc-509) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). RpAb to Bim (559685) was from BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ). Anti-vinculin mAb (V9131) was from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Anti-phospho-Akt (Thr308) and phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) RpAbs were from Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA). HRP-labelled Abs to rabbit or mouse immunoglobulins were from Dako (Glostrup, Denmark). Arsenic trioxide (ATO) and fludarabine were from Sigma–Aldrich.

2.3. Analysis of cell viability

2×10^5 CLL cells, cultured for 48 h in suspension or with stroma, and with or without drugs, were suspended in 300 μ l binding buffer (Immunostep, Salamanca, Spain) containing 1 μ l FITC-Annexin V and 1.5 μ g/ml propidium iodide (PI). Cell viability was determined using a five-color flow cytometer (FC 500; Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Data were analyzed using the CompuSyn software (BioSoft, Cambridge, UK), which allows the calculation of the combination index based on the algorithm of Chou and Talalay [13]. Combination index values <1 indicate synergism, values = 1 indicate additivity, and >1, antagonism.

2.4. Western blotting

These assays were performed exactly as previously described [11]. Protein bands were developed using the enhanced chemiluminescent detection method (GE Healthcare Europe GmbH, Barcelona, Spain) and quantitated using the MultiGauge V3.0 program (Fujifilm Global Lifescience, Düsseldorf, Germany). Protein load was corrected using vinculin as internal standard.

2.5. Mutational analysis

ATM (exons 2–63) and *BIRC3* genes (exons 6–9) were analyzed by High-resolution melting (HRM) analysis using the LightCycler 480 platform (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and Sanger sequencing using the BigDye Terminator Chemistry and an

Table 1
Clinical characteristics of CLL patients.

Patient	Sex/Age	Stage ^a	IGHV status	CD38/ZAP70 ^b	TP53	ATM	BIRC3	SF3B1	NOTCH1	11q	Therapy
P1	Male/57	A/0	M	-/ND	ND/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P2	Female/54	A/0	M	-/ND	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P3	Male/67	B/II	UM	-/+	WT/del-	UM	M	UM	UM	del-	No
P4	Male/67	A/0	UM	-/+	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P5	Male/54	A/I	M	-/+	ND/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P6	Male/43	B/II	UM	-/+	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P7	Female/53	A/0	UM	-/+	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P8	Female/52	A/0	M	ND/ND	ND/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P9	Male/58	A/I	UM	-/+	ND/del-	UM	UM	UM	UM	del+	No
P10	Male/74	A/0	M	+/+	ND/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P11	Female/42	B/I	M	-/+	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P12	Female/59	A/0	M	-/+	WT/del-	M	UM	UM	UM	del-	No
P13	Male/73	A/0	UM	-/+	M/del-	M	UM	UM	UM	del-	No
P14	Male/57	B/II	UM	-/+	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P15	Male/64	B/II	UM	-/ND	M/del-	ND	ND	UM	UM	del-	No
P16	Female/55	B/II	M	-/+	M/del-	ND	ND	UM	UM	del-	No
P17	Male/47	A/0	ND	-/-	WT/del-	ND	ND	UM	UM	del-	No
P18	Male/75	A/I	ND	-/-	ND/del-	ND	ND	UM	UM	del-	No
P19	Female/72	A/0	M	-/+	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P20	Female/69	B/II	ND	-/+	ND/del-	ND	ND	UM	UM	del+	No
P21	Male/65	A/II	ND	-/ND	ND/del-	ND	ND	ND	ND	del-	No
P22	Female/72	A/0	M	-/+	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	CH
P23	Male/44	B/I	UM	+/+	M*/del-	UM	UM	UM	UM	del-	F
P24	Female/68	A/0	UM	-/+	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	CH
P25	Female/67	A/II	UM	+/ND	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	FC
P26	Female/65	A/I	M	-/-	M/del-	UM	UM	M	UM	del-	Benda
P27	Male/50	A/0	M	-/+	ND/del-	UM	UM	UM	UM	del-	FCR + Rm
P28	Male/68	A/0	M	-/-	WT/del-	UM	UM	M	ND	del-	FC
P29	Female/53	A/0	UM	-/ND	M*/del-	UM	UM	M	UM	del-	FC
P30	Male/46	A/0	UM	+/+	WT/del-	UM	UM	UM	M	del-	FC
P31	Male/49	A/I	UM	+/+	WT/del-	M	UM	UM	M	del+	CH
P32	Male/46	A/II	M	+/+	WT/del-	M	UM	UM	M	del-	FC-Alem
P33	Male/64	B/I	UM	-/ND	WT/del-	M	M	UM	UM	del+	FC
P34	Male/69	B/II	UM	-/+	ND/del-	UM	UM	UM	UM	del+	FCR
P35	Male/65	A/0	UM	+/+	WT/del-	ND	ND	UM	UM	del-	F

IGHV, immunoglobulin heavy variable gene; WT, wild type; M, Mutated; M*, acquired mutation; UM, unmutated; CH, Chlorambucil; F, Fludarabine; Benda, Bendamustine; FC, Fludarabine + Cyclophosphamide; FCR, Fludarabine + Cyclophosphamide + Rituximab; Rm, Rituximab maintenance; Alem, Alemtuzumab; ND, Not determined.

^a Clinical stage according to references [1,2].

^b The coexpression of CD38 and ZAP-70 has clinical prognostic value [1,2].

ABIPrism 3130 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA), NOTCH1 (p.P2515fs*4) and SF3B1 genes (p.K700E) were studied by qbiomarker somatic mutation PCR assay (SABiosciences, Qiagen, Hilden, Germany) using 7500 RT-PCR (Applied Biosystems) [14].

2.6. Statistical analyses

Statistical significance of the data was determined using the two-tailed Student's *t*-test. A *p* value of ≤ 0.05 was considered significant. Analyses were performed using the GraphPad InStat v3.06 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. ATO enhances the cytotoxic effect of fludarabine in CLL cells

To determine whether ATO enhanced the cytotoxic activity of drugs currently used for the treatment of CLL, CLL cells from previously untreated (UT, *n* = 14) or treated (T, *n* = 13) patients (Table 1) were incubated with 1 μ M ATO alone or combined with increasing doses of fludarabine. After 48 h, cell viability was measured by flow cytometry using Annexin V and PI. The average constitutive viability of these samples was 86% (UT patients) and 84% (T patients) and was normalized to 100. Fig. 1A shows for both cases that ATO alone had a limited effect, reducing viability by 25% and 21%, respectively. Fludarabine alone decreased viability in a dose-dependent manner leading to 50% (UT patients) and 51% (T patients) at 5 μ M concentration. The combination of ATO and fludarabine significantly increased their individual effect at all concentrations of fludarabine tested, resulting in 26% (UT patients) and 42% (T patients) at the highest dose of fludarabine tested.

We next analyzed whether the interaction of ATO and fludarabine was synergistic or additive by calculating the combination index using the CompuSyn software. In samples from UT patients, the interaction of both drugs was additive for 1 μ M fludarabine and synergistic for the higher concentrations of 3 and 5 μ M (Fig. 1B). However, in samples from T patients, the combination of ATO with 1 or 3 μ M fludarabine was synergistic while the combination with 5 μ M fludarabine was additive (Fig. 1B), reflecting the differential response of the two groups of patients.

To then determine whether ATO was able to sensitize fludarabine-resistant cells to the action of this drug, we selected samples from both UT (P3, P5, P9, P10, P11) and T patients (P23, P26, P27, P29, P31) that responded poorly to fludarabine. Fig. 1C shows that fludarabine alone was highly inefficient as at the highest concentration cell viability remained at 81% and 85%, respectively, for UT and T samples. Likewise, 1 μ M ATO alone rendered cell viability values of 77% and 86%, respectively, for UT and T samples. Combination of several doses of fludarabine with 1 μ M ATO significantly decreased cell viability at all points tested, reaching 36% (UT samples) and 69% (T samples) at 5 μ M fludarabine (Fig. 1C). For T samples, the most efficient combination was 1 μ M ATO/1 μ M fludarabine. The interaction of ATO and fludarabine in these groups of patients followed the same synergistic or additive pattern described above, except that for UT samples, the combination of 1 μ M ATO/1 μ M fludarabine was also synergistic (Fig. 1D). Altogether these results indicated that low concentrations of ATO potentiated the effect of fludarabine, both in UT and T samples, leading to increased cell death.

3.2. The combination of ATO and fludarabine down-regulates survival pathways in CLL cells

To gain some insights on the mechanisms accounting for the synergistic cytotoxic effect of ATO and fludarabine, we analyzed the

possible regulation of well-known molecules involved in CLL survival. CLL cells from several UT patients were treated with either 1 μ M ATO, 5 μ M fludarabine or both drugs together. After 48 h, cells were lysed and analyzed by Western blotting. Fig. 2 shows the results of two representative samples and the quantitation of all samples studied. As observed, the phospho-Akt kinase was not down-regulated by ATO or fludarabine alone, but it was reduced 1.9-fold by combining both drugs (Fig. 2A, B). Likewise, ATO or fludarabine alone decreased phospho-ERK levels 1.5-fold, but the combination of both drugs led to a significant 4.2-fold reduction (Fig. 2A, B).

We also analyzed the regulation of Bcl-2 family proteins, which are major players in survival/apoptosis [15]. The anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-2 were clearly down-regulated when ATO and fludarabine were used together, although the effect was not statistically significant in the case of Mcl-1, compared to the effect of fludarabine alone (Fig. 2C). The pro-apoptotic members Bim and Bax were not modulated by ATO or fludarabine alone or combined (Fig. 2C). Because regulation of cell apoptosis/survival by Bcl-2 family proteins is determined by the balance of anti-apoptotic and pro-apoptotic members [15], we also measured the ratios of well-known partners of this family. Fig. 2D shows that the Mcl-1/Bim and Bcl-2/Bax ratios were significantly down-regulated by the combination of ATO and fludarabine, compared to the effect of the individual drugs. These results therefore indicated that ATO enhanced the effect of fludarabine by further inactivating kinases and Bcl-2 proteins involved in CLL cell survival.

3.3. The combination of ATO and fludarabine partially overcomes the CLL drug-resistance effect induced by stromal cells

Given the relevant role of the microenvironment in inducing survival pathways and drug resistance in CLL cells [16,17], we studied whether the synergistic combination of 1 μ M ATO and 5 μ M fludarabine overcame this resistance. CLL cells were cultured alone or in the presence of HS-5 or HS-27A stromal cells and treated with ATO, fludarabine or both drugs together. After 48 h CLL cell viability was determined by flow cytometry. The viability of control, untreated, cells in all cases was normalized to 100. In the absence of stroma, the combination of both drugs significantly enhanced the cytotoxic effect of ATO or fludarabine alone, reducing the average viability to 28% (Fig. 3A). Co-culturing with stromal cells clearly protected CLL cells to the individual action of ATO or fludarabine, rendering viability values of 80–90% for both types of stromal cells (Fig. 3B and C). Combining both drugs significantly reduced these percentages to 70% (HS-5 cells) and 74% (HS-27A cells), indicating that the synergistic interaction of ATO and fludarabine partially overcame the survival effect induced by stroma.

4. Discussion

CLL remains an incurable disease and current therapies and clinical trials mostly rely on the use of combined therapies [1–4]. ATO may be a good compound to use in these therapies, due to its demonstrated effectiveness in all CLL cases, regardless of their prognostic markers [9–11]. Indeed, a previous study showed that ATO, at 2–4 μ M, preferentially induced apoptosis in CLL samples from patients with unfavorable prognosis, including those that were resistant to fludarabine [9]. Using a different strategy, consisting in combining ATO and fludarabine, we now show for the first time that 1 μ M ATO was synergistic with certain concentrations of fludarabine and sufficient to sensitize fludarabine-resistant CLL cells to this drug. Interestingly, samples from previously untreated or treated patients responded well to this drug combination, although the effect on treated patients was moderate. Another

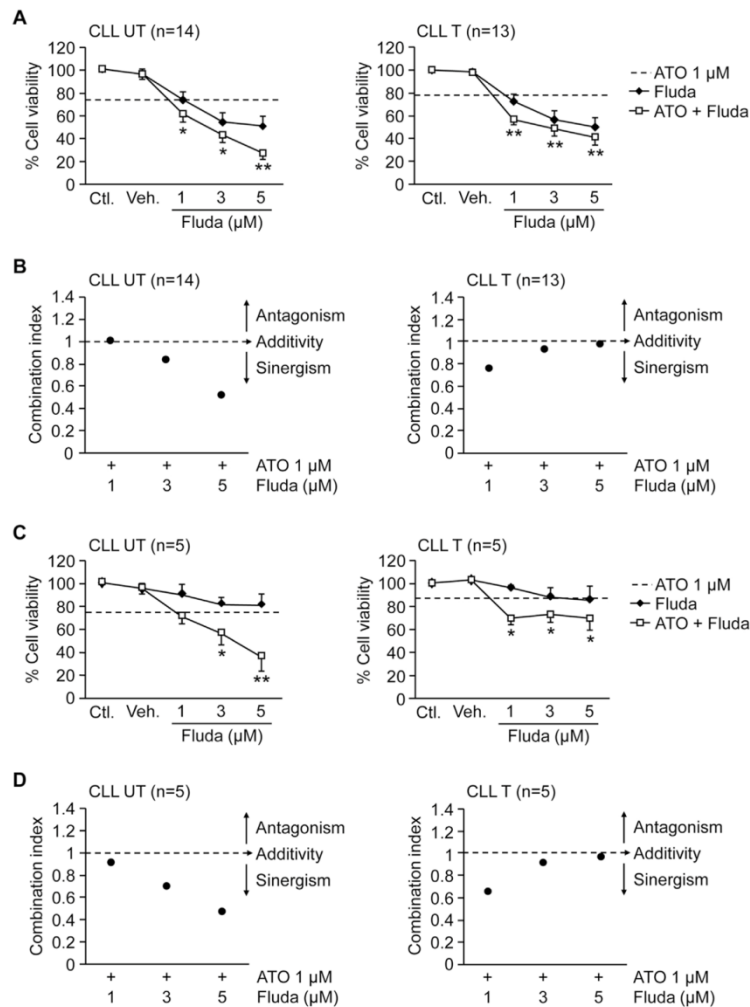


Fig. 1. Increased cytotoxicity against CLL cells by the combination of ATO and fludarabine. (A) 2×10^5 CLL cells from untreated (UT) or treated (T) patients were incubated with medium (control, Ctl), vehicle (Veh) or 1 μM ATO plus the indicated concentrations of fludarabine (Fluda). After 48 h, cell viability was determined by flow cytometry. Cell viability in the presence of 1 μM ATO alone (UT: 75%; T: 79%) is indicated by the dotted line. (B) Combination index values were calculated using the CompuSyn software. Graphs for UT and T samples represent the means of the indicated number of CLL samples, each with duplicate determinations. (C) CLL cells from UT and T patients that responded poorly to fludarabine were selected and treated with 1 μM ATO and the indicated concentrations of fludarabine. After 48 h cell viability was measured as explained. (D) Combination index analyses of the samples studied in (C) were calculated as above. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

difference between the two groups of patients was the dose of ATO at which synergism with fludarabine was observed. These differences probably reflect the more advanced disease (genetic modifications, clonal evolution, etc.) in the case of treated patients. In agreement with this, we mostly observed NOTCH1 and SF3B1 mutations, relevant for CLL pathology [18], within the group of treated samples (see Table 1).

Our results are in agreement with previous *in vitro* studies in which ATO was tested in combined therapies in several

malignancies. These include the combination with interferon- α for aggressive T-cell leukemia/lymphoma [19], or with phytosphingosine for myeloid leukemia cells [20]. ATO has also been tested in combination with kinase inhibitors, oxidative stress modulators and chemotherapeutic drugs, generally with good results [21,22]. Perhaps the best established is the combination of ATO and all-trans retinoic acid, already in clinical trials and shown to be extremely effective for the treatment of acute promyelocytic leukemia [23,24]. In line with these studies, we now report that the

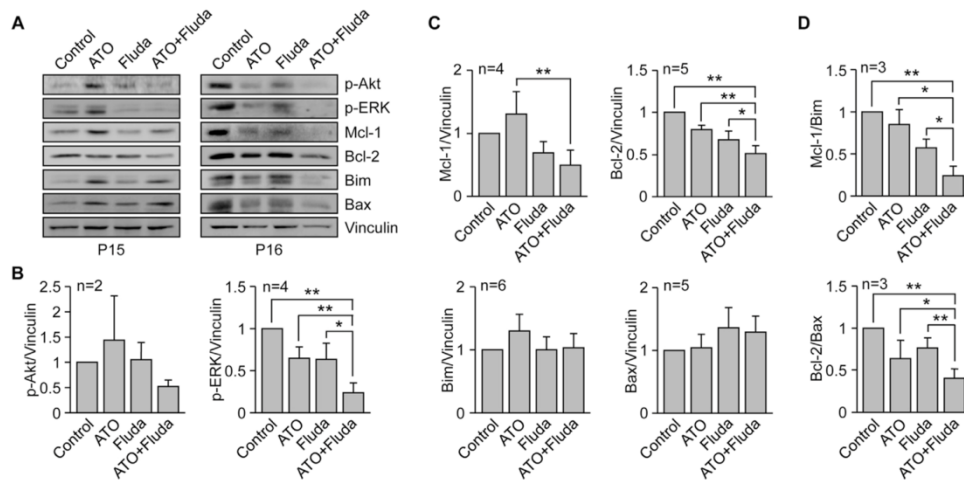


Fig. 2. Survival pathways affected by the combination ATO-fludarabine in CLL cells. (A) 10×10^6 CLL cells from two representative samples were treated with or without 1 μ M ATO, 5 μ M fludarabine or both drugs together for 48 h. Cells were lysed and lysates analyzed by Western blotting, using vinculin as internal standard. (B) Relative expression levels of phospho-Akt and phospho-ERK, quantitated by chemiluminescence after normalizing control values to 1. (C) Quantitation of the protein bands corresponding to the Bcl-2 family proteins shown in (A). (D) Quantitation of the indicated ratios. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

novel combination of very low concentrations of ATO and fludarabine may constitute a promising and effective alternative for the treatment of either naïve or relapsed/refractory patients with CLL.

Analysis of the possible mechanisms accounting for the enhanced cytotoxic effect of ATO + fludarabine revealed the involvement of the Akt and ERK pathways. Indeed, phosphorylation of both kinases was significantly down-regulated when both drugs were used together. Akt has been linked to the action of ATO since several reports have shown that inhibitors of this kinase increase the cytotoxic effect of ATO in myeloid and other cell types [25–27]. In the case of CLL, we have shown that 3 μ M ATO downregulated phospho-Akt, facilitating apoptosis [10]. Although the regulation of ERK by ATO appears to be more complex [28], it is clear from our present results that 1 μ M ATO combined with fludarabine

significantly dephosphorylates ERK. Therefore, the observed enhancement of CLL cell apoptosis when both drugs are present is likely due to the down-modulation of the Akt and ERK survival pathways.

Additional mechanistic insights were obtained by studying the possible regulation of some Bcl-2 family members known to be important for CLL cell survival [29]. Our results show that the expression of the anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-2 clearly decreased upon treatment with ATO and fludarabine. Interesting, Mcl-1 (and possibly Bcl-2) is a downstream target of Akt [30]. Additionally, the ratio with their corresponding pro-apoptotic partners Bim and Bax, was also downregulated by the combination of ATO and fludarabine. These results strongly suggest that the enhanced cytotoxicity observed upon combining ATO and

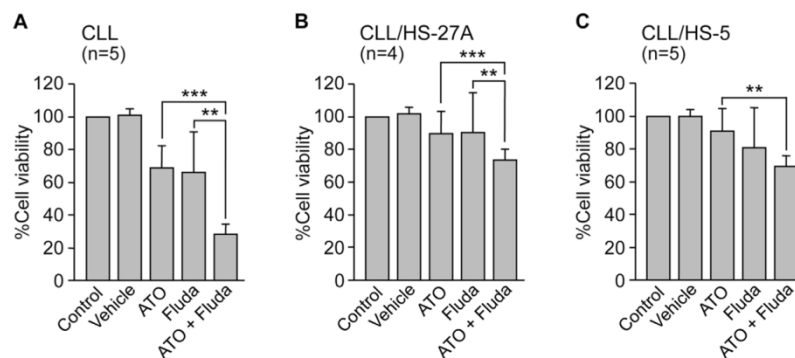


Fig. 3. The combination of ATO and fludarabine partially overcomes the survival effect of stroma. 2×10^5 CLL cells were incubated in suspension or with stromal cells, with or without 1 μ M ATO, 5 μ M fludarabine or both drugs together. After 48 h, CLL cells were recovered and their viability measured by flow cytometry. Cell viability of control, untreated, cells in each case was normalized to 100. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$.

fludarabine involves down-regulation of crucial survival pathways. Importantly, modulation of these pathways was not achieved by the individual drugs, further demonstrating the synergistic action of ATO and fludarabine.

A crucial component to take into account when studying the action of drugs in CLL and other cells is the effect of the microenvironment, which activate survival signals on the malignant cells that favor drug resistance [16,17]. Using co-cultures of CLL and stromal cells we show in this report that the combination of ATO and fludarabine partially overcomes the survival effect of the stroma. Although these conditions would have to be further studied so that the stroma effect can be completely suppressed, our results are very encouraging, considering the low concentration of ATO employed in our study. In summary, our current findings indicate that ATO in combination with fludarabine may be an efficient and novel therapeutic strategy for all cases of CLL, including those with unfavorable prognosis.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by grants SAF2012-31613 (AGP) and RTICC (Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer) RD12/0036/0061 (AGP), from the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO), Spain; S2010/BMD-2314-Neoplasim (AGP) from the Comunidad de Madrid/European Union; and by a grant from the Fundación para la Investigación Biomédica Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid (JAGM). CLS was supported by a grant from Roche Pharma and IAJ was supported by the Junta de Ampliación de Estudios program, JAEPre2010-00607, CSIC/EU, and by MINECO.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.007>.

References

- [1] L. Pleyer, A. Egle, T.N. Hartmann, R. Greil, Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6 (2009) 405–418.
- [2] T. Zenz, D. Mertens, R. Küppers, et al., From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia, *Nat. Rev. Cancer* 10 (2010) 37–50.
- [3] M. Hallek, Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies, *Blood* 122 (2013) 3723–3734.
- [4] F.T. Awan, J.C. Byrd, New strategies in chronic lymphocytic leukemia: shifting treatment paradigms, *Clin. Cancer Res.* 20 (2014) 5869–5874.
- [5] C. Chung, R. Lee, Ibrutinib, obinutuzumab, idelalisib, and beyond: review of novel and evolving therapies for chronic lymphocytic leukemia, *Pharmacotherapy* 34 (2014) 1298–1316.
- [6] K. Alimoghaddam, A review of arsenic trioxide and acute promyelocytic leukemia, *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell. Res.* 8 (2014) 44–54.
- [7] L. Zhou, Jian Hou, G. Chi-Fung Chan, D. Man-Yuen Sze, Arsenic trioxide for non acute promyelocytic leukemia hematological malignancies: a new Frontier, *J. Blood Dis.* 1 (2014) 1018.
- [8] P.R. Subbarayan, B. Ardalan, In the war against solid tumors arsenic trioxide needs partners, *J. Gastrointest. Cancer* 45 (2014) 363–371.
- [9] O. Merkel, C. Heyder, D. Asslaber, et al., Arsenic trioxide induces apoptosis preferentially in B-CLL cells of patients with unfavourable prognostic factors including del17p13, *J. Mol. Med.* 86 (2008) 541–552.
- [10] J. Redondo-Munoz, E. Escobar-Diaz, M. Hernández del Cerro, et al., Induction of B-chronic lymphocytic leukemia cell apoptosis by arsenic trioxide involves suppression of the PI3K/Akt pathway via JNK activation and PTEN upregulation, *Clin. Cancer Res.* 16 (2010) 4382–4391.
- [11] I. Amigo-Jiménez, E. Bailón, E. Ugarte-Berzal, et al., Matrix metalloproteinase-9 is involved in chronic lymphocytic leukemia cell response to fludarabine and arsenic trioxide, *PLoS One* 9 (2014) e99993.
- [12] A.B. Roeklein, B. Torok-Storb, Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes, *Blood* 85 (1995) 997–1005.
- [13] T.C. Chou, P. Talalay, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors, *Adv. Enzyme Regul.* 22 (1984) 27–55.
- [14] D. Rossi, M. Fangazio, S. Rasi, et al., Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 119 (2012) 2854–2862.
- [15] P.E. Czabotar, G. Lessene, A. Strasser, J.M. Adams, Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 15 (2014) 49–63.
- [16] A.D. Ramsay, M. Rodríguez-Justo, Chronic lymphocytic leukaemia—the role of the microenvironment pathogenesis and therapy, *Br. J. Haematol.* 162 (2013) 15–24.
- [17] J.A. Burger, J.G. Gribben, The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies, *Semin. Cancer Biol.* 24 (2014) 71–81.
- [18] S. Chiaretti, M. Marinelli, I. Del Giudice, et al., NOTCH1, SF3B1, BIRC3 and TP53 mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia undergoing first-line treatment: correlation with biological parameters and response to treatment, *Leuk. Lymphoma* 55 (2014) 2785–2792.
- [19] K. Ishitsuka, J. Suzumiya, M. Aoki, et al., Therapeutic potential of arsenic trioxide with or without interferon-alpha for relapsed/refractory adult T-cell leukemia/lymphoma, *Haematologica* 92 (2007) 719–720.
- [20] M.T. Park, Y.H. Kang, I.C. Park, et al., Combination treatment with arsenic trioxide and phytoresverin enhances apoptotic cell death in arsenic trioxide-resistant cancer cells, *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 82–92.
- [21] H. Yan, Y.C. Wang, D. Li, Y. Wang, et al., Arsenic trioxide and proteasome inhibitor bortezomib synergistically induce apoptosis in leukemic cells: the role of protein kinase C δ , *Leukemia* 21 (2007) 1488–1495.
- [22] S. Takahashi, Combination therapy with arsenic trioxide for hematological malignancies, *Anticancer Agents Med. Chem.* 10 (2010) 504–510.
- [23] F. Efficace, F. Mandelli, G. Avvisati, et al., Randomized phase III trial of retinoic acid and arsenic trioxide versus retinoic acid and chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia: health-related quality-of-life outcomes, *J. Clin. Oncol.* 32 (2014) 3406–3412.
- [24] M.F. Arteaga, J.H. Mikesch, T.K. Fung, C.S. So, Epigenetics in acute promyelocytic leukaemia pathogenesis and treatment response: a transition to targeted therapies, *Br. J. Cancer* 112 (2015) 413–418.
- [25] A.M. Ramos, C. Fernández, D. Amrán, et al., Pharmacologic inhibitors of PI3K/Akt potentiate the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide via glutathione depletion and increased peroxide accumulation in myeloid leukemia cells, *Blood* 105 (2005) 4013–4020.
- [26] G. Tabellini, A. Cappellini, P.L. Tazzari, et al., Phosphoinositide 3-kinase/Akt involvement in arsenic trioxide resistance of human leukemia cells, *J. Cell. Physiol.* 202 (2005) 623–634.
- [27] B.C. Bornhauser, L. Bonapace, D. Lindholm, et al., Low-dose arsenic trioxide sensitizes glucocorticoid-resistant acute lymphoblastic leukemia cells to dexamethasone via an Akt-dependent pathway, *Blood* 110 (2007) 2084–2091.
- [28] M.C. Estano, E. Calviño, E. de Blas, et al., 2-Deoxy-D-glucose cooperates with arsenic trioxide to induce apoptosis in leukemia cells: involvement of IGF-1R-regulated Akt/mTOR, MEK/ERK and LKB-1/AMPK signaling pathways, *Biochem. Pharmacol.* 84 (2012) 1604–1616.
- [29] A.G. Buggins, C.J. Pepper, The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia, *Leuk. Res.* 34 (2010) 837–842.
- [30] K. Balakrishnan, J.A. Burger, M. Fu, et al., Regulation of Mcl-1 expression in context to bone marrow stromal microenvironment in chronic lymphocytic leukemia, *Neoplasia* 16 (2014) 1036–1046.

Bone marrow stroma-induced resistance of chronic lymphocytic leukemia cells to arsenic trioxide involves Mcl-1 upregulation and is overcome by inhibiting the PI3K δ or PKC β signaling pathways

Irene Amigo-Jiménez¹, Elvira Bailón¹, Noemí Aguilera-Montilla¹, María José Terol², José A. García-Marco³ and Angeles García-Pardo¹

¹Cellular and Molecular Medicine Department, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain; ²Hematology Department, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain; ³Molecular Cytogenetics Unit, Hematology Department, Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid, Spain.

Contact information: Angeles García-Pardo, Cellular and Molecular Medicine Department, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. Tel: 34 91 8373112 ext 4430; Fax: 34 91 536 0432; e-mail: agarciapardo@cib.csic.es

Keywords: CLL, stromal cells, arsenic trioxide, Mcl-1, idelalisib, sotrastaurin

ABSTRACT

CLL remains an incurable disease in spite of the many new compounds being studied. Arsenic trioxide (ATO) induces apoptosis in all CLL cell types and could constitute an efficient therapy. To further explore this, we have studied the influence of stromal cells on the response of CLL cells to ATO. Bone marrow stromal cells induced CLL cell resistance to 2 μ M ATO and led to activation of Lyn, ERK, PI3K and PKC, as well as NF- κ B and STAT3. Mcl-1 and Bcl-xL were also upregulated after the co-culture. Inhibition experiments indicated that PI3K and PKC were involved in the resistance to ATO induced by stroma. Moreover, idelalisib and sotrastaurin, specific inhibitors for PI3K δ and PKC β , respectively, inhibited Akt phosphorylation, NF- κ B/STAT3 activation and Mcl-1 upregulation, and rendered cells sensitive to ATO. Gene silencing Mcl-1 with siRNA also overcame the protecting effect of stroma, confirming its key role in the survival mechanism against ATO. We have therefore identified the mechanism involved in the CLL cell resistance to ATO induced by stroma and show that idelalisib or sotrastaurin block this mechanism and restore sensibility to ATO. Combination of ATO with these inhibitors may thus constitute an efficient treatment for CLL.

INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the accumulation of malignant CD5⁺ B lymphocytes in the peripheral blood and lymphoid tissues [1, 2]. Frontline therapies for CLL have been based in the administration of cytostatic drugs such as chlorambucil and fludarabine, which in many cases control the disease efficiently and are well tolerated [3]. However, patients carrying certain prognostic markers, such as del17p13 or unmutated IgH_V, do not respond well to these therapies [3, 4]. CLL treatment has greatly improved with the development of more specific agents, such as monoclonal antibodies (obinutuzumab, anti-CD20), kinase inhibitors (CAL-101 or idelalisib, for PI3K δ ; ibrutinib, for Bruton tyrosine kinase; sotrastaurin, for PKC β), or Bcl-2 inhibitors (ABT-263, ABT-199) [3, 5]. These agents are currently in clinical trials or already approved, since they show promising results even in cases with adverse prognosis. Since these treatments are still in ongoing phase II-III trials, their long-term efficacy, particularly in refractory CLL cases, is not known. It is therefore crucial to continue searching for new compounds, which could be useful in the treatment of CLL, especially in the advanced setting.

Arsenic trioxide (ATO) is successfully employed for the treatment of acute promyelocytic leukemia [6] and is being trialed for other malignancies, generally in combined therapies [7, 8]. In the case of CLL, we and others have shown that ATO effectively induces *in vitro* apoptosis in all CLL cases tested, including those with unfavorable prognosis [9, 10]. ATO, alone or in combination with other treatments, could thus be an efficient therapeutic agent for CLL.

It is now well established that the CLL microenvironment activate survival pathways on the malignant cells that favor drug resistance and contribute to disease progression [11, 12]. Targeting these pathways has thus become an important issue when studying the effect of cytotoxic drugs on CLL. For example, CAL-101 was shown to down-regulate the chemokine and B-cell receptor signaling induced by stroma and to sensitize CLL cells towards bendamustine, fludarabine, and dexamethasone [13]. Blocking the heat shock protein 90 inhibited the stroma-induced NF- κ B signaling and synergistically enhanced the effect of fludarabine [14]. Likewise, blocking PI3K activity regulated the Akt/FoxO3a/Bim axis and increased the cytotoxic effect of fludarabine and bendamustine on CLL cells cultured on stroma [15].

Whether stromal cells influence the response of CLL cells to ATO has not been carefully studied. We recently showed that matrix metalloproteinase-9, a common component of the microenvironment, contributes to the CLL resistance to ATO and fludarabine by preventing downregulation of antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family [16]. Complete understanding of how stromal cells protect CLL cells from the action of ATO will allow the development of strategies that overcome this protection. We have addressed this in the present report by studying the survival mechanisms induced in CLL-stroma co-cultures and how the modulation of these mechanisms may render CLL cells sensitive to ATO in the presence of stroma.

RESULTS

Stromal cells protect CLL cells from the apoptotic effect of ATO

We previously showed that ATO efficiently induces apoptosis of CLL cells cultured in suspension [10, 16]. To determine if this response was influenced by the presence of stroma, we studied the effect of ATO in co-cultures of CLL-bone marrow stromal cells. In initial experiments, CLL cells from 9 different samples were cultured in suspension or with HS-5 cells (fibroblastoid properties) and treated with 1 or 2 μM ATO. Cell viability was measured by flow cytometry after 24 and 48 h. The average constitutive viability of these samples was 82% (range 70-90%) and was normalized to 100. Figure 1A shows that ATO decreased the viability of suspended cells in a dose-dependent manner, leading to 68% and 88% cell death, respectively, after 24 h or 48 h exposure to 2 μM ATO. Co-culture with HS-5 cells significantly protected CLL cells against the action of ATO. This was already observed using 1 μM ATO and it was clearly obvious with 2 μM , which only reduced CLL cell viability to 69% and 54%, respectively, after 24 h and 48 h (Figure 1A). All subsequent experiments were therefore performed using 2 μM ATO. In control experiments this ATO concentration had a minor effect on the viability of HS-5 cells (4% and 8% reduction after 24 and 48 h, respectively, not shown).

We next study whether HS-27A cells, an epithelioid-like stromal cell line with different functional properties than HS-5 cells [17, 18], produced the same protective effect on CLL cells exposed to ATO. HS-27A cells prevented ATO-induced CLL apoptosis in the 8 samples studied, since in the presence of 2 μM ATO average viability values were 71% (24 h) and 67% (48 h), compared to 26% and 13%, respectively, for suspended cells (Figure 1B).

We also tested the effect of culturing CLL cells on primary stroma derived from a CLL patient. Figure 1C shows that primary stroma also protected CLL cells (6 different patients) from ATO-induced apoptosis, since after 24 h, 2 μM ATO only decreased CLL cell viability to 79%, compared to 37% for suspended cells. After 48 h exposure to 2 μM ATO, these values were 61% and 14%, respectively, for stroma-cultured or suspended CLL cells (Figure 1C). Altogether these results indicated that stromal cells overcame the apoptotic effect of ATO on CLL cells, thus contributing to their survival and drug resistance.

The protecting effect against ATO induced by stroma involves interactions with CLL cells through $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrins

We next studied whether physical contact between CLL and stroma was necessary for the observed survival effect. Because these interactions are mostly mediated by the $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrins present on CLL cells [12], we examined the effect of blocking these integrins prior to setting up the co-cultures. CLL cells from five different patients were treated with anti- $\alpha 4$ or anti- $\beta 2$ blocking antibodies and incubated with stromal cells for 48 h, in the absence or presence of ATO. The average viability of control cells (without antibody treatment) at this time was 82% and was normalized to

100. In the absence of ATO, blocking $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrins did not affect the viability of CLL cells co-cultured with HS-5 stromal cells (Figure 1D). However, in the presence of ATO the anti- $\alpha 4$ and anti- $\beta 2$ integrin antibodies significantly reduced cell viability to 53% and 57%, respectively, while control antibodies had no effect (Figure 1D). The simultaneous blocking of both integrins increased this effect, reducing the viability of CLL cells to 32% (Figure 1D), closer to the effect of ATO on CLL cells in suspension (19%, not shown).

Similar results were obtained for CLL cells cultured on HS-27A stromal cells (Figure 1E). While the antibodies did not affect the viability of CLL cells in the absence of ATO, in the presence of this agent the anti- $\alpha 4$ antibody was even more effective than in HS-5 co-cultures, reducing cell viability to 37% and to 28% when combined with anti- $\beta 2$ antibody (Figure 1E). The higher effect of the anti- $\alpha 4$ antibody could be explained by the fact that HS-27A cells express high levels of VCAM-1 ($\alpha 4\beta 1$ ligand) upon stimulation with TNF- α while HS-5 cells do not ([18] and data not shown). These results established that blocking integrin-mediated interactions between CLL and stromal cells greatly reverted the stroma-induced CLL cell resistance to ATO. Because the effects of HS-5 and HS-27A cells on CLL cell drug resistance were similar, subsequent experiments were performed with both types of stromal cells but only the results obtained with HS-27A cells will be shown.

Survival pathways induced by co-culturing CLL cells with stromal cells and effect of ATO treatment

To determine the survival pathways induced by stromal cells and possibly contributing to CLL cell resistance to ATO, we first analyzed the possible activation of protein kinases relevant for CLL viability [19]. CLL cells were cultured in suspension or with HS-27A cells for 24 h in the absence or presence of ATO, lysed and analyzed by Western blotting. Figure 2A shows the results for 2 representative samples and the quantitation for all samples studied. In cultures of CLL cells alone, the phosphorylation of Akt, PKC, and Lyn was reduced upon ATO treatment, compared to the values of control cells (normalized to 1). Phosphorylated ERK was hardly detectable under these conditions in the samples studied. Co-culturing CLL cells with stroma significantly increased Akt, PKC, ERK and Lyn phosphorylation. Notably, these kinases remained activated after exposure to 2 μ M ATO (Figure 2A).

We also examined the possible activation of the transcription factors NF- κ B and STAT3, which are downstream targets of some of these kinases and also involved in CLL cell survival [20, 21]. NF- κ B activation was measured by analyzing the phosphorylation levels of I κ B, an associated inhibitory protein which is released from the NF- κ B complex and degraded upon activation [22]. As shown in Figure 2B, the phosphorylation of I κ B and STAT3 on CLL cells was increased by stroma and remained elevated upon treatment with 2 μ M ATO. Identical results were obtained when CLL cells were cultured on HS-5 stromal cells (not shown). Altogether these results indicated that stroma induced several survival pathways in CLL cells that were not affected by treatment with 2 μ M ATO.

Modulation of Bcl-2 family proteins in CLL cells co-cultured with stromal cells and exposed to ATO

To further characterize the molecular mechanisms induced by stroma on CLL cells exposed to ATO, we studied the regulation of Bcl-2 family proteins, which are major players in survival/apoptosis [23]. Moreover, some of these proteins are targets of NF- κ B and/or STAT3, which as shown above, remain activated upon ATO treatment (Figure 2B). CLL cells were cultured in the absence or presence of HS-27A cells for 24 h and with or without treatment with 2 μ M ATO. Figure 3A shows the Western blotting results of a representative patient and the quantitation of all patients studied. In cultures of CLL cells alone, the anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-xL were significantly downregulated by ATO (in agreement with the decreased cell viability, see Figure 1A), while Bcl-2 did not change. Upon co-culturing with HS-27A cells (or HS-5 cells, not shown), Mcl-1 and Bcl-xL were significantly upregulated while Bcl-2 was not (Figure 3A). Notably, treatment with ATO did not decrease the upregulated levels of Mcl-1 and Bcl-xL (Figure 3A), suggesting the likely involvement of these proteins in the resistance to this agent.

We also analyzed the possible modulation of several pro-apoptotic Bcl-2 family members, such as Bim, Noxa and Bax, known to regulate CLL viability by forming complexes with anti-apoptotic members of the family [23]. In the absence of stroma, 2 μ M ATO increased the levels of Bim and Noxa, but not Bax, in CLL cells 2.8 and 3.5-fold, respectively, compared to control values (Figure 3A). This increase correlated with the induction of apoptosis, demonstrated by the presence of 66% Annexin V⁺ cells (not shown). Culturing CLL cells on stroma clearly prevented upregulation of Bim and Noxa upon ATO treatment (Figure 3A), in agreement with the observed reduced apoptosis (35%, not shown) on these cells.

Since regulation of cell apoptosis/survival by Bcl-2 family proteins is determined by the balance of anti-apoptotic and pro-apoptotic members [23], we analyzed the ratios of these proteins in CLL/stromal cell cultures, before and after exposure to ATO. Figure 3B shows that the ratios Mcl-1/Bim, Mcl-1/Noxa, and Bcl-xL/Bim, all well-known partners [23], were significantly increased by stroma and remained elevated upon ATO treatment. Although Bax, another well-known partner for Bcl-xL was not modulated by stroma, the resulting Bcl-xL/Bax ratio was also elevated and it was not decreased by ATO (Figure 3B). Altogether these results strongly suggested that Mcl-1 and Bcl-xL may contribute to the resistance of CLL cells to ATO induced by stroma.

Involvement of the PI3K and PKC signaling pathways in the stroma-induced resistance of CLL cells to ATO

To determine which of the survival pathways described above was specifically involved in the resistance of CLL cells to ATO, we first studied the effect of blocking the activity of protein kinases and transcription factors. CLL cells were incubated with or without specific inhibitors (all at 5 μ M except for Stattic that was used at 2.5 μ M) for 1 h prior to culturing with HS-27A stromal cells (or HS-5 cells, not shown) for 24 h, in the absence or presence of 2 μ M ATO. The viability of untreated CLL cells cultured with

stromal cells for 24 h (40%-75%) was normalized to 100. Figure 4A shows that in the absence of ATO, only the inhibition of PI3K with LY294002 or STAT3 with Stattic had a limited effect, reducing cell viability by 17% and 28%, respectively. However, in the presence of ATO, blocking PI3K, Akt, PKC, NF- κ B or STAT3 activities efficiently overcame the survival effect induced by stromal cells (Figure 4A). In contrast, inhibiting MEK/ERK with UO126 or Lyn with PP2 had no effect, albeit these inhibitors efficiently blocked the phosphorylation of these kinases (Figure 4A).

The above results established that PI3K and PKC signaling were essential for the resistance to ATO induced by stroma. The PI3K δ and PKC β are major isoforms in CLL cells and some of their antagonists are currently in clinical trials for this disease [3, 5, 24, 25]. We therefore tested the effect of specifically blocking PI3K δ or PKC β on the CLL cell resistance to ATO induced by stroma. CLL cells were treated or not with various concentrations of idelalisib (PI3K δ inhibitor) or sotrastaurin (pan-PKC inhibitor with high efficiency for PKC β) and cultured with HS-27A cells for 24 h, in the absence or presence of 2 μ M ATO. Figure 4B shows that, in the absence of ATO, these inhibitors had a limited effect on the viability of CLL cells cultured on stromal cells. However, in the presence of ATO, idelalisib and sotrastaurin significantly reduced CLL cell viability in a dose-dependent manner, while UO126 had no effect (Figure 4B). Blocking PI3K δ and PKC β activities simultaneously by combining both inhibitors did not increase the effect of each individual inhibitor (data not shown).

To further confirm the role of the PI3K δ and PKC β pathways in the CLL cell resistance to ATO we studied whether idelalisib and sotrastaurin affected the activation of the Akt, NF- κ B and STAT3, which are also involved in this resistance (see Figure 4A). For Akt we analyzed the phosphorylation on S473, a residue that can be phosphorylated, either directly or indirectly, by several kinases including PI3K and PKC [26, 27]. Figure 4C shows that the p-S473-Akt phosphorylation induced by stroma was significantly reduced by inhibiting PI3K δ or PKC β , both in the absence or presence of 2 μ M ATO. Blocking these two kinases also significantly diminished STAT3 and NF- κ B activation, the latter assessed by the increased expression of I κ B α (Figure 4C), which reduces NF- κ B nuclear translocation and activity [22]. As observed above, blocking MEK with UO126 had no effect (Figure 4C), confirming the specific involvement of the PI3K δ and PKC β pathways.

Blocking the PI3K δ /PKC β -NF- κ B/STAT3 pathways inhibits Mcl-1 upregulation in CLL cells and the resistance to ATO induced by stromal cells

We next determine whether PI3K δ and PKC β were also responsible for the stroma-induced upregulation of Mcl-1 and Bcl-xL. CLL cells were treated with 25 μ M idelalisib, 10 μ M sotrastaurin or vehicle for 1 h and cultured over HS-27A cells for 24 h, in the absence or presence of 2 μ M ATO. At these concentrations, idelalisib and sotrastaurin reduced cell viability in the presence of ATO to 37% and 52%, respectively (not shown). In correlation with the decreased viability, Figure 5A shows that both inhibitors significantly downregulated Mcl-1 in control cells (no ATO) and more dramatically, in ATO-treated cells, while UO126 had no effect. Bcl-xL was also

significantly decreased by idelalisib and sotrastaurin, although only in the presence of ATO and to a more limited extent than Mcl-1. In agreement with the data shown in Figure 3A, Bcl-2 was not modulated by these inhibitors (Figure 5A).

To then determine whether PI3K δ and PKC β regulated Mcl-1 and Bcl-xL via NF- κ B and/or STAT3, we examined the effect of inhibiting these transcription factors. Blocking NF- κ B or STAT3 resulted in a significant downregulation of Mcl-1 expression, particularly in the presence of ATO (Figure 5B). In contrast, Bcl-xL was not affected by inhibiting NF- κ B or STAT3, suggesting alternative mechanisms of regulation or higher protein stability. Altogether these results established that upregulation of Mcl-1 via PI3K/PKC-activation of NF- κ B and STAT3 was a major mechanism accounting for the resistance of CLL cells to ATO in the presence of stromal cells.

Gene silencing Mcl-1 overcomes the resistance of CLL cells to ATO induced by stromal cells

To confirm that Mcl-1 plays a crucial role on the stroma-induced resistance of CLL cells to ATO, we knocked down this protein by transfecting CLL cells with specific or control siRNAs, prior to their co-culture with HS-27A cells. Figure 6A shows the Western blotting results of this procedure for two representative patients and the quantitation for all four patients analyzed. In the absence of ATO, the Mcl-1 siRNA reduced Mcl-1 expression by 50% compared to control values normalized to 1 (Figure 6A). Likewise, upon ATO treatment, Mcl-1 expression remained unchanged on control siRNA-transfected cells but it was reduced by 70% on Mcl-1 siRNA-transfected cells (Figure 6A).

Parallel cell viability analyses revealed that stromal cells protected CLL cells transfected with control siRNA, increasing their viability nearly 2-fold, both in the absence or presence of ATO, compared to the viability of suspended CLL cells normalized to 100 (Figure 6B). However, transfection with Mcl-1 siRNA reduced cell viability to the levels attained by CLL cells in suspension, thus nearly completely reverting the survival effect of stroma (Figure 6B). Therefore, these results established a major role for Mcl-1 in the resistance of CLL cells to ATO induced by stromal cells. Figure 6C shows a schematic representation of the identified survival mechanisms induced by stroma contributing to the resistance of CLL cells to ATO, and how they can be inhibited to render CLL cells sensitive to this agent.

DISCUSSION

We previously showed that ATO may constitute an efficient treatment in CLL, particularly in combined therapies [10,16, 28]. To further explore the potential clinical use of this agent, we have now studied the influence of bone marrow stromal cells on the response of CLL cells to ATO. We report for the first time that: 1) stromal cells induce CLL cell resistance to ATO; 2) this is due to activation of the PI3K δ -PKC β /STAT3-NF- κ B pathways, which leads to upregulation of Mcl-1; 3) blocking PI3K δ and PKC β with specific inhibitors overcomes the survival effect of stroma on CLL cells exposed to ATO.

The three types of stromal cells used in study, whether fibroblastoid-like, epithelioid-like or a mixture of both, protected CLL cells from the apoptotic action of ATO and this mostly involved physical cell-cell contact. Among the several receptor-ligand interactions that take place between CLL and stromal cells [12], our results show that blocking $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrins was sufficient to overcome the protective effect of stroma. This is agreement with previous studies showing a role for $\beta 1$ and $\beta 2$ integrins in the microenvironment-induced survival of CLL cells [29, 30]. Besides the well-known ligands for these integrins (VCAM-1, fibronectin, ICAM-1) present in bone marrow stroma, an additional cell-cell interaction contributing to the survival effect may be provided by MMP-9, also present in stroma, a ligand for $\alpha 4\beta 1$ [31], and with a reported protective role against ATO [16].

It is now well established that co-culturing CLL cells with stromal cells results in reciprocal activation of several signaling pathways, which in the case of CLL cells, promote cell survival and drug resistance [12, 32]. In our study, we detected activation of the Lyn, ERK, Akt and PKC kinases, as well as of the transcription factors NF- κ B and STAT3. Interestingly, and albeit we and others have reported a role for Lyn in CLL cell survival [21, 33], our results show that this kinase (or ERK) was not involved in the mechanism of resistance of CLL cells to ATO induced by stroma. In contrast, inhibition of PI3K (upstream of Akt) or PKC activities overcame the protective effect of stroma and rendered CLL cells sensitive to ATO. PI3K and PKC were previously shown to play an important role in the survival of CLL cells induced by IL-4 or phorbol esters, in the absence of stroma [34], as well as by other stimuli, including BCR, adhesion molecules and chemokines [35, 36]. Additionally, several inhibitors of the PI3K/Akt and PKC pathways have rendered promising results in vitro and in vivo, and may potentially have therapeutic application in CLL [5, 37, 38]. Our present results reveal new functions for PI3K and PKC in the response of CLL cells to ATO and highlight the important role of these kinases in CLL cell survival in different contexts.

Further insight into the mechanism of resistance to ATO induced by stroma was obtained by using idelalisib and sotrastaurin as inhibitors for the PI3K δ and PKC β isoforms, respectively. The study of these isoforms was chosen because of their predominant expression in CLL and their well-established role in CLL cell survival, as effectors of the B-cell receptor (PI3K δ) and Bruton tyrosine kinase (PKC β) pathways [24, 25, 39]. Indeed, idelalisib has recently entered clinical trials for CLL [3] and sotrastaurin has yielded very promising preclinical results [5]. Notably, PKC β -dependent activation of NF- κ B has been shown to be crucial for induction of CLL survival by stromal cells [40]. Our present results show that blocking PI3K δ and PKC β activities was sufficient to inhibit further downstream signaling (Akt, NF- κ B, STAT3 activation) and to overcome the survival effect of stroma. PI3K δ and PKC β are therefore key survival pathways in the response of CLL cells to ATO in the presence of stromal cells. The fact that we did not observe an additive or synergistic effect when idelalisib and sotrastaurin were used together, suggests that PI3K δ and PKC β were independently activated but converged in subsequent signaling. Indeed, both kinases can directly or indirectly phosphorylate Akt at

T308 and/or S473 [26, 41], and activate the transcription factors NF- κ B and STAT3 [40, 42].

We have further characterized the survival mechanism induced by stroma in the presence of ATO by studying the regulation of proteins from the Bcl-2 family. In agreement with our previous observations on the protective role of MMP-9 against ATO [16], our results show that ATO did not modulate the pro-apoptotic members Bim, Bax or Noxa in CLL-stromal cell co-cultures (but it did on suspended cells). Thus, although ATO upregulated these proteins in myeloma [43] and ovarian cancer [44] cells in the absence of stroma, we found a different response when stromal cells are present. With regard to the anti-apoptotic members of the Bcl-2 family, our study clearly demonstrates that stromal cells upregulated Mcl-1 in the absence or presence of ATO and this was also inhibited by idelalisib and sotrastaurin. Moreover, Mcl-1 upregulation was also blocked by inhibiting NF- κ B and STAT3, two transcription factors known to regulate Mcl-1 [45], confirming their involvement in the mechanism of resistance to ATO and the transcriptional regulation of Mcl-1 by stroma. These data, together with the fact that gene silencing Mcl-1 nearly completely reverted the resistance to ATO induced by stroma, provides strong evidence for the involvement of Mcl-1 in this resistance. Bcl-xL was also upregulated by stroma, but its expression was only partially reduced by idelalisib and sotrastaurin and was not affected by blocking NF- κ B and/or STAT3, albeit both factors can transcriptionally regulate Bcl-xL [46]. Therefore, while the contribution of Bcl-xL to the mechanism of CLL cell resistance to ATO in the presence of stroma needs to be clarified, our results clearly show a key role for Mcl-1 in this mechanism. Mcl-1 is a key survival molecule in CLL, recently shown to undergo complex regulation in the context of bone marrow stroma [47]. Indeed, upregulation of Mcl-1 by stroma is central to the protective effect against CLL cell spontaneous apoptosis or apoptosis induced by fludarabine [48], fludarabine/bendamustine [49], or Bcl-2-directed compounds [50]. We also recently reported a role for Mcl-1 in the protection against ATO induced by MMP-9 on CLL cells [16]. Our present results establish that Mcl-1 is a main target to overcome the survival effect of stroma and render CLL cells sensitive to ATO.

In summary, we report for the first time that the mechanism by which bone marrow stromal cells induce resistance of CLL cells to ATO consists in activation of the PI3K δ -PKC β /NF- κ B-STAT3/Mcl-1 pathways and that the specific inhibitors idelalisib (PI3K δ) or sotrastaurin (PKC β) overcome the stroma-induced resistance. Given the promising results obtained so far with idelalisib and sotrastaurin and the effectiveness of low concentrations of ATO in all types of CLL [9, 10], the combination of ATO with these inhibitors may represent an efficient alternative for the clinical treatment of this malignancy.

MATERIALS AND METHODS

Patients and cells

Approval was obtained from the CSIC Bioethics Review Board for these studies. All patients signed an informed consent before blood was drawn. B-lymphocytes were purified from the 42 CLL samples listed in Table 1, using Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) centrifugation and, if necessary, negative selection with anti-CD3-conjugated Dynabeads (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway). The resulting B cell population was mostly >90% CD19+, determined on a Coulter Epics XL flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Primary stromal cells (BMSC) were obtained from a bone marrow sample of a CLL patient after 3 week culture in IMDM (Lonza, Amboise, France)/20% FBS, and maintained for up to 4 weeks in IMDM/10% FBS. The HS-5 stromal cell line, with fibroblastoid properties [17, 18], was obtained from Dr. Atanasio Pandiella (Cancer Research Center, Salamanca, Spain). The HS-27A stromal cell line, with epithelioid properties [17, 18] was purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). Both cell lines were cultured in RPMI/10% FBS.

Antibodies and reagents

Rabbit polyclonal antibodies (RpAbs) to PKC (sc-10800), STAT-3 (sc-482), Mcl-1 (sc-819), Bcl-xL (sc-634), Bax (sc-526), Noxa (sc-52), and mouse monoclonal Abs (mAbs) to Akt (sc-5298), Lyn (sc-7274), IκBα (sc-1643), and Bcl-2 (sc-509), were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). RpAb to Bim (559685) and mAb to β2 integrin (556084) were from BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ). mAbs to vinculin (V9131) was from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). mAb to CD19 was from Diaclone (Besançon, France). mAbs against CD38 (16BDH), CD3 (T3B), α4 integrin (HP2/1, function blocking), α4 integrin (HP1/7, inactive control, isotype matched for HP2/1 and anti-β2 Abs), and β1 integrin (Alex1/4) were from Dr. F. Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid, Spain). RpAbs to phospho-Akt (T308), phospho-Akt (S473), phospho-PKC (pan, βII Ser660), phospho-ERK1/2 (T202/Y204), and phospho-IκBα (S32/36) were from Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA). Rabbit mAb to phospho-Lyn (Tyr396) was from Abcam (Cambridge, UK). mAb to phospho-STAT3 (Tyr705) was from BD Biosciences (Erembodegem, Belgium). HRP-labelled Abs to rabbit or mouse immunoglobulins were from Dako (Glostrup, Denmark). FITC-Annexin V was from Immunostep (Salamanca, Spain). Arsenic trioxide (ATO) and propidium iodide (PI) were from Sigma-Aldrich. Kinase inhibitors PP2 (Src), U0126 (MEK), BisI (PKC), LY294002 (PI3K), Triciribine/API-2 (Akt), and the NFκB activation inhibitor (#481407) were from Calbiochem (Darmstadt, Germany). CAL-101/idelalisib (PI3Kδ), sotrastaurin (pan-PKC including PKCβ), and stattic (STAT3) inhibitors were from Selleck Chemicals (Houston, TX). All inhibitors were used at 5 μM concentration except when indicated.

CLL-stromal cell co-culture

Bone marrow stromal cells were seeded onto gelatin-coated wells of 96- or 6-well plates. After 4-6 h, HS-27A cells were stimulated with 15-20 ng/ml TNF α overnight at 37°C, 5% CO₂, to induce VCAM-1 expression. HS-5 cells and BMSC were not stimulated because HS-5 cells do not increase VCAM-1 expression in response to TNF α ([17, 18], and our results not shown) and BMSC constitutively express sufficient VCAM-1 (data not shown). CLL cells (2-5 x 10⁶/ml), with or without previous incubation for 1 h with antibodies or inhibitors, were added to the confluent stromal cell monolayers or cultured in suspension for comparison. After 2 h at 37 °C, 2 μ M ATO was added or not to the cultures and cells further incubated for 24-48 h. CLL cells were gently collected with culture medium for further analysis. The integrity of the stromal cell monolayer was confirmed by phase contrast microscopy.

Analysis of apoptosis.

2 x 10⁵ CLL cells, cultured in suspension or stroma and with or without ATO, were suspended in 300 μ l binding buffer (Immunostep) containing 1 μ l FITC-Annexin V and 1.5 μ g/ml PI. Cell viability was determined on a Coulter Epics XL flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Western blotting

8-10 x 10⁶ CLL cells were lysed (20 min, 4 °C) in ice-cold 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40, 1mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, containing protease/phosphatase inhibitor cocktails (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting on nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). To detect multiple proteins on the same membrane, after identification of the first protein, membranes were washed with TBS/0.1% Tween[®]20 for 10 min, followed by 3 x 30 min incubation in 1% glycine pH 2.2, 1% SDS, 0.0005% NP-40, at room temperature. Membranes were washed 1 x 10 min with TBS/Tween, blocked with 5% BSA for 1 h, and re-probed with subsequent primary and secondary Abs. Protein bands were developed using the enhanced chemiluminiscent detection method (GE Healthcare Europe GmbH, Barcelona, Spain) and quantitated using the MultiGauge V3.0 program (Fujifilm Global Lifescience, Düsseldorf, Germany). Protein load was corrected using vinculin as internal standard.

RNA interference experiments

The following siRNA sequences were from Sigma-Aldrich: Mcl-1: sense 5'-GGACUUUUUUAUACCUGUUAUdTT-3'; control siRNA: sense 5'-AUUGUAUGCGAUCGCAGACdTT-3'. CLL cells were nucleofected with siRNAs (200-400 nM/10⁶ cells) in 100 μ l Human B Cell Nucleofector[™] solution (Lonza) using the U-15 program of the Nucleofector device I (Amaxa, Cologne, Germany). Immediately after nucleofection, 12 x 10⁶ CLL cells were seeded onto wells coated with HS-27A cells or

kept in suspension. After 16 h at 37 °C, 2 µM ATO was added and cells further incubated for 24 h. CLL cell viability was determined by flow cytometry.

Statistical analyses

Statistical significance of the data was determined using the two-tailed Student's t-test. A p value of ≤ 0.05 was considered significant. Analyses were performed using the GraphPad InStat v3.06 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All values are expressed as means \pm standard deviation.

Acknowledgements

We thank all the CLL patients who donated samples for this study, Dr. Estefanía Ugarte-Berzal for expert advice on some experiments and Dr. Pedro Lastres for help with the flow cytometry analyses.

Disclosure of potential conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Financial support: This work was supported by grants SAF2012-31613 (AGP) and RTICC (Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer) RD12/0036/0061 (AGP), from the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO), Spain; S2010/BMD-2314-Neoplasbim (AGP) from the Comunidad de Madrid/European Union; and a grant from the Fundación para la Investigación Biomédica Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid (JAGM). IAJ was supported by the Junta de Ampliación de Estudios program, JAEP2010-00607, CSIC/European Union, and by MINECO

REFERENCES

1. Pleyer L, Egle A, Hartmann TN, Greil R. Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009; 6: 405-418.
2. Gaidano G, Foà R, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2012; 122: 3432-3438.
3. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*. 2015; 90: 447-460.
4. Shindiapina P, Brown JR, Danilov AV. A new hope: novel therapeutic approaches to treatment of chronic lymphocytic leukaemia with defects in TP53. *Br J Haematol*. 2014; 167: 149-161.
5. El-Gamal D, Williams K, LaFollette TD, Cannon M, Blachly JS, Zhong Y, Woyach JA, Williams E, Awan FT, Jones J, Andritsos L, Maddocks K, Wu CH et al. PKC- β as a therapeutic target in CLL: PKC inhibitor AEB071 demonstrates preclinical activity in CLL. *Blood*. 2014; 124: 1481-1491.
6. Alimoghaddam K. A review of arsenic trioxide and acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2014; 8: 44-54.
7. Zhou L, Hou J, Chan GCF, Sze DMY. Arsenic trioxide for non acute promyelocytic leukemia hematological malignancies: a new frontier. *J Blood Disord*. 2014; 1: 1018.

8. Subbarayan PR, Ardalan B. In the war against solid tumors arsenic trioxide needs partners. *J Gastrointest Cancer*. 2014; 45: 363-371.
9. Merkel O, Heyder C, Asslaber D, Hamacher F, Tinhofer I, Holler C, Stöcher M, Prokesch A, Papak C, Scheideler M, Trajanoski Z, Greil R. Arsenic trioxide induces apoptosis preferentially in B-CLL cells of patients with unfavourable prognostic factors including del17p13. *J Mol Med*. 2008; 86: 541-552.
10. Redondo-Muñoz J, Escobar-Díaz E, Hernández Del Cerro M, Pandiella A, Terol MJ, García-Marco JA, García-Pardo A. Induction of B-chronic lymphocytic leukemia cell apoptosis by arsenic trioxide involves suppression of the PI3K/Akt pathway via JNK activation and PTEN upregulation. *Clin Cancer Res*. 2010; 16: 4382-4391.
11. Dal Bo M, Bomben R, Zucchetto A, Del Poeta G, Gaidano G, Deaglio S, Efremov DG, Gattei V. Microenvironmental interactions in chronic lymphocytic leukemia: hints for pathogenesis and identification of targets for rational therapy. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 3323-3334.
12. ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment dependency in Chronic Lymphocytic Leukemia: The basis for new targeted therapies. *Pharmacol Ther* 2014; 144: 338-348.
13. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ, Giese N, O'Brien S, Yu A, Miller LL, Lannutti BJ, Burger JA. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 118: 3603-3612.
14. Walsby E, Pearce L, Burnett AK, Fegan C, Pepper C. The Hsp90 inhibitor NVP-AUY922-AG inhibits NF- κ B signaling, overcomes microenvironmental cytoprotection and is highly synergistic with fludarabine in primary CLL cells. *Oncotarget*. 2012; 3: 525-534.
15. Rosich L, Saborit-Villarroya I, López-Guerra M, Xargay-Torrent S, Montraveta A, Aymerich M, Villamor N, Campo E, Pérez-Galán P, Roué G, Colomer D. The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor NVP-BKM120 overcomes resistance signals derived from microenvironment by regulating the Akt/FoxO3a/Bim axis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*. 2013; 98: 1739-1747.
16. Amigo-Jiménez I, Bailón E, Ugarte-Berzal E, Aguilera-Montilla N, García-Marco JA, García-Pardo A. Matrix metalloproteinase-9 is involved in chronic lymphocytic leukemia cell response to fludarabine and arsenic trioxide. *PLoS One*. 2014; 9: e99993.
17. Roecklein BA, Torok-Storb B. Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. *Blood*. 1995; 85: 997-1005.
18. Torok-Storb B, Iwata M, Graf L, Gianotti J, Horton H, Byrne MC. Dissecting the marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 872: 164-170.
19. Barragán M, Campàs C, Bellosillo B, Gil J. Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2003; 44: 1865-1870.
20. Lopez-Guerra M, Colomer D. NF-kappaB as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14: 275-288.
21. Redondo-Munoz J, Ugarte-Berzal E, Terol MJ, Van den Steen PE, Hernández del Cerro M, Roderfeld M, Roeb E, Opendakker G, García-Marco JA, García-Pardo A. Matrix metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia B cell survival through its hemopexin domain. *Cancer Cell*. 2010; 17: 160-172.
22. Beg AA, Baldwin AS Jr. The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev* 1993;7:2064-2070.
23. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15: 49-63.
24. Herman SE, Johnson AJ. Molecular pathways: targeting phosphoinositide 3-kinase p110-delta in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2012; 18: 4013-4008.
25. Allen JC, Slupsky JR. Pathophysiology of protein kinase C isozymes in chronic lymphocytic leukaemia. In: *Chronic lymphocytic leukemia*, Dr. Pablo Oppezzo (ed), InTech 2012, ISBN: 978-953-307-881-6.
26. Barragán M, de Frias M, Iglesias-Serret D, Campàs C, Castaño E, Santidrián AF, Coll-Mulet L, Cosiáls AM, Domingo A, Pons G, Gil J. Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C³⁶⁷. *J Leukoc Biol*. 2006; 80: 1473-1479.

27. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 1999; 13: 2905-2927.
28. Lozano-Santos C, Amigo-Jiménez I, Nova-Gurumeta S, Pérez-Sanz N, García-Pardo A, García-Marco JA. Arsenic trioxide synergistically potentiates the cytotoxic effect of fludarabine in chronic lymphocytic leukemia cells by further inactivating the Akt and ERK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 461: 243-248.
29. 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: 2387-2396.
30. Maffei R, Fiorcari S, Bulgarelli J, Martinelli S, Castelli I, Deaglio S, Debbia G, Fontana M, Coluccio V, Bonacorsi G, Zucchini P, Narni F, Torelli G, et al. Physical contact with endothelial cells through $\beta 1$ - and $\beta 2$ - integrins rescues chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug-induced apoptosis and induces a peculiar gene expression profile in leukemic cells. *Haematologica.* 2012; 97: 952-960.
31. Redondo-Muñoz J, Ugarte-Berzal E, García-Marco JA, del Cerro MH, Van den Steen PE, Opdenakker G, Terol MJ, García-Pardo A. Alpha4beta1 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: 169-178.
32. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol.* 2014; 24: 71-81.
33. ten Hacken E, Scielzo C, Bertilaccio MT, Scarfò L, Apollonio B, Barboglio F, Stamatopoulos K, Ponzoni M, Ghia P, Caligaris-Cappio F. Targeting the LYN/HS1 signaling axis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2013; 121: 2264-2273.
34. Barragán M, Bellosillo B, Campàs C, Colomer D, Pons G, Gil J. Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 2002; 99: 2969-2976.
35. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Sica S, Leone G, Efremov DG. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 2008; 111: 846-855.
36. Han TT, Fan L, Li JY, Xu W. Role of chemokines and their receptors in chronic lymphocytic leukemia: function in microenvironment and targeted therapy. *Cancer Biol Ther.* 2014; 15: 3-9.
37. Göckeritz E, Kerwien S, Baumann M, Wigger M, Vondey V, Neumann L, Landwehr T1, Wendtner CM, Klein C, Liu N, Hallek M, Frenzel LP, Krause G. et al. Efficacy of phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors with diverse isoform selectivity profiles for inhibiting the survival of chronic lymphocytic leukemia cells. *Int J Cancer.* 2015 [Epub ahead of print].
38. Yang Q, Modi P, Newcomb T, Quéva C, Gandhi V. Idelalisib: First-in-class PI3K delta inhibitor for the treatment of chronic lymphocytic leukemia, small lymphocytic leukemia, and follicular lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2015; 21: 1537-1542.
39. Abrams ST, Lakum T, Lin K, Jones GM, Treweeke AT, Farahani M, Hughes M, Zuzel M, Slupsky JR. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells is regulated by overexpressed active protein kinase C β II. *Blood.* 2007; 109: 1193-1201.
40. Lutzny G, Kocher T, Schmidt-Suppran M, Rudelius M, Klein-Hitpass L, Finch AJ, Dürig J, Wagner M, Haferlach C, Kohlmann A, Schnittger S, Seifert M, Wanninger S, et al. Protein kinase c- β -dependent activation of NF- κ B in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vivo. *Cancer Cell.* 2013; 23: 77-92.
41. Alessi DR, Cohen P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev.* 1998; 8: 55-62.
42. Vogt PK, Hart JR. PI3K and STAT3: a new alliance. *Cancer Discov.* 2011; 1: 481-486.
43. Lunghi P, Giuliani N, Mazzera L, Lombardi G, Ricca M, Corradi A, Cantoni AM, Salvatore L, Riccioni R, Costanzo A, Testa U, Levrero M, Rizzoli V, et al. Targeting MEK/MAPK signal transduction module potentiates ATO-induced apoptosis in multiple myeloma cells through multiple signaling pathways. *Blood.* 2008; 112: 2450-2462.
44. Yuan Z, Wang F, Zhao Z, Zhao X, Qiu J, Nie C, wei Y. BIM-mediated AKT phosphorylation is a key modulator of arsenic trioxide-induced apoptosis in cisplatin-sensitive and -resistant ovarian cancer cells. *PLoS One.* 2011; 6: e20586.

45. Thomas LW, Lam C, Edwards SW. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett.* 2010; 584: 2981-2989.
46. Sevilla L, Zaldumbide A, Pognonec P, Boulukos KE. Transcriptional regulation of the bcl-x gene encoding the anti-apoptotic Bcl-xL protein by Ets, Rel/NFkappaB, STAT and AP1 transcription factor families. *Histol Histopathol.* 2001; 16: 595-601.
47. Balakrishnan K, Burger JA, Fu M, Doifode T, Wierda WG, Gandhi V. Regulation of Mcl-1 expression in context to bone marrow stromal microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasia.* 2014; 16: 1036-1046.
48. Balakrishnan K, Burger JA, Wierda WG, Gandhi V. AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance. *Blood.* 2009; 113: 149-153.
49. El-Mabhouth AA, Ayres ML, Shpall EJ, Baladandayuthapani V, Keating MJ, Wierda WG, Gandhi V. Evaluation of bendamustine in combination with fludarabine in primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 2014; 123: 3780-3789.
50. Thijssen R, Slinger E, Weller K, Geest CR, Beaumont T, van Oers MH, Arnon P, Kater, Eric Eldering. Resistance to ABT-199 induced by microenvironmental signals in chronic lymphocytic leukemia can be counteracted by CD20 antibodies or kinase inhibitors. *Haematologica.* 2015 [Epub ahead of print].

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Stromal cells protect CLL cells from the cytotoxic effect of ATO. 2×10^5 CLL cells in RPMI/0.1%FBS were cultured in suspension or with HS-5 (A), HS-27A (B) or primary BMSC (C). After 2 h at 37 °C, 2 μ M ATO was added or not and cells further incubated for the indicated times. Cell viability was determined by flow cytometry, using Annexin V-FITC and PI. (D, E) 2×10^5 CLL cells, with or without previous incubation for 1 h with the indicated antibodies, were added to confluent monolayers of HS-5 (D) or HS-27A (E) stromal cells. After 2 h at 37 °C, 2 μ M ATO was added and viability was determined as above after 48 h. *P \leq 0.05; **P \leq 0.01; ***P \leq 0.001.

Figure 2. Stromal cells activate several protein kinases and transcription factors in CLL cells exposed to ATO. $8-10 \times 10^6$ CLL cells in RPMI/0.1% FBS were cultured in suspension or over HS-27A cells for 2 h at 37 °C. 2 μ M ATO was added or not and cells further incubated for 24 h. Cells were lysed and the indicated protein kinases (A) or transcription factors (B) were analyzed by Western blotting. The results from two representative samples and the quantitation of all samples analyzed, after normalizing control values to 1, are shown. * represents CLL cells cultured in suspension vs CLL cells cultured on stroma; Δ represents ATO-treated cells compared to their respective untreated controls. * or Δ P \leq 0.05; ** or $\Delta\Delta$ P \leq 0.01; *** or $\Delta\Delta\Delta$ P \leq 0.001.

Figure 3. Modulation of Bcl-2 family proteins in CLL-stromal cell co-cultures and effect of ATO. A, $8-10 \times 10^6$ CLL cells were cultured in suspension or over HS-27A stromal cells. After 2 h at 37 °C, 2 μ M ATO was added and cells further incubated for 24 h. Cells were lysed and the indicated proteins analyzed by Western blotting. The results from one representative sample and the quantitation of all samples analyzed, after

normalizing control values to 1, are shown. B, Ratios of relevant anti-apoptotic/pro-apoptotic partners of the Bcl-2 family. Statistical symbols are as in Fig. 2. * or $\Delta P \leq 0.05$; ** or $\Delta\Delta P \leq 0.01$; *** or $\Delta\Delta\Delta P \leq 0.001$.

Figure 4. PI3K δ and PKC β activities are involved in the stroma-induced resistance of CLL cells to ATO. A, 2×10^5 CLL cells were incubated for 1 h with or without the indicated inhibitors and added to confluent monolayers of HS-27A stromal cells. After 2 h at 37 °C, 2 μ M ATO was added or not, and cells further incubated for 24 h. Cell viability was determined by flow cytometry. LY, LY294002; Tric, Triciribine; UO, UO126. The inhibitory effect of UO126 and PP2 was confirmed by Western blotting. B, 2×10^5 CLL cells were treated for 1 h with the indicated concentrations of idelalisib, sotrastaurin, or UO and cultured as above on HS-27A cells, in the absence or presence of 2 μ M ATO. After 24 h, cell viability was determined by flow cytometry. C, $8-10 \times 10^6$ CLL cells were incubated for 1 h with 25 μ M idelalisib (Idela), 10 μ M sotrastaurin (Sotras), 5 μ M UO126 (UO) or vehicle, and cultured on HS-27A with or without ATO as above. After 24 h, cells were lysed and lysates analyzed by Western blotting. The results from a representative sample and the quantitation of all samples analyzed are shown. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Figure 5. Effect of blocking the PI3K δ /PKC β signaling pathways on the stroma-induced modulation of Bcl-2 family proteins. $8-10 \times 10^6$ CLL cells were incubated for 1 h with the indicated protein kinase (A) or transcription factor (B) inhibitors and cultured as above on HS-27A stromal cells, with or without 2 μ M ATO. After 24 h, cells were lysed and lysates analyzed by Western blotting. The results from a representative sample and the quantitation of all samples analyzed, after normalizing control values to 1, are shown. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Figure 6. Mcl-1 plays a central role in the mechanism of CLL cell resistance to ATO induced by stroma. 24×10^6 CLL cells were nucleofected with the indicated siRNAs and cultured in suspension or with HS-27A cells. After 16 h at 37 °C, 2 μ M ATO was added and cells further incubated for 24 h. A, a fraction of CLL cells was analyzed by Western blotting and two representative samples are shown. Numbers indicate the average of the 4 samples studied. B, Cell viability of these samples was determined by flow cytometry. C, Schematic representation of the identified mechanism of stroma-induced resistance of CLL cells to ATO. Idelalisib and sotrastaurin may be useful strategies to overcome this resistance and render CLL cells sensitive to ATO. *, Mcl-1 siRNA cells vs control siRNA cells; Δ , ATO-treated cells vs their respective untreated controls. * or $\Delta P \leq 0.05$; ** or $\Delta\Delta P \leq 0.01$; *** or $\Delta\Delta\Delta P \leq 0.001$.

Table 1. Clinical characteristics of the CLL patients.

Patient	Sex/Age	Stage	Ig Status	CD38/ZAP70 ^a	$\alpha 4$ integrin ^a (%)	$\beta 1$ integrin ^a (%)
1	M/57	C/IV	ND	-/+	ND	ND
2	M/69	C/IV	ND	-/+	37	72.7
3	F/72	C/IV	Mutated	-/+	74.9	99.2
4	M/67	B/II	Mutated	-/+	ND	ND
5	M/65	A/I	Mutated	-/-	78.5	92
6	M/79	A/I	Unmutated	-/+	95.1	99.2
7	M/NA	B/III	ND	+/+	82.4	95
8	M/79	B/II	Unmutated	+/-	47.3	95.7
9	M/77	A/O	Unmutated	+/ND	45	ND
10	F/55	B/II	Unmutated	-/ND	89	89.4
11	M/44	B/II	Unmutated	-/+	10.5	63.8
12	M/68	A/O	Mutated	-/+	12.5	41.2
13	M/59	C/IV	Unmutated	+/+	29.9	33.2
14	M/85	C/IV	Unmutated	+/-	25.7	47.1
15	F/73	A/II	Mutated	-/-	75.9	47.8
16	ND	ND	ND	ND	39.8	16.8
17	M/ND	ND	ND	ND	37	80.3
18	M/80	B/II	Unmutated	-/+	20	37.4
19	F/ND	ND	ND	ND	97.9	17.5
20	M/58	A/II	Mutated	-/ND	50	99
21	M/48	B/I	Unmutated	+/+	30	66.1
22	F/54	B/II	Unmutated	+/-	92.5	82.5
23	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	F/82	C/IV	Unmutated	+/ND	99.2	99.5
25	M/73	B/II	Unmutated	+/+	94.1	98
26	F/70	C/IV	ND	+/ND	80.7	78.2
27	M/72	C/IV	Unmutated	+/ND	48.9	54.3
28	M/44	B/II	Unmutated	-/+	18.6	35
29	M/61	C/IV	Unmutated	+/ND	60.9	70.9
30	F/69	c/IV	Unmutated	+/ND	99	97.4
31	M/79	A/I	ND	-/+	94	99.9
32	F/38	C/III	Unmutated	+/+	95.3	91.7
33	F/67	B/II	Unmutated	+/-	97.1	99.3
34	F/55	B/II	Mutated	-/+	98.7	97
35	F/65	A/I	Unmutated	-/+	19.8	53.5

36	M/65	B/II	Mutated	-/ND	97.1	92.5
37	M/50	A/0	ND	-/+	40.5	32.5
38	F/69	B/II	ND	-/+	63.2	51.4
39	M/74	B/II	Unmutated	+/+	34.9	51.3
40	M/74	B/II	Mutated	-/ND	26.1	40.9
41	M/73	A/0	ND	-/-	58.3	68.9
42	M/80	A/I	Mutated	-/+	36.2	87.4

^aThe expression of CD38, ZAP-70 and $\alpha 4\beta 1$ integrin has clinical prognostic value [1, 2]. ND, not determined.

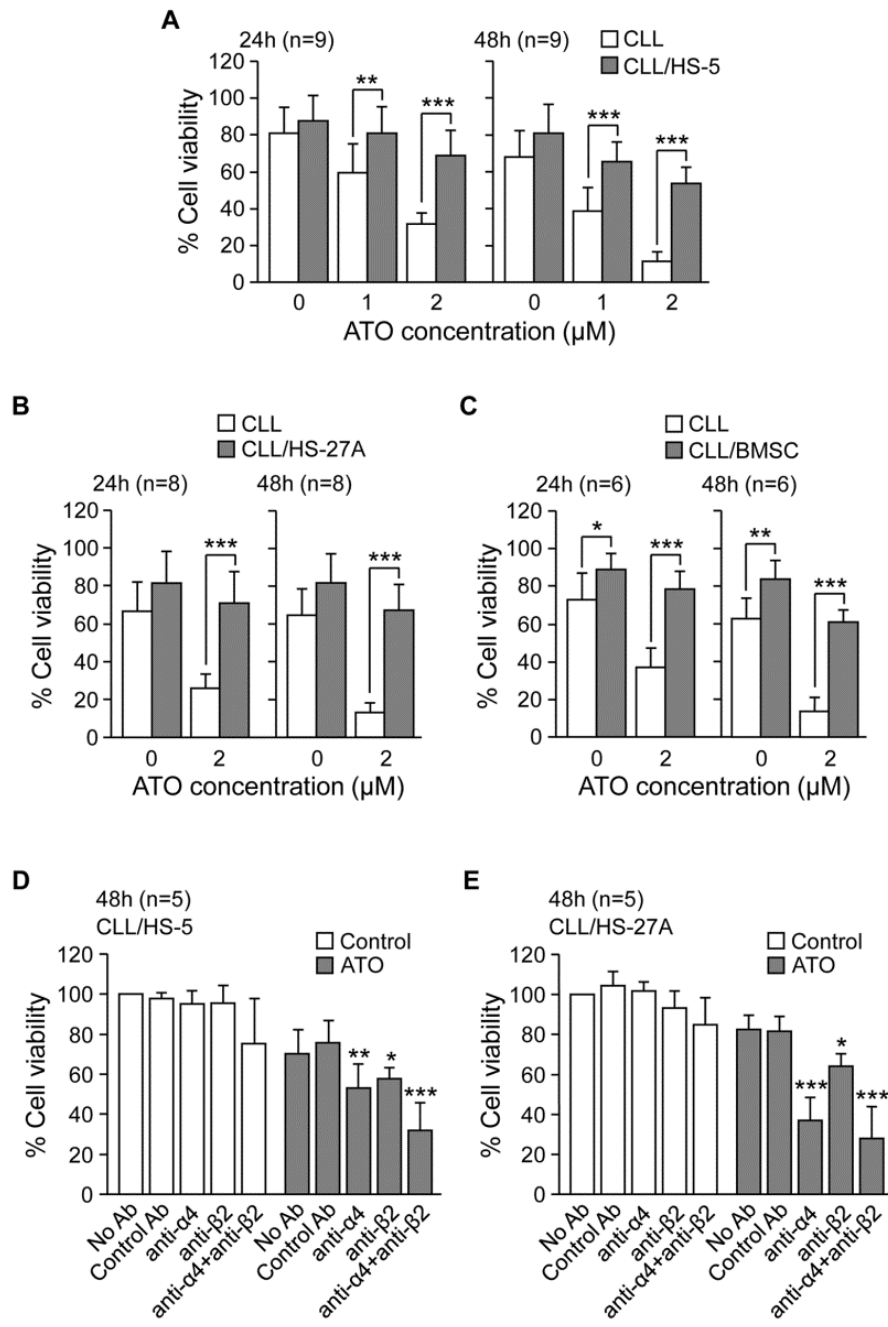


Figure 1

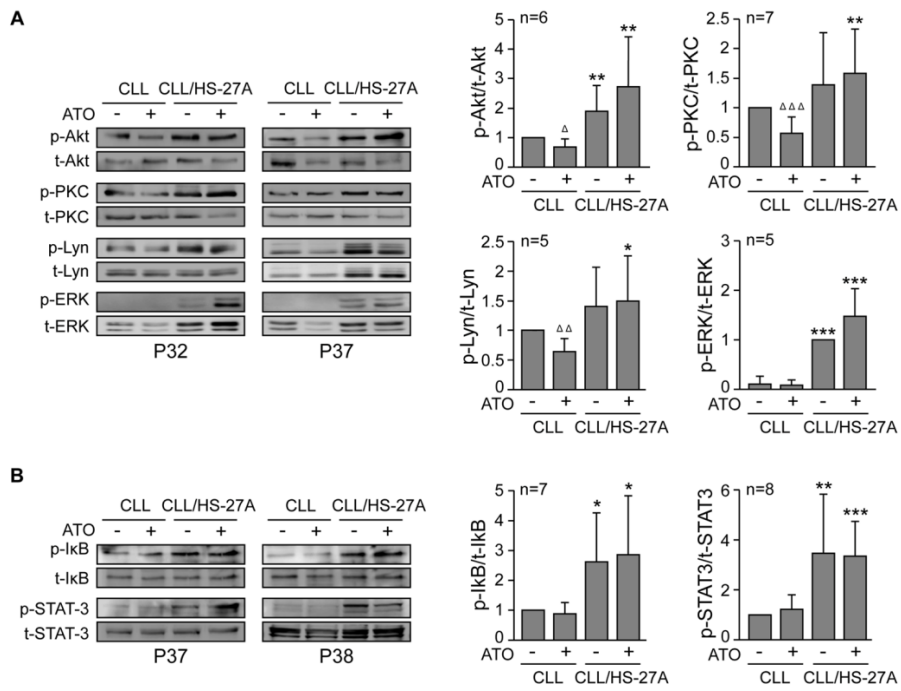


Figure 2

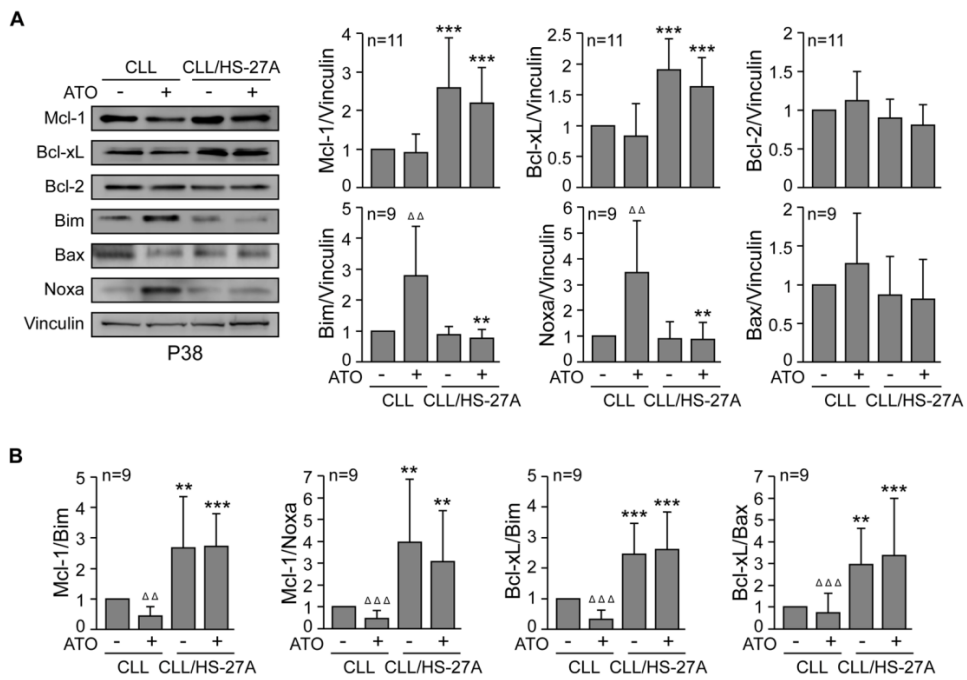


Figure 3

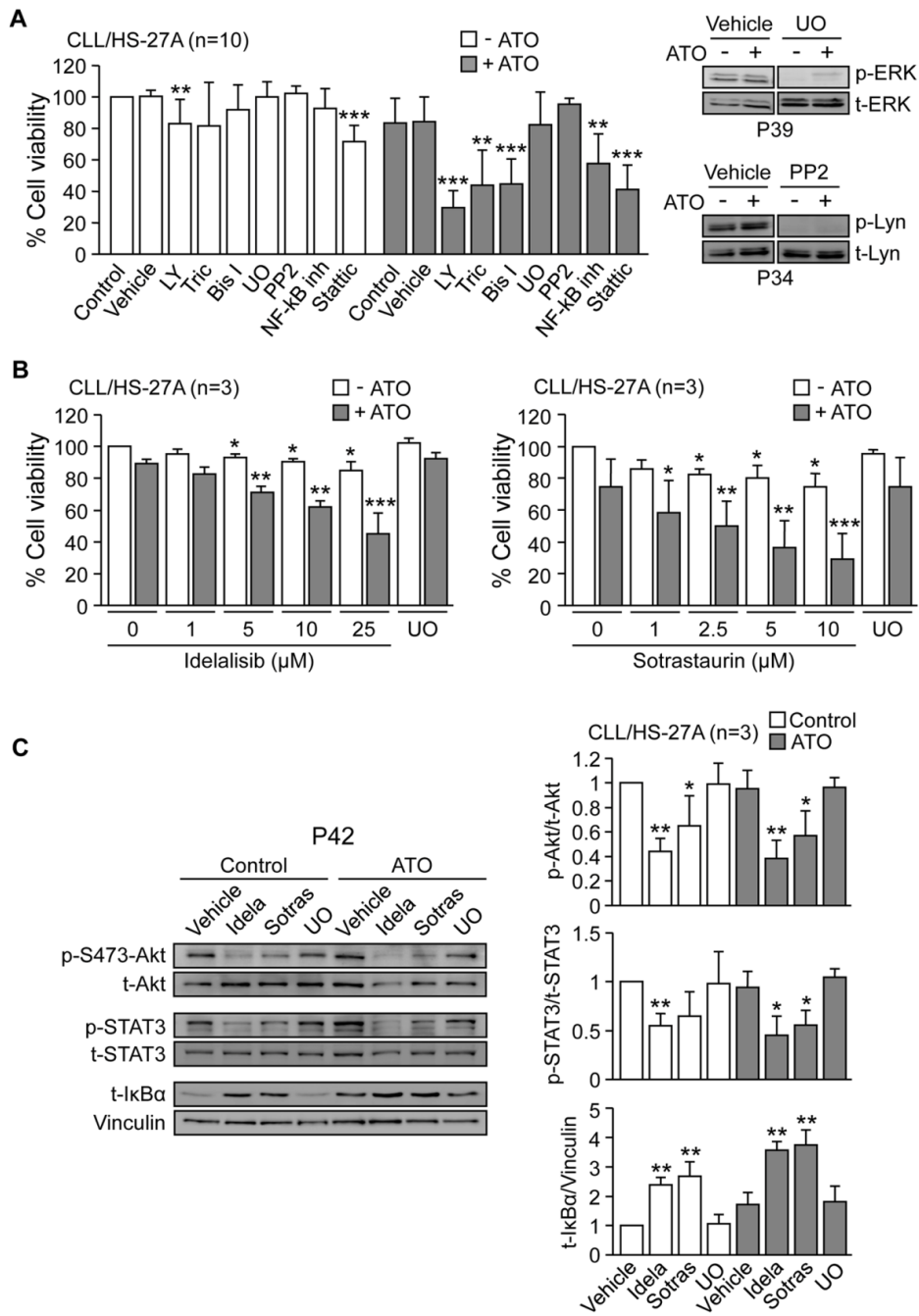


Figure 4

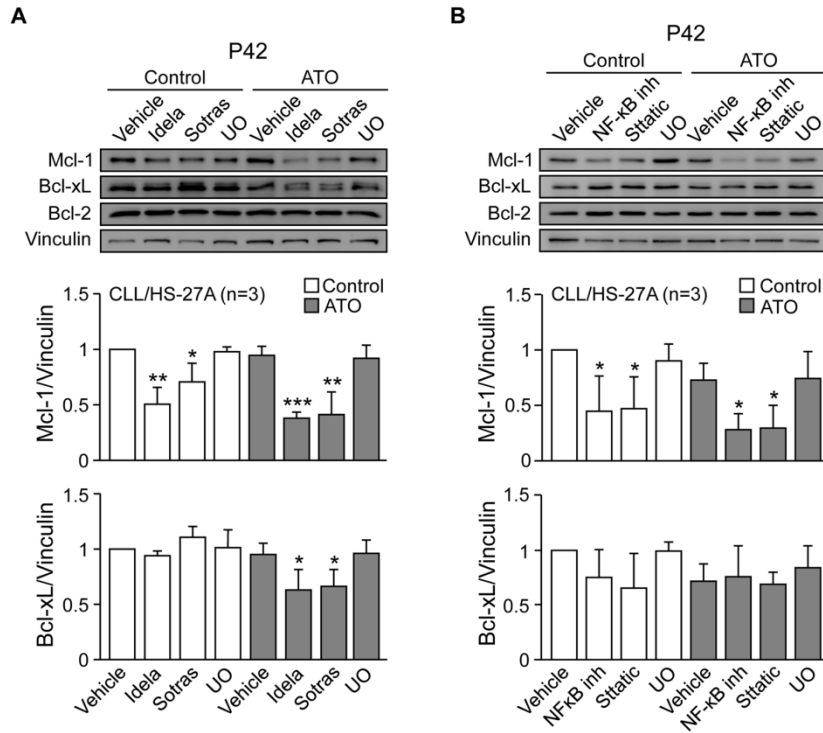


Figure 5

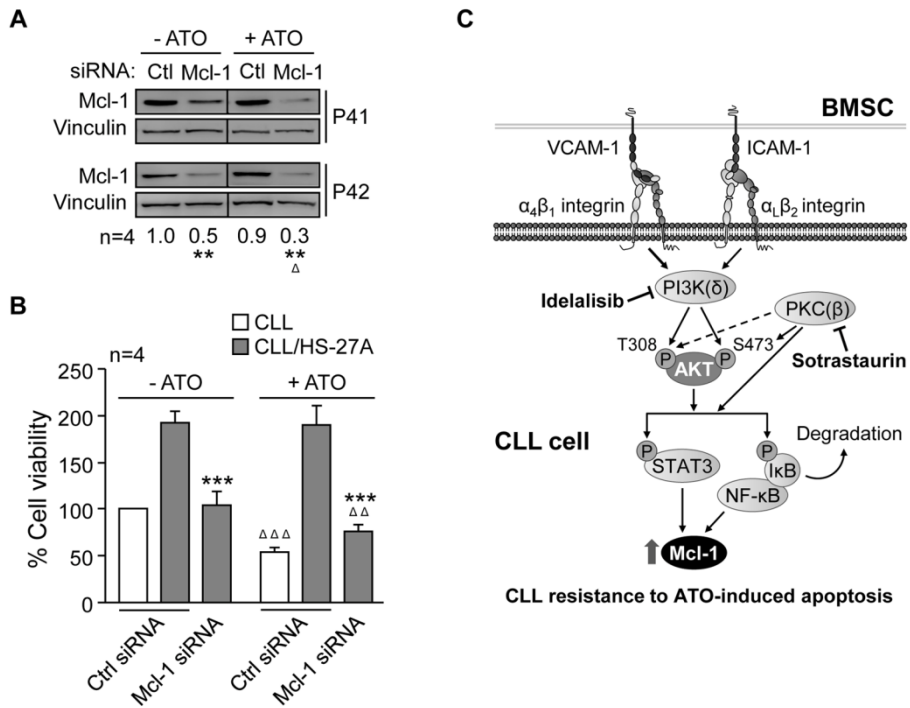


Figure 6

Supplemental Material can be found at:
<http://www.jbc.org/content/suppl/2012/06/22/M112.354670.DC1.html>

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 287, NO. 33, PP. 27601–27613, AUGUST 10, 2012
 © 2012 BY THE AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC. PUBLISHED IN THE U.S.A.

A 17-residue Sequence from the Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Hemopexin Domain Binds $\alpha 4\beta 1$ Integrin and Inhibits MMP-9-induced Functions in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells^{*S}

Received for publication, February 20, 2012, and in revised form, June 14, 2012. Published, JBC Papers in Press, June 22, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.354670

Estefanía Ugarte-Berzal^{†1}, Elvira Bailón^{‡2}, Irene Amigo-Jiménez^{‡2}, Cidonia L. Vituri^{§3}, Mercedes Hernández del Cerro[¶], María José Terol[¶], Juan P. Albar^{||}, Germán Rivas^{**}, José A. García-Marco^{††}, and Angeles García-Pardo^{‡4}

From the [†]Cellular and Molecular Medicine Department, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 28040 Madrid, Spain, [‡]Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Brasil, [§]Servicio de Hematología y Medicina Oncológica, Hospital Clínico Universitario, 46010 Valencia, Spain, ^{||}Servicio de Proteómica, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, 28049 Madrid, Spain, ^{**}Physical and Chemical Biology Department, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain, and ^{††}Servicio de Hematología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, 28222 Madrid, Spain

Background: proMMP-9 binds to B-CLL cells and contributes to malignant cell migration/arrest and survival.

Results: The VPLDTHDVFQ sequence from the proMMP-9 PEX9 domain inhibits $\alpha 4\beta 1$ integrin-mediated proMMP-9-B-CLL interaction, transendothelial migration, and proMMP-9-induced survival signaling.

Conclusion: The VPLDTHDVFQ sequence is an $\alpha 4\beta 1$ integrin binding site in proMMP-9 and blocks proMMP-9 effects on B-CLL cells.

Significance: The identified sequence may be a novel therapeutic target in B-CLL.

We previously showed that pro-matrix metalloproteinase-9 (proMMP-9) binds to B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells and contributes to B-CLL progression by regulating cell migration and survival. Induction of cell survival involves a non-proteolytic mechanism and the proMMP-9 hemopexin domain (PEX9). To help design specific inhibitors of proMMP-9-cell binding, we have now characterized B-CLL cell interaction with the isolated PEX9. B-CLL cells bound soluble and immobilized GST-PEX9, but not GST, and binding was mediated by $\alpha 4\beta 1$ integrin. The ability to recognize PEX9 was observed in all 20 primary samples studied irrespective of their clinical stage or prognostic marker phenotype. By preparing truncated forms of GST-PEX9 containing structural blades B1B2 or B3B4, we have identified B3B4 as the primary $\alpha 4\beta 1$ integrin-interacting region within PEX9. Overlapping synthetic peptides spanning B3B4 were then tested in functional assays. Peptide P3 (FPGV-PLDTHDVFQYREKAYFC), a sequence present in B4 or smaller versions of this sequence (peptides P3a/P3b), inhibited B-CLL cell adhesion to GST-PEX9 or proMMP-9, with IC₅₀ values of 138 and 279 μ M, respectively. Mutating the two aspartate residues to alanine rendered the peptides inactive. An anti-P3 anti-

body also inhibited adhesion to GST-PEX9 and proMMP-9. GST-PEX9, GST-B3B4, and P3/P3a/P3b peptides inhibited B-CLL cell transendothelial migration, whereas the mutated peptide did not. B-CLL cell incubation with GST-PEX9 induced intracellular survival signals, namely Lyn phosphorylation and Mcl-1 up-regulation, and this was also prevented by the P3 peptides. The P3 sequence may, therefore, constitute an excellent target to prevent proMMP-9 contribution to B-CLL pathogenesis.

B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)⁵ is characterized by the accumulation in the peripheral blood of CD5⁺ B lymphocytes, which progressively infiltrate the bone marrow and secondary lymphoid tissues (1, 2). As per most cell types, these migration processes include chemokine receptors, integrins, and matrix metalloproteinases (MMPs) (3–7).

The major MMP found in B-CLL cells is proMMP-9 (92 kDa) (8), and we and others have shown that (pro)MMP-9 (the pro-form and/or the active enzyme) plays an important role in B-CLL transendothelial migration and basement membrane invasion (9–11). Additionally, the constitutive levels of (pro)MMP-9 in B-CLL cells are significantly higher than in normal B-cells, and elevated intracellular levels of (pro)MMP-9 correlate with advanced stage and poor patient survival (9). Another difference with normal B cells is the consistent presence of (pro)MMP-9 at the B-CLL cell surface (9, 12). We previously demonstrated that $\alpha 4\beta 1$ integrin and a 190-kDa CD44

* This work was supported by Grants SAF2009–07035 and RTICC RD06/0020/0011 (to A. G.-P.) and RTICC RD06/0020/0080 (to M. J. T.) from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, and by a grant from the Fundación Puerta de Hierro (to J. A. G. M.).

^S This article contains supplemental Figs. S1 and S2.

[†] Supported by a fellowship from Ministerio de Ciencia e Innovación.

[‡] Supported by the JAE program, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Spain.

[§] Supported by the Carolina Foundation, Spain.

[¶] To whom correspondence should be addressed: Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. Tel.: 34-91-837-3112 (ext. 4430); Fax: 34-91-536-0432; E-mail: agarciapardo@cib.csic.es.

⁵ The abbreviations used are: B-CLL, B-cell chronic lymphocytic leukemia; MMP, matrix metalloproteinase; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; CF, 5(6)-carboxyfluorescein; BCECF-AM, 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6')-carboxyfluorescein-acetoxymethyl ester; Ab, antibody.

Overexpression of progelatinase B/proMMP-9 affects migration regulatory pathways and impairs chronic lymphocytic leukemia cell homing to bone marrow and spleen

Elvira Bailón,* Estefanía Ugarte-Berzal,* Irene Amigo-Jiménez,* Philippe Van den Steen,[†] Ghislain Opdenakker,[‡] José A. García-Marco,[‡] and Angeles García-Pardo*¹

*Cellular and Molecular Medicine Department, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain; [†]Rega Institute for Medical Research, University of Leuven, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium; and [‡]Hematology Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain

RECEIVED SEPTEMBER 27, 2013; REVISED JANUARY 17, 2014; ACCEPTED FEBRUARY 1, 2014. DOI: 10.1189/jlb.3H0913-521R

ABSTRACT

This study addresses the role of (pro)MMP-9 overexpression in CLL cell migration. We have used primary CLL cells and CLL-derived MEC-1 cells transfected with empty (mock cells) or proMMP-9-encoding (MMP-9 cells) lentiviral vectors. The constitutive (pro)MMP-9 expression in mock cells and primary CLL cells was similar, whereas in MMP-9 cells, expression resembled that of CLL cells incubated with proMMP-9. In xenograft models, in NOD/SCID mice, MMP-9-MEC-1 transfectants showed significantly reduced homing to bone marrow and spleen compared with mock cells. Likewise, incubation of primary CLL cells with proMMP-9, before injection into mice, inhibited their homing to these organs. This inhibition was specific, dose-dependent, and observed in all CLL tested, independently of prognostic markers or disease stage. Additionally, the MMP-9 catalytic activity was only partially involved, as the inactive mutant proMMP-9MutE had a partial effect. MMP-9 cells also showed impaired migration *in vitro*, which was reverted by reducing (pro)MMP-9 expression with siRNAs. CLL migration thus requires optimal

(pro)MMP-9 expression levels, below or above which migration is hampered. Biochemical analysis of the (pro)MMP-9 effect indicated that MMP-9 cells or primary CLL cells incubated with proMMP-9 had reduced activation of migration regulatory molecules, including RhoAGTPase, Akt, ERK, and FAK. In contrast, p190RhoGAP (RhoA inhibitor) and PTEN (Akt/ERK/FAK inhibitor) were up-regulated in MMP-9 cells. Reduction of (pro)MMP-9 expression by siRNAs restored RhoA activity and diminished PTEN levels. Our results reveal a novel function for (pro)MMP-9 in modulating signaling pathways leading to CLL cell arrest. Therefore, local high (pro)MMP-9 expression may contribute to malignant cell retention in lymphoid organs and disease progression. *J. Leukoc. Biol.* **96**: 185–199; 2014.

Introduction

CLL consists in the accumulation in peripheral blood of CD5⁺ B lymphocytes and their progressive infiltration of lymphoid organs, where they receive survival signals that favor drug resistance [1, 2]. The gelatinase B/(pro)MMP-9 is involved in the migration and survival of CLL cells, contributing to disease progression [3–6]. CLL cells synthesize (pro)MMP-9, which is mainly secreted as a soluble protein [3, 4, 7]. (pro)MMP-9 is also consistently detected at the surface of CLL cells, where it binds to $\alpha 4\beta 1$ integrin (CD49d/CD29) and CD44v [8]. The source of this surface-bound (pro)MMP-9 may be endogenous and/or exogenous, as cells in the CLL microenvironment of lymphoid organs (T lymphocytes, monocyte/macrophages, neutrophils, DCs, mesenchymal cells) produce (pro)MMP-9 [9]. Moreover, this production is up-regulated by chemokines and other factors [4, 5, 9], resulting in abundant (pro)MMP-9 at these organs. Accordingly, we showed re-

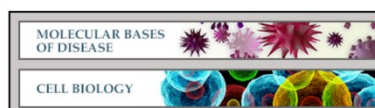
Abbreviations: Akt=protein kinase B signaling inhibitor 2, C3T=C3 transferase, Cib=Centro de Investigaciones Biológicas, CLL=chronic lymphocytic leukemia, CSIC=Consejo Superior de Investigaciones Científicas, EBNA-2=EBV nuclear antigen-2, eGFP=enhanced GFP, EU=European Union, FAK=focal adhesion kinase, GAP=GTPase-activating protein, HEK=human embryonic kidney, LAS-AF=Leica Application Suite-Advanced Fluorescence, MINECO=Ministry of Economy and Competitiveness, MLC=myosin light chain, MMP-9=activated form of matrix metalloproteinase-9, MutE=mutant E, MYPT1=myosin phosphatase target subunit 1, proMMP-9=proform (zymogen) of matrix metalloproteinase-9, (pro)MMP-9=proform and activated forms of matrix metalloproteinase-9, PTEN=phosphatase and tensin homolog, RhoA=Ras homolog gene family, member A, RpAb=rabbit polyclonal antibodies, siRNA=small interfering RNA, TIMP-1=tissue inhibitor of metalloproteinases 1

The online version of this paper, found at www.jleukbio.org, includes supplemental information.

1. Correspondence: Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. E-mail: agarciapardo@cib.csic.es



Molecular Bases of Disease:
A Novel CD44-binding Peptide from the
Pro-Matrix Metalloproteinase-9
Hemopexin Domain Impairs Adhesion and
Migration of Chronic Lymphocytic
Leukemia (CLL) Cells



Estefanía Ugarte-Berzal, Elvira Bailón, Irene Amigo-Jiménez, Juan Pablo Albar, José A. García-Marco and Angeles García-Pardo
J. Biol. Chem. 2014, 289:15340-15349.
 doi: 10.1074/jbc.M114.559187 originally published online April 16, 2014

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M114.559187](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.559187)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](#).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 32 references, 17 of which can be accessed free at <http://www.jbc.org/content/289/22/15340.full.html#ref-list-1>

