



EXPRESSIÓ DE ZAP-70 EN LIMFÒCITS B NORMALS I SÍNDROMES LIMFOPROLIFERATIVES B

Tesi presentada per

Marta Crespo Maull

Per optar al grau de

Doctora en Biologia

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Francesc Bosch i Albareda

Tesi adscrita al Departament de Medicina de la Facultat de Medicina, Universitat de
Barcelona. Programa de Biopatologia en Medicina, bienni 2001-2003

Tutor: Prof. Emili Montserrat i Costa

Barcelona, 2006

Als meus pares i al meu germà

Al Dr. Francesc Bosch

AGRAÏMENTS

Les paraules que venen a continuació són només un petit resum del que voldria expressar per intentar agrair a tots aquells que m'heu recolzat durant tant de temps, el haver confiat en mi i haver col·laborat, d'infinites maneres diferents, en tot el que ha implicat aquesta tesi doctoral. He tingut la sort de conèixer o simplement coincidir amb tot un seguit de persones sense les quals això no hagués estat possible. Gràcies a tots per ajudar-me a perseguir els meus somnis.

En primer lloc, vull agrair a la meva família el haver-me recolzat de manera absolutament incondicional des de sempre. A mi padre, a mi madre y a mi hermano, muchas gracias por ayudarme tanto, por esforzaros para que yo pueda alcanzar mis sueños y por hacerme sentir que estáis orgullosos de vuestra niña. Muchas gracias, os quiero mucho. Gracias también a todos los que nos rodean y apoyan siempre.

Al meu director de tesi, el Dr. Francesc Bosch, tinc mil coses per agrair-li, intentaré ser breu: Cesc, t'agraeixo l'enorme confiança dipositada en mi des del primer dia. He trobat en tu un director, un professor i un gran amic. Tan sols desitjo que estiguis orgullós de mi, de la meva feina i que això sigui només el principi. Espero que tota l'energia que has invertit en la meva formació t'hagi valgut la pena. Sé que no tot ha estat fàcil, però quan les coses han anat malament, m'has ajudat a veure-ho millor, des d'altra perspectiva. Gràcies pel teu optimisme, per transmetre'm la teva passió per la ciència. Per ajudar-me a mirar sempre endavant, les barreres estan per travessar-les, oi?. Per tot el que hem compartit, gràcies.

Als Professors Josep Garcia-Valero i Joan Montes del Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia els hi dec la meva manera de viure la biologia. Gracias por escogerme para conocer la ciencia desde dentro a vuestro lado. Gracias a vosotros me convencí de lo que quería hacer en un futuro y me siento muy afortunada por haber tenido la ocasión de recibir vuestros sabios consejos.

Al Professor Emili Montserrat li agraeixo que cregui en mi i en el meu futur. Gràcies per contribuir a la meva formació durant aquests anys amb la seva àmplia experiència i professionalitat. Gràcies per donar-me l'oportunitat de viure l'Hematologia intensament.

A totes les persones que formen part de la Unitat d'Hematopatologia. Amb vosaltres vaig compartir els primers anys de feina al Clínic i no us oblidaré mai. Gràcies a tots per seguir ajudant-me cada cop que ho he necessitat, encara que ja no "visqui" amb vosaltres.

Al Professor Elias Campo, per col·laborar amb nosaltres en nombroses ocasions, per implicar-se en els nostres projectes de manera entusiasta.

A la Dra. Neus Villamor. Neus, és fàcil: ets la millor. Moltes gràcies per acollir-me totes les vegades que t'he necessitat, que no han estat poques. Gràcies per ensenyar-me tot el que sé de citometria, per cuidar-me i per preocupar-te sempre per mi.

Moltes gràcies a la Dra. Dolors Colomer, per haver-me ensenyat moltíssim de biologia molecular durant els primers anys de la meva tesi i per seguir ajudant-me i col·laborant cada vegada que ho he necessitat.

A la Dra. Marta Aymerich, el Dr. Josep Lluís Aguilar i la Dra. Maria Rozman: sempre heu tingut un somriure, una paraula amable i una resposta per mi. Us ho agraeixo de tot cor. Us trobo molt a faltar a l'hora de dinar, gràcies per compartir aquelles estones de pau tant divertides.

Gràcies a la Dra. Mireia Camós, per la teva disposició, ajuda i col·laboració. Per la teva sinceritat i per haver estat sempre encantadora.

Moltes gràcies a les "mamis", la Montse Ràfols i la Rosa Arriols, per ajudar-me en els meus primers passos amb la citometria. Gràcies a la Montse Fàbregas, per ajudar-me amb tot el que li he demanat al llarg d'aquest

temps. Gràcies pel teu suport. I a totes tres, seguiu sempre així de divertides i vitals, m'ho he passat molt bé amb vosaltres.

També vull agrair a la resta de tècnics i infermeres de l'escola d'Hematopatologia el haver compartit amb bon humor el poc espai que teníem. Gràcies a tots per col·laborar amb els becaris, la vostra feina és fonamental per a nosaltres. Gracias Elena, Isabel y Sandra, por conseguir que todavía me sienta como en casa cuando os necesito. Y a la pequeña Silvia Pairet, con la que he coincidido poquito, pero que siempre me recibe con una gran sonrisa. Gracias también a Nerea, por la alegría que desprendes y por tratarme siempre con gran amabilidad.

Muchas gracias a la Dra. Patricia Pérez-Galán y al Dr. Gaël Roué por vuestra colaboración generosa. Gracias a la Dra. Carol Moreno, con la que he colaborado en diferentes proyectos durante este tiempo, por su paciencia y deferencia.

Aunque ya no estamos todas juntas, gracias a todas las *brujas* por todo lo que me habéis enseñado y por ser mis amigas. Os quiero muchísimo a todas!. A la Dra. Beatriz Bellosillo, que consiguió en el poco tiempo que compartimos en el laboratorio, convertirse en todo un referente científico y transmitirme su entusiasmo. Gracias por todo Bea, eres un sol. A la Silvia Marcé (gairebé doctora!), gràcies per tot el que hem compartit, dins i fora del laboratori, per ensenyar-me moltíssim des del primer dia i per brindar-me la teva amistat. A la Dra. Ana Ferrer: gracias Anita por dejarme sentir tu cariño, por todo lo que me has aportado y por estar siempre cerca. A Mari Vela, mi alma gemela en el Hospital del Mar, por compartir momentos geniales e inolvidables. Gracias asimismo a Ester Moragón, que también se fue al Hospital del Mar, gracias por tu alegría y simpatía.

No, no me olvido de Raquel Longarón, mi Raquel. Mi amiga incondicional, una gran compañera y mejor persona. Nunca hemos trabajado en el mismo grupo, pero siempre hemos estado juntas. Aquellos que la

conozcáis sabréis que no hay palabras para agradecerle su amistad.....si algún día nos separamos te echaré mucho de menos!.

Vull fer un agraïment molt especial al Dr. Antonio Martínez, d'Anatomia Patològica. Muchísimas gracias Toni por recibirme siempre con una sonrisa y resolver mis dudas. Conversar contigo es todo un placer.

Al Dr. Armando López-Guillermo, gracias por transmitirme tu alegría, amistad y sabiduría. Gracias por ayudarme cuando las cosas se me han puesto difíciles. Muchas gracias al Dr. Jordi Esteve, por tener siempre una palabra cariñosa y mostrarme su confianza. Gracias al Dr. Francisco Cervantes por compartir conmigo siempre su cara más amable y por su ayuda en los últimos pasos de la tesis.

Al resto del Servicio de Hematología, con los que he tenido un contacto menos directo pero con los que, siempre que lo he necesitado, he podido contar. Muchísimas gracias a todos.

A totes les secretaries, imprescindibles per a tots nosaltres. Gràcies Silvia Fuentes per tractar-me com si encara treballés amb vosaltres, per ajudar-me infinitat de vegades. Moltes gràcies a la Carme Torres, per la seva eficiència i simpatia.

I also would like to express gratitude to Professor Freda Stevenson, from the Department of Molecular Immunology in the Tenovus Research Laboratory, Southampton, and to all the people in the laboratory, for helping me with the mutational analysis of the immunoglobulines during two really motivating weeks. I am also grateful to Dr. Teresa Marafioti and Dr. Margaret Jones from the Department of Clinical Laboratory Sciences, John Radcliffe Hospital, Oxford; your cooperation has been crucial to our studies, thank you very much.

La segona meitat d'aquesta tesi l'he realitzat al nou laboratori d'Hematologia Mèdica i Experimental de l'IDIBAPS: el laboratori 301, la meua segona llar. Al principi era un espai compartit entre tres grups, el grup d'Oncologia del Dr. Pere Gascón i del Dr. Joan Albanell, amb el que vam mantenir moltes converses sobre organització del laboratori i que sempre es va mostrar disposat a ajudar, gràcies per tot. Allà vam conèixer al principi un grup molt heterogeni de persones que no ens coneixíem prèviament però que, entre tots, vam aconseguir crear les estones més divertides i enriquidores que recordo. Al grupet inicial: Núria Besalduch, Jordi Codony, Pep Domingo, Raquel Longarón i Eva Giné; gràcies a tots per compartir consells, penes i alegries. Jordi, t'agreixo molt la teua amistat i entrega, gràcies pels nombrosos consells tècnics que ens vas donar i per preocupar-te sempre per mi. Nur, tot i que va ser durant poc temps, vam tenir la sort de gaudir de la teua companyia. Gràcies per convertir-te en una amiga per sempre, guapa. Gràcies també a la Eva Fernández. Evita, nunca olvidaremos tu risa contagiosa en este laboratorio, ni tus pasteles y celebraciones. Eres la alegría en persona!.

Al actual grup d'Hematologia de l'IDIBAPS: a mis dos ángeles, la Dra. Ana Muntañola y la Dra. Eva Giné. Recordeu, estem juntes en això, no oblidem les nostres fites. Gaudiu del moment, sempre endavant i totes ho aconseguirem. Gracias por ser mis amigas y confidentes, os quiero!!. A les noves incorporacions, la Eva Calpe i la Maria João Baptista. Gràcies per la vostra paciència i comprensió en aquests moments de tanta feina, gràcies per alegrar el laboratori amb els vostres somriures.

Al grup d'Oncologia, recentment traslladat al nou laboratori 213: ara ja no estem junts, però ningú ho diria, casi ens veiem més ara que abans. A la Dra. Vanessa Almendro, gràcies per estar sempre que et necessitem, per compartir tants moments bons i per convertir-te en una gran amiga. Al Dr. Pep Domingo: per totes les converses que hem mantingut, per entendre'ns perfectament quan ningú més ens comprèn, per ser un bon amic i per tenir-me en tant bona consideració. Al Dr. Gianluca Laus, nuestro insigne oncólogo

italiano, por esa alegría y amabilidad que te caracteriza. Esperamos tu regreso. Y muchas gracias a la nueva incorporación, Susana García, por compartir nuestras pausas siempre riendo.

Agraeixo al Professor Pablo Engel la revisió crítica dels nostres treballs amb subpoblacions limfocitàries. Gràcies per implicar-se tant en els nostres projectes, per compartir amb nosaltres el seu valuós coneixement i per brindar-nos la seva ajuda en nombroses ocasions.

Gràcies als nostres veïns de l'IDIBAPS, els laboratoris de Patologia Molecular i de Biologia Cel·lular per crear un ambient de treball tant agradable. En especial moltes gràcies a l'Anna Lladó i al Francesc Tebar de Biologia Cel·lular per donar-me sempre ànims i consells molt útils. Agraeixo també al Professor Oriol Bachs el seu interès en els nostres projectes, l'organització de seminaris científics amb els quals tots ens enriqueim i la seva ajuda sempre que l'he necessitat.

I la nostra lab manager, la omnipresent i omnipotent Anna Beato. Moltes gràcies per la teva professionalitat en dur a terme aquesta tasca tant important i sovint poc valorada.

Ya fuera del ámbito científico, muchas gracias Gabi por comprender y apoyar mis sueños, mis inquietudes y mis planes de futuro. Gracias por darte cuenta de lo que esto significa para mí y apoyarme. Sé que no es fácil y por ello me siento muy afortunada. Te quiero.

I per acabar, vull donar les gràcies al Zouk i a tot allò que l'envolta: amistat, viatges, reptes, diversió, energia, passió, desconexió, entusiasme, felicitat.....axé galera!

A tots vosaltres, moltíssimes gràcies

Marta

ÍNDEX

I.	INTRODUCCIÓ	1
	1. MADURACIÓ I DESENVOLUPAMENT DELS LIMFÒCITS B	1
	1.1 L'Hematopoiesi	1
	1.2 Aspectes generals dels limfòcits B i el seu desenvolupament	2
	1.3 Dels progenitors hematopoietics multipotencials als progenitors limfoides comuns	5
	1.4 El desenvolupament dels limfòcits pro-B	7
	1.5 El desenvolupament dels limfòcits pre-B	9
	1.6 Senyalització a través del pre-BCR	10
	1.7 El desenvolupament dels limfòcits B immadurs	14
	1.8 El desenvolupament dels limfòcits B madurs perifèrics	18
	1.8.1 Els limfòcits B en transició	18
	1.8.2 Els limfòcits B de la zona marginal	20
	1.8.3 Els limfòcits B fol·liculars	23
	1.8.4 Els centres germinals i la generació d'anticossos d'alta afinitat	24
	1.8.5 Les cèl·lules plasmàtiques i els limfòcits B memòria	31
	1.8.6 Els limfòcits B CD5 positius	39
	2. NEOPLÀSIES DERIVADES DE LIMFÒCITS B	43
	2.1 Classificació (Organització Mundial de la Salut)	43
	2.2 Leucèmia Limfàtica Crònica	45

2.2.1 Origen cel·lular	45
2.2.2 Anomalies cromosòmiques	49
2.2.3 Factors pronòstic	51
2.2.3.1 Sistemes d'estadiatge clínic	52
2.2.3.2 Estat mutacional de les immunoglobulines	53
2.2.3.3 Expressió del CD38	55
2.3 Leucèmia/limfoma Aguda Limfoblàstica B	57
2.3.1 Patogènesi	57
2.3.2 Origen cel·lular i classificació immunofenotípica	58
2.3.3 Factors pronòstic	59
2.3.4 Alteracions genètiques	61
2.3.4.1 Alteracions primàries	61
2.3.4.2 Mutacions cooperatives	65
2.4 Limfoma de Burkitt	69
2.4.1 Origen cel·lular	69
2.4.2 Variants clínic-biològiques	70
2.4.3 Anomalies cromosòmiques	71
2.4.4 Patogènesi	73
3. LA PROTEÏNA ZAP-70	81
3.1 Estructura del gen i de la proteïna	81

3.2 La proteïna ZAP-70 en la senyalització a través de TCR	84
3.3 Malalties associades a ZAP-70	86
3.4 Expressió i funció de ZAP-70 en el desenvolupament dels limfòcits de ratolí	87
II. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS	91
III. RESULTATS	99
CAPÍTOL 1	99
1. Expressió de ZAP-70 com a marcador de l'estat mutacional de la regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines en la leucèmia limfàtica crònica.	
<i>ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukaemia. NEJM, 2003 May1;348(18):1764-75)</i>	
CAPÍTOL 2	113
2. Expressió de ZAP-70 en cèl·lules pro/pre-B normals, cèl·lules B madures i en leucèmia aguda limfoblàstica-B.	
<i>ZAP-70 expression in normal pro/pre-B cells, mature B cells, and in B-cell acute lymphoblastic leukaemia. CCR, 2006;12(3):726-34)</i>	
IV. DISCUSSIÓ	127
V. CONCLUSIONS	136
VI. BIBLIOGRAFIA	141

I. INTRODUCCIÓ

1. MADURACIÓ I DESENVOLUPAMENT DELS LIMFÒCITS B

1.1 L'hematopoiesi

El sistema hematopoètic genera constantment un gran nombre de tipus cel·lulars especialitzats a partir de cèl·lules hematopoètiques progenitores multipotencials, les quals tenen capacitat autorenovadora i donen lloc a diferents progenitors amb capacitat diferenciadora cada cop més restringida. Cada pas del desenvolupament és un canvi binari, de manera que les cèl·lules poden agafar direccions alternatives¹.

Tots els tipus cel·lulars sanguinis s'originen a partir d'una mateixa cèl·lula mare hematopoètica. Les cèl·lules sanguínies tenen una vida limitada, de manera que la producció de noves cèl·lules és un procés continu durant la vida de l'individu. La cèl·lula mare llavors ha de garantir la seva pròpia existència mitjançant la proliferació abans de començar el procés de diferenciació. En la vida fetal, el principal òrgan d'hematopoiesi és el fetge, mentre que en adults aquesta es trasllada principalment al moll de l'ós. Els limfòcits finalitzen la seva maduració fora dels principals òrgans hematopoètics, continuant la seva diferenciació al timus, a la melsa, i als òrgans limfoides secundaris, on els senyals que provenen del microambient tissular juguen un paper molt important.

Els gens homeobox, també anomenats gens HOX, són una família de factors de transcripció altament conservats en l'evolució. Inicialment es va descriure el

seu paper en relació a la determinació dels patrons posicionals de diferenciació durant el desenvolupament embrionari. A més a més, aquests factors de transcripció també regulen diferents aspectes de l'hematopoesi inicial. La família gènica HOX controla principalment els processos de proliferació i diferenciació de les cèl·lules mare hematopoiètiques, tot i que també estan relacionats amb el manteniment de l'estat de diferenciació cel·lular posterior².

1.2 Aspectes generals dels limfòcits B i el seu desenvolupament

Els limfòcits són les cèl·lules sanguínies responsables de la resposta de l'organisme davant d'antígens forans. La resposta immune cel·lular és duta a terme pels limfòcits T, mentre que els limfòcits B són els responsables de la resposta immune humoral. El desenvolupament dels limfòcits B passa per una sèrie d'etapes que es poden definir en funció de diferents variables: l'estat de reordenament dels gens de les immunoglobulines, l'expressió de proteïnes a la superfície cel·lular i la localització de les cèl·lules dins el moll de l'os, la melsa, el nòduls limfàtics o la sang perifèrica¹ (Figura 1) (Taulas 1 i 2).

Durant el seu desenvolupament, els limfòcits B han de superar diversos punts de control. Les diferents formes del receptor de limfòcits B (BCR, de l'anglès, *B-cell receptor*) i les seves molècules senyalitzadores, les quals s'expressen als diferents estadis de diferenciació, actuen com a guardians d'aquests punts de control permetent (selecció positiva) o evitant (selecció

negativa) la progressió cap a estadis més madurs en funció de la capacitat del limfòcit de reconèixer antígens forans o propis mitjançant el BCR³. Encara que els senyals a través del BCR són el principal mecanisme per a determinar el destí dels limfòcits B en desenvolupament, altres factors ambientals i de l'estroma són també crucials en alguns punts. El principal objectiu d'aquest procés és la generació d'una població diversa de limfòcits B perifèrics que siguin autotolerants i reactius davant antígens externs.

La determinació del llinatge B s'inicia amb l'expressió d'un nombre limitat de factors de transcripció per part dels progenitors limfoides comuns. Aquestes proteïnes també inicien els processos que permeten la recombinació seqüencial dels segments gènics que culmina amb la generació de immunoglobulines funcionals. Aquest procés funciona en paral·lel a l'expressió de proteïnes senyalitzadores accessòries necessàries per a l'expressió del receptor dels limfòcits pre-B (pre-BCR) i la del receptor de limfòcits B (BCR) a la membrana cel·lular dels limfòcits pre-B o els limfòcits B immadurs respectivament. La senyalització a través de BCRs funcionals promou la selecció i migració dels limfòcits B immadurs des de el moll de l'ós fins als òrgans limfoides secundaris, on continuen amb la seva maduració. Un cop estimulats per antígens i sovint amb la col·laboració dels limfòcits T, es poden diferenciar en les cèl·lules efectores, els limfòcits B memòria i les cèl·lules plasmàtiques secretores d'anticossos, les quals representen l'estadi de diferenciació limfocitària B final.

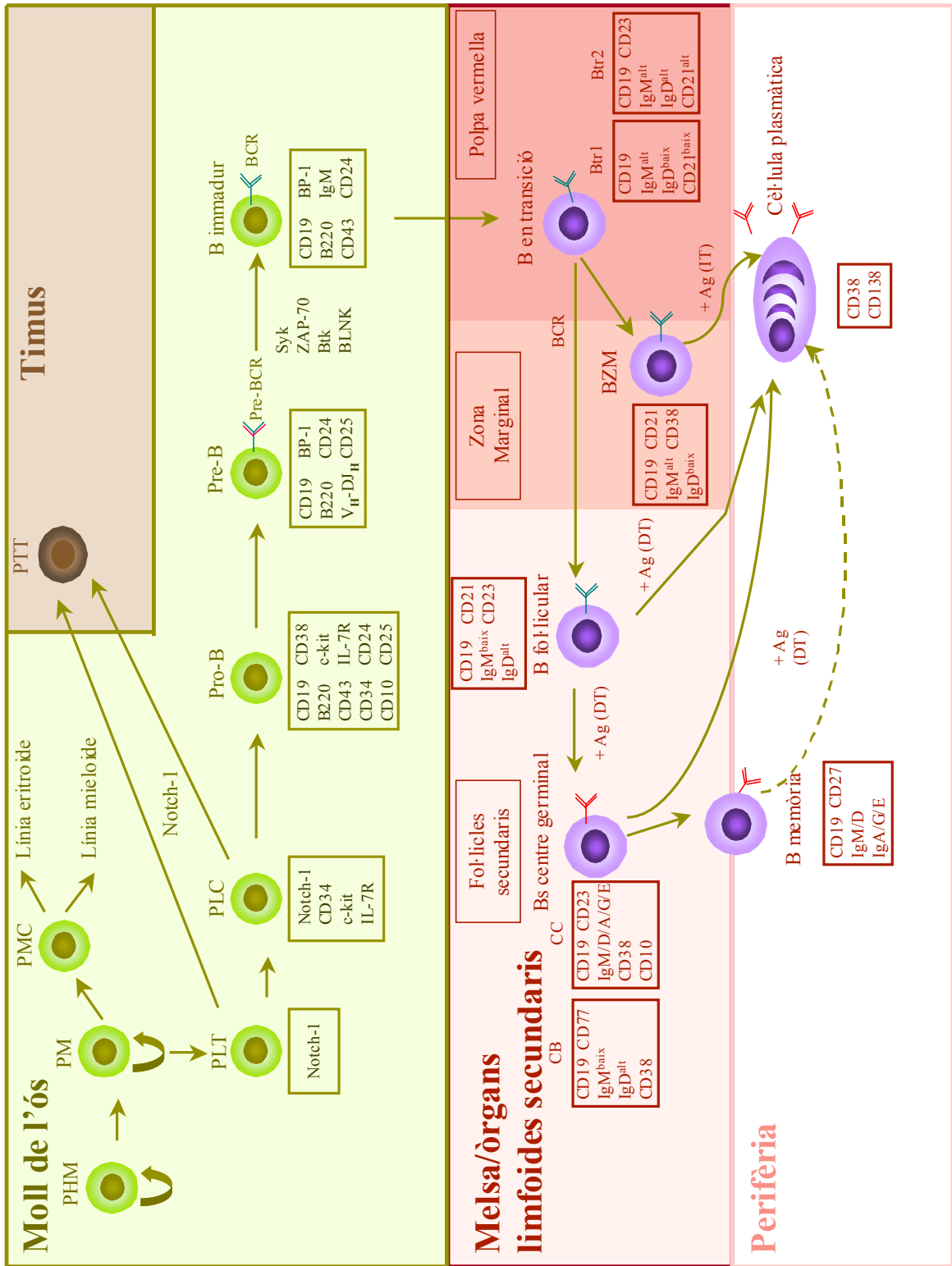


Figura 1. *Etapas del desenvolupament dels limfòcits B, des dels progenitors hematopoiètics multipotencials (PHM) fins a les cèl·lules plasmàtiques productores d'anticossos, indicant alguns dels marcadors de superfície característics de cada estadi i els òrgans que participen en el procés. PM: progenitor multipotencial; PMC: progenitor mieloide comú; PTT: progenitor temprà de llinatge T; PLT: progenitor limfoide temprà; PLC: progenitor limfoide comú; BCR: receptor de limfòcits B; Btr: B en transició Ag: antígen; DT: dependent de limfòcits T; IT: independent de limfòcits T; ZM: zona marginal; CB: centroblastes; CC: centròcits.*

1.3 Dels progenitors hematopoiètics multipotencials als progenitors limfoides comuns

Un dels primers progenitors que trobem al moll de l'ós són els progenitors multipotencials, dels quals es diferencien el progenitor mieloide comú, del qual deriven totes les cèl·lules sanguínies no limfoides, i el progenitor limfoide temprà. Aquest últim tipus cel·lular expressa de manera molt primerenca els gens de recombinació gènica *Rag1* i *Rag2* (*recombination activating gene 1/2*) i, conseqüentment, pot començar el procés de reordenament dels segments D i J del locus de la cadena pesada de les immunoglobulines (Ig_H)^{4,5} (Figura 5). Aquests progenitors poden migrar al timus, on en resposta a senyals a través de molècules Notch1 es converteixen en progenitors primerencs de llinatge T, o poden quedar-se al moll de l'ós com a progenitors limfoides comuns, caracteritzats per l'expressió de CD34, de c-KIT i del receptor de interleukina 7 (IL-7R o CD127).

Les fases inicials del desenvolupament dels limfòcits B que tenen lloc al moll de l'ós depenen de la presència de les cèl·lules de l'estroma. Aquestes

cèl·lules sintetitzen factors de creixement que estimulen la proliferació i diferenciació dels progenitors. Els més importants són la IL-7 (crítica també per al desenvolupament dels limfòcits T), el SCF (*stem cell factor*, present a la superfície de les cèl·lules de l'estroma: el seu lligant, el c-KIT, s'expressa a la superfície dels progenitors limfoides comuns i dels limfòcits pre-B) i el SDF (*stromal derived factor*), essencial per al desenvolupament dels limfòcits pre-B⁶.

El factor de transcripció PU.1 participa en l'autorenovació i proliferació dels progenitors hematopoètics multipotencials^{7,8}. Aquest factor està implicat en el compromís temprà cap als llinatges mieloide i limfoide en funció dels seus nivells d'expressió: nivells elevats de PU.1 afavoreixen la diferenciació cap a progenitors de la línia mieloide, mentre que nivells intermedis són decisius per al posterior desenvolupament dels limfòcits de llinatge B⁹. En canvi, sembla que aquest factor de transcripció no està implicat en la producció de limfòcits T.

Altres factors de transcripció són també fonamentals en les etapes més primerenques: són els factors de les famílies Ikaros¹⁰, Helios¹¹ i Aiolos¹², els quals actuen formant homodímers o heterodímers. S'han realitzat diversos estudis amb diferents tipus de mutants d'aquests factors de transcripció. El model més senzill que es pot concloure de tots els resultats és que Ikaros i PU.1 actuen de manera paral·lela en la diferenciació dels progenitors limfoides comuns, mentre que l'expressió de només PU.1 en nivells elevats condueix a la diferenciació cap al llinatge mieloide¹.

1.4 El desenvolupament dels limfòcits pro-B

Els progenitors limfoides comuns poden generar limfòcits B, limfòcits T, cèl·lules dendrítiques i limfòcits NK (*natural killer*). Una part dels progenitors limfoides comuns expressen la molècula de superfície B220 (CD45R), marcador de limfòcits B que caracteritza l'entrada al camí de la diferenciació limfocitària B: són els anomenats limfòcits pro-B¹³. En aquesta etapa encara es manté l'expressió de CD34, IL-7R (CD127) i c-KIT, mentre que adquireixen l'expressió del CD10, la qual es perd al progressar el desenvolupament i la del CD19, marcador de limfòcits B que perdura al llarg de totes les etapes subseqüents. D'altres marcadors de superfície que es troben també en subtipus cel·lular i que ajuden al seu reconeixement són el CD43, el CD24 i el CD25 (Taula 1). Els limfòcits pro-B representen el primer estadi irrevocablement compromès amb el llinatge B. Els limfòcits pro-B tenen una capacitat limitada d'autorenovació i proliferació. En aquesta fase del desenvolupament continua el procés de reordenament dels segments gènics de la cadena pesada de les immunoglobulines. Els limfòcits pro-B primerencs acompleixen el reordenament del segments D_H i J_H provant primer en un cromosoma i, si el reordenament no té èxit, en el segon cromosoma. Els limfòcits pro-B tardans reordenen un segment V_H junt als segments DJ_H prèviament reordenats, provant també primer en un cromosoma i si no s'aconsegueix un reordenament funcional, en el segon cromosoma. El procés acaba amb la generació d'un al·lel V_H-DJ_H funcional, a la vegada que es regula negativament l'expressió dels gens de recombinació *Rag1* i *Rag2*. Si després de

intentar el reordenament en els dos cromosomes es produeix una absència de reordenaments reeixits, el limfòcit no serà viable i finalment morirà per apoptosi.

L'especificació del llinatge B està altament regulada per diferents factors de transcripció que actuen de manera jeràrquica. Probablement a causa de la regulació negativa del gen *notch1* per part del factor de transcripció PAX-5 (*paired box gene 5*)^{14,15}, s'activa l'expressió dels factors de transcripció EBF (*early B cell factor*) i E2A (*immunoglobulin enhancer building factors E2/E47*), els quals posen en marxa el programa de transcripció gènica específic del llinatge dels limfòcits B^{16,17}. La determinació del llinatge B per part dels diferents factors de transcripció, però, no és un procés tan lineal (Figura 2). La identitat de limfòcit B està determinada per l'expressió de les proteïnes accessòries que componen el pre-BCR i per l'inici de la recombinació gènica al locus *Ig_H*. Aquest programa molecular està directament regulat pels factors E2A i EBF. El factor de transcripció PU.1 és també essencial per a l'afavoriment de la generació de limfòcits B, encara que només actua en aquest sentit quan es troba en concentracions molt baixes¹⁸. Sembla que PU.1, juntament amb el factor E2A, a més de regular directament gens relacionats amb el llinatge B, és alhora un del encarregats de regular l'expressió de EBF.

De igual manera, l'expressió de EBF està altament regulada per la senyalització a través de IL-7R (CD127), el qual actua mitjançant l'activació de la molècula senyalitzadora intracel·lular STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*)¹⁹. Per tal de proporcionar una visió global, estudis recents

proposen la següent relació jeràrquica entre tots aquests components: inicialment, els factors E2A i PU.1 provocarien canvis estructurals en la cromatina del gen que codifica per EBF els quals permetrien la seva inducció per part dels senyals provinents del IL-7R (CD127)²⁰. D'entre molts altres gens, el factors EBF i E2A regulen positivament l'expressió de *pax-5*. Aquests tres factors de transcripció col·laboren per a una activació sinèrgica dels gens específics de llinatge B²¹. PAX-5, a més a més, garanteix el compromís a llinatge B de manera irreversible mitjançant la inhibició de diversos gens específics de llinatge no B, incloent *Notch1*^{14,15,22}.

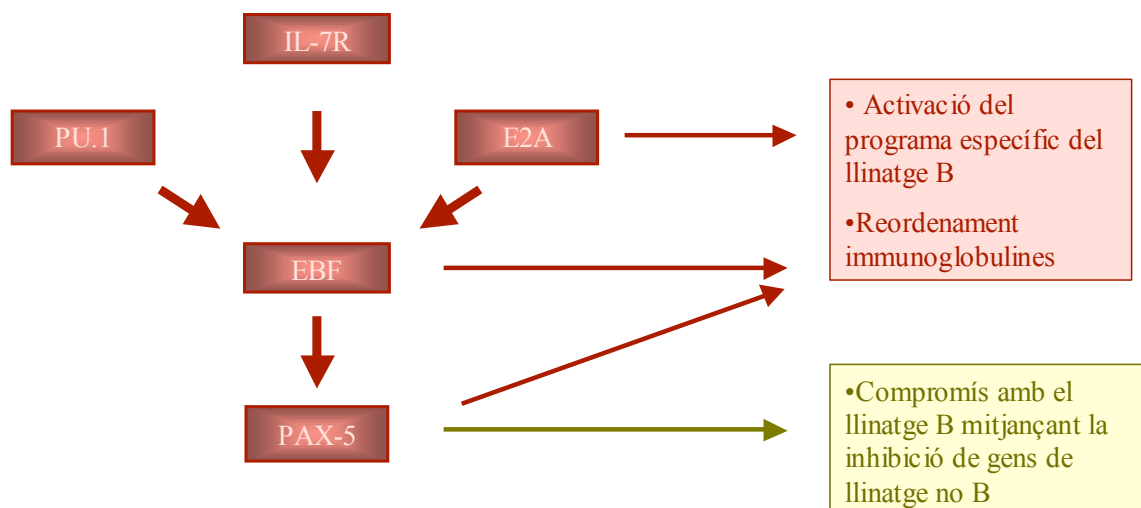


Figura 2. Relacions entre els diferents factors que controlen les etapes inicials del desenvolupament dels limfòcits B.

1.5 El desenvolupament dels limfòcits pre-B

Un cop aconseguit un reordenament V_H-DJ_H funcional, s'expressa la cadena Ig_H en la superfície cel·lular, fet que defineix l'estadi de limfòcit pre-B. A la membrana d'aquestes cèl·lules trobem l'al·lel V_H-DJ_H associat amb les pseudo

cadena lleugera V_{preB} i $\lambda 5$ i amb les molècules senyalitzadores $Ig\alpha$ (CD79a) i $Ig\beta$ (CD79b) per formar el receptor de limfòcits pre-B o pre-BCR²³⁻²⁵ (Figura 3). Els limfòcits pre-B es caracteritzen fenotípicament per l'adquisició de l'expressió de l'aminopeptidasa transmembrana BP-1 (β -protein-1), mentre que IL-7R (CD127), el CD43 i c-KIT es deixen d'expressar, a la vegada que es manté l'expressió de CD24 i CD25. Abans de començar el reordenament de la cadena lleugera (cadena Ig_L), els limfòcits pre-B augmenten molt de mida (limfòcits pre-BI) i passen per diversos cicles de divisió cel·lular; després es converteix en limfòcits pre-BII, cèl·lules molt més petites, les quals inicien el reordenament la cadena Ig_L .

1.6 Senyalització a través del pre-BCR

La senyalització a través del pre-BCR és un dels punts de control més importants del procés de generació de limfòcits B on es comprova la funcionalitat de la cadena pesada de les immunoglobulines. Si el reordenament V_H-DJ_H ha produït una cadena pesada funcional, el complex pre-BCR senyalitzarà a través de les molècules $Ig\alpha$ (CD79a) i $Ig\beta$ (CD79b). Aquesta senyalització permet l'exclusió al·lèlica del locus Ig_H (inhibició del reordenament de l'altre al·lel quan un ja s'ha reordenat correctament) i estimula la proliferació clonal dels limfòcits pre-BI, els quals augmenten molt de tamany^{26,27}. Un cop les cèl·lules han passat per uns dos-cinc cicles de proliferació, aquesta senyalització permet que es tornin a expressar els gens *Rag1* i *Rag2*, fenomen que comporta el reordenament de la cadena lleugera de les immunoglobulines als limfòcits pre-BII, que són cèl·lules molt més

petites. Primer s'intenta el reordenament al locus κ i si no té èxit en cap dels dos cromosomes, s'intenta amb el locus λ ; aproximadament en un seixanta-cinc per cent dels casos, s'aconsegueix un reordenament funcional al locus κ ²⁸.

Els mecanismes responsables d'iniciar la senyalització a través del pre-BCR no estan encara definits. Per una banda, sembla que el simple ensamblaje dels diferents components del receptor o això afegit a la seva localització en microdominis de la membrana cel·lular rics en colesterol i esfingolípid (els anomenats *lipid rafts*), podrien ser suficients per a induir la senyalització del pre-BCR que permet el posterior desenvolupament dels limfòcits B²⁹⁻³¹. Per altra banda, alguns grups han proposat lligants potencials del pre-BCR (Figura 3), com per exemple, la galectina, una molècula que es troba a l'estroma del moll de l'ós³², els quals s'unirien a la cadena pesada de les immunoglobulines del pre-BCR i activarien les vies de senyalització intracel·lular. Tot i que la selecció que pateixen els limfòcits pre-B és independent d'antigen, el fet de que pugui existir un lligant pel pre-BCR suggereix que serien necessàries interaccions febles del pre-BCR amb molècules pròpies per a que el desenvolupament pugui continuar.

Les molècules senyalitzadores intracel·lulars implicades en la transducció del senyal del pre-BCR han estat definides a partir d'estudis amb models murins deficientes en l'expressió de diferents gens. D'entre les molècules que participen en aquesta via de senyalització destaquen, per la seva indispensabilitat, les proteïnes BLNK (també anomenada SLP-65, *SH2 domain-containing leukocyte protein-65*) i BTK (*Butron tyrosine kinase*)^{33,34}. De la mateixa manera, l'absència

de les tres quinases Src, [Lyn, Blk (*B lymphoid tyrosine kinase*) i Fyn], condueix a una reducció dràstica en el nombre de limfòcits pre-B generats (ja que tenen una pitjor supervivència), i conseqüentment, a una substancial reducció en el nombre dels limfòcits B perifèrics, el que indica una redundància funcional d'aquestes tres proteïnes en la seva participació en la senyalització a través del pre-BCR³⁵.

En aquest mateix sentit, s'ha descrit recentment que l'absència de la proteïna tirosina quinasa SYK (*spleen tyrosine kinase*) produeix un bloqueig parcial del desenvolupament en aquest punt, el qual es veu atenuat per la presència de la proteïna de la mateixa família ZAP-70 (*ζ-associated protein-70*); l'absència d'ambdues proteïnes provoca un bloqueig total a l'estadi pro-B i la manca d'exclusió al·lèlica, ambdós fenòmens indicadors d'una senyalització a través del pre-BCR defectuosa³⁶.

Les proteïnes senyalitzadores LAT (*linker for activation of T lymphocytes*) i SLP-76 (*SH2 domain-containing leukocyte protein-76*) també es troben expressades en els limfòcits pre-B i participen en la senyalització del pre-BCR^{37,38}. Aquestes proteïnes, juntament amb la tirosina quinasa ZAP-70 eren considerades fins recentment proteïnes senyalitzadores pròpies del receptor de limfòcits T (TCR) i, per tant, específiques del llinatge T. Recentment s'ha postulat que una de les diferències entre el pre-BCR i el BCR dels limfòcits B d'estadis madurats més avançats, és la utilització a les cascades de transducció de senyals de components del pre-TCR/TCR, els quals posteriorment es regulen negativament, probablement com a conseqüència de la mateixa senyalització a través del pre-

BCR. S'ha proposat com a model que l'expressió d'aquestes proteïnes sigui un mecanisme per assegurar la màxima eficiència de transducció de senyals a partir del pre-BCR a través de diferents complexos transductors funcionalment redundants³⁷ (Figura 3).

L'activació de les diferents proteïnes senyalitzadores proximals per part del pre-BCR convergeix en la fosforilació de la proteïna PLC γ 2 (*phospholipase C γ 2*). La PLC γ 2 indueix la hidròlisi del PIP2 (*fosfatidilinositol bifosfat*) present a la membrana citoplasmàtica i es generen els metabolits IP3 (*inositol trifosfat*) i DAG (*diacilglicerol*). La unió del IP3 al seu receptor (IP3R), localitzat al reticle endoplasmàtic, facilita l'alliberament del calci intrareticular, de manera que augmenta la concentració de Ca⁺⁺ a l'espai intracel·lular. Els nivells elevats de calci juntament amb el DAG permeten la translocació a la membrana citoplasmàtica d'algunes isoformes de la serina/treonina quinasa PKC (*protein kinase C*). Les PKCs regulen l'activació gènica posterior mitjançant el control de l'expressió de diversos factors de transcripció.

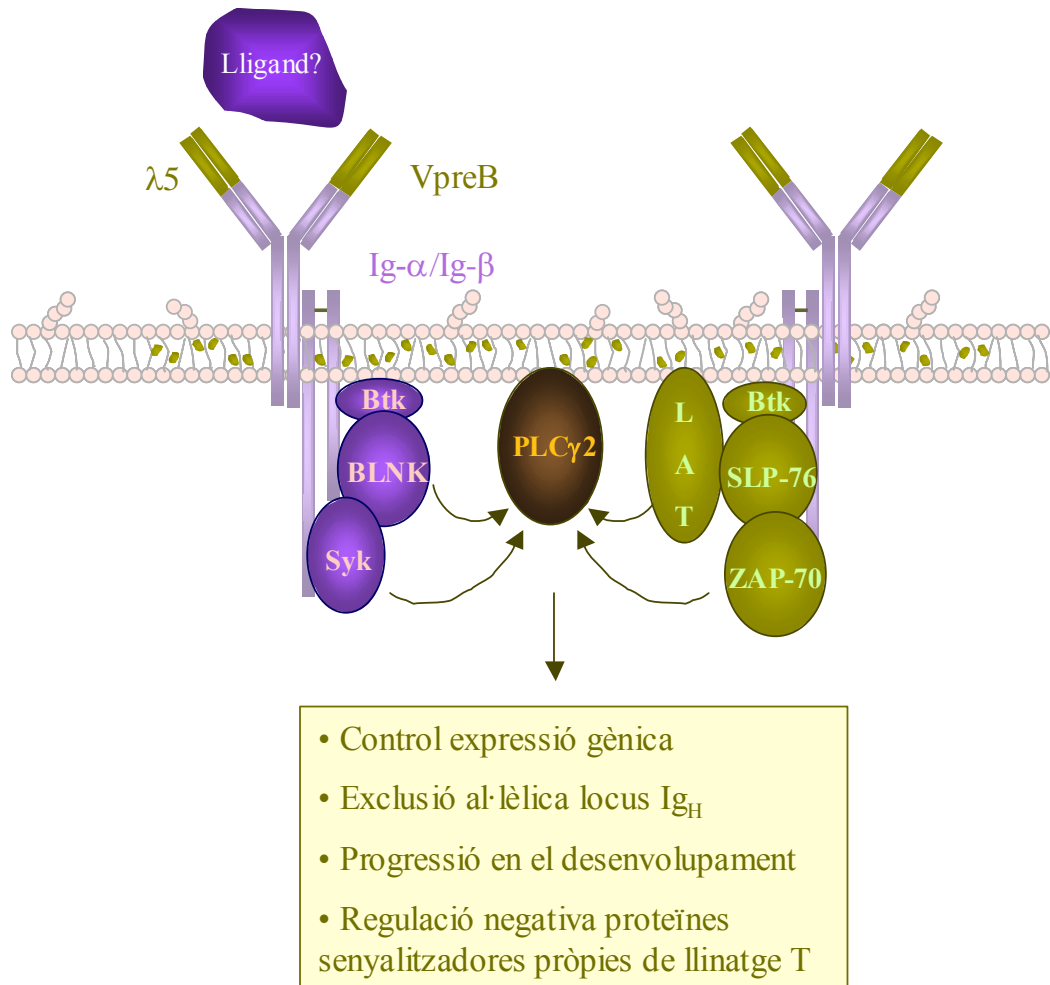


Figura 3. Model per l'activació de PLC γ 2 a través del pre-BCR. A la banda esquerra, el model clàssic del pre-BCR. A la banda dreta, les proteïnes senyalitzadores i adaptadores pròpies del pre-TCR que es troben en redundància funcional als limfòcits pro/pre-B. Adaptat de Su YM, et al. *Immunity*, 2003;19 (295-305)³⁷

1.7 El desenvolupament dels limfòcits B immadurs

Una vegada els gens de la cadena Ig_L s'han reordenat amb èxit, aquesta comença a sintetitzar-se i s'expressa en superfície juntament amb la cadena pesada, reordenada amb el segment constant μ , de manera que es produeix la

immunoglobulina IgM que, expressada a la membrana en associació a les molècules senyalitzadores $Ig\alpha$ (CD79a) i $Ig\beta$ (CD79b) constitueix el receptor de cèl·lules B o BCR característic dels limfòcits B immadurs. A cada limfòcit B immadur, la combinació de segments gènics de la regió variable de les immunoglobulines (V, D i J) que es trobem és diferent, de tal manera que cada limfòcit expressa en superfície una IgM diferent. La seqüència d'aminoàcids de cada immunoglobulina determinarà la afinitat per la unió als diferents antígens i, per tant, la intensitat de senyalització cel·lular a través del BCR.

Immunofenotípicament, aquests limfòcits es caracteritzen per l'expressió dels marcadors de limfòcits B CD19 i B220, per l'adquisició de la IgM a la membrana i del marcador CD43. A més a més, es manté l'expressió del CD24 i de BP-1.

En aquest punt del desenvolupament té lloc un dels processos de selecció més importants, ja que els limfòcits B immadurs que expressen BCRs amb alta afinitat per antígens propis, els anomenats limfòcits B autoreactius, han de ser eliminats del sistema immune³⁹.

Com a conseqüència de la resposta del BCR davant l'exposició a antígens propis, els limfòcits B poden experimentar diferents mecanismes de selecció negativa. Per a eliminar els limfòcits B autoreactius del repertori immune, es pot promoure la delecció d'aquestes cèl·lules mitjançant l'activació de les vies apoptòtiques; també es pot induir anèrgia, un procés on el BCR es torna refractari

a l'estimulació antigènica i els limfòcits entren en un estat irreversible de no resposta. Aquests limfòcits emigren del moll de l'ós però a la perifèria no són capaços d'activar-se i sobreviuen durant relativament poc temps. En alguns limfòcits B autoreactius, de manera alternativa, es tornen a expressar els gens *Rag1* i *Rag2* de manera que poden ser rescatats per un procés anomenat edició del receptor, mitjançant el qual es tornen a reordenar els segments gènics de la cadena lleugera de les immunoglobulines per tal d'intentar aconseguir un nou reordenament funcional i no autoreactiu que permeti la supervivència i posterior maduració del limfòcit⁴⁰⁻⁴³.

Les evidències indiquen que són diversos els factors que finalment decideixen si la cèl·lula autoreactiva patirà apoptosi, podrà intentar un nou reordenament de les immunoglobulines, o pel contrari, entrarà en un estat anèrgic. Entre aquests factors, es troben entre els més rellevants l'afinitat del BCR pel lligant i el lloc de trobada amb l'antígen. En aquest sentit s'ha descrit que una senyalització intensa a través del BCR provoca inicialment l'intent d'editar el receptor per evitar l'apoptosi i, si aquest no és reeixit, es produeix la mort del limfòcit per apoptosi. Els senyals lleus, per la seva banda, provocarien la inactivació del limfòcit i la seva entrada en un estat anèrgic^{40,41}. També s'ha descrit que la trobada amb l'antígen al moll de l'ós afavoreix la edició del receptor, mentre que la trobada a la perifèria directament condueix a la mort del limfòcit autoreactiu⁴².

Només un vint per cent aproximadament dels limfòcits B immadurs sobreviuen a aquest procés de selecció. Els que ho fan, abandonen el moll de l'ós i entren a la circulació perifèrica. Aquests limfòcits immadurs recentment generats emigren inicialment a la polpa vermella de la melsa, on se'ls coneix com a limfòcits B en transició.

	PLC	pro-B primerenc	pro-B tardà	pre-B I	pre-B II	B immadur	B madur
Reordenament							
Gens H	germinal	DJ	VDJ	VDJ	VDJ	VDJ	VDJ
Gens L	germinal	germinal	germinal	germinal	VJ	VJ	VJ
Ig membrana	No	No	No	Hm psL	Hm psL	IgM	IgM IgD
Molècules de superfície							
CD19		—————					
CD45R (B220)		—————					
CD34	—————						
CD10		—————					
CD38		—————					—————
CD43		—————					
CD24			—————	—————	—————	—————	—————
BP-1				—————	—————	—————	
CD25 (IL-2R)			—————	—————	—————		
c-kit	—————						
IL-7R (CD127)	—————						

Taula 1. Marcadors de superfície expressats pels limfòcits B als diferents estadis de les primeres etapes de desenvolupament. PLC: progenitor limfoide comú; H: heavy (cadena pesada); L: light (cadena lleugera); Ig: immunoglobulina; Hm: cadena pesada a la membrana; psL: pseudo cadena lleugera.

1.8 El desenvolupament dels limfòcits B madurs perifèrics

1.8.1 Els limfòcits B en transició

Els limfòcits B en transició o transicionals representen el punt de connexió entre els limfòcits B immadurs i els limfòcits B madurs immunocompetents, els quals responen a l'ajuda dels limfòcits T i perden sensibilitat als processos de selecció negativa. Els limfòcits B en transició es divideixen en dos subpoblacions anomenades Btr1 i Btr2 (limfòcits B en transició 1 i 2), les quals s'ubiquen en

zones diferents de la melsa. Els Btr1 es troben principalment a la vaina limfoide periarteriolar i pateixen novament selecció negativa si es mostren autoreactius, sent això un punt de control decisiu per a la generació de limfòcits B madurs. Els que sobreviuen són els Btr2, els quals s'ubiquen preferentment als fol·licles de la melsa i es poden distingir per l'adquisició de l'expressió en membrana de CD21 i CD23. Els limfòcits Btr1 expressen molta IgM i nivells baixos de IgD en membrana, la qual es produeix per splicing alternatiu del RNA de la cadena pesada. En els Btr2 trobem nivell elevats tant de IgM com de IgD, mentre que en els limfòcits B madurs, els nivells de IgM són lleugerament més baixos.

El pas de limfòcits B immadurs a madurs està altament controlat per la senyalització del BCR, especialment per la transducció de senyals a través de les proteïnes SYK i BTK^{44,45}, i per la proteïna BAFF (*B cell activating factor belonging to the TNF family*) i els seus tres receptors: BAFF-R⁴⁶ (*receptor de BAFF*), TACI⁴⁷ (*transmembrane activator and calcium-modulating and cyclophilin ligand interactor*) i BCMA⁴⁸ (*B cell maturation agent*). La proteïna BAFF s'expressa en limfòcits T, monòcits, macròfags i cèl·lules dendrítiques⁴⁸⁻⁵², i es pot trobar tant en forma unida a la membrana com en forma soluble⁵¹. L'estímul dels receptors de BAFF permet als limfòcits B immadurs transicionals sobreviure i diferenciar-se a limfòcits B madurs en resposta a senyals a través del BCR⁵³.

1.8.2 Els limfòcits B de la zona marginal

Seguidament, dels limfòcits B en transició situats als fol·licles de la melsa, una petita proporció (aproximadament un deu per cent) es diferencia en limfòcits B de la zona marginal i la resta en limfòcits B fol·liculars, probablement un altre cop en resposta a diferents senyals provinents del BCR. Els passos finals de la diferenciació dels limfòcits B són majoritàriament dependents d'antigen i condueixen a la formació final de les cèl·lules plasmàtiques efectores secretores d'anticossos.

Els limfòcits B de la zona marginal abandonen els fol·licles per residir exclusivament a la zona marginal de la melsa, on es troben estratègicament situats a la interfase sang-teixit limfoide⁵⁴. Aquests limfòcits mantenen l'expressió de CD21, no expressen CD23 i adquireixen l'expressió de la molècula senyalitzadora CD38. La seva localització anatòmica afavoreix que siguin els primers en trobar-se amb els antígens que circulen per la sang, ja que la melsa té una situació central en el sistema circulatori que permet a aquests limfòcits ser els primers en respondre ràpidament a una trobada amb antígens sanguinis. Aquests limfòcits responen especialment a antígens anomenats TI-2 (independent de limfòcits T tipus 2) d'una forma molt ràpida. Aquests antígens solen tenir naturalesa no proteica (carbohidrats, lipopolisacàrids, etc.) i es caracteritzen per contenir múltiples epítops idèntics que entrecreuen els BCRs a la superfície del limfòcit. Es troben principalment en bacteris encapsulats. Un cop estimulats, aquests limfòcits abandonen la zona marginal i migren cap a la polpa vermella de

la melsa on proliferen i es diferencien ràpidament en cèl·lules plasmàtiques secretores d'anticossos de manera independent dels limfòcits T i sense la formació de centres germinals.

Els mecanismes de diferenciació d'aquests limfòcits són poc coneguts. A part de la senyalització a través del BCR, es coneix la importància de factors de transcripció de la família NF- κ B (Nuclear Factor kappa B), com c-Rel i dels senyals a través de Notch^{55,56}. També reben senyals de l'estroma a través de quimioquines, citoquines i integrines⁵⁷. Un dels models proposats es basa en la diferent intensitat d'unió entre el BCR i autoantígens per a determinar el destí d'un limfòcit B en transició entre limfòcit B de la zona marginal o limfòcit B fol·licular⁵⁸. Segons aquest model, tots els limfòcits B transicionals que reben senyals de supervivència a través de BAFF poden continuar desenvolupant-se; llavors, si en resposta a un autoantígen el BCR transmet un senyal d'intensitat intermèdia (en termes de duració i amplitud de senyal i molècules transductores de senyal activades), el limfòcit es diferencia en limfòcit B fol·licular, mentre que si la unió amb l'autoantígen provoca una nul·la o molt fluixa resposta del BCR per molt baixa afinitat, el limfòcit sobreviu gràcies als senyals de BAFF i al probable senyal constitutiu de base a través del BCR i, a més a més, és susceptible de rebre senyals a través de Notch2, les quals el porten a diferenciar-se en un limfòcit B de la zona marginal⁵⁹.

A la zona marginal de la melsa trobem majoritàriament aquest tipus de limfòcits, els quals es poden distingir i caracteritzar immunofenotípicament per

l'expressió de IgM, nivells baixos de IgD, expressió de CD21 i manca d'expressió de CD23. En quant a l'estat mutacional de les immunoglobulines, sorprenentment la gran majoria tenen hipermutacions a les regions variables. De manera clàssica es considera que les immunoglobulines només pateixen hipermutació somàtica durant el transcurs de la reacció del centre germinal, descrita en detall més endavant, la qual depèn del contacte amb l'antígen i de la col·laboració dels limfòcits T. Nogensmenys, actualment s'acumulen evidències de que els limfòcits B de la zona marginal poden patir hipermutacions de manera independent de limfòcits T i d'antígens com a mecanisme de diversificació de receptors antigènics fora del centre germinal previ a l'encontre amb l'antígen. D'altres autors, però, sostenen que aquests limfòcits en realitat són limfòcits B memòria fruit de la reacció clàssica del centre germinal que no han patit canvi de classe de cadena pesada, ja que expressen IgM i IgD, que són reclutats a aquesta zona privilegiada anatòmicament per a dotar a l'organisme d'una primera defensa davant antígens sanguinis. A més a més, aquests limfòcits B anomenats de la zona marginal IgM positius/IgD positius amb hipermutació somàtica de les immunoglobulines representen aproximadament el quaranta per cent dels limfòcits B amb hipermutacions que circulen per la perifèria. Per tant, tot i que s'anomenen de la zona marginal, tenen capacitat de recirculació i es poden trobar a d'altres localitzacions. Cal esmentar que a la zona marginal de la melsa, a part d'aquests limfòcits probablement naïf (verges, que no han tingut contacte amb l'antígen) però amb signes de hipermutació somàtica, també resideixen limfòcits B memòria clàssics que són el resultat de la reacció del centre germinal i que per tant han sofert hipermutació somàtica i canvi de classe de cadena pesada.

Tots els limfòcits B que es troben a la zona marginal de la melsa tenen com a característiques comunes que reben aquesta denominació degut a la seva localització anatòmica principal i que tenen una elevada capacitat de respondre ràpidament davant la trobada amb un antígen sanguini, ja siguin limfòcits B memòria els quals responen davant antígens del tipus "depenent de limfòcit T", com limfòcits B naïf (amb o sense hipermutacions somàtiques) que responen majoritàriament a antígens tipus TI-2.

1.8.3 Els limfòcits B fol·liculars

Els limfòcits B fol·liculars són els responsables de la resposta immune humoral davant antígens proteics. Aquests limfòcits recirculen als fol·licles de la melsa, als nòduls limfàtics i al moll de l'ós fins que moren o són estimulats per un antígen i experimenten maduració addicional. Els limfòcits B fol·liculars expressen nivells baixos de IgM en superfície junt a uns nivells molt elevats de IgD. A més, es caracteritzen per la coexpressió del CD21 i el CD23 i per la manca d'expressió del CD38. Aquests limfòcits reben ajuda dels limfòcits T i responen ràpidament, proliferant i formant finalment cèl·lules plasmàtiques o limfòcits B memòria, en l'anomenada reacció del centre germinal⁶⁰.

Els limfòcits B fol·liculars que circulen poden també respondre ràpidament a la trobada amb l'antígen mitjançant la proliferació i diferenciació en cèl·lules plasmàtiques, sense que tingui lloc la formació de centres germinals. Aquesta

resposta, però, és més lenta que la que donen els limfòcits B de la zona marginal⁶¹.

1.8.4 Els centres germinals i la generació d'anticossos d'alta afinitat

Els centres germinals (Figura 4) són àrees especialitzades dels fol·licles en les quals els limfòcits B fol·liculars, amb la col·laboració dels limfòcits T, proliferen ràpidament i pateixen hipermutació somàtica de la regió variable de les immunoglobulines i recombinació genòmica per canvi de classe de cadena pesada (el que defineix el tipus i funció de la immunoglobulina)⁶². En la reacció del centre germinal els limfòcits estan sotmesos a un procés continu d'expansió, diversificació i selecció. Aquests limfòcits donen lloc finalment a cèl·lules plasmàtiques i a limfòcits B memòria.

El reclutament dels limfòcits B activats per antígens a la reacció del centre germinal comença a les regions riques en limfòcits T dels òrgans limfoides secundaris i és dependent de limfòcits T. Els limfòcits B fol·liculars experimenten una ràpida i massiva expansió clonal, es formen els fol·licles secundaris i es regionalitzen en una zona obscura i una zona clara. Els limfòcits B de la zona obscura, anomenats centroblastes, proliferen i pateixen hipermutació somàtica de les immunoglobulines, fet que fa que cada limfòcit expressi ara un BCR encara més diferenciat. Quan abandonen el cicle cel·lular, passen a la zona clara, on s'anomenen centròcits, i es seleccionen positivament aquells que expressen BCRs

amb major afinitat per l'antigen, en un procés on cal la col·laboració de cèl·lules dendrítiques presentadores d'antigen. En els centròcits, a més, es produeix el canvi de classe de cadena pesada de les immunoglobulines. Aquells centròcits que no són eliminats mitjançant apoptosi (seleccionats positivament), poden tornar a entrar al cicle del centre germinal, tornant a la zona obscura, o abandonar-ho per a diferenciar-se en cèl·lules plasmàtiques o en limfòcits B memòria⁶².

Els centroblastes i els centròcits tenen una expressió diferencial de diversos marcadors de superfície. En primer lloc, els dos tipus de limfòcits del centre germinal tornen a expressar el CD38, el qual no s'expressava en els limfòcits B fol·liculars que inicien la reacció del centre germinal. En els centroblastes trobem elevada expressió de IgD juntament amb nivells baixos de IgM. A més a més, aquests limfòcits es caracteritzen per l'expressió del CD77. En els centròcits, l'expressió de immunoglobulines pot ser molt variable, ja que poden experimentar canvi de classe de cadena pesada, així que podem trobar expressió de IgM, IgD, IgA, IgG o IgE. L'expressió del CD77 es perd en aquest moment del desenvolupament mentre que s'adquireix l'expressió de CD10 i CD23 novament (Taula 2).

El grau d'afinitat del BCR per l'antigen sembla determinar la decisió de diferenciar-se finalment en cèl·lules plasmàtiques o en limfòcits B memòria^{63,64}. Actualment es proposa el següent model: una alta afinitat del BCR afavoreix la diferenciació en cèl·lules plasmàtiques; una afinitat mitjana, la diferenciació en limfòcits B memòria, mentre que una baixa afinitat indueix apoptosi. En canvi, els

senyals provinents de la lligació del CD40 a la superfície del limfòcit B per part dels limfòcits T que participen en la reacció del centre germinal i els senyals de la IL-4 secretada per aquests mateixos limfòcits T, afavoririen la formació de limfòcits B memòria^{65,66}.

La regulació de la reacció del centre germinal, en termes generals, ve donada per l'expressió de diferents factors de transcripció que controlen els processos de diferenciació. La presència dels factors de transcripció BCL-6 (*B-cell lymphoma 6 protein*)⁶⁷ i PAX-5⁶⁸ és imprescindible per a la reacció del centre germinal. Aquests dos factors reprimeixen altres, principalment BLIMP-1 (*B lymphocyte induced maturation protein 1*)⁶⁹ i XBP-1 (*X-box binding protein 1*)⁷⁰ respectivament, que són els que desencadenen la diferenciació irreversible dels centròcits en limfòcits B memòria o en cèl·lules plasmàtiques. PAX-5 per la seva banda també activa la transcripció del gen *aid* (*activation induced cytidine deaminase*), el qual és indispensable per als processos de hipermutació somàtica i canvi de classe de cadena pesada que tenen lloc durant la reacció del centre germinal⁷¹.

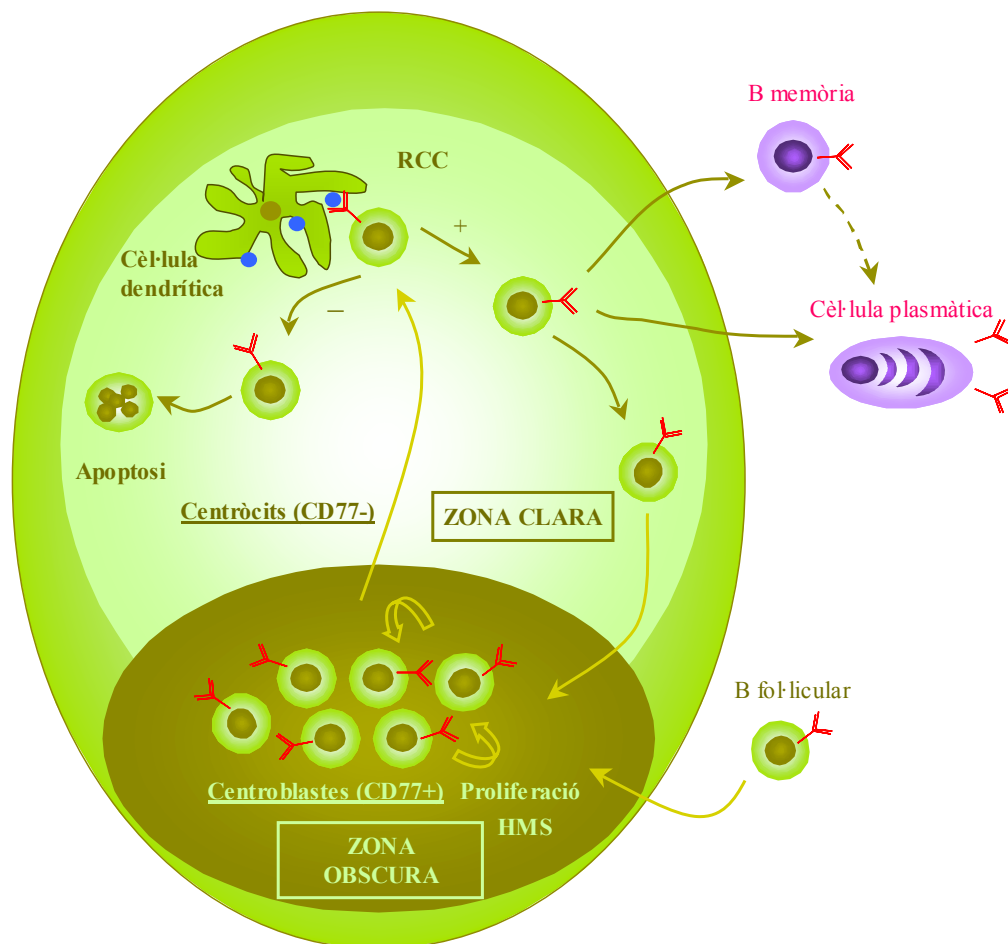


Figura 4. La reacció del centre germinal. Mitjançant diversos cicles de proliferació, maduració de l'afinitat de l'anticòs i apoptosi, al final de la reacció es generen limfòcits B memòria i cèl·lules plasmàtiques amb BCRs amb alta afinitat per l'antigen (representat per un punt blau). HMS: hipermutació somàtica. RCC: recombinació de canvi de classe de cadena pesada.

La hipermutació somàtica de les immunoglobulines que pateixen els centròblastes de la zona obscura del centre germinal és un mecanisme mutagènic dirigit cap a les regions variables dels segments gènics prèviament reordenats que es transcriuen. La taxa de mutacions que trobem en aquesta regió del genoma és extremadament elevada. El tipus de mutacions que s'observen acostumen a ser canvis de nucleòtids, mentre que les delecions o insercions són molt infreqüents.

L'alteració de la seqüència genòmica comença per l'acció de l'enzim AID el qual actua directament sobre el DNA de cadena simple deaminant les citosines per convertir-les en uracil. Aquesta lesió provoca que siguin reclutats diferents enzims especialitzats, els quals poden sintetitzar per sobre de la lesió però introdueixen errors amb elevada freqüència⁷².

Dins de la regió variable de les immunoglobulines, es poden distingir dos tipus de regions, les regions CDR (*complementary determining region*) i les FR (*framework*). La majoria de les mutacions s'acumulen a les zones CDR que codifiquen per les zones de més elevada afinitat per l'antigen de la immunoglobulina. Les zones FR, a més de patir menys mutacions, tenen una composició de nucleòtids que fa que siguin inherentment menys susceptibles a les mutacions que provoquen canvi d'aminoàcid, tot el contrari que la composició de nucleòtids de les regions CDR⁷³.

La recombinació del DNA pel canvi de classe de cadena pesada provoca la substitució d'un segment gènic de la regió constant de la cadena pesada de les immunoglobulines (normalment segment μ , que dona lloc a immunoglobulines tipus IgM) per un altre segment situat més cap a 3' (γ , ϵ o α , que donen lloc a IgG, IgE o IgA, respectivament) eliminant el DNA que queda situat al mig (Figura 5). Situat a 3' de cada segment gènic de la cadena pesada trobem una seqüència de canvi de classe o seqüència S (*switch*, en anglès). Les recombinases reconeixen aquestes seqüències i les alineen de manera que la zona intermèdia queda en forma de bucle el qual, al produir-se la recombinació del DNA, s'elimina. Aquest

procés també depèn de l'acció de l'enzim AID. La recombinació provoca que la seqüència V_HDJ_H prèviament reordenada quedi situada junt a un nou segment constant. La disposició de quin segment queda col·locat està determinada per la regulació per part de diferents citoquines principalment secretades pels limfòcits T que col·laboren en el procés. El canvi de classe de cadena pesada modifica la funció de la immunoglobulina i la seva manera i lloc d'actuació sense afectar a l'especificitat d'unió immunoglobulina-antígen.

En els limfòcits B fol·liculars que no han tingut contacte amb l'antígen i en alguns limfòcits B de la zona marginal trobem coexpressió de IgM i IgD; això és deu a que davant del segment $C\delta$ no hi ha regió S de manera que es transcriu el RNA primari i s'expressen tant IgM com IgD de manera simultània al existir dos senyals de poliadenilació diferents i un procés de splicing diferencial que salta el segment $C\mu$ per a permetre la producció de IgD. En aquells limfòcits B que només expressen IgM, la majoria dels quals es troben a la zona marginal, s'ha produït un reordenament intern que provoca la pèrdua de la regió $S\mu$ de manera que aquests limfòcits ja no poden patir cap canvi de classe de cadena addicional i per això, tot i expressar IgM, es considera que han patit canvi de classe de cadena pesada⁷⁴.

Els processos d'hipermutació somàtica i de recombinació pel canvi de classe de cadena pesada són crítics per a la maduració de la resposta dels anticossos davant antígens forans, ja que donen lloc a anticossos amb una major

afinitat per l'antígen i a l'adquisició de noves funcions efectores biològiques respectivament⁷⁵.

Els diferents tipus d'immunoglobulines tenen diferents funcions efectores. Les IgG constitueixen la immunoglobulina més comú al sèrum, aproximadament un vuitanta per cent del total. Són les que es secreten majoritàriament en una resposta secundària a un antígen, tenen alta capacitat d'extravasar-se i d'actuar als teixits neutralitzant toxines bacterianes. També activen molt eficaçment el sistema del complement. Les IgA es troben principalment en les secrecions seromucoses, tot i que també hi ha al sèrum. Formen estructures dimèriques amb capacitat per unir-se tant a virus com a bacteris que puguin entrar a les mucoses evitant que les colonitzin i fins i tot que s'hi adhereixin. La IgM constitueix aproximadament el deu per cent de les immunoglobulines presents en el sèrum. Aquesta immunoglobulina es troba en forma de pentàmers, fet que li confereix una elevada capacitat d'unió a estructures foranies particulades amb zones repetitives. Són les primeres en ser secretades davant una resposta immune primària i també activen molt eficaçment el complement. Les IgD es troben de forma molt minoritària en sèrum (aproximadament un 0.2 per cent) i, de fet, es desconeix la seva funció com a immunoglobulina secretada. Es troben a la superfície cel·lular de limfòcits B majoritàriament naïf formant part del BCR. Finalment, les immunoglobulines tipus IgE són les responsables de les reaccions al·lèrgiques i de la defensa davant grans patògens, com els helmints. La seva presència en el sèrum és la menys abundant.

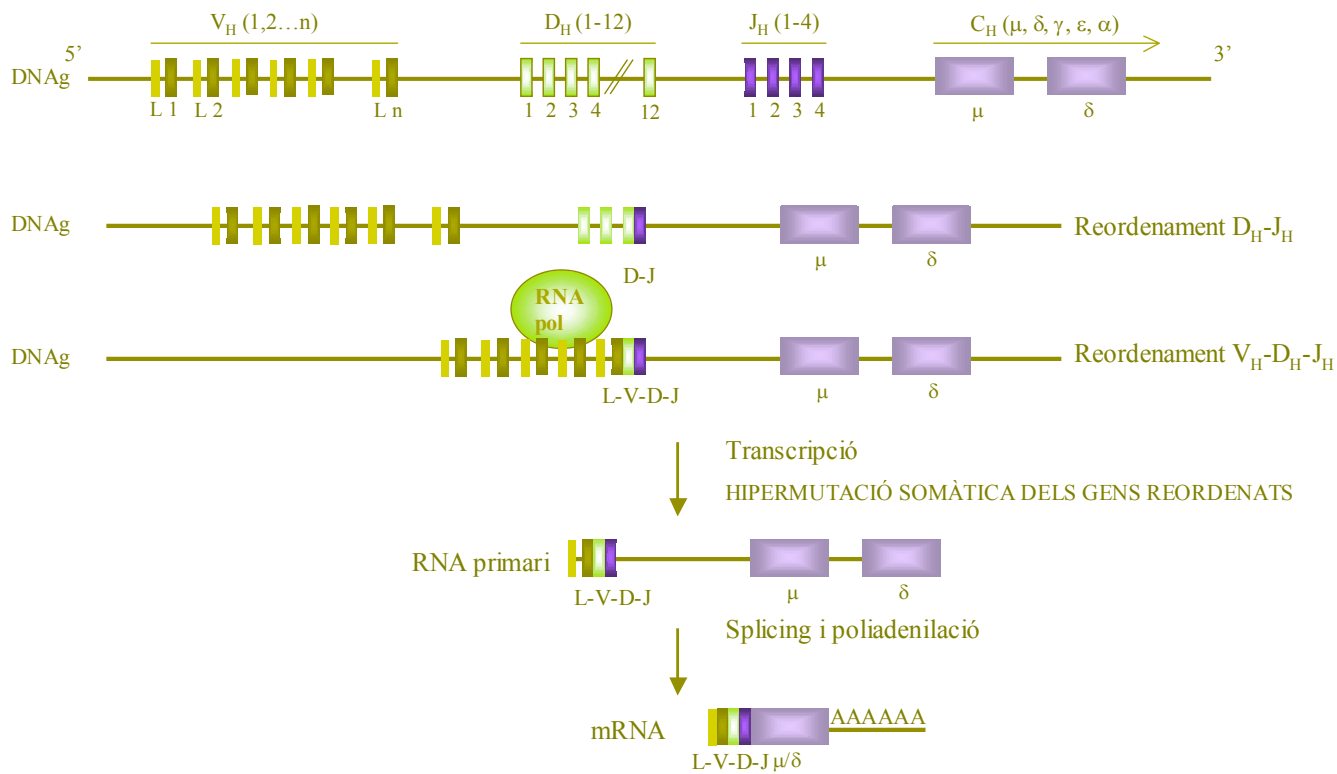


Figura 5. Reordenament dels diferents segments gènics de la cadena pesada de les immunoglobulines. La generació de la diversitat dels anticossos es basa en l'existència de múltiples segments gènics en la línia germinal, en les combinacions entre ells i en la hipermutació somàtica que pateixen les regions variables. L: regió líder; DNAg: DNA genòmic; RNA pol: RNA polimerasa; mRNA: RNA missatger.

1.8.5 Les cèl·lules plasmàtiques i els limfòcits B memòria

Un cop la reacció del centre germinal arriba al seu punt màxim, els centres germinals desapareixen a poc a poc i es generen les cèl·lules plasmàtiques i els limfòcits B memòria. Aquests limfòcits, com a conseqüència d'haver patit canvi de classe de cadena pesada, poden expressar immunoglobulines del tipus IgG, IgE o IgA (els limfòcits B naïf, que no han tingut contacte amb l'antigen, només expressen IgM i IgD).

En les cèl·lules plasmàtiques la producció d'immunoglobulines canvia de la forma ancorada a la membrana a la forma secretada. Abans de l'aturada del cicle cel·lular que culmina amb formació d'aquest tipus cel·lular, comença la secreció d'immunoglobulines característica d'aquests limfòcits, els quals perden la capacitat de dividir-se i representen el grau màxim de diferenciació limfocitària B. Les cèl·lules plasmàtiques, a diferència dels limfòcits B memòria, han patit diferenciació terminal i no poden ser estimulades per antígen, ni per a proliferar ni per a augmentar la seva producció d'anticossos. A la superfície de les cèl·lules plasmàtiques, trobem expressió de CD38 i de la molècula CD138, marcador sovint utilitzat per a identificar aquest subtipus cel·lular.

Podem diferenciar entre dos tipus de cèl·lules plasmàtiques. Les cèl·lules plasmàtiques de vida curta, que són el resultat de la reacció primerenca a l'antígen, la qual no requereix de la reacció del centre germinal. Tenen el seu origen en el limfòcits B de la zona marginal o en limfòcits B fol·liculars que circulen. Poden patir canvi de classe de cadena pesada, encara que majoritàriament secreten IgM, però no experimenten diversificació somàtica del BCR mitjançant hipermutació al gen de les immunoglobulines. Aquests limfòcits tenen la funció de respondre inicialment d'una manera molt ràpida als patògens. Les cèl·lules plasmàtiques de vida curta resideixen a la melsa, es creu que el microambient d'aquest òrgan no permet la coexistència d'un nombre elevat de cèl·lules plasmàtiques i per aquest motiu pateixen apoptosi en pocs dies. El segon tipus són les cèl·lules plasmàtiques de vida llarga: són el producte de la reacció del centre germinal, contenen BCRs amb evidència de hipermutació somàtica i

amb patrons mutacionals que suggereixen selecció conduïda per l'antígen. Els limfòcits B memòria, davant una trobada secundària amb l'antígen, proliferen i donen lloc també a cèl·lules plasmàtiques de llarga vida. Les cèl·lules plasmàtiques migren al moll de l'ós on reben estímuls que els permeten sobreviure durant molts mesos sense proliferar, i són les responsables de generar nivells persistents d'anticossos.

El procés de diferenciació terminal dels limfòcits B en cèl·lules plasmàtiques productores d'anticossos està finament regulat per l'expressió de diferents factors activadors i repressors de la transcripció que controlen els programes d'expressió gènica propis d'aquest estadi del desenvolupament (Figura 6). Els factors de transcripció BLIMP-1, IRF-4 (*interferon regulatory factor 4*) i XBP-1, principalment, permeten la diferenciació terminal dels limfòcits B aturant el cicle cel·lular, disminuint la senyalització a través del BCR i la comunicació amb els limfòcits T, inhibint els processos de hipermutació somàtica i canvi de classe de cadena pesada i induint una copiosa síntesi i secreció d'immunoglobulines. És interessant destacar que, per a permetre la diferenciació plasmàtica, s'ha de reprimir, per part de BLIMP-1, la transcripció del factor PAX-5, el qual és necessari per establir i mantenir la identitat de limfòcit B durant tot el desenvolupament⁷⁶ (Figura 6).

A més a més de PAX-5, altres factors de transcripció responsables de l'activació dels gens de la maquinària dels limfòcits B del centre germinal com BCL-6 i MITF (*microphthalmia transcription factor*) han de ser també regulats negativament. Aquest factors, a la vegada impedeixen el desenvolupament de les

cèl·lules plasmàtiques reprimint l'expressió BLIMP-1, IRF-4 i XBP-1. Aquest sistema de repressió mútua preveu la formació de cèl·lules plasmàtiques al centre germinal al mateix temps que impedeix la reversió de les cèl·lules plasmàtiques cap a l'estadi de limfòcit B.

Per a iniciar la diferenciació terminal de les cèl·lules plasmàtiques, cal la regulació negativa del repressor transcripcional BCL-6, fet que permet que s'expressi BLIMP-1. Quan BLIMP-1 s'expressa aquest alhora reprimeix l'expressió de BCL-6 i PAX-5, entre d'altres gens crítics per a la funció del centre germinal: això assegura que la diferenciació en cèl·lules plasmàtiques sigui irreversible⁷⁷. BLIMP-1 és també induït per diferents interleuquines i citoquines secretades per cèl·lules dendrítiques fol·liculars i per limfòcits T, com IL-2, IL-5, IL-6 i IL-10, entre d'altres^{78,79}. BLIMP-1 és el responsable directe de l'expressió de gens del programa de diferenciació de cèl·lules plasmàtiques, com IRF-4^{80,81} i de gens involucrats en la secreció d'immunoglobulines⁸².

La repressió de PAX-5 és important no només per a inhibir les funcions de limfòcit B, si no també per a permetre la funcionalitat de les cèl·lules plasmàtiques permetent (desreprimint) l'expressió de Ig_H, Ig_L i XBP-1, entre d'altres^{70,83}. XBP-1 és un factor de transcripció també indispensable per a la diferenciació i funció de les cèl·lules plasmàtiques⁸⁴. La inhibició de PAX-5 per part de BLIMP-1 és indispensable per a que es pugui expressar XBP-1, ja que PAX-5 manté reprimida l'expressió de XBP-1⁷⁰. XBP-1 indueix l'expressió de gens implicats en processos relacionats amb situacions d'alta activat de síntesi

proteica (com és el cas de la secreció d'anticossos per part de les cèl·lules plasmàtiques) com serien, entre d'altres, el doblegament de proteïnes, la seva posterior glicosilació i el tràfic entre el reticle endoplasmàtic i el Golgi⁸⁵.

Finalment, un altre dels factors de transcripció implicats en el desenvolupament de les cèl·lules plasmàtiques és MITF. La seva expressió és crucial per a mantenir els limfòcits B madurs en un estat de repòs, ja que en la seva absència es formen cèl·lules plasmàtiques de manera espontànea⁸⁶. Aquesta activitat depèn de la repressió de l'expressió del factor IRF-4. IRF-4 és un activador transcripcional que sembla que també actua en una fase primerenca del desenvolupament de les cèl·lules plasmàtiques ja que també és necessari per als cicles de proliferació previs a la diferenciació terminal, procés que no requereix de BLIMP-1⁸³ ni de XBP-1⁸⁷. Experiments recents amb ratolins deficients per IRF-4 en els limfòcits B del centre germinal exclusivament, demostren que, en absència d'aquest factor, després de la reacció del centre germinal no es generen cèl·lules plasmàtiques. En aquests ratolins, es regula positivament l'expressió de BLIMP-1, però no la de XBP-1, fet que indica que IRF-4 actua després de BLIMP-1 però abans de XBP-1 (Figura 6).

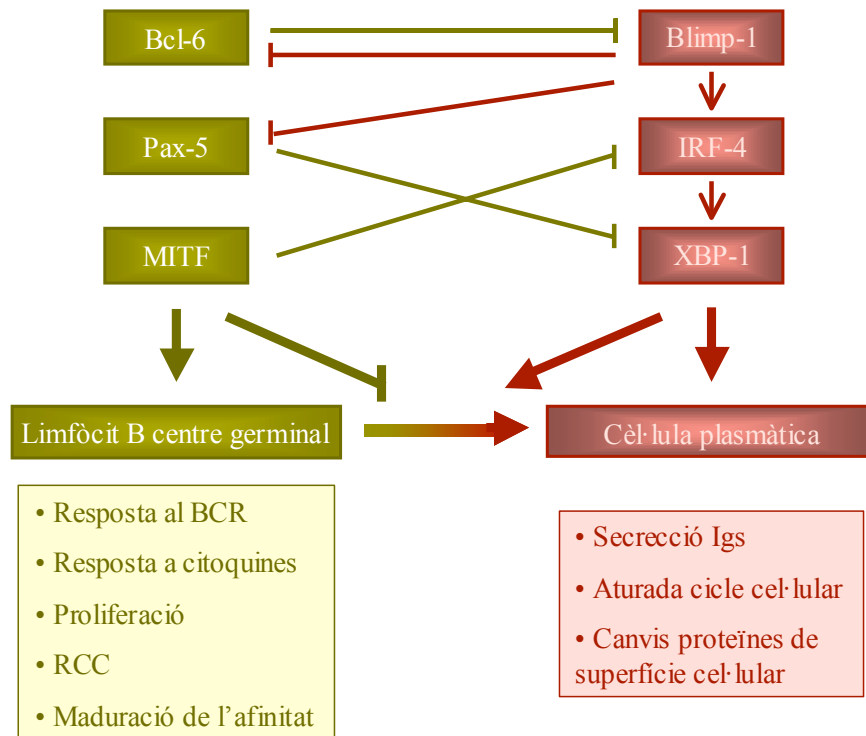


Figura 6. Relació entre els diferents factors de transcripció implicats en la diferenciació de les cèl·lules plasmàtiques. Els mecanismes de repressió transcripcional controlen els programes d'expressió gènica dels limfòcits B del centre germinal i de les cèl·lules plasmàtiques, els quals són mútuament excloents.

En la diferenciació de les cèl·lules plasmàtiques es produeixen també canvis en l'expressió de diverses molècules de superfície: es perden molècules reguladores del senyal a través del BCR, com el CD19, el CD21 i el CD45, ja que tampoc s'expressa el BCR a la membrana⁸⁸. Al mateix temps, es produeix l'augment de l'expressió del proteoglican Syndecan-1 (també anomenat CD138), el qual reconeix la matriu extracel·lular i diversos factors de creixement⁸⁹. La seva expressió augmenta al centre germinal, abans de la diferenciació terminal. També s'expressen la integrina VLA-4 (*very late antigen 4*), important per als contactes entre cèl·lules plasmàtiques i cèl·lules de l'estroma del moll de l'ós⁹⁰ i

el CD38, glicoproteïna transmembrana senyalitzadora amb efectes estimuladoris i anti-apoptòtics en aquest tipus cel·lular⁹¹.

A diferència de les cèl·lules plasmàtiques, els limfòcits B memòria retenen l'expressió del BCR d'alta afinitat a la seva superfície i no secreten anticossos. Aquests limfòcits també poden persistir durant molt de temps independentment d'estimulació antigènica. Un cop abandonen el centre germinal, els limfòcits B memòria recirculen per la sang i els òrgans limfàtics secundaris o es queden a les zones de drenatge dels ganglis limfàtics i melsa, incloent la zona marginal. Tenen la capacitat intrínseca de respondre més ràpidament que els limfòcits B naïf i proliferen davant un encontre secundari amb l'antígen⁹². Quan succeeix això, es produeix una expansió clonal massiva dels limfòcits B memòria, donant lloc a entre vuit i deu vegades més cèl·lules plasmàtiques que en una resposta primària⁹³. Una petita fracció de limfòcits B memòria persisteix sense diferenciar-se en cèl·lula plasmàtica per garantir la presència de limfòcits B memòria en l'organisme. També pot tenir lloc una reacció del centre germinal secundària. L'expressió de la proteïna de superfície CD27, en coexpressió amb el CD19 i amb diferents classes d'immunoglobulines a la membrana, s'ha revelat com un important marcador per a identificar els limfòcits B memòria⁹⁴.

A la sang perifèrica, sorprenentment, un percentatge molt elevat dels limfòcits B amb hipermutacions somàtiques de les immunoglobulines i expressió de CD27 no han patit canvi de classe de cadena pesada i, per tant, coexpressen a la superfície immunoglobulines del tipus IgM i IgD⁹⁴. Aquests limfòcits B memòria

representen el quinze per cent dels limfòcits B en perifèria. Un percentatge molt baix, inferior a l'u per cent, expressa només IgD. La resta, es considera que han patit recombinació de canvi de classe de cadena pesada, ja que expressen IgG o IgA. Del total de limfòcits B memòria perifèrics, un deu per cent expressa només IgM, però experiments in vitro indiquen que també han patit canvi de classe de cadena, ja que no poden patir més canvis degut a reordenaments interns al gen de les immunoglobulines⁹⁵. Actualment es considera que els limfòcits B memòria "autèntics" productes de la reacció del centre germinal que circulen per la perifèria són aquells que han patit canvi de classe de cadena pesada i, per tant, expressen IgM només o IgG/IgA. Els limfòcits B memòria IgM/IgD positius que trobem en sang perifèrica són iguals en termes de immunofenotip, perfil d'expressió gènica i comportament davant reaccions immunes independents de limfòcits T als que trobem a la zona marginal de la melsa⁹⁶. A més a més, aquests limfòcits són presents a la sang perifèrica d'aquells malalts amb síndrome hiper-IgM, els quals no desenvolupen centres germinals⁹⁷. És per això que es considera que aquests limfòcits B memòria no són el producte del centre germinal, si no que es tractaria d'un llinatge de limfòcits B diferent que es diversificaria patint hipermutació somàtica de les immunoglobulines de manera independent de limfòcits T i d'antígens a la zona marginal de la melsa i que, a més a més, es troben circulant per la sang perifèrica. Aquests limfòcits constituïrien la part perifèrica d'aquells limfòcits B de la zona marginal encarregats bàsicament de la resposta immune independent de limfòcits T i tindrien la mateixa funció.

La relació ontogènica entre les cèl·lules plasmàtiques i els limfòcits B memòria actualment no està resolta. Es proposen dues alternatives: la visió clàssica, en la que els limfòcits B memòria i les cèl·lules plasmàtiques serien dos destins diferents que poden adoptar els limfòcits B que abandonen els centres germinals indistintament; més recentment s'ha proposat que els limfòcits B post-germinals es podrien desenvolupar a través d'un únic camí que va des de la formació de limfòcits B memòria fins la formació de cèl·lules plasmàtiques (passant per l'estadi de limfòcit B pre-plasmàtic⁹⁸). Algunes dades, però, suggereixen que aquests anomenats limfòcits B pre-plasmàtics són limfòcits no B que capturen BCRs amb receptors de superfície a través de interaccions amb la cadena pesada de les immunoglobulines, de manera que es pot confondre i identificar com a limfòcits que expressen immunoglobulines en superfície⁹⁹.

1.8.6 Els limfòcits B CD5 positius

En algun moment actualment no definit de la ontogènia dels limfòcits B es generen els limfòcits B CD5 positius. Aquests limfòcits tenen fenotip de limfòcit B fol·licular i predominen en la vida fetal. La majoria dels limfòcits B IgM positius de la sang de cordó umbilical expressen CD5, en canvi en els adults representen un percentatge molt baix dels limfòcits B madurs¹⁰⁰. La molècula CD5 sembla participar en la modulació de la senyalització a través del BCR mitjançant el reclutament de la proteïna fosfatasa SHP1 (*Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 1*)¹⁰¹. Aquests limfòcits constitueixen una població de

cèl·lules naïf que recirculen que rarament participen en la reacció del centre germinal i que, conseqüentment, presenten els gens de les immunoglobulines reordenats però no mutats. Tenen capacitat d'autorenovar-se i expressen un repertori de BCRs esbiaixat cap al reconeixement d'antígens del tipus TI-2, normalment presents en la superfície dels bacteris¹⁰².

Els limfòcits B CD5 positius són els responsables de la producció dels anticossos anomenats naturals, els quals es formen en resposta a antígens propis però que sovint reconeixen antígens bacterians tipus TI-2 amb baixa afinitat. Aquests anticossos constitueixen una primera defensa davant infeccions, ja que tenen capacitat d'unir-se a diversos antígens no proteics dels patògens més comuns, tal com polisacàrids, fosfatidilcolina i lipopolisacàrics, de igual manera que succeeix en el ratolins. En aquest sentit, la funció dels limfòcits B CD5 positius seria equivalent a la dels limfòcits B de la zona marginal¹⁰³⁻¹⁰⁵.

	B transició 1	B transició 2	B zona marginal	B fol·licular	Centroblast	Centròcit (1)	B memòria (2)	Cèl·lula plasmàtica
Molècules de superfície								
CD19	+	+	+	+	+	+	+	-
IgM	alt	alt	alt	baix	baix	+	+	-
IgD	baix	alt	baix	alt	alt	+	+	-
IgG/A/E	-	-	-	-	-	+	+	-
CD21	baix	alt	+	+	-	-	-	-
CD23	-	+	-	+	-	-	-	-
CD38	-	-	+	-	+	+	-	+
CD10	-	-	-	-	-	+	-	-
CD27	-	-	-	-	-	-	+	-
CD138	-	-	-	-	-	-	-	+
CD77	-	-	-	-	+	-	-	-

Taula 2. Immunofenotip de les diferents poblacions de limfòcits B madurs perifèrics.

(1): una fracció dels centròcits pateixen canvi de classe de cadena pesada de manera que canvien de l'expressió de IgM i IgD a la d'altres tipus d'immunoglobulines per generar anticossos amb diferents funcions efectores.

(2): 37,5 % IgM+ IgD+, 37,5 % IgG o IgA, 25 %: només IgM; <1% només IgD⁹⁴

2. NEOPLÀSIES DERIVADES DE LIMFÒCITS B

2.1 Classificació (Organització Mundial de la Salut)

Les neoplàsies derivades de limfòcits B, també anomenades síndromes limfoproliferatives B, són un grup de malalties caracteritzades pel creixement anormal i no controlat d'una clona limfocítica, ja sigui de precursors o de limfòcits B madurs. Els processos de desenvolupament, maduració i activació dels limfòcits B anteriorment descrits poden patir desregulacions que comportin bloqueigs en la diferenciació, manca d'apoptosi i/o augment del creixement cel·lular i la proliferació que desemboquin en l'aparició d'una leucèmia (afectació principal a la sang perifèrica i/o moll de l'ós) o un limfoma (creixement neoplàsic en masses tisulars concretes).

Segons l'actual classificació de la Organització Mundial de la Salut, les diferents malalties es classifiquen en funció de la població limfocitària que es vegi afectada; aquesta classificació també integra dades genètiques i moleculars¹⁰⁶.

- Neoplàsies derivades de precursors de limfòcits B:
 - Leucèmia/limfoma limfoblàstica B

- Neoplàsies derivades de limfòcits B madurs:
 - Leucèmia limfàtica crònica
 - Leucèmia prolimfocítica B

- Limfoma B esplènic de la zona marginal
- Leucèmia de cèl·lules peludes
- Limfoma limfoplasmacític
- Limfoma de cèl·lules del mantell
- Limfoma fol·licular
- Limfoma B de la zona marginal, del teixit limfoide associat a mucoses
- Limfoma ganglionar de la zona marginal
- Limfoma B de cèl·lules grans difús
- Limfoma de Burkitt
- Mieloma múltiple

D'entre totes les síndromes limfoproliferatives B, aquesta tesi doctoral, per raons de la distribució de l'expressió de la proteïna ZAP-70 i el seu possible significat biològic, es focalitzarà en la descripció de les característiques clínic-biològiques de la leucèmia limfàtica crònica, el limfoma de Burkitt i en la leucèmia/limfoma limfoblàstica B.

2.2 Leucèmia Limfàtica Crònica

La leucèmia limfàtica crònica (LLC), la més freqüent de les leucèmies en el món occidental, és una malaltia produïda per la proliferació i cúmul de limfòcits B morfològicament madurs immunoincompetents principalment a la sang perifèrica, tot i que també es poden acumular al moll de l'ós, als ganglis limfàtics i a la melsa¹⁰⁷. En els últims anys s'han fet molts progressos en l'estudi de la LLC, tant a nivell biològic com a nivell clínic, malgrat això, aquesta és una malaltia que actualment segueix incurable. Els coneixements biològics sobre la LLC adquirits durant els darrers anys contribueixen a entendre millor la natura d'aquesta malaltia, ajuden a identificar subgrups de pacients amb especial mal pronòstic candidats a tractaments diferencials i, finalment, permeten usar diferents marcadors biològics pel diagnòstic, la detecció de la malaltia i el seu seguiment al llarg del temps. Actualment, no hi ha cap alteració genètica específica que defineixi la LLC, fet que fa que el coneixement sobre la patogènesi de la malaltia sigui encara limitat.

2.2.1 Origen cel·lular

Les cèl·lules de LLC es caracteritzen per l'expressió dels marcadors de superfície cel·lular CD5, CD23, CD19 i nivells baixos de IgM/IgD, un patró d'expressió que no es troba en cap població de limfòcits B normal coneguda¹⁰⁷. L'expressió de la molècula CD5 va donar suport a la idea de que la LLC tenia el seu origen en els limfòcits B naïf CD5 positius¹⁰⁸. Per això, de manera clàssica la

LLC ha estat considerada una malaltia derivada de limfòcits B que no han passat pel centre germinal, també anomenats limfòcits B pre-germinals. Les primeres seqüències d'immunoglobulines que es varen obtenir de malalts amb LLC confirmaven aquesta hipòtesi, ja que no es van trobar signes de hipermutació somàtica¹⁰⁹. Més endavant, però, van començar a aparèixer publicacions on es demostrava que aproximadament la meitat de les mostres de malalts amb LLC presentaven hipermutacions somàtiques. Això es defineix per una homologia menor al noranta-vuit per cent amb la línia germinal dels gens del segment V_H del domini variable de la cadena pesada de les immunoglobulines (IgV_H)¹¹⁰. Aquest punt de tall va ser escollit inicialment ja que els polimorfismes, molt freqüents en els gens de les immunoglobulines, poden donar lloc a un dos per cent de disparitat¹¹¹. Actualment es coneix que aproximadament entre el cinquanta i el setanta per cent dels casos de LLC presenten hipermutacions a IgV_H^{112,113}. Aquest fet suggeriria que aquests casos hipermutats estan constituïts per un subgrup diferent de cèl·lules que haurien passat pel centre germinal, clàssicament el lloc fisiològic on els gens de les immunoglobulines pateixen hipermutació somàtica. A més a més, i més interessant encara, es va descriure el fet de que els pacients sense hipermutacions a IgV_H tenen una major probabilitat de presentar un estat avançat de la malaltia, exhibir característiques citogenètiques desfavorables, necessitar tractament més aviat i tenir una supervivència més curta¹¹⁴.

Aquesta separació biològica i pronòstica basada en l'estat mutacional de IgV_H suggeriria que la LLC podria tractar-se en realitat de dues malalties diferents,

una amb un origen pre-germinal i amb un pronòstic desfavorable i una altra amb un origen post-germinal que presentaria un pronòstic més favorable.

Posteriorment, els anàlisis de perfils d'expressió gènica van demostrar que, entre més de dotze mil gens analitzats, només uns trenta s'expressen de manera diferencial entre els dos subtipus de LLC, fet que anava en contra de la teoria de que la LLC en realitat es tractava de dues malalties diferents¹¹⁵. A més a més, es van comparar els perfils d'expressió gènica de la LLC amb els de diferents subpoblacions de limfòcits B normals, entre elles els limfòcits B CD5 positius, i es va arribar a la conclusió de que, en termes d'expressió gènica, la subpoblació que més s'assembla a la LLC, independentment de l'estat mutacional del gen de les immunoglobulines, són els limfòcits B memòria.

Malgrat que els perfils d'expressió gènica mostraven un perfil únic i homogeni en tots els casos de LLC analitzats, entre els pocs gens que s'expressaven de manera diferencial entre les LLC amb IgV_H mutat (també anomenades LLC mutades) i les no mutades es trobaven molts que són induïts en l'activació del limfòcit B per contacte amb antígen, la majoria dels quals es trobaven sobreexpressats en els casos no mutats, i d'altres gens amb significat funcional als limfòcits B de LLC encara per dilucidar, com el gen *zap-70*, el gen *lpl* (*lipoprotein lipase*) i el gen *distrofina*¹¹⁶.

Recentment s'han introduït noves teories en quant a l'origen fisiològic de les hipermutacions somàtiques en els gens de les immunoglobulines que es troben

als limfòcits B memòria normals. A la zona marginal de la melsa trobem diferents classes de limfòcits B. Tots comparteixen immunofenotip i es poden caracteritzar per l'expressió de CD19, CD21 i CD38. Aquesta població de limfòcits B està composta tant per limfòcits amb signes de hipermutació somàtica com per limfòcits B amb els gens de les immunoglobulines en la seva forma original present a la línia germinal. Actualment existeix debat sobre si aquests limfòcits mutats són limfòcits B memòria que han passat pel centre germinal però que resideixen en aquesta zona o si, pel contrari, aquests limfòcits representen un nou camí de diversificació de les immunoglobulines fora del centre germinal. Les evidències experimentals apunten cada cop més a que els limfòcits B amb hipermutació somàtica però que no han patit canvi de classe de cadena pesada s'han diversificat a la melsa sense necessitat de la formació de centres germinals, mentre que aquells que han patit canvi de classe de cadena pesada són els autèntics limfòcits B memòria producte de la reacció clàssica del centre germinal i que resideixen en aquesta zona anatòmica. Tot i que amb orígens de desenvolupament distants, tots aquests limfòcits de la zona marginal comparteixen una mateixa funció: la de respondre ràpidament davant antígens sanguinis mitjançant una ràpida proliferació i diferenciació en cèl·lules plasmàtiques secretores d'anticossos.

Les característiques compartides entre aquesta població limfocitària i les cèl·lules de LLC suggereixen un possible origen de la malaltia en els limfòcits B de la zona marginal ja que, de la mateixa forma que les LLC, aquests limfòcits normals poden presentar els gens de les immunoglobulines en estat germinal o

amb signes de hipermutació somàtica, la majoria expressen el marcador de limfòcit B memòria CD27 i no han fet canvi de classe de cadena pesada. A més, el fet de que en la LLC no es trobi cap translocació o mutació comú producte d'errors durant els processos de hipermutació somàtica i canvi de classe de cadena pesada suggereix que la LLC s'originaria en un limfòcit on aquests mecanismes d'edició del DNA es troben desactivats, com és el cas tant dels limfòcits B de la zona marginal com dels limfòcits B memòria producte de la reacció clàssica del centre germinal.

2.2.2 Anomalies cromosòmiques

Al contrari del que succeeix en la majoria de les síndromes limfoproliferatives B, en la LLC no es coneix cap anomalia genètica comuna a tots els malalts que es pugui relacionar amb la fisiopatologia d'aquesta malaltia. Malgrat això, aproximadament en el vuitanta per cent dels casos es troben anomalies cromosòmiques¹¹⁷, algunes de les quals són adquirides durant el curs de la malaltia¹¹⁸.

L'anomalia més freqüent és la delecció de la banda 13q14, situada al braç llarg del cromosoma 13, la qual es troba aproximadament en la meitat dels malalts i està relacionada amb un bon pronòstic de la malaltia. En aquesta regió s'ha hipotetitzat l'existència d'algun gen supressor de tumors, ja que s'ha descrit que aquesta delecció afecta també a d'altres tipus de tumors¹¹⁹⁻¹²⁹. Actualment,

però, tot i que s'han identificat diversos gens i pseudogens a la banda 13q14, encara no s'ha relacionat cap d'aquests gens directament amb la fisiopatologia de la malaltia^{127,130-133}.

La següent alteració més freqüent és la delecció de 11q22.3, la qual afecta a un vint per cent aproximadament dels malalts¹¹⁷. En aquesta regió cromosòmica es troba el gen supressor de tumors *atm* (*ataxia-telangiectasia mutated*), i en una proporció variable de malalts amb aquesta anomalia l'expressió del gen es troba alterada. La proteïna ATM està directament relacionada amb els processos de reparació del DNA i amb la regulació dels punts de control del cicle cel·lular, en resposta a diferents estímuls de dany cel·lular, com el bloqueig de la replicació del material genètic, el trencament de la doble hèlix del DNA, així com els danys provocats per radiacions ionitzants^{134,135}. És probablement per l'afectació directa de la funció d'aquesta proteïna que aquesta anomalia està relacionada amb una pitjor supervivència dels malalts.

En aproximadament un setze per cent dels malalts trobem trisomia del cromosoma 12¹¹⁷. El pronòstic associat a la presència d'aquesta anomalia és una supervivència menor a la que trobem en els casos que presenten com a única alteració la delecció de 13q14^{117,136,137}. Estudis d'expressió gènica per microarrays demostren que diversos gens localitzats al cromosoma 12 es troben efectivament sobreexpressats en les cèl·lules dels malalts que presenten aquesta alteració, encara que no s'ha relacionat cap en concret amb el pronòstic diferencial que presenten aquests casos¹³⁸.

Finalment, en aproximadament un set per cent dels malalts trobem delecció de 17p13.1, banda del cromosoma 17 a la qual es troba un important gen supressor de tumors, el gen que codifica per la proteïna P53. La proteïna P53 té un paper central en la regulació de la reparació del DNA, en la progressió del cicle cel·lular i en l'apoptosi davant agressions externes o situacions d'estrès intracel·lular^{139,140}. Els malalts amb aquesta alteració tenen molt mal pronòstic i, de mateixa manera que passa amb els malalts amb delecció de 11q, acostumen a presentar estadis avançats de la malaltia i un curt temps fins a la progressió de la malaltia¹¹⁷.

Altres alteracions es troben en freqüències molt baixes, com per exemple les translocacions que afecten a la banda 14q32, la trisomia de 3q, la delecció de 6q o la trisomia de 8q.

2.2.3 Factors pronòstic

Actualment es considera la LLC com una única entitat clínica amb un origen cel·lular o mecanisme de transformació neoplàsica comú, tot i que encara desconegut; no obstant això, el curs clínic de la malaltia és molt variable. La mitjana de supervivència dels malalts és aproximadament de deu anys, però el pronòstic individual dels pacients és extremadament variable, amb un rang de supervivència que pot anar des de solament uns mesos fins a una esperança de vida normal^{114,116,141}. Això es tradueix en que alguns pacients tenen un pronòstic

molt desfavorable i necessiten tractaments primerencs i d'altres pacients tenen un pronòstic excel·lent i no precisen mai tractament.

Diversos factors clínics i biològics avaluables en el moment de diagnosticar la malaltia contribueixen a conèixer amb antelació quin serà el curs més probable de la malaltia. Entre aquests factors s'han descrit variables clàssiques com els sistemes d'estadiatge clínic, i noves variables de caràcter biològic com les alteracions cromosòmiques, l'estat mutacional del segment V_H del domini variable de la cadena pesada de les immunoglobulines i l'expressió del marcador de superfície cel·lular CD38. La classificació d'aquests paràmetres pronòstic es resumeix a la taula 4.

	Risc baix	Risc elevat
Factor pronòstic		
Estadi clínic: Binet	A	B, C
Estadi clínic: Rai	I	II-IV
Nombre de limfòcits perifèrics	baix	alt
Infiltració al moll de l'ós	baixa	difusa
Morfologia cel·lular	típica	atípica
Temps de duplicació limfocitària	> 12 mesos	< 12 mesos
Anomalies cromosòmiques	cap, del13q	+12, del17p, del11q
Marcadors sèrics	normal	alts
CD38	< 30 %	> 30 %
Estat mutacional de IgV _H	mutat	no mutat

Taula 4. Resum dels principals factors pronòstic en la leucèmia limfàtica crònica.

2.2.3.1 Sistemes d'estadiatge clínic

Els sistemes d'estadiatge clínic establerts per Rai i Binet^{142,143} als anys 1975 i 1981 respectivament, són actualment els paràmetres més utilitzats en el maneig de la LLC per avaluar el pronòstic dels malalts en el moment del diagnòstic. No

obstant això, les variables que formen part d'aquests índexs tenen una sèrie de limitacions ja que trobem variabilitat pronòstic dins un mateix estadi clínic i no són prou acurades a l'hora de identificar formes indolents o agressives de la malaltia. Per aquests motius, des que es van introduir els sistemes d'estadiatge s'ha treballat en la recerca de nous factors amb l'objectiu d'afegir poder pronòstic als estadis clínics. Per la seva transcendència, a més de les alteracions cromosòmiques anteriorment detallades, es descriurà el valor pronòstic dels sistemes d'estadiatge clínic, les mutacions de les immunoglobulines i l'expressió del marcador de superfície cel·lular CD38.

2.2.3.2 Estat mutacional de les immunoglobulines

Un dels paràmetres biològics emprat amb més interès en l'actualitat per a avaluar el pronòstic dels malalts amb LLC és l'anàlisi de l'estat mutacional del segment V_H del domini variable de la cadena pesada de les immunoglobulines (a partir d'ara referit com estat mutacional de IgV_H o estat mutacional de les immunoglobulines)(Figura 7). Com s'ha demostrat en diferents estudis, els pacients sense mutacions a IgV_H (definit per un percentatge de canvis inferior al dos per cent) tenen major probabilitat de presentar un estadi avançat de la malaltia, mostrar característiques citogenètiques desfavorables, necessitar tractament més ràpidament, i tenir una supervivència més curta. De forma interessant, aquest valor pronòstic de l'estat mutacional de les immunoglobulines és independent de l'estadi clínic^{113,114}. Malauradament l'anàlisi mutacional de

IgV_H és un procediment que no es troba a l'abast de la majoria dels laboratoris que diagnostiquen aquesta malaltia, ja que es tracta un mètode complex que implica un procés llarg i costós. Per aquests motius, una de les prioritats en la recerca de la LLC és identificar factors fàcilment avaluable que permetin predir l'estat mutacional de les immunoglobulines.

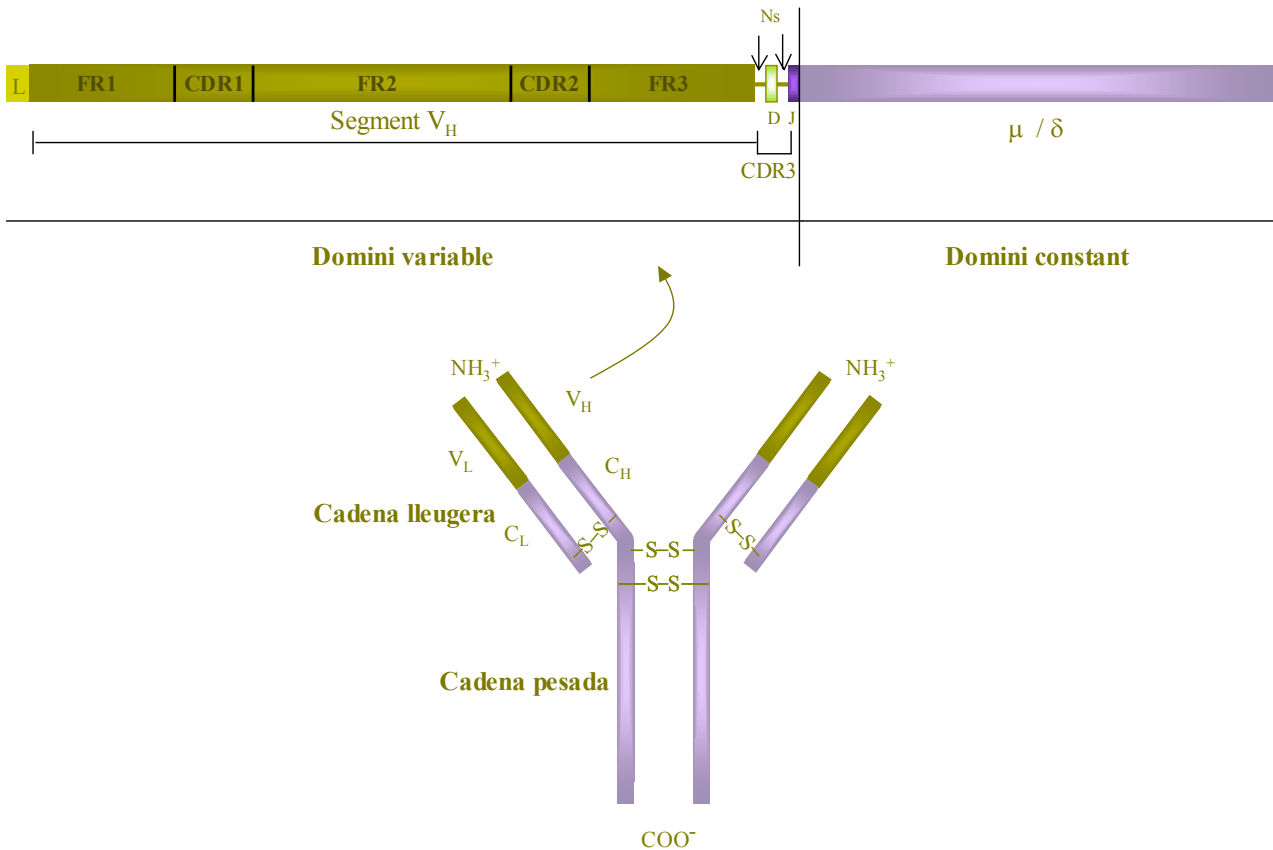


Figura 7. Definició de hipermutació de les immunoglobulines en el pronòstic de la LLC. Per a determinar l'estat mutacional de les immunoglobulines com a factor pronòstic es compara la seqüència del segment V_H del domini variable de la cadena pesada de la immunoglobulina expressada per les cèl·lules de LLC amb la seqüència de la línia germinal. Es consideren mutats els casos amb un percentatge d'homologia amb la línia germinal menor al noranta-vuit per cent. Ns: nucleòtids addicionals; S-S: ponts disulfur; NH₃⁺: grup amino-terminal; COO⁻: grup carboxi-terminal.

2.2.3.3 Expressió del CD38

Un dels principals marcadors proposats com a indicador de l'estat mutacional de les immunoglobulines és l'expressió de la molècula de superfície cel·lular CD38. El CD38 és una glicoproteïna transmembrana que es troba altament expressada a la superfície dels limfòcits pro-B, un dels primers estadis del desenvolupament dels limfòcits B. L'expressió del CD38 decreix de manera dràstica a mesura que avança la maduració limfocitària. Un cop els limfòcits B són activats per l'antígen, l'expressió del CD38 torna a ser molt intensa, així doncs trobem expressió del CD38 tant en centroblastes com en centròcits del centre germinal; de igual manera, tant els limfòcits B de la zona marginal¹⁴⁴ com les cèl·lules plasmàtiques expressen CD38¹⁴⁵. Aquesta molècula està implicada en la regulació del creixement cel·lular i la diferenciació en diferents estadis del desenvolupament. Els senyals provinents del CD38 en limfòcits pro-B inhibeixen el creixement cel·lular i indueixen apoptosi¹⁴⁶, mentre que, per contra, la lligació del CD38 en limfòcits B madurs té efectes estimuladors i de prevenció de l'apoptosi⁹¹.

Inicialment es va descriure que l'expressió de CD38 (mesurada per citometria de fluxe) en un percentatge de cèl·lules de LLC major o igual al trenta per cent es correlacionava amb l'absència de mutacions a IgV_H¹⁴⁷. No obstant això, aquesta correlació ha estat objecte de posterior controvèrsia i, a més a més, s'ha descrit la variació del nivell d'expressió de CD38 al llarg de l'evolució de la malaltia¹⁴⁸. De totes maneres, és important destacar que el CD38 és un factor

pronòstic per ell mateix, independent de l'estat mutacional de les immunoglobulines¹⁴⁹.

2.3 Leucèmia/limfoma Aguda Limfoblàstica B

La leucèmia aguda limfoblàstica B (LAL-B) és una neoplàsia caracteritzada per l'expansió clonal i acumulació de progenitors de limfòcits B bloquejats a diferents estadis de maduració. Els limfòcits B neoplàsics s'acumulen sobretot en el moll de l'ós i, en la majoria dels casos, també a la sang perifèrica¹⁵⁰. Clínicament, es considera que la LAL-B és una malaltia bastant heterogènia en termes d'anomalies genètiques, resposta al tractament i pronòstic. Les noves tècniques de detecció d'anomalies cromosòmiques i d'obtenció de perfils d'expressió gènica, permeten una acurada definició dels diferents subgrups moleculars de LAL-B, fet que comporta que es puguin optimitzar les estratègies terapèutiques en funció del risc de cada subtipus de malaltia per tal d'aconseguir un major èxit en la curació. La LAL-B és la neoplàsia més comú durant la infantesa, mentre que la seva freqüència en adults és molt més baixa; de igual manera, tot i que els mecanismes generals d'inducció de la malaltia són els mateixos, les freqüències de les diferents alteracions genètiques són diferents entre adults i nens¹⁵¹⁻¹⁵⁴.

2.3.1 Patogènesi

Els mecanismes descrits que poden provocar una transformació de progenitors de limfòcits B induint l'aparició de la LAL-B són diversos: expressió aberrant de proto-oncogens, expressió de proteïnes de fusió (proteïnes quinases

constitutivament actives o factors de transcripció amb noves funcions) causades per translocacions, o hiperdiploidies. Totes aquestes alteracions provoquen disfuncions cel·lulars que desemboquen en modificacions de processos molt finalment regulats durant el desenvolupament limfocitari; això finalment condueixen a l'adquisició d'una capacitat il·limitada de proliferació, bloqueig del desenvolupament i resistència a la apoptosi¹⁵⁵.

2.3.2 Origen cel·lular i classificació immunofenotípica

Els limfòcits B de la LAL-B es caracteritzen per presentar immunofenotips que es corresponen a diferents estadis discrets del desenvolupament del limfòcits B, fet que suggereix que l'origen cel·lular d'aquesta malaltia es troba en progenitors de limfòcits B bloquejats en diferents moments del seu desenvolupament. Aquests estadis de maduració es poden definir per l'expressió de diversos marcadors de superfície cel·lular de diferenciació. Seguint aquest criteri, les LAL-B es classifiquen en funció de l'expressió de diferents proteïnes que corresponen a diferents estadis de maduració o de diferenciació dels limfòcits B¹⁵⁶. El llinatge B de la malaltia ve definit per l'expressió d'almenys dos dels següents marcadors de limfòcits B primerencs: CD19, CD79a (Ig α) i CD22. Un cop classificada la LAL com de llinatge B, es defineixen quatre categories en funció del grau de diferenciació¹⁵⁷:

- LAL pro-B (BI): no expressa cap altre marcador de diferenciació.
- LAL-B comú (BII): CD10 positiu.

- LAL pre-B (BIII): IgM citoplasmàtica positiva.
- LAL-B madura (BIV): cadena lleugera kappa o lambda positiva (citoplasmàtica o de superfície).

2.3.3 Factors pronòstic

Existeixen múltiples variables que poden afectar al pronòstic dels malalts amb LAL-B. La variabilitat en el pronòstic dels diferents subtipus de LAL-B es pot atribuir majoritàriament a diferències en la sensibilitat als tractaments quimioteràpics associades a les anormalitats genètiques específiques¹⁵⁸.

L'edat és un dels factors que més influeix en el pronòstic de la malaltia en alguns subtipus de LAL-B, les diferències observades poden ser degudes a esdeveniments genètics secundaris, a l'estat maduratiu dels limfòcits afectats i a característiques farmacocinètiques dels pacients que varien en funció de l'edat.

Diferents característiques clíniques com el nombre de limfòcits en sang perifèrica, el sexe i el temps de resposta al tractament s'utilitzen també per a predir el curs clínic de la malaltia. Altres factors són els relacionats amb la farmacodinàmica i farmacogenètica de cada malalt i els recentment introduïts patrons o perfils d'expressió gènica.

Menció apart mereixen les alteracions genètiques i anomalies cromosòmiques, sovint relacionades també amb els mecanismes de patogènesi de la malaltia. A la taula 3 es mostra un resum de les principals anomalies genètiques que trobem tant en adults com en nens associades a la seva rellevància pronòstica.

Un cop diagnosticada i classificada la LAL-B i escollit el règim terapèutic més adequat, la resposta al tractament és un dels indicadors més fiables de la probabilitat de recaiguda i, per tant, del pronòstic de la malaltia. En aquest sentit, la determinació de la malaltia mínima residual confereix uns nivells de sensibilitat i especificitat molt elevats que permeten establir acuradament el risc de recaiguda després del tractament¹⁵⁹.

Anomalia	Adults		Nens	
	Freqüència (%)	Pronòstic	Freqüència (%)	Pronòstic
Cap	15-36	intermig-bo	31-40	intermig-bo
Hiperdiploidia elevada (>50 cr)	2-11	bo	23-26	bo
Hiperdiploidia baixa	10-15	bo	10-11	intermig
Pseudodiploidia	31-50	dolent	18-26	intermig
Hipodiploidia	4-9	dolent	6	45 cr: intermig <45 cr: dolent
t(9;22)(q34;q11,2) (<i>bcr-abl</i>)	11-29	dolent	2-6	dolent
	37 per RT-PCR			
t(4;11)(q21;q23) (<i>mll-af4</i>)	3-7	dolent	2	dolent
t(1;19)(q21;q23) (<i>pbx1-e2a</i>)	2-3	per definir	4-5	excel·lent
t(12;21)(p13;q22) (<i>tel-aml1</i>)	0-3	desconegut	20-25	bo
9p (<i>cdk1/p16INK4a/p14ARF i P15INK4b</i>)	6-30	intermig	7-11	advers

Taula 3. Principals anomalies genètiques en pacients amb LAL-B, indicant les freqüències i pronòstics relacionats. cr: cromosomes. Taula adaptada de Han X. Et al. *Annals of Diagnostic Pathology* 9 (2005)¹⁶⁰

2.3.4 Alteracions genètiques

Les alteracions que es troben més sovint en la LAL-B són les causades per translocacions cromosòmiques, les quals inclouen sobreexpressió de proto-oncogens, codificació per proteïnes tirosines quinases constitutivament actives i alteracions de factors de transcripció. Es considera que aquestes alteracions estan íntimament relacionades amb la patogènesi de la malaltia i que poden, per elles mateixes, ser les causants primàries de la malaltia. Altre tipus d'alteracions, com les mutacions que afecten al gen *ptpn11* (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*), es consideren també alteracions genètiques primàries. En un grup apart, es descriuran les anomenades mutacions cooperatives, les quals es creu cooperen amb les alteracions primàries en el desenvolupament de la malaltia, ja que afecten a gens relacionats amb el control del cicle cel·lular, la proliferació i la supervivència, però no es troben com a única alteració.

2.3.4.1 Alteracions primàries

- Mutacions del gen *ptpn11*:

El gen *ptpn11*, situat al braç llarg del cromosoma 12, a la banda 24 (12q24) codifica per la proteïna fosfatasa SHP2 (*SH2 containing protein tyrosine phosphatase 2*), la qual està implicada en la generació de senyals a través de la via de les MAP-quinases (MAP: *mitogen-associated-protein*), via que, en condicions normals, s'activa en resposta a diferents factors de creixement en els precursors de limfòcits B¹⁶¹. Aproximadament en un vuit per cent dels casos de

LAL-B pediàtrica trobem mutacions somàtiques en el gen *ptpn11* que provoquen la transcripció d'una proteïna constitutivament activa¹⁶². Aquesta activació permanent resulta en la pèrdua de regulació de la resposta als factors de creixement per part dels precursors de limfòcits B.

- Gen de fusió *bcr-abl*:

La translocació recíproca t(9;22)(q34;q11.2) provoca la formació de l'anomenat cromosoma Filadèlfia i la transcripció de l'oncogen de fusió *bcr-abl*. Aquest oncogen és el resultat de la fusió de la porció 5' del gen *bcr* (*breakpoint cluster region*) amb la porció 3' del gen *abl* (*Abelson*). La proteïna ABL és una proteïna tirosina quinasa sotmesa a una fina regulació que controla processos molt diversos com la reorganització de citoesquelet, la diferenciació i l'apoptosi induïda per danys al DNA. La proteïna de fusió BCR-ABL presenta activitat quinasa constitutiva i elevada. Aquest fet provoca que s'activin diferents vies de senyalització, tot i que l'efecte més important es produeix a través de l'activació de la proteïna PI3K (*phosphoinositid 3-kinase*)¹⁶³. La proteïna PI3K controla una via implicada en la regulació de processos cel·lulars centrals com la supervivència, la proliferació, la diferenciació i el metabolisme que es troba alterada en nombroses neoplàsies humanes, ja que PI3K s'expressa i actua en molts tipus cel·lulars diferents. En leucèmies la seva activació té efectes mitogènics i antiapoptòtics¹⁶⁴. Aquesta alteració, amb una freqüència de l'onze al trenta per cent, és la més comuna en la LAL-B d'adults¹⁶⁵.

- Factors de transcripció quimèrics:

La formació de factors de transcripció quimèrics és un mecanisme patogènic molt recurrent en la LAL-B i en d'altres tipus de leucèmies. Les diferents cascades transcripcionals activades pels factors de fusió convergeixen en la modificació dels patrons normals d'expressió dels gens de la família Homeobox (família HOX), els quals codifiquen per factors de transcripció encarregats dels processos de regulació de la diferenciació cel·lular, tant en el desenvolupament embrionari, com en el desenvolupament del sistema hematopoiètic^{166,167}.

- Factor de transcripció TEL-AML1:

Fruit de la translocació t(12;21) (p13;q22). La regió 5' del factor de transcripció de la família ets (*E-26 transforming specific*) anomenat *tel* (*translocation ets leukemia*)¹⁶⁸ i la pràctica totalitat de la regió codificant del gen *aml1* (*acute myeloid leukemia 1*), el qual codifica també per a un altre factor de transcripció, es fusionen per a formar un factor de transcripció quimèric. El factor de transcripció TEL-AML1 resultant conté el domini d'interacció proteïna-proteïna del factor TEL i la regió d'unió al DNA i de regulació de la transcripció del factor AML1. Aquest últim factor és clau en la regulació de la formació de les cèl·lules mare hematopoiètiques, de la seva capacitat d'autorenovació i diferenciació. El factor de transcripció AML1 en condicions normals actua activant la transcripció de gens de la família HOX¹⁶⁹. El factor quimèric, pel contrari, provoca el reclutament de histona-deacetilases que fan que s'inhibeixi la transcripció dels gens normalment activats per AML1 al afavorir la desacetilació de les histones que

formen part de la estructura del DNA i, consegüent, el tancament de la estructura de la cromatina¹⁷⁰. Aquesta és l'anomalia més freqüent en LAL-B pediàtrica, ja que es troba en un trenta per cent dels malalts, pel contrari, només s'ha descrit en un percentatge molt baix de casos de LAL-B d'adults (entre l'u i el tres per cent)¹⁷¹. Els casos pediàtrics de LAL-B amb aquesta translocació acostumen a tenir bon pronòstic¹⁷².

- Translocacions en les que participa el gen *mll*:

En aproximadament un vuitanta per cent dels malalts pediàtrics amb LAL-B trobem translocacions que afecten al gen *mll* (*mixed-lineage leukemia*), situat a la banda 21 del braç llarg del cromosoma 4 (4q21). Aquestes translocacions provoquen la fusió de la regió amino-terminal de la proteïna MLL amb alguna de les quaranta possibles parelles descrites¹⁷³. La proteïna MLL està relacionada amb el desenvolupament limfocitari ja que manté l'expressió d'alguns membres de la família HOX. Les proteïnes de fusió resultat de la translocació presenten una activitat molt elevada, de manera que s'alteren els patrons normals d'expressió dels gens HOX que controlen l'autorenovació i creixement de les cèl·lules mare hematopoiètiques i dels progenitors de limfòcits B¹⁷⁴. La translocació més comuna és la t(4;11)(q21;q23), la qual dona lloc al gen de fusió *mll-af4* (*ALL1 fused gene from chromosome 4*); aquesta translocació representa el tipus d'anomalia que afecta al gen *mll* més comú en LAL-B pediàtrica, i està associada a un mal pronòstic¹⁷⁵.

- Factor de transcripció PBX1-E2A:

La proteïna PBX1 (*pre B-cell leukemia transcription factor 1*) és també un factor de transcripció implicat en la regulació dels gens HOX. Per la seva banda, el factor de transcripció E2A és un dels factors implicats en el compromís amb el llinatge B que es dona a l'inici del desenvolupament limfocitari B. També participa en la iniciació dels reordenaments dels gens de les immunoglobulines¹⁶. La translocació t(1;19) resulta en la formació del factor quimèric PBX1-E2A de manera que es veuen afectades tant la regulació dels gens HOX com l'expressió dels nombrosos gens regulats per E2A¹⁷⁶. Aquesta translocació es troba aproximadament en un sis per cent dels casos de LAL-B pediàtrica. Fins fa relativament poc temps estava associada a un pronòstic molt dolent tot i que, actualment, aquests pacients tenen un pronòstic molt més bo ja que responen de manera excel·lent als tractaments¹⁷⁷. En el cas dels adults, aquest reordenament es troba aproximadament en un tres per cent dels casos i el pronòstic encara no està ben definit ja que hi ha treballs publicats amb informacions contradictòries^{178,179}.

2.3.4.2 Mutacions cooperatives

Les diferents mutacions cooperatives que podem trobar a les LAL-B es considera que col·laboren amb les alteracions primàries descrites anteriorment en la patogènesi de la malaltia, ja que afecten a processos bàsics com la proliferació, la supervivència i el control del cicle cel·lular.

- Alteracions de la via de FLT3:

El receptor FLT3 (*fms-like tyrosine kinase 3*) es troba expressat en els progenitors hematopoiètics i juga un paper molt important en el seu desenvolupament. En el cas de les LAL-B amb reordenament del gen *mll* o amb hiperdiploidia de més de cinquanta cromosomes, sempre es troba aquesta via afectada, ja sigui per sobreexpressió del receptor, per secreció autocrina del lligant o per mutacions activadores del domini quinasa del receptor¹⁸⁰. Aquestes alteracions provoquen una senyalització continuada que contribueix al creixement dels limfòcits leucèmics.

- Mutacions que afecten a la via del retinoblastoma:

El paper principal de la proteïna del retinoblastoma és el control de l'entrada a la fase de síntesi (fase S) del cicle cel·lular¹⁸¹. Les alteracions directes de la proteïna del retinoblastoma són molt poc freqüents en aquest tipus de malaltia neoplàsica, mentre que, en una proporció una mica més elevada, trobem alteracions que afecten a dues proteïnes reguladores de la via de control de la proteïna del retinoblastoma: són les proteïnes P16^{INK4a} (*P16 inhibitor of kinase 4a*) i P15^{INK4b} (*P15 inhibitor of kinase 4b*)¹⁸². Aquestes dues proteïnes tenen funció inhibidora dels complexos CDK-ciclina (CDK: *cyclin dependent kinase*), els quals es formen en resposta a estímuls mitòtics. Aquests complexos són els encarregats de inactivar mitjançant fosforilació l'activitat de la proteïna del retinoblastoma. Quan aquests inhibidors es troben alterats, el control de la proteïna del retinoblastoma desapareix, així que es troba en estat hiperfosforilat de manera

que deixa de reprimir la transcripció dels gens necessaris per a la entrada en la fase S del cicle cel·lular per part dels factors de transcripció de la família E2F.

- Mutacions que afecten a la via de P53:

El gen *p53*, de igual manera que succeeix amb el gen que codifica per la proteïna del retinoblastoma, rarament es troba mutat en la LAL-B, però sí que trobem sovint alteracions que afecten a la seva via de regulació i actuació. La proteïna P53 és una proteïna supressora de tumors amb un paper crucial en l'aturada del cicle cel·lular o la inducció d'apoptosi davant la detecció de dany al DNA o d'altres tipus de situacions d'estrès. La proteïna P53 actua mitjançant l'activació de la transcripció d'inhibidors del cicle cel·lular, com la proteïna P21 i de factors proapoptòtics, com la proteïna BAX (*BCL2-associated X protein*)¹⁸³. Tres de les proteïnes de la via de P53 que trobem més sovint alterades en LAL-B són P14^{ARF} (P14, *alternative reading frame*), P21 i HDM2 (*murine double minute 2' gene*).

En el cas de P14^{ARF}, el seu paper és el de inhibir la proteïna HDM2, la qual ubiquitinitza la P53, fet que resulta en una ràpida degradació d'aquesta a través del proteasoma. En la LAL-B trobem freqüentment delecció o silenciament transcripcional de P14^{ARF}, de manera que HDM2 queda lliure per induir la degradació de P53¹⁸⁴. Contràriament, però amb un efecte equivalent, la proteïna HDM2 es troba sobreexpressada en aproximadament un cinquanta per cent dels casos de LAL-B. Seguint la mateixa línia d'alteració de la via de P53, també aproximadament en la meitat dels casos de LAL-B trobem silenciament del gen que

codifica per la proteïna P21, la transcripció del qual està directament regulada per P53¹⁸⁵.

En la LAL-B sovint trobem deleccions homozigòtiques de P16^{INK4a} i P14^{ARF}, ja que aquestes dues proteïnes són codificades al mateix locus cromosòmic i es generen per pautes de lectura del codi genètic alternatives. L'afectació d'aquestes dues proteïnes provoca desregulació simultània de la via de P53 i de la via del retinoblastoma, dos tipus d'alteracions que probablement cooperen en la patogènesi de la malaltia en aquells casos on trobem delecció d'aquest locus¹⁸⁶.

2.4 Limfoma de Burkitt

El limfoma de Burkitt és una neoplàsia agressiva derivada de limfòcits B de fenotip madur caracteritzada per una ràtio proliferativa ràpida i que sovint afecta a zones extraganglionars com el tracte gastrointestinal i el sistema nerviós central, encara que també es pot presentar en forma de leucèmia aguda^{187,188}. Existeixen dues variants morfològiques, el limfoma de Burkitt clàssic i el limfoma de Burkitt atípic¹⁰⁶, el qual té una morfologia intermèdia entre el limfoma de Burkitt i el limfoma B de cèl·lules grans difús, fet que fa que el grau de coincidència entre diferents patòlegs en el moment del diagnòstic pugui ser bastant baix. Les cèl·lules del limfoma de Burkitt són extremadament sensibles a la quimioteràpia; no obstant això, els tractaments actuals no permeten donar una bona resposta en aquells casos que presenten variables de mal pronòstic o en els casos en que es produeix una recaiguda després del tractament; és per aquest motiu que actualment es busquen noves teràpies dirigides cap a la regulació de marcadors biològics específics que pugin aportar una millora en aquest sentit.

2.4.1 Origen cel·lular

Els limfòcits neoplàsics del limfoma de Burkitt expressen immunoglobulines del tipus IgM a la membrana, amb restricció de cadena lleugera (tota la clona expressa la mateixa classe de cadena lleugera, ja sigui K o λ). L'immunofenotip d'una cèl·lula de limfoma de Burkitt es correspon a un limfòcit madur positiu per

a l'expressió dels marcadors de superfície cel·lular CD19, CD20, CD22 i CD79a (Ig α) i que no expressa els marcadors CD5, CD23¹⁸⁷.

Els limfòcits B del limfoma de Burkitt tenen morfologia i expressen proteïnes característiques dels limfòcits B madurs del centre germinal, com són el CD10 i el factor de transcripció BCL-6^{189,190}. A més a més, aquests limfòcits presenten signes de hipermutació somàtica de les immunoglobulines, el que indica que es tracta de limfòcits B madurs que han tingut contacte amb l'antigen i han madurat la seva afinitat per aquest. Tot aquest conjunt de característiques fan que actualment molts autors considerin que el limfoma de Burkitt deriva de limfòcits B provinents del centre germinal^{189,191}. No obstant això, la contrapartida normal que donaria origen al limfoma de Burkitt està encara per clarificar, i es postula que podria no ser la mateixa per les diferents variants de limfoma de Burkitt que més endavant es descriuen¹⁹². Basant-se en diferents estudis sobre els tipus de mutacions que afecten a les regions variables de les immunoglobulines, alguns autors suggereixen que la cèl·lula d'origen molt probablement es troba al centre germinal, mentre que d'altres consideren que la cèl·lula originària seria un limfòcit B memòria¹⁹³⁻¹⁹⁵.

2.4.2 Variants clínico-biològiques

Existeixen tres variants de limfoma de Burkitt, les quals es diferencien tant per diferents aspectes clínics i biològics com per la distribució geogràfica dels

afectats per la malaltia. Aquestes tres variants, però, comparteixen morfologia cel·lular i immunofenotip.

El primer tipus és el limfoma de Burkitt endèmic¹⁹⁶, el qual es presenta en edats infantils en regions africanes, en zones de Nova Guinea i en part del continent sud-america. Pràcticament la totalitat dels casos d'aquesta varietat estan infectats pel virus Epstein-Barr i presenten localitzacions anatòmiques particulars, com ara l'afectació mandibular.

El segon subgrup s'anomena limfoma de Burkitt esporàdic¹⁸⁸ i afecta majoritàriament a adults joves d'arreu del món. En funció de l'àrea geogràfica, però, es troba infecció pel virus Epstein-Barr en un percentatge que varia del deu al trenta per cent dels casos.

El tercer tipus són aquells limfomes de Burkitt relacionats amb el virus de la immunodeficiència humana (VIH)¹⁹⁷. En aquesta variant, l'associació amb el virus Epstein-Barr varia del vint-i-cinc al quaranta per cent dels casos aproximadament.

2.4.3 Anomalies cromosòmiques

Totes les variants de limfoma de Burkitt tenen en comú la translocació cromosòmica del proto-oncogen *c-myc*, el qual es troba situat a la banda q24 del

cromosoma 8, en juxtaposició al locus de la cadena pesada de les immunoglobulines a la banda q32 del cromosoma 14 en un vuitanta per cent dels casos, donant lloc a la translocació t(8;14)(q24;q32). El proto-oncogen *c-myc* es pot trobar també menys freqüentment en juxtaposició al locus de la cadena lleugera Ig_K a 2q11, donant lloc a la translocació t(2;8)(p11;q24) (en un quinze per cent dels casos) o al locus de Ig_λ a 22q11, originant la translocació t(8;22)(q24;q11), la qual es troba només en un cinc per cent dels casos^{198,199}. Aquesta translocació condueix a una sobreexpressió del factor de transcripció c-MYC, ja que tant el locus de la cadena pesada com els de la cadena lleugera són transcripcionalment actius en els limfòcits B madurs. Encara i això, tot i que la transcripció del gen *c-myc* és efectivament més elevada que la que trobem en limfòcits B madurs normals no activats, en alguns casos la magnitud de l'augment no és més gran que la que s'observa en limfòcits B en proliferació no maligna, com és el cas dels limfòcits B infectats pel virus Epstein-Barr. En limfòcits B normals derivats del centre germinal, tot i ser cèl·lules amb una elevada taxa de proliferació, no trobem expressió del gen *c-myc*²⁰⁰. D'acord amb això, en les cèl·lules del limfoma de Burkitt l'al·lel no translocat es troba inactiu, de manera que tota la proteïna c-MYC que hi ha és derivada de l'al·lel translocat²⁰¹.

En quant a la translocació més freqüent, la t(8;14)(q24;q32), s'han identificat diferents punts de tall, tant en el cromosoma 8 com en el cromosoma 14, que varien en funció de la variant clínic-biològica. Encara que no existeix una associació estricta, en la variant endèmica del limfoma de Burkitt, el punt de tall al cromosoma 8 normalment es troba a més de 100 kilobases en direcció 5'

del primer exó del gen *c-myc*, això juntament amb un trencament al cromosoma 14 en els segments d'unió (segments J) del gen *Ig_H* (cadena pesada de les immunoglobulines). Aquesta translocació resulta en la localització del promotor de *c-myc* (situat a l'exó 1) sota el control del element *enhancer* E μ del gen *Ig_H*²⁰²⁻²⁰⁵. Pel contrari, en els casos de limfoma de Burkitt esporàdic i associat a VIH, el punts de tall es troben habitualment entre els exons 1 i 2 del gen de *c-myc* (no afecta a la regió codificant del gen, que són els exons 2 i 3) i dins de la regió *switch* S μ del gen *Ig_H*²⁰²⁻²⁰⁶. En aquests casos, el *enhancer* E μ del gen *Ig_H* és eliminat durant la translocació, el que indica que d'altres elements reguladors d'aquest gen (com podria ser l'element E α) deuen ser els responsables de dirigir la transcripció de *c-myc*^{202,206}.

El reordenament del gen *c-myc* no és exclusiu del limfoma de Burkitt, ja que alteracions semblants que afecten a aquest gen es poden trobar també en altres malalties, com són els limfomes difusos de cèl·lules grans²⁰⁷, el mieloma múltiple²⁰⁸ i la leucèmia aguda limfoblàstica²⁰⁹.

2.4.4 Patogènesi

Les alteracions genètiques i epigenètiques de diversos gens de control del cicle i del creixement cel·lular que es troben al limfoma de Burkitt són diverses. Mentre que les translocacions que provoquen desregulació de *c-myc* són comunes

a tots els casos, d'altres alteracions es troben en percentatges variables i poden ser també responsables de l'evolució i progressió d'aquesta malaltia.

A més a més, la desregulació de l'expressió de *c-myc* afecta a un ampli ventall de proteïnes relacionades amb processos molt bàsics i altament regulats com són la regulació del cicle cel·lular, l'apoptosi, el creixement cel·lular, l'adhesió i la diferenciació, fet que fa difícil atribuir a una única alteració la patogènesi d'aquesta malaltia.

El gen *c-myc* i d'altres gens de control del cicle cel·lular

La proteïna c-MYC és un factor de transcripció de la família Myc, la qual es caracteritza per tenir dos dominis amino-terminals altament conservats anomenats Myc Box I i Myc Box II. La proteïna c-MYC interacciona amb el també factor de transcripció MAX formant heterodímers amb capacitat d'unió a unes regions del DNA anomenades *E-boxes*. D'aquesta forma els heterodímers MYC/MAX regulen la transcripció de diferents gens. D'entre els mecanismes cel·lulars en els que c-MYC està implicada destaquen el creixement cel·lular, mitjançant la regulació del pas de la fase G0 del cicle cel·lular a la fase G1, el metabolisme glicolític, la proliferació, la sensibilització a determinats senyals apoptòtics, l'adhesió i la diferenciació cel·lular^{210,211}. Tot i la importància de la regulació de l'expressió d'aquesta proteïna, encara es necessiten altres anomalies moleculars

que també afectin a la regulació del cicle cel·lular per a explicar la patogènesi d'aquesta malaltia²¹².

A més de les translocacions de *c-myc* que provoquen una sobreexpressió d'aquest factor de transcripció en tots els casos de limfoma de Burkitt, altres mutacions que afecten també a *c-myc* o a d'altres gens poden col·laborar en l'evolució i progressió d'aquesta malaltia. Els al·lels de *c-myc* translocats sovint presenten mutacions o delecions puntuals probablement pel fet de trobar-se situats al costat del locus de les immunoglobulines, el qual està sotmès a processos de hipermutació somàtica. La majoria de les mutacions es troben a l'exó 1 o a l'intró 1, on estan situats els elements reguladors de *c-myc*. La delecioó o mutació de varis elements reguladors negatius dins el gen de *c-myc* podrien estar implicades en afavorir encara més l'activitat transcripcional^{213,214}. També s'han descrit mutacions a la regió codificant (exons 2 i 3), les quals poden modificar la interacció de c-MYC amb proteïnes inhibidores de la seva funció o alterar la inducció de la seva degradació a través del proteasoma. En aquest sentit, la sobreexpressió de *c-myc* pot estar relacionada amb mutacions que afecten al residu treonina 58: amb aquesta mutació, la inducció de la ubiquitinització i posterior degradació de la proteïna c-MYC a través del sistema del proteasoma es veu fortament disminuïda, el que afavoreix la seva acumulació^{215,216}.

En quant a d'altres alteracions en gens directament implicats en el control del cicle cel·lular, com el gen *p53*, també s'ha descrit la presència de mutacions

puntuals^{217,218}. Altres tipus d'alteracions, com la regulació negativa de les proteïnes P16^{INK4a}, P15^{INK4b} o la DAPK-2 (*death associated protein kinase 2*) mitjançant la hipermetilació del DNA^{219,220}, poden contribuir també a la desregulació del cicle cel·lular present en les cèl·lules del limfoma de Burkitt.

El gen *bcl-6*

El gen *bcl-6* codifica per un factor repressor de la transcripció el qual es requereix per a la reacció del centre germinal i, per tant, s'expressa en tots els limfòcits B derivats del centre germinal, ja siguin normals o neoplàsics. La proteïna BCL-6 reprimeix la transcripció de gens involucrats en el control de l'activació dels limfòcits B, en la diferenciació i en l'apoptosi. La seva regulació negativa és necessària per a que els limfòcits B puguin abandonar el centre germinal i continuar amb el procés de diferenciació. En quant al cicle cel·lular, entre d'altres funcions, el factor de transcripció BCL-6 reprimeix les respostes d'aturada del cicle o apoptosi davant la ruptura de la doble cadena del DNA que té lloc durant els processos de hipermutació somàtica i canvi de classe de cadena pesada que afecten als gens de les immunoglobulines durant la reacció del centre germinal²²¹. Aquesta funció la du a terme mitjançant la repressió directa de la transcripció de *p53*²²² i la repressió indirecta de l'expressió de *p21*²²³.

El gen *bcl-6* es pot veure afectat per la presència de mutacions somàtiques puntuals a la zona 5' no codificant. Aquestes mutacions, però, es troben també

en condicions normals, ja que sembla que el mateix mecanisme d'hipermutació de les immunoglobulines afecta també a *bcl-6*²²⁴. En neoplàsies derivades de limfòcits B trobem predominància d'aquestes mutacions en els tumors derivats de limfòcits B del centre germinal o en tumors post-germinals. En el cas del limfoma de Burkitt, es troben mutacions en un quaranta-seixanta per cent dels casos^{225,226}. El significat funcional d'aquestes mutacions encara no està clarament definit, tot i que algunes podrien afectar a la seva regulació²²⁷.

Coexpressió de c-MYC i BCL-6

En el cas dels limfomes derivats de limfòcits B del centre germinal que expressin de manera aberrant c-MYC, trobem coexpressió d'aquesta proteïna (de manera ectòpica) i de BCL-6 (que ja s'expressa en els limfòcits B normals del centre germinal). En el limfoma de Burkitt, les translocacions del gen *c-myc* que provoquen la seva sobreexpressió afecten a la pràctica totalitat dels casos, així que aquests dos factors de transcripció es troben sempre coexpressats, fet que no es dona en condicions normals, ja que en els limfòcits B del centre germinal BCL-6 reprimeix activament l'expressió de *c-myc*. La translocació del gen *c-myc* impedeix el funcionament d'aquest mecanisme de regulació negativa. Recentment s'ha descrit que aquestes dues proteïnes, a més a més, interaccionen físicament formant un complex proteic que comporta un augment de l'activitat constitutiva d'ambdós factors mitjançant diversos mecanismes: en primer lloc, augmenta al doble la vida mitja de la proteïna c-MYC de manera depenent de la

presència de BCL-6. A més a més, la capacitat tant de c-MYC com de BCL-6 per a reprimir l'expressió de P21 es veu també augmentada. Finalment, la unió de c-MYC a BCL-6 provoca la inhibició de la inactivació funcional de BCL-6 mitjançant la seva acetilació per part de la proteïna P300, ja que c-MYC recluta la histona deacetilasa HDAC2 (*histone deacetylase 2*), la qual, en aquest cas, deacetila BCL-6, en lloc d'alterar l'estructura de la cromatina mitjançant la deacetilació d'histones²²⁸.

Infecció pel virus Epstein-Barr

La infecció pel virus Epstein-Barr es troba en un percentatge elevat de casos de limfoma de Burkitt, sobretot en la gran majoria dels casos de la variant endèmica. La contribució del virus a la patogènesi de la malaltia no està encara clarament definida. La infecció pel virus Epstein-Barr no és exclusiva del limfoma de Burkitt, ja que està relacionada també amb els limfomes post-trasplantament i amb molts casos de malaltia de Hodgkin. En principi es va postular que aquesta infecció havia de ser crucial per a la limfomagènesi, ja que la infecció d'aquest virus en limfòcits B normals en repòs fa que es transformin en línies cel·lulars limfoblastoides immortals²²⁹. Sorprenentment, però, el patró d'expressió de proteïnes víriques que trobem en aquestes cèl·lules immortalitzades és molt diferent al que trobem en els casos de malaltia de Hodgkin o de limfoma de Burkitt infectats pel virus. En aquests casos el patró d'expressió d'aquestes proteïnes és molt més restringit, de manera que moltes que són imprescindibles

per al procés de immortalització de limfòcits B normals es troben regulades negativament²³⁰. Aquest fet va fer plantejar-se la veritable contribució de la infecció pel virus Epstein-Barr a la limfomagènesi: per una banda es postula que podria tractar-se d'un fenomen iniciador, que crearia un conjunt de cèl·lules amb característiques semblants a les de les línies immortals que posteriorment adquiririen altres canvis que portarien a una malignització definitiva, lo qual comportaria la regulació negativa de les proteïnes víriques amb funcions redundants.

Recentment s'ha descrit que una gran majoria dels limfomes de Burkitt expressen la proteïna TCL1 (*T cell leukemia 1*)²³¹⁻²³³. La sobreexpressió de TCL1 en limfòcits B de ratolins els predisposa a desenvolupar tumors derivats de limfòcits B madurs, amb fenotips compatibles amb el limfoma de Burkitt, el limfoma B de cèl·lules grans difús o a la LLC, en alguns casos^{234,235}. La contribució de la proteïna TCL1 a la patogènesi de la malaltia està per dilucidar, però podem trobar explicacions en les seves funcions. La proteïna TCL1 s'uneix a la proteïna antiapoptòtica AKT (*protein kinase B*) i l'activa, de manera que es promou el creixement i la supervivència cel·lulars²³⁶. A més, en els limfòcits B, AKT està implicada en senyalització a través del BCR²³⁷. La proteïna TCL1, en aquelles cèl·lules de limfoma de Burkitt infectades pel virus Epstein-Barr, s'expressa de manera dependent de la seva presència²³⁸; aquest fenomen sembla indicar que la presència del virus evita la necessitat de l'existència d'altres alteracions genètiques o epigenètiques que condueixin a l'expressió de TCL1 en tots els limfomes de Burkitt, inclosos els negatius per la infecció per part del virus.

Contràriament al que s'ha observat en les cèl·lules de limfoma de Burkitt, l'expressió de la proteïna TCL1 en limfòcits B normals no és dependent de la infecció del virus Epstein-Barr^{231,239}. És per això que molt probablement els mecanismes d'expressió de TCL1 en el limfoma de Burkitt són diferents i això podria ser un esdeveniment crític i comú en la patogènesi dels limfomes de Burkitt, tant positius com negatius per la infecció del virus Epstein-Barr.

3. LA PROTEÏNA ZAP-70

La proteïna ZAP-70 és una tirosina quinasa de la família SYK/ZAP-70 expressada preferentment en limfòcits de llinatge T i NK. Aquesta és una de les primeres proteïnes implicades en els esdeveniments inicials de la senyalització a través del receptor de limfòcits T o TCR. L'estimulació d'aquest receptor resulta en l'activació de diverses cascades de senyalització que, finalment, determinen el destí cel·lular regulant processos com la supervivència, la proliferació, la diferenciació i la producció de citoquines²⁴⁰. Recentment s'ha descrit també la seva participació en la transducció de senyals provenint de quimioquines i citoquines²⁴¹⁻²⁴³.

3.1 Estructura del gen i de la proteïna

El gen *zap-70* es troba localitzat al braç llarg del cromosoma 2, a la banda q11.2. Consta de catorze exons i l'inici de transcripció està situat dins l'exó 3 (Figura 8). La zona promotora i els factors de transcripció que es poden unir a ella i regular l'expressió del gen no han estat encara identificats, tot i que s'han descrit zones de metilació de citosines relacionades amb els nivells d'expressió de la proteïna en diferents subpoblacions de limfòcits²⁴⁴.

La proteïna ZAP-70 es localitza preferentment en el citoplasma cel·lular dels limfòcits T en repòs i, al activar-se, s'acumula a la membrana plasmàtica²⁴⁵. S'ha descrit també la seva presència al nucli, tant en limfòcits en repòs com

activats, i la fosforilació de la fracció nuclear de la proteïna davant l'estímul del TCR, el que suggereix una funcionalitat al nucli encara desconeguda²⁴⁶.

La proteïna està composta per dos dominis SH2 (*Src homology 2*) d'unió a tirosines fosforilades situats en tàndem a l'extrem amino-terminal, un domini quinasa a l'extrem carboxi-terminal i dues zones intermèdies anomenades interdomini A i interdomini B²⁴⁷. Els dos dominis SH2, situats del residu 10 al 102 i del residu 162 al 254, s'uneixen a polipèptids que contenen fosfotirosines. L'especificitat per la proteïna d'unió ve donada per la interacció amb d'altres residus que són diferents de les tirosines fosforilades. El domini quinasa, que comprèn des del residu 338 al 593, és un domini catalític altament conservat amb capacitat d'unió amb ATP (*adenosin trifosfat*) i de fosforilació de residus tirosina. L'interdomini A, situat entre els dos dominis SH2 forma una estructura enrotllada que probablement acosta els dos dominis SH2 per a unir-se a fosfotirosines²⁴⁸. L'interdomini B, situat entre el domini SH2 carboxi-terminal i el domini quinasa, conté diversos motius senyalitzadors i tirosines fosforilables. La funció de la proteïna està alhora regulada per la fosforilació de diverses tirosines situades als diferents dominis, les quals permeten interaccions amb d'altres proteïnes o modificacions d'estructura interna (Figura 8):

- Tirosina 292: localitzada a l'interdomini B. La fosforilació d'aquest residu permet la unió de proteïnes reguladores negatives que inactiven l'activitat quinasa de la ZAP-70²⁴⁹.

- Tirosines 315 i 319: localitzades a l'interdomini B. Quan es fosforilen el domini quinasa queda lliure de manera que es permet l'activitat enzimàtica de la proteïna²⁵⁰⁻²⁵².
- Tirosines 492 i 493: la fosforilació d'aquests dos residus situats al domini quinasa es requereix per a la completa activació de l'activitat enzimàtica²⁵³.

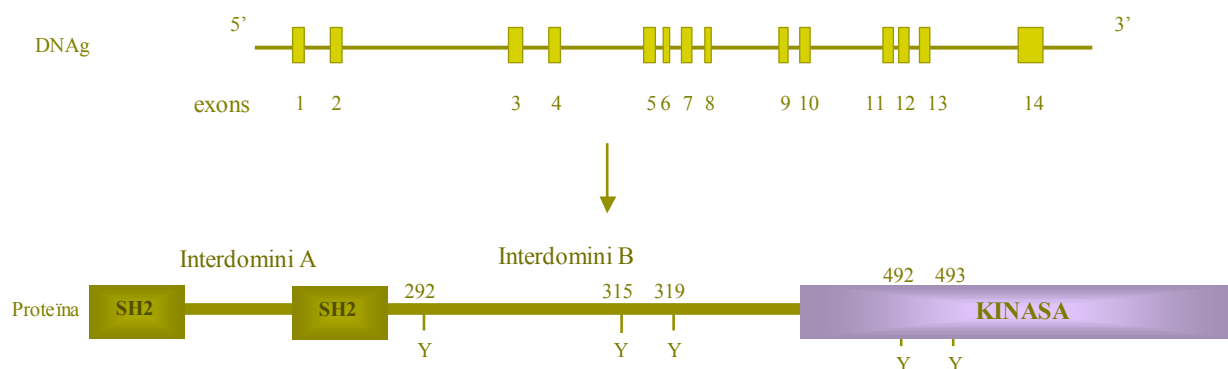


Figura 8. Esquema del gen i la proteïna ZAP-70. El gen zap-70 es troba localitzat al cromosoma 2 i consta de catorze exons que codifiquen per una proteïna tirosina quinasa amb dos dominis SH2 d'unió a tirosines fosforilades i un domini quinasa. Les diferents posicions (número d'aminoàcid) dels principals residus tirosina (Y) fosforilables que regulen la funció de la proteïna estan indicades. DNAg: DNA genòmic.

3.2 La proteïna ZAP-70 en la senyalització a través de TCR

El TCR té capacitat de reconeixement del conjunt format per un fragment d'antigen i la molècula MHC (*major histocompatibility complex*) que es troba a la superfície de les cèl·lules presentadores d'antigen. El receptor està format per dues cadenes polipeptídiques transmembrana de la superfamília de les immunoglobulines anomenades cadenes α i β unides covalentment. Al domini extracel·lular tenen una regió variable que constitueix el lloc d'unió de l'antigen mentre que el domini intracel·lular és molt curt i no té capacitat senyalitzadora. Associades al TCR com a estructura auxiliar que s'encarrega de transferir el senyal a l'interior de la cèl·lula, es troben el CD3 i les cadenes ζ . En la zona central del complex molecular hi ha les dues cadenes α i β associades al CD3. El CD3 està compost per les tres cadenes γ , δ i ϵ . Aquestes tres proteïnes pertanyen també a la superfamília de les immunoglobulines i es troben en forma d'heterodímers. Junt amb això s'associa un homodímer de cadenes ζ , polipèptid amb una llarga cua intracel·lular[□]. Els dominis citoplasmàtics de les proteïnes del CD3 i de les cadenes ζ contenen unes seqüències específiques d'aminoàcids anomenades motius d'activació de l'immunoreceptor via tirosina (ITAM, en anglès), que s'encarreguen d'iniciar la senyalització. Aquests dominis es fosforilen en resposta a l'estimulació del TCR, fet que permet la unió de proteïnes amb dominis SH2 i d'aquesta manera l'inici de la cascada de senyalització intracel·lular²⁵⁴.

L'activació dels limfòcits T a través de l'estimulació del TCR per part dels complexos antígen-MHC, és seguida per l'activació de les proteïnes de la família Src, com la LCK (*lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase*) i la FYN (*feline yes related protein*), les quals fosforilen els dominis ITAM de les cues citoplasmàtiques del CD3 i de les cadenes ζ . La proteïna ZAP-70 és reclutada als dominis ITAM fosforilats de les cadenes ζ a través dels seus dominis SH2, es fosforila i, al mateix temps, gràcies a la seva activitat quinasa, fosforila a d'altres proteïnes, entre elles les proteïnes adaptadores LAT i SLP-76. SLP-76 recluta proteïnes intercanviadores de nucleòtids de guanina, com VAV-1 (*vav és la sisena lletra de l'alfabet hebreu*) i NCK (*non-catalytic region of tyrosine kinase*), principalment relacionades amb reordenacions del citoesquelet d'actina. La proteïna adaptadora LAT interactua amb la PLC γ 1 i permet la seva activació mitjançant fosforilació. La funció enzimàtica d'aquesta proteïna comporta la hidròlisi del PIP2 de la membrana plasmàtica, el qual dóna lloc als missatgers secundaris DAG i IP3. El DAG activa la PKC i la via de les MAP-quinases, el que permet l'activació dels factors de transcripció NF-KB, els quals regulen diferents funcions efectores cel·lulars. El IP3 format provoca l'alliberació del calci del reticle endoplasmàtic així com l'entrada de calci extracel·lular, fet que fa augmentar la concentració de calci intracel·lular, amb la conseqüent activació de la calmodulina, la qual indueix l'activació del factor de transcripció NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), el qual activa la transcripció del gen de la interleukina IL-2, entre d'altres. Diversos mecanismes reguladors de retroalimentació que actuen a múltiples nivells d'aquestes vies i la integració de senyals provinents d'altres receptors, fa que un mateix estímul inicial del TCR

pugui resultar en funcions molt diferents en funció de factors com el tipus de limfòcit T i el microambient on es troba²⁵⁵⁻²⁵⁸.

Cal destacar que en els limfòcits B, la proteïna SYK té un paper anàleg en la senyalització a través del receptor de limfòcits B o BCR²⁵⁹. Aquesta proteïna té un cinquanta per cent d'homologia amb la ZAP-70 i una estructura funcional de dominis equivalent. En resposta a l'activació del BCR, SYK és reclutada a través dels seus dominis SH2 als dominis ITAM fosforilats de les cues citoplasmàtiques de les proteïnes Ig α (CD79a) i Ig β (CD79b) del complex del BCR. Subseqüentment s'uneixen proteïnes adaptadores com SLP-65 i s'activa la via de la PLC γ 2, la qual és funcionalment equivalent a la PLC γ 1. A diferència de la ZAP-70, la proteïna SYK no necessita ser fosforilada per quinases de la família Src per a ser activa i, a més a més, la seva activitat quinasa intrínseca és cent vegades superior a la de la ZAP-70. La proteïna SYK es troba en nivells baixos en els limfòcits T perifèrics, encara que es troben nivells d'expressió més elevats en d'altres subpoblacions de limfòcits T^{260,261}.

3.3 Malalties associades a ZAP-70

Diferents mutacions puntuals en la regió codificant de la proteïna ZAP-70, concretament als exons 3, 12 i 13, que causen manca d'expressió o manca de funcionalitat de la proteïna han estat descrites en humans. Aquestes mutacions són la causa de la manca de limfòcits CD8 positius perifèrics i de diferents variants de immunodeficiències combinades severes²⁶²⁻²⁶⁶. Aquests fets fan

destacar la importància de la proteïna ZAP-70 en el desenvolupament i funció dels limfòcits T.

3.4 Expressió i funció de ZAP-70 en el desenvolupament dels limfòcits B de ratolí

Durant el desenvolupament dels limfòcits B en ratolins, igual que succeeix en humans, el correcte ensamblaje i la senyalització a través del pre-BCR són necessaris per a la progressió des de l'estadi de limfòcit pro-B al següent estadi, el de limfòcit pre-B i per al procés de selecció positiva que pateixen els limfòcits pre-B, ja que en aquests limfòcits es comprova la funcionalitat de la cadena pesada de les immunoglobulines que forma part del pre-BCR mitjançant senyals de proliferació i supervivència²³⁻²⁵.

Sorprenentment, ja que la ZAP-70 havia estat sempre relacionada exclusivament amb el desenvolupament i senyalització dels limfòcits de llinatge T i NK, s'ha demostrat recentment en ratolins la participació, juntament amb la proteïna SYK, de la proteïna ZAP-70 en la transició madurativa des de l'estadi de limfòcit pro-B a l'estadi de limfòcit pre-B mitjançant la seva participació en la transducció de senyals a través del receptor pre-BCR. Els ratolins deficients en SYK mostren un bloqueig parcial de la diferenciació dels limfòcits B, mentre que els deficients en les dues proteïnes tirosina quinasa pateixen un bloqueig total del desenvolupament limfocitari B en aquest punt. En els limfòcits pro-B doblement

deficients per SYK i ZAP-70, la estimulació del pre-BCR no indueix diferenciació dels limfòcits, expansió proliferativa ni exclusió al·lèlica del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines, tots aquests senyals d'una ineficient senyalització a través d'aquest receptor³⁶.

De manera concordant, en aquest mateix treball, es descriu per primera vegada l'expressió de la proteïna ZAP-70 en poblacions de limfòcits B, ja que es va trobar expressada en limfòcits pro-B, en limfòcits pre-B i en limfòcits B de la melsa. Aquests últims limfòcits no estaven caracteritzats i, per tant no es coneix a quina subpoblació pertanyen; tot i això sembla que el més probable és que siguin els mateixos limfòcits pre-B en trànsit per la melsa. En totes aquestes subpoblacions de limfòcits B els nivells d'expressió de la proteïna ZAP-70 eren però considerablement menors als que es troben en limfòcits T normals³⁶.

Anteriorment a aquest descobriment, l'expressió d'altres components de la cascada de senyalització del pre-TCR/TCR, com les proteïnes adaptadores LAT i SLP-76, havia estat descrita en limfòcits pro/pre-B de ratolí i també de humans. Aquestes proteïnes probablement estarien actuant com a molècules senyalitzadores funcionalment redundants als components del pre-BCR per a permetre la màxima eficiència en la transducció de senyals en un moment crucial per a la generació de limfòcits B^{37,38}.

II. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS

HIPÒTESI DE TREBALL

La leucèmia limfàtica crònica és una neoplàsia de limfòcits B amb fenotip madur. L'heterogeneïtat clínica que presenta aquesta síndrome limfoproliferativa ha empès cap a la recerca de marcadors biològics que ens puguin indicar el pronòstic dels malalts. Quan es va descriure que, aproximadament el cinquanta per cent dels casos no presentaven hipermutacions al segment gènic V_H de la regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines o IgV_H i que, a més a més, això estava relacionat amb un pitjor pronòstic de la malaltia, es varen plantejar principalment dues qüestions.

La primera qüestió, en termes de fisiopatologia i origen cel·lular de la malaltia, era esbrinar si la LLC es tractava d'una sola malaltia independentment de l'estat mutacional de les immunoglobulines o, pel contrari, si aquells casos amb els gens IgV_H no mutats constituïen en realitat una malaltia diferent, amb un origen pre-germinal i amb un pitjor pronòstic.

L'altra qüestió que es va plantejar va ser, donat que l'absència de mutacions a IgV_H estava relacionada amb un pitjor pronòstic de la malaltia, si aquesta anàlisi es podia aplicar de manera rutinària com a part de les maniobres d'estudi inicial dels pacients amb LLC. Malauradament, aquesta és una anàlisi complexa i d'elevat cost en termes econòmics i de temps, amb poques possibilitats de ser aplicada en els centres que diagnostiquen habitualment aquesta malaltia.

En el moment de plantejar-nos la hipòtesi i el disseny experimental que permetrien portar a terme aquesta tesi doctoral, el debat sobre la existència de una o dues malalties dins la LLC i la recerca de marcadors indicadors de l'estat mutacional de les immunoglobulines de fàcil determinació estaven molt vius dins l'àmbit de la recerca biomèdica en la LLC arreu del món. En aquest sentit, dues publicacions sobre els perfils d'expressió gènica mitjançant microarrays varen transmetre dos missatges molt importants: que el perfil d'expressió gènica propi de la LLC era molt semblant al dels limfòcits B memòria normals i que no existien grans diferències entre els perfils d'expressió de les LLC amb IgV_H mutat i el de les LLC amb IgV_H no mutat. Entre els pocs gens diferencials destacava, però, el gen *zap-70*. Fins a aquell moment, l'expressió de la proteïna ZAP-70 es creia exclusiva dels limfòcits de llinatge T i NK; a més a més, aquest gen codificava per una proteïna tirosina quinasa amb un paper clau en el desenvolupament i funcionalitat d'aquests limfòcits.

Més endavant es va descriure que l'expressió de la proteïna ZAP-70 era imprescindible per al correcte desenvolupament dels limfòcits B en ratolins, ja que era necessària per a una completa activació dels senyals a través del pre-BCR en els limfòcits pre-B. Aquesta publicació representava el primer treball on es descrivia un paper funcional de la proteïna ZAP-70 en el desenvolupament dels limfòcits B normals.

Amb totes aquestes dades, ens vam plantejar la hipòtesi de que l'expressió de la proteïna ZAP-70 en LLC podria estar relacionada amb l'estat mutacional de les

immunoglobulines i, per tant, tindria valor pronòstic a la LLC. L'anàlisi rutinari de l'expressió de ZAP-70 per mètodes a l'abast dels laboratoris on es du a terme el diagnòstic, com la citometria de fluxe, podria substituir a l'anàlisi de l'estat mutacional de les immunoglobulines. Per altra banda, la proteïna ZAP-70 podria estar expressada en limfòcits pro/pre-B normals humans. D'aquesta manera, les leucèmies agudes limfoblàstiques-B amb fenotip pro/pre-B també podrien expressar ZAP-70, a més d'altres proteïnes relacionades amb el receptor pre-TCR/TCR, com a reflex del seu origen cel·lular.

OBJECTIUS

1. Determinar la correlació entre l'expressió de ZAP-70 i l'estat mutacional del segment gènic V_H de la regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines en la leucèmia limfàtica crònica.
 - 1.1. Posar a punt la detecció de la proteïna ZAP-70 per citometria de fluxe en cèl·lules de leucèmia limfàtica crònica criopreservades i en mostres de sang perifèrica dels malalts.
 - 1.2. Determinar el valor pronòstic de l'expressió de ZAP-70 analitzada per citometria de fluxe en la leucèmia limfàtica crònica.
2. Determinar l'expressió de ZAP-70 en limfòcits B normals, a diferents estadis del desenvolupament, i neoplàsies derivades dels mateixos.
 - 2.1. Determinar l'expressió de ZAP-70 en leucèmies agudes limfoblàstiques B: correlacionar amb estat de maduració i amb anomalies cromosòmiques.
 - 2.2. Determinar l'expressió i la funcionalitat d'altres elements del pre-TCR/TCR en leucèmies agudes limfoblàstiques B.

III. RESULTATS

CAPÍTOL 1

Expressió de ZAP-70 com a marcador de l'estat mutacional de la regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines en la leucèmia limfàtica crònica.

L'estat mutacional del segment V_H del domini variable de la cadena pesada de les immunoglobulines (IgV_H) a les cèl·lules de leucèmia limfàtica crònica (LLC) és un factor pronòstic molt important en aquesta malaltia. Malauradament, l'anàlisi rutinari d'aquest paràmetre, costós i llarg, no es troba actualment a l'abast de la majoria dels laboratoris que diagnostiquen aquest tipus de leucèmia. L'objectiu del present treball fou determinar si l'expressió de la proteïna ZAP-70 correlacionava amb l'estat mutacional de les immunoglobulines, la progressió de la malaltia i la supervivència dels malalts.

Es va analitzar l'expressió de la proteïna ZAP-70 en línies cel·lulars de llinatge T i B i en mostres de sang perifèrica de cinquanta-sis malalts de LLC mitjançant diferents mètodes: citometria de fluxe, Western blot i immunohistoquímica. Els resultats es varen correlacionar amb l'estat mutacional de les immunoglobulines i amb el curs clínic de la malaltia.

La proteïna ZAP-70 es va detectar mitjançant citometria de fluxe en limfòcits de llinatge T i en limfòcits B de LLC a trenta-dos dels cinquanta-sis pacients analitzats. En tots aquells pacients en els quals un mínim del vint per cent de les

cèl·lules leucèmiques expressaven ZAP-70, el gen de les immunoglobulines es trobava no mutat, mentre que es van trobar mutacions a IgV_H en vint-i-un de vint-i-quatre pacients en els quals menys del vint per cent de les cèl·lules leucèmiques eren positives per l'expressió de ZAP-70 ($P < 0.001$). Mitjançant l'anàlisi de l'expressió de la proteïna per immunohistoquímica o Western blot es varen obtenir resultats concordants. Es van analitzar mostres seqüencials de trenta pacients (mitjana de temps entre mostres: trenta-set mesos) i no es varen observar canvis en els nivells d'expressió de ZAP-70 al llarg del temps. Dins els pacients en estadi de Binet A, aquells amb una expressió de ZAP-70 superior o igual al vint per cent presentaven una progressió de la malaltia més ràpida i una pitjor supervivència que aquells amb una expressió de ZAP-70 en un percentatge de cèl·lules de LLC inferior al vint per cent.

Amb els resultats obtinguts, podem concloure que, entre els pacients de LLC, l'expressió de la proteïna ZAP-70 detectada per citometria de fluxe es correlaciona amb l'estat mutacional de les immunoglobulines, amb la progressió de la malaltia i amb la supervivència.

ORIGINAL ARTICLE

ZAP-70 Expression as a Surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia

Marta Crespo, B.S., Francesc Bosch, M.D., Neus Villamor, M.D., Beatriz Bellosillo, Ph.D., Dolors Colomer, Ph.D., María Rozman, M.D., Silvia Marcé, B.S., Armando López-Guillermo, M.D., Elies Campo, M.D., and EmiliMontserrat, M.D.

ABSTRACT

From the Department of Hematology (M.C., F.B., A.L.-G., E.M.) and the Hematopathology Unit (N.V., B.B., D.C., M.R., S.M., E.C.), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clínic, Barcelona, Spain. Address reprint requests to Dr. Bosch at the Department of Hematology, Hospital Clínic, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain, or at fbosch@clinic.ub.es.

Ms. Crespo and Drs. Bosch and Villamor contributed equally to the article.

N Engl J Med 2003;348:1764-75.
Copyright © 2003 Massachusetts Medical Society.

BACKGROUND

The mutational status of immunoglobulin heavy-chain variable-region (IgV_H) genes in the leukemic cells of chronic lymphocytic leukemia (CLL) is an important prognostic factor in the disease. We investigated whether the expression of ZAP-70 by CLL cells correlated with the IgV_H mutational status, disease progression, and survival.

METHODS

The expression of ZAP-70 was analyzed in T-cell and B-cell lines and in peripheral-blood samples from 56 patients with CLL with the use of flow cytometry, Western blotting, and immunohistochemistry. The results were correlated with the IgV_H mutational status and clinical outcome.

RESULTS

ZAP-70 was detected by flow-cytometric analysis in cells of T-cell lineage and in leukemic cells from 32 of 56 patients with CLL. In all patients in whom at least 20 percent of the leukemic cells were positive for ZAP-70, IgV_H was unmutated, whereas IgV_H mutations were found in 21 of 24 patients in whom less than 20 percent of the leukemic cells were positive for ZAP-70 ($P < 0.001$). Concordant results were obtained when ZAP-70 expression was assessed by immunohistochemistry or Western blotting. The level of ZAP-70 expression did not change over time (median, 37 months) in sequential samples from 30 patients with CLL. Patients with Binet stage A CLL who had at least 20 percent ZAP-70-positive leukemic cells had more rapid progression and poorer survival than those with less than 20 percent ZAP-70-positive cells.

CONCLUSIONS

Among patients with CLL, expression of ZAP-70, as detected by flow-cytometric analysis, correlated with IgV_H mutational status, disease progression, and survival.

THE STAGING SYSTEMS DEVELOPED BY Rai et al.¹ and Binet et al.² are standard methods of assessing prognosis in chronic lymphocytic leukemia (CLL). However, since these systems cannot identify stable or progressive forms of the disease, there has been a continual effort to identify other prognostic factors in CLL.³⁻⁶

About 50 to 70 percent of patients with CLL have evidence of somatic hypermutation in the immunoglobulin heavy-chain variable-region (*IgV_H*) genes of the leukemic cells.⁷⁻¹¹ These patients probably constitute a subgroup in whom the leukemic cells have passed through the germinal center, the site of *IgV_H* hypermutation.¹² It is important to note that patients with unmutated *IgV_H* genes usually have an advanced stage of CLL and unfavorable cytogenetic features, require therapy, and have a short survival. In contrast, patients with leukemic cells that have mutant *IgV_H* genes usually present in an early clinical stage, frequently have 13q14 chromosomal deletions, do not have alterations of p53, do not require therapy, and have a long survival.^{11,13,14} For these reasons, knowledge of the mutational status of *IgV_H* is of considerable value in assessing the prognosis in CLL. Most general laboratories, however, are unable to determine *IgV_H* sequences. Moreover, even when the technique is available, it is too costly and time consuming to include in the standard workup of CLL. These considerations have made finding a surrogate for *IgV_H* mutational status in CLL an important priority.

Investigations using DNA microarrays^{15,16} have shown that CLL cells exhibit a characteristic gene-expression profile in which the expression of a small subgroup of genes, including those encoding ZAP-70, IM1286077, and C-type lectin, correlates with the mutational status of *IgV_H* genes.^{16,17} ZAP-70, a member of the Syk-ZAP-70 protein tyrosine kinase family, is normally expressed in T cells and natural killer cells and has a critical role in the initiation of T-cell signaling.¹⁸⁻²² This finding led us to hypothesize that the expression of ZAP-70 could not only predict *IgV_H* mutational status but also serve as a prognostic factor in CLL. We therefore analyzed ZAP-70 protein in CLL cells from a series of patients using Western blotting, immunohistochemistry, and flow cytometry and correlated the results with the mutational status of the *IgV_H* genes and the clinical outcome.

METHODS

PATIENTS AND SAMPLE COLLECTION

Fifty-six patients who had received a diagnosis of CLL at our institution were selected on the basis of the availability of frozen samples for biologic studies. Lymph-node–biopsy specimens were available from eight patients. Progression was defined as a change to a more advanced clinical stage or the need for treatment. The time to progression and survival were calculated from the time of diagnosis. The median age was 60 years (range, 37 to 81), and the median duration of follow-up (from diagnosis) was 63 months.

Mononuclear cells from peripheral-blood samples were isolated on a Ficoll–Hypaque gradient (Seromed).²³ In three samples, CD19+ cells were isolated with use of anti-CD19 fluorescein isothiocyanate, followed by separation with anti-fluorescein isothiocyanate Microbeads (Miltenyi Biotec). Lymph-node–biopsy specimens from six additional patients who had received a diagnosis of mantle-cell lymphoma according to the criteria of the World Health Organization²⁴ were included in the analysis.

PREPARATION OF RNA, COMPLEMENTARY DNA, AND GENOMIC DNA

Total RNA was isolated with use of Ultraspec RNA (Biotecx Laboratories) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of RNA with the use of Moloney–murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies). High-molecular-weight DNA was extracted from mononuclear cells isolated on a Ficoll gradient with use of a salting-out procedure.²⁵

AMPLIFICATION OF *IgV_H* GENES

We amplified cDNA using a set of six heavy-chain variable-region (*V_H*) family-specific primers (*V_H*1 through *V_H*6) that anneal to sequences in the leader region²⁶ along with primers complementary to the constant region (*IgM* and *IgG*).⁷ When amplification with these primers failed, an alternative set of primers specific to framework I region and the heavy-chain joining (*J_H*) region was used.²⁷ For the amplification of genomic DNA, approximately 100 ng of DNA was used in a total volume of 50 µl.¹¹

IgV_H MUTATIONAL STATUS

Polymerase-chain-reaction (PCR) products were purified either directly with use of the Concert rap-

id PCR purification system (GIBCO BRL), or by gel excision with use of the QIAEX II agarose-gel extraction kit (Qiagen). Products were directly sequenced from both strands with use of the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (versions 2.0 and 3.0, Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Sequencing analysis and alignments were performed with use of DNAPLOT software and the VBASE data library.²⁸ Samples in which fewer than 2 percent of base pairs differed from those of the consensus sequence were considered unmutated.⁸

WESTERN BLOTTING

Western blotting of cell lysates was carried out as previously described.²³ Cell lysates from the following cell lines were also included: Jurkat (a T-cell line derived from lymphoblastic lymphoma), JVM-2 (B-cell prolymphocytic leukemia), Granta 519 and REC (mantle-cell lymphoma), DHL-16 and DOHH-2 (follicular lymphoma), Ly1.2 and Ly3 (diffuse large-B-cell lymphoma), and Namalwa, Raji, Daudi, and Ramos (Burkitt's lymphoma). Blots were incubated with anti-ZAP-70 antibody (Upstate Biotechnology) and anti- α -tubulin (Calbiochem). Lysates from Jurkat cells, a T-cell line with a high level of expression of ZAP-70 protein,¹⁸ were used as a positive control. To analyze the influence of normal T cells present in the CLL samples, we mixed different concentrations of mononuclear cells from healthy blood donors with REC cells, a B-cell line that does not express ZAP-70.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY

We also analyzed the expression of ZAP-70 in paraffin-embedded sections of lymph-node-biopsy specimens from eight patients with CLL and six patients with mantle-cell lymphoma using an anti-ZAP-70 antibody (ZAP-70-LR, Santa Cruz Biotechnology). We evaluated the level of ZAP-70 expression in tumor cells, T cells, and residual germinal-center areas.

FLOW CYTOMETRY

Mononuclear cells, as well as whole blood, from 56 patients with CLL and 10 healthy blood donors used as normal controls were fixed and permeabilized with use of the Fix & Perm kit (Caltag Laboratories) according to the manufacturer's instructions. Then 1.5 μ g of anti-ZAP-70 antibody per 500,000 cells was incubated for 20 minutes at room temperature, washed twice in phosphate-buffered saline (Biomérieux), incubated for 20 minutes with goat

antimouse immunoglobulin fluorescein isothiocyanate (Dako), washed, and then incubated with normal mouse serum for five minutes. Finally, CD3-phycoerythrin, CD56-phycoerythrin, CD19-peridinin chlorophyll protein cychrome 5.5, and CD5-allophycocyanine (BD Biosciences) were added, and the samples were incubated for 15 minutes. Samples were analyzed with a flow cytometer (FACS Calibur, BD Biosciences) with a gate on the fluorescence 2 detector to ensure that at least 1000 T cells and natural killer cells were analyzed in each sample. In samples from healthy control subjects, at least 5000 B cells were also analyzed. Analysis of stained samples was carried out with use of CellQuest software (BD Biosciences).

Lymphocytes were gated to avoid the inclusion of debris, monocytes, and doublets. The resultant cells were then gated to select CD3+CD56+ cells (T and natural killer cells), used as an internal control for ZAP-70 expression, and CD19+CD5+ (CLL cells). Biparametric dot graphs of cells that were stained for ZAP-70 and CD3 plus CD56 were independently plotted for T cells and natural killer cells and CLL cells. A marker that included T cells and natural killer cells (in the upper right quadrant of each graph) was used to calculate the percentage of CLL cells that were positive for ZAP-70. The percentage of CD19+ cells that also expressed CD38 was quantified as previously described.⁸

STATISTICAL ANALYSIS

Correlations between ZAP-70, CD38, and mutational status were analyzed with use of Wilcoxon's and Fisher's exact tests and a multiple regression analysis. To identify the level of ZAP-70 expression that could best be used to discriminate mutated from unmutated cells, we used a receiver-operating-characteristic plot.²⁹ Correlations between the clinical characteristics and the expression of ZAP-70 were also analyzed with use of Wilcoxon's or Fisher's exact test. Survival and time to progression were estimated according to the method of Kaplan and Meier and compared between groups by means of the log-rank test. All P values were two-sided, and the type I error was set at 5 percent. Statistical analyses were performed with use of SPSS software.³⁰

RESULTS

SOMATIC MUTATIONS IN *IgV_H* GENES

All sequences of *IgV_H* genes in the leukemic cells from the 56 patients were in-frame rearrangements, and only two premature stop codons were observed. We

found somatic mutations (up to 98 percent homology with germ-line sequences) in 21 of 56 patients (38 percent), including 7 that had 95.6 to 97.3 percent homology with germ-line sequences (Table 1).

WESTERN BLOT ANALYSIS OF ZAP-70 EXPRESSION

ZAP-70 expression was analyzed in 12 human cell lines corresponding to different stages of B-cell differentiation. Peripheral-blood lymphocytes from healthy blood donors (data not shown) and the Jurkat T-cell line were used as positive controls. The protein was not detected in any of the B-cell lines, except the Ramos cell line, in which it was expressed weakly (Fig. 1A).

Of 32 samples from the patients with CLL, 16 had a high level of expression of ZAP-70 on Western blotting and the remaining 16 had a low level of expression (Fig. 1B). The presence of more than 2 percent T cells in the blood samples influenced the result, especially when the proportion was 10 percent or higher (Fig. 1C). However, samples from all but two patients with CLL contained less than 15 percent T cells on Western blotting (mean [\pm SD], 4.5 ± 5.5 percent); Patient 45 had more than 20 percent T cells in the sample.

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF ZAP-70 EXPRESSION

We analyzed lymph-node–biopsy specimens from eight patients with CLL, none of whom had IgV_H mutations, and six patients with mantle-cell lymphoma, which is characterized by proliferation of CD5+ B cells but not usually by IgV_H mutations. All lymph-node–biopsy specimens from the patients with CLL were positive for ZAP-70, with a diffuse pattern reflecting the infiltration by leukemic cells. T cells in the biopsy specimens showed stronger immunoreactivity than the CLL cells. Residual germinal centers were negative for ZAP-70. All mantle-cell lymphomas were negative for ZAP-70, whereas T cells in the tissue had a high level of expression of ZAP-70.

FLOW-CYTOMETRIC ANALYSIS OF ZAP-70 EXPRESSION

In samples of normal blood, flow-cytometric analysis disclosed a population with high and homogeneous expression of ZAP-70 (Fig. 2A). This population corresponded to T cells and natural killer cells. In these samples, the proportion of normal B cells (from healthy blood donors) expressing as much ZAP-70 as T cells and natural killer cells was 0 to 6.5 percent (mean, 4 ± 2.5). No significant differences

in ZAP-70 expression were observed between CD5– and CD5+ B-cell subpopulations (Fig. 2B).

The method used to quantify the percentage of CLL cells expressing as much ZAP-70 as T cells is shown in Figure 2C. Leukemic cells from 56 patients with CLL were analyzed for ZAP-70 expression by flow cytometry. In these samples, T cells and natural killer cells also displayed high and homogeneous levels of expression of ZAP-70. In contrast to normal CD5+ B cells, CD5+ CLL cells from 32 of 56 patients expressed high levels of ZAP-70 (Fig. 2D).

In all but one patient (Patient 45), there was complete concordance of ZAP-70 expression as assessed by flow cytometry, Western blotting, and immunohistochemistry (Table 1). These discrepant results in Patient 45 (Fig. 1B and Table 1) could be explained by the high number of T cells (20 percent) in the patient's sample. ZAP-70 expression was also analyzed in 30 of 56 patients from whom two sequential samples were available. The median time between the collections of the samples was 37 months (range, 11 to 64). None of these 30 patients had significant changes in ZAP-70 expression over time.

CORRELATION BETWEEN ZAP-70 PROTEIN AND IgV_H MUTATIONAL STATUS

There was a strong correlation between the presence of IgV_H mutations and the percentage of leukemic cells that expressed ZAP-70, as assessed by flow cytometry. In the receiver-operating-characteristic analysis, a value of 17.5 percent ZAP-70–positive CLL cells was the best cutoff for assigning IgV_H mutational status. We used a cutoff value of 20 percent for simplicity. Patients with unmutated IgV_H genes had higher percentages of ZAP-70–positive CLL cells than did patients with IgV_H mutations (48 ± 21 percent vs. 6 ± 4 percent, $P < 0.001$). Samples from all 21 patients with IgV_H mutations contained less than 20 percent ZAP-70–positive CLL cells, and all but 3 patients without IgV_H mutations (91 percent) had 20 percent or more ZAP-70–positive CLL cells (Fig. 3A and 3B). Conversely, all the patients with increased proportions of ZAP-70–positive cells did not have somatic mutations, and 88 percent of patients with low numbers of ZAP-70–positive cells had IgV_H mutations. Overall, the probability of the absence of somatic mutations in the presence of more than 20 percent ZAP-70–positive CLL cells (positive predictive value) was 100 percent (95 percent confidence interval, 89 to 100), whereas the probability of IgV_H mutations in the presence of a low percentage of ZAP-70–positive cells (negative pre-

Table 1. Main Biologic and Clinical Characteristics of the Patients.*

Patient No.	IgV _H			ZAP-70 Expression				CD38+ Cells	Stage at Diagnosis		Survival
	Somatic Mutations	Homology %	Family	No. of Nucleotide Changes	Western Blotting	Flow-Cytometric Analysis % (category)	IHC of Lymph-Node Biopsy Specimen		Binet	Rai	
1	No	100	4-39	0	—	69 (high)	—	99	A	0	29
2	No	100	3-48	0	—	54 (high)	—	—	A	I	10
3	No	100	1-46	0	Strong	21 (high)	—	—	A	0	3†
4	No	100	1-69	0	—	47 (high)	—	4	A	I	61
5	No	100	3-23	0	—	60 (high)	Strong	95	B	II	74†
6	No	100	1-69	0	—	59 (high)	Strong	—	B	II	75†
7	No	100	3-33	0	—	61 (high)	—	99	A	I	60†
8	No	100	1-03	0	—	45 (high)	Strong	—	B	I	48†
9	No	100	1-69	0	—	29 (high)	—	—	A	0	48
10	No	100	1-03	0	—	64 (high)	—	46	A	0	58†
11	No	100	1-69	0	—	64 (high)	—	94	A	0	58
12	No	100	3-11	0	—	54 (high)	Strong	—	A	0	104
13	No	100	1-18	0	—	70 (high)	—	1	A	0	77
14	No	100	1-03	0	Strong	24 (high)	—	4	A	0	39†
15	No	100	1-e	0	Strong	37 (high)	—	64	C	IV	92
16	No	100	3-11	0	Strong	46 (high)	—	30	A	0	26†
17	No	100	1-69	0	Strong	46 (high)	—	11	A	0	84†
18	No	100	1-e	0	Strong	30 (high)	—	95	A	I	85†
19	No	100	2-70	0	Strong	74 (high)	—	—	A	0	76†
20	No	100	1-69	0	Strong	73 (high)	—	71	A	0	67†
21	No	100	3-30	0	Strong	60 (high)	—	70	A	I	80†
22	No	100	3-74	0	Strong	30 (high)	—	80	B	II	18
23	No	99.7	1-69	1	—	35 (high)	Strong	83	A	0	67†
24	No	99.6	4-34	1	Strong	77 (high)	—	50	A	I	49†
25	No	99.6	1-69	1	Strong	29 (high)	—	39	A	I	92†
26	No	99.3	1-69	2	Strong	73 (high)	Strong	53	A	I	67
27	No	99.3	3-49	2	—	73 (high)	Strong	99	A	0	78†
28	No	99.3	1-69	2	Strong	51 (high)	—	95	A	I	109†
29	No	99	3-09	3	Strong	70 (high)	—	53	A	0	307
30	No	98.6	3-48	4	—	71 (high)	—	99	A	0	19

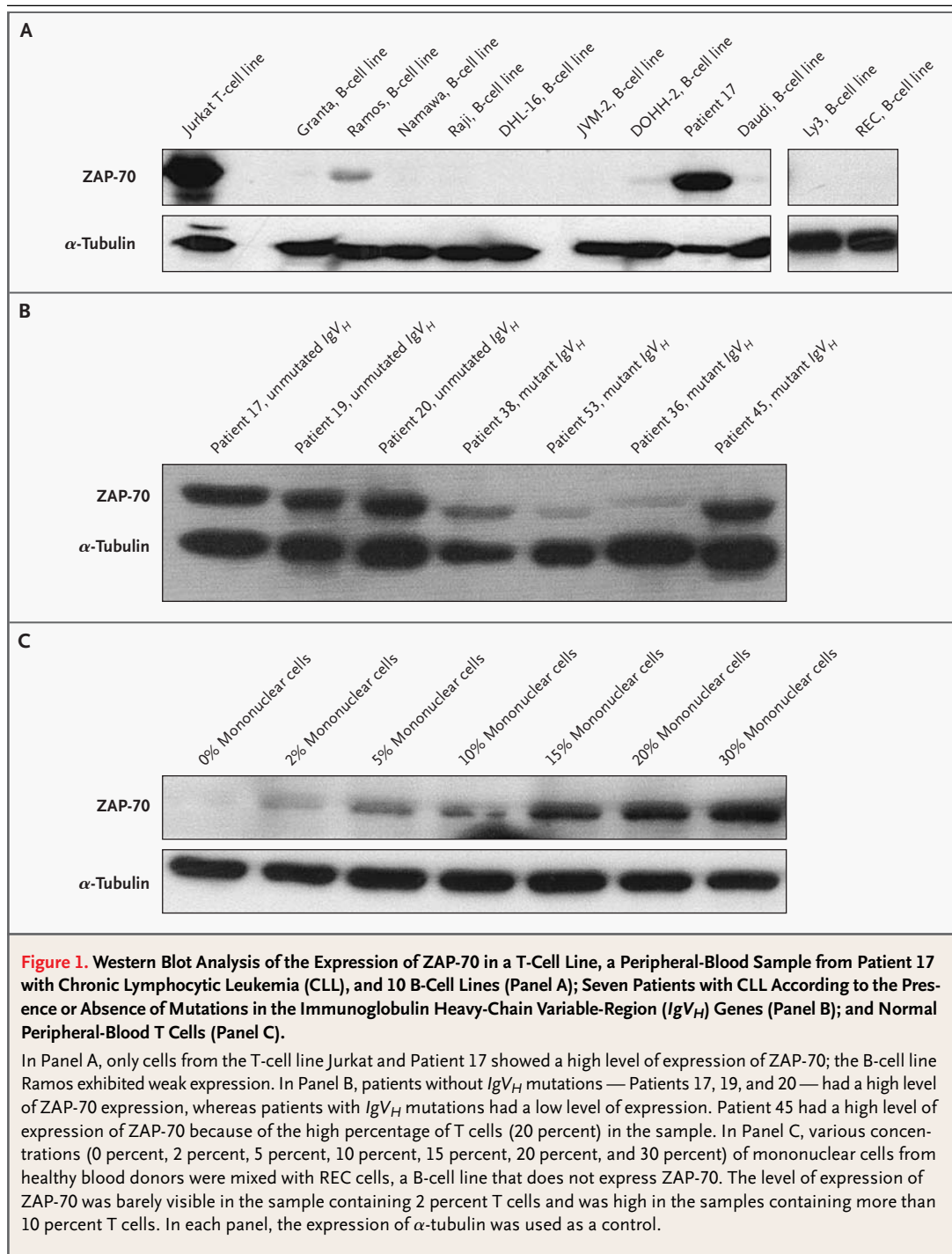
Table 1. (Continued.)

Patient No.	IgV _H			ZAP-70 Expression				CD38+ Cells %	Stage at Diagnosis		Survival <i>mo</i>
	Somatic Mutations	Homology %	Family	No. of Nucleotide Changes	Western Blotting	Flow-Cytometric Analysis % (category)	IHC of Lymph-Node Biopsy Specimen		Binet	Rai	
31	No	98.3	3-15	5	—	30 (high)	—	78	A	I	55†
32	No	98.3	1-69	5	—	29 (high)	Strong	86	B	II	80†
33‡	No	100	3-43	0	Weak	5 (low)	—	25	B	II	48†
34‡	No	100	1-69	0	Weak	5 (low)	—	50	C	IV	47
35‡	No	100	3-72	0	Weak	12 (low)	—	2	A	0	87†
36	Yes	97.3	4-61	8	Weak	12 (low)	—	15	B	II	8†
37	Yes	96.6	1-02	10	Weak	4 (low)	—	1	A	0	52†
38	Yes	96.2	4-59	11	Weak	1 (low)	—	0	A	0	138†
39	Yes	95.6	3-07	13	—	11 (low)	—	73	A	0	63†
40	Yes	95.6	4-31	13	—	7 (low)	—	—	A	0	46†
41	Yes	95.6	7-04.1	13	Weak	5 (low)	—	5	A	I	121†
42	Yes	95.6	4-61	13	Weak	2 (low)	—	1	C	IV	289†
43	Yes	93.9	3-21	9	Weak	13 (low)	—	46	A	III	25
44	Yes	93.7	2-05	18	Weak	3 (low)	—	98	A	0	67†
45‡	Yes	93.5	5-51	19	Strong	12 (low)	—	0	A	0	14†
46	Yes	93.3	3-72	20	—	2 (low)	—	78	A	0	64†
47	Yes	93.2	1-03	19	Weak	6 (low)	—	2	A	0	128†
48	Yes	92.5	3-23	22	—	10 (low)	—	—	A	I	59†
49	Yes	92.4	4-34	22	—	1 (low)	—	—	C	IV	9
50	Yes	92.4	4-04	22	—	6 (low)	—	8	A	0	127†
51	Yes	92.4	4-34	22	Weak	6 (low)	—	1	A	0	421†
52	Yes	90.6	4-34	27	Weak	6 (low)	—	12	A	0	122†
53	Yes	89.8	1-18	35	Weak	3 (low)	—	0	A	0	43†
54	Yes	89.1	3-23	32	—	1 (low)	—	—	C	III	56†
55	Yes	89.1	3-74	34	Weak	4 (low)	—	38	A	0	83†
56	Yes	88.4	3-30	34	Weak	4 (low)	—	0	A	0	31†

* Samples in which fewer than 2 percent of base pairs differed from those of the consensus sequence for immunoglobulin heavy-chain variable-region (IgV_H) genes were considered unmutated.⁸ The level of ZAP-70 expression was considered to be high if at least 20 percent of chronic lymphocytic leukemia cells were positive for the protein. Survival was measured from the time of diagnosis. IHC denotes immunohistochemical analysis.

† The patient was still alive at the time of analysis.

‡ The results of IgV_H mutational analysis and ZAP-70 expression were discordant.



dictive value) was 87.5 percent (95 percent confidence interval, 68 to 97). The sensitivity and specificity of the flow-cytometric analysis were 91 percent (95 percent confidence interval, 77 to 98) and 100 percent (95 percent confidence interval, 84 to 100), respectively.

To verify ZAP-70 expression in the three patients in whom IgV_H status and flow-cytometric results were discordant, Western blot analysis was performed on isolated fractions of CD19+ cells with a purity greater than 98 percent (CD19 is a surface marker of B cells). A weak signal was observed in all

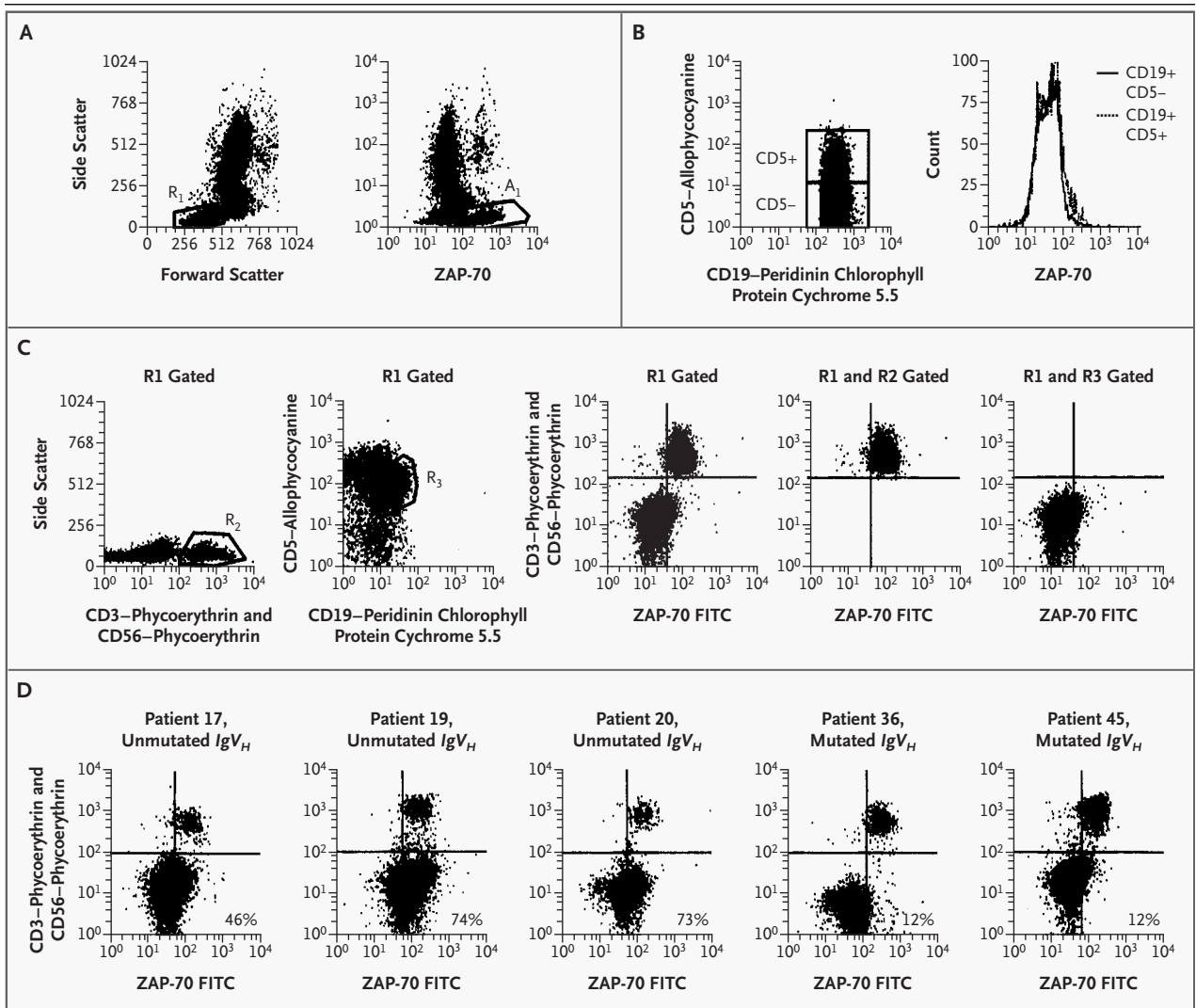
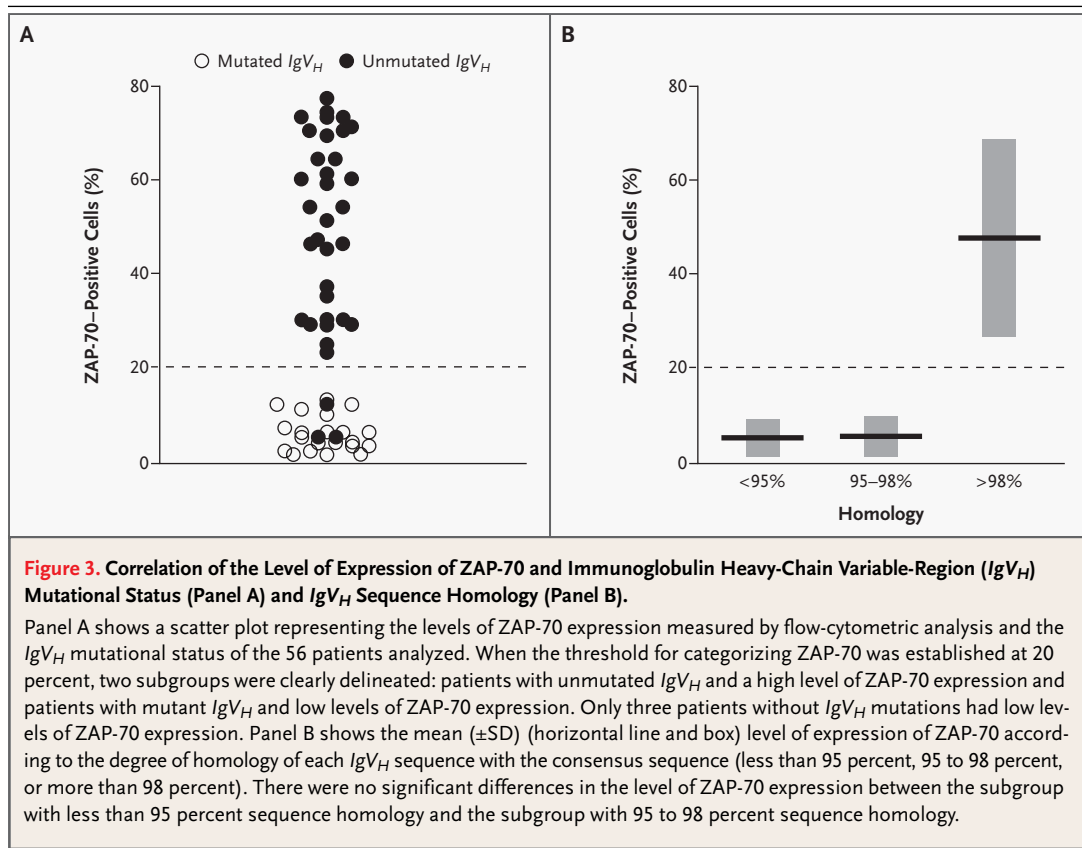


Figure 2. Immunofluorescence and Flow-Cytometric Analysis of the Expression of ZAP-70.

Panel A shows flow-cytometric plots of lysed whole blood. In the left-hand plot, forward and side scatter of lysed blood is represented with a region (R1) drawn around the lymphocytes. The right-hand plot shows side scatter and ZAP-70 staining of the same sample; A₁ denotes a population with a low SSC and a high level of expression of ZAP-70. Panel B shows the level of expression of ZAP-70 by normal B cells. The left-hand plot shows the expression of CD5 on gated CD19+ cells, with two regions showing the CD5+ and CD5- B-cell subpopulations. The histogram on the right-hand side represents the expression of ZAP-70 by the CD19+CD5- subpopulation and the CD19+CD5+ subpopulation. Panel C shows the method used to quantify the expression of ZAP-70 by chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. Lymphocytes were R1 gated, and then T cells and natural killer (CD3+CD56+) cells (the R2 region in the leftmost plot) and CLL (CD19+CD5+) cells (the R3 region in the second plot) were selected according to their phenotype. The third plot shows the expression of ZAP-70 after lymphocyte (R1) gating. For the purposes of quantification, markers were placed so that the T cells and natural killer cells (R1 and R2 gated) with a high level of expression of ZAP-70 would appear in the upper right quadrant (fourth plot). Subsequently, CLL cells were plotted, and the cells in the lower right quadrant were quantified as CLL cells with a high level of expression of ZAP-70 (rightmost plot). Panel D shows the level of expression of ZAP-70 by lymphocytes from five representative patients with CLL according to the mutational status of immunoglobulin heavy-chain variable-region (*IgV_H*) genes. The percentage of CLL cells with a high level of expression of ZAP-70 is shown in the lower right quadrant of each plot, after the exclusion of T cells and natural killer cells. FITC denotes fluorescein isothiocyanate.



three samples (data not shown), validating the low levels of expression of ZAP-70 observed on flow cytometry.

ZAP-70 AND CD38 EXPRESSION

Data for the expression of CD38 were available for 45 patients (CD38 is a marker that has been proposed as a surrogate for *IgV_H* mutational status). Of these 45 patients, 18 had no more than 30 percent CD38+ cells (Table 1). There were significant differences in the mean percentages of CD38+ CLL cells between patients with *IgV_H* mutations and those without *IgV_H* mutations (20 percent vs. 60 percent, $P < 0.001$). In addition, 22 of 28 patients without *IgV_H* mutations (79 percent) had at least 30 percent CD38+ cells, whereas 12 of 17 (71 percent) with somatic mutations had less than 30 percent CD38+ cells. Moreover, the percentage of CD38+ cells was at least 30 percent in 21 of 25 patients (84 percent) with at least 20 percent ZAP-70-positive cells and less than 30 percent in 14 of 20 patients (70 percent) with less than 20 percent ZAP-70-positive cells. The level of CD38 expression was also low in the two pa-

tients with discordant results of ZAP-70 expression and *IgV_H* mutations (Table 1). In a multiple regression analysis, only ZAP-70 expression ($P < 0.001$), and not CD38 expression, maintained its correlation with *IgV_H* mutational status.

PROGNOSTIC IMPORTANCE OF THE PERCENTAGE OF ZAP-70-POSITIVE CELLS

None of the standard variables were associated with ZAP-70 expression, including Binet's and Rai's clinical stages, the lymphocyte count, and the lymphocyte doubling time. However, an increased percentage of ZAP-70-positive cells was associated with a short time to progression. Among 44 patients with Binet stage A, the median time to progression was 29 months for the 26 patients with at least 20 percent ZAP-70-positive cells, whereas the median was not reached among the 18 patients with less than 20 percent ZAP-70-positive cells ($P = 0.009$) (Fig. 4A).

When survival was calculated from the time of diagnosis, the 26 patients with Binet stage A CLL and at least 20 percent ZAP-70-positive cells had a median survival of 90 months, whereas the median sur-

vival was not reached in the 18 patients with Binet stage A and less than 20 percent ZAP-70–positive cells ($P=0.01$) (Fig. 4B). However, when all patients were analyzed (Binet stage A, B, and C), the percentage of ZAP-70–positive cells was not significantly correlated with survival ($P=0.06$). The percentage of CD38+ cells (with a cutoff of 30 percent) did not predict progression or survival (data not shown). Finally, as expected, IgV_H mutational status also correlated with progression and survival (data not shown).

DISCUSSION

The management of CLL is based on each patient's individual risk, because the disease has a widely variable clinical course. An important determinant of the prognosis is the mutational status of IgV_H genes in the leukemic cells, which correlates with the clinical outcome better than and independently of classic prognostic factors.^{8,11,31} Methods to identify IgV_H mutations are, however, not widely available in clinical practice. Our study confirms that the leukemic cells without IgV_H mutations in patients with CLL express high levels of ZAP-70, whereas the leukemic cells with IgV_H mutations in patients with CLL have barely detectable levels of ZAP-70.^{16,17} Moreover, using flow cytometry, we found that none of the patients with CLL and at least 20 percent ZAP-70–positive cells had IgV_H somatic mutations, whereas all but three patients with less than 20 percent ZAP-70–positive cells had mutated IgV_H genes. Flow-cytometric analysis of ZAP-70 expression was a sensitive and specific surrogate for mutational status of IgV_H genes; this method should be readily available in general laboratories.

The mechanisms accounting for the relation between ZAP-70 expression and the mutational status of IgV_H are unknown. We also have no explanation for the inconsistency between mutational status and ZAP-70 levels in three of our patients. A discrepancy between ZAP-70 expression, as assessed by Western blotting, and the IgV_H mutational status was also found in 1 of 22 patients in another series.¹⁷

Apart from CLL cells, ZAP-70 was expressed only in T cells and tumors of T-cell lineage, whereas it was barely detectable in normal CD19+CD5+ cells. It was not detected by Western blotting or immunohistochemistry in any of the B-cell lines or biopsy specimens of mantle-cell lymphoma. Nevertheless, ZAP-70 messenger RNA has been found in other B-cell lines with the use of reverse-transcriptase–

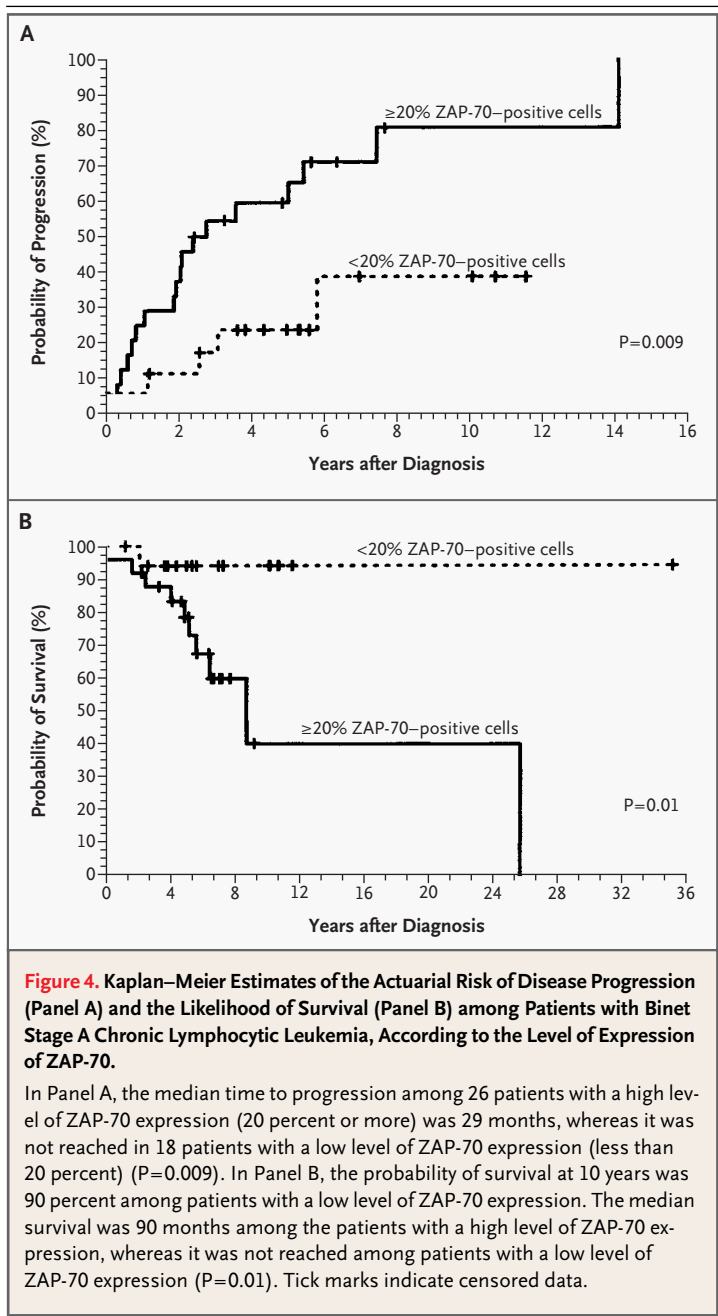


Figure 4. Kaplan–Meier Estimates of the Actuarial Risk of Disease Progression (Panel A) and the Likelihood of Survival (Panel B) among Patients with Binet Stage A Chronic Lymphocytic Leukemia, According to the Level of Expression of ZAP-70.

In Panel A, the median time to progression among 26 patients with a high level of ZAP-70 expression (20 percent or more) was 29 months, whereas it was not reached in 18 patients with a low level of ZAP-70 expression (less than 20 percent) ($P=0.009$). In Panel B, the probability of survival at 10 years was 90 percent among patients with a low level of ZAP-70 expression. The median survival was 90 months among the patients with a high level of ZAP-70 expression, whereas it was not reached among patients with a low level of ZAP-70 expression ($P=0.01$). Tick marks indicate censored data.

PCR (RT-PCR) analysis.¹⁶ Our results indicate that, among B-cell and T-cell lymphoproliferative disorders, a high level of ZAP-70 expression is restricted to T-cell proliferative diseases and a subgroup of CLL.

The use of flow cytometry to assess the level of ZAP-70 expression offers advantages over other systems of analysis. With flow cytometry, it is possible

to analyze the percentage of ZAP-70–positive cells selectively in subpopulations of CLL cells, T cells, and natural killer cells. By contrast, Western blotting and RT-PCR can overestimate the level of expression of ZAP-70 owing to the presence of T cells in the sample.^{16,17}

The value of CD38 as a surrogate for IgV_H mutations is controversial.^{32,33} Moreover, the level of CD38 expression may vary over the course of the disease.³⁴ In our series, the level of CD38 expression did not correlate with disease progression or survival. In contrast, the level of expression of ZAP-70 did not change over time, and the presence of ZAP-70 was associated with rapid progression and poor survival.

In conclusion, the expression of ZAP-70 by CLL cells, as ascertained by flow-cytometric analysis, is a simple and reliable surrogate for the identification of IgV_H mutations. Moreover, ZAP-70 expression by itself can be used as a prognostic marker. For these reasons, ZAP-70 analysis should be included in the workup of patients with CLL.

Supported in part by grants from the José Carreras International Foundation against Leukemia (EM/02 and CR/02), Fondo de Investigaciones Sanitarias (02/0250 and 01/1581), and Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF-02-3261). Ms. Crespo is a recipient of a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spain.

We are indebted to Professor Freda K. Stevenson for technical advice in the analysis of the somatic mutations of IgV_H, to Montse Sánchez for immunohistochemical analysis, and to Penelope Elvy and Eoin McGrath for their assistance in the preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219-34.
- Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198-206.
- Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995;333:1052-7. [Erratum, *N Engl J Med* 1995;333:1515.]
- Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol* 1999;17:399-408.
- Montserrat E. Classical and new prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia: where to now? *Hematol J* 2002;3:7-9.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-6.
- Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998;102:1515-25.
- Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-7.
- Schroeder HW Jr, Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today* 1994;15:288-94.
- Oscier DG, Thompssett A, Zhu D, Stevenson FK. Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood* 1997;89:4153-60.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-54.
- Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996;381:751-8.
- Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Döhner H. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 2002;16:993-1007.
- Lin K, Sherrington PD, Dennis M, Matrai Z, Cawley JC, Pettitt AR. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1404-9. [Erratum, *Blood* 2002;100:2291.]
- Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001;194:1625-38.
- Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001;194:1639-47.
- Chen L, Widhopf G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:4609-14.
- Chan AC, Irving BA, Fraser JD, Weiss A. The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:9166-70.
- Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 1992;71:649-62.
- Vivier E, da Silva AJ, Ackerly M, et al. Association of a 70-kDa tyrosine phosphoprotein with the CD16: zeta:gamma complex expressed in human natural killer cells. *Eur J Immunol* 1993;23:1872-6.
- Isakov N, Wange RL, Burgess WH, Watts JD, Aebbersold R, Samelson LE. ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity. *J Exp Med* 1995;181:375-80.
- Latour S, Veillette A. Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Curr Opin Immunol* 2001;13:299-306.
- Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guilermo A, et al. Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1810-6.
- Swerdlow SH, Berger F, Isaacson PI, et al. Mature B-cell neoplasms: mantle cell lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. WHO Classification of Tumours. Lyons, France: IARC Press, 2001:168-70.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
- Campbell MJ, Zelenetz AD, Levy S, Levy R. Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire. *Mol Immunol* 1992;29:193-203.
- Deane M, Norton JD. Immunoglobulin heavy chain variable region family usage is independent of tumor cell phenotype in human B lineage leukemias. *Eur J Immunol* 1990;20:2209-17.
- Cook GP, Tomlinson IM. The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunol Today* 1995;16:237-42.
- Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristics (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993;39:561-77. [Erratum, *Clin Chem* 1993;39:1589.]
- SPSS advanced statistics, version

10.0.6. Chicago, SPSS, 1999 (software).

31. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IgV_H gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002;100:1177-84.

32. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, et al.

Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98:2633-9.

33. Ibrahim S, Keating M, Do KA, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;98:181-6.

34. Hamblin TJ, Orchard JA, Gardiner A,

Oscier DG, Davis Z, Stevenson FK. Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL. *Blood* 2000;95:2455-7.

Copyright © 2003 Massachusetts Medical Society.

FULL TEXT OF ALL JOURNAL ARTICLES ON THE WORLD WIDE WEB

Access to the complete text of the *Journal* on the Internet is free to all subscribers. To use this Web site, subscribers should go to the *Journal's* home page (<http://www.nejm.org>) and register by entering their names and subscriber numbers as they appear on their mailing labels. After this one-time registration, subscribers can use their passwords to log on for electronic access to the entire *Journal* from any computer that is connected to the Internet. Features include a library of all issues since January 1993 and abstracts since January 1975, a full-text search capacity, and a personal archive for saving articles and search results of interest. All articles can be printed in a format that is virtually identical to that of the typeset pages. Beginning six months after publication the full text of all original articles and special articles is available free to nonsubscribers who have completed a brief registration.

CAPÍTOL 2

Expressió de ZAP-70 en cèl·lules pro/pre-B normals, cèl·lules B madures i en leucèmia aguda limfoblàstica-B.

La proteïna ZAP-70 es troba expressada normalment en limfòcits de llinatge T, en els quals juga un paper crucial en la transducció inicial de senyals a través del receptor de cèl·lules T o TCR. Recentment s'ha descrit que la proteïna ZAP-70 es troba també involucrada en les fases inicials del desenvolupament dels limfòcits B de ratolí. L'objectiu d'aquest treball fou investigar, en mostres humanes, la presència de ZAP-70 en limfòcits normals en estadi pro/pre-B i en estadis madurs i també en cèl·lules tumorals de leucèmies agudes limfoblàstiques B (LAL-B).

L'expressió de ZAP-70 es va determinar per citometria de fluxe, immunofluorescència, Western blot i RT-PCR quantitativa. L'expressió de ZAP-70 i d'altres components proteïcs de la via de senyalització del pre-TCR/TCR es va determinar mitjançant Western blot.

Es va trobar expressió de ZAP-70 en limfòcits pro/pre-B però no en limfòcits B madurs derivats de moll de l'ós, sang perifèrica o amígdala. Entre els limfòcits tumorals analitzats, es va trobar expressió de ZAP-70 en el cinquanta-sis per cent de les LAL-B amb fenotip pro/pre-B i en quatre de sis limfomes de Burkitt/LAL-B. Als limfòcits de LAL-B l'expressió del marcador de superfície CD38 es correlacionà amb

l'expressió de ZAP-70 ($P=0.05$). No es van trobar mutacions en cap dels catorze exons del gen *zap-70* en aquells casos de LAL-B que no expressaven la proteïna. A més a més, altres elements de la via senyalitzadora del pre-TCR/TCR, com LAT i LCK, també es van trobar expressats a les cèl·lules de LAL-B.

Amb aquests resultats podem concloure que, entre les subpoblacions de limfòcits B normals, la proteïna ZAP-70 només s'expressa en limfòcits pro/pre-B i no en una proporció significativa de limfòcits B normals de fenotip madur. A més a més, la presència de la proteïna ZAP-70 en cèl·lules de LAL-B probablement és un reflex del seu origen cel·lular en limfòcits pro/pre-B. La manca d'expressió de ZAP-70 en limfòcits B normals de fenotip madur suggereix que l'expressió que trobem en neoplàsies derivades de limfòcits B madurs, com el limfoma de Burkitt o la leucèmia limfàtica crònica, podria ésser deguda a un fenomen aberrant.

ZAP-70 Expression in Normal Pro/Pre B Cells, Mature B Cells, and in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia

Marta Crespo,¹ Neus Villamor,² Eva Giné,¹ Ana Muntañola,¹ Dolores Colomer,² Teresa Marafioti,³ Margaret Jones,³ Mireia Camós,² Elias Campo,² Emili Montserrat,¹ and Francesc Bosch¹

Abstract Purpose: The *ZAP-70* gene is normally expressed in T and natural killer cells, where it is required for the T-cell receptor (TCR) signaling. More recently, it has been described that *ZAP-70* contributes to the B-cell development at early stages of B-cell differentiation in mice. The purpose was to investigate the presence of *ZAP-70* in normal pro/pre B cells and mature B cells and in tumoral cells from B-acute lymphoblastic leukemias (B-ALL).

Experimental Design: *ZAP-70* expression was ascertained by flow cytometry, immunofluorescence, Western blot, and quantitative reverse transcription-PCR. Analysis of *ZAP-70* and other signaling proteins of the pre-TCR/TCR was done by Western blot.

Results: *ZAP-70* was expressed in pro/pre B cells but not in normal mature B cells derived from bone marrow, peripheral blood, or tonsil. Among tumoral cells, *ZAP-70* was expressed in 56% of B-ALLs with pro/pre B-cell phenotype and in 4 of 6 Burkitt/ALL lymphomas. In B-ALL cells, expression of CD38 protein correlated with *ZAP-70* expression ($P = 0.05$). Mutational analysis of the *ZAP-70* gene revealed the absence of mutations in cases lacking *ZAP-70* expression. Moreover, other elements of the pre-TCR/TCR signaling pathway, like LAT and Lck, were also found in B-ALL cells.

Conclusions: Among normal B-cell subsets, *ZAP-70* was found expressed in normal pro/pre B cells but not in a significant proportion of normal B cells with mature phenotype. Moreover, the presence of *ZAP-70* in B-ALLs probably reflects their cellular origin. The lack of *ZAP-70* expression in normal mature B cells suggests that its expression in mature-derived neoplasms with different cellular origin, such as Burkitt's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia, might be due to an aberrant phenomenon.

ZAP-70 (ξ -associated protein) is a tyrosine kinase of the Syk/*ZAP-70* family that plays a critical role in signal transduction from the T-cell receptor (TCR; refs. 1–3). In response to TCR stimulation, the immunoreceptor tyrosine-based activation motifs become phosphorylated, allowing recruitment and phosphorylation of Syk/*ZAP-70* tyrosine kinases. Following these steps, TCR-linked signal transduction takes place, including differentiation, proliferation and effector functions of the cell (4, 5).

The *ZAP-70* gene has been reported to be expressed in T and natural killer derived cells. However, in recent studies, *ZAP-70* expression has also been found in B-chronic lymphocytic leukemia (CLL; ref. 6) cells, particularly in those cases with unmutated IgV_H genes (7–9). Of note, CLL cases with increased *ZAP-70* expression have a worse prognosis in terms of progression and survival. In CLL cells, *ZAP-70* can be phosphorylated and functionally active upon B-cell receptor (BCR) stimulation (10). The activated *ZAP-70* can cooperate with Syk, the tyrosine kinase of the BCR signal pathway normally expressed in B cells, thus inducing proliferation of the CLL cells (10). The mechanisms of the abnormal expression of *ZAP-70* in CLL cells, a B-cell mature proliferation, are not fully understood. It has been hypothesized that the expression of *ZAP-70* was derived from the cell that this leukemia originated from, or that its expression was ectopic in this cell lineage.

No expression of *ZAP-70* in other B-cell compartments had been reported until recently, when *ZAP-70* expression was shown to play an important role for B-cell development in mice (11). Consistent with this, *ZAP-70* expression was found in mice pro-B, pre-B, and CD19⁺ splenic B cells, although at lower levels than in normal thymocytes. The expression of *ZAP-70* in normal human B cells at different stages of differentiation, especially in the mature B-cell compartment, has not yet been fully elucidated. Thus, it is of great interest to know whether expression of *ZAP-70* in mature B-cell-derived neoplasms is a consequence of their cellular origin.

Authors' Affiliations: Departments of ¹Hematology and ²Hematopathology, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; and ³Department of Clinical Laboratory Sciences, John Radcliffe Hospital, Oxford, United Kingdom

Received 7/14/05; revised 11/11/05; accepted 11/18/05.

Grant support: Fondo de Investigaciones Sanitarias grant 02/0250, Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung e.V. grant D-1643, and the José Carreras International Foundation Against Leukemia grant EM/03.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Note: Supplementary data for this article are available at <http://www.idibaps.ub.edu/images/noticias/ZAP70SEQ.pdf>. M. Crespo and N. Villamor contributed equally to this study.

Requests for reprints: Francesc Bosch, Department of Hematology, Hospital Clínic de Barcelona. Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Phone: 34-93-227-5428; Fax: 34-93-227-5428; E-mail: fbosch@clinic.ub.es.

© 2006 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1531

To address these questions, ZAP-70 expression was analyzed by different methods in normal human B cells at different stages of B-cell maturation, including normal pro/pre B cells and mature B cells. In addition, expression and mutational status of ZAP-70 was analyzed in B-ALL cells, including Burkitt's cases and B-ALLs with pro/pre B phenotype. The phosphorylation status of ZAP-70 and other signaling proteins was analyzed in these cases.

Materials and Methods

Samples. Normal lymphocytes were isolated on a Ficoll/Hypaque (Seromed, Berlin, Germany) gradient from peripheral blood lymphocytes (PBL; $n = 2$) and bone marrow ($n = 8$) obtained from adults and tonsil ($n = 4$) obtained from children. In addition, tumoral cells from 29 B-ALL cases, classified according to their maturation status (12), were included in this study: status B-I ($CD19^+$, $CD10^-$, $cIgM^-$), four

Table 1. ZAP-70 expression values and main characteristics of the B-ALLs, normal controls, and cell lines

Samples	Age	ZAP-70 Expression		Maturation status	Phenotype			Genetic abnormalities
		QRT-PCR (AU)	FC(%)		CD34	CD10	CD38	
ALL-5	7		99	B-II	+	+		
ALL-27	6	0.38	95	B-IV/Burkitt	-	+	+	t(8;14)
ALL-24	69		95	B-IV/Burkitt	-	+	+	t(8;14)
ALL-30	22		94	B-II-My	+	+	+	bcr/abl
ALL-1 - CD19 ⁺	14	0.39	88	B-II-My	+	+	+	bcr/abl
ALL-4 - CD19 ⁺	67	0.34	86	B-II-My	+	+	+	bcr/abl
ALL-6	6		79	B-II	+	+		
ALL-7	8		77	B-II	+	+		
ALL-33	68		72	B-IV/Burkitt	-	+	+	
ALL-16	20		64	B-II	+	+	+	
ALL-20 - CD19 ⁺	34	0.35	60	B-I	+	-	+	
ALL-31	55		56	B-II-My	+	+	+	
ALL-36	24	0.81		B-II	+	+	+	
ALL-37	30	0.72		B-II-My	+	+	+	MLL
ALL-29	55	0.65		B-II	+	+	+	bcr/abl
ALL-40	27	0.57		B-IV/Burkitt	-	+	+	
ALL-26	49	0.48		B-III	-	+	+	t(1;19)
ALL-22 - CD19 ⁺	50	0.1	14	B-II	+	+	+	
ALL-2 - CD19 ⁺	20	0.19	12	B-IV/Burkitt	-	+		
ALL-12 - CD19 ⁺	17	0.05	3	B-II-My	+	+	-	del(11q)
ALL-32	59		1	B-I	+	-	+	
ALL-18* - CD19 ⁺	38	0.19		B-II	+	+	+	bcr/abl
ALL-13 - CD19 ⁺	2	0.08		B-I-My	+	-	+	t(4;11) MLL
ALL-19	34	0.09		B-II-My	+	+	+	bcr/abl
ALL-23	20	0.08		B-II-My	+	+	-	bcr/abl
ALL-25	20	0.08		B-II	+	+	+	
ALL-38	69	0.07		B-IV/Burkitt	-	+		t(8;14)
ALL-8*	77	0.04		B-I-My	+	-	+	bcr/abl
ALL-21	32	0.01		B-II-My	+	+	-	
Jurkat		1		T-ALL				
Ramos		0.01		Burkitt				
Daudi		0.01		Burkitt				
Namalwa		0.01		Burkitt				
Raji		0.01		Burkitt				
JVM-2		0.08		PLL				
NALM-6		0.13		B-ALL				
NC-NC		0.13		Lymphoblastoid				
Tonsil CD19 ⁺ CD27 ⁺		0.06						
Tonsil CD19 ⁺ CD27 ⁻		0.19						
Tonsil CD19 ⁻		0.76						
PBL's		0.75						

NOTE: Analyses were done in separated B-cell subpopulations where indicated (CD19⁺). Maturation status was referred to the EGIL Classification (12). Genetic abnormalities and additional immunophenotypic characteristics, when available, were detailed. Gray zones indicate those B-ALL cases that were considered with high ZAP-70 expression.

Abbreviations: FC, flow cytometry; My, presence of myeloid markers; PLL, prolymphocytic leukemia.

*Lymphoid blast crisis from a previous chronic myeloid leukemia.

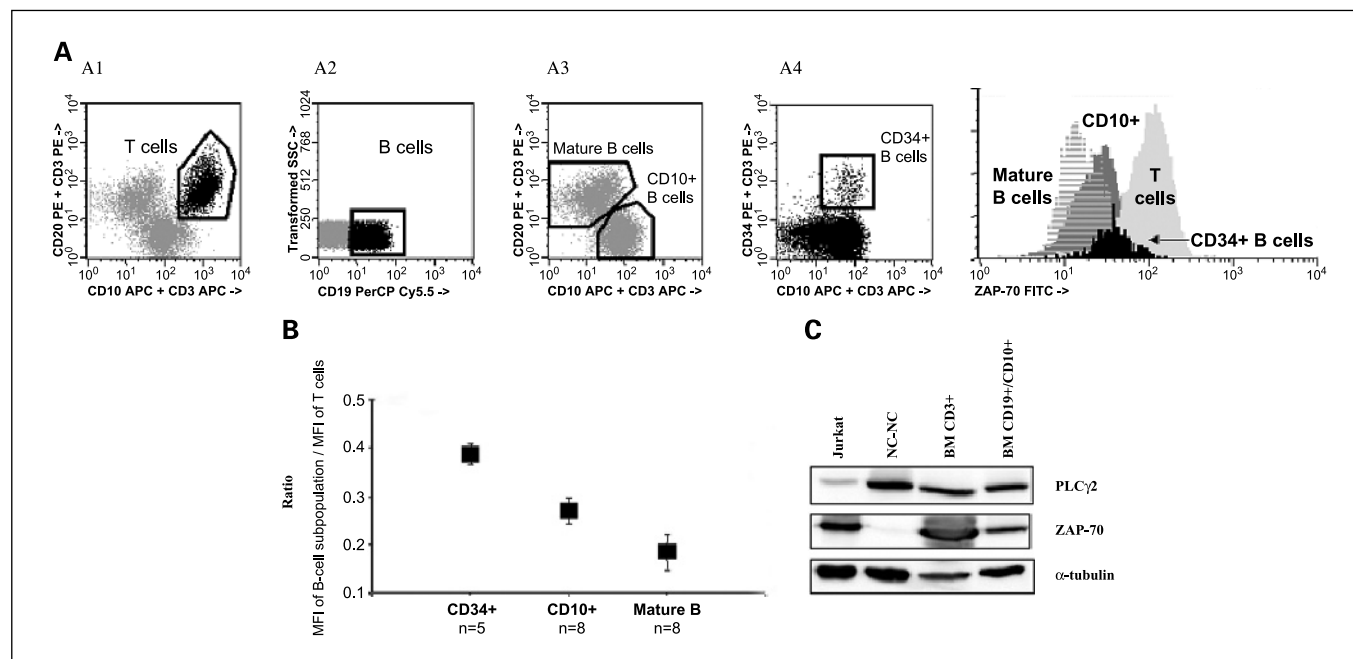


Fig. 1. ZAP-70 expression in normal B cells from bone marrow. *A*, analysis of ZAP-70 expression by flow cytometry. A1, gate for selecting T cells (strong positive in both PE and APC). A2, gate for B cells (CD19⁺). A3, gate for selecting CD10⁺ and mature CD20⁺/CD10⁻ B cells. A4, gate for CD34⁺ B cells. Right, overlapping histograms of ZAP-70 staining in T cells, mature B cells, and CD34⁺ and CD10⁺ B cells from a normal bone marrow sample. As shown, normal CD34⁺ B cells expressed higher levels of ZAP-70 than CD10⁺ B cells and mature B cells. *B*, intracellular content of ZAP-70 in different B-cell subsets from bone marrow. The most immature B cells (CD34⁺) showed the highest content of ZAP-70 amongst B cells subpopulations. MFI, mean fluorescence intensity channel. *C*, Western blot analysis of ZAP-70 expression in purified CD19⁺/CD10⁺ cells from bone marrow. Jurkat and NC-NC protein extracts were used as positive and negative control for ZAP-70, respectively. PLCγ2 (mainly expressed by B cells) and α-tubulin were used as loading controls. Confirming flow cytometry results, CD19⁺/CD10⁺ B cells disclosed ZAP-70 expression, although at lower levels than T cells.

cases; B-II (CD19⁺, CD10⁺, cIgM⁻), 18 cases; B-III (CD19⁺, CD10⁺, cIgM⁺), one case; and B-IV/Burkitt (CD19⁺, CD10⁺, sIgM⁺), six cases (Table 1). Moreover, tumoral lymphocytes obtained from 10 patients diagnosed with CLL were also analyzed for ZAP-70 expression. The cell lines Jurkat (T-ALL), NALM-6 (B-ALL), Ramos, Daudi, Namalwa, Raji (Burkitt), JVM-2 (prolymphocytic leukemia), and NC-NC (lymphoblastoid) were used as controls. The main clinical (age, response to treatment, duration of response, and survival) and biological variables of the cases diagnosed with B-ALL were recorded and correlated with ZAP-70 expression. Samples were obtained after informed consent and approval from the local Ethical Committee.

In normal PBLs, CD19⁺ lymphocytes were negatively selected using the B-cell Isolation kit II (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) followed by a further negative selection using anti-CD56, anti-CD2, and anti-CD3-FITC labeled (Becton Dickinson, San Jose, CA). In normal bone marrow, CD19⁺/CD10⁺ lymphocytes were positive selected using anti-CD10-phycoerythrin (PE) followed by anti-CD19-FITC (Becton Dickinson). In tonsils, the subpopulations CD19⁺/CD27⁻, CD19⁺/CD27⁺, and CD19⁻ were isolated by separation of CD19⁺ cells with anti-CD19-FITC followed by further purification of CD27⁺ cells with anti-CD27-PE (Becton Dickinson). In tumoral samples (B-ALLs and CLL cases), isolation of CD19⁺ cells was done by separation of CD3⁺ cells with anti-CD3-FITC. Labeled cells were collected correspondingly using anti-FITC, anti-PE, or anti-biotin Microbeads (Miltenyi Biotec). Isolated samples were analyzed for ZAP-70 expression when the presence of T and natural killer cells was <1%.

Flow cytometry analysis of ZAP-70. Flow cytometry analysis of ZAP-70 expression was done as previously described (7). Several surface markers combinations were used to assess ZAP-70 expression on the different cell subsets: (a) for B-cell subsets in normal bone marrow, to analyze simultaneously T cells and different subsets of B cells, ZAP-70-FITC/CD20-PE+CD3-PE/CD19-peridin chlorophyll protein cychrome 5.5 (PerCP Cy5.5)/CD10-allophycocyanine

(APC)+CD3-APC or CD34-APC+CD3-APC; (b) for CLL, ZAP-70-FITC/CD3-PE+CD56-PE/CD19-PerCP Cy5.5/CD5-APC; and (c) for B-ALL, ZAP-70-FITC/CD3-PE+CD56-PE/CD19-PerCP Cy5.5/CD10-APC or CD34-APC. ZAP-70 monoclonal antibody was purchased from Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY), and the surface markers were from Becton Dickinson (CD56-PE, CD19 PerCP Cy5.5, CD5-APC, CD3-APC) and Immunotech (Marseilles, France; CD20-PE, CD10-APC, CD34-APC, CD3-PE). Mean fluorescence channel intensity was obtained for each lymphoid subpopulation, and the ratios between T and pre/pre B cells or mature B cells were compared using the Mann-Whitney test.

Double immunofluorescence analysis of ZAP-70. Five-micrometer-thick paraffin-embedded tissue sections of reactive tonsil, tonsil cell suspensions, or mononucleated cells from peripheral blood were dewaxed and rehydrated when necessary and then submitted to antigen retrieval by heating in 0.01 mol/L Tris-EDTA (pH 9.0) for 2 minutes in a conventional pressure cooker. Double immunofluorescence labeling for ZAP-70 and CD20 was done following the instructions previously described (13, 14).

The staining was examined using an E800 Eclipse fluorescence microscope (Nikon, Kingston-upon-Thames, United Kingdom). Images were captured using an Axiocam CCD camera and Axiovision software (Imaging Associates, Bicester, United Kingdom) and then opened using Adobe Photoshop (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA).

Quantitative real-time RT-PCR of ZAP-70. Total RNA was isolated from 20 B-ALL cases (in eight cases from isolated CD19⁺ cells), purified CD19⁺/CD27⁻, CD19⁺/CD27⁺, and CD19⁻ tonsil cells, normal PBLs, 10 CLL cases, and from cell lines using the guanidinium thiocyanate method (Ultraspec RNA; Biotecx Laboratories, Houston, TX) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1 μg of RNA using 260 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), 26 units of RNase inhibitor (Promega, Madison, WI), and 4.7 μg of random hexanucleotides (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

Quantitative real-time RT-PCR (QRT-PCR) was done with Taqman technology and the ABI PRISM 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City, CA). ZAP-70 primers and Taqman probe (FAM labeled at the 5' end) were used at 300 and 200 nmol/L, respectively. Sequences of primers and the probe can be found at <http://www.idibaps.ub.edu/images/noticias/ZAP70SEQ.pdf>. The Jurkat T-cell line was used as a positive control for expression of ZAP-70, and GUS (β -glucuronidase) expression was used as endogenous control. The cycle threshold values of each sample were used to analyze the data, as the cycle threshold is inversely proportional to the amount of target cDNA. All samples were analyzed in triplicates. The PCR arbitrary units (AU) were defined as the mRNA levels of ZAP-70 normalized to the GUS expression. RNA from Jurkat T cells was used as reference control to normalize ZAP-70/GUS amplification ratios.

ZAP-70 expression was analyzed by QRT-PCR and flow cytometry in 7 B-ALLs and 10 CLLs. Values obtained by both methods were correlated using a regression test. Finally, to assess the influence in ZAP-70 expression of T cells present in B-ALL samples, serial dilutions of Jurkat and JVM-2 (a cell line that did not express ZAP-70; ref. 7) were done and analyzed by QRT-PCR.

Western blotting. Cryopreserved B-ALL cells were thawed and maintained at 37°C and 5% CO₂ in RPMI/10% FCS for 1 hour. Then, cells were washed with RPMI serum-free culture medium and resuspended in 400 μ L of RPMI serum-free. For pervadate treatment, equal volumes of solutions containing 300 mmol/L H₂O₂ and 100

mmol/L NaVO₄ were mixed immediately before use and added to B-ALL cells at a final concentration of 1.5 mmol/L H₂O₂ and 0.5 mmol/L NaVO₄. Cells were incubated for 4 minutes at 37°C, pelleted, and lysed on ice for 30 minutes in lysis buffer containing 20 mmol/L Tris (pH 7.4), 1 mmol/L EDTA, 140 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 2 mmol/L NaVO₄, and 1 \times proteases inhibitor cocktail (Sigma, St Louis, MO). After centrifugation (5 minutes at 13.2 \times 10³ rpm), supernatants were collected and used for Western blot analysis.

Isolated populations from normal tonsils, bone marrow, and PBLs were pelleted and lysed on ice for 30 minutes in lysis buffer, and supernatants were collected by centrifugation.

Cell lysates were subjected to electrophoresis in 10% polyacrylamide gels and transferred to Immobilon-phosphate membranes. Membranes were incubated with the following primary antibodies: anti-phosphotyrosine, anti-phospho-ZAP-70 (Tyr³¹⁹)/phospho-Syk (Tyr³⁵²; Cell Signaling Technology, Beverly, MA); anti-ZAP-70, clone 2F3.2; anti-PLC γ 2; anti-LAT, anti-phospho-LAT (Tyr²²⁶); anti-Lck, clone 3A5; and anti- α -tubulin (all purchased from Upstate). Chemiluminescent images were detected with the LAS-3000 system and analyzed with Image Gauge V4.0 software (Fuji Photo Film Co., Carrollton, TX).

ZAP-70 mutational analysis in B-ALLs. Genomic DNA was isolated from tumoral lymphocytes from four B-ALL patients (two of them with high ZAP-70 expression) using a sodium chloride extraction method (15). The coding region of the ZAP-70 gene (starting at the position -697 bp upstream of the transcription start site and including intronic

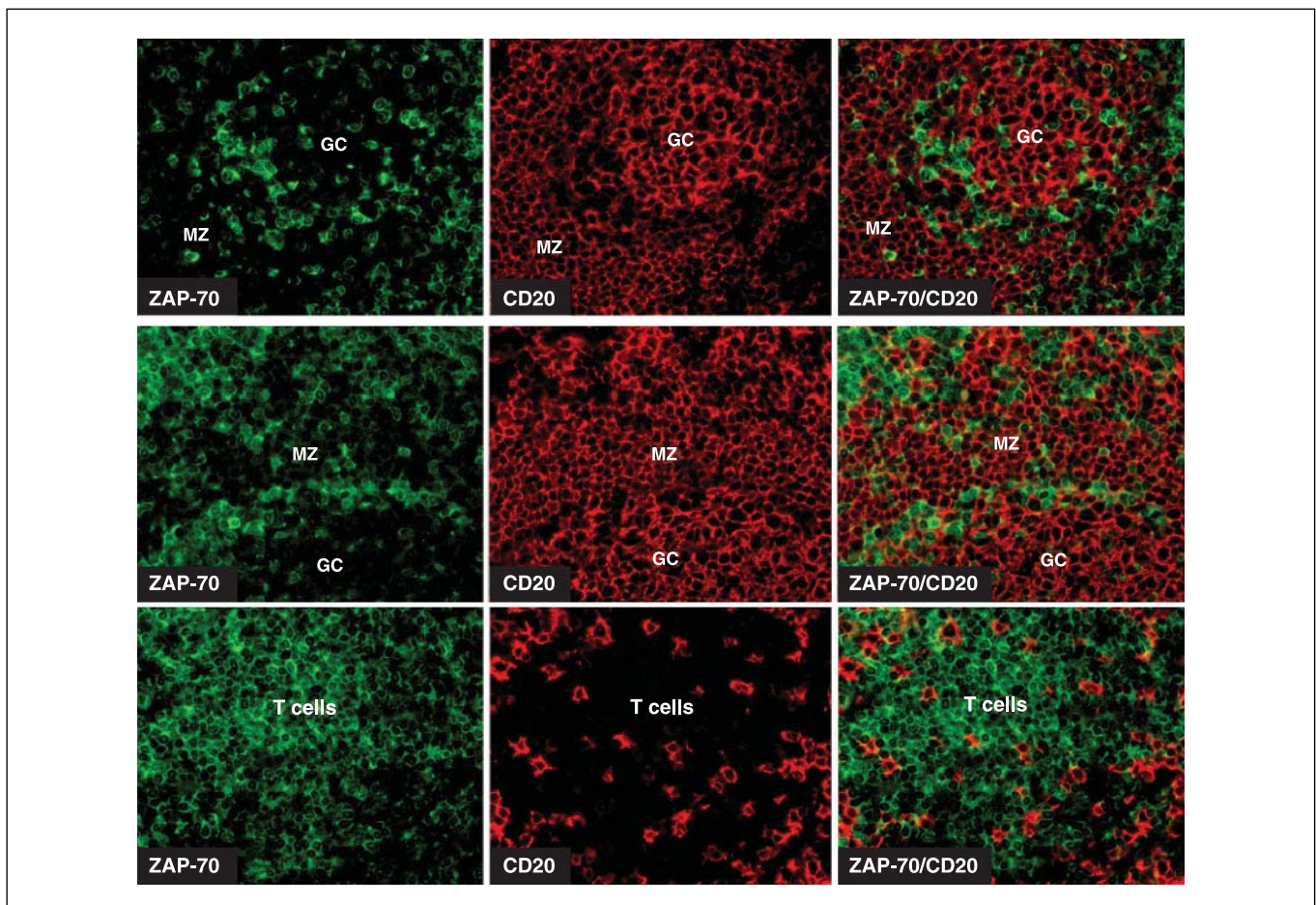


Fig. 2. ZAP-70 expression in normal mature B cells from tonsil sections. Double immunofluorescence labeling for ZAP-70 and CD20 on paraffin sections of human tonsil. Top, ZAP-70 (green) labels scattered cells located in germinal centers (GC) and mantle zone (MZ) of secondary follicles (top left). Top middle, anti-CD20 staining (red) shows that the ZAP-70-positive (green) cells seem to be CD20 negative as can be better observed in the merged image (top right). Middle, at higher magnification, the three images (left, middle, and right) further illustrate the absence of ZAP-70/CD20 double-positive cells. Bottom left, in the interfollicular area, T cells express ZAP-70 (green), whereas large interfollicular B cells and small B lymphocytes are CD20⁺ (red; middle and right).

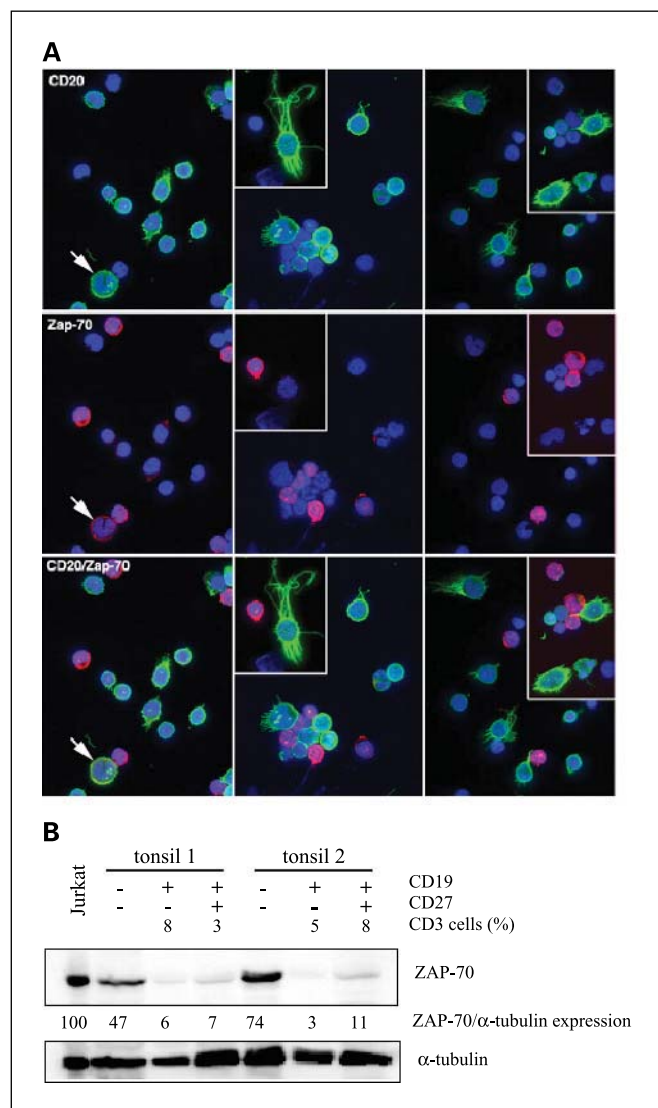


Fig. 3. ZAP-70 expression in cell suspensions from tonsil. **A**, double immunofluorescence labeling for CD20 (green) and ZAP-70 (red) on cell suspensions from tonsil mononuclear cells showing only one double-positive cell (arrow) among >1,000 cells analyzed. **B**, Western blot analysis of CD19⁻, CD19⁺/CD27⁻, and CD19⁺/CD27⁺ subpopulations from two normal tonsils. ZAP-70 relative expression was expressed as a ratio between ZAP-70 and α -tubulin, being the expression in Jurkat T cells the reference. The percentage of CD19⁻ cells contaminating CD19⁺ cell lysates is indicated. ZAP-70 protein was only found in CD19⁻ subfractions, whereas CD19⁺/CD27⁻ and CD19⁺/CD27⁺ populations did not show a significant expression of ZAP-70. The faint band observed in CD19⁺ cells is explained by the T-cell content of the samples, as is reflected in the ratios of expression.

flanking regions) was amplified by PCR (see <http://www.idibaps.ub.edu/images/noticias/ZAP70SEQ.pdf>). PCR products were purified and directly sequenced from both strands using the Big Dye Terminator Cycle sequencing V3.1 Ready Reaction. Sequence analysis and alignments were done using the *Blast 2 sequences* tool (16).

Results

ZAP-70 expression in normal B-cell subsets. ZAP-70 protein was analyzed by flow cytometry in pro/pre B cells (CD19⁺/CD10⁺/CD20⁻ or CD19⁺/CD34⁺) and in CD19⁺/CD20⁺/CD34⁻/CD10⁻ (mature) B-cell subpopulations from eight

normal bone marrows. Among the different B-cell subsets analyzed, expression of ZAP-70 was found to be higher in pro/pre B cells (CD19⁺/CD10⁺ or CD19⁺/CD34⁺) than in mature B cells (CD19⁺/CD34⁻/CD10⁻; Fig. 1A and B). The analysis of mean fluorescence intensity showed that ZAP-70 ratios between T cells and pro/pre B cells were lower than ratios between T cells and mature B cells (3.72 versus 5.51, respectively; *P* = 0.002; data not shown). To confirm these results and to exclude the possibility of a nonspecific staining of ZAP-70 in the different B-cell subsets, CD19⁺/CD10⁺ cells from bone marrow were isolated and ZAP-70 expression analyzed by Western blotting. With this method, expression of ZAP-70 was confirmed in CD19⁺/CD10⁺ purified cells. (Fig. 1C). Unfortunately, analysis of ZAP-70 in the CD19⁺/CD34⁺ subset was not done due to the low number of recovered cells.

ZAP-70 expression was then analyzed in mature B cells derived from normal tonsil. In CD19⁺/CD27⁻ and CD19⁺/CD27⁺ cells from tonsil, levels of ZAP-70 expression obtained by QRT-PCR were as low as the negative controls, whereas in CD19⁻ cells, the expression was similar to PBLs (Table 1). Furthermore, tonsil slides and cell suspension were analyzed using immunofluorescence with anti-ZAP-70 and anti-CD20 double staining. Again, ZAP-70 was found expressed in T-cell areas, whereas no mature B cells in germinal center, mantle zone or marginal zone, were positively stained with ZAP-70 (Fig. 2). In addition, immunoblot analysis done on protein extracts obtained from these subsets did not detect a significant presence of ZAP-70 protein (Fig. 3). Moreover,

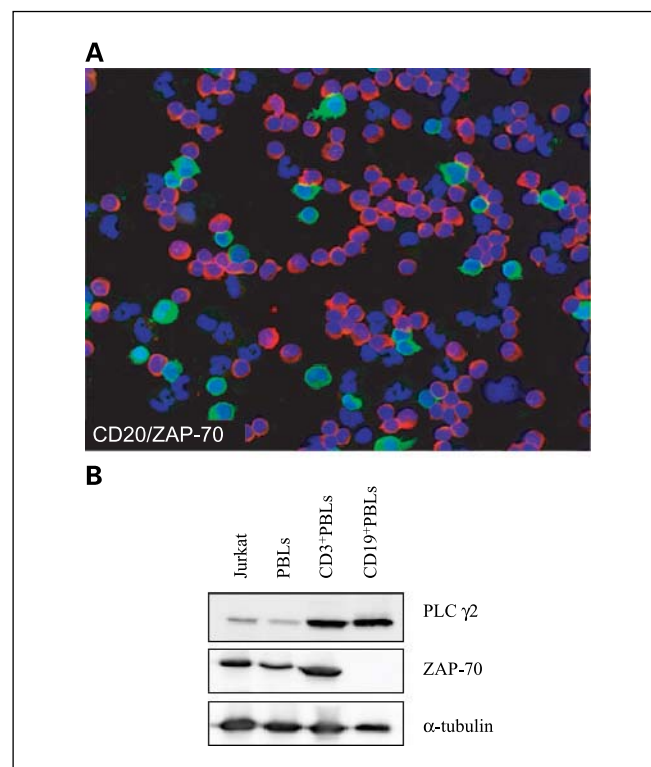


Fig. 4. ZAP-70 expression in mature B cells from peripheral blood. ZAP-70 expression was analyzed in normal PBLs by immunofluorescence and Western blot. **A**, immunofluorescence analysis using ZAP-70/CD20 staining did not disclose the presence of double-positive cells. **B**, immunoblots of CD19⁺ selected cells did not show ZAP-70 expression, opposite to the intensity of expression observed in Jurkat, PBLs, and selected CD3⁺ cells.

double staining of tonsil cell suspensions detected only one double-positive cell for CD20 and ZAP-70 among >1,000 cells analyzed (Fig. 3).

ZAP-70 expression was analyzed in normal PBLs by immunofluorescence and Western blot. Immunofluorescence analysis did not detect cells with double-positive staining of ZAP-70 and CD20. These results were confirmed by Western blot analysis of CD19⁺ purified cells (Fig. 4).

ZAP-70 expression in B-ALLs. B-ALLs are aggressive neoplasms that derive from B cells with pro/pre B phenotype (B-I, B-II, B-III) or from mature germinal center B cells (B-IV and/or Burkitt/ALL). Because we found ZAP-70 expression in normal CD34⁺ or CD10⁺ B cells, the analysis of its expression was then done in a series of 29 B-ALL cases at different status of maturation.

ZAP-70 expression was ascertained by FC in 16 cases, by QRT-PCR in 20 cases, and by both methods in seven cases. The flow cytometry analysis of primary B-ALL cells disclosed a high expression of ZAP-70 in 12 of 16 cases (average expression, 80%; range, 56-99%; Table 1; Fig. 5), whereas in the remaining cases, the expression was considered low (average expression, 7%; range, 1-14%).

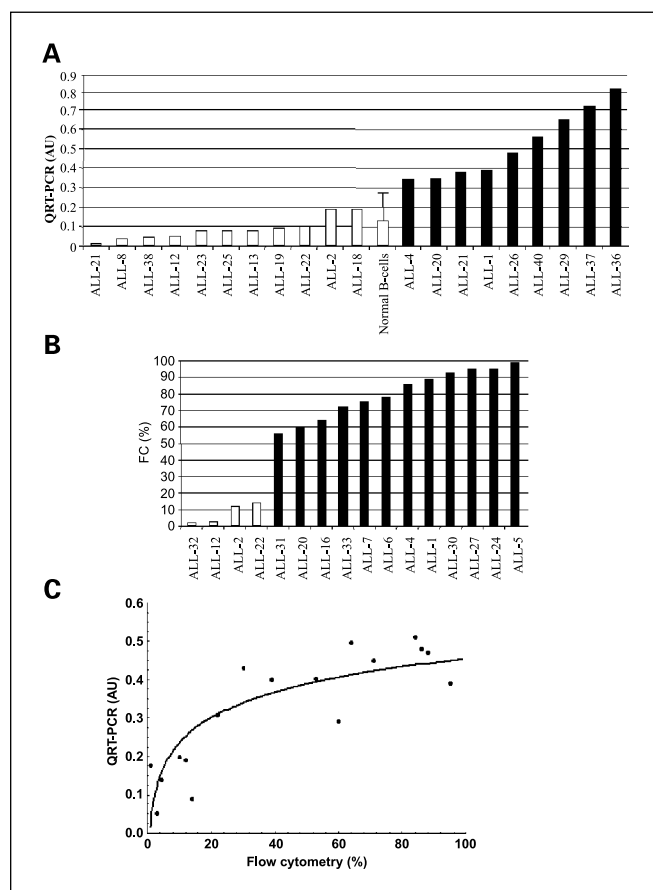


Fig. 5. Quantitative analyses of ZAP-70 expression in B-ALLs. **A**, QRT-PCR analysis of 20 B-ALL cases. Nine cases (black columns) exhibited levels of ZAP-70 mRNA superior to those obtained in normal mature B cells. Bar, 3 SD. **B**, flow cytometry analysis of 16 B-ALL samples. In 12 cases (black columns), ZAP-70 protein values were high. **C**, correlation between QRT-PCR and flow cytometry analysis of ZAP-70 expression in B-ALLs and CLLs samples. There was a logarithmic correlation between both methods ($R^2 = 0.7$; $P < 0.0001$; see also **A** and **B**).

Expression of ZAP-70 was also analyzed by QRT-PCR in 20 B-ALLs cases. To rule out the influence of contaminating T cells in non-CD19⁺-purified cases, two different strategies were done: ZAP-70 expression analysis in serial dilutions of T cells and a ZAP-70 nonexpressing cell line (Jurkat and JVM-2), and comparison of the values obtained before and after B-cell purification in eight B-ALL cases. Using these approaches, we found that the presence of <10% of T cells did not significantly influence the values of ZAP-70 expression (data not shown). Consequently, when CD19⁺ purification was not possible, only the B-ALL cases with a total number of T and natural killer cells <10% were included in the analysis.

Normal B cells and ZAP-70 nonexpressing cell lines exhibited a mean relative expression of 0.042 AU (SD, ± 0.052 AU). Therefore, values of QRT-PCR above 0.20 AU (average ± 3 SDs) were considered as having high relative levels of ZAP-70 expression. With this cutoff, 9 of 20 B-ALLs showed high levels of ZAP-70 expression (range, 0.34-0.81 AU), whereas in the remaining cases, these levels were similar to normal B cells (range, 0.01-0.19 AU; Table 1; Fig. 5). Of note, in 7 B-ALL cases and in 10 CLL cases in which ZAP-70 expression was analyzed by QRT-PCR and flow cytometry, there was a logarithmic correlation between both methods ($R^2 = 0.7$; $P < 0.0001$; Fig. 5).

Overall, we found a high expression of ZAP-70 in 13 of 23 (56%) B-ALLs with pro/pre B phenotype. Moreover, four of six Burkitt/ALL disclosed increased expression of ZAP-70. The levels of ZAP-70 in these Burkitt/ALL cases were found in the higher range of the series.

ZAP-70 expression and clinicobiological variables in B-ALLs. No relationship was observed between ZAP-70 expression levels and the maturation status of the B-ALLs or the detected genetic abnormalities, including the presence of bcr/abl rearrangement (Table 1). Of note, all the cases with high ZAP-70 expression showed increased expression of CD38, whereas the three cases with low CD38 disclosed low levels of ZAP-70 (Fisher's exact test, $P = 0.05$).

Twenty patients diagnosed with B-ALL were evaluable for prognosis. Cases with a lymphoid blast crisis of a chronic myelogenous leukemia, Burkitt's lymphoma, or without enough clinical data were not included in the analysis. There was no correlation between ZAP-70 expression and response to the induction treatment (data not shown). As per the duration of response and survival, the series was too heterogeneous to perform a meaningful analysis, because the great majority of patients diagnosed with B-ALL bcr/abl⁺ underwent allogeneic transplant, for this reason being not comparable with the rest of the patients from this series.

Mutational analysis of ZAP-70 in B-ALLs. Different point mutations in the exons 3, 12, and 13 of the ZAP-70 gene have been shown to cause deficient ZAP-70 protein expression in human T cells, leading to absence of peripheral CD8⁺ T cells and/or different forms of severe combined immunodeficiency (2, 3, 17-19). To rule out the presence of mutations in the coding portion of the ZAP-70 gene in B-ALLs not expressing ZAP-70, sequencing of the 5'-untranslated region, coding, and adjoining intronic regions was done, and the sequences were compared with the wild-type sequence (Genbank accession no. L05148.1). The mutational analysis did not reveal the presence of mutations, deletions, or insertions in B-ALL cases

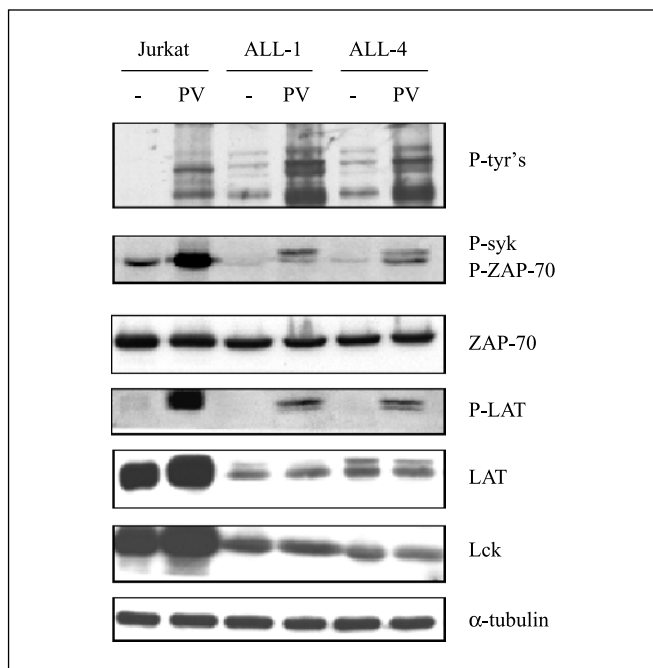


Fig. 6. Western blot analysis of the expression of proteins involved in pre-BCR signaling in B-ALL cells. Two representative B-ALL cases that expressed ZAP-70 (ALL-1 and ALL-4) were analyzed. The Jurkat cell line was used as positive control for ZAP-70 expression. Cells were treated with pervanadate (PV), a broad phosphatase inhibitor, to analyze the phosphorylation status of different proteins analyzed. Expression of α -tubulin was determined as a control of protein load. Expression of P-ZAP-70, P-Syk, ZAP-70, P-LAT, LAT, and Lck in B-ALL cells was analyzed using direct antibodies. ZAP-70 protein was found to be significantly phosphorylated at Tyr³¹⁹ and Syk in Tyr³⁵² in B-ALL cells. Moreover, LAT was phosphorylated at Tyr²²⁶ upon treatment with pervanadate. The Src-kinase Lck, required for ZAP-70 signaling, was expressed in all the cases analyzed. Analysis of phosphotyrosines (P-tyr's) in the high molecular weight area of each blot was done to control pervanadate treatment.

with low ZAP-70 expression. Three polymorphisms already described (see <http://www.idibaps.ub.edu/images/noticias/ZAP70SEQ.pdf>) were found in both ZAP-70 expressing and nonexpressing B-ALLs.

ZAP-70 phosphorylation and pre-TCR/TCR pathway in B-ALL cases. To determine whether ZAP-70 protein was phosphorylated in B-ALL cells, Western blot analysis was done using an anti-phospho-ZAP-70/phospho-Syk antibody that detects a phosphorylated-active ZAP-70 protein (P-ZAP-70) at the Tyr³¹⁹ residue, and the orthologous Tyr³⁵² residue in Syk (P-Syk). These residues are required for the assembly of a signaling complex that leads to the activation of the PLC γ 1-dependent and Ras-dependent signaling cascades (20, 21). Syk protein is the other member of the Syk/ZAP-70 family normally expressed in cells of B-cell lineage that is required for the pre-BCR/BCR signaling (22–24). To rule out an alternate expression between Syk and ZAP-70 in B-ALL, the expression and the phosphorylation status of Syk protein was also analyzed in B-ALL cells. Western blot of total cell lysates revealed that Syk was expressed in all the samples analyzed, including cases with low ZAP-70 expression (data not shown). In untreated B-ALL cells, Western blot analysis revealed that neither ZAP-70 nor Syk were constitutively activated. Treatment of these cells with pervanadate, a broad phosphatase inhibitor (25), significantly increased the intensity of ZAP-70 and Syk phosphorylation (Fig. 6). Interestingly, Lck protein, a Src-kinase required for

ZAP-70 kinase phosphorylation activity (4, 26, 27), was detected in all B-ALL cases (Fig. 6).

Different signaling elements belonging to the pre-TCR/TCR signal pathway have been described in human and mice pro/pre B cells and B-ALL cells (28–30). One of these elements is the linker for activation of T cells (LAT) protein (27–29, 31–33), a transmembrane adapter molecule expressed in T cells but not in normal mature B cells. In CD19⁺-purified B-ALL cells, we found that LAT was expressed in all the cases, confirming the results previously reported in normal pro/pre B cells (28, 29). Tyr²²⁶ residue of LAT becomes phosphorylated in T cells following TCR engagement (32, 34, 35). Using an anti-P-LAT antibody, this residue proved to be phosphorylated upon pervanadate stimulation (Fig. 6). These results showed the presence of other pre-TCR/TCR signaling elements in B-ALLs apart from ZAP-70.

Discussion

ZAP-70, a tyrosine kinase of the Syk/ZAP-70 family that plays a critical role in the signal transduction from the TCR, has been reported to be expressed in T and natural killer derived cells (1–3). Recently, ZAP-70 expression has been shown to be expressed in mice pro/pre B cells, its presence being important for B-cell development (11). Surprisingly, ZAP-70 expression has also been found in a mature B-cell-derived neoplasm as CLL (6), particularly in cases with unmutated IgV_H genes (7–9), where it seems to contribute to enhancing the signal from the BCR (10). These results pose the question whether ZAP-70 expression in CLL is an aberrant phenomenon related to the neoplasm or is a reflection of a normal B-cell counterpart of CLL expressing ZAP-70. The abovementioned results prompted us to analyze ZAP-70 expression in different human B-cell subsets and B-ALLs. Among normal B cells, ZAP-70 was only found expressed in CD34⁺ or CD10⁺ B cells, whereas no expression was observed in mature B-cell subsets from bone marrow, tonsil, and peripheral blood. Moreover, the expression of ZAP-70 protein found in CD34⁺ or CD10⁺ B cells obtained by flow cytometry and Western blot was inferior to that in T cells, in accordance to the results found in mice pro/pre B cells (11). Although expected, ZAP-70 expression in human pro/pre B cells has not been previously reported. Thus, recent gene expression profile done on pro/pre B cells did not clarify whether ZAP-70 was expressed (30).

Our results reasonably rule out the possibility of the existence of a significant proportion of mature B cells expressing ZAP-70. In this sense, expression of ZAP-70 in normal mature B cells has not been reported because this gene was cloned and found to be expressed only in cell lines of T or natural killer lineage (1). Thus, we and others showed that ZAP-70 is expressed in pro/pre B cells from mice and human but not in mature B cells. The expression found in mice splenic cells was attributed to mature B cells, but these cells were not phenotypically characterized and would correspond to immature B cells transiting to the spleen. In addition to that, we previously found the lack of ZAP-70 expression in normal CD5⁺ or CD5⁻ B cells from peripheral blood (7). Furthermore, in a recently published report (36), it was found ZAP-70 expression in a very low percentage of mature B cells from different tissues. Although an overinterpretation of ZAP-70 intensity and/or T-cell contamination could not be completely

excluded in that article, it is also possible that in our report, even with the use of several and sensitive methods, a small percentage of B cells expressing ZAP-70 was not detected, as we observed a <0.1% B cells expressing ZAP-70 in tonsil.

ZAP-70 expression was found in 56% of B-ALL cases analyzed with pro/pre B phenotype. This is probably a consequence of the cell of origin of these neoplasms, as we found ZAP-70 expressed in normal pro/pre B cells. ZAP-70 expression was also analyzed in a small series of patients recently analyzed (37). In this report, a expression of ZAP-70 was found in all the cases analyzed, opposite to our results and to those recently published, in which ZAP-70 expression was analyzed by oligonucleotide arrays (38). In the later report, it was found an important correlation between ZAP-70 expression and the relapse rate (38). This analysis, however, was done in a series of cases without relevant genetic abnormalities (38). The series of patients herein reported was too heterogeneous in terms of genetic abnormalities and given therapy to analyze the clinical effect of ZAP-70 expression.

There is no clear explanation for the lack of ZAP-70 expression, found at both mRNA and protein levels, in some cases of pro/pre B-ALLs. In this sense, we did not observe mutations in the coding or 5'-untranslated region regions of the gene, as has been described in severe combined immunodeficiencies (2, 3, 17–19). In this sense, the lack of expression of ZAP-70 found in some B-ALL cases could be related to other pre-BCR signaling defects also described in this leukemia, similar to the lack of expression of SLP-65 or Syk reported in some B-ALL cases (39, 40).

Expression of other components of the pre-TCR/TCR signaling cascade, like LAT and SLP-76, has been found in mice and human pro/pre B cells. These proteins are probably acting as functionally redundant signaling molecules to the pre-BCR components (28, 29) to ensure maximum efficiency of its signal transduction. In our study, in B-ALLs ZAP-70 and Syk were found phosphorylated at the Tyr³¹⁹ residue and at the Tyr³⁵² residue, respectively. In addition, LAT, P-LAT, and the Src-kinase Lck were also found in all the B-ALL cases analyzed. These findings point out that ZAP-70, when expressed, is

functionally active in B-ALL cells. In this setting, our finding of pre-TCR/TCR signaling elements in pro/pre B-ALL cells is in agreement with the hypothesis of the usage of pre-TCR/TCR signaling elements by the pre-BCR (28).

Interestingly, ZAP-70 expression was observed in Burkitt/ALL cases with the t(8;14)(q24;q32) at the highest levels observed among B-ALLs and CLLs (7). In accordance to this, we and others recently described ZAP-70 expression in a variable percentage of Burkitt's lymphomas (41–43), suggesting that this gene could play a role in the pathogenesis of this disease. The expression of ZAP-70 found in Burkitt and in 50% of CLL cases (7) suggests that this gene is aberrantly expressed in mature B-cell-derived neoplasms, as we did not observe ZAP-70 expression in normal mature B cells. Increased expression of ZAP-70 in a mature neoplasm like CLL correlates with an adverse behavior of the disease (7). Further investigations are warranted to determine whether ZAP-70 expression in Burkitt's lymphoma is associated with particular clinical and biological features.

In conclusion, this study shows that ZAP-70 was expressed in normal human pro/pre B cells but not in normal mature B cells. ZAP-70 expression was also found in one half of the B-ALLs analyzed, probably reflecting the lineage origin of such cases. In addition, other elements of the pre-TCR/TCR signaling cascade were found to be both expressed and phosphorylated in B-ALLs. Finally, the absence of ZAP-70 in normal mature B cells suggests that the expression observed in mature B-cell-derived neoplasms with different cellular origin, such as Burkitt/ALL and CLL reflects an aberrant phenomenon. Further investigations focused on the mechanisms regulating ZAP-70 expression in mature B-cell neoplasms are warranted.

Acknowledgments

We thank Drs. Assumpcio Cuchi (Department of Otorhinolaryngology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain), Pablo Engel (Department of Cellular Biology and Pathology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain), and J. Sabin (Department of Otorhinolaryngology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain) for providing us with the tonsil samples, Dr. Riccardo Dalla-Favera for the critical review of the article, and Eoin McGrath for his assistance in the preparation of the article.

References

- Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 1992;71:649–62.
- Arpaia E, Shahar M, Dadi H, Cohen A, Roifman CM. Defective T cell receptor signaling and CD8⁺ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* 1994; 76:947–58.
- Chan AC, Kadlecck TA, Elder ME, et al. ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* 1994;264: 1599–601.
- Ashe JM, Wiest DL, Abe R, Singer A. ZAP-70 protein promotes tyrosine phosphorylation of T cell receptor signaling motifs (ITAMs) in immature CD4(+)8(+) thymocytes with limiting p56(lck). *J Exp Med* 1999; 189:1163–8.
- Kong G, Dalton M, Wardenburg JB, Straus D, Kurosaki T, Chan AC. Distinct tyrosine phosphorylation sites in ZAP-70 mediate activation and negative regulation of antigen receptor function. *Mol Cell Biol* 1996;16:5026–35.
- Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995;333:1052–7.
- Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:1764–75.
- Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003;101:4944–51.
- Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004;363:105–11.
- Chen L, Widhopf G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:4609–14.
- Schweighoffer E, Vanes L, Mathiot A, Nakamura T, Tybulewicz VL. Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion. *Immunity* 2003;18:523–33.
- van Dongen JJ. Proposals for immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995;9: 2149–50.
- Marafioti T, Jones M, Facchetti F, et al. Phenotype and genotype of interfollicular large B cells, a subpopulation of lymphocytes often with dendritic morphology. *Blood* 2003;102:2868–76.
- Mason DY, Micklem K, Jones M. Double immunofluorescence labelling of routinely processed paraffin sections. *J Pathol* 2000;191:452–61.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
- Tatusova TA, Madden TL. "Blast 2 sequences: a new tool for comparing protein and nucleotide sequences". *FEMS Microbiol Lett* 1999;174:247–50.
- Elder ME, Lin D, Clever J, et al. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* 1994;264: 1596–9.
- Toyabe S, Watanabe A, Harada W, Karasawa T, Uchiyama M. Specific immunoglobulin E responses in ZAP-70-deficient patients are mediated by Syk-dependent T-cell receptor signalling. *Immunology* 2001; 103:164–71.
- Elder ME, Skoda-Smith S, Kadlecck TA, Wang F, Wu J, Weiss A. Distinct T cell developmental consequences in humans and mice expressing identical mutations in the DLAARN motif of ZAP-70. *J Immunol* 2001;166:656–61.
- Williams BL, Irvin BJ, Sutor SL, et al. Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen

- receptor-dependent phospholipase C-gamma1 and Ras activation. *EMBO J* 1999;18:1832–44.
21. Law CL, Chandran KA, Sidorenko SP, Clark EA. Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol Cell Biol* 1996;16:1305–15.
 22. Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 1995;378:303–6.
 23. Kurosaki T. Molecular mechanisms in B cell antigen receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 1997;9:309–18.
 24. Zhang J, Berenstein E, Siraganian RP. Phosphorylation of Tyr342 in the linker region of Syk is critical for Fc epsilon RI signaling in mast cells. *Mol Cell Biol* 2002;22:8144–54.
 25. Secrist JP, Burns LA, Karnitz L, Koretzky GA, Abraham RT. Stimulatory effects of the protein tyrosine phosphatase inhibitor, pervanadate, on T-cell activation events. *J Biol Chem* 1993;268:5886–93.
 26. Latour S, Veillette A. Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Curr Opin Immunol* 2001;13:299–306.
 27. Kolanus W, Romeo C, Seed B. T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell* 1993;74:171–83.
 28. Su YW, Jumaa H. LAT links the pre-BCR to calcium signaling. *Immunity* 2003;19:295–305.
 29. Oya K, Wang J, Watanabe Y, Koga R, Watanabe T. Appearance of the LAT protein at an early stage of B-cell development and its possible role. *Immunology* 2003;109:351–9.
 30. Terskikh AV, Miyamoto T, Chang C, Diatchenko L, Weissman IL. Gene expression analysis of purified hematopoietic stem cells and committed progenitors. *Blood* 2003;102:94–101.
 31. Finco TS, Kadlecsek T, Zhang W, Samelson LE, Weiss A. LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* 1998;9:617–26.
 32. Lin J, Weiss A. Identification of the minimal tyrosine residues required for linker for activation of T cell function. *J Biol Chem* 2001;276:29588–95.
 33. Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, Triple RP, Samelson LE. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 1998;92:83–92.
 34. Zhang W, Triple RP, Zhu M, Liu SK, McGlade CJ, Samelson LE. Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling. *J Biol Chem* 2000;275:23355–61.
 35. Paz PE, Wang S, Clarke H, Lu X, Stokoe D, Abo A. Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells. *Biochem J* 2001;356:461–71.
 36. Nolz JC, Tschumper RC, Pittner BT, Darce JR, Kay NE, Jelinek DF. ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. *Leukemia* 2005;19:1018–24.
 37. Guillaume N, Alleaume C, Munfus D, et al. ZAP-70 tyrosine kinase is constitutively expressed and phosphorylated in B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells. *Haematologica* 2005;90:899–905.
 38. Chiaretti S, Guarini A, De Propriis MS, et al. ZAP-70 expression in acute lymphoblastic leukemia: association with the E2A/PBX1 re-arrangement and the pre-B stage of differentiation, and prognostic implications. *Blood* 2005;107:197–204.
 39. Goodman PA, Wood CM, Vassilev A, Mao C, Uckun FM. Spleen tyrosine kinase (Syk) deficiency in childhood pro-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* 2001;20:3969–78.
 40. Jumaa H, Bossaller L, Portugal K, et al. Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2003;423:452–6.
 41. Admirand JH, Rassidakis GZ, Abruzzo LV, et al. Immunohistochemical detection of ZAP-70 in 341 cases of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Mod Pathol* 2004;17:954–61.
 42. Sup SJ, Domiati-Saad R, Kelley TW, Steinle R, Zhao X, Hsi ED. ZAP-70 expression in B-cell hematologic malignancy is not limited to CLL/SLL. *Am J Clin Pathol* 2004;122:582–7.
 43. Carreras J, Villamor N, Colomo L, et al. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. *J Pathol* 2005;205:507–13.

IV. DISCUSSIÓ

Els treballs que componen aquesta tesi doctoral han permès descriure l'expressió de la proteïna ZAP-70 en limfòcits B, tant normals com neoplàsics, a diferents estadis de maduració. D'entre totes les subpoblacions de limfòcits B normals analitzades per diversos mètodes (Western blot, immunofluorescència, RT-PCR quantitativa i citometria de fluxe) només es va detectar expressió de ZAP-70 en limfòcits amb fenotip pro/pre-B. No es va trobar cap població de limfòcits B madurs provenint de sang perifèrica, moll de l'ós o amígdala amb una expressió significativa de ZAP-70. Contràriament als resultats obtinguts en limfòcits B normals, en els limfòcits B neoplàsics analitzats trobem expressió de ZAP-70 tant en limfòcits amb fenotip pro/pre-B (cèl·lules de leucèmia aguda limfoblàstica B) com en neoplàsies derivades de limfòcits B madurs (leucèmia limfàtica crònica i limfoma de Burkitt) en proporcions variables.

Expressió de la proteïna ZAP-70 en la leucèmia limfàtica crònica

En la LLC, l'expressió de la proteïna ZAP-70 té actualment un doble significat. Per una banda, el fet de que en limfòcits B madurs normals no trobem expressió de ZAP-70 ens indica que l'expressió de ZAP-70 en LLC es probablement deguda a un fenomen aberrant relacionat amb la transformació neoplàsica que han patit aquestes cèl·lules. Per una altra banda, des del punt de vista de l'àmbit clínic, en aquesta tesi doctoral es demostra que l'expressió de ZAP-70 és un bon indicador de l'estat mutacional del segment V_H de la regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines i, a més d'això, és un factor pronòstic independent.

La LLC és una malaltia heterogènia en quant a l'evolució i pronòstic dels malalts. En termes generals, es pot distingir entre una forma estable i una forma progressiva de la malaltia. Fins al dia d'avui s'han identificat diferents paràmetres que permeten avaluar la probabilitat de progressió de la malaltia. Aquests inclouen característiques clíniques, dades analítiques i histològiques i marcadors sèrics. Actualment, els que tenen major rellevància són l'estat mutacional de les immunoglobulines^{113,114} i l'expressió del marcador de superfície CD38, el qual es postulà inicialment com un indicador de l'estat mutacional de les immunoglobulines¹⁴⁷. Aquests factors pronòstic tenen l'avantatge de que distribueixen els pacients en dos grups ben diferenciats amb l'ús d'un únic paràmetre. L'obtenció de l'estat mutacional de les immunoglobulines és una tècnica complexa i de llarga durada que no es troba sempre disponible als laboratoris que diagnostiquen LLC i, per tant, no aplicable de forma sistemàtica. Per contra, l'expressió de CD38 es determina per citometria de fluxe i és relativament fàcil d'obtenir. No obstant, diferents treballs demostren que la seva expressió no és estable al llarg del curs de la malaltia i qüestionen el seu valor com a indicador de l'estat mutacional de les immunoglobulines, encara que s'ha demostrat que té valor pronòstic independent^{148,149}.

Els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral confirmen que les cèl·lules de LLC que tenen els gens de les immunoglobulines no mutats expressen nivells alts de ZAP-70 analitzada per citometria de fluxe (superior o igual al vint per cent), mentre que les cèl·lules de LLC amb gens de les immunoglobulines mutats expressen nivells

baixos de ZAP-70 (inferiors al vint per cent). La detecció de la proteïna ZAP-70 per citometria de fluxe va revelar que cap dels pacients que presentaven alta expressió de ZAP-70 tenien mutacions a les immunoglobulines, mentre que tots els que tenien baixa expressió de ZAP-70 excepte tres, presentaven signes d'hipermutació somàtica als gens de les immunoglobulines. A més a més, el nivell d'expressió de ZAP-70 no variava al llarg del temps d'evolució de la malaltia. De manera independent, la ZAP-70 té valor pronòstic, ja que una alta expressió de ZAP-70 estava associada a una ràpida progressió de la malaltia i a una supervivència més curta.

L'anàlisi de ZAP-70 per citometria de fluxe descrit en aquesta tesi doctoral és un mètode sensible i específic per a inferir l'estat mutacional de les immunoglobulines i per a determinar el pronòstic de la malaltia. Aquest és un mètode que es pot posar a punt en els laboratoris generals de manera ràpida i immediata. Els mecanismes responsables de la relació entre l'expressió de ZAP-70 i l'estat mutacional de les immunoglobulines es desconeixen actualment. De igual manera, no tenim una explicació per a l'existència de tres malalts amb dades discordants d'expressió de ZAP-70 i de presència de mutacions a IgV_H.

L'ús de la citometria de fluxe per a determinar el nivell d'expressió de la proteïna ZAP-70 ofereix diferents avantatges davant d'altres mètodes d'anàlisi. Amb aquesta tècnica, es pot analitzar l'expressió de la proteïna en les diferents subpoblacions de limfòcits presents a la sang perifèrica dels malalts: cèl·lules de LLC, limfòcits B normals i limfòcits T i NK. Per contra, l'ús de tècniques alternatives com el Western blot o la RT-PCR quantitativa pot sobreestimar el nivell d'expressió

de la ZAP-70 per part de les cèl·lules de LLC, a causa de la presència de limfòcits T i NK a la mostra^{116,148,267}. En el cas de fer servir alguna d'aquestes tècniques, cal la purificació prèvia a l'anàlisi dels limfòcits de LLC de les mostres (limfòcits CD19 i CD5 positius), amb el que la complexitat, cost i durada de la tècnica s'incrementa de manera considerable.

Expressió de la proteïna ZAP-70 en leucèmies agudes limfoblàstiques B

La LAL-B és una neoplàsia causada per la proliferació i cúmul de precursors de limfòcits B aturats a diferents estadis del desenvolupament. Hem trobat expressió de ZAP-70 en un cinquanta-sis per cent dels casos amb fenotip pro/pre-B analitzats. Aquest fet probablement ens està indicant l'origen cel·lular d'aquesta malaltia, ja que també hem trobat expressió de ZAP-70 en limfòcits pro/pre-B normals, tal i com anteriorment s'havia descrit en ratolins³⁶. Curiosament, però, no el cent per cent dels malalts amb LAL-B expressaven ZAP-70, com caldria esperar. En la sèrie de pacients estudiada en aquesta tesi, no hem pogut trobar una relació entre l'estadi maduratiu dels limfòcits neoplàsics i els nivells d'expressió de ZAP-70; no obstant això, la sèrie de la qual disposàvem era bastant heterogènia i la majoria dels casos corresponien a estadis LAL-B II o LAL comú. En un treball publicat recentment es troba una important correlació entre l'expressió de ZAP-70 analitzada per microarrays d'oligonucleòtids i la ràtio de recaiguda dels malalts³⁷.

El fet de que alguns casos de LAL-B no expressin ZAP-70 (ni a nivell de proteïna ni a nivell de RNA missatger) no té actualment una clara explicació. Pel que fa a aquesta manca d'expressió, no hem observat mutacions en la zona codificant o en la zona 5' no traduïda del gen de la *zap-70*, mutacions descrites prèviament i que causen pèrdua d'expressió del gen *zap-70* que té com a conseqüència l'aparició de diferents formes de immunodeficiències combinades severes²⁶⁸⁻²⁷². De totes maneres, i en relació a això, l'absència d'altres proteïnes senyalitzadores de la via de senyalització del pre-BCR ha estat descrita amb anterioritat en alguns casos de LAL-B, com per exemple manca d'expressió de SLP-65 o SYK^{273,274}.

Estudi de la via de senyalització del pre-BCR en LALs

La senyalització a través del pre-BCR en limfòcits pro/pre-B normals és un dels punts de control més importants en el desenvolupament, ja que permet comprovar la funcionalitat de la cadena pesada recentment reordenada^{26,27} i del seu correcte funcionament depèn la continuïtat del desenvolupament d'aquests limfòcits. A més de la ZAP-70, també s'ha descrit la col·laboració d'altres proteïnes de la cascada de senyalització del pre-TCR/TCR en aquesta via, com per exemple LAT i SLP-76. Aquestes proteïnes en els limfòcits pro/pre-B probablement tenen una funció redundat en la cascada de senyalització del pre-BCR; d'aquesta manera s'asseguraria la màxima eficiència de transducció de senyal^{37,38}. En aquest treball, hem estudiat l'expressió i l'estat de fosforilació de diferents proteïnes d'aquesta via de senyalització en cèl·lules de LAL amb fenotip pro/pre-B. L'estudi de la fosforilació

es va fer tractant les mostres amb un potent inhibidor de les fosfatases, ja que els mecanismes que desencadenen la senyalització a través del pre-BCR no estan encara definits²⁹⁻³². Les proteïnes ZAP-70 i SYK es trobaven fosforilades als residus tirosina 319 i tirosina 352 respectivament, fenòmens que indiquen activació d'aquests enzims^{252,275,276}. A més a més, també es va trobar l'expressió de la proteïna LAT, la seva forma activa fosforilada i l'expressió de la SRC-quinasa LCK, la qual és necessària per a la completa activació de la ZAP-70²⁷⁷. Tots aquests resultats indiquen que la proteïna ZAP-70, en aquells casos de LAL-B en els quals es troba expressada, és activa funcionalment. La nostra troballa d'elements senyalitzadors propis de la via del pre-TCR/TCR en cèl·lules de llinatge pro/pre-B està en concordància amb la hipòtesi anteriorment descrita de l'ús d'elements d'aquesta via per part del pre-BCR per tant d'assegurar una bona eficiència de senyalització, crucial per a la supervivència i proliferació dels limfòcits pro/pre-B³⁷.

Expressió de la proteïna ZAP-70 en leucèmies/limfomes de Burkitt

La leucèmia/limfoma de Burkitt és una malaltia que té el seu origen en limfòcits B madurs, probablement amb origen al centre germinal^{189,190}. Totes les cèl·lules d'aquesta malaltia presenten la translocació del proto-oncogen *c-myc* (banda q24 del cromosoma 8), fet que comporta la seva sobreexpressió i desregulació^{198,199}. Els resultats presentats en aquesta tesi doctoral mostren l'expressió de la proteïna ZAP-70 en quatre de sis casos de leucèmia/limfoma de Burkitt, els quals tenien tots la translocació t(8;14)(q24;q32) (*c-myc* en juxtaposició a

la cadena pesada de les immunoglobulines). Els nivells d'expressió de ZAP-70 que presenten aquests casos, es troben entre els més elevats d'entre totes les LAL-B i LLC analitzades pel nostre grup fins ara. De manera concordant, recentment en un altre treball del nostre grup i en d'altres treballs basats en l'anàlisi de ZAP-70 per immunohistoquímica en biòpsies de limfomes, es troba expressió de ZAP-70 en un percentatge variable de limfomes de Burkitt²⁷⁸⁻²⁸⁰. Totes aquestes dades suggereixen que la ZAP-70 podria jugar un paper en la patogènesi d'aquesta malaltia i que l'expressió de ZAP-70 en aquests limfomes és aberrant, ja que no observem ZAP-70 en limfòcits B madurs normals. Mentre que en la LLC la sobreexpressió de ZAP-70 està relacionada amb un pronòstic advers de la malaltia, en el cas de la leucèmia/limfoma de Burkitt, actualment no tenim prou dades per a determinar si l'expressió de ZAP-70 està relacionada amb alguna característica clínica o biològica particular.

V. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. El cinquanta per cent aproximadament dels casos de leucèmia limfàtica crònica presenten una alta expressió de ZAP-70 en els limfòcits neoplàsics i això es correlaciona amb l'absència de mutacions al segment V_H de la regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines.
2. La determinació de l'expressió de la proteïna ZAP-70 en la leucèmia limfàtica crònica per citometria de fluxe és un indicador de pronòstic ràpid, fiable i amb una gran utilitat clínica per determinar el pronòstic de la malaltia.
3. La proteïna ZAP-70 s'expressa als limfòcits B en els estadis del desenvolupament més inicials (pro/pre-B) però és absent a estadis madurs posteriors.
4. La proteïna ZAP-70 s'expressa al cinquanta per cent aproximadament de les LAL-B, independentment de l'estat maduratiu i d'anomalies cromosòmiques. L'expressió de la proteïna ZAP-70 en la LAL-B és un reflex de l'origen cel·lular de la malaltia. La manca d'expressió de ZAP-70 en algunes leucèmies agudes limfoblàstiques B no és deguda a mutacions a la zona codificant o regió 5' no traduïda del gen.

Conclusions

5. La proteïna ZAP-70 es troba expressada de manera aberrant en aproximadament un trenta per cent de les leucèmies/limfomes de Burkitt, i en un cinquanta per cent de les leucèmies limfàtiques cròniques, ja que no s'expressa en limfòcits B madurs.

6. La proteïna ZAP-70 i d'altres elements senyalitzadors del pre-TCR/TCR es troben expressats i fosforilats en les cèl·lules de leucèmia limfoblàstica B, possiblement col·laborant amb altres proteïnes senyalitzadores en garantir la senyalització a través del pre-BCR.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Matthias,P. & Rolink,A.G. Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 497-508 (2005).
2. van Oostveen,J., Bijl,J., Raaphorst,F., Walboomers,J. & Meijer,C. The role of homeobox genes in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Leukemia* **13**, 1675-1690 (1999).
3. Wang,L.D. & Clark,M.R. B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development. *Immunology* **110**, 411-420 (2003).
4. Medina,K.L. *et al.* Identification of very early lymphoid precursors in bone marrow and their regulation by estrogen. *Nat. Immunol.* **2**, 718-724 (2001).
5. Igarashi,H., Gregory,S.C., Yokota,T., Sakaguchi,N. & Kincade,P.W. Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity.* **17**, 117-130 (2002).
6. Takatsu,K. Cytokines involved in B-cell differentiation and their sites of action. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **215**, 121-133 (1997).
7. Scott,E.W., Simon,M.C., Anastasi,J. & Singh,H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**, 1573-1577 (1994).
8. Scott,E.W. *et al.* PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity.* **6**, 437-447 (1997).
9. DeKoter,R.P. & Singh,H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* **288**, 1439-1441 (2000).
10. Georgopoulos,K., Winandy,S. & Avitahl,N. The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 155-176 (1997).
11. Kelley,C.M. *et al.* Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr. Biol.* **8**, 508-515 (1998).
12. Morgan,B. *et al.* Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *EMBO J.* **16**, 2004-2013 (1997).
13. Martin,C.H. *et al.* Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential. *Nat. Immunol.* **4**, 866-873 (2003).
14. Souabni,A., Cobaleda,C., Schebesta,M. & Busslinger,M. Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity.* **17**, 781-793 (2002).
15. Nutt,S.L., Heavey,B., Rolink,A.G. & Busslinger,M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* **401**, 556-562 (1999).

16. Bain,G. *et al.* E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* **79**, 885-892 (1994).
17. O'Riordan,M. & Grosschedl,R. Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity*. **11**, 21-31 (1999).
18. Zou,G.M., Chen,J.J., Yoder,M.C., Wu,W. & Rowley,J.D. Knockdown of Pu.1 by small interfering RNA in CD34+ embryoid body cells derived from mouse ES cells turns cell fate determination to pro-B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 13236-13241 (2005).
19. Kikuchi,K., Lai,A.Y., Hsu,C.L. & Kondo,M. IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF. *J. Exp. Med.* **201**, 1197-1203 (2005).
20. Singh,H. & Pongubala,J.M. Gene regulatory networks and the determination of lymphoid cell fates. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 116-120 (2006).
21. Sigvardsson,M. *et al.* Early B-cell factor, E2A, and Pax-5 cooperate to activate the early B cell-specific mb-1 promoter. *Mol. Cell Biol.* **22**, 8539-8551 (2002).
22. Nutt,S.L., Thevenin,C. & Busslinger,M. Essential functions of Pax-5 (BSAP) in pro-B cell development. *Immunobiology* **198**, 227-235 (1997).
23. Pelanda,R., Braun,U., Hobeika,E., Nussenzweig,M.C. & Reth,M. B cell progenitors are arrested in maturation but have intact VDJ recombination in the absence of Ig-alpha and Ig-beta. *J. Immunol.* **169**, 865-872 (2002).
24. Papavasiliou,F., Jankovic,M., Gong,S. & Nussenzweig,M.C. Control of immunoglobulin gene rearrangements in developing B cells. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 233-238 (1997).
25. Gong,S. & Nussenzweig,M.C. Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Ig beta. *Science* **272**, 411-414 (1996).
26. Kitamura,D. & Rajewsky,K. Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature* **356**, 154-156 (1992).
27. Rolink,A.G., Winkler,T., Melchers,F. & Andersson,J. Precursor B cell receptor-dependent B cell proliferation and differentiation does not require the bone marrow or fetal liver environment. *J. Exp. Med.* **191**, 23-32 (2000).
28. ten Boekel,E., Melchers,F. & Rolink,A. The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B cell development. *Int. Immunol.* **7**, 1013-1019 (1995).
29. Bannish,G., Fuentes-Panana,E.M., Cambier,J.C., Pear,W.S. & Monroe,J.G. Ligand-independent signaling functions for the B lymphocyte antigen receptor and their role in positive selection during B lymphopoiesis. *J. Exp. Med.* **194**, 1583-1596 (2001).
30. Ohnishi,K. & Melchers,F. The nonimmunoglobulin portion of lambda5 mediates cell-autonomous pre-B cell receptor signaling. *Nat. Immunol.* **4**, 849-856 (2003).

31. Guo,B., Kato,R.M., Garcia-Lloret,M., Wahl,M.I. & Rawlings,D.J. Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex. *Immunity*. **13**, 243-253 (2000).
32. Gauthier,L., Rossi,B., Roux,F., Termine,E. & Schiff,C. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 13014-13019 (2002).
33. Pappu,R. *et al.* Requirement for B cell linker protein (BLNK) in B cell development. *Science* **286**, 1949-1954 (1999).
34. Khan,W.N. *et al.* Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity*. **3**, 283-299 (1995).
35. Saijo,K. *et al.* Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during B cell development. *Nat. Immunol.* **4**, 274-279 (2003).
36. Schweighoffer,E., Vanes,L., Mathiot,A., Nakamura,T. & Tybulewicz,V.L. Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion. *Immunity*. **18**, 523-533 (2003).
37. Su,Y.W. & Jumaa,H. LAT links the pre-BCR to calcium signaling. *Immunity*. **19**, 295-305 (2003).
38. Oya,K., Wang,J., Watanabe,Y., Koga,R. & Watanabe,T. Appearance of the LAT protein at an early stage of B-cell development and its possible role. *Immunology* **109**, 351-359 (2003).
39. King,L.B. & Monroe,J.G. Immunobiology of the immature B cell: plasticity in the B-cell antigen receptor-induced response fine tunes negative selection. *Immunol. Rev.* **176**, 86-104 (2000).
40. Fulcher,D.A. *et al.* The fate of self-reactive B cells depends primarily on the degree of antigen receptor engagement and availability of T cell help. *J. Exp. Med.* **183**, 2313-2328 (1996).
41. Glynne,R., Ghandour,G., Rayner,J., Mack,D.H. & Goodnow,C.C. B-lymphocyte quiescence, tolerance and activation as viewed by global gene expression profiling on microarrays. *Immunol. Rev.* **176**, 216-246 (2000).
42. Sandel,P.C. & Monroe,J.G. Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity*. **10**, 289-299 (1999).
43. Gay,D., Saunders,T., Camper,S. & Weigert,M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J. Exp. Med.* **177**, 999-1008 (1993).
44. Allman,D. *et al.* Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J. Immunol.* **167**, 6834-6840 (2001).

45. Turner,M. *et al.* Syk tyrosine kinase is required for the positive selection of immature B cells into the recirculating B cell pool. *J. Exp. Med.* **186**, 2013-2021 (1997).
46. Rodig,S.J., Shahsafaei,A., Li,B., Mackay,C.R. & Dorfman,D.M. BAFF-R, the major B cell-activating factor receptor, is expressed on most mature B cells and B-cell lymphoproliferative disorders. *Hum. Pathol.* **36**, 1113-1119 (2005).
47. Thompson,J.S. *et al.* BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population. *J. Exp. Med.* **192**, 129-135 (2000).
48. Gross,J.A. *et al.* TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* **404**, 995-999 (2000).
49. Moore,P.A. *et al.* BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science* **285**, 260-263 (1999).
50. Mukhopadhyay,A., Ni,J., Zhai,Y., Yu,G.L. & Aggarwal,B.B. Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 15978-15981 (1999).
51. Schneider,P. *et al.* BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J. Exp. Med.* **189**, 1747-1756 (1999).
52. Shu,H.B., Hu,W.H. & Johnson,H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 680-683 (1999).
53. Batten,M. *et al.* BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **192**, 1453-1466 (2000).
54. Lopes-Carvalho,T., Foote,J. & Kearney,J.F. Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 244-250 (2005).
55. Cariappa,A., Liou,H.C., Horwitz,B.H. & Pillai,S. Nuclear factor kappa B is required for the development of marginal zone B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **192**, 1175-1182 (2000).
56. Witt,C.M., Won,W.J., Hurez,V. & Klug,C.A. Notch2 haploinsufficiency results in diminished B1 B cells and a severe reduction in marginal zone B cells. *J. Immunol.* **171**, 2783-2788 (2003).
57. Guinamard,R., Okigaki,M., Schlessinger,J. & Ravetch,J.V. Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat. Immunol.* **1**, 31-36 (2000).
58. Cariappa,A. *et al.* The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity.* **14**, 603-615 (2001).
59. Tanigaki,K. *et al.* Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat. Immunol.* **3**, 443-450 (2002).

60. Oliver,A.M., Martin,F. & Kearney,J.F. IgMhighCD21high lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J. Immunol.* **162**, 7198-7207 (1999).
61. Jacob,J., Kassir,R. & Kelsoe,G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J. Exp. Med.* **173**, 1165-1175 (1991).
62. McHeyzer-Williams,L.J., Driver,D.J. & McHeyzer-Williams,M.G. Germinal center reaction. *Curr. Opin. Hematol.* **8**, 52-59 (2001).
63. Smith,K.G., Light,A., Nossal,G.J. & Tarlinton,D.M. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *EMBO J.* **16**, 2996-3006 (1997).
64. Smith,K.G. *et al.* bcl-2 transgene expression inhibits apoptosis in the germinal center and reveals differences in the selection of memory B cells and bone marrow antibody-forming cells. *J. Exp. Med.* **191**, 475-484 (2000).
65. Stuber,E. & Strober,W. The T cell-B cell interaction via OX40-OX40L is necessary for the T cell-dependent humoral immune response. *J. Exp. Med.* **183**, 979-989 (1996).
66. Zhang,X. *et al.* The distinct roles of T cell-derived cytokines and a novel follicular dendritic cell-signaling molecule 8D6 in germinal center-B cell differentiation. *J. Immunol.* **167**, 49-56 (2001).
67. Ye,B.H. *et al.* The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat. Genet.* **16**, 161-170 (1997).
68. Morrison,A.M., Nutt,S.L., Thevenin,C., Rolink,A. & Busslinger,M. Loss- and gain-of-function mutations reveal an important role of BSAP (Pax-5) at the start and end of B cell differentiation. *Semin. Immunol.* **10**, 133-142 (1998).
69. Reljic,R., Wagner,S.D., Peakman,L.J. & Fearon,D.T. Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. *J. Exp. Med.* **192**, 1841-1848 (2000).
70. Reimold,A.M. *et al.* Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. *J. Exp. Med.* **183**, 393-401 (1996).
71. Gonda,H. *et al.* The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J. Exp. Med.* **198**, 1427-1437 (2003).
72. Maizels,N. Immunoglobulin gene diversification. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 23-46 (2005).
73. Shapiro,G.S., Aviszus,K., Murphy,J. & Wsocki,L.J. Evolution of Ig DNA sequence to target specific base positions within codons for somatic hypermutation. *J. Immunol.* **168**, 2302-2306 (2002).

74. Zhang,K., Cheah,H.K. & Saxon,A. Secondary deletional recombination of rearranged switch region in Ig isotype-switched B cells. A mechanism for isotype stabilization. *J. Immunol.* **154**, 2237-2247 (1995).
75. Dudley,D.D., Chaudhuri,J., Bassing,C.H. & Alt,F.W. Mechanism and Control of V(D)J Recombination versus Class Switch Recombination: Similarities and Differences. *Adv. Immunol.* **86**, 43-112 (2005).
76. Lin,K.I., Angelin-Duclos,C., Kuo,T.C. & Calame,K. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol. Cell Biol.* **22**, 4771-4780 (2002).
77. Shaffer,A.L. *et al.* Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity.* **17**, 51-62 (2002).
78. Turner,C.A., Jr., Mack,D.H. & Davis,M.M. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* **77**, 297-306 (1994).
79. Choe,J. & Choi,Y.S. IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. *Eur. J. Immunol.* **28**, 508-515 (1998).
80. Kallies,A. *et al.* Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *J. Exp. Med.* **200**, 967-977 (2004).
81. Sciammas,R. & Davis,M.M. Modular nature of Blimp-1 in the regulation of gene expression during B cell maturation. *J. Immunol.* **172**, 5427-5440 (2004).
82. Shaffer,A.L. *et al.* XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity.* **21**, 81-93 (2004).
83. Shapiro-Shelef,M. *et al.* Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity.* **19**, 607-620 (2003).
84. Reimold,A.M. *et al.* Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* **412**, 300-307 (2001).
85. Shaffer,A.L. *et al.* XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity.* **21**, 81-93 (2004).
86. Lin,L., Gerth,A.J. & Peng,S.L. Active inhibition of plasma cell development in resting B cells by microphthalmia-associated transcription factor. *J. Exp. Med.* **200**, 115-122 (2004).
87. Reimold,A.M. *et al.* Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* **412**, 300-307 (2001).
88. Calame,K.L., Lin,K.I. & Tunyaplin,C. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 205-230 (2003).

89. Sanderson,R.D., Lalor,P. & Bernfield,M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul.* **1**, 27-35 (1989).
90. Drew,M. *et al.* Very late antigen (VLA) expression by normal and neoplastic human plasma cells; including an assessment of antibodies submitted to the Vth International Workshop on Leucocyte Differentiation Antigens using human myeloma cell lines. *Leuk. Res.* **20**, 619-624 (1996).
91. Funaro,A. *et al.* Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation. *J. Immunol.* **145**, 2390-2396 (1990).
92. Tangye,S.G., Avery,D.T., Deenick,E.K. & Hodgkin,P.D. Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses. *J. Immunol.* **170**, 686-694 (2003).
93. McHeyzer-Williams,M.G. Immune response decisions at the single cell level. *Semin. Immunol.* **9**, 219-227 (1997).
94. Klein,U., Rajewsky,K. & Kuppers,R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J. Exp. Med.* **188**, 1679-1689 (1998).
95. Zhang,K., Cheah,H.K. & Saxon,A. Secondary deletional recombination of rearranged switch region in Ig isotype-switched B cells. A mechanism for isotype stabilization. *J. Immunol.* **154**, 2237-2247 (1995).
96. Weller,S. *et al.* Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* **104**, 3647-3654 (2004).
97. Weller,S. *et al.* CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 1166-1170 (2001).
98. Driver,D.J., McHeyzer-Williams,L.J., Cool,M., Stetson,D.B. & McHeyzer-Williams,M.G. Development and maintenance of a B220- memory B cell compartment. *J. Immunol.* **167**, 1393-1405 (2001).
99. Bell,J. & Gray,D. Antigen-capturing cells can masquerade as memory B cells. *J. Exp. Med.* **197**, 1233-1244 (2003).
100. Youinou,P., Jamin,C. & Lydyard,P.M. CD5 expression in human B-cell populations. *Immunol. Today* **20**, 312-316 (1999).
101. Sen,G., Bikah,G., Venkataraman,C. & Bondada,S. Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3319-3328 (1999).

102. Brezinschek,H.P. *et al.* Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *J. Clin. Invest* **99**, 2488-2501 (1997).
103. Casali,P., Burastero,S.E., Nakamura,M., Inghirami,G. & Notkins,A.L. Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1+ B-cell subset. *Science* **236**, 77-81 (1987).
104. Wedemayer,G.J., Patten,P.A., Wang,L.H., Schultz,P.G. & Stevens,R.C. Structural insights into the evolution of an antibody combining site. *Science* **276**, 1665-1669 (1997).
105. Carsetti,R., Rosado,M.M. & Wardmann,H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol. Rev.* **197**, 179-191 (2004).
106. Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H. & Vardiman J.W.(Eds). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *IARC Press* (2001).
107. Rozman,C. & Montserrat,E. Chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **333**, 1052-1057 (1995).
108. Dono,M., Cerruti,G. & Zupo,S. The CD5+ B-cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2105-2111 (2004).
109. Kipps,T.J. *et al.* Developmentally restricted immunoglobulin heavy chain variable region gene expressed at high frequency in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 5913-5917 (1989).
110. Schroeder,H.W., Jr. & Dighiero,G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol. Today* **15**, 288-294 (1994).
111. Matsuda,F. *et al.* Structure and physical map of 64 variable segments in the 3'0.8-megabase region of the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Nat. Genet.* **3**, 88-94 (1993).
112. Fais,F. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J. Clin. Invest* **102**, 1515-1525 (1998).
113. Oscier,D.G., Thompsett,A., Zhu,D. & Stevenson,F.K. Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood* **89**, 4153-4160 (1997).
114. Hamblin,T.J., Davis,Z., Gardiner,A., Oscier,D.G. & Stevenson,F.K. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1848-1854 (1999).
115. Klein,U. *et al.* Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J. Exp. Med.* **194**, 1625-1638 (2001).

116. Rosenwald,A. *et al.* Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* **194**, 1639-1647 (2001).
117. Dohner,H. *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1910-1916 (2000).
118. Fegan,C., Robinson,H., Thompson,P., Whittaker,J.A. & White,D. Karyotypic evolution in CLL: identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease. *Leukemia* **9**, 2003-2008 (1995).
119. Liu,Y. *et al.* 13q deletions in lymphoid malignancies. *Blood* **86**, 1911-1915 (1995).
120. Avet-Loiseau,H. *et al.* Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood* **94**, 2583-2589 (1999).
121. Cigudosa,J.C. *et al.* Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative genomic hybridization. *Blood* **91**, 3007-3010 (1998).
122. Gupta,V.K., Schmidt,A.P., Pashia,M.E., Sunwoo,J.B. & Scholnick,S.B. Multiple regions of deletion on chromosome arm 13q in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **84**, 453-457 (1999).
123. La Starza,R. *et al.* Molecular delineation of 13q deletion boundaries in 20 patients with myeloid malignancies. *Blood* **91**, 231-237 (1998).
124. Li,C. *et al.* Identification of two distinct deleted regions on chromosome 13 in prostate cancer. *Oncogene* **16**, 481-487 (1998).
125. Rosenwald,A. *et al.* A biological role for deletions in chromosomal band 13q14 in mantle cell and peripheral t-cell lymphomas? *Genes Chromosomes. Cancer* **26**, 210-214 (1999).
126. Siu,L.L., Wong,K.F., Chan,J.K. & Kwong,Y.L. Comparative genomic hybridization analysis of natural killer cell lymphoma/leukemia. Recognition of consistent patterns of genetic alterations. *Am. J. Pathol.* **155**, 1419-1425 (1999).
127. Stilgenbauer,S. *et al.* Expressed sequences as candidates for a novel tumor suppressor gene at band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Oncogene* **16**, 1891-1897 (1998).
128. Tamura,K. *et al.* Deletion of three distinct regions on chromosome 13q in human non-small-cell lung cancer. *Int. J. Cancer* **74**, 45-49 (1997).
129. Yin,Z. *et al.* Limiting the location of a putative human prostate cancer tumor suppressor gene at chromosome 13q14.3. *Oncogene* **18**, 7576-7583 (1999).
130. Calin,G.A. *et al.* A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1793-1801 (2005).

131. Kalachikov,S. *et al.* Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Genomics* **42**, 369-377 (1997).
132. Liu,Y. *et al.* Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* **15**, 2463-2473 (1997).
133. Migliazza,A. *et al.* Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **97**, 2098-2104 (2001).
134. Bao,S. *et al.* ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature* **411**, 969-974 (2001).
135. Boulwood,J. Ataxia telangiectasia gene mutations in leukaemia and lymphoma. *J. Clin. Pathol.* **54**, 512-516 (2001).
136. Juliusson,G. *et al.* Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N. Engl. J. Med.* **323**, 720-724 (1990).
137. Oscier,D.G. *et al.* Correlation of chromosome abnormalities with laboratory features and clinical course in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **76**, 352-358 (1990).
138. Haslinger,C. *et al.* Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J. Clin. Oncol.* **22**, 3937-3949 (2004).
139. Bargonetti,J. & Manfredi,J.J. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr. Opin. Oncol.* **14**, 86-91 (2002).
140. Mowat,M.R. p53 in tumor progression: life, death, and everything. *Adv. Cancer Res.* **74**, 25-48 (1998).
141. Lin,K. *et al.* Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **100**, 1404-1409 (2002).
142. Rai,K.R. *et al.* Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **46**, 219-234 (1975).
143. Binet,J.L. *et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* **48**, 198-206 (1981).
144. Shapiro-Shelef,M. & Calame,K. Regulation of plasma-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 230-242 (2005).
145. Sieff,C. *et al.* Changes in cell surface antigen expression during hemopoietic differentiation. *Blood* **60**, 703-713 (1982).
146. Kumagai,M. *et al.* Ligation of CD38 suppresses human B lymphopoiesis. *J. Exp. Med.* **181**, 1101-1110 (1995).

147. Damle,R.N. *et al.* Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1840-1847 (1999).
148. Hamblin,T.J. *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* **99**, 1023-1029 (2002).
149. Oscier,D.G. *et al.* Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* **100**, 1177-1184 (2002).
150. Pui,C.H. & Evans,W.E. Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **339**, 605-615 (1998).
151. Schrappe,M. *et al.* Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* **95**, 3310-3322 (2000).
152. Pui,C.H. *et al.* Results of therapy for acute lymphoblastic leukemia in black and white children. *JAMA* **290**, 2001-2007 (2003).
153. Linker,C., Damon,L., Ries,C. & Navarro,W. Intensified and shortened cyclical chemotherapy for adult acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **20**, 2464-2471 (2002).
154. Kantarjian,H.M. *et al.* Results of treatment with hyper-CVAD, a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **18**, 547-561 (2000).
155. Hanahan,D. & Weinberg,R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
156. Bene,M.C. *et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* **9**, 1783-1786 (1995).
157. van Dongen,J.J. Proposals for immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* **9**, 2149-2150 (1995).
158. Pui,C.H., Relling,M.V. & Downing,J.R. Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1535-1548 (2004).
159. Pui,C.H., Campana,D. & Evans,W.E. Childhood acute lymphoblastic leukaemia--current status and future perspectives. *Lancet Oncol.* **2**, 597-607 (2001).
160. Han,X. & Bueso-Ramos,C.E. Advances in the pathological diagnosis and biology of acute lymphoblastic leukemia. *Ann. Diagn. Pathol.* **9**, 239-257 (2005).
161. Neel,B.G., Gu,H. & Pao,L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 284-293 (2003).

162. Tartaglia, M. *et al.* Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia. *Blood* **104**, 307-313 (2004).
163. Kharas, M.G. & Fruman, D.A. ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res.* **65**, 2047-2053 (2005).
164. Vivanco, I. & Sawyers, C.L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 489-501 (2002).
165. Secker-Walker, L.M. *et al.* Cytogenetics adds independent prognostic information in adults with acute lymphoblastic leukaemia on MRC trial UKALL XA. MRC Adult Leukaemia Working Party. *Br. J. Haematol.* **96**, 601-610 (1997).
166. Buske, C. & Humphries, R.K. Homeobox genes in leukemogenesis. *Int. J. Hematol.* **71**, 301-308 (2000).
167. van Oostveen, J., Bijl, J., Raaphorst, F., Walboomers, J. & Meijer, C. The role of homeobox genes in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Leukemia* **13**, 1675-1690 (1999).
168. Wang, L.C. *et al.* The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev.* **12**, 2392-2402 (1998).
169. Lorsbach, R.B. & Downing, J.R. The role of the AML1 transcription factor in leukemogenesis. *Int. J. Hematol.* **74**, 258-265 (2001).
170. Hiebert, S.W. *et al.* The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Mol. Cell Biol.* **16**, 1349-1355 (1996).
171. Jabber Al-Obaidi, M.S. *et al.* ETV6/AML1 fusion by FISH in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **16**, 669-674 (2002).
172. Loh, M.L. & Rubnitz, J.E. TEL/AML1-positive pediatric leukemia: prognostic significance and therapeutic approaches. *Curr. Opin. Hematol.* **9**, 345-352 (2002).
173. Huret, J.L., Dessen, P. & Bernheim, A. An atlas of chromosomes in hematological malignancies. Example: 11q23 and MLL partners. *Leukemia* **15**, 987-989 (2001).
174. Ernst, P., Wang, J. & Korsmeyer, S.J. The role of MLL in hematopoiesis and leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* **9**, 282-287 (2002).
175. Look, A.T. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* **278**, 1059-1064 (1997).
176. Aspland, S.E., Bendall, H.H. & Murre, C. The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis. *Oncogene* **20**, 5708-5717 (2001).
177. Uckun, F.M. *et al.* Clinical significance of translocation t(1;19) in childhood acute lymphoblastic leukemia in the context of contemporary therapies: a report from the Children's Cancer Group. *J. Clin. Oncol.* **16**, 527-535 (1998).

178. Piccaluga,P.P. *et al.* Poor outcome of adult acute lymphoblastic leukemia patients carrying the (1;19)(q23;p13) translocation. *Leuk. Lymphoma* **47**, 469-472 (2006).
179. Secker-Walker,L.M. *et al.* Prognostic significance of the balanced t(1;19) and unbalanced der(19)t(1;19) translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **6**, 363-369 (1992).
180. Gilliland,D.G. & Griffin,J.D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* **100**, 1532-1542 (2002).
181. Spike,B.T. & Macleod,K.F. The Rb tumor suppressor in stress responses and hematopoietic homeostasis. *Cell Cycle* **4**, 42-45 (2005).
182. Krug,U., Ganser,A. & Koefler,H.P. Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* **21**, 3475-3495 (2002).
183. Vousden,K.H. & Lu,X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 594-604 (2002).
184. Calero Moreno,T.M. *et al.* Deletion of the Ink4-locus (the p16ink4a, p14ARF and p15ink4b genes) predicts relapse in children with ALL treated according to the Nordic protocols NOPHO-86 and NOPHO-92. *Leukemia* **16**, 2037-2045 (2002).
185. Roman-Gomez,J. *et al.* 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21(CIP1/WAF1/SDI1) gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **99**, 2291-2296 (2002).
186. Sherr,C.J. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 731-737 (2001).
187. Wright,D.H. Burkitt's lymphoma: a review of the pathology, immunology, and possible etiologic factors. *Pathol. Annu.* **6**, 337-363 (1971).
188. Magrath,I. The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Adv. Cancer Res.* **55**, 133-270 (1990).
189. Stein,H., Gerdes,J. & Mason,D.Y. The normal and malignant germinal centre. *Clin. Haematol.* **11**, 531-559 (1982).
190. Cattoretti,G. *et al.* BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* **86**, 45-53 (1995).
191. Mann,R.B. *et al.* Non-endemic Burkitt's lymphoma. A B-cell tumor related to germinal centers. *N. Engl. J. Med.* **295**, 685-691 (1976).
192. Bellan,C. *et al.* Immunoglobulin gene analysis reveals 2 distinct cells of origin for EBV-positive and EBV-negative Burkitt lymphomas. *Blood* **106**, 1031-1036 (2005).
193. Chapman,C.J., Zhou,J.X., Gregory,C., Rickinson,A.B. & Stevenson,F.K. VH and VL gene analysis in sporadic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation, intracloal heterogeneity, and a role for antigen selection. *Blood* **88**, 3562-3568 (1996).

194. Klein,U., Klein,G., Ehlin-Henriksson,B., Rajewsky,K. & Kuppers,R. Burkitt's lymphoma is a malignancy of mature B cells expressing somatically mutated V region genes. *Mol. Med.* **1**, 495-505 (1995).
195. Isobe,K. *et al.* VH gene analysis in sporadic Burkitt's lymphoma: somatic mutation and intraclonal diversity with special reference to the tumor cells involving germinal center. *Leuk. Lymphoma* **43**, 159-164 (2002).
196. Burkitt,D.P. Sarcoma involving the jaw in African children. *Br. J Surg.* **46**, 218-223. 1958.

Ref Type: Generic

197. Carbone,A. *et al.* AIDS-related Burkitt's lymphoma. Morphologic and immunophenotypic study of biopsy specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* **103**, 561-567 (1995).
198. Dalla-Favera,R. *et al.* Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **79**, 7824-7827 (1982).
199. Taub,R. *et al.* Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **79**, 7837-7841 (1982).
200. Klein,U. *et al.* Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 2639-2644 (2003).
201. Nishikura,K. *et al.* Differential expression of the normal and of the translocated human c-myc oncogenes in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **80**, 4822-4826 (1983).
202. Hecht,J.L. & Aster,J.C. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **18**, 3707-3721 (2000).
203. Neri,A., Barriga,F., Knowles,D.M., Magrath,I.T. & Dalla-Favera,R. Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 2748-2752 (1988).
204. Shiramizu,B. *et al.* Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein-Barr virus association. *Blood* **77**, 1516-1526 (1991).
205. Gutierrez,M.I. *et al.* Molecular epidemiology of Burkitt's lymphoma from South America: differences in breakpoint location and Epstein-Barr virus association from tumors in other world regions. *Blood* **79**, 3261-3266 (1992).
206. Bhatia,K. *et al.* Mutations in the coding region of c-myc occur frequently in acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphomas. *Blood* **84**, 883-888 (1994).

207. Akasaka,T. *et al.* Molecular and clinical features of non-Burkitt's, diffuse large-cell lymphoma of B-cell type associated with the c-MYC/immunoglobulin heavy-chain fusion gene. *J. Clin. Oncol.* **18**, 510-518 (2000).
208. Shou,Y. *et al.* Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 228-233 (2000).
209. Erikson,J. *et al.* Dereglulation of c-myc by translocation of the alpha-locus of the T-cell receptor in T-cell leukemias. *Science* **232**, 884-886 (1986).
210. Dang,C.V. *et al.* Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp. Cell Res.* **253**, 63-77 (1999).
211. Dang,C.V. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol. Cell Biol.* **19**, 1-11 (1999).
212. Cinti,C. *et al.* Genetic alterations of the retinoblastoma-related gene RB2/p130 identify different pathogenetic mechanisms in and among Burkitt's lymphoma subtypes. *Am. J. Pathol.* **156**, 751-760 (2000).
213. Zajac-Kaye,M. & Levens,D. Phosphorylation-dependent binding of a 138-kDa myc intron factor to a regulatory element in the first intron of the c-myc gene. *J. Biol. Chem.* **265**, 4547-4551 (1990).
214. Zajac-Kaye,M., Gelmann,E.P. & Levens,D. A point mutation in the c-myc locus of a Burkitt lymphoma abolishes binding of a nuclear protein. *Science* **240**, 1776-1780 (1988).
215. Bahram,F., von der,L.N., Cetinkaya,C. & Larsson,L.G. c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover. *Blood* **95**, 2104-2110 (2000).
216. Gregory,M.A. & Hann,S.R. c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Mol. Cell Biol.* **20**, 2423-2435 (2000).
217. Preudhomme,C. *et al.* Clinical significance of p53 mutations in newly diagnosed Burkitt's lymphoma and acute lymphoblastic leukemia: a report of 48 cases. *J. Clin. Oncol.* **13**, 812-820 (1995).
218. Bhatia,K.G., Gutierrez,M.I., Huppi,K., Siwarski,D. & Magrath,I.T. The pattern of p53 mutations in Burkitt's lymphoma differs from that of solid tumors. *Cancer Res.* **52**, 4273-4276 (1992).
219. Katzenellenbogen,R.A., Baylin,S.B. & Herman,J.G. Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood* **93**, 4347-4353 (1999).

220. Klangby,U. *et al.* p16/INK4a and p15/INK4b gene methylation and absence of p16/INK4a mRNA and protein expression in Burkitt's lymphoma. *Blood* **91**, 1680-1687 (1998).
221. Bross,L. *et al.* DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation. *Immunity*. **13**, 589-597 (2000).
222. Phan,R.T. & Dalla-Favera,R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* **432**, 635-639 (2004).
223. Phan,R.T., Saito,M., Basso,K., Niu,H. & Dalla-Favera,R. BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat. Immunol.* **6**, 1054-1060 (2005).
224. Peng,H.Z. *et al.* Nonimmunoglobulin gene hypermutation in germinal center B cells. *Blood* **93**, 2167-2172 (1999).
225. Capello,D. *et al.* Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. *Blood* **95**, 651-659 (2000).
226. Gaidano,G. *et al.* Frequent mutation of the 5' noncoding region of the BCL-6 gene in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* **89**, 3755-3762 (1997).
227. Margalit,O. *et al.* BCL6 is regulated by p53 through a response element frequently disrupted in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **107**, 1599-1607 (2006).
228. Masumichi Saito, Ryan T.Phan, Herbert C.Morse, Laura Pasqualucci & Riccardo Dalla-Favera. Pathologic Co-Expression and Physical Interaction of c-MYC and BCL6 in B-Cell Lymphomas. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* (2005).
229. Timms,J.M. *et al.* Target cells of Epstein-Barr-virus (EBV)-positive post-transplant lymphoproliferative disease: similarities to EBV-positive Hodgkin's lymphoma. *Lancet* **361**, 217-223 (2003).
230. Kuppers,R. & Rajewsky,K. The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 471-493 (1998).
231. Teitell,M. *et al.* TCL1 oncogene expression in AIDS-related lymphomas and lymphoid tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 9809-9814 (1999).
232. Said,J.W. *et al.* TCL1 oncogene expression in B cell subsets from lymphoid hyperplasia and distinct classes of B cell lymphoma. *Lab Invest* **81**, 555-564 (2001).
233. Teitell,M.A. *et al.* TCL1 expression and Epstein-Barr virus status in pediatric Burkitt lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **124**, 569-575 (2005).
234. Bichi,R. *et al.* Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 6955-6960 (2002).

235. Hoyer,K.K. *et al.* Dysregulated TCL1 promotes multiple classes of mature B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 14392-14397 (2002).
236. Gold,M.R. Akt is TCL-ish: implications for B-cell lymphoma. *Trends Immunol.* **24**, 104-108 (2003).
237. Gold,M.R. *et al.* Targets of B-cell antigen receptor signaling: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 signaling pathway and the Rap1 GTPase. *Immunol. Rev.* **176**, 47-68 (2000).
238. Kiss,C. *et al.* T cell leukemia I oncogene expression depends on the presence of Epstein-Barr virus in the virus-carrying Burkitt lymphoma lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 4813-4818 (2003).
239. Narducci,M.G. *et al.* Regulation of TCL1 expression in B- and T-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues. *Cancer Res.* **60**, 2095-2100 (2000).
240. Chan,A.C., Iwashima,M., Turck,C.W. & Weiss,A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* **71**, 649-662 (1992).
241. Ticchioni,M. *et al.* Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood* **99**, 3111-3118 (2002).
242. Soede,R.D., Wijnands,Y.M., Kouteren-Cobzaru,I. & Roos,E. ZAP-70 tyrosine kinase is required for LFA-1-dependent T cell migration. *J. Cell Biol.* **142**, 1371-1379 (1998).
243. Ahmed,Z. *et al.* Distinct spatial and temporal distribution of ZAP70 and Lck following stimulation of interferon and T-cell receptors. *J. Mol. Biol.* **353**, 1001-1010 (2005).
244. Corcoran,M. *et al.* ZAP-70 methylation status is associated with ZAP-70 expression status in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **90**, 1078-1088 (2005).
245. Yamasaki,S., Takamatsu,M. & Iwashima,M. The kinase, SH3, and SH2 domains of Lck play critical roles in T-cell activation after ZAP-70 membrane localization. *Mol. Cell Biol.* **16**, 7151-7160 (1996).
246. Sloan-Lancaster,J. *et al.* Regulation of ZAP-70 intracellular localization: visualization with the green fluorescent protein. *J. Exp. Med.* **186**, 1713-1724 (1997).
247. Zhao,Q., Williams,B.L., Abraham,R.T. & Weiss,A. Interdomain B in ZAP-70 regulates but is not required for ZAP-70 signaling function in lymphocytes. *Mol. Cell Biol.* **19**, 948-956 (1999).
248. Hatada,M.H. *et al.* Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* **377**, 32-38 (1995).
249. Lupher,M.L., Jr., Songyang,Z., Shoelson,S.E., Cantley,L.C. & Band,H. The Cbl phosphotyrosine-binding domain selects a D(N/D)XpY motif and binds to the Tyr292 negative regulatory phosphorylation site of ZAP-70. *J. Biol. Chem.* **272**, 33140-33144 (1997).

250. Di,B., V *et al.* Tyrosine 315 determines optimal recruitment of ZAP-70 to the T cell antigen receptor. *Eur. J. Immunol.* **32**, 568-575 (2002).
251. Di,B., V *et al.* Tyrosine 319, a newly identified phosphorylation site of ZAP-70, plays a critical role in T cell antigen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **274**, 6285-6294 (1999).
252. Williams,B.L. *et al.* Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-gamma1 and Ras activation. *EMBO J.* **18**, 1832-1844 (1999).
253. Mege,D. *et al.* Mutation of tyrosines 492/493 in the kinase domain of ZAP-70 affects multiple T-cell receptor signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **271**, 32644-32652 (1996).
254. Frank,S.J., Samelson,L.E. & Klausner,R.D. The structure and signalling functions of the invariant T cell receptor components. *Semin. Immunol.* **2**, 89-97 (1990).
255. Latour,S. & Veillette,A. Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 299-306 (2001).
256. Samelson,L.E. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 371-394 (2002).
257. Germain,R.N. & Stefanova,I. The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 467-522 (1999).
258. Palacios,E.H. & Weiss,A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* **23**, 7990-8000 (2004).
259. Chan,A.C. *et al.* Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *J. Immunol.* **152**, 4758-4766 (1994).
260. Latour,S. & Veillette,A. Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 299-306 (2001).
261. Tomlinson,M.G., Lin,J. & Weiss,A. Lymphocytes with a complex: adapter proteins in antigen receptor signaling. *Immunol. Today* **21**, 584-591 (2000).
262. Arpaia,E., Shahar,M., Dadi,H., Cohen,A. & Roifman,C.M. Defective T cell receptor signaling and CD8+ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* **76**, 947-958 (1994).
263. Elder,M.E. *et al.* Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* **264**, 1596-1599 (1994).
264. Chan,A.C. *et al.* ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* **264**, 1599-1601 (1994).

265. Toyabe,S., Watanabe,A., Harada,W., Karasawa,T. & Uchiyama,M. Specific immunoglobulin E responses in ZAP-70-deficient patients are mediated by Syk-dependent T-cell receptor signalling. *Immunology* **103**, 164-171 (2001).
266. Elder,M.E. *et al.* Distinct T cell developmental consequences in humans and mice expressing identical mutations in the DLAARN motif of ZAP-70. *J. Immunol.* **166**, 656-661 (2001).
267. Chen,L. *et al.* Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **100**, 4609-4614 (2002).
268. Arpaia,E., Shahar,M., Dadi,H., Cohen,A. & Roifman,C.M. Defective T cell receptor signaling and CD8+ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* **76**, 947-958 (1994).
269. Chan,A.C. *et al.* ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* **264**, 1599-1601 (1994).
270. Elder,M.E. *et al.* Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* **264**, 1596-1599 (1994).
271. Elder,M.E. *et al.* Distinct T cell developmental consequences in humans and mice expressing identical mutations in the DLAARN motif of ZAP-70. *J. Immunol.* **166**, 656-661 (2001).
272. Toyabe,S., Watanabe,A., Harada,W., Karasawa,T. & Uchiyama,M. Specific immunoglobulin E responses in ZAP-70-deficient patients are mediated by Syk-dependent T-cell receptor signalling. *Immunology* **103**, 164-171 (2001).
273. Goodman,P.A., Wood,C.M., Vassilev,A., Mao,C. & Uckun,F.M. Spleen tyrosine kinase (Syk) deficiency in childhood pro-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* **20**, 3969-3978 (2001).
274. Jumaa,H. *et al.* Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **423**, 452-456 (2003).
275. Law,C.L., Chandran,K.A., Sidorenko,S.P. & Clark,E.A. Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol. Cell Biol.* **16**, 1305-1315 (1996).
276. Di,B., V *et al.* Tyrosine 319, a newly identified phosphorylation site of ZAP-70, plays a critical role in T cell antigen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **274**, 6285-6294 (1999).
277. Ashe,J.M., Wiest,D.L., Abe,R. & Singer,A. ZAP-70 protein promotes tyrosine phosphorylation of T cell receptor signaling motifs (ITAMs) in immature CD4(+)8(+) thymocytes with limiting p56(lck). *J. Exp. Med.* **189**, 1163-1168 (1999).
278. Admirand,J.H. *et al.* Immunohistochemical detection of ZAP-70 in 341 cases of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Mod. Pathol.* **17**, 954-961 (2004).

Bibliografia

279. Carreras,J. *et al.* Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. *J. Pathol.* **205**, 507-513 (2005).
280. Sup,S.J. *et al.* ZAP-70 expression in B-cell hematologic malignancy is not limited to CLL/SLL. *Am. J. Clin. Pathol.* **122**, 582-587 (2004).