

Informe final publicable de proyecto

La proteína de unión al ARN Musashi2 como blanco terapéutico en la leucemia linfoide crónica

Código de proyecto ANII: FSGSK_1_2020_1_165303

Fecha de cierre de proyecto: 01/06/2024

PALACIOS PEREIRA, Florencia Leticia (Responsable Técnico - Científico)

OPPEZZO, Pablo (Co-Responsable Técnico-Científico)

DOS SANTOS D ANGELO, María Gimena (Investigador)

LANDONI COUTURE, Ana Inés (Investigador)

MARQUEZ, María Elena (Investigador)

QUEROL RIVAS, Juliana (Investigador)

INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO (Institución Proponente) \\\ ADMINISTRACIÓN DE SERVICIOS DE SALUD DEL ESTADO
\\\ INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO

Resumen del proyecto

La regulación post-transcripcional es un mecanismo esencial donde las células controlan la regulación genética. Las proteínas de unión al ARN determinan el destino del ARN y en ciertos casos pueden contribuir al desarrollo de cáncer. Concretamente, Musashi2 (MSI2), controla la diferenciación de las células madre al unirse a los ARNm y regular la traducción de proteínas. Curiosamente, altos niveles de MSI2 se asocian con mal pronóstico en varios cánceres, incluido la leucemia linfoide crónica (LLC).

La LLC surge de la acumulación de linfocitos B-CD5+ y un desequilibrio entre la proliferación y la muerte celular. La progresión de la enfermedad se correlaciona con las proporciones relativas de fracciones proliferativas y en reposo (FP y FR). Si bien la sobrevida de los pacientes ha mejorado con el uso de nuevos agentes, los tratamientos inducen en muchos casos remisiones parciales, efectos tóxicos y resistencia. Desafortunadamente, suspender el tratamiento muchas veces revierte la remisión. En la actualidad, la LLC sigue siendo una enfermedad incurable en la que se necesita una mayor comprensión de los mecanismos que promueven la progresión de la enfermedad. Nuestro trabajo más reciente en el área describe una sobre-expresión de MSI2 en FP, a su vez altos niveles de esta proteína se correlacionan con un mal pronóstico. Debido a que MSI2 fue descrito como un blanco terapéutico en otros tumores y que específicamente en la LLC su inhibición elimina células tumorales, en este proyecto nos proponemos evaluar las causas de la sobre-expresión de la proteína en el clon tumoral y si la inhibición de la misma podría ser una terapia alternativa para la LLC.

Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Inmunología / Hematology

Palabras clave: Leucemia Linfoide Crónica / MSI2 / Terapia en cancer /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Nuestro grupo se ha centrado en el estudio de la biología de las células B de pacientes con leucemia linfoide crónica (LLC). En particular, los mecanismos moleculares involucrados en la progresión de la CLL con el propósito de identificar y proporcionar nuevos blancos y estrategias terapéuticas para la enfermedad.

La CLL se desarrolla por la acumulación de células B CD5+ monoclonales malignas que circulan en la sangre periférica (PB) y son continuamente estimuladas por señales del microambiente dentro de la médula ósea (MO) y los órganos linfoides secundarios (SLO) 1. Las células de LLC proliferan en SLO en los que la señalización del receptor de células B (BCR) desencadena la expansión de las células B 2,3. Debido a ello, se han diseñado moléculas anti-apoptóticas y una variedad de inhibidores de quinasas que apuntan a componentes de la vía de señalización BCR como diana. En particular, venetoclax promueve la muerte de las células cancerosas al bloquear la proteína 2 de leucemia / linfoma de células B (BCL2), que es una proteína clave asociada con la supervivencia celular en la LLC 4. Aunque venetoclax es un fármaco muy eficaz para la CLL, algunos pacientes recaen, generando resistencia al tratamiento por la aparición de mutaciones puntuales en componentes claves de la vía 5. Además, el inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (ibrutinib, acaibrutinib, zanoibrutinib) modula las interacciones del microambiente al inducir la migración de células CLL de SLO a PB 6,7, lo que provoca una rápida reducción de los ganglios linfáticos y posterior aumento de la muerte celular 8. En trabajos con un seguimiento de pacientes de ocho años tratados con ibrutinib, se ha visto que mejora sobrevida libre de progresión cuando la droga es

administrada como primera línea, sin embargo, sigue habiendo un grupo minoritario de pacientes que recaen y son resistentes a la terapia^{9,10}. A pesar de que la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes ha mejorado con el uso de las nuevas terapias, los tratamientos, en general, inducen remisiones parciales en gran parte de los pacientes¹⁰. A su vez, dado que los tratamientos son a largo plazo, en parte de los pacientes generan efectos tóxicos y pueden dar lugar a diferentes tipos de resistencia. Lamentablemente, se ha visto que interrumpir el tratamiento revierte la remisión de la enfermedad¹¹. En resumen, dado que muchos pacientes recaen³, la CLL todavía sigue siendo una enfermedad incurable en la que se necesita una mayor comprensión de los mecanismos que promueven la proliferación de LLC.

Aunque la mayoría de las células de CLL circulantes no se replican, una pequeña fracción de las células leucémicas recientemente fueron divididas (fracción proliferante, PF) en SLO migran y se encuentran en PB12. Debido a que la tasa de crecimiento de los clones de LLC se correlaciona directamente con un mal pronóstico¹³, y el hecho de que nosotros y otros investigadores describimos que las fracciones proliferantes regulan positivamente AID, proteína mutagénica^{14–16} las células dentro de dicha fracción intraclonal pueden adquirir nuevas anomalías en el ADN que podrían conducir a una enfermedad más letal. Esto hace que las células de este subconjunto del clon tumoral sea un posible blanco terapéutico.

A su vez, más recientemente, observamos más altos niveles de la oncoproteína de unión al ARNm llamada Musashi2 (MSI2) en la en la fracción proliferante que en la fracción en reposo (RF), lo que sugiere un posible papel en la proliferación celular y evolución de la enfermedad. Curiosamente los pacientes de mal pronóstico presentan elevados niveles de MSI2. Describimos también que la inhibición de vías de señalización relevantes para la división celular como: AKT, MAPK-ERK y BTK, disminuyen los niveles de expresión de MSI2 en células de pacientes con LLC¹⁷, lo que sugiere que la sobreexpresión de MSI2 podría ocurrir gracias a la acción de diferentes vías. Curiosamente, al día de hoy, se desconoce cuáles son las señales que recibe la célula tumoral o las vías involucradas en la inducción y sobreexpresión de MSI2 en células de LLC, e incluso más en el PF, así como cuál es el papel de MSI2 en las células proliferativas.

En la LLC, NOTCH1 (una vía asociada con la progresión de la enfermedad)¹⁸ suprime la expresión del factor de transcripción Kruppel-like factor 4 (KLF4)¹⁹, un regulador negativo de MSI2 en adenocarcinoma²⁰. Además, la vía STAT3 activa, otro eje asociado con un mal pronóstico en la LLC, inhibe el factor de transcripción SOX11²¹, un regulador negativo de MSI2 en linfoma de células del manto²². Desconocemos si NOTCH1/KLF4 y/o STAT3/SOX11 podrían ser las vías responsables de la sobre-expresión de MSI2 en las células B de pacientes con LLC que contribuyan a la evolución de la enfermedad.

En relación con la función de MSI2, el grupo de Kharas describió una molécula pequeña (Ro08-2750) que se une selectivamente al sitio de unión de ARN MSI2, lo que provoca la pérdida de la función de MSI2 y afecta la supervivencia de la leucemia mieloide²³ (Minuesa, Albanese et al. 2019). Recientemente, demostramos que Ro08-2750 elimina las células B en división en pacientes con LLC humanas *in vitro* e *in vivo* y reduce la carga tumoral en un modelo de ratón LLC. Sin embargo, si MSI2 influye en el desarrollo/progresión de la CLL, o cuáles son los efectos inmunomoduladores de Ro08-2750, no solo las células leucémicas sino también las células T y/o mieloides, son preguntas que aún no hemos podido responder. Finalmente, nos preguntamos si la combinación de dos fármacos que se dirigen a diferentes subpoblaciones del clon será una mejor estrategia para esta leucemia. Para hacer eso, probaremos el inhibidor de MSI2 en combinación con venetoclax. La razón es que venetoclax afecta principalmente a los RF *in vitro*²⁴ y al ibrutinib PF *in vitro* y la combinación de ambos fármacos se ha utilizado con buenos resultados preliminares en ensayos clínicos²⁵. Especulamos si la selección simultánea de ambas fracciones con Ro08-2750 y venetoclax podría ser un mejor enfoque para el tratamiento de la CLL.

Debido a que MSI2 influye en la supervivencia y proliferación de las células de CLL y altos niveles se correlacionan con un mal pronóstico en la CLL, proponemos que MSI2 y su vía tienen un potencial terapéutico valioso en la CLL.

El objetivo general de esta propuesta es determinar el papel de MSI2 en las células B proliferativas de pacientes con LLC y determinar si la inhibición de MSI2 sola o en combinación con otros tratamientos podría ser una nueva estrategia terapéutica para esta leucemia.

En este proyecto proponemos:

- 1) evaluar los mecanismos moleculares responsables de inducir la sobreexpresión de MSI2,
- 2) determinar el papel de MSI2 en la proliferación de células B de CLL,
- 3) estudiar la influencia de MSI2 en el desarrollo y la progresión de la CLL y
- 4) evaluar el efecto inmunomodulador de la inhibición de MSI2 y la combinación de tratamiento farmacológico en un modelo de ratón humanizado.

1. Evaluar los mecanismos moleculares responsables de inducir la sobreexpresión de MSI2. Dado que MSI2 favorece la sobrevida de pacientes con LLC y hemos descrito altos niveles de MSI2 en células B de CLL, e incluso más altos en el PF, comprender las vías involucradas en la sobreexpresión de MSI2 podría brindarnos nueva información sobre la biología de las células de pacientes con CLL. Por tanto, nos proponemos evaluar 2 vías independientes: 1- NOTCH1/KLF4/MSI2 y 2- STAT3/SOX11/MSI2. Primero, dado que NOTCH1 inhibe KLF419 en células LLC, y que KLF4 se expresa en bajos niveles en células de pacientes con CLL19 y es un regulador negativo de MSI2 en adenocarcinoma, nos preguntamos si la ausencia de KLF4 en células de LLC podría contribuir a la sobreexpresión de MSI2. En segundo lugar, en el linfoma de células del manto, STAT3 activo inhibe el factor de transcripción negativo de MSI2, SOX1121,22,26. Debido a que STAT3 es constitutivamente activo en las células de LLC27 y se describieron niveles bajos de proteína SOX11 en esta leucemia28, nos preguntamos si la vía STAT3/SOX11 regula la expresión de MSI2 en CLL. células.

Para determinar el papel de KLF4 en la expresión de MSI2, modularemos la expresión de KLF4 mediante el tratamiento de células B de CLL con inhibidor de NOTCH119 y determinaremos los niveles de ARNm de MSI2 y KLF4 mediante PCR en tiempo real y los niveles de proteína mediante transferencia Western y citometría de flujo. En segundo lugar, una vez que confirmamos que la inhibición de NOTCH1 aumenta KLF4 y disminuye los niveles de MSI2, probaremos si KLF4 se une al promotor MSI2. Para ello, se realizará inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y amplificación del promotor MSI2 por PCR29.

Para evaluar el papel de STAT3 / SOX11 en la expresión de MSI2, primero determinaremos si STAT3 se une al promotor SOX11 en las células de CLL mediante la amplificación del promotor ChIP y SOX11 mediante PCR. En segundo lugar, debido a que el inhibidor de STAT3, Napabucasin, se encuentra en ensayos clínicos de fase 3 para adenocarcinoma y cáncer colorrectal y en AML elimina las células tumorales30 lo trataremos en células de CLL con diferentes concentraciones de Napabucasina durante 24, 48 y 72 hrs. y probar la viabilidad celular, los niveles de proteína SOX11 y MSI2 mediante citometría de flujo.

2. Determinar el papel de MSI2 en la proliferación de células B de CLL. Anteriormente, describimos en muestras de pacientes con LLC ex vivo, más altos niveles de MSI2 en células en división que en las células

en reposo en sangre periférica y ganglios linfoides 17. Dado que las células en división pueden adquirir mutaciones en el ADN que pueden contribuir a la progresión de la enfermedad, creemos que comprender el papel de MSI2 en la proliferación celular puede ser útil para diseñar nuevas estrategias de tratamientos posibles para prevenir el crecimiento del clon.

MSI2 se une a secuencias consenso de ARNm específicas31–33 y regula la traducción de proteínas. Debido a que se han descrito distintos ARNm blancos en los diferentes tejidos estudiados 34–37 y a su vez, dado que la identificación de los ligandos de ARNm no proporciona información sobre el papel de MSI2 como regulador positivo o negativo, realizamos un estudio del perfil proteómico en células CLL activadas con bajos niveles de MSI2 (siMSI2) versus control (siCTR)38. Después de documentar niveles reducidos de MSI2 en células B de 12 pacientes con CLL mediante el tratamiento con siMSI2 y eliminar las células muertas mediante centrifugación en gradiente de densidad, se determinó el perfil del proteoma utilizando aptámeros de ADN monocatenario-modificados (SOMAmers) que se unen y cuantifican unidades fluorescentes relativas de proteínas objetivo-específicas. De acuerdo con el funcionamiento de MSI2 como inhibidor de la traducción, no observamos proteínas reguladas negativamente. Nuestros resultados, no publicados aun, revelaron que la caída de MSI2, induce la sobreexpresión de 12 proteínas (P <0.01 y cambio de veces 2-1.2) asociadas con el movimiento celular, la apoptosis y la reparación del ADN, el tráfico intracelular y el metabolismo celular.

Con el propósito de confirmar los resultados preliminares de los estudios proteómicos, y para analizar la relación entre MSI2 y el reordenamiento del citoesqueleto, nos propusimos realizar ensayos de adhesión celular a la fibronectina y determinar las modificaciones del citoesqueleto por microscopía39. Para ello, se seleccionarán 12 muestras de pacientes con CLL para realizar una estimulación *in vitro* y en muestras con altos niveles de MSI2 comparados con bajos niveles de MSI2 como se realizó anteriormente. Las células se recolectarán después de 72 horas del tratamiento y se realizará el experimento de adhesión celular a la fibronectina. La modificación del citoesqueleto por microscopía se determinará mediante un método establecido39 que clasifica las células redondas como que tienen un citoesqueleto no modificado y las células alargadas como si tienen un reordenamiento del citoesqueleto. Se contará el número de células alargadas y no alargadas para determinar la modificación del citoesqueleto.

Para determinar el papel de MSI2 en la localización *in vivo*, se preincubarán células B de CLL activadas con Ro08-2750 o vehículo durante 2 días y posteriormente se inyectarán por vía intravenosa en un ratón con inmunodeficiencia. Después de 4 horas, se evaluará el desplazamiento de células B CLL humanas a la BM y el bazo o PB. por citometría de flujo. Debido a que los pacientes con CLL somos heterogéneos, seleccionaremos 3 pacientes con características clínicas progresivas.

3. Estudiar la influencia de MSI2 en el desarrollo y progresión de la CLL. Debido a que el bloqueo de la función de MSI2 por Ro08-2750 elimina las células LLC humanas y murinas y los niveles altos de MSI2 se correlacionan con mal pronóstico17 nos preguntamos si MSI2 contribuye al desarrollo / progresión de la enfermedad.

Para determinar el papel de MSI2 en el desarrollo de CLL, proponemos tratar células tumorales en el modelo de ratón CLL (TCL1,40), ratones jóvenes, de recuento bajo de células tumorales con Ro08-2750 y evaluar la carga tumoral. Para ello, los animales TCL1 de 4 meses, sin clon tumoral, serán tratados con o sin Ro08-2750 y se evaluará el recuento de glóbulos blancos (WBC) una vez por semana durante 2-3 meses. Debido a que 7 mg/kg fue la dosis más baja del registro Ro 08-2750 que mostró una reducción en las células de ratones CLL (B220+ CD5+) en el modelo TCL1 192-SCID4017, proponemos usar 7 mg / kg .

Para determinar el papel de MSI2 en la progresión / supervivencia de los ratones, inhibiremos MSI2 en ratones TCL1 adultos, con alto recuento de células y evaluaremos el crecimiento y la supervivencia del tumor. Para ello, se tratarán ratones TCL1 de 6-8 meses de edad con una población clara de clon tumoral, con o sin Ro08-2750 una vez a la semana y se determinará WBC durante 2-3 meses.

4. Evaluar el efecto inmunomodulador de la inhibición de MSI2 y la combinación de tratamiento farmacológico en un modelo de ratón humanizado. Debido a que Ro08-2750 in vitro elimina las células B y mieloides humanas, pero no las células T, de los pacientes con CLL17, probaremos el efecto de Ro08-2750 no solo en B sino también en el compartimento de células mieloides y T en el modelo de ratón humanizado (modelo de xenoinjerto derivado del paciente de CLL, PDX).

Para evaluar el efecto inmunomodulador de Ro08-2750 en células humanas in vivo (PDX), probaremos el efecto de Ro08-2750 en células mieloides y linfoides. Las células B de CLL se inyectarán por vía intravenosa con células T activadas autólogas en ratón NOD / SCID (NSG) y se realizará una inyección intraperitoneal del vehículo y/o Ro08-2750 dos veces por semana durante 3 semanas. Después de sacrificar los ratones, se recolectará el bazo, la médula ósea y la sangre periférica para su análisis. Previamente, probamos 3 concentraciones diferentes de Ro08-2750 (1.4, 7 y 13 mg / kg) en un modelo de ratón diferente17, ratones SCID trasplantados con esplenocitos TCL1 generados por transferencias seriadas41. Debido a que en otro modelo de ratón se observaron buenos resultados usando 7 y 13 mg / kg, primero probaremos estas dos concentraciones en este nuevo modelo animal. Además, Minuesa et al., observaron en un modelo de ratón con CML tratado con Ro08-2750 una reducción de la oncoproteína c-myc 23. Aunque no sabemos si MSI2 es un regulador positivo de c-myc en las células de CLL, probaremos los niveles mediante citometría de flujo.

Debido a que observamos que Ro08-2750 elimina las células de CLL en división in vitro y venetoclax reduce las células en reposo42, nos proponemos usar ambas drogas en combinación. Debido a que las RF pueden alcanzar los SLO y eventualmente proliferar y generar una enfermedad más progresiva, nos preguntamos si la combinación de Ro 08-2750 con venetoclax podría ser un mejor tratamiento para la CLL que un solo agente. Para evaluar esta idea, trataremos ratones con Ro08-2750 con o sin Venetoclax utilizando el modelo PDX. Se tomarán muestras de bazo, médula ósea y sangre periférica para su análisis.

Metodología/Diseño del estudio

La metodología se encuentra detallada en los objetivos y justificación.

Resultados, análisis y discusión

1) Con el propósito de entender los mecanismos moleculares que regulan u gatillan la expresión de MSI2 en los pacientes de LLC realizamos los siguientes experimentos.

1a. Determinamos a nivel de ARNm mediante PCR cuantitativa la expresión de KLF4/MSI2 en LLC y HD. Los resultados mostraron que había una correlación negativa entre KLF4/MSI2 ($r=0.68$; $p=0.009$).

1b. Para estudiar aún más el papel de NOTCH1/KLF4/MSI2, se trataron muestras de pacientes con LLC de mal pacientes con un inhibidor de NOTCH1 (gamma-secretasa) y se determinaron los niveles de NOTCH1/KLF4/MSI2. La inhibición de NOTCH1 aumentó los niveles de KLF4 ($p= 0.01$) y disminuyó la expresión de MSI2 y c-myc ($p<0.05$). Los resultados fueron confirmados usando una línea celular derivada de un paciente con LLC (MEC1) y 12 muestras de pacientes con LLC.

1c. Para confirmar que la disminución de la expresión de MSI2 se debe a la acción negativa de KLF4 en el

promotor de MSI2, se realizó una inmunoprecipitación de cromatina utilizando anti-KLF4 y amplificación del promotor de MSI2 por PCR. Notablemente, las células LLC tratadas expuestas al inhibidor de NOTCH1 inmunoprecipitaron un fragmento correspondiente al promotor de MSI2, lo que indica que KLF4 se une y regula negativamente la expresión de MSI2 en las células LLC.

Conclusión del objetivo 1. Los resultados sugirieron que la sobreexpresión de MSI2 en LN y en células activas se debe a la ausencia del factor de transcripción KLF4 regulado por NOTCH1.

2) Respecto al rol de MSI2 en células proliferantes realizamos los siguientes experimentos:

2a. Analizamos los proteomas de la inhibición de MSI2 en células B-CLL activadas (CpG-ODN+IL15, n=12) y los comparamos con el control. Los resultados mostraron que la inhibición de MSI2 aumentó los niveles de 12 proteínas ($p < 0.01$) consistentes con MSI2 funcionando como un inhibidor de la traducción del ARNm de un conjunto de moléculas involucradas en la migración celular.

2b. Para confirmar estos resultados, seleccionamos y verificamos los niveles de expresión de proteínas por citometría de flujo de Fer (receptor de tirosina quinasa) y su forma activa (fosforilación Y174).

2c. Dado que Fer/VAV1 desempeña un papel en la regulación del citoesqueleto, también inhibimos MSI2 en células B CLL del mismo grupo y evaluamos por microscopía el reordenamiento del citoesqueleto de células unidas a diapositivas recubiertas de fibronectina, mostrando que la inhibición de MSI2 en células activadas presenta células más alargadas implicando un citoesqueleto activo.

Conclusión del objetivo 2. Dado que: 1-los niveles altos de MSI2 se asocian con un mal resultado, 2-hay más MSI2 en LN>PB, incluso más en células divididas y 3-en células activadas MSI2 inhibe la migración celular, postulamos que MSI2 puede estar jugando un papel en mantener las células en tejidos sólidos recibiendo señales de supervivencia, favoreciendo la progresión de la enfermedad.

3) Con el propósito de entender el rol de MSI2 en el desarrollo y/o progresión de la enfermedad, 3a. tratamos con el inhibidor de MSI2 un modelo animal de LLC (TCL1), ratones jóvenes de 4 meses de edad. Observamos que la dosis planteada en el proyecto no fue suficiente para reducir el porcentaje del clon tumoral en sangre, pero si afectó y redujo la expresión del oncogen c-myc.

3b. Para confirmar los resultados, realizamos una inmunoprecipitación de ARN, usando el anticuerpo contra MSI2 y por PCR amplificamos una región del gen de c-myc. Los resultados mostraron que efectivamente MSI2 regula c-myc en células de pacientes con LLC.

Conclusion del objetivo 3. Estos resultados podrían explicar la contribución de MSI2 en la progresión de la enfermedad y porque es que altos niveles MSI2 se asocian a mal pronóstico. Aunque más experimentos deberían realizarse para confirmar la idea.

En conjunto, nuestros resultados proporcionan hallazgos novedosos sobre los mecanismos moleculares que regulan la expresión de MSI2, destacando el papel de la vía NOTCH1/KLF4 en esta proteína y la función potencial de MSI2 inhibiendo la migración celular de CLL en un microambiente activo que respalda la progresión de CLL y explica la posible asociación con el oncogenes c-myc postulando nuevas herramientas para modular/prevenir la progresión.

Conclusiones y recomendaciones

La regulación post-transcripcional es un mecanismo esencial para que las células controlen la regulación génica, donde las proteínas de unión al ARN (RBPs) orquestan el destino de las moléculas de ARN. Debido a su papel crítico, una desregulación de las RBPs puede llevar al cáncer. Específicamente, en la leucemia linfocítica crónica (LLC), altos niveles de la proteína Musashi2 (MSI2) se han relacionado con la supervivencia de las células tumorales y un mal pronóstico, destacando un papel clave para MSI2 durante la evolución de la enfermedad.

El aumento de las células LLC en pacientes proviene de una pequeña fracción de células B CD5+ en división. El crecimiento de esta fracción proliferativa (FP) se correlaciona directamente con un mal pronóstico, convirtiendo a la FP en un blanco importante para la terapia. Interesantemente, observamos niveles más altos de MSI2 en células B de LLC que en donantes sanos (DS), incluso más altos en la FP. La reducción de la expresión de MSI2 o el bloqueo de su función elimina las células LLC. Estos resultados nos permiten proponer que MSI2 en sí mismo, las moléculas que inducen la expresión de MSI2 o las moléculas que MSI2 regula, como responsables del curso clínico de los pacientes con LLC. Por lo tanto, en este trabajo estudiamos los mecanismos moleculares que inducen la sobreexpresión de MSI2 en células B de LLC y su función en las células proliferantes.

Interesantemente, en células LLC, NOTCH1 suprime la expresión del factor de transcripción Kruppel-like factor 4 (KLF4), un conocido regulador negativo de MSI2 en adenocarcinoma. NOTCH1 es un receptor transmembrana que se escinde al interactuar con ligando, con un dominio intracelular que migra al núcleo y activa genes relacionados con la supervivencia celular, como c-myc. Como observamos para MSI2, se encontraron formas activas más altas de NOTCH1 en ganglios linfáticos (GL) que en sangre periférica (SP) de células B de LLC. Dado que se informaron bajos niveles de KLF4 en células B de LLC, nos preguntamos si la sobreexpresión de MSI2 en LLC se debía a alteraciones en la vía NOTCH1/KLF4. Para responder a esto, determinamos inicialmente a nivel de ARNm mediante PCR cuantitativa la expresión de KLF4/MSI2 en células B de LLC y DS. Los resultados mostraron una correlación negativa entre KLF4/MSI2 ($r=0.68$; $p=0.009$). Para estudiar más a fondo el papel de NOTCH1/KLF4/MSI2, se trató a pacientes con LLC de mal pronóstico (previamente seleccionados por NOTCH1 activado) con un inhibidor de NOTCH1 (?-secretasa) y se determinaron los niveles de NOTCH1/KLF4/MSI2. La inhibición de NOTCH1 aumentó los niveles de KLF4 ($p=0.01$) y disminuyó la expresión de MSI2 y c-myc ($p<0.05$). Para confirmar que la disminución de la expresión de MSI2 se debe a la acción negativa de KLF4 sobre el promotor de MSI2, se realizó una inmunoprecipitación de cromatina utilizando anti-KLF4 y amplificación por PCR del promotor de MSI2. Notablemente, las células B de LLC tratadas expuestas al inhibidor de NOTCH1 inmunoprecipitaron un fragmento correspondiente al promotor de MSI2, indicando que KLF4 se une y regula negativamente la expresión de MSI2 en células B de LLC. Los resultados sugirieron que la sobreexpresión de MSI2 en GL y en células activadas/en división se debe a la ausencia de KLF4 regulado por NOTCH1. Estos resultados apoyan la idea de entender cuál es el rol de MSI2 en células proliferantes y cuáles son las moléculas que MSI2 regula en el microambiente activo.

Dado que MSI2 regula diferentes blancos de manera específica según el tipo celular, estudiamos el papel de MSI2 en células B de LLC activadas/divisoras. Para hacerlo, analizamos los proteomas de células B de LLC activadas (CpG-ODN+IL15) en las que se redujo la expresión de MSI2 ($n=12$) y las comparamos con el control. Los resultados mostraron que la reducción de MSI2 aumentó significativamente los niveles de 12 proteínas ($p < 0.01$), lo que concuerda con MSI2 funcionando como un inhibidor de ARNm de un conjunto de moléculas involucradas en la migración celular. Para confirmar estos resultados, seleccionamos y verificamos la expresión de niveles de proteínas mediante citometría de flujo de Fer (receptor de tirosina proteína quinasa no) VAV1 (factores de intercambio de nucleótidos de guanina) y su forma activa (fosfoY174). Dado que Fer/VAV1 juega un papel en la regulación del citoesqueleto, también reducimos la expresión de MSI2 en células B de LLC del mismo grupo y evaluamos mediante microscopía la reorganización del citoesqueleto de células unidas a portaobjetos recubiertos de fibronectina, mostrando que la disminución

de MSI2 en células activadas presenta células más alargadas, lo que implica un citoesqueleto activo. Dado que: 1- los niveles altos de MSI2 se asocian a un mal pronóstico, 2- hay más MSI2 en GL>SP, incluso más en células en división y 3- en células activadas, MSI2 inhibe la migración celular, hipotetizamos que MSI2 podría estar desempeñando un papel en mantener las células en tejidos sólidos recibiendo señales de supervivencia, favoreciendo la progresión de la enfermedad.

En conjunto, nuestros resultados proporcionan hallazgos novedosos sobre los mecanismos moleculares que regulan la expresión de MSI2, destacando el papel de la vía NOTCH1/KLF4 en esta proteína y la función potencial de MSI2 en la progresión e la enfermedad.

Referencias bibliográficas

1. Chiorazzi, N., Chen, S. S. & Rai, K. R. Chronic lymphocytic leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 11, 1–35 (2021).
2. Burger, J. A. & Chiorazzi, N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends in Immunology* vol. 34 592–601 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.07.002> (2013).
3. Haselager, M. V., Kater, A. P. & Eldering, E. Proliferative Signals in Chronic Lymphocytic Leukemia; What Are We Missing? *Frontiers in Oncology* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.592205> (2020).
4. Wierda, W. G. & Tambaro, F. P. How I Manage CLL with Venetoclax-Based Treatments. (2020).
5. Herling, C. D. et al. Clonal dynamics towards the development of venetoclax resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun* 9, (2018).
6. De Rooij, M. F. M. et al. LYMPHOID NEOPLASIA The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor-and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. (2012) doi:10.1182/blood.
7. Ponader, S. et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. (2012) doi:10.1182/blood-2011-10.
8. Burger, J. A. et al. Leukemia cell proliferation and death in chronic lymphocytic leukemia patients on therapy with the BTK inhibitor ibrutinib. *JCI Insight* 2, (2017).
9. Byrd, J. C. et al. Ibrutinib Treatment for First-Line and Relapsed/ Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia: Final Analysis of the Pivotal Phase Ib/II PCYC-1102 Study. *Clinical Cancer Research* 26, 3918–3927 (2020).
10. Burger, J. A. et al. Long-term efficacy and safety of first-line ibrutinib treatment for patients with CLL/SLL: 5 years of follow-up from the phase 3 RESONATE-2 study. *Leukemia* 34, 787–798 (2020).
11. Woyach, J. A. et al. Ibrutinib Regimens versus Chemoimmunotherapy in Older Patients with Untreated CLL. *New England Journal of Medicine* 379, 2517–2528 (2018).
12. Messmer, B. T. et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Journal of Clinical Investigation* 115, 755–764 (2005).
13. Murphy, E. J. et al. Leukemia-cell proliferation and disease progression in patients with early stage chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 31, 1348–1354 (2017).
14. Palacios, F. et al. High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood* 115, 4488–96 (2010).
15. Patten, P. E. M. et al. IGHV-unmutated and IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia cells produce activation-induced deaminase protein with a full range of biologic functions. *Blood* 120, 4802–4811 (2012).
16. Rush, J. S. et al. Expression of Activation-Induced Cytidine Deaminase Is Regulated by Cell Division, Providing a Mechanistic Basis for Division-Linked Class Switch Recombination. vol. 102 www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0502779102 (2005).
17. Palacios, F. et al. Musashi 2 influences chronic lymphocytic leukemia cell survival and growth making it a potential therapeutic target. *Leukemia* 35, 1037–1052 (2021).
18. Arruga, F. et al. Immune response dysfunction in chronic lymphocytic leukemia: Dissecting molecular mechanisms and microenvironmental conditions. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms21051825> (2020).
19. Filarsky, K. et al. Krüppel-like Factor 4 (KLF4) Inactivation in Chronic Lymphocytic Leukemia Correlates with Promoter DNA-Methylation and Can Be Reversed by Inhibition of NOTCH Signaling A C B D. (2016).

20. Guo, K. et al. The novel KLF4/MSI2 signaling pathway regulates growth and metastasis of pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research* 23, 687–696 (2017).
21. Mohanty, A. et al. Regulation of SOX11 Expression through CCND1 and STAT3 in Mantle Cell Lymphoma. <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/133/4/306/1552362/blood851667.pdf> (2019).
22. Vegliante, M. C. et al. Plenary Paper SOX11 regulates PAX5 expression and blocks terminal B-cell differentiation in aggressive mantle cell lymphoma. (2013) doi:10.1182/blood-2012-06.
23. Minuesa, G. et al. Small-molecule targeting of MUSASHI RNA-binding activity in acute myeloid leukemia. *Nat Commun* 10, (2019).
24. Lu, P. et al. Ibrutinib and venetoclax target distinct subpopulations of CLL cells: implication for residual disease eradication. *Blood Cancer J* 11, (2021).
25. Niemann, C. & Frederiksen, H. Venetoclax and Ibrutinib for Patients with Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. doi:10.1182/blood.2020008608/1760941/blood.2020008608.pdf.
26. Vegliante, M. C. et al. Epigenetic activation of SOX11 in Lymphoid Neoplasms by Histone modifications. *PLoS One* 6, (2011).
27. Hazan-Halevy, I. et al. LYMPHOID NEOPLASIA STAT3 is constitutively phosphorylated on serine 727 residues, binds DNA, and activates transcription in CLL cells. *Blood* 115, 2852–2863 (2010).
28. Wasik, A. M. et al. Flow cytometric analysis of SOX11: A new diagnostic method for distinguishing B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma from mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 56, 1425–1431 (2015).
29. Guo, K. et al. The Novel KLF4/MSI2 Signaling Pathway Regulates Growth and Metastasis of Pancreatic Cancer Running Title: KLF4/MSI2 Signaling in PDA Progression MSI2 in Pancreatic Cancer.
30. Bi, S. et al. Napabucasin (BBI608)eliminate AML cells in vitro and in vivo via inhibition of Stat3 pathway and induction of DNA damage. *Eur J Pharmacol* 855, 252–261 (2019).
31. Okabe, M., Imai, T., Kurusu, M., Hiromi, Y. & Okano, H. Translational repression determines a neuronal potential in Drosophila asymmetric cell division. *Nature* 411, 94–98 (2001).
32. Okano, H. et al. Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. *Experimental Cell Research* vol. 306 349–356 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.02.021> (2005).
33. Ruth Zearfoss, N. et al. A conserved three-nucleotide core motif defines musashi RNA binding specificity. *Journal of Biological Chemistry* 289, 35530–35541 (2014).
34. Park, S. M. et al. Musashi-2 controls cell fate, lineage bias, and TGF-? signaling in HSCs. *Journal of Experimental Medicine* 211, 71–87 (2014).
35. Park, S. M. et al. Musashi2 sustains the mixed-lineage leukemia'driven stem cell regulatory program. *Journal of Clinical Investigation* 125, 1286–1298 (2015).
36. Wang, S. et al. Transformation of the intestinal epithelium by the MSI2 RNA-binding protein. *Nat Commun* 6, (2015).
37. Bennett, C. G. et al. Genome-wide analysis of Musashi-2 targets reveals novel functions in governing epithelial cell migration. *Nucleic Acids Res* 44, 3788–3800 (2016).
38. Mongini, P. K. A. et al. TLR-9 and IL-15 Synergy Promotes the In Vitro Clonal Expansion of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells. *The Journal of Immunology* 195, 901–923 (2015).
39. Ali, A. Y. et al. Distinct roles for phosphoinositide 3-kinases ? and ? in malignant B cell migration. *Leukemia* 32, 1958–1969 (2018).
40. Bichi, R. et al. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6955–60 (2002).
41. Chen, S. S. et al. Autoantigen can promote progression to a more aggressive TCL1 leukemia by selecting variants with enhanced B-cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, (2013).
42. Lu, P. et al. Ibrutinib and venetoclax target distinct subpopulations of CLL cells: implication for residual disease eradication. *Blood Cancer J* 11, (2021).

Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)