



Tesis doctoral:

---

**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA PODOCALICINA EN LA  
LINFOMAGÉNESIS DE CÉLULAS B HUMANAS**

---

**Estibaliz Tamayo Orbegozo**

Febrero, 2017

**Directora de tesis: Susana Larrucea Bilbao**

Departamento de Biología Celular e Histología

Universidad del País Vasco (UPV/EHU)



## **Agradecimientos**

Debo decir que me considero una persona afortunada, puede que sea porque siempre intento ver el vaso medio lleno pero sobre todo, porque cuando miro a mí alrededor cuento con personas increíbles, las que en esta etapa de tanto trabajo en la que en algunos momentos he disfrutado y en otros me ha tocado sufrir un poquillo, una vez más me han demostrado su apoyo incondicional. Por todo esto, aprovechando estas líneas, me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a estas grandes personas que me rodean:

En el ámbito profesional, ahora que he conocido de cerca el mundo de la investigación, me gustaría mostrar mi admiración a todas las personas que se dedican a ello, incluidos los miembros de este tribunal quienes a pesar de sus apretadas agendas han manifestado una gran disponibilidad. Porque gracias a su trabajo hoy en día enfermar de linfoma es bastante más esperanzador que hace unas décadas. En lo que me toca de cerca, agradecer como no a mi directora de tesis Susana Larrucea, alguien con una pasión incondicional hacia la ciencia, quién ha confiado plenamente en mí y me ha dedicado tantísimo tiempo. Del mismo modo, me gustaría tener unas palabras de gratificación para Laura, gracias por enseñarme a manejar en el laboratorio. Gracias al Servicio de Inmunología del Hospital de Cruces por abrirnos sus puertas y también por el asesoramiento profesional con las muestras de pacientes, y por último, gracias a todos los compañeros y grandes profesionales de BioCruces con los que he compartido numerosas experiencias. En especial gracias a mi tocaya, por dedicarme todos los días una sonrisa y por escucharme cuando lo he necesitado. Una vez más, en otra etapa profesional, espero llevarme amigos con los que seguir compartiendo momentos dentro y fuera del laboratorio.

Ahora que este trabajo que tantos quebraderos de cabeza me ha llevado está dando su fruto he comprendido que el mejor camino no es siempre el más fácil. Por ello, en parte, este trabajo se lo quiero dedicar a una persona muy especial quien me enseñó una gran frase que me ha enseñado a ser luchadora: “de los cobardes no se ha escrito nada”. Gracias a estos 4 años que he dedicado a la investigación más básica he conseguido ampliar enormemente mis conocimientos científicos que han complementado mi formación sanitaria. Espero dut nitaz harro egotea amama!

En lo personal me gustaría agradecer de todo corazón a las personas más importantes de mi vida. Por un lado a mis dos hermanos Unai y Josu, mi hermana Ane, sus parejas y mis queridos sobrinos. Aunque por ser la pequeña de cuatro hermanos siempre me dejaban el peor sitio para estudiar, al final no salió mal la cosa y por lo demás siempre me han cuidado un montón!!!! Como no, a mis padres, unas personas admirables, gracias por darme la mejor educación con la que he podido contar. Y por último me gustaría agradecerle a Ruben, la persona con la que llevo compartiendo más de un tercio de mi vida. Eskerrikasko por tu paciencia por tu nobleza, por tu apoyo diario, eres la persona con quién hace dos años cumplí el sueño de dar la vuelta al mundo y ahora voy a cumplir el de ser madre, algo que me ha dado unas fuerzas tremendas para tirar para adelante y para luchar con ganas en esta última etapa que ha sido la más dura de toda la tesis doctoral.

**UNA VEZ MÁS GRACIAS A TODOS VOSOTROS POR HACER POSIBLE LA  
REALIZACIÓN DE ESTE BONITO TRABAJO.**





**Ruben, Ama eta bidean datorren nire alaba maitea,**

**BEREZIKI ZUENTZAT**



## Resumen

Los linfomas no Hodgkin (NHL) de células B maduras constituyen un grupo de neoplasias linfoides muy heterogéneo, tanto a nivel biológico como clínico, que abarca desde enfermedades indolentes hasta altamente agresivas. A pesar del avance experimentado en el tratamiento de los NHL desde la inclusión de anticuerpos monoclonales anti-CD20 a la terapia estándar, el pronóstico de los pacientes con formas más agresivas de la enfermedad es aún desfavorable debido a la adquisición de resistencia a fármacos que limita en gran medida su eficacia. Los mecanismos moleculares que promueven los linfomas de células B solo se conocen parcialmente. En las últimas décadas se ha demostrado que la desregularización de varios genes y vías de señalización induce la proliferación y supervivencia de los linfomas de células B, entre los que se incluyen los genes *MYC*, *Tp53*, *BCL2* y *BCL6* y las vías de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), el receptor de células B (BCR)/tirosina quinasa de Bruton (BTK) y el factor nuclear kB (NF-kB).

La proteína 1 similar a la podocalicina (PCLP1) es una proteína transmembrana de tipo II perteneciente a la familia de las sialomucinas CD34 y expresada en células normales y en varios tipos de tumores. Expresiones elevadas de PCLP1 se han asociado con fenotipos más agresivos y pronóstico desfavorable en cáncer de mama, próstata, colorectal, ovárico y renal. PCLP1 regula la morfología y adhesión celulares y presenta propiedades antiadherentes y proadherentes, dependiendo del contexto celular. En células de cáncer de mama, PCLP1 aumenta la migración, invasión, expresión de metaloproteasas y la activación de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y PI3K, ambas vías implicadas en la proliferación, supervivencia y migración celulares. Asimismo, PCLP1 participa en la quimioresistencia a cisplatino. La expresión de PCLP1 se ha detectado en blastos de la mayoría de pacientes de leucemias mieloides agudas, y leucemias linfoides agudas, aunque el papel de esta proteína en la progresión de las neoplasias hematológicas y su expresión en los linfomas aún no se ha determinado.

El principal objetivo de este trabajo es aportar conocimiento sobre la función de PCLP1 en las células B maduras de linfoma. Nuestros resultados muestran que la expresión de PCLP1 está aumentada en las células malignas de algunos pacientes con linfomas de células B. Además, hemos demostrado que la sobreexpresión de PCLP1 aumenta la proliferación, la adhesión célula-célula, la formación de colonias y la migración celular en células de linfoma de células B. PCLP1 promueve asimismo la

resistencia a la muerte mediada por dexametasona, peróxido de hidrógeno y el anticuerpo monoclonal anti-CD20 de tipo II obinutuzumab. Por otro lado, éste es el primer trabajo que atribuye a PCLP1 una función en la reprogramación metabólica, necesaria para mantener la elevada tasa proliferativa de las células tumorales. Concretamente, PCLP1 aumenta la dependencia a la glutamina de las células de linfoma de células B, la vía de las pentosas fosfato (PPP), así como la producción de vacuolas lipídicas citosólicas. En resumen, el presente trabajo demuestra que PCLP1 contribuye a la proliferación y supervivencia de las células B maduras de linfoma y sugiere que esta proteína podría promover la linfomagénesis y representar una diana terapéutica eficaz para el tratamiento de los linfomas de células B.





## Abreviaturas

<b>2DG</b>	2-deoxi-D-glucosa
<b>6AN</b>	6-aminonicotinamida
<b>7ADD</b>	7-aminoactinomicina D
<b>ABC</b>	<i>ATP Binding Cassette</i>
<b>Acetil CoA</b>	Acetil coenzima A
<b>ADC</b>	Anticuerpos conjugados con drogas
<b>ADCC</b>	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ALL</b>	Leucemia linfoide aguda
<b>AML</b>	Leucemia mieloide aguda
<b>AMP</b>	Adenosina monofosfato
<b>AMPK</b>	Proteína quinasa activada por AMP
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BCR</b>	Receptor de células B
<b>BL</b>	Linfoma de Burkitt
<b>BSA</b>	Albumina de suero bovino
<b>BTK</b>	Tirosina quinasa de Bruton
<b>CAR</b>	Receptor antigénico quimérico
<b>CDC</b>	Citotoxicidad dependiente de complemento
<b>CKI</b>	Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina
<b>CEIC</b>	Comité Ético de Investigación Clínica
<b>CG</b>	Centro germinal
<b>CHO</b>	Ovario de hámster chino
<b>CHOP</b>	Ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina, vincristina y prednisona
<b>CLL</b>	Leucemia linfocítica crónica
<b>CtBP</b>	<i>C-terminal-binding protein</i>
<b>DLBCL</b>	Linfoma difuso largo de células B
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DDR1</b>	Receptor de dominio de discoidina 1

<b>EMA</b>	Agencia Europea del Medicamento
<b>EMP1</b>	Proteína 1 epitelial de membrana
<b>EMT</b>	Transición epitelial-mesenquimal
<b>ERM</b>	Ezrina-Radixina-Moesina
<b>EUA</b>	Estados Unidos de América
<b>FAD</b>	Dinucleótido de flavina y adenina en su forma oxidada
<b>FADH2</b>	Dinucleótido de flavina y adenina en su forma reducida
<b>FASN</b>	Enzima sintasa de ácidos grasos
<b>FBS</b>	Suero de ternera fetal
<b>FDA</b>	Agencia Estadounidense de Alimentos y Medicamentos
<b>FL</b>	Linfoma Folicular
<b>FMO</b>	Fluorescencia menos uno
<b>G6P</b>	Glucosa-6-fosfato
<b>G6PD</b>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GLS</b>	Glutaminasa
<b>GLUT</b>	Transportadores de glucosa
<b>H2O2</b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HCL</b>	Leucemia de células peludas
<b>HEV</b>	Vénulas de endotelio alto
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Factor inducible de hipoxia 1
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano
<b>HO<math>\cdot</math></b>	Radical hidroxilo
<b>HSC</b>	Precursor hematopoyético común
<b>ICAM</b>	Moléculas de adhesión intracelular
<b>IDH</b>	Isocitrato deshidrogenasa
<b>Igs</b>	Inmunoglobulinas
<b>ILSG</b>	Grupo Internacional del Estudio del Linfoma
<b>JAK</b>	Quinasa Janus
<b>LFA-1</b>	Antígeno 1 asociado a la función de los leucocitos
<b>M</b>	Muerte en cada caso
<b>MALT</b>	Linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos



<b>MCL</b>	Linfoma de células del manto
<b>Me</b>	Muerte espontánea
<b>MEP</b>	Progenitor transformado de Myb-Ets 21
<b>MFI</b>	Media de intensidad de fluorescencia
<b>miR</b>	Micro RNA
<b>MMP</b>	Metaloproteinasas de matriz extracelular
<b>MPT</b>	Transición de permeabilidad mitocondrial
<b>MSC</b>	Célula madre mesenquimal
<b>Mt</b>	Muerte total
<b>MZL</b>	Linfoma de zona marginal
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida
<b>NCAM</b>	Moléculas de adhesión de células neuronales
<b>NF-kB</b>	Factor nuclear kB
<b>NHERF</b>	Factor regulador del intercambiador Na <sup>+</sup> /H
<b>NHL</b>	Linfoma no Hodgkin
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCLP1</b>	Proteína 1 similar a podocalicina
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>P-gp</b>	P-glicoproteína 1
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3-quinasa
<b>PK-M2</b>	Isoforma 2 de piruvato quinasa
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PPP</b>	Vía de las pentosa fosfato
<b>R5P</b>	Ribosa-5-fosfato
<b>R-CHOP</b>	Rituximab, ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina, vincristina y prednisona
<b>REAL</b>	Revisión de la Clasificación Americana-Europea de neoplasias linfoides

<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
<b>SDF-1</b>	Factor 1 derivado de células del estroma
<b>SGLT</b>	Transportadores de glucosa asociados a sodio
<b>SLeX</b>	Complejo sialilado relacionado con la familia de Lewis X
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>Sp1</b>	Proteína de especificidad 1
<b>TCA</b>	Ácidos tricarboxílicos
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	Factor de crecimiento transformador $\beta$ 1
<b>VCAM</b>	Moléculas de adhesión vascular
<b>VEB</b>	Virus Epstein Barr
<b>VLA</b>	Antígenos de expresión muy tardía
<b>WM</b>	Macroglobulinemia de Waldeström
<b>WT1</b>	Proteína del tumor de Wilms 1



# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. LINFOMA NO HODGKIN DE CÉLULAS B.....</b>	<b>3</b>
1.1. Proceso de desarrollo de los linfocitos B.....	3
1.1.1. Alteraciones en el desarrollo de los linfocitos B.....	5
1.2. Epidemiología del linfoma no Hodgkin de células B.....	6
1.3. Estadios del linfoma no Hodgkin de células B.....	7
1.4. Clasificación del linfoma no Hodgkin de células B.....	8
1.4.1. Linfoma folicular.....	10
1.4.2. Linfoma linfoplasmacítico/Macroglobulinemia de Waldenström.....	10
1.4.3. Leucemia de células peludas.....	11
1.4.4. Leucemia linfocítica crónica/linfoma de linfocitos pequeños.....	11
1.4.5. Linfoma de Burkitt.....	11
1.5. Procesos celulares implicados en la linfomagénesis.....	13
1.5.1. Adhesión celular.....	13
1.5.2. Migración celular.....	14
<b>2. TRATAMIENTO DEL LINFOMA NO HODGKIN DE CÉLULAS B.....</b>	<b>15</b>
2.1. Agentes citostáticos.....	15
2.2. Pequeñas moléculas inhibidoras.....	16
2.3. Glucocorticoides.....	16
2.3.1. Apoptosis tumoral mediante estrés oxidativo.....	17
2.4. Inmunoterapia.....	18
2.4.1. Anticuerpos monoclonales anti-CD20.....	18
2.4.2. Direcciones futuras.....	23
<b>3. METABOLISMO Y CANCER.....</b>	<b>24</b>
3.1. Metabolismo celular en condiciones fisiológicas.....	24
3.2. Metabolismo celular en condiciones tumorales.....	27
3.2.1. Alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Efecto Warburg.....	27
3.2.2. Alteraciones en el metabolismo de la glutamina.....	30
3.2.3. Alteraciones en el metabolismo de la Vía de las Pentosas Fosfato.....	32
3.2.4. Alteraciones en el metabolismo lipídico.....	33
3.2.5. Oncogenes y vías de señalización implicados en la reprogramación metabólica de las células tumorales.....	34
3.2.6. Metabolismo celular y linfoma.....	35
<b>4. PODOCALICINA.....</b>	<b>37</b>
4.1. Estructura proteica de PCLP1 y organización genómica.....	37
4.2. Regulación de la expresión de PCLP1.....	39
4.3. Función de PCLP1.....	39
4.3.1. PCLP1 en células epiteliales.....	39

4.3.2. PCLP1 en células del sistema nervioso.....	41
4.3.3. PCLP1 en células madre.....	41
4.3.4. PCLP1 en células hematopoyéticas.....	41
4.4. PCLP1 en cáncer.....	42
4.4.1. PCLP1 en tumores hematológicos.....	43
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
<b>1. OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRIMARIAS.....</b>	<b>51</b>
1.1. Muestras de pacientes.....	51
1.2. Muestras de donantes sanos.....	51
<b>2. CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES.....</b>	<b>52</b>
<b>3. TRANSFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES.....</b>	<b>52</b>
<b>4. CITOMETRÍA DE FLUJO.....</b>	<b>53</b>
4.1. Cuantificación de niveles de moléculas de superficie celular.....	53
<b>5. WESTERN BLOT.....</b>	<b>55</b>
<b>6. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....</b>	<b>56</b>
<b>7. CUANTIFICACIÓN DE NIVELES DE PCLP1 EN LINFOCITOS NORMALES Y LINFOCITOS MALIGNOS EN MUESTRAS DE PACIENTES.....</b>	<b>58</b>
7.1. Estrategia de selección.....	59
<b>8. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR.....</b>	<b>59</b>
<b>9. ENSAYO CLONOGÉNICO.....</b>	<b>60</b>
<b>10. ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR.....</b>	<b>60</b>
<b>11. ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR.....</b>	<b>61</b>
<b>12. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD CELULAR.....</b>	<b>61</b>
<b>13. ESTADÍSTICA.....</b>	<b>62</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
<b>1. PCLP1 EN LA LINFOMAGÉNESIS.....</b>	<b>67</b>
1.1. Expresión de PCLP1 en líneas celulares y muestras de pacientes.....	67
1.1.1. Expresión de PCLP1 en líneas celulares de linfoma y ALL.....	67
1.1.2. Expresión de PCLP1 en linfocitos B normales y linfocitos B malignos de muestras de pacientes con neoplasias de células B.....	69
1.2. Generación de células Raji que sobreexpresan PCLP1.....	72
1.3. PCLP1 induce la proliferación celular, formación de colonias, migración quimiotáctica y adhesión intercelular en células Raji.....	73
1.3.1. Efecto de PCLP1 en la proliferación celular, en la formación de colonias y migración quimiotáctica.....	73
1.3.2. Efeccto de PCLP1 en la adhesión intercelular.....	75

1.4. PCLP1 se localiza en la región pericentriolar de las células Raji.....	78
<b>2. PCLP1 EN LA RESISTENCIA A FÁRMACOS.....</b>	<b>80</b>
2.1. PCLP1 induce resistencia a la muerte mediada por dexametasona y especies reactivas de oxígeno en células Raji.....	80
2.2. PCLP1 aumenta la resistencia a la muerte directa inducida por obinutuzumab en células Raji .....	83
<b>3. PCLP1 EN EL METABOLISMO DE LAS CÉLULAS TUMORALES.....</b>	<b>85</b>
3.1. PCLP1 regula el metabolismo celular en células Raji.....	85
3.2. PCLP1 induce la síntesis de vacuolas lipídicas en células Raji.....	89
3.3. La proliferación inducida por PCLP1 es modulada por inhibidores metabólicos.....	92
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>99</b>
<b>1. PCLP1 INDUCE A UN FENOTIPO MÁS MALIGNO EN CÉLULAS RAJI.....</b>	<b>101</b>
<b>2. PCLP1 CONFIERE RESISTENCIA A DEXAMETASONA Y OBINUTUZUMAB EN CÉLULAS RAJI.....</b>	<b>106</b>
<b>3. PCLP1 PROMUEVE LA REPROGRAMACIÓN METABÓLICA EN CÉLULAS RAJI.....</b>	<b>109</b>
<b>4. CONSIDERACIONES FINALES.....</b>	<b>113</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>117</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>121</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>155</b>



# **I. INTRODUCCIÓN**



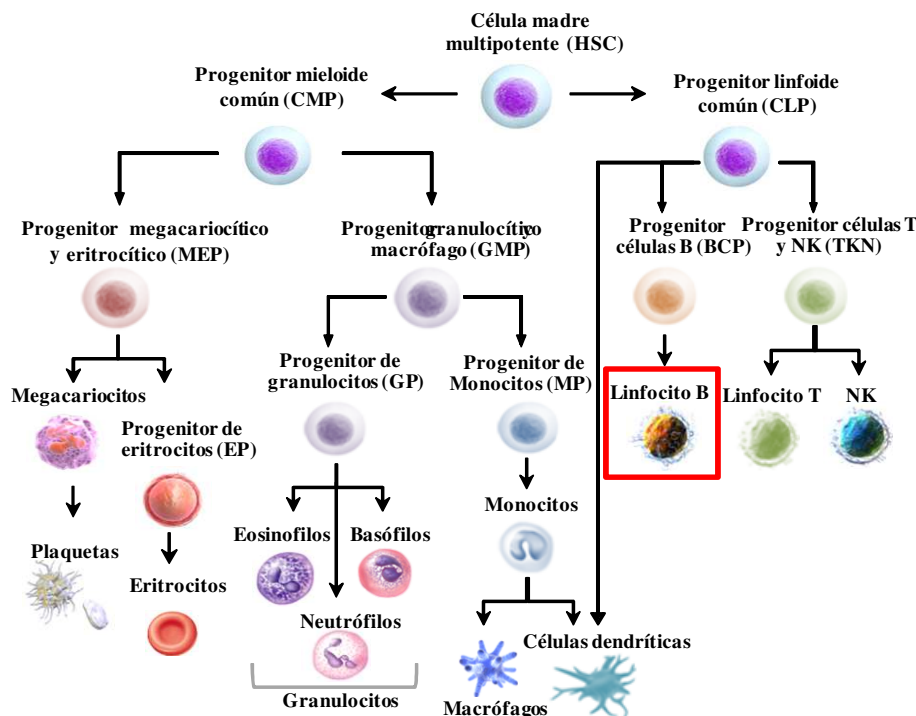




## 1. LINFOMA NO HODGKIN DE CÉLULAS B

### 1.1. Proceso de desarrollo de los linfocitos B

Los linfocitos son un subtipo celular de leucocitos o glóbulos blancos que pertenecen a las células del sistema inmunitario y constituyen aproximadamente el 30% del total de la población de leucocitos de la sangre periférica. Al igual que el resto de células que forman el sistema inmunitario, provienen de un precursor hematopoyético común (HSC) presente en la médula ósea que da lugar a dos linajes diferentes. Por un lado, el linaje linfoide se diferencia para dar lugar a células linfocitarias, tales como linfocitos T, linfocitos B, células *Natural Killer* (NK) y células dendríticas que expresan moléculas de membrana únicas.<sup>1</sup> Por otro lado, el linaje mieloide da lugar a los glóbulos rojos, plaquetas, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos y células dendríticas. Las células NK, células dendríticas, macrófagos, granulocitos y mastocitos se engloban como células del sistema inmunitario innato y representan la primera línea de defensa frente a patógenos o a agentes extraños. Por el contrario, los linfocitos T, B y sus mediadores humorales (citocinas y anticuerpos) generan una respuesta específica de antígeno o adaptativa<sup>2</sup> (**Figura 1**).



**Figura 1. Hematopoyesis.** En la médula ósea, la célula madre pluripotente da lugar a dos linajes denominados mieloide y linfoide. El linaje mieloide da lugar a los megacariocitos y plaquetas, eritrocitos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y monocitos. Los monocitos se diferencian finalmente a macrófagos y células dendríticas. Por otro lado, el linaje linfoide da lugar a los linfocitos B, T, células NK y a las células dendríticas.

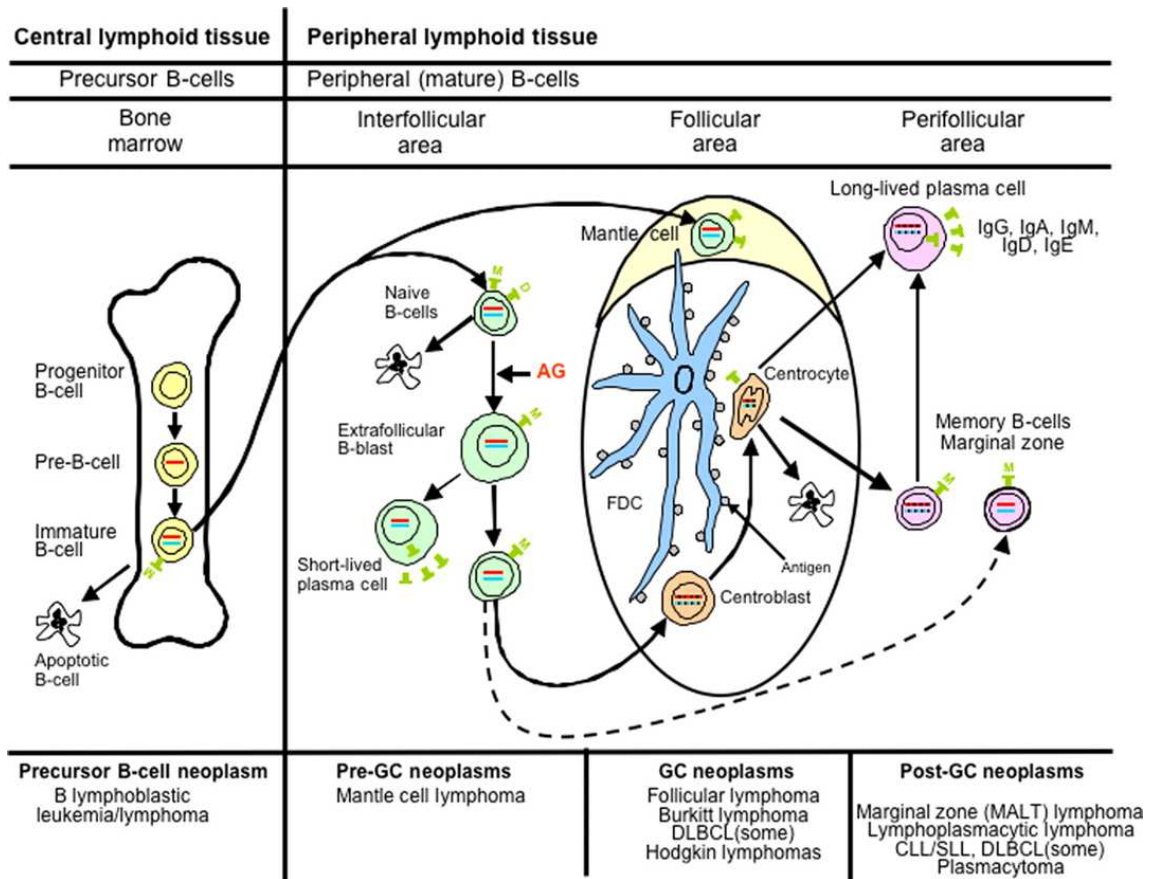
Dentro de los linfocitos, uno de los principales componentes del sistema inmunitario, los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos. Reconocen los antígenos extracelulares y se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos, por lo que actúan como mediadores de la inmunidad humoral. Antes del nacimiento, los linfocitos B se desarrollan en el hígado fetal a partir de precursores comprometidos y, después del nacimiento, los linfocitos B se generan en la médula ósea provenientes de progenitores hematopoyéticos que inicialmente no expresan inmunoglobulinas (Igs). En la médula ósea también se produce el primer proceso de diferenciación de las células B: el reordenamiento de los segmentos V (*variable*), D (*diversity*) y J (*joining*) de los genes de las Igs, lo que da lugar a la producción de Igs con sus cadenas pesadas y ligeras,<sup>3</sup> convirtiéndose en linfocitos B inmaduros que expresan Igs de clase IgM unidas a la membrana.<sup>4</sup> Posteriormente, los linfocitos B abandonan la médula ósea para seguir madurando, principalmente en el bazo. En el bazo las células evolucionan a linfocitos B foliculares, expresan Igs de clase IgM e IgD en la superficie celular y adquieren la capacidad de recircular y poblar todos los órganos linfáticos periféricos. Los linfocitos vírgenes procedentes de la médula ósea, junto con células presentadores de antígenos, forman los folículos linfoides primarios que carecen de centro germinal. Cuando estas células linfoides reconocen un antígeno y son estimuladas por éste, se produce la fase de activación de los linfocitos B y la posterior proliferación celular, lo que conduce a la expansión clonal, seguida de la diferenciación celular, dando lugar a los folículos linfoides secundarios. Estos órganos se componen desde el interior al exterior del centro germinal, el manto y la zona marginal, en algunos casos. El centro germinal es el origen del mayor número de linfomas.<sup>5</sup> En la zona oscura del centro germinal predominan los centroblastos, que proliferan con gran rapidez y sufren un gran número de mutaciones en la región V del gen de las Igs, un proceso denominado hipermutación somática y que incrementa la diversidad de las Igs. Los centroblastos maduran a centrocitos, unos linfocitos pequeños y con núcleo irregular, los cuales se sitúan en la zona clara del centro germinal. Los centrocitos experimentan un cambio de isotipo de Igs de forma que pasarán a ser de IgM a IgG, IgA o con menor frecuencia IgE. Finalmente, los centrocitos saldrán del centro germinal y se diferenciarán a células plasmáticas secretoras de anticuerpos o a células B memoria post-centro germinal.<sup>6</sup> En **Figura 2** se muestra una representación gráfica del desarrollo de los linfocitos B. Se calcula que el desarrollo de un linfocito B maduro a partir de un progenitor linfoide dura de 2 a 3 días en los seres humanos. Durante su maduración, las células de la línea de

linfocitos B pasan a través de estadios distinguibles, caracterizado cada uno de ellos por diferentes marcadores de superficie celular y un patrón específico de expresión del gen de la IgG.

#### 1.1.1. Alteraciones en el desarrollo de los linfocitos B

El desarrollo de linfocitos B funcionales depende de la maduración de progenitores multipotentes en la médula ósea. La formación de estos progenitores específicos se encuentra coordinada por factores de transcripción que activan los genes del linaje B, a la vez que por la restricción del desarrollo de otros subtipos celulares. Así, la alteración de este proceso podría causar la formación de algunas neoplasias.<sup>7</sup> Los mecanismos moleculares que promueven los linfomas B se conocen solo parcialmente. En las últimas décadas se han descrito varios genes y vías de señalización cuya desregularización induce la proliferación y supervivencia de las células de linfomas B. Entre ellos destacan los genes *MYC*, *Tp53*, *BCL2* y *BCL6* y las vías de señalización fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), receptor de células B (BCR)/tirosina quinasa de Bruton (BTK) y la vía del factor nuclear-kB (NF-kB).<sup>8</sup>

En general, las células tumorales linfoides se originan a partir de la transformación maligna de sus precursores linfocíticos, que se detienen en un estado específico de diferenciación. En el momento de la transformación neoplásica la célula queda “congelada”, reteniendo los marcadores de membrana del estadio madurativo en el que se encontraba.<sup>9</sup> De este modo, las neoplasias de células linfoides reflejan en buena medida los diferentes estadios de maduración de las células linfoides B normales (**Figura 2**), tanto desde el punto de vista morfológico como inmunofenotípico. Esta semejanza es utilizada a la hora de clasificar y denominar las neoplasias linfoides.<sup>10</sup>



**Figura 2. Representación gráfica de la diferenciación de células B y su relación con las correspondientes neoplasias de células B.** Los precursores de células B que maduran en la médula pueden sufrir apoptosis o diferenciarse a célula B madura virgen, que al exponerse a un antígeno puede dar lugar a una célula plasmática de vida media corta o entrar en el GC. Los centroblastos, las células transformadas del GC, pueden sufrir apoptosis o madurar a centrocitos. Las células post-GC incluyen células plasmáticas de vida media larga y células B memoria/zona marginal. AG: antígeno; FDC: células dendrítica folicular. Barras roja y azul: reorganización del gen de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulinas, respectivamente. Puntos negros en las barras rojas y azules: hipermutaciones somáticas.<sup>11</sup>

## 1.2. Epidemiología del linfoma no Hodgkin de células B

El linfoma no Hodgkin (NHL) supone el 90% de los diagnósticos de linfoma en los países desarrollados, siendo más frecuentes el NHL de células B (85%) que el NHL de células T (15%).<sup>12</sup> El 10% restante de los linfomas pertenecen a los linfomas de Hodgkin, o Enfermedad de Hodgkin, que se diferencia del NHL tanto clínica como terapéuticamente y en la presencia de células denominadas Reed-Sternberg.

Existen datos consistentes que demuestran un aumento constante en la incidencia del NHL durante los últimos años, habiéndose duplicado en las últimas décadas.<sup>13</sup> Como consecuencia, también ha ocurrido un aumento de la mortalidad, aunque en menor grado debido a la influencia de los tratamientos. El NHL es el tumor hematológico maligno más frecuente en adultos de todo el mundo, siendo más habitual en los países desarrollados y

en la raza blanca, afecta más a los hombres que a las mujeres y supone el séptimo cáncer más frecuente en hombres y el sexto entre las mujeres.<sup>14</sup> Algunos subtipos de NHL se relacionan con áreas geográficas concretas, lo que sugiere la participación de factores ambientales e infecciosos en el desarrollo de la enfermedad.<sup>13</sup> El incremento en su incidencia se puede atribuir, por un lado, a la mejora de las técnicas diagnósticas y sistemas de recogida de información y, por otro lado, al aumento de los linfomas asociados a situaciones de inmunodeficiencia (SIDA, trasplantes), si bien algunas causas de dicho aumento aún permanecen desconocidas. Además, el aumento de la incidencia no se puede atribuir de forma exhaustiva al envejecimiento de la población, dado que se refleja igualmente en las tasas ajustadas por edad.

Aunque su incidencia aumenta exponencialmente con la edad, los NHL son tumores con incidencia relativamente elevada en personas jóvenes, suponiendo un 7% de todos los cánceres diagnosticados en menores de 20 años en los países desarrollados.<sup>15</sup> Cabe destacar que los NHL de alto grado de malignidad afectan con mayor frecuencia a la población menor de 35 años, siendo los tipos de baja malignidad rarísimos en niños, lo que se traduce en un gran impacto en cuanto a años de vida potencial perdidos.<sup>13</sup>

### **1.3. Estadios del linfoma no Hodgkin de células B**

El sistema de clasificación por estadios usado en el NHL se basa en el Sistema de estadificación de Ann Arbor, propuesto originalmente para la enfermedad de Hodgkin y que, sin embargo, se ha usado para la clasificación del NHL durante más de 20 años.<sup>16</sup>

El sistema de estadificación del NHL se basa actualmente en la clasificación de Ann Arbor modificada por Costwolds.

Estadio I: compromiso de una sola región ganglionar o un solo sitio u órgano extraganglionar.

Estadio II: compromiso de dos o más regiones ganglionares del mismo lado del diafragma o afectación localizada de un sitio u órgano extraganglionar y una o más regiones ganglionares en el mismo lado del diafragma.

Estadio III: compromiso de regiones ganglionares a ambos lados del diafragma que pueden estar acompañadas por afectación localizada de un sitio u órgano extraganglionar o esplénico o de ambas

Estadio IV: Infiltración difusa o diseminada de uno o más órganos extraganglionares distantes, con o sin afectación asociada de los ganglios linfáticos.

#### 1.4. Clasificación del linfoma no Hodgkin de células B

Las neoplasias linfoides de células B se clasifican por el estado de madurez de las células afectadas. Así, la leucemia linfoblástica/linfoma linfoblástico agudo agrupa las enfermedades de células precursoras que se originan en la médula. En términos generales, se considera leucemia linfoblástica cuando existe más de un 20% de blastos en médula ósea y linfoma linfoblástico cuando el porcentaje de blastos es inferior al 20% y además es frecuente la aparición de una masa de células B. Por otro lado, cuando las células afectadas son maduras y tienen su origen en los ganglios linfáticos, la enfermedad que aparece es una leucemia linfocítica crónica (CLL) o linfoma maduro.

Los linfomas maduros de células B o NHL son un subgrupo heterogéneo constituido por más de 40 neoplasias diferentes del sistema inmunitario que surgen en ganglios linfáticos y/o tejido linfoide del parénquima de los órganos. Se clasifican acorde a las directrices publicadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) dentro de la clasificación de tumores hematopoyéticos y tejidos linfoides. El proyecto de esta clasificación se inició en 1995 y finalmente se publicó en el año 1999,<sup>17</sup> siendo su última actualización del año 2008 en su 4ª edición<sup>11</sup> y recientemente revisada.<sup>18</sup> Para el desarrollo de la clasificación de enfermedades hematológicas malignas, la OMS adoptó la Revisión de la Clasificación Americana-Europea de neoplasias linfoides (R.E.A.L) publicada en el año 1994 por el Grupo Internacional del Estudio del Linfoma (ILSG).<sup>19</sup> Dicha clasificación se basa en una combinación de características morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas y clínicas de las diferentes enfermedades.

En la **Tabla 1** se muestra la clasificación de neoplasias linfoides de células B maduras propuesta por la OMS.<sup>18</sup>



Tabla 1. Clasificación de la OMS de las neoplasias maduras de células B<sup>18</sup>

<b>Neoplasias maduras de células B</b>
Leucemia linfocítica crónica/linfoma de linfocitos pequeños
Linfocitosis monoclonal de células B
Leucemia prolinfocítica de células B
Linfoma de zona marginal esplénica
Leucemia de células peludas
Linfoma/Leucemia esplénica de células B inclasificable
Linfoma linfoplasmacítico
Gammopatía monoclonal de significado indeterminado (MGUS), IgM
Enfermedad de cadena pesada $\mu$
Enfermedad de cadena pesada $\gamma$
Enfermedad de cadena pesada $\alpha$
Gammopatía monoclonal de significado indeterminado (MGUS), IgG/A
Mieloma de células plasmáticas
Plasmacitoma solitario de hueso
Plasmacitoma extraóseo
Enfermedad de deposición de inmunoglobulina monoclonal
Linfoma de zona marginal extranodal de tejidos linfoides asociados a mucosa (MALT)
Linfoma de zona margina nodal
Linfoma folicular
Linfoma folicular pediátrico
Linfoma de células B grandes con reorganización IRF4
Linfoma primario de centro de folículo cutáneo
Linfoma de células del manto
Linfoma difuso de células B grandes (DLBCL)
Linfoma de células B grandes rico en células T/histocitos
DLBCL primario del sistema nervioso central
DLBCL primario cutáneo
DLBCL EBV+
Úlcera mucocutánea EBV+
DLBCL asociado a inflamación crónica
Granulomatosis linfomatoide

---

Linfoma de células B grandes primario de mediastino (timo)

Linfoma de células B grandes intravascular

Linfoma de células B grandes ALK+

Linfoma plasmablastico

Linfoma de efusión primaria

DLBCL HHV8+

Linfoma de Burkitt

*Burkitt-like* linfoma con aberración 11q

Linfoma de células B de alto grado con reordenamiento de *MYC* y *BCL2* y/o *BCL6*

Linfoma de células B de alto grado

Linfoma B, clasificable, con caracteres intermedios entre DLBCL B y Linfoma de Hodgkin clásico.

---

#### 1.4.1. Linfoma folicular

El linfoma folicular (FL) es el segundo NHL más frecuente por detrás del linfoma difuso de células B grandes (DLBCL). Comprende el 20% de todos los NHL y el 70% de los linfomas indolentes de América y Europa. La mayoría de pacientes son mayores de 50 años y presentan una enfermedad generalizada con ausencia de síntomas en el momento del diagnóstico. La afectación ganglionar es más común y suele acompañarse de enfermedad esplénica y de médula ósea.<sup>20</sup> El FL se origina en el centro germinal<sup>21</sup> y se caracteriza por el reordenamiento del gen *BCL2* en el 90% de los casos, produciéndose una translocación cromosómica que causa la yuxtaposición del gen *BCL2* en el cromosoma 18 y de la cadena pesada de la Ig en el cromosoma 14 t(14;18). Como consecuencia, aumenta la síntesis de la proteína antiapoptótica BCL2, lo que conlleva a una acumulación de linfocitos B que sufren mutaciones adicionales que originan finalmente el FL.<sup>22</sup> En estadios iniciales, el FL es potencialmente curable mediante radioterapia. No obstante, cuando se presenta en estadios avanzados, y a pesar de que el paciente puede alcanzar una remisión superior a diez años tras tratamiento con diferentes agentes terapéuticos, la enfermedad se considera incurable.

#### 1.4.2. Linfoma linfoplasmacítico/ Macroglobulinemia de Waldenström

El linfoma linfoplasmacítico, también denominado Macroglobulinemia de Waldenström (WM) es un tipo de neoplasia linfoproliferativa de células B de bajo grado por su crecimiento lento, caracterizado principalmente por la infiltración en médula ósea

de células linfoplasmáticas junto con una gammapatía monoclonal de IgM sérica.<sup>23</sup> Con una media de aparición de la enfermedad de en torno a 65 años, la baja incidencia que muestra esta enfermedad, unos 1500 nuevos casos anuales en los EUA, puede estar infravalorada debido a la ausencia de síntomas en los estadios tempranos.<sup>24</sup>

#### 1.4.3. Leucemia de células peludas

La leucemia de células peludas (HCL), clasificada dentro de las neoplasias linfoides maduras, es una neoplasia hematológica muy extraña, con 1000 nuevos casos nuevos cada año en los Estados Unidos de América (EUA).<sup>25</sup> Los hallazgos morfológicos se caracterizan por pequeños linfocitos de crecimiento lento portadores de proyecciones citoplasmáticas de pelo fino con extensa infiltración en órganos reticuloendoteliales.<sup>26</sup> Las recientes investigaciones han mejorado el conocimiento de los mecanismos genéticos e inmunológicos de esta leucemia, sugiriendo que la célula de origen que causa HCL es una HSC en lugar de un progenitor linfoide común.<sup>26</sup>

#### 1.4.4. Leucemia linfocítica crónica/linfoma de linfocitos pequeños

Históricamente el linfoma de linfocitos pequeños y la leucemia linfocítica crónica (CLL) se han clasificado como dos entidades diferentes. En cambio, actualmente se consideran dos manifestaciones clínicas diferentes de una misma enfermedad. Esta neoplasia es más frecuente en personas mayores, con unos 19.000 nuevos casos al año en los EUA. La CLL suele comenzar con una linfocitosis asintomática<sup>21</sup> que se diagnostica por un contaje de linfocitos en sangre periférica muy elevado<sup>27</sup> y que progresa hacia una pancitopenia concomitante con la aparición de hemorragias e infecciones que causan la muerte de estos pacientes.<sup>28</sup> Aunque aún no existe un consenso respecto a las células normales homólogas de las que derivan las células de CLL, se sabe que provienen de unos linfocitos ya expuestos a antígeno, semejantes a las células memoria.<sup>29</sup>

#### 1.4.5. Linfoma de Burkitt

El linfoma de Burkitt (BL) es una forma de NHL altamente agresiva, con una tasa de proliferación extremadamente elevada y que se presenta con mayor frecuencia en niños y adultos jóvenes.<sup>30</sup> Dentro de esta entidad se distinguen diferentes variedades: BL africana o endémica por su mayor incidencia en este continente, BL esporádica, descrito en el resto del mundo y BL asociado a inmunodeficiencias que ocurre más comúnmente en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana.

El BL más frecuente con diferencia es el BL endémico, su incidencia en niños de África ecuatorial se asemeja a la incidencia de la leucemia linfocítica aguda (ALL) en países desarrollados, y es de 3 a 6 casos por 100.000 niños de entre 0 y 14 años por año, suponiendo unas tasas del 30-50% de todos los cánceres infantiles en África ecuatorial.

La infección por el virus de Epstein Barr (VEB) en las células tumorales de BL endémico existe prácticamente en el 100% de los casos, mientras que es raro en el BL esporádico en el BL asociado a inmunodeficiencias, ya que tan solo se presenta en un 15-25% y 30-40% respectivamente.<sup>31-33</sup> Dicho virus se considera oncogénico por su capacidad de transformar células B normales en células linfoblastoides *in vitro*.<sup>34</sup> Sin embargo, la presencia de personas asintomáticas infectadas con el virus apunta a la necesidad de factores adicionales para el desarrollo de BL.

La translocación cromosómica del oncogen *MYC* representa el sello distintivo del BL que afecta a las tres variantes<sup>35</sup>, aunque dicha translocación también puede aparecer en otros tipos de linfomas, como en el DLBCL. Se trata de una translocación cromosómica que implica en el 80% de los casos al locus del gen *MYC* en el cromosoma 8 y al genes de las cadenas pesadas de la Ig en el cromosoma 14 t(8;14). En un 20% de los casos las translocaciones ocurren entre los cromosomas 2 y 8 t(2;8) o los cromosomas 8 y 22, t(8;22) que implican al locus del gen *MYC* y a los genes de las cadenas ligeras de la Ig.<sup>36</sup>

Los genes *MYC* constituyen una familia de protooncogenes compuesta por varios miembros, *L-MYC*, *N-MYC* y *c-MYC*, cuya reorganización puede dar lugar a una desregularización de la proteína MYC y consecuentemente la transformación oncogénica,<sup>37</sup> caracterizada por el aumento de la capacidad proliferativa celular, la reprogramación metabólica y la inestabilidad genómica en el BL. No obstante, la activación de *MYC* también conduce a la apoptosis celular, lo que apunta a la participación de factores adicionales en el desencadenamiento de la linfomagénesis.

Recientemente se han identificado varias mutaciones en la vía de señalización de PI3K en pacientes con BL, lo que refleja la cooperación de *c-MYC* y PI3K en el desarrollo de BL y proporciona diferentes dianas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad.<sup>38</sup>

## 1.5. Procesos celulares implicados en la linfomagénesis

### 1.5.1. Adhesión celular

Las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular están mediadas por moléculas que se expresan en la superficie de la mayoría de las células, denominadas colectivamente moléculas de adhesión celular. Se agrupan en diferentes familias entre las que se encuentran las integrinas, las selectinas, la superfamilia de las Igs, las cadherinas y la familia de CD44.<sup>39</sup> Estas moléculas controlan varias funciones celulares, incluidas la proliferación, migración, supervivencia y muerte celulares a través de la activación de varias vías de señalización intracelular.

Las integrinas son una superfamilia de proteínas integrales de membrana compuestas por una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$  unidas de manera no covalente, cada una de ellas con diferentes variables que al combinarse forman numerosas integrinas diferentes. Se clasifican en función de su cadena  $\beta$ , de la que se conocen 8 subunidades diferentes. Estas moléculas participan principalmente en la adhesión celular a la matriz extracelular y en la adhesión intercelular, ambos procesos dependiente de la presencia de cationes divalentes, como calcio y magnesio<sup>40</sup>

Las selectinas se caracterizan por poseer una estructura muy conservada, la cual incluye un dominio tipo lectina, un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico, dos o más dominios tipo proteína reguladora del complemento, una región transmembrana y una región intracitoplasmática corta en el extremo carboxilo terminal. Se han identificado tres miembros de esta familia: CD62L (selectina L), expresada en leucocitos, CD62P (selectina P), expresada en plaquetas, y CD62E (selectina E), expresada en el endotelio. La principal función de CD62L consiste en establecer el primer contacto entre los leucocitos y el endotelio, una unión débil y reversible reforzada posteriormente por las integrinas.<sup>41</sup>

La superfamilia de las Igs, caracterizada por la presencia de diferente número de dominios de tipo Ig, está implicada en el reconocimiento intercelular y en la transducción de señales, e incluye moléculas que intervienen en la inmunidad celular, como el antígeno leucocitario humano (HLA) o el receptor de células T (TCR), en el tráfico leucocitario, como las moléculas de adhesión intracelular 1 y 2 (ICAM-1, ICAM-2) y las moléculas de adhesión vascular 1 (VCAM-1), entre otros.<sup>42</sup>

Las cadherinas son moléculas de adhesión transmembrana dependientes de calcio que mantienen y estabilizan las conexiones intercelulares y controlan la morfología y la

polaridad celulares, constituyendo una de las moléculas de adhesión más importante en la formación de asociaciones célula-célula.<sup>43</sup> Existen varios subtipos, entre los que destacan las E-cadherinas, P-cadherinas y N-cadherinas.<sup>44</sup>

La molécula CD44 es una glucoproteína transmembrana involucrada en la proliferación, invasión, migración y adhesión celulares y que actúa como receptor para una serie de moléculas, entre las cuales se encuentra el ácido hialurónico.<sup>45</sup> CD44 participa en la recirculación de linfocitos desde la sangre periférica hacia los tejidos, especialmente los ganglios linfáticos.<sup>46</sup>

La mayoría de los NHL expresan diferentes receptores de adhesión que median la adhesión célula a célula o la adhesión de la célula con la matriz extracelular. Su análisis permite mejorar el conocimiento de la etiopatogenia y del comportamiento de los linfomas, dado que se encuentran directamente implicados en la respuesta inmunitaria y en la recirculación y tráfico linfocitario.<sup>47</sup> Varios estudios han puesto de manifiesto la capacidad de los receptores de adhesión para provocar la diseminación del linfoma y generar una serie de señales hacia el interior de la célula que promueven el crecimiento y la supervivencia celulares, contribuyendo de este modo a la agresividad del linfoma. Por ello, la determinación de estas moléculas ofrece una herramienta eficaz para predecir la evolución de los pacientes con linfoma.<sup>39</sup>

### 1.5.2. Migración celular

En condiciones fisiológicas, tanto el tráfico leucocitario como la linfopoyesis de células B, la mielopoyesis de la médula ósea, la supervivencia y proliferación de HSCs y la migración de las HSCs a la médula ósea, se encuentran regulados principalmente por el receptor de quimiocinas CXCR4 y su ligando CXCL12, también denominado factor 1 derivado de células del estroma (SDF-1).<sup>48</sup> CXCL12 es secretado constitutivamente a niveles elevados por las células del estroma, formándose un gradiente de concentración de esta quimiocina que retiene las HSCs y progenitores hematopoyéticos presentes en la médula ósea en su interior y que regula la migración de las células que expresan CXCR4 hacia los órganos que lo secretan.<sup>49</sup>

El receptor de quimiocinas CXCR4 se expresa a altos niveles en una variedad de células hematológicas malignas, incluyendo linfomas y leucemias linfocíticas.<sup>50</sup> La señalización CXCL12/CXCR4 conduce a la diseminación de las células malignas a órganos distantes como la médula ósea y nódulos linfáticos,<sup>51</sup> donde la interacción con las células del estroma secretoras de CXCL12 promueve la supervivencia celular y la

resistencia a la quimioterapia de las células tumorales.<sup>52,53</sup> Además, existen evidencias de que el eje CXCL12/CXCR4 participa en la regulación de las células madre cancerosas, responsables de iniciar el tumor, la colonización metastásica y la resistencia al tratamiento.<sup>54</sup> Por todo ello, se ha propuesto la quimiocina CXCR4 como posible diana terapéutica en el tratamiento del NHL.<sup>50,54</sup>

## **2. TRATAMIENTO DEL LINFOMA NO HODGKIN DE CÉLULAS B**

El NHL es una entidad neoplásica hematológica que se manifiesta con diversos grados de agresividad, lo que requiere distintos manejos terapéuticos y se traduce en un riesgo de recaída variable. Puede llegar a ser agresivo en sus estadios más avanzados III y IV, si bien su correcto manejo permite aumentar las tasas de supervivencia y el intervalo libre de enfermedad. Un buen diagnóstico del subtipo y del estadio del linfoma, así como el conocimiento del estado físico y el pronóstico del paciente son indispensables para diseñar una correcta estrategia terapéutica. En algunos casos la quimioterapia y la radioterapia resultan efectivos, mientras que en otras ocasiones tanto los pacientes con NHL primario como los que han sufrido una recaída de la enfermedad no responden bien a los tratamientos convencionales. Por ello, cada vez es más frecuente el uso de anticuerpos monoclonales y nuevas moléculas dirigidas contra dianas terapéuticas específicas. Así, en algunos subtipos de NHL, para conseguir una remisión completa, se hace necesario utilizar regímenes de dosis altas de quimioterapia, anticuerpos monoclonales dirigidos a algunos tipos celulares o incluso el trasplante de células madre. Los protocolos quimioterapéuticos que se plantean en cada situación varían mucho dependiendo del tipo de linfoma y de la situación del paciente. Paradójicamente, los NHL agresivos con mayor tasa de crecimiento acostumbran a responder mejor a los tratamientos quimioterapéuticos, mientras que los linfomas de curso indolente son muy difíciles de erradicar. Actualmente se dispone de un arsenal terapéutico amplio para combatir esta enfermedad. A continuación se muestran los grupos terapéuticos utilizados en el tratamiento del NHL.

### **2.1. Agentes citostáticos**

Los agentes citostáticos utilizados comúnmente para el tratamiento de los tumores, consisten en sustancias citotóxicas que causan daño celular interfiriendo en fases específicas del ciclo celular y, por tanto, ejercen su efecto contra células que se

encuentran en proceso de división. Dado que no actúan de forma selectiva sobre las células tumorales, sino sobre todas las células del organismo, estos compuestos producen diversos efectos adversos. La intensidad y la frecuencia del tratamiento con estos agentes están limitadas por la mielosupresión y comorbilidades asociadas. Asimismo, el desarrollo de resistencia a los agentes citostáticos conduce a la recaída de la enfermedad, por lo que se requieren nuevos tratamientos con diferentes mecanismos de acción y que minimicen los efectos adversos típicos de la quimioterapia. El régimen quimioterapéutico más frecuentemente utilizado para tratar el NHL es el compuesto por los citostáticos ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina o doxorubicina, oncovin o vincristina y por el glucocorticoide prednisona (CHOP).<sup>55</sup>

## **2.2. Pequeñas moléculas inhibidoras**

Estudios realizados con pequeñas moléculas inhibidoras que tienen como diana terapéutica diferentes vías implicadas en la transducción de señales, la proliferación, la apoptosis o la diferenciación, entre otros, han mostrado beneficios clínicos en el tratamiento de NHL resistentes a la quimioterapia,<sup>56</sup> aunque la duración óptima del tratamiento y el efecto de la combinación con otros agentes se encuentra aún en fase de estudio. No obstante, estos mecanismos de acción, aunque novedosos, presentan numerosos retos que se han de vencer, como el nivel de respuesta, manejo de las reacciones adversas y la detección de mecanismos de resistencia potenciales. Dentro de este grupo de moléculas destacan los inhibidores BTK, PI3K, BCL2, quinasas Janus (JAKs) y las proteínas de la familia Aurora Quinasa.

## **2.3. Glucocorticoides**

Los glucocorticoides son un grupo de fármacos ampliamente utilizados en el tratamiento de NHL en combinación con otros agentes citotóxicos por su efecto proapoptótico. Como miembros de la familia de las hormonas esteroideas, ejercen su función alterando la transcripción de una gran variedad de genes mediante su interacción con el receptor de glucocorticoides. Se ha propuesto como uno de los posibles mecanismos de acción de estos fármacos la detención del ciclo celular, la activación de transcripción de genes proapoptóticos y la supresión de la apoptosis a través de la inhibición de la ruta PI3K/Akt.<sup>57</sup> Sin embargo, el tratamiento con glucocorticoides a largo

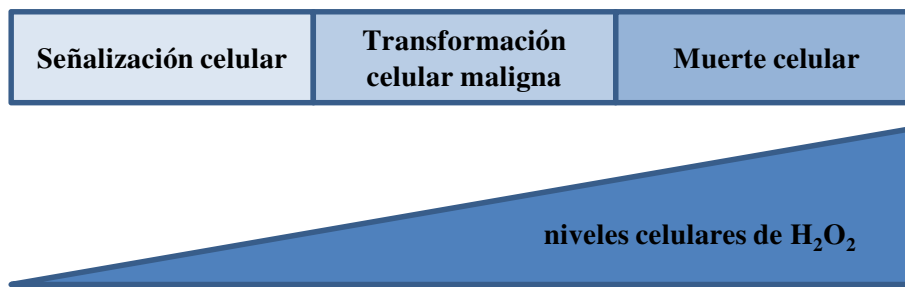


plazo presenta limitaciones debido al efecto negativo sobre el metabolismo y el sistema inmune, cardiovascular y reproductivo.

Muchos de los fármacos quimioterapéuticos convencionales, así como los corticoides utilizados durante años para tratar diferentes tipos de cáncer, entre ellos el NHL, producen apoptosis mediante el aumento de los niveles celulares de  $H_2O_2$ .<sup>58,59</sup> Se ha comprobado que los glucocorticoides ejercen la apoptosis produciendo alteraciones en el sistema redox, elevando los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).<sup>59</sup> Estas observaciones indican que los esteroides disminuyen las defensas antioxidantes, lo que resulta en la apoptosis celular.

### 2.3.1. Apoptosis tumoral mediante estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son esenciales para la vida ya que ejercen un papel importante en las vías de transducción de señales que regulan diversos procesos fisiológicos. Sin embargo, aunque estas moléculas se producen de manera natural por el metabolismo del oxígeno, niveles elevados pueden generar daños en diferentes componentes celulares como las mitocondrias, el ácido desoxiribonucleico (ADN), el ácido ribonucleico (ARN) y diferentes lípidos y proteínas de membrana.  $H_2O_2$  constituye uno de los compuestos más importantes dentro de las ROS junto con el anión superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $HO^\bullet$ ) y el óxido nítrico (NO). Por un lado,  $H_2O_2$ , participa en la carcinogénesis transformando las células normales mediante la activación de factores de transcripción o inhibiendo los genes supresores de tumor y, por otro lado, los niveles elevados de  $H_2O_2$  inhiben la progresión del cáncer mediante la estimulación de señales apoptóticas.<sup>60</sup> De este modo, como se puede observar en la **Figura 3**, el efecto que ejerce  $H_2O_2$  en la célula dependerá de su concentración. Así, niveles bajos de  $H_2O_2$  inducirán la señalización celular necesaria para la actividad de la célula, el aumento constitutivo producirá una transformación maligna y carcinogénesis y, finalmente, los niveles elevados desencadenarán la muerte celular.



**Figura 3. Efectos celulares mediados por diferentes niveles celulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Niveles bajos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poseen una función fisiológica en la señalización celular. Un incremento constitutivo en su concentración se ha asociado con la carcinogénesis. Niveles elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pueden producir muerte celular. Adaptada de López-Lázaro M, 2006.<sup>60</sup>

El aumento de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce la pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial,<sup>61</sup> un incremento repentino en la permeabilidad de la membrana denominada transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT) y la liberación del citocromo C de la mitocondria, con la consiguiente activación de las caspasas efectoras, provocando la fragmentación del ADN, lo que constituye la vía intrínseca de la apoptosis.<sup>62</sup> La susceptibilidad de la apoptosis mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las células tumorales es mayor a la de las células normales, aunque el motivo se desconoce. Se ha sugerido que en las células normales los niveles basales de ROS producidas en la cadena respiratoria son menores que en las células cancerosas, que poseen niveles basales próximos a valores tóxicos<sup>63</sup> y, por ello, un aumento en los niveles basales desencadenaría la vía apoptótica en las células tumorales. Este efecto paradójicamente diferencial de la respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células normales y en las células cancerosas aporta nuevas posibilidades para la terapia del cáncer.

Durante años se ha estudiado la posibilidad de tratar a los pacientes afectados de cáncer directamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finalmente, en 1993 la Asociación Americana de Cáncer analizó la literatura existente y determinó que no era una práctica adecuada.<sup>64</sup> No obstante, existen datos que respaldan el uso de compuestos que desembocan en el aumento celular de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dado que la mayoría de los agentes utilizados para combatir el cáncer producen un aumento de los niveles celulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 2.4. Inmunoterapia

### 2.4.1. Anticuerpos monoclonales anti-CD20

La molécula CD20 es una proteína transmembrana que se expresa aproximadamente en el 95% de las células B maduras de tumores linfoides<sup>65</sup> y aproximadamente en el 40-50% de las células precursoras B de pacientes con ALL.<sup>66</sup>

Aunque CD20 también se expresa en células normales, se ha confirmado su eficacia como diana terapéutica para el tratamiento de varios tumores hematológicos.<sup>67</sup> Rituximab fue el primer anticuerpo monoclonal aprobado por la Agencia Estadounidense de Alimentos y Medicamentos (FDA) en el año 1997.<sup>68</sup> Se trata de un anticuerpo monoclonal quimérico IgG1 de tipo I que destruye las células tumorales que expresan la molécula CD20 mediante citotoxicidad celular directa dependiente anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) o mediante muerte celular directa mediada por apoptosis.<sup>69</sup> La utilización de rituximab en combinación con los agentes quimioterapéuticos convencionales dio lugar al régimen terapéutico R-CHOP lo que revolucionó las posibilidades terapéuticas del NHL, suponiendo uno de los avances más importantes de las enfermedades linfoproliferativas de los últimos 30 años.<sup>70</sup> A pesar del éxito de rituximab, su efectividad se encuentra limitada por la adquisición de resistencia a este fármaco. Se define como resistencia a rituximab la falta de respuesta o la progresión de la enfermedad durante los 6 meses siguientes al tratamiento con un régimen que contenga rituximab.<sup>71</sup> La resistencia a rituximab puede estar mediada por diversos factores, incluyendo no solo las alteraciones del tumor, sino también las alteraciones del sistema inmune del huésped, dado que la capacidad citotóxica de rituximab depende en parte de la activación de las células del sistema inmune del huésped. Se han descrito varios mecanismos de resistencia, como la disminución del efecto ADCC y polimorfismos del receptor FcγRIIIa en las células citotóxicas,<sup>72</sup> la inhibición del CDC,<sup>73</sup> la pérdida de la expresión o mutación de CD20 en la superficie de subclones,<sup>74,75</sup> la sobreexpresión de genes antiapoptóticos<sup>76</sup> o el propio microambiente tumoral.<sup>77</sup> Por otro lado, la distribución de rituximab *in vivo* y su farmacocinética también contribuyen a la aparición de resistencia al tratamiento.

La supervivencia libre de enfermedad a los 5 años en pacientes con bajo grado de LF que fallan o adquieren resistencia al tratamiento con rituximab en monoterapia o en combinación con otros agentes es del 58%, una cifra inferior a la obtenida en todos los pacientes con linfoma.<sup>78</sup> Por ello, resulta evidente la necesidad de desarrollar nuevas terapias más eficaces que rituximab para la eliminación de células linfoides malignas. Se han desarrollado al menos 10 anticuerpos anti-CD20 modificados para mejorar los resultados terapéuticos obtenidos con rituximab. Dependiendo de su mecanismo de acción, los anticuerpos monoclonales se clasifican en dos tipos. La mayoría de ellos son de tipo I (rituximab, ofatumumab) y presentan una CDC y una ADCC muy eficaz, aunque producen una citotoxicidad directa mediante apoptosis más leve. En cambio, los

anticuerpos monoclonales de tipo II, (obinutuzumab), exhiben una CDC mínima o nula, pero muestran una citotoxicidad directa no apoptótica muy efectiva y una ADCC superior a la producida por los anticuerpos de tipo I, especialmente en aquellos glucosilados mediante ingeniería genética.<sup>67</sup> De todos los anticuerpos monoclonales anti-CD20 en fase de desarrollo, obinutuzumab es en la actualidad el único de tipo II que se está utilizando en clínica.<sup>79</sup> Este anticuerpo está aprobado tanto por la FDA como por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en combinación con clorambucilo para el tratamiento de pacientes adultos con CLL no tratados previamente y con comorbilidades, que no resultan candidatos para un tratamiento basado en una dosis completa de fludarabina, así como en combinación con bendamustina seguido de obinutuzumab en monoterapia de mantenimiento para el tratamiento de pacientes con FL que no han respondido o han progresado durante el tratamiento o hasta 6 meses después del tratamiento con un régimen que incluye rituximab. En la actualidad existen más de 80 ensayos clínicos abiertos para determinar la utilidad de obinutuzumab en diferentes tipos de linfoma, entre ellos el BL.

También conocido como GA101, obinutuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 de tipo II, cuya región variable se une al mismo epítipo de CD20 que rituximab, aunque en una orientación completamente diferente, posiblemente afectando la reordenación espacial de las dos moléculas CD20 unidas a cada molécula de obinutuzumab y aumentando de ese modo la eficacia de la muerte celular directa (**Figura 4**). Además, la región constante Fc se encuentra altamente glucosilada, resultando en una mayor afinidad por los receptores Fc $\gamma$  presentes en las células polimorfonucleares y células NKs y, por consiguiente, produciendo un efecto ADCC más efectivo.<sup>80</sup>

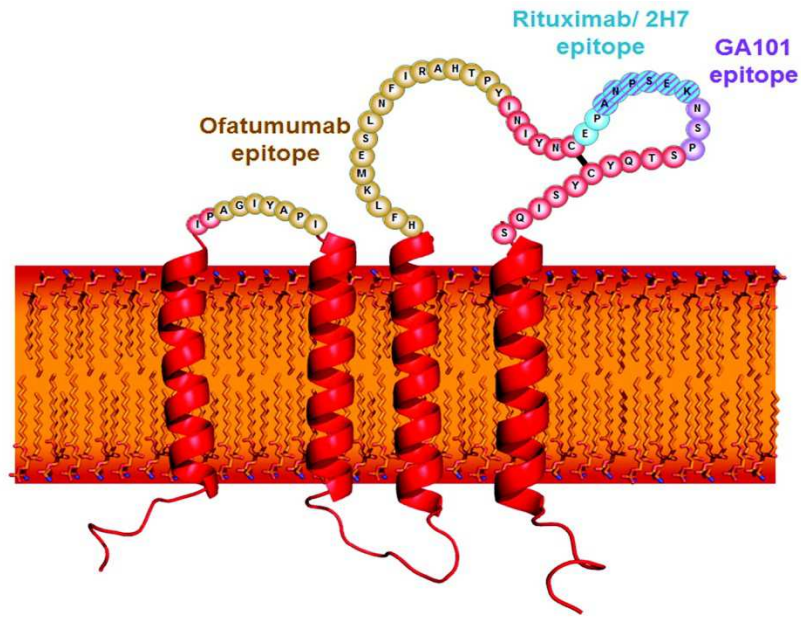
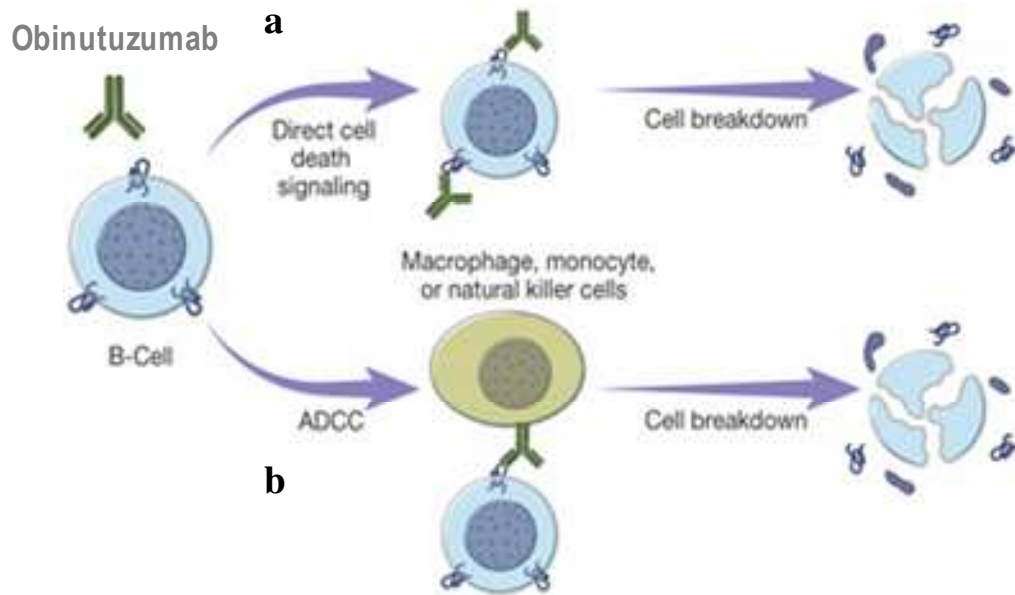


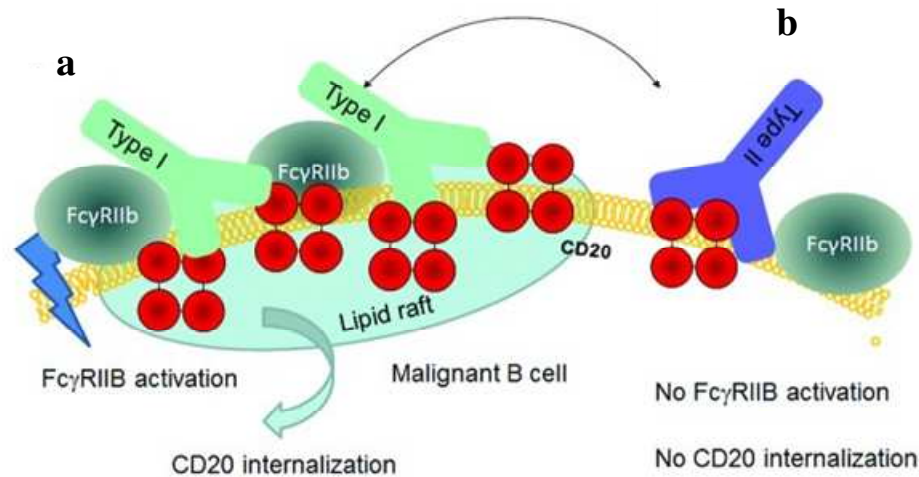
Figura 4. Estructura y topología de la molécula CD20 y los epítomos que reconocen rituximab, ofatumumab y obinutuzumab (GA101).<sup>81</sup>

Como resultado, obinutuzumab induce una ADCC y muerte directa más efectivas que rituximab y ejerce una actividad CDC nula (**Figura 5**). La muerte celular directa inducida por este fármaco no ocurre a través de la ruta apoptótica, ya que es independiente de caspasas y no promueve la sobreexpresión de la molécula BCL2 ni la fragmentación del ADN, sino mediante un fenómeno denominado agregación homotípica dependiente de la actina y mediado por lisosomas.<sup>82,83</sup> Este nuevo mecanismo de muerte celular mediado exclusivamente por los anticuerpos monoclonales de tipo II presenta especial interés en pacientes con alteraciones en los mecanismo dependientes de Fc-Fc $\gamma$ R y en aquéllos con defectos en la maquinaria apoptótica.



**Figura 5. Mecanismo de acción de obinutuzumab.** (a) La región variable del anticuerpo se une directamente a la proteína CD20 de la célula tumoral y produce su muerte mediante un proceso mediado por lisosomas y dependiente de actina. (b) La región Fc constante del anticuerpo unida al receptor Fc $\gamma$  de las células polimorfonucleares o NK destruye la célula tumoral mediante un mecanismo denominado ADCC.<sup>84</sup>

Cragg M y colaboradores<sup>85</sup> descubrieron distintas formas de unión de los anticuerpos monoclonales al antígeno CD20. Concretamente, los anticuerpos de tipo I se unen fijando la molécula CD20 en balsas lipídicas de la membrana celular generando mayor unión de C1q y, por lo tanto, aumentando la CDC. Los anticuerpos monoclonales de tipo II, en cambio, no fijan el CD20 en balsas lipídicas, lo que se traduce en una menor CDC y mayor muerte celular directa. Por otra parte, la unión de los anticuerpos monoclonales de tipo I con la molécula CD20 induce la unión simultánea del anticuerpo con el Fc $\gamma$ IIIb presente en la célula de linfoma, lo que provoca la internalización del CD20 y, como consecuencia, una disminución tanto del ADCC como de la muerte directa y resistencia a la respuesta de estos fármacos, fenómeno que no ocurre con los anticuerpos monoclonales de tipo II (**Figura 6**). Esta peculiaridad explica la eficacia de obinutuzumab en pacientes que no responden a rituximab.<sup>79</sup>



**Figura 6. Efecto de los anticuerpos monoclonales anti-CD20 tipo I y tipo II en la internalización de FcγRIIb.** (a) Los anticuerpos monoclonales tipo I, como rituximab, tienen la capacidad de unirse no solo a la molécula CD20 sino que también a la molécula FcγRIIb. La unión simultánea de FcγRIIb puede llevar a la internalización del anticuerpo monoclonal mediante la formación de balsas lipídicas. (b) Los anticuerpos monoclonales de tipo II, como obinutuzumab, al unirse a la molécula CD20 no producen la unión simultánea de FcγRIIb. Como consecuencia, la internalización del anticuerpo monoclonal de tipo II mediante balsas lipídicas queda totalmente reducida.<sup>81</sup>

En cuanto a los ensayos clínicos realizados hasta la fecha, varios estudios comparativos tanto *in vitro* como *in vivo* han puesto en evidencia la superioridad de obinutuzumab frente a los anticuerpos monoclonales de tipo I rituximab y ofatumumab, tanto en la ADCC como en la citotoxicidad directa. Más recientemente, obinutuzumab, en combinación con clorambucilo, ha mostrado mayor respuesta completa y supervivencia libre de enfermedad comparado con terapias estándares con rituximab y clorambucilo en pacientes con CLL.<sup>86</sup>

#### 2.4.2. Direcciones futuras

Aparte de los anticuerpos monoclonales convencionales señalados anteriormente, actualmente se encuentra en fase de ensayo clínico el tratamiento del NHL con anticuerpos conjugados con drogas (ADC) y con anticuerpos monoclonales biespecíficos. Los primeros consisten en anticuerpos unidos a una droga citotóxica que reconocen una molécula presente en la célula tumoral, lo que posibilita la liberación específica de la droga en la célula tumoral, reduciendo así su toxicidad. Los segundos, denominados abreviadamente BiTE, son moléculas que al combinar la especificidad de dos anticuerpos permiten la unión simultánea a dos epítopos situados en dos células distintas y, por tanto, facilitan la aproximación entre la célula efectora y la célula tumoral.<sup>87</sup>

Otro tipo de terapia prometedora es la inmunoterapia celular adoptiva con linfocitos T nativos modificados genéticamente para que expresen receptores antigénicos

quiméricos (denominados T-CAR), capaces de reconocer específicamente un antígeno en la superficie de la célula tumoral, normalmente la molécula CD19.<sup>88</sup>

Por último, otra de las estrategias desarrolladas recientemente consiste en el bloqueo de los puntos de control inmunitarios con anticuerpos monoclonales específicos para potenciar la respuesta inmunológica frente a las células tumorales. Entre las moléculas que actúan como puntos de control destacan PD-1 o CTLA4, que inhiben el sistema inmunitario y previenen la autoinmunidad. Aunque algunos de estos fármacos aún se encuentran en fase de ensayo clínico, otros ya se están utilizando en terapia tumoral, principalmente en el tratamiento del melanoma.<sup>89</sup>

### **3. METABOLISMO Y CANCER**

El papel del metabolismo en el desarrollo del cáncer ha sido ampliamente estudiado por numerosos investigadores desde hace décadas, cuando se hizo pública una clara evidencia de la diferencia entre el metabolismo de las células tumorales y el de sus homólogos normales. La regulación metabólica está estrechamente relacionada con la progresión tumoral, debido a la mayor necesidad de nutrientes impuesta por la elevada capacidad proliferativa de las células cancerosas.<sup>90</sup> En años recientes se ha avivado el interés en este campo tras el descubrimiento del papel regulador de ciertos oncogenes y supresores tumorales en el metabolismo de los nutrientes y de mutaciones en enzimas metabólicas que participan en el desarrollo de enfermedades malignas.<sup>91</sup>

#### **3.1. Metabolismo celular en condiciones fisiológicas**

Dado que la glucosa ingerida en la dieta no difunde a través de la bicapa lipídica de la membrana celular, son necesarios transportadores específicos, existen de dos tipos: los transportadores sodio glucosa activos que ingresan conjuntamente a la célula sodio y glucosa (SGLT) y transportadores de glucosa mediante difusión facilitada (GLUT). Una vez la molécula de glucosa entra dentro de la célula, ésta es fosforilada mediante la enzima llamada hexoquinasa convirtiéndose en glucosa-6-fosfato (G6P). Posteriormente G6P puede ser metabolizada mediante glucólisis o en la vía de las pentosas fosfato (PPP). La glucólisis ocurre mediante una serie de reacciones enzimáticas que tienen lugar en el citoplasma celular donde un mol de glucosa se convertirá en dos moles de piruvato. En condiciones anaeróbicas, el piruvato producido en la glucólisis se convierte en lactato en el mismo citoplasma. En cambio, en condiciones aeróbicas, normalmente, el piruvato se

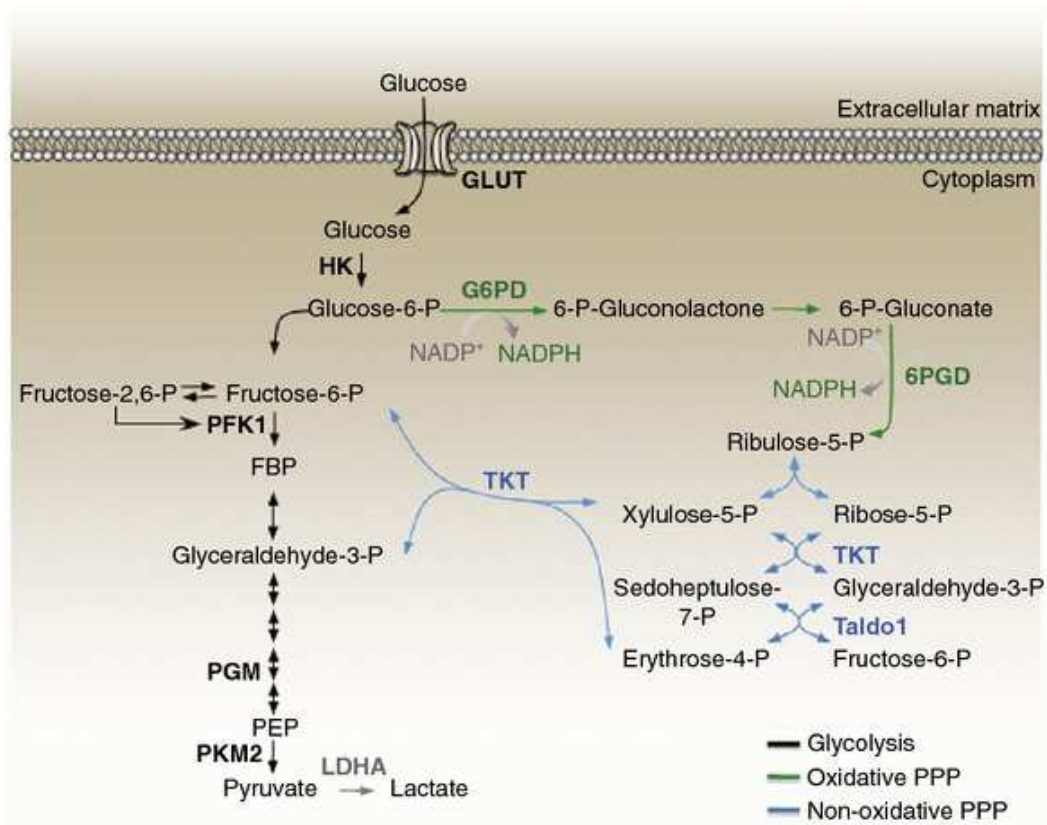


introduce en la mitocondria, y se descarboxila dando acetil coenzima A (acetil-CoA) que ya puede entrar en el ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), lo que forma parte de la segunda parte de la respiración celular.<sup>90</sup>

La glutamina, el aminoácido más abundante en el plasma, aporta a las células el nitrógeno necesario para la biosíntesis de nucleótidos y aminoácidos.<sup>92</sup> Constituye un nutriente clave en numerosos procesos intracelulares, incluyendo el metabolismo oxidativo, generación de adenosina trifosfato (ATP), biosíntesis de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, así como en la homeostasis redox y la regulación de vías de transducción de señales.<sup>93</sup> Al igual que la glucosa, la glutamina es utilizada por las células como fuente principal de macromoléculas y energía. El glutamato generado a partir de la glutamina se convierte en  $\alpha$ -cetoglutarato, un intermediario que se incorpora en el ciclo de TCA, lo que genera las formas reducidas de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y dinucleótido de flavina y adenina (FADH<sub>2</sub>) para la producción de energía en la cadena respiratoria.<sup>94</sup>

Otra ruta importante en el metabolismo de la glucosa es la PPP, también denominada vía de las hexosas monofosfato o del fosfogluconato. Ocurre en el citoplasma y tiene dos funciones específicas: la generación de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), quién posteriormente tendrá un importante papel tanto como protector de ROS ya que reduce el glutatión a un antioxidante activo que protege la célula, como en la biosíntesis de lípidos, y la síntesis de pentosas, sobre todo ribosa-5-fosfato (R5P), que se utilizará como precursor en la síntesis de ácidos nucleicos y de diferentes cofactores esenciales como las formas oxidadas de nicotinamida adenina dinucleótido(NAD) o de dinucleótido de flavina y adenina (FAD). En la etapa oxidativa de las PPP, donde las reacciones son irreversibles a partir de G6P se genera 6-fosfogluconolactona gracias a la enzima limitante glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). Posteriormente, 6-fosfogluconolactona es hidrolizada para generar 6 fosfogluconato, el cual se descarboxila oxidativamente para dar lugar a la molécula de 5 carbonos ribulosa-5-fosfato y una molécula de NADPH. La actividad de la enzima G6PD está modulada directamente por el ratio NADP<sup>+</sup>/NADPH. En sujetos sanos, la enzima G6PD funciona al 1-2% de su máximo potencial, ya que en estas condiciones la concentración de NADPH se encuentra elevada. Sin embargo, en condiciones patológicas, el NADPH se oxida, el ratio NADP<sup>+</sup>/NADPH aumenta y G6PD cambia a un estado de mayor actividad, incrementando así el flujo de la PPP.

En la etapa no oxidativa se produce R5P a partir de la glucosa, dado que las reacciones son reversibles, ésta puede convertirse en intermediarios glucolíticos como gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato mediante las enzimas transquetolasa y transaldolasa. Así, la glucólisis y la gluconeogénesis se coordinan con la PPP con el objeto de controlar la producción celular de NADPH y de R5P y determinar la fase de la PPP que se debe activar para cubrir las necesidades metabólicas celulares.<sup>95</sup> En la **Figura 7** se muestra un esquema representativo de la glucólisis y las etapas oxidativa y no oxidativa de la PPP.

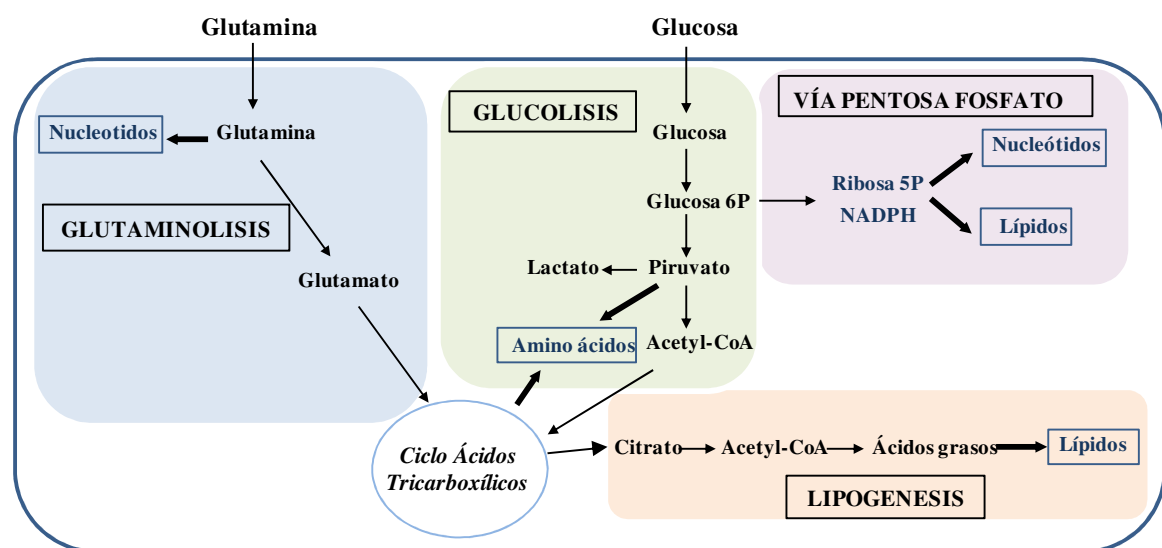


**Figura 7. Representación esquemática de la PPP y glucólisis.** La vía oxidativa de la PPP produce NADPH que puede ser utilizado en reacciones biosintéticas para la producción de nucleótidos, lípidos y como defensa antioxidativa. La vía reversible no oxidativa produce R5P a partir de la vía oxidativa y también intermediarios glucolíticos. Las flechas negras representan el flujo glucolítico, las verdes la rama oxidativa de la PPP y las azules representan los múltiples pasos del proceso de la rama no oxidativa de la PPP.

La síntesis de ácidos grasos tiene lugar a partir del ciclo de TCA. La fuente de carbono de la lipogénesis es el Acetil CoA que proviene del metabolismo de la glucosa y la glutamina. Además actúa como cofactor el NADPH, procedente fundamentalmente de la PPP.<sup>96</sup> Puesto que el Acetil CoA se encuentra en la mitocondria y la síntesis de ácidos grasos se lleva a cabo en el citosol, es necesario que el Acetil CoA salga al exterior de la

mitocondria. Esto puede ocurrir mediante dos formas. Por un lado, el citrato formado en la mitocondria a partir de Acetil CoA y oxalacetato, atraviesa la mitocondria y pasa al citosol transformándose de nuevo en Acetil CoA y oxalacetato, reacción que es catalizada por la enzima ATP citrato liasa. Por otro lado, dentro de la mitocondria, el Acetil CoA es transferido a la carnitina por acción de la enzima carnitina acil-transferasa produciéndose Acetil-carnitina. La acetil-carnitina pasa hacia el citosol en donde se regenera el Acetil CoA mediante la reacción de la Acetil carnitina con la coenzima A citosólica.

En la **Figura 8** se muestra una representación esquemática del metabolismo celular.



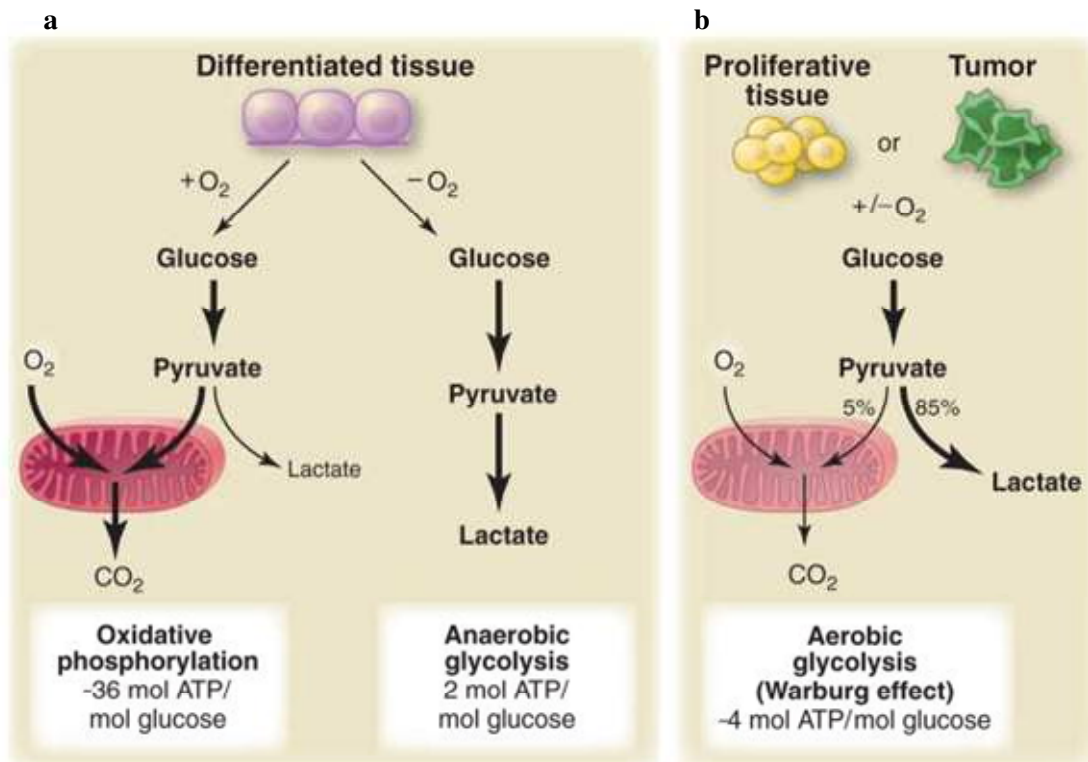
**Figura 8. Representación esquemática del metabolismo celular.** Una vez en el interior de la célula, la glucosa es fosforilada a glucosa 6-fosfato (G6P) mediante hexoquinasas. G6P puede ser metabolizada vía glucólisis aeróbica o mediante la PPP. A través de la glucólisis aeróbica, G6P se convierte en piruvato. Después, el piruvato se puede transformar en acetil-CoA o lactato. El acetil-CoA puede usarse para la síntesis de ácidos grasos y lípidos para la generación de biomembranas. La G6P que entra en la PPP genera ribosa para la síntesis de nucleótidos y NADPH, necesaria tanto para la síntesis de lípidos como para el mantenimiento de la homeostasis redox. Por otro lado, la glutamina aporta intermediarios para mantener la función del ciclo de ácidos tricarboxílicos y contribuye también a la síntesis de lípidos y a la producción de purinas y pirimidinas para la síntesis de nucleótidos. La glucosa y glutamina también producen el carbono y el nitrógeno necesarios para la síntesis de aminoácidos no esenciales.

## 3.2. Metabolismo celular en condiciones tumorales

### 3.2.1. Alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Efecto Warburg

Las células tumorales muestran una actividad metabólica aumentada e inusual comparada con las células normales, al reprogramar su maquinaria metabólica con el objeto de satisfacer sus demandas biosintéticas y bioenergéticas. Algunos aspectos de la reprogramación metabólica son específicos de ciertos tipos de tumores, mientras que

otros aparecen en varios tumores. Una de estas anomalías metabólicas consiste en el aumento de la vía glucolítica, incluso en presencia de niveles apropiados de oxígeno, un fenómeno conocido como glucolisis aeróbica o efecto Warburg.<sup>97,98</sup> Hace casi un siglo, Otto Warburg descubrió que las células tumorales más proliferativas mostraban un incremento en la absorción de glucosa y flujo glucolítico y que, además, gracias al aumento de la enzima lactato deshidrogenasa, la mayoría del piruvato generado en la glucolisis era reducido a lactato en el citosol en vez de incorporarse al ciclo de TCA para su completa oxidación. Este proceso es menos eficiente en cuanto a producción de moléculas de ATP, ya que a partir de una molécula de glucosa solo genera 4 moléculas de ATP en vez de las 38 moléculas producidas a través de la oxidación completa; no obstante, constituye una vía rápida para la obtención de ATP.<sup>99</sup> En células normales solamente ocurre cuando la cantidad de oxígeno disponible es limitada, fenómeno conocido como glucolisis anaeróbica (**Figura 9**). Para compensar la falta de energía generada, las células tumorales aumentan la regulación de transportadores de glucosa, especialmente GLUT1, GLUT2, GLUT3 y GLUT4, lo que supone un incremento de la absorción de glucosa,<sup>100</sup> y, por tanto, de la producción de intermediarios glucolíticos necesarios para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos requeridos para la rápida proliferación celular.



**Figura 9. Representación esquemática de las diferencias entre la fosforilación oxidativa, la glucólisis anaeróbica y la glucólisis aeróbica (efecto Warburg).** (a) En presencia de oxígeno las células diferenciadas no proliferativas metabolizan la glucosa a piruvato vía glucólisis y posteriormente oxidan la mayoría del piruvato en la mitocondria durante el proceso de fosforilación oxidativa. El oxígeno es necesario en este proceso, ya que actúa como el último aceptor de electrones para oxidar completamente la glucosa. Cuando el oxígeno es limitante, las células pueden redirigir el piruvato generado en la glucólisis hacia la producción de lactato (glucólisis anaeróbica). Esta generación de lactato durante la glucólisis anaeróbica resulta en una mínima producción de ATP, a diferencia de la fosforilación oxidativa. (b) Warburg observó que las células cancerosas son propensas a convertir la mayoría de la glucosa en lactato aún en presencia de oxígeno (glucólisis aeróbica). Esta propiedad también se presenta en las células normales proliferativas. La mitocondria permanece funcional y parte de la fosforilación oxidativa continúa tanto en las células cancerosas como en las células normales proliferativas. En las células proliferativas, alrededor del 10% de la glucosa es desviada a otras vías biosintéticas antes de convertirse en piruvato.<sup>101</sup>

Varios estudios han demostrado que las células cancerosas muestran mayor sensibilidad a la citotoxicidad inducida por la privación de glucosa, proponiendo que el aumento en el metabolismo de ésta es necesario para proporcionar moléculas reducidas como NADPH y piruvato.<sup>102-104</sup> En otro estudio se demostró que las células tumorales presentaban mayor susceptibilidad al tratamiento con 2-deoxiglucosa (2DG), un análogo de la glucosa que bloquea la glucólisis y, por consiguiente, mimetiza el efecto de la privación de la glucosa.<sup>105</sup> De este modo, el metabolismo de la glucosa puede aportar una diana terapéutica para el tratamiento del cáncer, ya que su inhibición inducirá un aumento de la muerte tumoral al incrementarse el nivel de estrés oxidativo. Asimismo, la adición de 2DG a ciertos tratamientos citotóxicos aumenta la muerte de las células tumorales.<sup>106,107</sup>

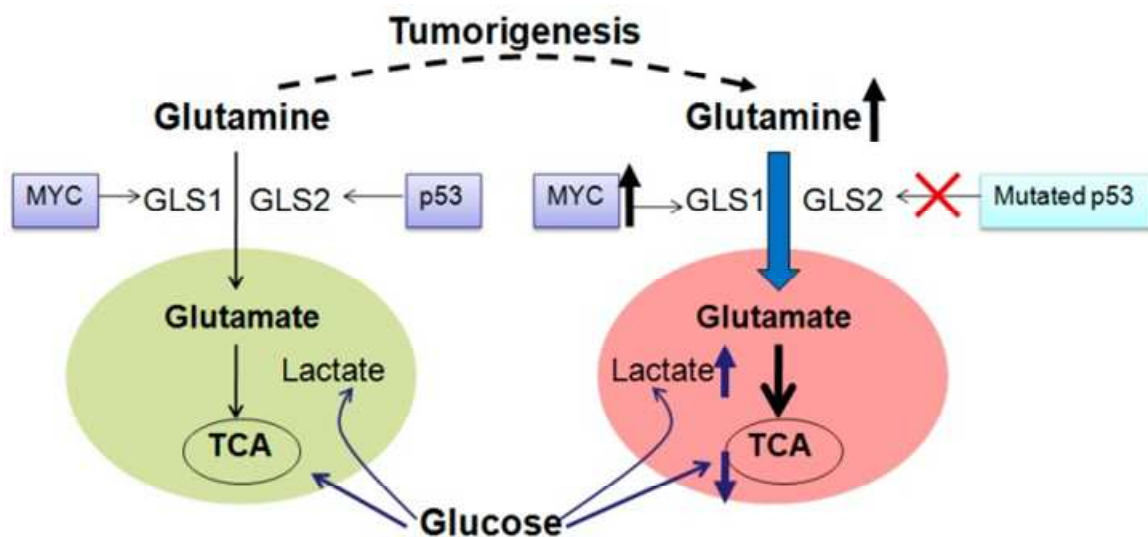
### 3.2.2. Alteraciones en el metabolismo de la glutamina

A pesar de que parte de la investigación del metabolismo de las células tumorales se ha enfocado en el metabolismo de la glucosa, desde 1950 varios biólogos especializados en cáncer han reconocido la importancia de la glutamina como nutriente de las células tumorales.<sup>108</sup> El metabolismo de la glutamina constituye un proceso crítico para el crecimiento y supervivencia de las células tumorales, ya que es necesario para la biosíntesis de macromoléculas y el mantenimiento del equilibrio bioenergético y redox. Si bien la mayoría de las células son capaces de sintetizar glutamina a partir de glucosa, en algunas células de rápida proliferación, como en las tumorales, la demanda de este aminoácido puede llegar a ser tan elevada que requieren un aporte adicional, lo que convierte a la glutamina en un aminoácido esencial para ciertos tumores.<sup>109</sup> De este modo, algunos tumores se convierten en dependientes o adictos a la glutamina, constituyendo esta adicción parte del proceso de la reprogramación tumoral. Es por ello que, en estas células tumorales, la privación de glutamina puede desencadenar la muerte celular.<sup>110</sup> En cambio, altas concentraciones extracelulares de glutamina estimulan el crecimiento tumoral y participan en la transformación maligna. L-asparaginasa, una enzima ampliamente utilizada desde hace décadas en el tratamiento de la ALL infantil y que, además, se está empleando actualmente para el tratamiento de algunas ALL y linfomas de adultos,<sup>111</sup> actúa hidrolizando los aminoácidos asparagina y glutamina del plasma, dos aminoácidos esenciales para la supervivencia de las células tumorales, interrumpiendo de esa manera su crecimiento.

La glutaminólisis contribuye al crecimiento tumoral a través de dos vías distintas aunque conectadas: promoviendo la proliferación celular e inhibiendo la muerte celular.<sup>112</sup> Por un lado, y como se ha señalado anteriormente, el piruvato generado a partir de la vía glucolítica se convierte en lactado, en vez de incorporarse al ciclo de TCA, por lo que aumenta la demanda de precursores biosintéticos y de NADPH.<sup>110</sup> Para compensar estos cambios y mantener un ciclo de TCA funcional, la glutaminólisis elevada proporciona a las células tumorales los metabolitos intermediarios del ciclo de TCA,<sup>113</sup> el cual a su vez mantiene la producción energética en forma de ATP y suministra precursores para otras rutas biosintéticas, incluyendo la biosíntesis de nucleótidos, hexosaminas, ciertos aminoácidos no esenciales y ácidos grasos.<sup>114</sup> Bajo condiciones de hipoxia, las células tumorales utilizan el  $\alpha$ -cetoglutarato derivado de la glutamina para producir citrato a través de la carboxilación reductiva, un proceso crítico en la síntesis lipídica.<sup>112</sup>

Por otro lado, la glutaminólisis se encuentra involucrada en varios procesos metabólicos y vías de señalización que inhiben la muerte celular.<sup>112</sup> Las células tumorales se enfrentan constantemente a una gran variedad de señales de estrés, tales como ROS y la limitación de nutrientes. Las elevadas concentraciones de ROS causan inevitablemente daño oxidativo a proteínas, lípidos y nucleótidos. La glutamina contribuye a la producción de glutatión y de NADPH, los principales agentes reductores de las células, manteniendo así la homeostasis redox.<sup>113</sup> Asimismo, el fumarato derivado de la glutamina controla el estrés oxidativo a través del incremento de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa 1 y de la activación de la vía Nrf2.<sup>115,116</sup>

Un paso clave en el incremento del catabolismo de la glutamina es la activación de la enzima mitocondrial glutaminasa (GLS). La actividad de GLS se encuentra aumentada en células tumorales y es regulada por los oncogenes *MYC*, *Tp53*, *RAS* y el factor inducible de hipoxia 1 (*HIF-1 $\alpha$* ),<sup>117</sup> (**Figura 10**) entre otros. Cabe destacar que las células de los mamíferos disponen de dos genes que codifican la enzima GLS, la GLS de riñón (*GLS1*) y la de hígado (*GLS2*).<sup>118</sup> Aunque cada una de ellas se ha detectado en diferentes tipos de tejidos, es la *GLS1* la que se distribuye ubicuamente y se expresa en células tumorales.<sup>117</sup> A su vez, en humanos se distinguen dos variantes de la isoforma enzimática *GLS1*, una forma larga (KGA) y una forma corta (GAC).<sup>92</sup>



**Figura 10.** El consumo de la glutamina está aumentado en la mayoría de los tumores. Durante la carcinogénesis el lactato proveniente de la glucosa aumenta, a la vez que la glucosa que entra en el ciclo de TCA disminuye. Además, el metabolismo de la glutamina aumenta con el fin de aportar la energía y macromoléculas necesarias para la proliferación y crecimiento celular. En los tumores *Tp53* se encuentra mutado, mientras que *MYC* está sobreexpresado, lo que promueve el metabolismo de la glutamina a través de la activación de *GLS1* durante la carcinogénesis. *GLS1* es altamente expresado en muchos tumores y promueve la proliferación celular. Por otro lado, la expresión de *GLS2* está reducida.<sup>117</sup>

Recientemente se han desarrollado dos nuevas moléculas denominadas BPTES y compuesto 968, que tienen como diana terapéutica la enzima GLS1.<sup>117</sup> Ninguna de ellas es análoga a la glutamina, de modo que pueden bloquear específicamente la enzima sin interrumpir otros aspectos del metabolismo de la glutamina. Ello supone un notable avance en el tratamiento antitumoral, dada la toxicidad que producen las moléculas que mimetizan la propia glutamina. A pesar de sus similitudes, BPTES y el compuesto 968 difieren estructural y funcionalmente, por lo que se pueden considerar como prototipos de dos clases diferentes de inhibidores alostéricos de GLS.

### 3.2.3. Alteraciones en el metabolismo de la Vía de las Pentosas Fosfato

La PPP juega un papel esencial en el crecimiento y proliferación de las células tumorales, ya que proporciona a las células R5P y de NADPH, necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos y ácidos grasos y para la detoxificación de ROS.<sup>119</sup>

Las células con una actividad proliferativa aumentada, como las tumorales, exhiben un flujo aumentado de la PPP mediado a través de la activación de la enzima G6PD.<sup>100</sup> Además, se ha observado un aumento de expresión de G6PD en varios tipos de cáncer, incluido el linfoma difuso de células B grandes y adenocarcinoma de pulmón.<sup>95</sup>

Un estudio realizado en células de cáncer de mama mostró un flujo de PPP 8 veces mayor en células tumorales que en células normales.<sup>120</sup> En células tumorales, las mutaciones oncogénicas incrementan tanto la glucólisis como la PPP, de modo que un aumento en la glucólisis suele ir acompañado de un aumento de la actividad de la PPP para cubrir las demandas metabólicas de las células en rápido crecimiento y división. Sin embargo, en células tumorales sometidas a estrés oxidativo, la célula disminuye la vía glucolítica y aumenta el flujo hacia la PPP con el objeto de producir mayor cantidad de NADPH que neutralice las ROS. Por tanto, estas dos vías se encuentran coordinadas para proporcionar a la célula el ratio óptimo de proliferación y supervivencia.<sup>95</sup>

Los citostáticos utilizados en protocolos quimioterapéuticos para el tratamiento de la mayoría de tumores actúan interfiriendo en la síntesis del ADN. Dado que la replicación de ADN es más activa en las células tumorales que en las células normales, estos fármacos se muestran más efectivos en los tumores. Desgraciadamente, también ejercen efecto en las células hematopoyéticas y otros tipos celulares de replicación rápida. Por ello, la inhibición de diferentes enzimas que participan en la PPP podría ofrecer una alternativa eficaz para el tratamiento de los tumores. En apoyo de esta idea, el tratamiento de células tumorales de cáncer de próstata con 6-aminonicotinamida (6AN), un inhibidor



competitivo de la G6PD, ha demostrado su efectividad al disminuir tanto la síntesis de ácidos nucleicos y la proliferación celular como la generación de NADPH.<sup>121</sup>

#### 3.2.4. Alteraciones en el metabolismo lipídico

El metabolismo lipídico participa en diferentes aspectos en la biología de la célula cancerosa. De hecho, en muchos tumores, la activación de la síntesis lipídica *de novo* implica un peor pronóstico.<sup>122</sup> La producción de lípidos es necesaria para el crecimiento y proliferación celulares. Por otra parte, los lípidos también intervienen en los procesos de señalización implicados en la transformación y desarrollo tumorales.<sup>123</sup>

En las células tumorales, el aumento de la velocidad proliferativa requiere un incremento en la síntesis de lípidos que constituyen la membrana celular. Igualmente, el acúmulo de lípidos en el interior de la célula puede dotar a la célula tumoral de energía en momentos de agotamiento de nutrientes. Por otro lado, con objeto de evitar la acidificación del microambiente tumoral por el exceso de lactato, en algunos tumores, se ha asociado el aumento de la síntesis de lípidos con el secuestro del exceso de piruvato producido por un incremento de flujo glucolítico.<sup>124</sup>

Por estas razones, la alteración en la síntesis de ácidos grasos y colesterol se asocian al metabolismo de las células tumorales. En las células tumorales, el aumento de la síntesis *de novo* de lípidos conlleva una saturación de la membrana lipídica, incrementando la proporción de fosfolípidos saturados y monoinsaturados, al carecer las células de los mamíferos de capacidad para sintetizar lípidos poliinsaturados *de novo*, lo que altera dramáticamente la estructura de la membrana, volviéndose más rígida.<sup>96</sup> Este proceso dota a la célula tumoral de una mayor protección frente a la muerte mediada por estrés oxidativo, debido a que los lípidos saturados y monoinsaturados son menos susceptibles a la peroxidación lipídica que los lípidos poliinsaturados.<sup>125</sup> Estos hallazgos sugieren que el aumento de la lipogénesis en células tumorales puede limitar la absorción de agentes quimioterapéuticos a la vez que disminuir la susceptibilidad a la muerte mediada por aquellos tratamientos que actúen elevando el estrés oxidativo, como se ha explicado anteriormente. Por todo ello, la utilización de inhibidores de la lipogénesis deja abierta la posibilidad de aumentar la eficacia de los agentes citostáticos. La expresión de la enzima sintasa de ácidos grasos (FASN), clave en la lipogénesis neoplásica, se encuentra aumentada en algunos cánceres, convirtiéndola en una diana atractiva para la terapia del cáncer. Cerulenina, una molécula inhibidora de la enzima FASN, ha

demostrado su eficacia en la terapia antitumoral, aunque el mecanismo exacto de acción aún se desconoce.<sup>126</sup>

### 3.2.5 Oncogenes y vías de señalización implicados en la reprogramación metabólica de las células tumorales

Los mecanismos que subyacen al efecto Warburg aún no se conocen completamente. De todas maneras, es evidente la implicación de varios oncogenes y supresores tumorales en este fenómeno. Una de las características que comparten varios oncogenes con función tirosina quinasa en respuesta a señales de proliferación es la regulación del metabolismo de la glucosa. Como se ha indicado anteriormente, la señalización intracelular PI3K/Akt/mTOR constituye uno de los reguladores clave de la glucólisis aeróbica y de la biosíntesis, ya que impulsa la expresión de transportadores y aumenta la regulación de enzimas glucolíticas.<sup>127</sup> La proteína quinasa activada por AMP (AMPK), es otro modulador importante del metabolismo celular que se activa mediante el aumento en el ratio adenosina monofosfato (AMP)/ATP y del estrés oxidativo. Una vez activado AMPK, fosforila numerosos sustratos que regulan la absorción de la glucosa, biogénesis mitocondrial y supresión de la gluconeogénesis. La activación de AMPK también activa la proteína p53, que se encuentra alterada en varios tumores y provoca la supervivencia celular en respuesta a la privación de glucosa.<sup>128</sup> En condiciones de hipoxia y en respuesta a factores de crecimiento, el factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  aumenta la expresión de transportadores de glucosa y enzimas glucolíticas.<sup>127</sup> Al contrario que las células diferenciadas, las células proliferativas expresan de manera selectiva la isoforma M2 de la enzima glucolítica piruvato quinasa (PK-M2), cuya regulación permite a las células metabolizar la glucosa mediante glucólisis solo cuando existen señales de proliferación.<sup>129</sup>

En cuanto a la glutamina, el aumento de su absorción y disponibilidad en células tumorales puede atribuirse tanto a una regulación a nivel transcripcional como post-transcripcional. Así, *c-MYC* induce la transcripción de transportadores de glutamina SLC38A5 y SLC1A5 aumentando la expresión del silenciamiento de mir23a/b.<sup>130</sup> A través de ATF4, *MYC* induce asimismo la apoptosis celular tras privación de glutamina, pero no de glucosa,<sup>131</sup> que puede ser atenuada mediante la asparagina.<sup>132</sup> Así, las células cancerosas que expresan *MYC* son altamente dependientes de glutamina y muy sensibles a la privación de este aminoácido. La depleción de glutamina en estas células conduce a una profunda reducción en los niveles de metabolitos del ciclo de TCA a pesar de la alta

disponibilidad de glucosa, lo que refleja la gran importancia de la glutamina en el mantenimiento de la anaplerosis mitocondrial. Estos datos sugieren que la transformación *MYC* también puede suprimir la capacidad de las células tumorales de utilizar glucosa como sustrato anaplerótico.<sup>110</sup>

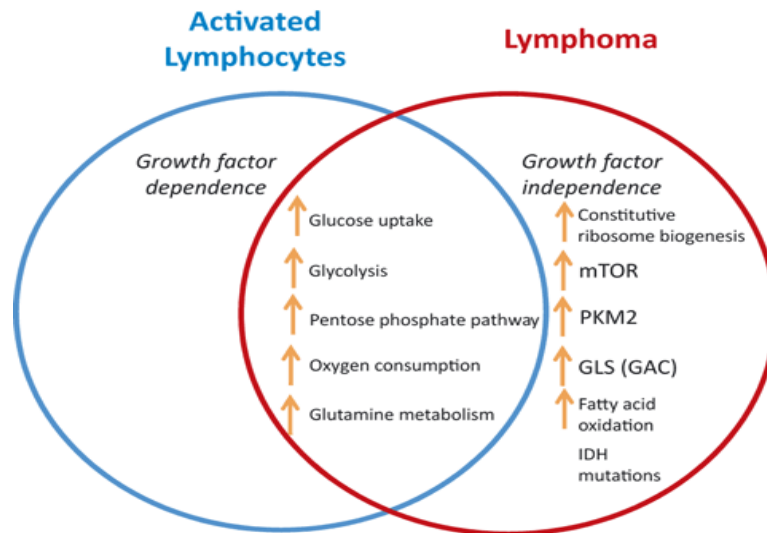
En relación con la PPP, dada la importancia de la enzima G6PD tanto en la fisiología de las células sanas como de las tumorales, la expresión y la actividad de esta enzima está regulada por los oncogenes, vías de señalización y supresores tumorales más importantes, incluidos *K-RAS*, *PI3K*<sup>133,134</sup> y *Tp53*.<sup>135</sup> G6PD también es regulada por factores de transcripción como NRF2, cuyo papel en la oncogénesis se ha demostrado recientemente.<sup>136</sup> Así, los genes que regulan estas vías metabólicas pueden utilizarse como dianas terapéuticas específicas para el tratamiento del cáncer.

### 3.2.6. Metabolismo celular y linfoma

A diferencia de otros tipos celulares diferenciados, los linfocitos activados muestran diversas características similares a las células tumorales. Tras la respuesta inmunitaria, tanto los linfocitos B como los linfocitos T activados aumentan su tamaño, empiezan a dividirse rápidamente y reprograman las diferentes vías metabólicas como la glucólisis aeróbica, la glutaminólisis, la PPP y el consumo de oxígeno en general.<sup>137</sup> A pesar de este cambio dramático en la tasa de división y en el metabolismo, es muy extraño que los linfocitos activados se conviertan en células malignas, de modo que, una vez finalizada la respuesta inmunitaria, los linfocitos sufren un proceso apoptótico o vuelven a su estado metabólico y transcripcional basal convirtiéndose en células memoria quiescentes. Por el contrario, las células linfocitarias malignas surgen por la desregulación de oncogenes clave y por la pérdida de genes supresores tumorales. Como resultado, la neoplasia linfoide se mantiene en un estado perpetuo de proliferación con un metabolismo diferente al de los linfocitos normales.<sup>129</sup>

En contraste con los linfocitos activados, varios linfomas tienen activada la vía mTOR y la oxidación de ácidos grasos. La isoforma PK-M2 de la enzima piruvato quinasa y la variante GAC de la enzima GLS se encuentran asimismo aumentadas en el linfoma. Por otro lado, algunas leucemias muestran mutaciones en enzimas del ciclo de TCA, concretamente en la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH) 1 y 2, lo que impide la correcta conversión de isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato. En su lugar, se incrementa la capacidad de catalizar la conversión de  $\alpha$ -cetoglutarato al metabolito 2-hidroxiglutarato, el cual inhibe dioxigenasas dependientes de oxígeno y, como resultado, se produce la

estabilización de HIF-1 $\alpha$  o demetilinas de histonas y ADN, alterando de este modo el epigenoma.<sup>138,139</sup> Como se ilustra en la **Figura 11**, el aumento en el metabolismo de los linfocitos activados depende de factores de crecimiento, mientras que en los linfomas es independiente de ellos.



**Figura 11. Características metabólicas diferenciales entre los linfocitos activados y las células de linfoma.** A pesar de que los linfocitos activados comparten con los linfomas el aumento de la glucólisis, glutaminólisis, consumo de oxígeno y PPP, estos procesos son dependientes de factores de crecimiento en los linfocitos. Por otro lado, los linfomas adquieren una dependencia de glucosa y glutamina independiente de factores de crecimiento puesto que poseen varias alteraciones que dan lugar a una reprogramación metabólica.<sup>129</sup>

En las células de linfoma la absorción y metabolismo de los nutrientes esenciales para el crecimiento del tumor dependen mayoritariamente de la actividad de *MYC*, PI3K y p53.<sup>140</sup> La vía PI3K/Akt/mTOR se encuentra activada en varios linfomas, lo que induce un aumento en la absorción de glucosa y en la glucólisis aeróbica, promoviendo el fenotipo Warburg.<sup>8</sup>

Por otro lado, varios linfomas se vuelven dependientes de la glutamina extracelular, convirtiéndose en una fuente primaria de carbono y energía.<sup>114</sup> Este efecto es en parte dependiente de la expresión inapropiada de *c-MYC*, muy elevado en algunos linfomas.<sup>110,130</sup> *C-MYC* también controla las vías de utilización de la glucosa. Un estudio reciente ha revelado, asimismo, una relación entre la aparición de lípidos específicos y la sobreexpresión de *MYC* en linfomas.<sup>141</sup>

La reprogramación metabólica en las células tumorales contribuye no solo al aumento de la proliferación celular, sino a la resistencia a fármacos. Es por ello que algunos oncogenes activados, como *MYC*, constituyen atractivas dianas terapéuticas para combatir los linfomas. No obstante, en el caso de *MYC*, al tratarse de una molécula no enzimática, resulta difícil el desarrollo de un fármaco que bloquee su acción.<sup>142</sup>

## 4. PODOCALICINA

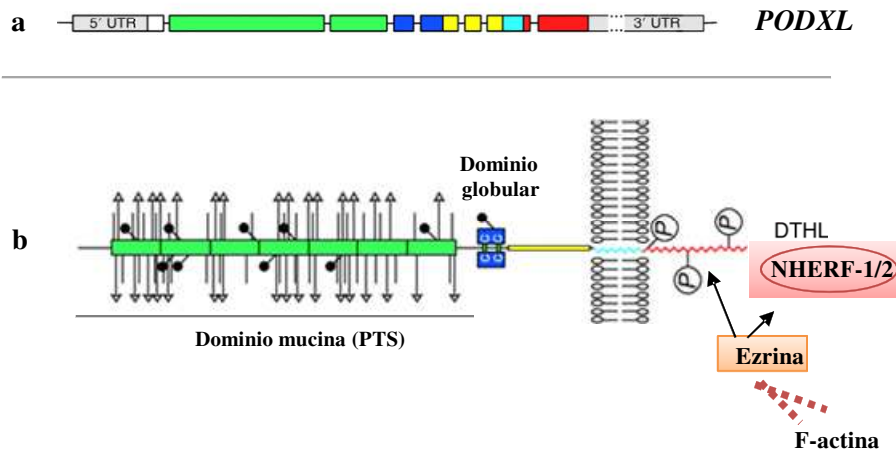
La podocalicina, también denominada proteína 1 similar a podocalicina (PCLP1), trombospondina, PODXL, progenitor transformado de Myb-Ets (MEP) 21, o gp135, es una proteína transmembrana de tipo I altamente glucosilada perteneciente a la familia de sialomucinas CD34. Inicialmente identificada en la superficie de los podocitos glomerulares de rata por Kerjaschki y colaboradores en 1984,<sup>143</sup> a lo que debe su nombre. Su homóloga en humanos se ha detectado en la superficie de otros tipos celulares, como células epiteliales, endotelio vascular, células hematopoyéticas, células mesenquimales, células del sistema nervioso (SNC) y células tumorales. La importancia de esta proteína reside en su estructura rica en sulfatos y ácidos siálicos y en su capacidad para interactuar con el citoesqueleto celular. Estas características otorgan a PCLP1 un papel fundamental en la adhesión y morfología celulares, tanto en homeostasis como en condiciones de malignidad.

### 4.1. Estructura proteica de PCLP1 y organización genómica

PCLP1 es una proteína cuyo gen (*PODXL*) se encuentra en la región cromosómica 7q32–q33<sup>144</sup> y comprende un total de 1,1 Mb organizadas en 8 exones que codifican para una proteína de 528 aminoácidos con un peso molecular calculado de 55,5 KDa. Como consecuencia de un proceso de glucosilación post-traducciona, PCLP1 puede llegar a alcanzar un peso molecular de entre 145 y 200 KDa.<sup>145,146</sup> PCLP1, junto con la proteína CD34 y endoglicano, pertenece a la familia de proteínas denominada CD34. Los miembros de esta familia comparten una estructura similar que consiste en tres dominios estructurales: un dominio extracelular altamente cargado, un tallo yuxtamembrana y un dominio citoplasmático de corta longitud que interactúa con proteínas intracelulares.<sup>147,148</sup> (**Figura 12**).

El extremo amino terminal extracelular de PCLP1 se compone de 406 aminoácidos y está formado por un dominio mucina unido a un dominio globular rico en aminoácidos cisteína. El dominio mucina se denomina PTS por su riqueza en prolina, treonina y serina, es de gran longitud (250 aminoácidos) y presenta lugares de N-glucosilación, O-glucosilación, sialilación y sulfatación, lo que confiere una gran carga negativa a esta proteína. Por último, el dominio intracelular de PCLP1 es de menor longitud (75 aminoácidos) y presenta lugares de fosforilación y de interacción con proteínas intracelulares. Los cuatro aminoácidos carboxilo-terminales, que incluyen el

aspartato, treonina, histidina y leucina, forman un motivo llamado DTHL que interacciona con dominios de señalización de moléculas intracelulares denominados dominios PDZ.<sup>149</sup> El dominio intracelular de PCLP1 se encuentra ampliamente conservado entre especies (95%), a diferencia del dominio extracelular (<33%). Este alto grado de conservación indica que el dominio intracelular juega un papel fundamental en la función de PCLP1.



**Figura 12. Estructura proteica y organización genómica de PCLP1.** (a) Estructura del gen *PODXL*, donde se muestran los 8 exones que dan lugar a los correspondientes dominios proteicos. (b) Estructura proteica donde aparece en verde el dominio mucina con las zonas de O-glucosilación (líneas verticales), sialilación (flechas) y sulfatación (líneas con punto). En azul se muestra el dominio globular, seguido del tallo yuxtamembrana (amarillo), dominio transmembrana (azul) y la cola citoplasmática (rojo) con sus zonas fosforiladas y el motivo DTHL. Adaptada de Nielsen y McNagny, 2008.<sup>148</sup>

A través de la cola citoplasmática, PCLP1 se asocia a proteínas de unión a actina tales como la ezrina, el factor regulador del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHERF) o la cortactina.<sup>149-151</sup> La ezrina pertenece a la familia de proteínas denominada ezrina-radixina-moesina (ERM) y se une a PCLP1 de forma directa o a través de la proteína adaptadora NHERF formando el complejo PCLP1-NHERF-ezrina.<sup>152</sup> Este complejo interacciona con proteínas del citoesqueleto de actina, participando así en importantes procesos celulares como la morfogénesis, adhesión, tráfico de membrana, transporte y señalización celular. Asimismo, la formación del complejo PCLP1-NHERF-ezrina se encuentra implicada en el desarrollo de extensiones de membrana, modulando positivamente la movilidad celular.<sup>153,154</sup>

## 4.2 Regulación de la expresión de PCLP1

La transcripción de PCLP1 puede ser regulada por varios factores, entre los que se incluyen la proteína del tumor de Wilms 1 (WT1), un potente activador de la transcripción de varios genes implicados en el crecimiento, metabolismo celular y diferenciación renal, y el factor de transcripción de la proteína de especificidad 1 (Sp1).<sup>155</sup> Aunque WT1 se expresa inicialmente en el riñón en desarrollo y en los podocitos de los glomérulos, su sobreexpresión se ha asociado a tumores de riñón, pulmón, mama y ALL y síndromes mielodisplásicos. La unión de WT1 a zonas conservadas del promotor del gen *PODXL* activa su transcripción favoreciendo el establecimiento y mantenimiento de las características funcionales de los podocitos.<sup>156</sup> Además de en podocitos, WT1 se expresa en el SNC y en tejidos hematopoyéticos y se sobreexpresa en una gran variedad de cánceres de adultos.<sup>157</sup> Asimismo, la expresión de PCLP1 puede ser regulada negativamente por el factor de transcripción supresor de tumores p53 o por la proteína adaptadora asociada a integrinas PINCH1 (LIMS1).<sup>158</sup>

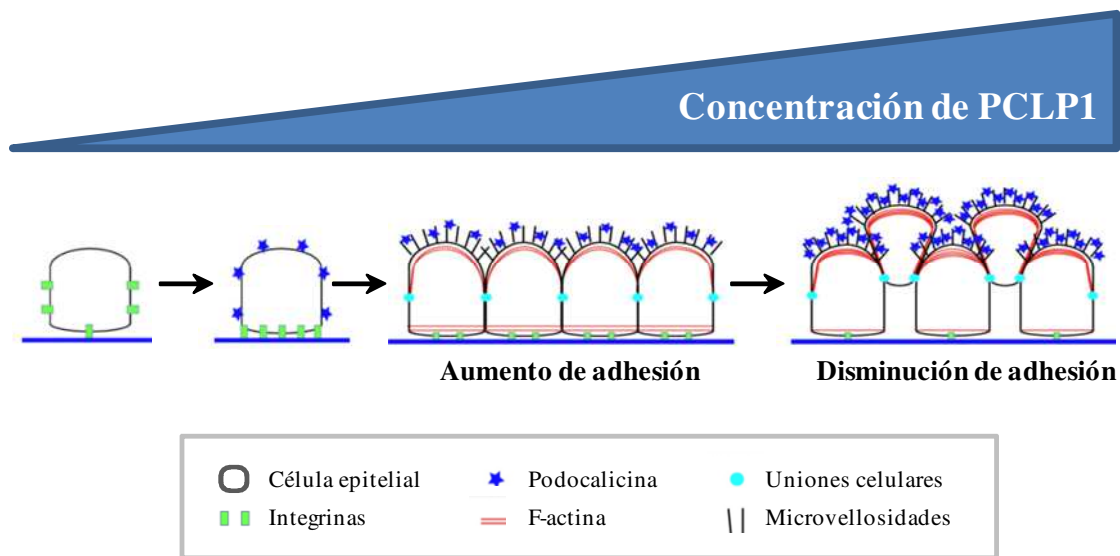
## 4.3. Función de PCLP1

### 4.3.1. PCLP1 en células epiteliales

Los estudios iniciados por Kerjaschki y colaboradores atribuyeron un papel esencial a PCLP1 en la organización y funcionamiento del riñón al observar que ratones carentes del gen *PODXL* presentaban una permeabilidad glomerular reducida, lo que provocaba la muerte por anuria.<sup>159</sup> Este hallazgo se explica por la riqueza en ácidos siálicos del dominio extracelular de PCLP1 que confiere a esta proteína la carga negativa necesaria para crear fuerzas de repulsión que mantienen abiertos los espacios intercelulares a través de los cuales se filtra la orina.<sup>160-162</sup>

Dependiendo de su nivel de expresión y localización celular se pueden observar efectos opuestos de PCLP1 en la adhesión celular. Por este motivo, varios trabajos han atribuido a PCLP1 una función antiadherente tanto en podocitos *in vivo*,<sup>159,161,163</sup> como en líneas celulares de riñón y de ovario.<sup>164</sup> Por el contrario, otros autores han demostrado el papel proadhesivo de PCLP1 en líneas celulares epiteliales de ovario y endoteliales.<sup>165,166</sup> Se ha demostrado que en células que presentan niveles moderados de expresión de PCLP1, esta proteína se dirige hacia zonas apicales permitiendo el movimiento de integrinas hacia zonas basolaterales, lo cual incrementa la adhesión celular en la zona basal.<sup>154,167,168</sup> Por el contrario, altos niveles de expresión de PCLP1 tienen como

consecuencia una mayor expansión de los dominios apicales, con una relocalización de la actina a la membrana apical para formar microvellosidades, dejando a los dominios basolaterales con insuficiente área para adherirse a otras células (**Figura 13**).<sup>169</sup> De hecho, un estudio realizado en líneas celulares de riñón (MDCK) y de cáncer de mama (MCF-7) muestra que la sobreexpresión de PCLP1 induce la formación de microvellosidades ricas en actina en el dominio apical, disminuyendo la actina basolateral e interrumpiendo la adhesión mediada por integrinas.<sup>170</sup>



**Figura 13. Función de PCLP1 en la adhesión celular.** Niveles moderados de PCLP1 establecen dominios apicales de PCLP1 y localización basolateral de integrinas permitiendo la adhesión celular en la zona basal. Niveles elevados de expresión de PCLP1 inducen la apicalización y formación de microvellosidades, lo cual interrumpe la adhesión mediada por integrinas. Adaptada de Nielsen and McNagny 2008.<sup>148</sup>

Cabe destacar que PCLP1 se expresa en las células endoteliales de las vénulas de endotelio alto (HEV) presentes en los órganos linfáticos secundarios,<sup>171,172</sup> donde presenta una función proadherente. Las células de HEV ejercen un papel fundamental en la migración de los linfocitos hacia órganos linfoides secundarios a través de la interacción de las moléculas de adhesión celular leucocitaria denominadas selectinas con moléculas presentes en la superficie de las células de HEV. En las células de HEV, PCLP1 exhibe un patrón de glucosilación inusual constituido por grupos glucídicos complejos sialilados relacionados con la familia de Lewis X (SLeX) que le permiten interactuar con su ligando presente en los linfocitos, la selectina L. Esta interacción entre PCLP1 y selectina L promueve el reclutamiento linfocitario a los órganos linfáticos secundarios, ejerciendo una función proadherente.<sup>173</sup>



#### 4.3.2. PCLP1 en células del sistema nervioso

En los últimos años, varios trabajos han descrito la expresión de la proteína PCLP1 durante el desarrollo del SNC y en el cerebro adulto. Los mayores niveles de expresión de PCLP1 se producen en los estadios postnatales, especialmente en la placa cortical, hipocampo, cerebelo y prosencéfalo.<sup>174,175</sup> Aunque la función específica de esta proteína durante el desarrollo neuronal aun se desconoce, se sabe que participa en la morfogénesis neuronal a través de la regulación del crecimiento y ramificación de las neuritas. Recientemente se ha demostrado que PCLP1 es requerida para la correcta formación y el mantenimiento de las sinapsis neuronales, dado que contribuye a la estabilización de los contactos sinápticos tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico.<sup>176</sup>

#### 4.3.3. PCLP1 en células madre

PCLP1 se expresa de forma elevada en células madre humanas embrionarias y ha sido descrita como marcador de células madre mesenquimales (MSC) y de células madre pluripotentes.<sup>177-179</sup> La estructura glucosilada de PCLP1 participa en el mantenimiento de la morfología de las células madre. El estudio en MSCs ha revelado que PCLP1, junto con otras proteínas, regula la diferenciación y la agregación celulares y participa en la proliferación clonal y en la migración de estas células.<sup>180,181</sup> Otro estudio reciente desarrollado en una subpoblación de MSCs, constituida por células progenitoras cardíacas, ha demostrado que la expresión de PCLP1 promueve la activación, adhesión y migración celulares y favorece el estado inmaduro o no diferenciado.<sup>182</sup>

#### 4.3.4. PCLP1 en células hematopoyéticas

Al igual que otros componentes de la familia CD34, la proteína PCLP1 se expresa durante el desarrollo embrionario en progenitores hematopoyéticos tempranos, hemangioblastos y eritroblastos.<sup>183-185</sup> Los niveles de expresión de PCLP1 en estas células son inferiores a los presentes en podocitos y van disminuyendo progresivamente durante la maduración celular, lo que sugiere que pueda tener un importante papel regulador en la diferenciación y maduración celular.<sup>186</sup> También se ha propuesto que tanto CD34 como PCLP1 participan en la migración de las células hematopoyéticas durante el desarrollo y en la diferenciación de los nuevos compartimentos hematopoyéticos.<sup>183</sup> En la fase adulta, la expresión de mRNA de PCLP1 es positiva para células B, T, monocitos y granulocitos y negativa para eritrocitos y trombocitos.<sup>187</sup> En cambio, la expresión a nivel proteico permanece restringida a células del linaje megacariocítico y a una subpoblación de células

madre hematopoyéticas presente en médula ósea, y relacionada con el linaje mieloide y linfoide. Asimismo, se ha detectado expresión de PCLP1 en la membrana citoplasmática de monocitos activados con factor estimulador de colonias de monocitos.<sup>187-190</sup>

#### 4.4. PCLP1 en cáncer

Multitud de estudios implican a PCLP1 en la malignidad tumoral. Así, se han detectado polimorfismos o expresión alterada de PCLP1 en varios cánceres humanos, incluyendo cáncer de mama,<sup>191</sup> próstata,<sup>192</sup> páncreas,<sup>193</sup> carcinoma hepatocelular,<sup>194</sup> testicular,<sup>195</sup> embrionario,<sup>178</sup> ovárico,<sup>169</sup> colorectal,<sup>196</sup> renal,<sup>197</sup> tiroideo,<sup>198</sup> pulmonar,<sup>199</sup> tumores cerebrales<sup>200</sup> y leucemias<sup>186,188</sup>. Además, niveles elevados de expresión de PCLP1 en células tumorales se asocian con tumores de alto grado, agresivos, con mayor riesgo de metástasis y pronóstico negativo. Este vínculo entre PCLP1 y metástasis se ha visto reforzado por estudios que muestran un aumento del potencial invasivo en células tumorales que sobreexpresan ectópicamente PCLP1.<sup>169,191,192,196,197,201-206</sup> Por otro lado, existen estudios que relacionan PCLP1 con la resistencia a citostáticos.<sup>207,208</sup>

En cuanto a los mecanismos que subyacen a la metástasis inducida por PCLP1, la capacidad para promover la malignidad tumoral se ha atribuido tanto a su propiedad antiadherente como a la proadherente. Diversos estudios han demostrado que la capacidad antiadherente de esta proteína interrumpe el contacto célula-célula, incrementa la migración y altera la morfología celular *in vitro*, dando lugar a un fenotipo metastásico.<sup>164,170,191,201</sup> Por otro lado, se ha descrito que PCLP1 induce la adhesión celular a proteínas de la matriz extracelular, la migración y la interacción intercelular de manera dependiente de integrinas, moléculas de adhesión implicadas en la progresión del cáncer. En la misma línea, se ha demostrado que PCLP1 expresada en células tumorales pancreáticas estimula la adhesión a la selectina E y selectina L presentes en el endotelio vascular y en los leucocitos, respectivamente, contribuyendo a la metástasis de las células cancerosas.<sup>209,210</sup> Asimismo, la región cromosómica 7q32-q33, donde se localiza el gen *PODXL* se halla ligada a formas agresivas de cáncer de próstata.<sup>211,212</sup>

El incremento de la migración e invasividad mediado por PCLP1 es dependiente de su ligando intracelular, la ezrina, que participa en la interacción de PCLP1 con el citoesqueleto e induce la activación de las rutas de señalización PI3K y la MAPK.<sup>201</sup> Dichas rutas afectan a funciones celulares relacionadas con la carcinogénesis y metástasis, y se encuentran implicadas en la inducción de metaloproteinasas que degradan

la matriz extracelular (MMP) facilitando la migración e invasión tumorales.<sup>213,214</sup> Cabe destacar que los ligandos intracelulares de PCLP1, la ezrina y NHERF, se encuentran asociadas a varios tipos de cáncer contribuyendo al fenotipo maligno.<sup>215-218</sup>

Por otra parte, se ha atribuido a PCLP1 un importante papel regulador en la transición epithelial-mesenquimal (EMT) inducida por el factor de crecimiento transformador  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1).<sup>219</sup> Durante el proceso de EMT las células epiteliales pierden su polarización apical-basal y el contacto entre células, adoptando una morfología mesenquimal y un comportamiento invasivo y migratorio.<sup>220</sup>

#### 4.4.1. PCLP1 en tumores hematológicos.

La detección inicial de PCLP1 en los progenitores hematopoyéticos normales<sup>187</sup> y de WT1, el regulador post-transcripcional de PCLP1, en la mayoría de los blastos en la leucemia mieloide aguda (AML) y ALL<sup>183,221</sup> condujo al estudio de la expresión de PCLP1 en las leucemias. Así, en un estudio realizado en 81 pacientes con leucemia, se han detectado niveles elevados de PCLP1 en los blastos de la mayoría de los pacientes diagnosticados de AML, ALL, y sarcoma mieloide cutáneo.<sup>186</sup> Un segundo estudio desveló la expresión de altos niveles de PCLP1 en el 18% de los pacientes de AML detectándose mayor expresión en aquellos que presentaban fenotipo de peor pronóstico como es el monocítico.<sup>188</sup> Se ha sugerido que la presencia de PCLP1 podría ser usada como marcador con el fin de aumentar la sensibilidad de los análisis de detección de leucemia. El significado funcional de esta proteína en la progresión de los tumores hematológicos y su expresión en células de linfoma aún no se han determinado. En la AML, la pérdida de micro RNA(miR)-199b, un micro RNA que bloquea PCLP1 y el receptor de dominio de discoidina 1 (DDR1) y que regula la capacidad migratoria celular, se correlaciona con una baja supervivencia, lo que apunta a un papel de PCLP1 en el desarrollo de las leucemias.<sup>222</sup>



## **II. OBJETIVOS**



## Objetivos

Los antecedentes descritos ponen en evidencia el papel crucial de esta proteína en la progresión del cáncer, a la vez que sugieren que PCLP1 podría expresarse y participar en la linfomagénesis de células B. La expresión de PCLP1 en los tipos de cáncer más agresivos, así como en ALL, y su capacidad para activar vías de señalización intracelular como PI3K/Akt y MAPK e inducir resistencia a ciertos tratamientos en algunos tumores, sugiere que PCLP1 podría promover la proliferación celular y la progresión de los linfomas de células B. Por esta razón, se hace necesario estudiar el papel de PCLP1 en este tipo de tumores, lo que permitirá considerar esta molécula como potencial diana terapéutica.

El objetivo general del proyecto es caracterizar la función de PCLP1 en el desarrollo de linfomas de células B. En este marco, los objetivos concretos planteados en este trabajo son los siguientes:

- 1.- Analizar la expresión de PCLP1 en linfomas y líneas celulares de células B y su localización subcelular.
- 2.- Estudiar el papel de PCLP1 en la proliferación, migración y adhesión de células de linfomas de células B.
- 3.- Analizar el efecto de PCLP1 en la respuesta al tratamiento con diferentes agentes.
- 4.- Valorar la implicación de PCLP1 en la reprogramación metabólica de células de linfoma de células B mediante el análisis de su efecto en la glucólisis, la glutaminólisis, la ruta de las pentosas fosfato y la formación de vacuolas lipídicas.





### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRIMARIAS

### 1.1. Muestras de pacientes

Las células primarias de muestras de pacientes utilizadas en este estudio se obtuvieron a partir del excedente diagnóstico de muestras de sangre periférica, médula ósea, líquido pleural y de biopsia de linfoma de pacientes que leyeron y firmaron el consentimiento correspondiente autorizado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Cruces en conformidad con las guías éticas de la Declaración de Helsinki.

#### Criterios de inclusión de los pacientes:

- Pacientes con diagnóstico de ALL-B y linfoma de tipo B.
- Edades comprendidas entre 18 y 55 años.
- Pacientes que hayan firmado el consentimiento informado.

#### Criterios de exclusión de los pacientes:

- Pacientes que estén en tratamiento con quimioterapia o hayan estado los 3 meses anteriores.

#### Criterios de inclusión de las muestras biológicas:

- Muestras con al menos un mililitro de excedente diagnóstico tras su análisis inmunológico.

#### Criterios de exclusión de las muestras biológicas:

- Excedentes con volumen inferior a un mililitro

El mismo día de la recogida de la muestra, las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se separaron mediante centrifugación en medio de gradiente de densidad (Axis-Shield, Dundee, Reino Unido), y, a continuación, se realizaron los experimentos correspondientes.

### 1.2. Muestras de donantes sanos

Los linfocitos B utilizadas en este estudio se obtuvieron a partir de muestras de sangre periférica de donantes sanos que leyeron y firmaron el consentimiento correspondiente autorizado por el CEIC del Hospital Universitario Cruces en conformidad con las guías éticas de la declaración de Helsinki. Las PBMCs se separaron mediante centrifugación en medio de gradiente de densidad.

Para la conservación de las células durante largos periodos de tiempo, se almacenaron en nitrógeno líquido en medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI) (Lonza, Basilea, Suiza) compuesto por RPMI que contiene L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1mM y glucosa 20mM y suplementado con 10% (v/v) de suero de ternera fetal (FBS) (Lonza) descomplementado, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) (en adelante RPMI completo) y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich). Una vez descongeladas las PBMCs, se aislaron los linfocitos B mediante selección negativa utilizando el cóctel de enriquecimiento de células B humanas RosetteSep, siguiendo las instrucciones del fabricante (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). La pureza de las células B fue superior al 90% tal y como se determinó mediante citometría de flujo basándose en la expresión de CD19<sup>+</sup> y CD3<sup>-</sup>.

## 2. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo son las siguientes:

- Raji (CCL-86<sup>TM</sup>): línea celular de BL endémico que contiene VEB, derivada del maxilar superior izquierdo un niño de raza negra de 11 años de edad.
- Daudi (CCL-213<sup>TM</sup>): línea celular de BL endémico que contiene Herpes virus, derivada de sangre periférica de un niño de raza negra de 16 años de edad.
- Ramos (CRL-1596<sup>TM</sup>): línea celular de BL esporádico, derivada de un niño caucásico de 3 años de edad.
- Jurkat (TIB-152<sup>TM</sup>): línea celular de leucemia linfoblástica aguda de células T, derivada de sangre periférica de un niño de 14 años de edad.

Todas ellas se obtuvieron de *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, EUA) y se cultivaron en medio RPMI completo. Estas líneas celulares no adherentes se cultivaron de forma rutinaria en frascos ventilados de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, Nueva York, EUA) en un incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

## 3. TRANSFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Las células Raji y Jurkat se transfectaron con el vector eucariótico de expresión pEGFP-N1 nativo que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) o con el vector que porta una secuencia de ADN que codifica la proteína PCLP1 humana fusionada con GFP (PCLP1-GFP) (cedidos por el Dr. R. Parrilla, del Centro de Investigaciones

Biológicas-CSIC). Ambos vectores de expresión co-expresan un marcador de selección que confiere resistencia a la geneticina (G418) (Sigma-Aldrich).

La transfección estable de estas dos líneas se realizó con Lipofectamina® 2000 (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA) siguiendo las indicaciones del proveedor. Para ello, se mezcló, por un lado, 1 µg del ADN plasmídico con 50 µl de OptiMEM (Thermo Fisher) y 1 µl de *Plus Reagent* (Thermo Fisher), incubándolo durante 10 minutos y, por otro lado, se mezclaron 2 µl de lipofectamina® 2000 con 5 µl de OptiMEM, incubándolo durante 5 minutos. Posteriormente, se mezclaron las dos soluciones y se añadió la mezcla a  $10^5$  células resuspendidas en 500 µl de medio RPMI completo sin antibióticos y 1% de una solución de aminoácidos no esenciales (MEM-NEAA) (Thermo Fisher) en placas de 24 pocillos, se incubaron durante 6 horas y se lavaron con medio de cultivo completo. Transcurridas 24 horas del inicio de la transfección, se añadió el antibiótico G418 a una concentración de 800 µg/ml para la selección de clones estables. Una vez aislados los clones mediante la técnica de dilución límite, se expandieron y, finalmente, se verificó la expresión de la proteína de fusión PCLP1-GFP o de GFP mediante citometría de flujo, *Western blot*, y microscopía de fluorescencia.

Se obtuvieron 3 clones estables con niveles elevados de PCLP1-GFP (en adelante Raji-PCLP1 y Jurkat-PCLP1) y 3 clones estables que expresan GFP como control (en adelante Raji-Ctrl y Jurkat-Ctrl). Los clones obtenidos se cultivaron de forma rutinaria en medio RPMI completo con 400 µg/ml de G418 y congelados en nitrógeno líquido en medio RPMI completo suplementado con 5% de DMSO.

## 4. CITOMETRÍA DE FLUJO

### 4.1. Cuantificación de niveles de moléculas de superficie celular

Para la determinación de moléculas de superficie celular mediante citometría de flujo se llevaron a cabo los siguientes pasos. En primer lugar, se lavaron las células mediante centrifugación a 437 g con tampón fosfato salino (PBS) (Thermo Fisher) durante 5 minutos. Posteriormente se incubaron entre  $0,1 \times 10^6$  y  $0,2 \times 10^6$  células en el caso de las líneas celulares y entre  $0,5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^6$  células en el caso de las muestras de pacientes, resuspendidas en un volumen de 50-100 µl de una solución compuesta por PBS, 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA) (Roche, Basilea, Suiza) y 0,01% de azida sódica (Merck, Nueva Jersey, EUA), con 20 µg/ml de IgG humana (Sigma-Aldrich)

durante 15 minutos a temperatura ambiente para bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos a los receptores Fc de membrana. Inmediatamente después del bloqueo, se incubaron las células con concentraciones saturantes de anticuerpos específicos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para la detección de PCLP1 en la línea celular Raji en condiciones de concentraciones altas y bajas de glucosa, las células se incubaron con un anticuerpo anti PCLP1 humano conjugado con ficoeritrina (PE) (R&D Systems, McKinley Place NE, Minneapolis, EUA) o con el control isotópico (BioLegend, San Diego, California, EUA). Para la detección de PCLP1 en las muestras primarias de pacientes, las células se incubaron con un anticuerpo anti PCLP1 humano primario (R&D Systems) o con su control isotópico (BioLegend) seguido de un anticuerpo policlonal IgG conjugado con PE (R&D Systems) y, por último, se añadieron el resto de anticuerpos. El control isotópico (BioLegend) se incluyó para evaluar las uniones no específicas. Para la detección de PCLP1 en las líneas celulares de Raji, Ramos, Daudi y Jurkat, se realizó marcaje tanto directo como indirecto con los anticuerpos anti PCLP1 humanos arriba mencionados y con sus correspondientes controles isotópicos. Finalmente, las células se lavaron con PBS y se fijaron con 1% de formaldehído en PBS durante 30 minutos a 4°C. Una vez lavadas las células, se resuspendieron en 500 µl de PBS para su análisis citofluorométrico. En la **Tabla 2** se muestran los anticuerpos y fluorocromos utilizados en citometría de flujo.

En todos los ensayos de citometría de flujo se adquirieron de 30.000 a 50.000 eventos, excepto en los ensayos con muestras de pacientes, en los que se adquirieron el  $0,5 \times 10^6$  eventos. La adquisición y el análisis de las muestras se realizaron en el citómetro de flujo Cytomics FC500, equipado con el programa de análisis CXP (Beckman Coulter, Brea, California, EUA), o MACSQuant Analyzer 10, equipado con el programa de análisis MACSQuantify versión 2.6 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Los datos se presentaron como la Intensidad Mediana de Fluorescencia (MFI), corrigiendo las uniones no específicas utilizando el control isotópico correspondiente o el control de fluorescencia menos uno (FMO), es decir, en presencia de todos los fluorocromos excepto el de interés.

Tabla 2. Anticuerpos y fluorocromos empleados en los ensayos de citometría de flujo.

Anticuerpo	Fluorocromo conjugado	Clon	Compañía	Concentración (v/v)
Anti-CD45	FITC/PerCP/ APCH7	2D1	BD Biosciences	1 µl/ml
Anti-CD19	FITC/ PerCP Cy5	4G7 SJ25C1	BD Biosciences	1 µl/ml
Anti-CD20	FITC/APC	L27	BD Biosciences	1 µl/ml
Anti-CD10	APC	HI10a	BD Biosciences	1 µl/ml
Anti-CD103	FITC	LF61	BD Biosciences	1 µl/ml
Anti-CD5	PECy7	L17F12	BD Biosciences	1 µl/ml
Anti $h$ PCLP1	-	222328	R&D Systems	1 µl/ml
Anti $h$ PCLP1	PE	222328	R&D Systems	1 µl/ml
<i>mouse</i> IgG2a	-	MG2a-53	Biologend	1 µl/ml
<i>mouse</i> IgG1	PE	MOPC-21	Biologend	1 µl/ml
Anti- <i>mouse</i> IgG( <i>Goat</i> )	PE		R&D Systems	1 µl/ml
<b>Fluorocromo</b>			<b>Compañía</b>	<b>Dilución final</b>
Anexina V-PE			Immunostep	0,2 µl/ml
7 AAD (7 -aminoactinomicina D)			Inmunostep	1 µl/ml

## 5. WESTERN BLOT

Para la detección de proteínas mediante *Western blot*, en primer lugar se procedió a la obtención del extracto proteico mediante la incubación de  $2 \times 10^6$  células en 100 µl de tampón de lisis compuesto por 1% de IGEPAL® CA-630 (Sigma-Aldrich), Tris-HCL 20 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, al que se adicionó un cóctel inhibidor de proteasas al 5% (v/v) (Sigma-Aldrich) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich) 1 mM. El extracto celular de cada muestra se incubó con el tampón de lisis durante 30 minutos a 4°C y el lisado celular resultante se centrifugó a 13.000 g durante 20 minutos a 4°C. Esta centrifugación permite eliminar los restos celulares particulados y obtener un sobrenadante con el lisado celular, que se almacenó a -80°C para su posterior uso. La concentración proteica de cada muestra se cuantificó por triplicado empleando el kit Pierce™ *BCA Protein Assay* (Thermo Fisher) basado en el método del ácido bicinconínico o BCA. Mediante concentraciones conocidas de BSA se estableció la recta de calibrado que permite calcular la absorbancia correspondiente a la concentración proteica de la muestra. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro POLARstar® Omega (BMG Labtech, Alemania).

En segundo lugar, se sometieron cantidades equivalentes de muestra (20-50 µg) a electroforesis en geles de poliacrilamida NuPAGE Bis-Tris al 4-12% (Thermo Fisher) en

condiciones desnaturizantes y reductoras, a un voltaje continuo de 180 V durante 1 hora, usando una cubeta X CellSureLock® (Thermo Fisher) e incluyendo un marcador de peso molecular *Novex Protein Standard* (Thermo Fisher). A continuación, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de PVDF mediante el sistema de transferencia en seco iBlot® Dry Blotting System (Thermo Fisher).

Una vez realizada la transferencia de proteínas, se bloqueó la membrana con 1% de BSA en tampón TBST (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM y 0,1% (v/v) de Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-PCLP1 3D3 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania) diluido en tampón de bloqueo a una concentración de 1 µg/ml durante toda la noche en agitación a 4°C. Después de varios lavados, se incubaron las membranas con un anticuerpo secundario anti-IgG (H+L) de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Bio-Rad, Madrid, España) diluido 1/5000 en tampón TBST con 5% de leche desnatada Sveltesse, (Nestlé, Vevey, Suiza) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, y tras sucesivos lavados, la inmunoreacción se detectó por quimioluminiscencia con el kit *Supersignal West Femto* (Thermo Fisher) y se visualizó con el sistema de imagen G:BOX y el programa de análisis *Gene Snap* (Syngene, Cambridge, Reino Unido). Como control de carga proteica, se analizó la expresión de actina con un anticuerpo específico (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1/5000.

## 6. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Para la cuantificación de vacuolas lipídicas se emplearon técnicas de microscopía de fluorescencia convencional. Para ello, se incubaron las células a una densidad de  $0,8 \times 10^6$  en 8 ml de medio completo durante 48, 72 y 96 horas en el caso de las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1, o durante 48 horas en el caso de las células Jurkat-Ctrl y Jurkat-PCLP1. En el caso de los experimentos en los que se determinó el efecto de los ácidos grasos externos en la síntesis de vacuolas lipídicas, se sembraron  $10^5$  células Raji-Ctrl o Raji-PCLP1 y se incubaron en presencia de 400 µg/ml de ácido oleico o el vehículo durante 48 horas. Transcurridos los tiempos indicados, se depositaron  $10^5$  células en cubreobjetos circulares de vidrio, previamente cubiertos con 0,1 mg/ml de poli-D-lisina (Sigma-Aldrich) y colocados en placas de 24 pocillos, y se incubaron durante 15 min a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Tras un lavado con PBS, las células se fijaron con 3,7% de paraformaldehído en PBS durante 10 minutos a 4°C. A continuación, se incubaron con



una solución de Rojo de Nilo (MP Biomedicals, Santa Ana, California, EUA), un colorante específico de lípidos neutros, a una concentración de 40 µg/ml durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se lavaron con PBS 1X y se realizó el montaje en portaobjetos usando medio de montaje con DAPI (Abcam, Cambridge, Reino Unido) para la visualización de los núcleos celulares. Finalmente, se adquirieron imágenes de 10 campos por cada condición utilizando una cámara digital monocroma CCDORCA-ER (Hamamatsu, Shizuoka, Japón) acoplada a un microscopio de fluorescencia convencional Nikon Eclipse TE2000-E (Nikon, Tokio, Japón) con un objetivo de aceite de inmersión 60X y con el programa de adquisición NIS-Elements (Nikon). El área total de vacuolas lipídicas por célula se cuantificó utilizando el programa de análisis *ImageJ* (*National Institute of Health*).

Para determinar la localización subcelular de PCLP1, se cultivaron las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 a una densidad de  $0,8 \times 10^6$  en 8 ml de medio completo durante 72 h. Posteriormente, se sembraron las células a una densidad de  $0,25 \times 10^6$  en 1 ml de medio RPMI completo sin rojo fenol en placas de 35 mm con base de vidrio (Ibidi, Martinsried, Alemania) y en presencia del colorante vital Hoechst 33342 (Thermo Fisher) a una concentración de 2 µM para la visualización del núcleo en célula viva. Las imágenes se adquirieron utilizando una cámara AxioCam MRm, acoplada a un microscopio de fluorescencia Zeiss Observer Z1 equipado con un módulo ApoTome.2 de iluminación estructurada, con un objetivo de 63X de aceite de inmersión y el programa de análisis ZEN 2 Pro (ZeissApoTome.2, Oberkochen, Alemania).

Con el propósito de visualizar la localización de PCLP1 en la región pericentriolar, las células se depositaron en cubreobjetos cubiertos previamente con poli-D-lisina y se fijaron con metanol durante 10 minutos a -20°C. Posteriormente se permeabilizaron con una solución compuesta por Tritón X-100 al 0,1% y FBS al 1% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se incubaron con un anticuerpo anti  $\gamma$ -tubulina (BioLegend) a una dilución de 1:500 durante toda la noche a 4°C, seguido de una incubación con un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con Alexa 546 (Thermo Fisher) a una dilución de 1:500 durante 1 h a temperatura ambiente. Para finalizar, se montaron las células en portaobjetos utilizando un medio de montaje con DAPI y se adquirieron imágenes empleando un microscopio de fluorescencia Zeiss Observer Z1 como se ha señalado anteriormente.

Para visualizar las vacuolas formadas tras el tratamiento con el inhibidor metabólico 6AN, se cultivaron las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 a una densidad de  $10^5$

en 1 ml con el compuesto 6AN o con el vehículo y se procedió como se ha indicado en el párrafo sobre la localización subcelular de PCLP1.

Con el objetivo de descartar la senescencia como mecanismo de muerte de las células tratadas con 6AN, se utilizó un kit de senescencia que contiene el compuesto  $\beta$ -galactosidasa (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, EUA). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se prepararon las siguientes soluciones: (a) solución de marcaje, (b) solución de fijación, (c) solución X-gal y (d) solución de marcaje con  $\beta$ -galactosidasa. A continuación, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS y se añadió 1 ml de la solución de marcaje dejándolo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se volvieron a lavar las células dos veces con PBS y se añadió 1 ml de la solución de marcaje con  $\beta$ -galactosidasa sellando la placa con parafilm para evitar la evaporación y dejándola durante toda la noche a 37°C en un incubador sin CO<sub>2</sub>. Al día siguiente se adquirieron las imágenes utilizando una cámara digital monocroma CCDORCA-ER acoplada a un microscopio de fluorescencia convencional Nikon Eclipse TE2000-E con un objetivo 10X.

## **7. CUANTIFICACIÓN DE NIVELES DE PCLP1 EN LINFOCITOS NORMALES Y LINFOCITOS MALIGNOS EN MUESTRAS DE PACIENTES**

En total se recogieron 14 muestras de pacientes con los siguientes diagnósticos basados en los criterios clínicos de la clasificación de neoplasias linfoides de células B de la OMS: 5 FL, 1 WM, 3 ALL-B, 2 HCL y 3 CLL-B. Para la determinación de los niveles de PCLP1 en linfocitos tumorales y linfocitos normales de muestras de pacientes mediante citometría de flujo en primer lugar, se separaron las PBMCs mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll. Seguidamente, se incubaron con la solución de bloqueo como se ha indicado en el apartado 4.1 y se marcaron con concentraciones saturantes del anticuerpo anti PCLP1 humano primario o del control isotópico, seguido de un anticuerpo policlonal IgG conjugado con PE. Por último, se añadieron los anticuerpos conjugados con fluorocromos específicos para marcar las poblaciones de linfocitos B normales y de linfocitos B malignos y analizar así los niveles de PCLP1 en cada una de las subpoblaciones celulares: CD45, CD19, CD20 (en todas las muestras), CD10 (FL, ALL), CD103 (HCL) y CD5 (CLL) (BD Biosciences, San José, California, EUA)

## 7.1. Estrategia de selección

En primer lugar, dentro de la muestra de PBMCs se seleccionó la población de leucocitos escogiendo la población CD45<sup>+</sup> al enfrentar la rugosidad celular con CD45 en un diagrama de dispersión, posteriormente de la población CD45<sup>+</sup> se seleccionaron los linfocitos B separando la población CD19<sup>+</sup> (FL, ALL) o CD20<sup>+</sup> (WM, HCL, CLL). Finalmente, se escogieron las poblaciones CD45<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup> o CD20<sup>+</sup> en cada caso, y utilizando un marcador específico en cada tipo de malignidad CD10 (FL, ALL), CD19 (WM), CD103 (HCL) y CD5 (CLL) se consiguió diferenciar la población de linfocitos B tumorales y la de linfocitos B normales.

La adquisición y el análisis de las muestras se realizó utilizando el citómetro de flujo digital MACSQuant Analyzer 10 equipado con el programa de análisis MACSQuantify versión 2.6. Los resultados obtenidos se expresaron como la MFI de cada población a la que se restó la mediana del control FMO, que contenía todos los anticuerpos de la muestra excepto el anticuerpo anti-PCLP1.

## 8. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Para cuantificar la proliferación celular, se cultivaron 10<sup>5</sup> células por ml en las siguientes condiciones: 1) medio RPMI completo durante 24, 48, 72 y 96 horas, 2) medio RPMI libre de glucosa durante 24, 48, 72 y 96 horas, 3) medio RPMI libre de glutamina durante 24, 48, 72 y 96 horas, 4) medio RPMI libre de glucosa y con concentraciones decrecientes de glutamina durante 72 horas, o 5) medio RPMI completo en presencia de los inhibidores enzimáticos de las rutas metabólicas que se muestran en la **Tabla 3**. Una vez transcurrido el tiempo indicado en cada experimento, se contabilizó el número de células viables mediante el ensayo de exclusión del colorante vital azul tripán utilizando un hemocitómetro (cámara de Neubauer). La proliferación celular se expresó como el número de células viables normalizado al observado en medio RPMI completo o RPMI completo con el vehículo.

**Tabla 3. Inhibidores metabólicos, su diana enzimática, la dosis y la duración empleadas en los ensayos de proliferación**

Compuesto	Diana	Dosis	Duración del tratamiento
<b>6-Amino nicotinamida</b>	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	5, 10, 20 $\mu$ M	72 horas
<b>2 Deoxiglucosa</b>	Análogo de la glucosa. Inhibidor de la glucólisis	1, 2, 4 mM	72 horas
<b>Cerulenina</b>	Ácido graso sintasa (FASN)	5, 10, 20 $\mu$ M	72 horas
<b>Compuesto 968</b>	Glutaminasa 1	5, 10, 20 $\mu$ M	168 horas

## 9. ENSAYO CLONOGÉNICO

La capacidad clonogénica de las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 se evaluó mediante ensayo clonogénico en metilcelulosa. Para ello, se añadieron  $2 \times 10^3$  células a 3 ml de medio de cultivo compuesto por medio RPMI, 1,5% de metilcelulosa, 30% de FBS, 100U/ml de penicilina y 100U/ml de estreptomycin por triplicado. Una vez agitada la mezcla, se añadió a placas de 6 pocillos y se mantuvo en cultivo a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante 11 días, momento en que los clones fueron visibles a simple vista. El recuento del número de clones se realizó utilizando un microscopio invertido Leica ICC50 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) con un objetivo 4X, contabilizando únicamente aquellos que contenían al menos 50 células. Por último, y tras retirar el medio de cultivo, se fijaron los clones con metanol al 95% durante 3 h y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0,5% en metanol al 20% durante 1 h. Después de eliminar el exceso de la solución de tinción, se adquirieron imágenes de los clones individuales con una cámara digital monocroma CCD ORCA-ER acoplada a un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse TE2000-E con un objetivo de 20X y el programa de adquisición NIS-Elements (Nikon). El total de los clones presentes en cada pocillo se fotografió con una cámara Pentax Optio 750Z.

## 10. ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR

La capacidad migratoria hacia quimiocinas, o quimiotaxis, se evaluó utilizando cámaras *Transwell* de 6,5 mm de diámetro que contienen un filtro de policarbonato con poros de 5  $\mu$ m de diámetro (Corning) insertadas en placas de 24 pocillos. En el

compartimento inferior se añadieron 600  $\mu$ l de medio RPMI 1% BSA con 100 ng/ml de la quimiocina CXCL12. En el compartimento superior se añadieron las células tumorales Raji-Ctrl o Raji-PCLP1 a una densidad de  $0,5 \times 10^6$  células en 100  $\mu$ l de medio RPMI 1% BSA. Además, como control negativo, se incluyó un pocillo en las mismas condiciones pero sin CXCL12 con el propósito de medir la migración aleatoria. Tras 3 horas de incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, se retiró el compartimento superior y se cuantificaron las células que habían migrado al compartimento inferior utilizando el citómetro de flujo MACSQuant Analyzer 10 equipado con el programa de análisis MACSQuantify versión 2.6. El índice de migración se calculó dividiendo el número de células que migraron en presencia de CXCL12 entre el número de células que migraron en ausencia de CXCL12. Finalmente, se calculó el índice de migración celular de Raji-PCLP1 respecto al índice de migración de Raji-Ctrl, considerado como 1.

## **11. ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR**

Para determinar la adhesión celular, se cultivaron las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 en frascos de cultivo durante 72h. Posteriormente, con el objetivo de determinar el mecanismo por el que se produce la adhesión celular inducida por PCLP1, se cultivaron las células en frascos de cultivo durante 24h en presencia o ausencia de EDTA 1mM, EGTA 1mM o en placas de 24 pocillos durante 2 h en presencia de anti CD62L, anti CD18 o el control isotópico. Finalmente, se adquirieron imágenes mediante microscopía de contraste de fases con un microscopio Nikon Eclipse TE2000-E empleando un objetivo 10X y una cámara digital monocroma CCD ORCA-ER y el programa de adquisición NIS-Elements. La cuantificación de la adhesión celular se realizó contabilizando el número de agregados con más de 20 células por campo, analizando diez campos por cada experimento y realizando tres experimentos independientes por cada condición.

## **12. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD CELULAR**

La determinación de la muerte celular se realizó mediante tinción con Anexina V PE (Immunostep, Salamanca, España) y 7-aminoactinomicina D (7ADD) (Immunostep). Para ello, se incubaron  $10^5$  células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 en 100  $\mu$ l de medio RPMI durante 72 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en presencia de concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Industrias Noriega, Asturias, España), dexametasona (Sigma-Aldrich) u obinutuzumab

(donado por Roche) durante el periodo indicado en la **Tabla 4** para cada condición y con medio RPMI libre de glucosa y concentraciones descendentes de glutamina durante 72 horas. Para determinar la muerte espontánea, las células se incubaron en presencia del vehículo o de medio RPMI completo.

**Tabla 4. Dosis y tiempo de tratamiento de los diferentes compuestos con los que se midió la apoptosis**

Compuesto	Dosis	Tiempo de tratamiento
Peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	50, 100, 200 μM	6 horas
Dexametasona	10, 100, 1000 μM	72 horas
Obinutuzumab	0,031, 0,0625, 0,125, 0,25, 2,5, 25 μg/ml	12 horas

Transcurrido el tiempo de tratamiento, se lavaron las células dos veces con PBS y se resuspendieron en 100 μl de una solución tampón que contiene Hepes 10 mM, pH 7,4, cloruro sódico 140 mM y cloruro cálcico 2,5 mM. A continuación se incubaron las células con 2 μl de Anexina V PE y 10 μl de 7ADD a temperatura ambiente durante 30 minutos y, finalmente, se añadieron 400 μl de la solución tampón anteriormente mencionado y se analizaron utilizando un citómetro de flujo digital Cytomics FC500. El porcentaje de muerte celular se calculó considerando como muertas aquellas células con marcaje Anexina V<sup>+</sup>/7ADD<sup>-</sup>, Anexina V<sup>-</sup>/7ADD<sup>+</sup> y Anexina V<sup>+</sup>/7ADD<sup>+</sup>. Para la determinación de la muerte total (Mt) mediada por el tratamiento, se restó el porcentaje de muerte espontánea (Me) a la muerte en cada caso (M), y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% Mt = \frac{(\% M - \% Me)}{(100 - \% Me)} \times 100$$

En el caso de obinutuzumab, se calculó el porcentaje de supervivencia de las células tratadas con diferentes concentraciones del fármaco. Para ello, se determinó el porcentaje de células Anexina V<sup>-</sup>/7ADD<sup>-</sup> y se normalizó al porcentaje de células Anexina V<sup>-</sup>/7ADD<sup>-</sup> tratadas con el vehículo.

### 13. ESTADÍSTICA

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando los programas GraphPad Prism 3.0 y SPSS 23. En todos los experimentos de este trabajo, excepto en aquellos realizados mediante microscopía o aquellos en los que se normalizó al control, se aplicó

el estadístico t de Student para muestras relacionadas para determinar si las diferencias entre los grupos eran significativas, ya que los datos presentaban una distribución normal. En el resto de experimentos, se utilizó la prueba t de Student para muestras independientes en los casos en los que los valores presentaban una distribución normal y la prueba U de Mann-Whitney en aquellos que no presentaban una distribución normal. Los valores de P inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. La significancia se clasificó como \* $p < 0,05$  (significativo); \*\* $p < 0,01$  (muy significativo) o \*\*\* $p < 0,001$  (altamente significativo).







## **IV. RESULTADOS**



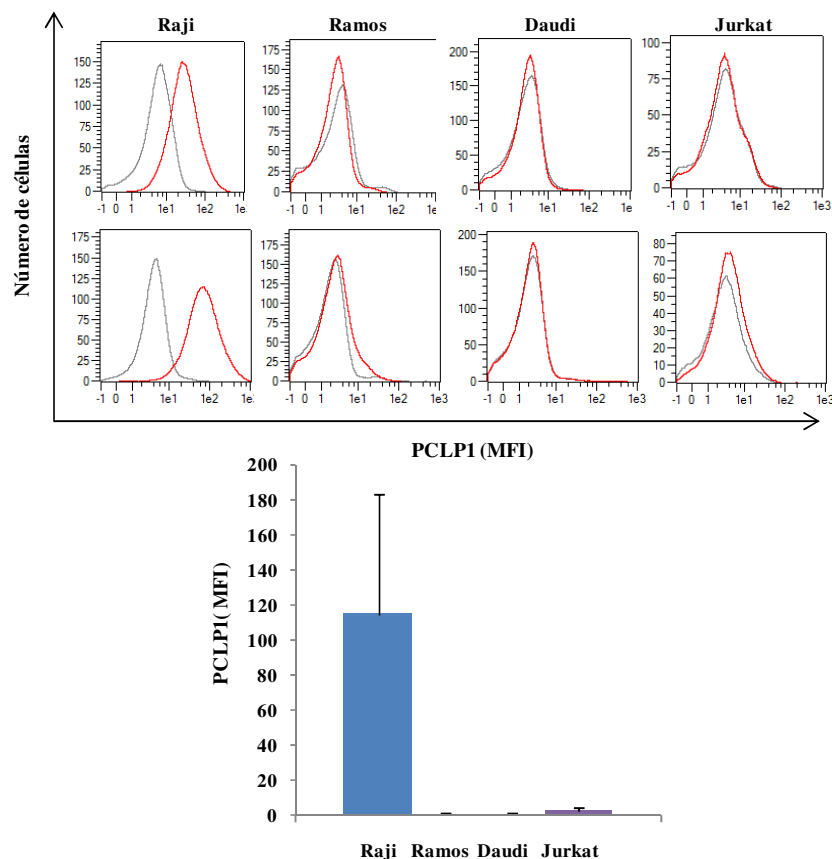


## 1. PCLP1 EN LA LINFOMAGÉNESIS

### 1.1. Expresión de PCLP1 en líneas celulares y muestras de pacientes

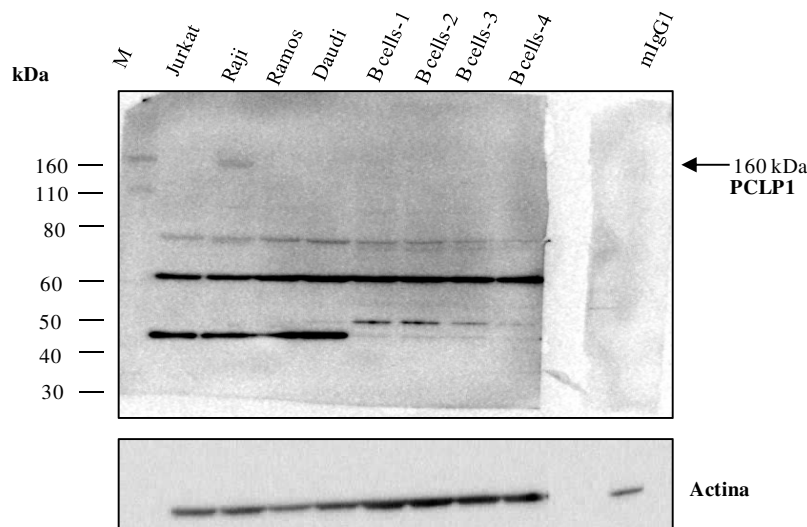
#### 1.1.1. Expresión de PCLP1 en líneas celulares de linfoma y ALL

Primero se procedió al análisis de la expresión de PCLP1 en la superficie celular de las líneas celulares Raji, Ramos y Daudi de linfoma de células B maduras, (linfomas de Burkitt) y la línea celular Jurkat de leucemia de células T (ALL-T) mediante citometría de flujo, utilizando tanto técnicas de marcaje directo con un anticuerpo anti PCLP1 conjugado con PE, como técnicas indirectas con un anticuerpo anti PCLP1 seguido de un anticuerpo secundario conjugado con PE para amplificar la señal. Los resultados mostraron niveles elevados de PCLP1 en la superficie de las células Raji, mientras que no fue detectable en la superficie celular del resto de las líneas celulares analizadas con ninguna de las técnicas empleadas (**Figura 14**).



**Figura 14. Expresión de PCLP1 en líneas celulares de linfoma de células B y leucemia de células T mediante citometría de flujo.** Expresión de PCLP1 (rojo) y su correspondiente control isotópico (gris) en la superficie celular de diferentes líneas celulares mediante citometría de flujo. En el gráfico inferior se muestran los valores de la expresión de PCLP1 obtenidos en las diferentes líneas celulares tras restar la MFI del control isotópico a la MFI del marcaje de PCLP1.

Posteriormente, la determinación de la expresión proteica total de PCLP1 se realizó mediante la técnica de *Western blot* a partir de lisados totales tanto de las cuatro líneas celulares arriba mencionadas como de 4 muestras de linfocitos B obtenidas de sangre periférica de sujetos sanos. Aunque el peso molecular calculado de la PCLP1 es de 55KDa, la extensa modificación post-traduccional por adición de polisacáridos sialilados puede dar lugar a una proteína con un peso molecular de 160 KDa.<sup>145</sup> Los resultados obtenidos mediante *Western blot* mostraron una forma altamente glucosilada de 160 KDa en las células Raji, indetectable en el resto de líneas celulares y en las muestras de linfocitos B de los 4 sujetos sanos (**Figura 15**). Por otra parte, se observaron bandas adicionales de 70 KDa y 55KDa en todas las muestras que podrían corresponder a una forma de glucosilación intermedia y a una forma no glucosilada, respectivamente. Asimismo, se detectaron unas bandas de tamaño inferior a 40KDa tanto en las líneas celulares como en los linfocitos B normales, que podrían representar productos proteolíticos de PCLP1. La especificidad de la reacción quedó demostrada por la ausencia de bandas en el control isotópico.



**Figura 15. Expresión de PCLP1 en líneas celulares de linfoma, leucemias de células T y linfocitos B de sujetos sanos mediante *Western blot*.** Expresión proteica de PCLP1 de lisados de líneas celulares y linfocitos B de sujetos sanos mediante *Western blot*, incluyendo el control isotópico para la detección de interacciones inespecíficas. Como control de carga se determinó la expresión de la proteína actina.

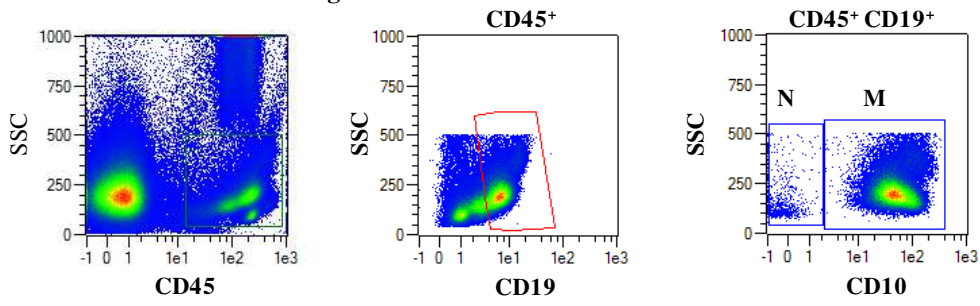
### 1.1.2. Expresión de PCLP1 en linfocitos B normales y linfocitos B malignos de muestras de pacientes con neoplasias de células B

Como se ha mencionado anteriormente, la expresión de PCLP1 ha sido detectada en la mayoría de blastos en pacientes con diagnóstico de AML y ALL,<sup>186</sup> aunque su papel en la formación y progresión de este tipo de enfermedades aún se desconoce. Sin embargo, no se han publicado estudios en relación a su expresión en neoplasias maduras de células B. Teniendo en cuenta estas observaciones nos propusimos analizar y comparar la expresión de PCLP1 en la superficie de poblaciones de células B maduras normales y malignas provenientes de una pequeña cohorte de pacientes mediante citometría de flujo. Para ello, se procedió a la recogida de muestras de pacientes que cumplieran los criterios de inclusión del estudio, tal y como se expone en el apartado 1.1 de Material y Métodos, previa obtención de la aprobación del estudio por parte del Comité Ético del Hospital Universitario Cruces (OSI Ezkerralde-Enkarterri Cruces). Las muestras procedieron del excedente diagnóstico de 14 pacientes con los siguientes diagnósticos: 5 pacientes con FL, 1 paciente con WM, 2 pacientes con HCL, 3 pacientes con CLL-B y 3 pacientes con ALL-B. Seguidamente, se realizó el marcaje con un anticuerpo anti PCLP1 humano y con anticuerpos monoclonales específicos en función del diagnóstico para diferenciar las células B normales de las malignas por citometría de flujo, con el asesoramiento de los facultativos de la Sección de Inmunología del Hospital Universitario Cruces.

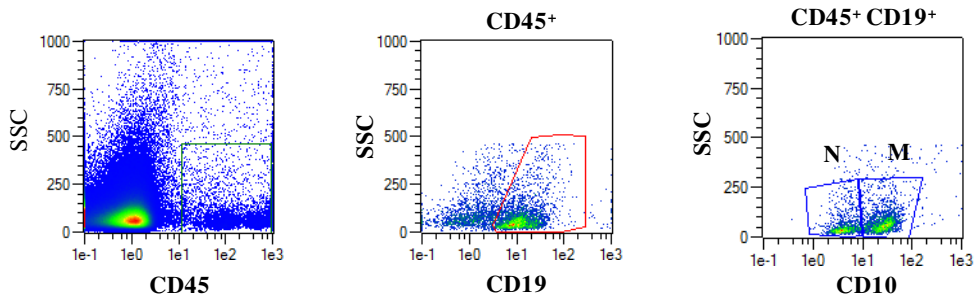
En la actualidad, el análisis inmunofenotípico mediante citometría de flujo constituye una herramienta indispensable para el diagnóstico de neoplasias hematológicas, ya que las células malignas sufren aberraciones fenotípicas y expresan moléculas de superficie diferentes a sus homólogos normales.<sup>223</sup>

La **Figura 16** muestra las estrategias de selección que permiten definir las poblaciones de linfocitos B malignos y de linfocitos B normales en cada tipo de linfoma para el posterior análisis de la expresión de PCLP1 de las dos poblaciones.

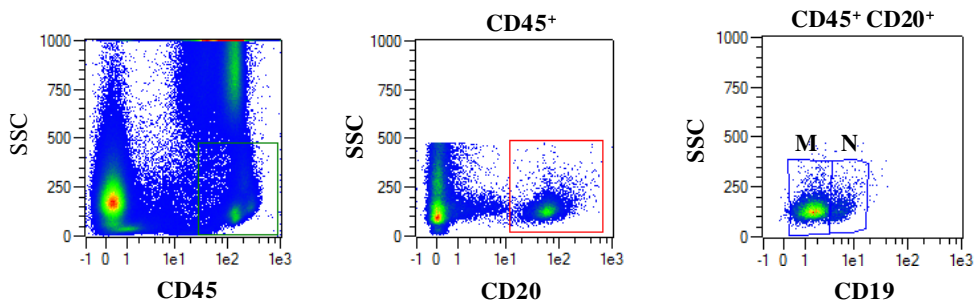
**Leucemia linfoblástica aguda**



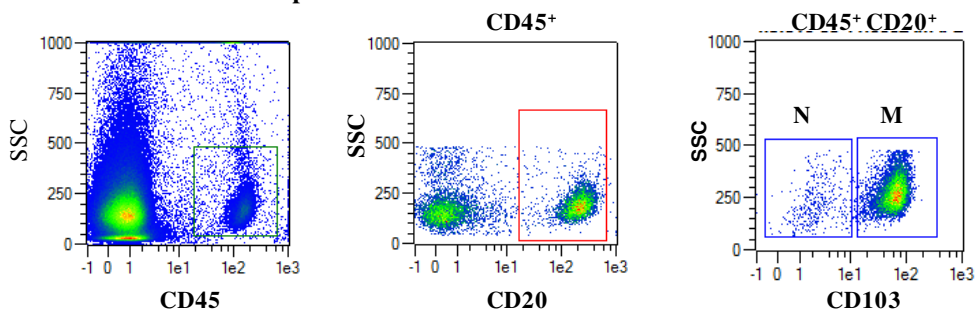
**Linfoma folicular**



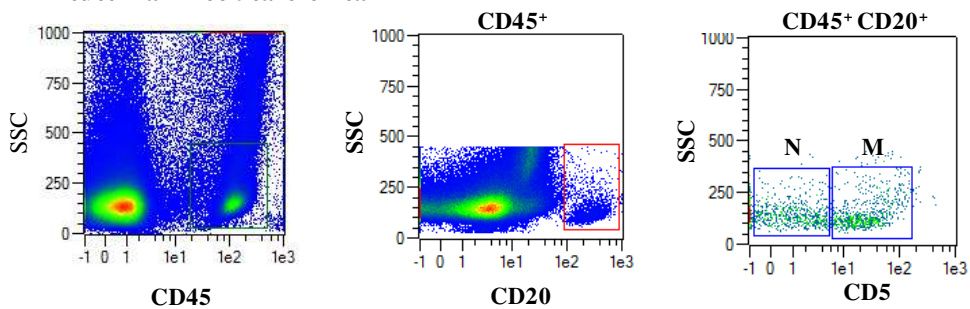
**Linfoma linfoplasmacítico/Macroglobulinemia de Waldeström**



**Leucemia de células peludas**



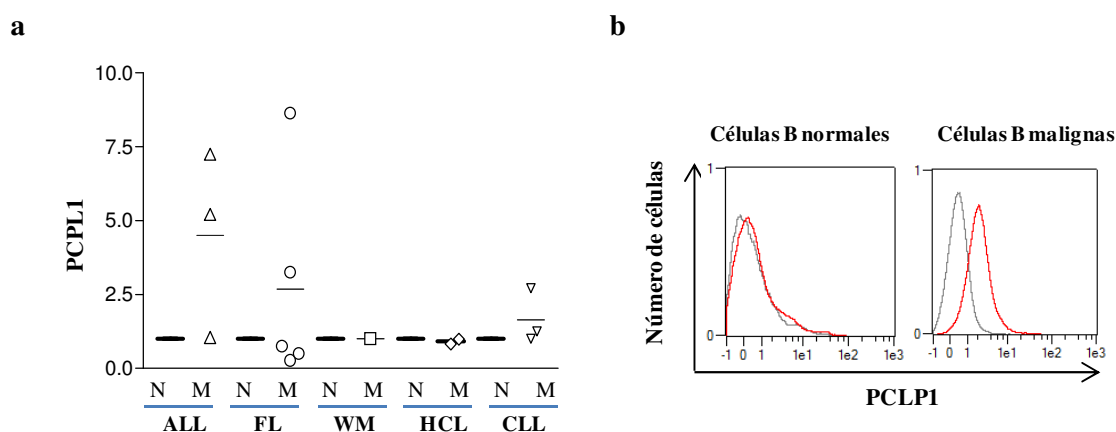
**Leucemia linfocítica crónica**





**Figura 16. Estrategias de selección de citometría de flujo para la detección de PCLP1 en las células B normales y malignas de pacientes con neoplasias de células B.** Primero se separó la población total de leucocitos en función de la rugosidad celular y marcaje CD45<sup>+</sup>(primera columna). Posteriormente, de la población total de leucocitos se seleccionó la población de linfocitos B en función del marcaje CD19<sup>+</sup>(ALL, FL) o CD20<sup>+</sup>(WM, HCL, CLL) (segunda columna). Finalmente, dentro de la población de linfocitos B, se diferenciaron la población normal y maligna en función del un marcador específico de cada neoplasia CD10 (ALL, FL), CD19 (WM), CD103 (HCL) y CD5 (CLL). N: población normal; M: población maligna.

Dado que previamente se ha detectado expresión de PCLP1 en células malignas de ALL, se incluyó en el estudio la expresión de esta proteína en tres pacientes con ALL como control positivo del procedimiento de análisis. Como se muestra en la **Figura 17 a**, en 2 de los 3 pacientes de ALL, las células malignas expresaron mayores niveles de PCLP1 que la población de células B normales provenientes del mismo paciente, en concordancia con hallazgos previos.<sup>186</sup> Los resultados revelaron niveles de expresión de PCLP1 de 3 a 8 veces mayores en la población de células malignas comparado con la población normal en 2 de 5 pacientes con diagnóstico de FL y en al menos 1 de los 3 pacientes con CLL (**Figura 17 a**). En los pacientes de WM y HCL, el grado de expresión de PCLP1 en las células malignas fue similar al detectado en la población normal (**Figura 17 a**). La **Figura 17 b** corresponde a un histograma de citometría de flujo representativo de una muestra de paciente que refleja la MFI de PCLP1 y del control isotópico tanto en la población de células B normales como en las malignas. Estos datos indican que la expresión de PCLP1 se encuentra aumentada en células malignas de algunos pacientes con linfoma de células B.



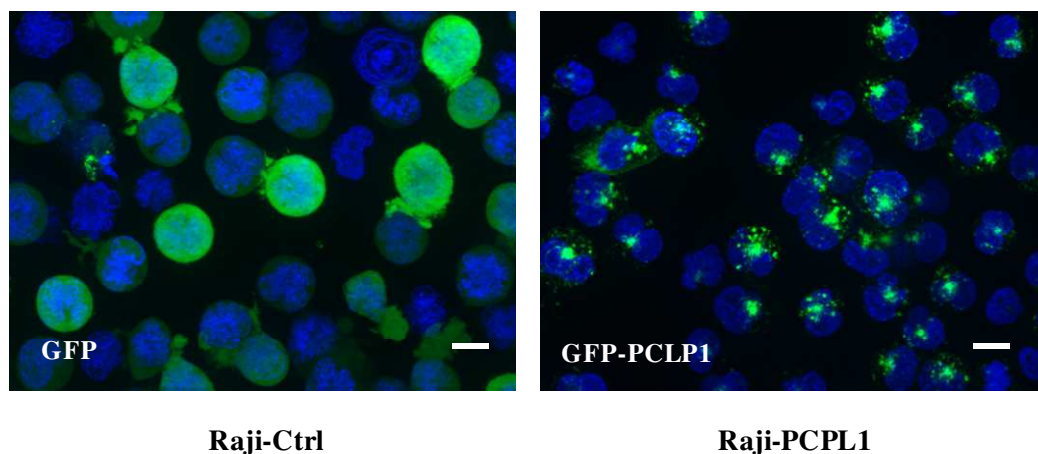
**Figura 17. Expresión de PCLP1 en células B normales y malignas de muestras de pacientes con neoplasias de células B.** (a) MFI de PCLP1 determinado mediante citometría de flujo en células B malignas de pacientes con los diagnósticos indicados normalizado con la MFI de la de células B normales del mismo paciente. (b) Histograma representativo de la MFI de la expresión de PCLP1 en la población normal y maligna de células B de uno de los pacientes mostrados en (a) Las líneas gris y roja del histograma representan el control isotópico y el marcaje de PCLP1, respectivamente. N: población normal; M: población maligna; ALL: leucemia linfoblástica aguda; FL: linfoma folicular; WM: macroglobulinemia de Waldenström; HCL: leucemia de células peludas; CLL: leucemia linfocítica crónica.

## 1.2. Generación de células Raji que sobreexpresan PCLP1

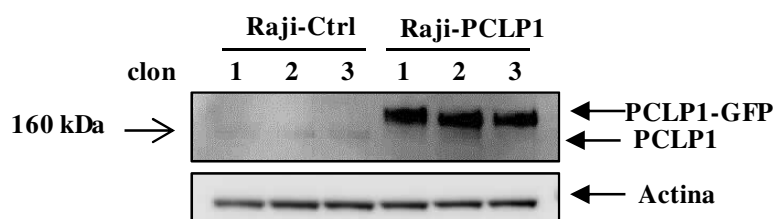
Con el objetivo de estudiar el papel de PCLP1 en la linfomagénesis de células B maduras, en primer lugar se generaron líneas celulares estables que sobreexpresaban PCLP1. Como línea celular para la realización de los experimentos se eligió la línea Raji de BL endémico, la única de las analizadas que expresa niveles detectables de PCLP1 endógeno. Las células Raji se transfectaron con el plásmido pEGFP que contiene ADN que codifica la proteína PCLP1 (pEGFP-PCLP1) o con el plásmido vacío como control (pEGFP), obteniéndose 3 clones estables con niveles elevados de PCLP1-GFP (Raji-PCLP1) y 3 clones estables que expresan GFP como control (Raji-Ctrl).

Tal y como refleja la imagen de la **Figura 18 a**, las células Raji que expresan la proteína de fusión PCLP1-GFP muestran una distribución de la fluorescencia punteada en conformidad con la descrita anteriormente en otros tipos celulares.<sup>170</sup> En cambio, las células Raji control que expresan únicamente GFP exhiben un patrón de fluorescencia homogéneo. La expresión de PCLP1 en las células Raji transfectadas con el plásmido pEGFP-PCLP1 se confirmó posteriormente mediante la técnica de *Western blot* en los 3 clones obtenidos, que reveló una banda específica con un peso molecular de en torno a 160 kDa en todos ellos, correspondiente a PCLP1 (**Figura 18 b**).

a



b



**Figura 18. Expresión de PCLP1 en las células Raji transfectadas.** Expresión proteica de PCLP1 en células transfectadas con el plásmido pEGFPN1 nativo (Raji-Ctrl) y transfectadas con el plásmido que contiene la secuencia que codifica para PCLP1-GFP (Raji-PCPL1). (a) Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia mostrando GFP en color verde y los núcleos teñidos con Hoechst 33342 en azul. La barra de escala mostrada en la parte inferior derecha de cada imagen equivale a 10µm. (b) Expresión proteica de PCLP1 en 3 clones de PCLP1-Ctrl y 3 clones de Raji-PCPL1 mediante *Western blot*, incluyendo como control de carga la expresión de la proteína actina.

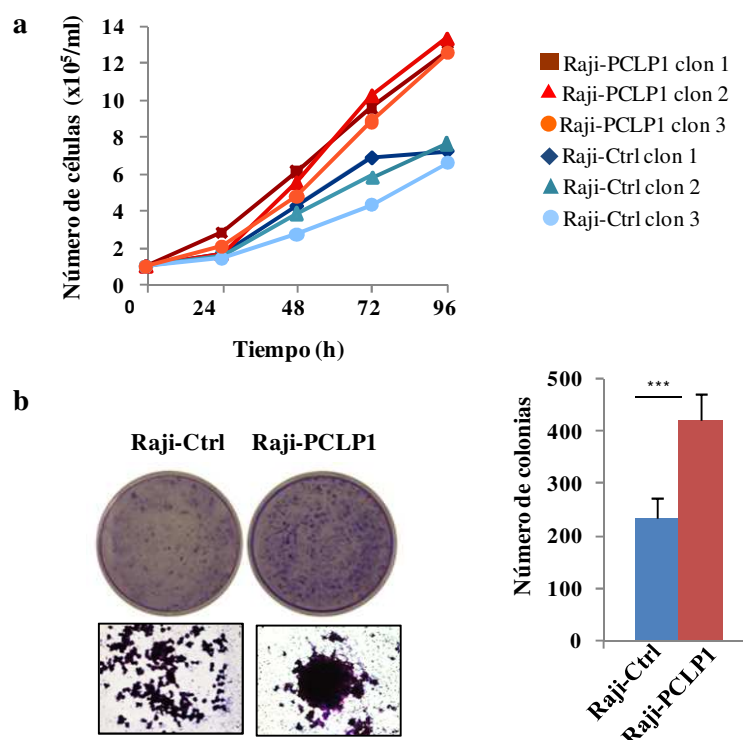
### 1.3. PCLP1 induce la proliferación celular, formación de colonias, migración quimiotáctica y adhesión intercelular en células Raji

#### 1.3.1. Efecto de PCLP1 en la proliferación celular, en la formación de colonias y migración quimiotáctica

La implicación de PCLP1 en la linfomagénesis se evaluó determinando el efecto de la expresión ectópica de esta proteína en el crecimiento celular, en la formación de colonias y en la migración quimiotáctica de células de linfoma, tres procesos esenciales para la progresión de las enfermedades malignas.

Con este propósito, se sembraron tres clones diferentes de células Raji-Ctrl y Raji-PCPL1 en medio RPMI completo y se cuantificó el número de células a determinados tiempos durante un máximo de 96 h. Como se desprende de la **Figura 19 a**, los tres clones de células Raji-PCPL1 mostraron un aumento acusado en su proliferación cuando

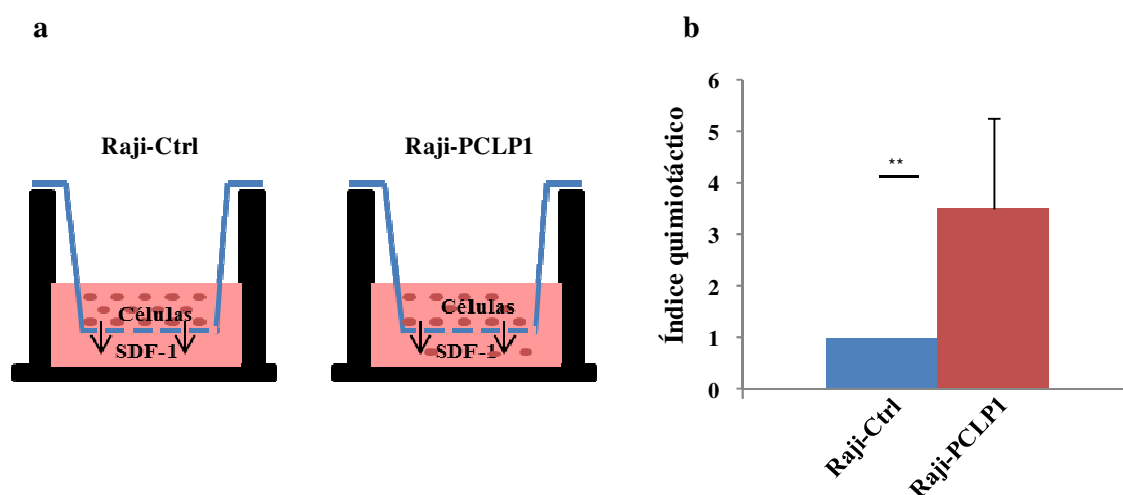
se compara con las células Raji-Ctrl. Asimismo, se examinó el potencial clonogénico de estas células determinando su capacidad para formar colonias. Para ello, se sembraron tanto células Raji-Ctrl como células Raji-PCLP1 en medio con metilcelulosa. Al cabo de 11 días de cultivo se detectó un incremento de alrededor del 90% en el número de colonias de Raji-PCLP1 comparado con Raji-Ctrl (**Figura 19 b**). Estos datos indican que PCLP1 aumenta de la proliferación y la clonogenicidad de las células Raji.



**Figura 19. La expresión exógena de PCLP1 induce la proliferación celular y formación de colonias en células Raji.** (a) Proliferación de tres clones diferentes de Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 utilizando el método de exclusión celular del colorante azul tripán. Los datos muestran la media de tres experimentos independientes. (b) Fotografías representativas de placas del ensayo clonogénico, donde se visualiza la formación de colonias de Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 a los 11 días de incubación en metilcelulosa. Las imágenes inferiores muestran una colonia representativa ampliada mediante microscopía de contraste de fases. El histograma representa la media  $\pm$ SD del número de colonias por placa de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado. El análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student para muestras relacionadas. \*\*\*  $P < 0,001$ .

Las células de linfoma expresan el receptor de quimiocinas CXCR4, el cual media la migración celular a órganos que expresan su ligando CXCL12,<sup>224</sup> incluyendo nódulos linfáticos, pulmones, hígado y huesos, lo que en última instancia permite el establecimiento de metástasis en estos órganos. Para analizar el efecto de PCLP1 en la migración inducida por CXCL12, se realizaron ensayos de quimiotaxis en respuesta a un gradiente de CXCL12 (SDF-1) utilizando el sistema de *Transwell* (**Figura 20 a**) como se

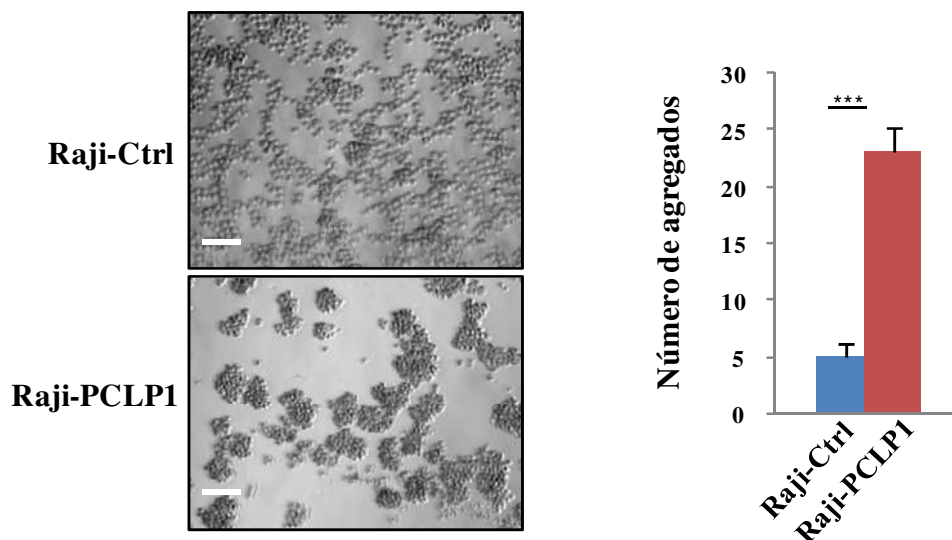
indica en el apartado 10 de Material y Métodos. Los datos revelaron que las células Raji-PCLP1 presentan un aumento en la migración hacia CXCL12 comparado con las células Raji-Ctrl (**Figura 20 b**), lo que indica que PCLP1 aumenta la quimiotaxis dependiente de CXCL12 en células Raji.



**Figura 20. La expresión exógena de PCLP1 induce quimiotaxis en células Raji.** (a) Dibujo representativo del ensayo quimiotáctico, donde se evaluó la migración de las células hacia el compuesto SDF-1 utilizando pocillos *Transwell*. (b) Índice quimiotáctico de las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1. Los datos del histograma representan la media  $\pm$ SD del índice quimiotáctico de migración dependiente de CXCL12 de Raji-PCLP1 normalizado al índice quimiotáctico de migración de Raji-Ctrl de un total de 6 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó usando la prueba U de Mann-Whitney \*\*  $P < 0,01$

### 1.3.2. Efecto de PCLP1 en la adhesión intercelular

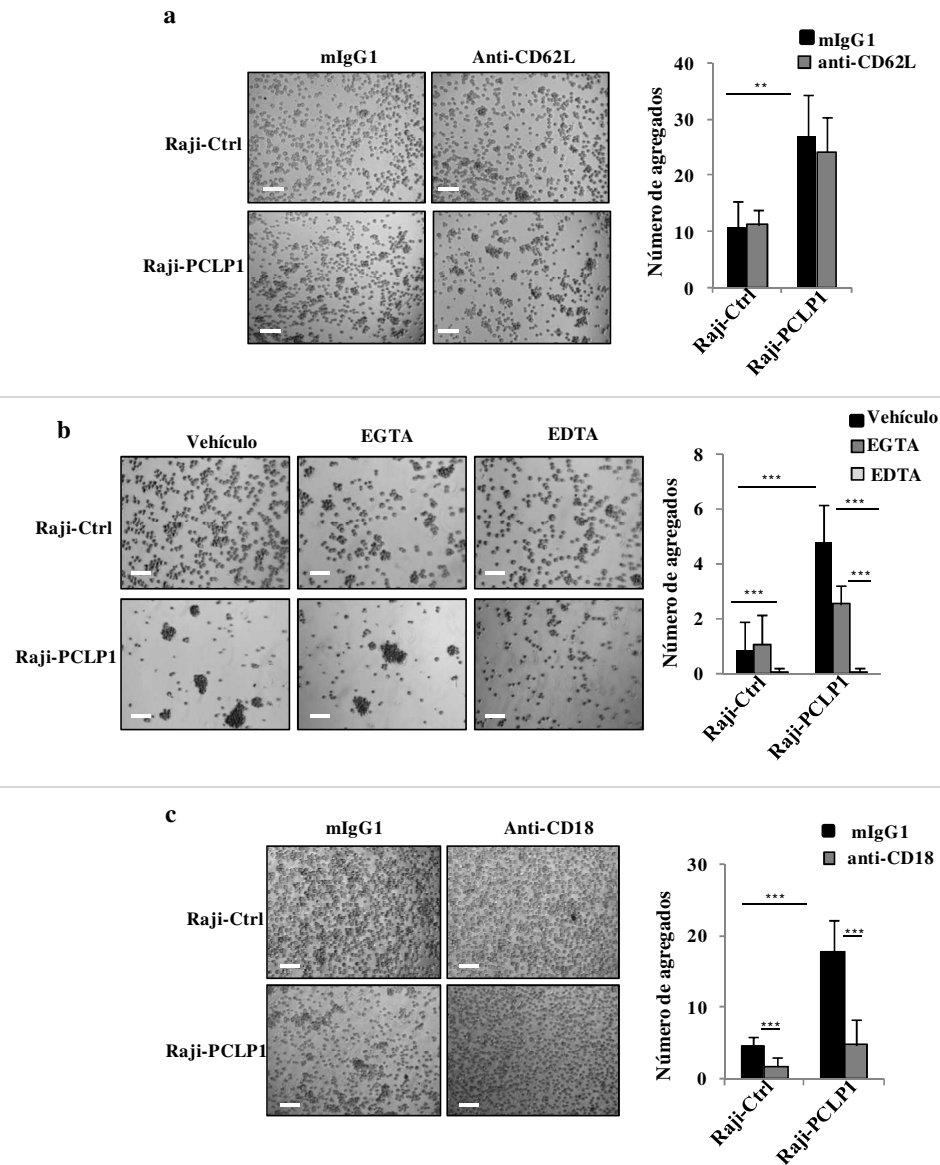
Al observar las células Raji en cultivo se advirtió que aquellas que sobreexpresaban PCLP1 crecían formando numerosos agregados de gran tamaño, a diferencia del control (**Figura 21**), lo que revelaba la implicación de esta proteína en la adhesión intercelular en linfomas de células B. Estudios realizados en líneas celulares B y linfocitos B normales han demostrado que la interacción intercelular estimula la proliferación e inhibe la muerte celular por apoptosis,<sup>225</sup> a la vez que dificulta el acceso de los fármacos a las células. Para cuantificar la adhesión intercelular, se sembró el mismo número de células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 en medio de cultivo completo y a las 72 h se adquirieron imágenes mediante microscopía de contraste de fases para la posterior cuantificación del número de agregados por campo. Como revela el histograma que se encuentra en la parte derecha de la **Figura 21**, el número de agregados con más de 20 células es de 4 a 5 veces superior en células Raji-PCLP1 que en células control, lo que indica que PCLP1 incrementa la adhesión intercelular de células Raji.



**Figura 21. La expresión de PCLP1 promueve la adhesión intercelular en células Raji.** Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases con un objetivo de 10X de células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 cultivadas en medio completo. La barra de escala mostrada en la parte inferior izquierda de cada foto equivale a 100 $\mu$ m. En el histograma de la derecha se muestra la media  $\pm$ SD del número de agregados con más de 20 células por campo, incluyendo 10 campos en cada uno de los tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student para muestras independientes \*\*\*P<0,001.

A continuación, tratamos de identificar los mecanismos moleculares implicados en la adhesión celular mediada por PCLP1. Selectina L (CD62L) es el único ligando conocido de PCLP1 que se expresa en linfocitos B,<sup>173</sup> por lo que tratamos de evaluar la participación de esta molécula en la adhesión intercelular inducida por PCLP1. Con este propósito, se analizó la formación de los agregados celulares en presencia de un anticuerpo monoclonal bloqueante anti selectina L. El tratamiento de las células Raji-PCLP1 con un anticuerpo monoclonal bloqueante anti selectina L, no tuvo un efecto significativo en la formación de agregados inducida por PCLP1 (**Figura 22 a**), lo que apunta a un proceso independiente de selectina L. Posteriormente se procedió a valorar la implicación de las integrinas en la adhesión inducida por PCLP1. Dado que los cationes divalentes son esenciales para la unión de las integrinas a sus ligandos,<sup>226</sup> se evaluó la dependencia al calcio y magnesio de la adhesión inducida por PCLP1. La presencia de EDTA, un quelante de calcio y magnesio, en el medio inhibió completamente dicha adhesión (**Figura 22 b**), mientras que la presencia de EGTA, un quelante específico de calcio, provocó una disminución parcial. Esta dependencia a cationes divalentes sugería un mecanismo dependiente de integrinas. La interacción de las integrinas con sus ligandos promueve la adhesión de las células a la matriz extracelular y a otras células. La integrina  $\alpha$ L $\beta$ 2, denominada antígeno 1 asociado a la función de los leucocitos (LFA-1) o CD11a/CD18, perteneciente a la subfamilia de las integrinas  $\beta$ 2, cuyo ligando principal es

ICAM-1, se expresa exclusivamente en leucocitos. Dicha integrina juega un papel crítico en la migración leucocitaria a tejidos y nódulos linfoides a través de los vasos sanguíneos. Para determinar si la adhesión celular mediada por PCLP1 en células Raji era dependiente de integrinas  $\beta 2$ , se evaluó la formación de agregados en presencia de un anticuerpo monoclonal bloqueante anti-CD18. Como se desprende de la **Figura 22 c**, dicho anticuerpo inhibió significativamente la agregación inducida por PCLP1, lo que refleja la participación de las integrinas  $\beta 2$  en este proceso (**Figura 22 c**).



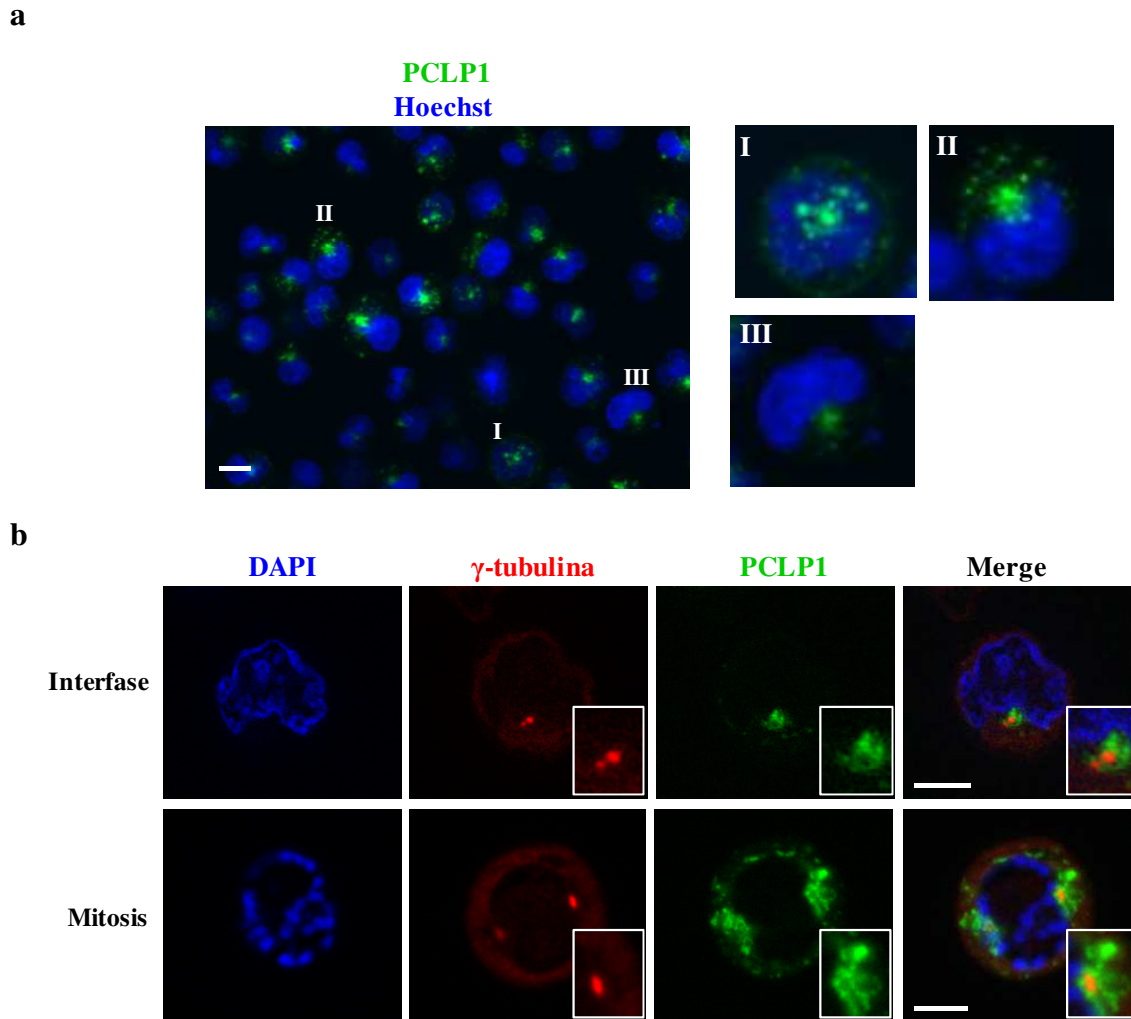
**Figura 22. La adhesión intercelular inducida por PCLP1 es mediada por integrinas.** Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases con un objetivo de 10X en la que se muestran los agregados de Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 tras la adición al medio de (a) un anticuerpo monoclonal bloqueante anti-CD62L o el control isotópico, (b) EDTA 1mM, EGTA 1mM o el vehículo y (c) un anticuerpo monoclonal bloqueante anti-CD18 o control isotópico. La barra de escala mostrada en la parte inferior izquierda de cada imagen equivale a 100  $\mu$ m. En el histograma de la derecha de cada apartado se muestra la media  $\pm$ SD del número de agregados con más de 20 células por campo, incluyendo 10 campos en cada uno de los tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó usando la prueba U de Mann-Whitney \*\*  $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$ .

#### 1.4. PCLP1 se localiza en la región pericentriolar de las células Raji

Seguidamente, se procedió a examinar la localización subcelular de PCLP1 en las células de linfoma B mediante la visualización de la señal emitida por la proteína GFP fusionada a PCLP1 con un microscopio de fluorescencia. Como revela la **Figura 23 a**, se detectó presencia de PCLP1 en la membrana plasmática, en vesículas citoplasmáticas y en la región perinuclear/centrosómica. El centrosoma es el principal centro organizador



de microtúbulos en las células animales y juega un papel crucial en la mitosis<sup>227</sup> Está formado por dos centriolos morfológicamente diferentes, denominados centriolo madre e hijo, rodeados de un material proteico denso y amorfo conocido como material pericentriolar, compuesto por más de 300 proteínas diferentes. En la interfase el centrosoma se duplica y posteriormente, durante la mitosis, los dos centrosomas resultantes se separan y migran a los polos opuestos del huso mitótico para dirigir la correcta segregación de los cromosomas en las dos células en división.<sup>227</sup> Dado que PCLP1 se ha visto asociado previamente al centrosoma,<sup>228</sup> tratamos de investigar de manera más detallada la localización de PCLP1 en esta región durante las diferentes etapas del ciclo celular, mediante experimentos de colocalización con  $\gamma$ -tubulina, un marcador específico del área pericentriolar. Las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia, revelan que PCLP1 se localiza en la región pericentriolar y en sus alrededores tanto en la interfase como en la mitosis. En la interfase, PCLP1 exhibe una distribución asimétrica, localizándose preferentemente alrededor de uno de los centriolos. Durante la mitosis, PCLP1 migra a los polos opuestos de la células en asociación con los centrosomas (**Figura 23 b**).



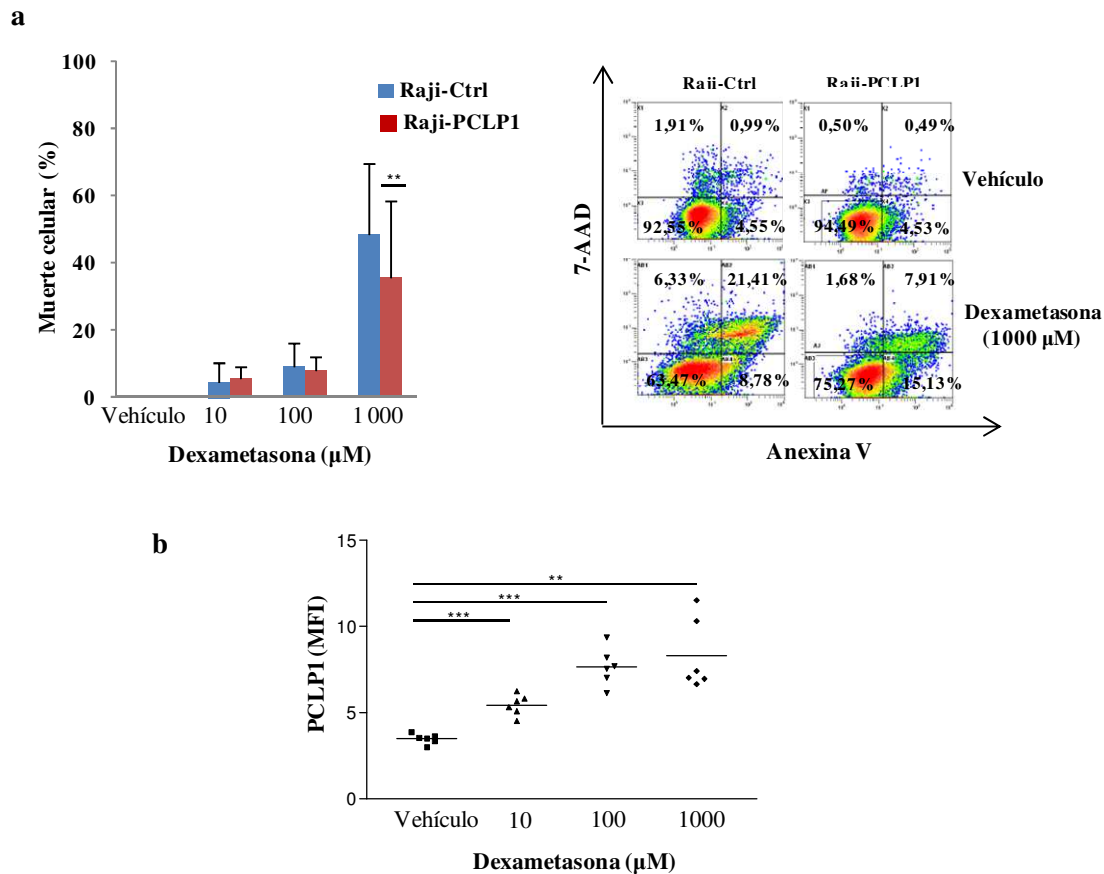
**Figura 23. Localización de PCLP1 en células Raji.** (a) Imagen representativa de células Raji-PCLP1 donde se muestra el núcleo teñido con Hoechst 33342 (azul) y la localización de PCLP1 (verde) en la superficie celular (I), en las vesículas citoplasmáticas (II) y centrosoma (III) usando un objetivo 63X. La barra de escala mostrada en la parte inferior izquierda equivale a 10  $\mu$ m. (b) Imágenes representativas de células Raji-PCLP1 donde se muestra la localización de PCLP1 (verde) en el área pericentriolar en las diferentes fases del ciclo celular. Las células se tiñeron con un anticuerpo monoclonal anti  $\gamma$ -tubulina para visualizar los centriolos (rojo) y con DAPI (azul) para la detección de los núcleos. Los cuadros de la parte inferior izquierda muestran imágenes ampliadas de la región centrosomal. La barra de escala mostrada en la parte inferior izquierda equivale a 5  $\mu$ m

## 2. PCLP1 EN LA RESISTENCIA A FÁRMACOS

### 2.1. PCLP1 induce resistencia a la muerte mediada por dexametasona y especies reactivas de oxígeno en células Raji

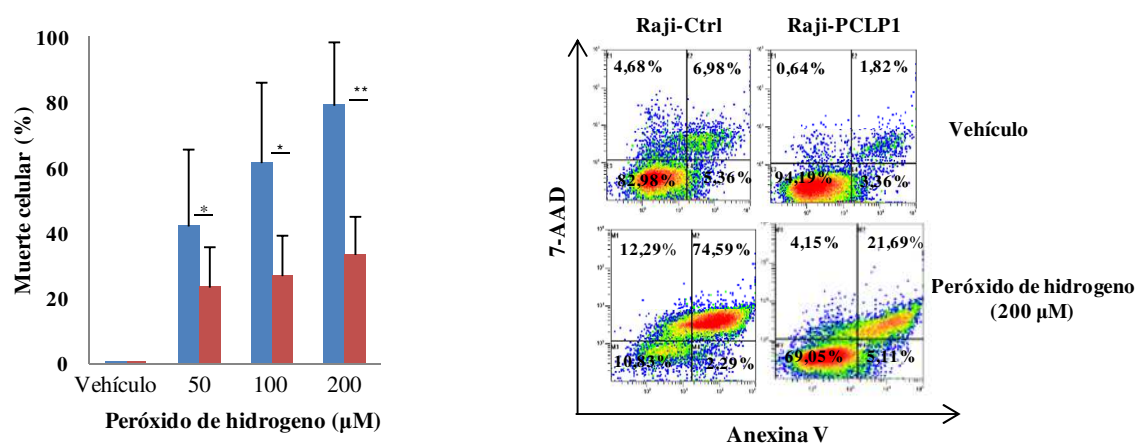
La dexametasona es un glucocorticoide ampliamente utilizados para el tratamiento de diversas neoplasias hematológicas malignas, incluyendo linfomas de células B y leucemias. De hecho, la dexametasona forma parte de los protocolos estandarizados de primera línea de tratamiento, aunque la adquisición de resistencia a este tipo de fármacos

restringe su efectividad.<sup>229</sup> Dado que publicaciones recientes demuestran la quimioresistencia inducida por PCLP1 a cisplatino en un tipo de carcinoma de células escamosas de boca y lengua<sup>207</sup> y en células de osteosarcoma,<sup>208</sup> nos planteamos si PCLP1 podría inducir resistencia a alguno de los fármacos utilizados para tratar el NHL. Con esta finalidad, se decidió evaluar el efecto de PCLP1 en el tratamiento de las células con dexametasona. Para ello, las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 se trataron con dosis crecientes de dexametasona durante 72 horas y posteriormente se examinó la muerte total mediante tinción de las células con Anexina V y 7ADD y posterior análisis por citometría de flujo. Tras restar la muerte espontánea producida por el vehículo, los datos revelaron una reducción remarcable de la muerte celular en las células Raji que sobreexpresaban PCLP1 comparado con las células transfectadas con el vector vacío a concentraciones elevadas de dexametasona (**Figura 24 a**). En concordancia con estos resultados, se pudo demostrar asimismo que las células Raji-PCLP1 que sobrevivían al tratamiento con dexametasona exhibían mayores niveles medios de PCLP1 que las células tratadas con el vehículo, debido a la mayor susceptibilidad a la muerte inducida por el fármaco de las células Raji-PCLP1 con menor expresión de PCLP1 (**Figura 24 b**). Estos resultados indican que la expresión de PCLP1 confiere resistencia a concentraciones elevadas de dexametasona en las células Raji.



**Figura 24. La sobreexpresión de PCLP1 provoca una disminución en la muerte mediada por dexametasona en células Raji.** (a) Porcentaje de muerte celular (Anexina V<sup>+</sup>/7ADD<sup>-</sup>; Anexina V<sup>-</sup>/7ADD<sup>+</sup>; Anexina V<sup>+</sup>/7ADD<sup>+</sup>) producida por concentraciones crecientes de dexametasona en las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1. En la parte derecha se muestran los gráficos de dispersión de citometría de flujo representativos de la tinción con Anexina V y 7ADD. Los datos muestran la media  $\pm$ SD de 6 experimentos independientes. (b) Expresión de PCLP1 de las células Raji-PCLP1 resistentes a la muerte inducida por dexametasona. Se seleccionaron las células doblemente negativas para la tinción con Anexina V y 7ADD tras tratamiento con dexametasona o vehículo de los experimentos mostrados en (a) y se analizó la expresión de PCLP1 en función del marcaje con GFP mediante citometría de flujo. El análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student para muestras relacionadas. \*\*P < 0,01. \*\*\*P < 0,001

Dado que los glucocorticoides inducen la muerte de las células de linfoma mediante el estrés oxidativo generado por el aumento celular de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,<sup>59</sup> se evaluó el efecto de la expresión de PCLP1 en la citotoxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para ello, se trataron las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 6 horas, tiempo aproximado en el que ocurre la muerte mediada por estrés oxidativo. Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo mostraron que la respuesta citotóxica al estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era significativamente menor en las células Raji que sobreexpresaban PCLP1 con respecto a las células control (**Figura 25**). Este hallazgo demostró que PCLP1 inhibe parcialmente la apoptosis mediada por especies reactivas de oxígeno en las células Raji.



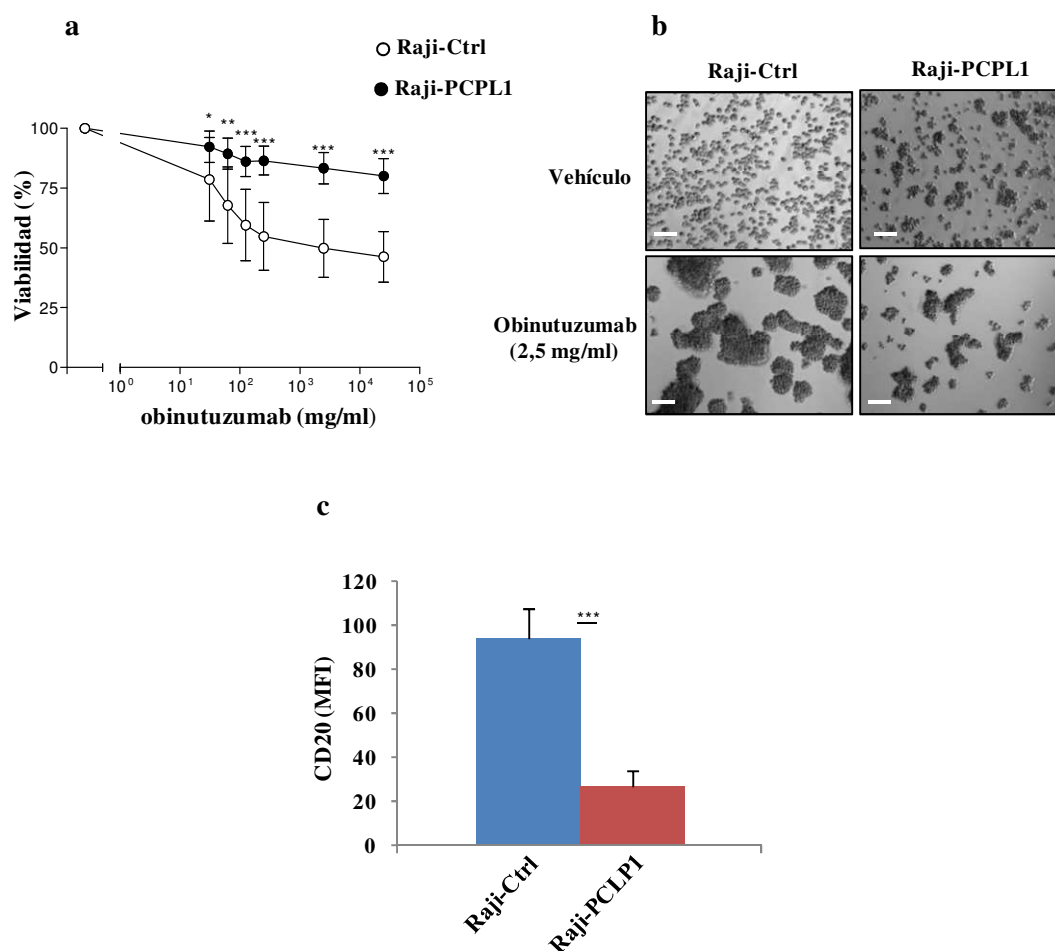
**Figura 25. La sobreexpresión de PCLP1 provoca una disminución en la muerte inducida por las especies reactivas de oxígeno en células Raji.** Porcentaje de muerte celular (Anexina V<sup>-</sup>/7ADD<sup>-</sup>; Anexina V<sup>+</sup>/7ADD<sup>-</sup>; Anexina V<sup>-</sup>/7ADD<sup>+</sup>) producida por concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1. En la parte derecha se muestran las gráficas de dispersión de citometría de flujo representativas de la tinción con Anexina V y 7ADD. Los datos muestran la media ±SD de 5 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student para muestras relacionadas. \*P < 0,05. \*\*P < 0,01.

## 2.2. PCLP1 aumenta la resistencia a la muerte directa inducida por obinutuzumab en células Raji

En 1997 la FDA, aprobó el primer anticuerpo monoclonal anti CD20 para el tratamiento de NHL, rituximab, lo que supuso una revolución en la terapia frente al grupo de enfermedades que engloba el NHL. Posteriormente se han desarrollado diferentes anticuerpos monoclonales frente a la molécula CD20, incluyendo obinutuzumab. Un reciente estudio ha demostrado que obinutuzumab induce mayores niveles de muerte celular directa, no dependientes de complemento, tanto en líneas celulares de linfoma B como en enfermedades malignas primarias de células B en comparación con rituximab.<sup>80,230</sup> La muerte producida por obinutuzumab es mediada por lisosomas y depende en gran medida de su capacidad de desencadenar la adhesión celular homotípica dependiente de actina.<sup>82</sup> Dado que PCLP regula la reorganización del citoesqueleto a través de su unión a la actina, nos preguntamos si podría modular el efecto citotóxico de obinutuzumab. Para llevar a cabo este objetivo, se trataron las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 con concentraciones crecientes de obinutuzumab durante 12 horas y se determinó la supervivencia celular por citometría de flujo mediante marcaje con Anexina V y 7ADD. Como se refleja en la **Figura 26 a**, las células Raji-PCLP1 exhibieron un marcado aumento en la resistencia al tratamiento con obinutuzumab respecto a las células Raji-Ctrl. En línea con estos resultados, el examen de las células mediante microscopía en contraste de fases reveló que las células Raji-Ctrl tratadas con obinutuzumab

experimentaron un prominente aumento en la adhesión homotípica, visualizado mediante la presencia de grandes racimos de células, indicativo de una elevada muerte celular (**Figura 26 b**). Por el contrario, las células Raji-PCLP1 experimentaron un aumento discreto en la agregación homotípica en respuesta al tratamiento de obinutuzumab (**Figura 26 b**). Estos datos demuestran que la expresión de PCLP1 inhibe la muerte celular mediada por obinutuzumab en las células Raji.

Tras obtener estos resultados, se determinó el nivel de expresión de la molécula CD20 en la superficie celular de Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 con el objetivo de comprobar si la disminución del efecto del fármaco anti-CD20 inducida por la expresión de PCLP1 se correlacionaba con una disminución en la expresión de CD20 (**Figura 26 c**). Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo mostraron una disminución en la expresión de CD20 en las células Raji-PCLP1, lo que sugiere que la resistencia a obinutuzumab inducida por esta proteína podría deberse a la disminución de la expresión de CD20 en la membrana celular.



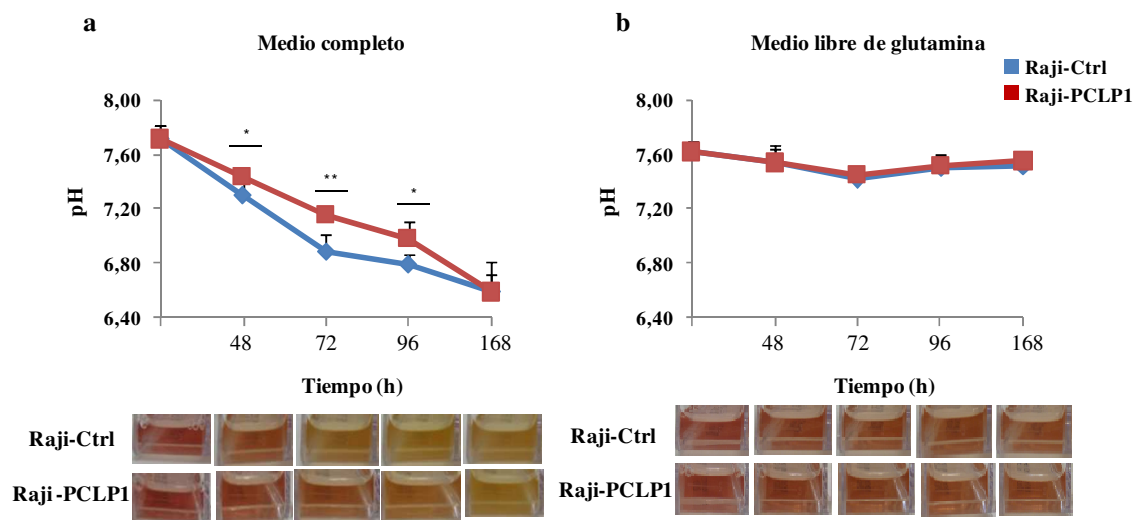
**Figura 26. La sobreexpresión de PCLP1 proporciona resistencia al tratamiento con obinutuzumab en células Raji.** (a) Curva de viabilidad (Anexina V/7ADD) de las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 tras tratamiento de concentraciones crecientes de obinutuzumab. Los datos muestran la media  $\pm$ SD del porcentaje de viabilidad de 6 experimentos independientes. (b) Imágenes representativas adquiridas mediante microscopía de contraste de fases de la agregación homotípica inducida por obinutuzumab en las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1. La barra de escala que se muestra en la parte inferior derecha de cada imagen equivale a 100 $\mu$ m. (c) MFI de los niveles de expresión de CD20 adquirida mediante citometría de flujo. El análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student para muestras relacionadas. \*P < 0,05. \*\*P < 0,01. \*\*\*P < 0,001.

### 3. PCLP1 EN EL METABOLISMO DE LAS CÉLULAS TUMORALES

#### 3.1. PCLP1 regula el metabolismo celular en las células Raji

Las células tumorales con elevada tasa de proliferación presentan un aumento en el consumo de glucosa y producción de lactato,<sup>231</sup> lo que conduce a la acidificación del medio extracelular, visualizada *in vitro* por el viraje al color amarillo del indicador de pH rojo fenol añadido al medio de cultivo. Contrariamente a lo esperado, a lo largo del tiempo de cultivo se detectó una disminución en la acidificación del medio de las células Raji-PCLP1 comparado con las células Raji-Ctrl, como reflejan las imágenes en el viraje al amarillo del medio de las células y los valores de pH determinados con un pH-metro

(Figura 27 a). Esta observación sugiere que PCLP1 regula la homeostasis del pH en células Raji. Recientemente se ha descrito la capacidad de ciertos tumores para mantener la homeostasis del pH mediante la producción de amonio a través de la glutaminólisis. Para determinar si PCLP1 controla la homeostasis del pH a través de esta vía metabólica, se cultivaron las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 en un medio libre de glutamina. En ausencia de glutamina, no se detectaron diferencias en el pH del medio entre las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 (Figura 27 b), lo que sugiere que PCLP1 mantiene la homeostasis del pH a través de un proceso dependiente de la glutaminólisis.



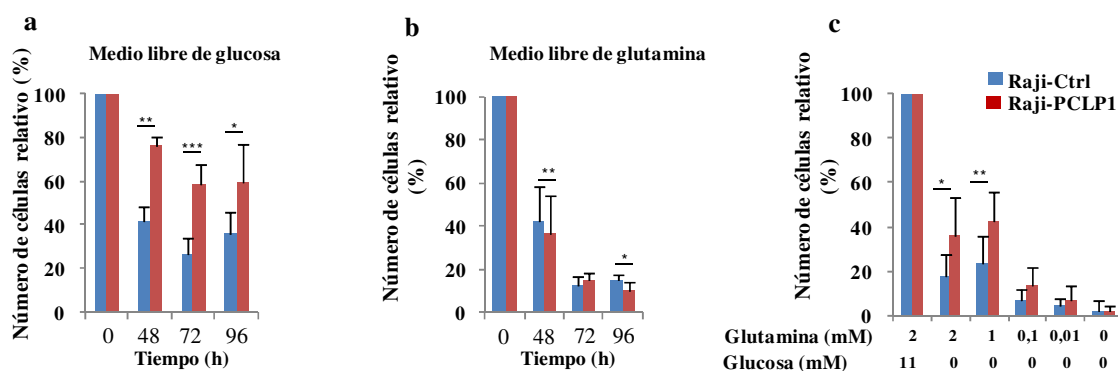
**Figura 27. PCLP1 regula la homeostasis del pH a través de un proceso dependiente de la glutaminólisis.** (a) Determinación de niveles de pH del medio de cultivo de las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 en los tiempos indicados en medio completo y (b) en medio libre de glutamina. Los gráficos muestran los valores de pH determinados con un pHmetro a diferentes tiempos de incubación. En la parte inferior se muestran fotografías representativas del color del medio de cultivo que contiene rojo fenol como indicador del pH. Los datos representan la media  $\pm$ SD de 5 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student para muestras relacionadas. \*P < 0,05. \*\*P < 0,01.

Este hallazgo sugería que PCLP1 podría tener la capacidad de activar la vía de la glutaminólisis, aumentando de este modo la dependencia de las células de linfoma de células B a la glutamina para sobrevivir y proliferar. PCLP1 activa las vías oncogénicas PI3K/AKT y MAPK,<sup>201</sup> ampliamente conocidas por regular varias respuestas celulares, incluyendo el metabolismo de la glucosa y glutamina, así como la proliferación celular. La glutamina representa una fuente alternativa de energía y macromoléculas en aquellos tumores privados de glucosa debido al elevado consumo de nutrientes y a la deficiente vasculatura de las células tumorales.<sup>232</sup>

Con la finalidad de examinar si PCLP1 aumenta la dependencia de las células Raji a la glucosa o glutamina, se determinó la proliferación de las células Raji-Ctrl y Raji-

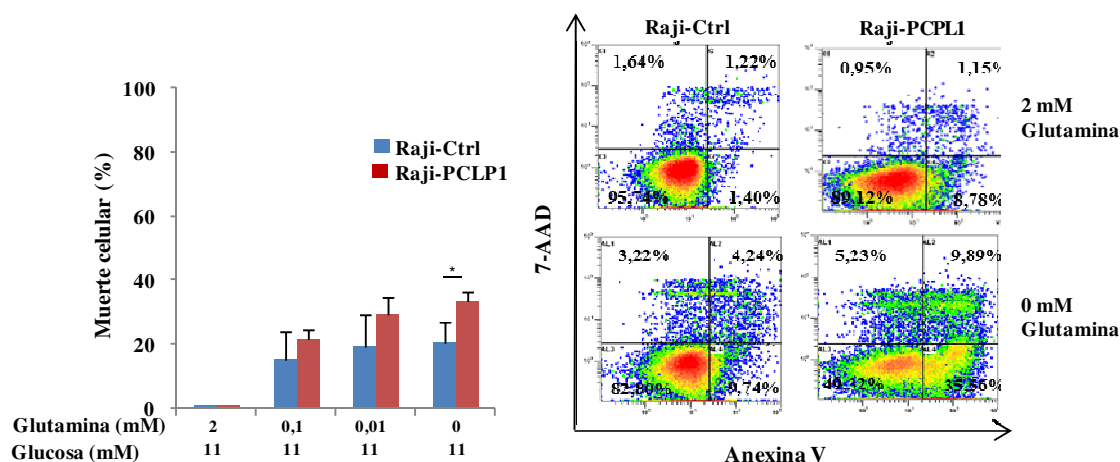


PCLP1 bajo condiciones de privación de glucosa y glutamina a diferentes tiempos. En condiciones de ausencia de glucosa, las células Raji-PCLP1 mostraron un aumento significativo en su proliferación con respecto a las células Raji-Ctrl (**Figura 28 a**). Por el contrario, en ausencia de glutamina, las células Raji-PCLP1 presentaron una disminución en su capacidad proliferativa comparado con las células Raji-Ctrl. (**Figura 28 b**). Cuando se cultivaron las células durante 72 h en condiciones de ausencia de glucosa con concentraciones decrecientes de glutamina, el efecto de PCLP1 en el aumento de la proliferación disminuyó de manera gradual hasta los niveles observados en las células Raji-Ctrl, lo que indica que el incremento en la proliferación celular inducido por PCLP1 en ausencia de glucosa es dependiente de glutamina (**Figura 28 c**).



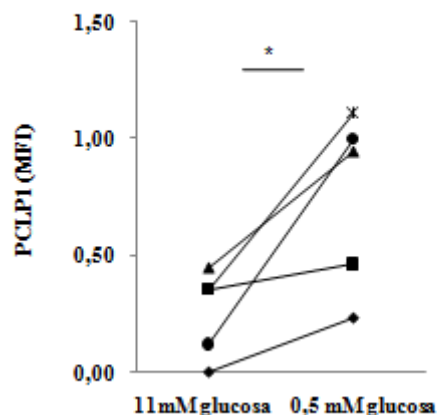
**Figura 28. El incremento en la proliferación celular en ausencia de glucosa inducido por PCLP1 es dependiente de glutamina.** (a) Proliferación celular de Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 en los tiempos indicados en condiciones de ausencia de glucosa o (b) en ausencia de glutamina. (c) Proliferación celular de Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 en condiciones de ausencia de glucosa y concentraciones decrecientes de glutamina a 72 h de cultivo. La proliferación celular en cada caso se expresó como el número total de células viables en condiciones de privación de glucosa y/o glutamina normalizado al número total de células viables cultivadas en medio completo. Los datos muestran la media  $\pm$  SD de 5 a 6 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student para muestras relacionadas. \* $P < 0,05$ . \*\* $P < 0,01$ . \*\*\* $P < 0,001$ .

A continuación se evaluó el efecto de la sobreexpresión de PCLP1 en la supervivencia de las células Raji en condiciones de carencia de glutamina. Para ello, se sembraron las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 en medio de cultivo en presencia de glucosa y con concentraciones decrecientes de glutamina. Los resultados revelaron un aumento significativo en la muerte celular total en las células Raji-PCLP1 respecto a Raji-Ctrl (**Figura 29**), como refleja el aumento del marcaje de Anexina/7ADD detectado mediante citometría de flujo. En conjunto, estos resultados demuestran que PCLP1 incrementa la dependencia a la glutamina y reduce la dependencia a la glucosa en las células Raji.



**Figura 29. PCLP1 induce una alta dependencia a la glutamina y una dependencia reducida a la glucosa para su proliferación en las células Raji.** Porcentaje de muerte celular (Anexina V<sup>+</sup>/7ADD<sup>-</sup>; Anexina V<sup>-</sup>/7ADD<sup>+</sup>; Anexina V<sup>+</sup>/7ADD<sup>+</sup>) producida por concentraciones descendentes de glutamina en presencia de glucosa en las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 tras restarle la muerte espontánea. En la parte derecha se muestran las gráficas de dispersión de citometría de flujo representativas en los que se puede ver la tinción de Anexina y 7ADD. Los datos muestran la media  $\pm$ SD de 5 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student para muestras relacionadas. \*P < 0,05.

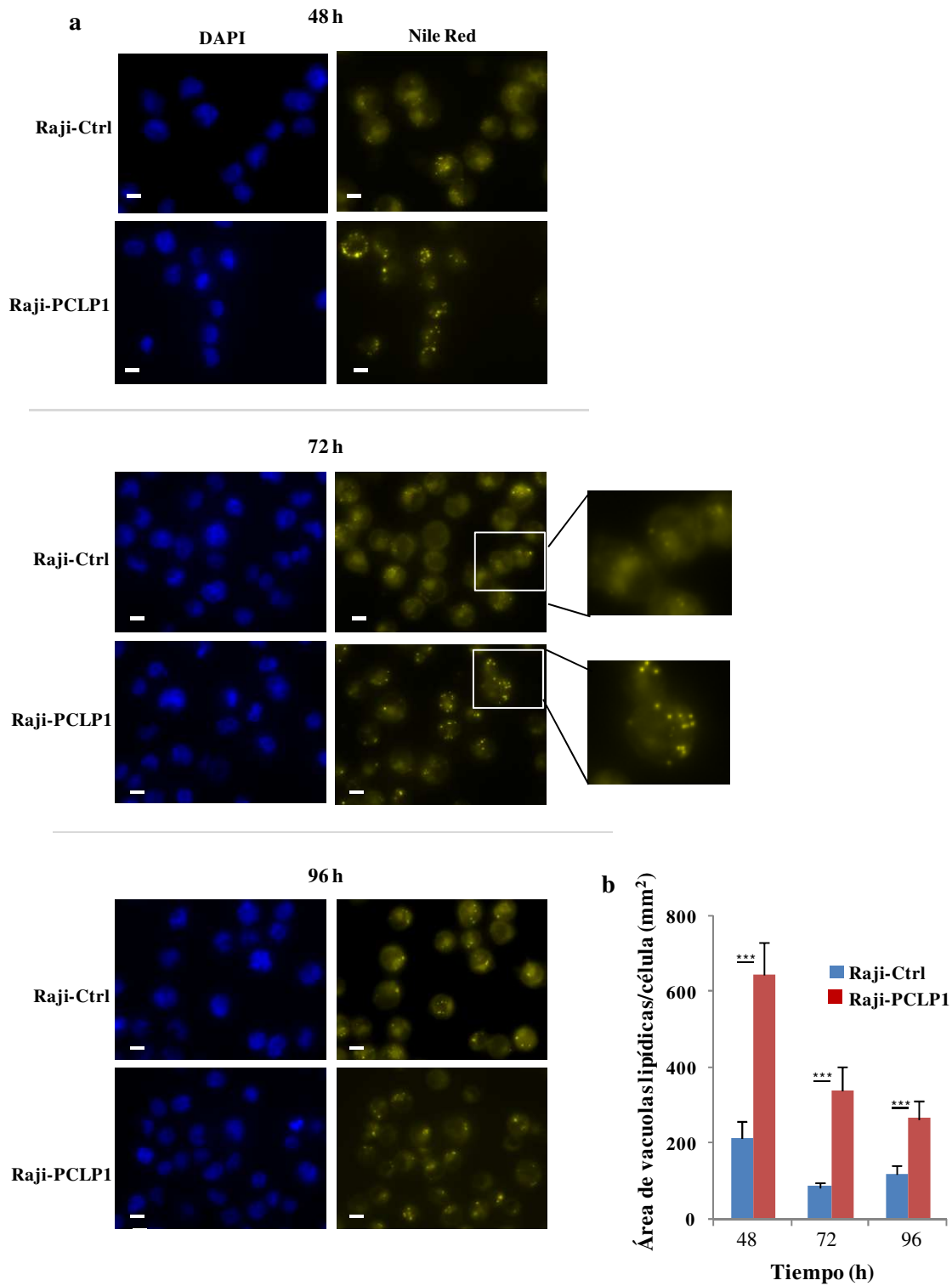
En podocitos renales humanos se ha descrito que niveles elevados de glucosa provocan una dramática disminución de la expresión de PCLP1, que vuelve a sus niveles normales tras cultivarlos en medio con baja concentración de glucosa.<sup>233,234</sup> Teniendo en cuenta este hallazgo, se procedió a valorar el efecto de la disminución de glucosa en la expresión de PCLP1 en las células Raji, reproduciendo las condiciones de baja concentración en glucosa presentes en las células tumorales. Para ello, se cultivaron las células Raji en un medio con concentraciones bajas de glucosa (0,5 mM) o en medio completo, que contiene concentraciones altas de glucosa (11 mM) durante 72 h y se analizó la expresión de PCLP1 mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que los niveles de PCLP1 aumentan en células cultivadas en medio bajo en glucosa (**Figura 30**), lo que indica que la privación de glucosa promueve la expresión de PCLP1 en la superficie de células Raji.



**Figura 30. Los niveles de expresión de PCLP1 aumentan en condiciones bajas de glucosa en las células Raji.** Las células Raji se cultivaron durante 72h en medio de cultivo con concentraciones elevadas de glucosa (11mM) y en medio de cultivo con concentraciones bajas de glucosa (0,5mM) y los niveles de PCLP1 se determinaron mediante citometría de flujo con un anticuerpo anti-PCLP1 humano. En la gráfica se muestran los valores de MFI de 5 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student para muestras relacionadas. \*P < 0,05.

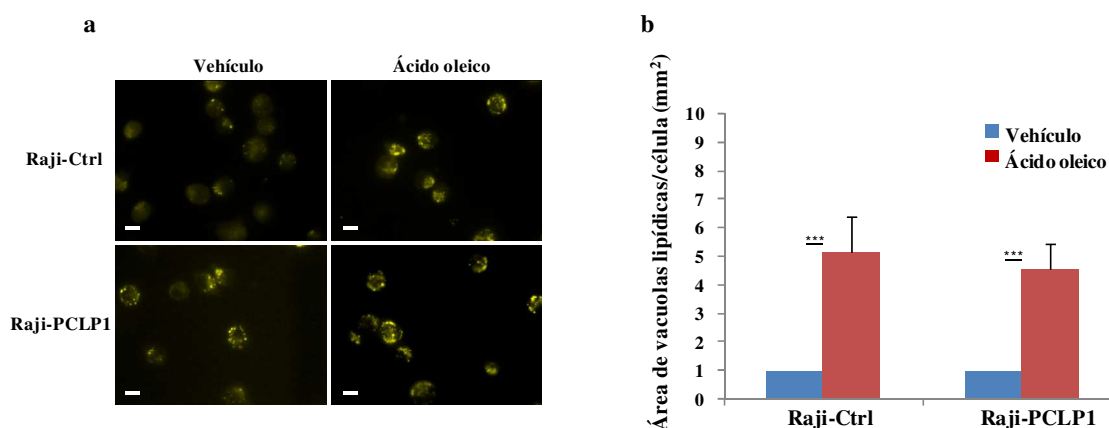
### 3.2. PCLP1 induce la formación de vacuolas lipídicas en células Raji

Una de las características más relevantes de las células tumorales es la alteración del metabolismo lipídico. Las células tumorales con alto grado de proliferación aumentan la síntesis endógena de lípidos, almacenando el exceso en su interior en forma de vacuolas lipídicas.<sup>96</sup> El examen microscópico de las células Raji-PCLP1 reveló la presencia de mayor número de vesículas citoplasmáticas que en las células Raji-Ctrl. Con la finalidad de estudiar la composición del contenido de las vesículas, se tiñeron las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 con Rojo de Nilo, un marcador de lípidos neutros, a diferentes tiempos de cultivo en medio completo. La observación por microscopía de fluorescencia desveló un marcado aumento de la acumulación de vacuolas lipídicas neutras en el citoplasma de las células Raji-PCLP1 a las 48 horas de cultivo comparado con las células Raji-Ctrl (**Figura 31 a**), lo que se confirmó posteriormente mediante la cuantificación del área de las vacuolas lipídicas por célula usando el programa de análisis de *ImageJ* (**Figura 31 b**). Estas reservas lipídicas disminuían de manera gradual en el tiempo (**Figura 31 a**), probablemente debido a la lipólisis u oxidación lipídica inducida por la carencia de nutrientes.



**Figura 31. PCLP1 induce la formación de vacuolas lipídicas en la línea celular Raji.** (a) Imágenes representativas de las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 tras cultivarlas en las mismas condiciones en medio completo a diferentes tiempos y marcarlas posteriormente con DAPI (columna izquierda en azul) y Rojo de Nilo (columna derecha en amarillo). Las imágenes se adquirieron con un microscopio de fluorescencia con un objetivo de 60X. La barra de escala mostrada en la parte inferior izquierda de cada foto equivale a 10µm. (b) Histograma que refleja la cuantificación del área de vacuolas lipídicas por célula en cada campo analizado mediante *ImageJ*. Los datos muestran la media ± SD del área de vacuolas lipídicas por célula en cada campo analizando 10 campos en cada uno de los tres experimentos independientes realizados. Para el análisis estadístico se usó la prueba U de Mann-Whitney \*\*\*P<0,001.

Tras observar el incremento en la formación de vacuolas lipídicas en el interior de las células que sobreexpresan PCLP1, nos preguntamos si este aumento en la síntesis lipídica se debía a la síntesis *de novo* o, por el contrario, a una mayor captación de lípidos exógenos presentes en el medio de cultivo. Para este cometido, se añadió al medio de cultivo un ácido graso monoinsaturado, el ácido oleico, y se analizó la formación de vacuolas lipídicas al cabo de 48 h. Como se puede observar en las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia, al añadir el ácido oleico al medio de cultivo el número de vacuolas lipídicas aumentó considerablemente tanto en las células Raji-Ctrl como en las células Raji-PCLP1 (**Figura 32 a**). La cuantificación mediante el programa *ImageJ* mostró un incremento de 4 a 5 veces en el área de las vacuolas lipídicas por célula en ambos clones tras la adición de ácido oleico, sin detectarse diferencias significativas entre ellos. (**Figura 32 b**). Estos resultados apuntan a que el aumento en la formación de vacuolas lipídicas inducido por PCLP1 en células Raji-PCLP1 no se debe al aumento en la captación de ácidos grasos extracelulares.

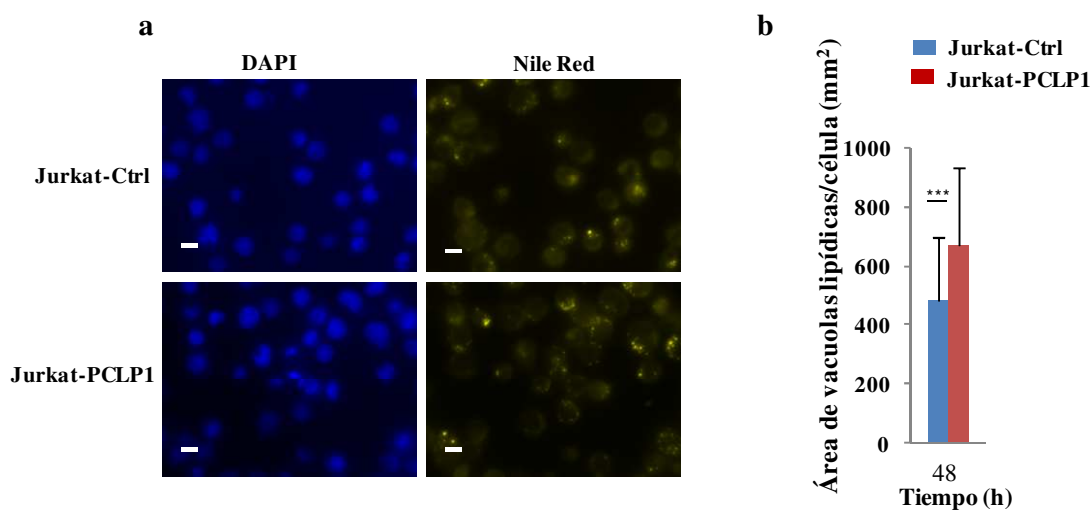


**Figura 32. La formación de vacuolas lipídicas inducida por PCLP1 es independiente de la presencia de ácidos grasos extracelulares.** (a) Imágenes representativas de las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 tras cultivarlas durante 48 horas añadiendo al medio de cultivo el vehículo (columna izquierda) o 400  $\mu\text{g/ml}$  de ácido oleico (columna derecha) y marcarlas con Rojo de Nilo. Las imágenes se adquirieron con un microscopio de fluorescencia con un objetivo de 60X. La barra de escala mostrada en la parte inferior izquierda de cada foto equivale a 10 $\mu\text{m}$ . (b) Histograma que refleja la cuantificación del área de vacuolas lipídicas por célula en cada campo analizado mediante *Image J*. Los datos muestran la media  $\pm$  SD del área de vacuolas lipídicas por célula en células cultivadas con ácido oleico normalizada al área de vacuolas lipídicas por célula en células cultivadas con el vehículo en cada campo de un total de 10 campos analizados en cada uno de los cuatro experimentos independientes realizados. Para el análisis estadístico se usó la prueba U de Mann-Whitney \*\*\* $P < 0,001$ .

Para determinar si la formación de vacuolas lipídicas inducida por PCLP1 es específica de células Raji, se analizó asimismo el efecto de PCLP1 en el contenido de lípidos en la línea celular Jurkat, proveniente de una ALL de células T. Para ello,

siguiendo el procedimiento descrito para las células Raji, se transfectaron las células Jurkat con el plásmido pEGFP que contiene ADN que codifica la proteína PCLP1 (pEGFP-PCLP1) o el plásmido vacío como control (pEGFP), obteniéndose una línea celular que expresa niveles elevados de PCLP1-GFP (Jurkat-PCLP1), y su respectivo control (Jurkat-Ctrl), respectivamente.

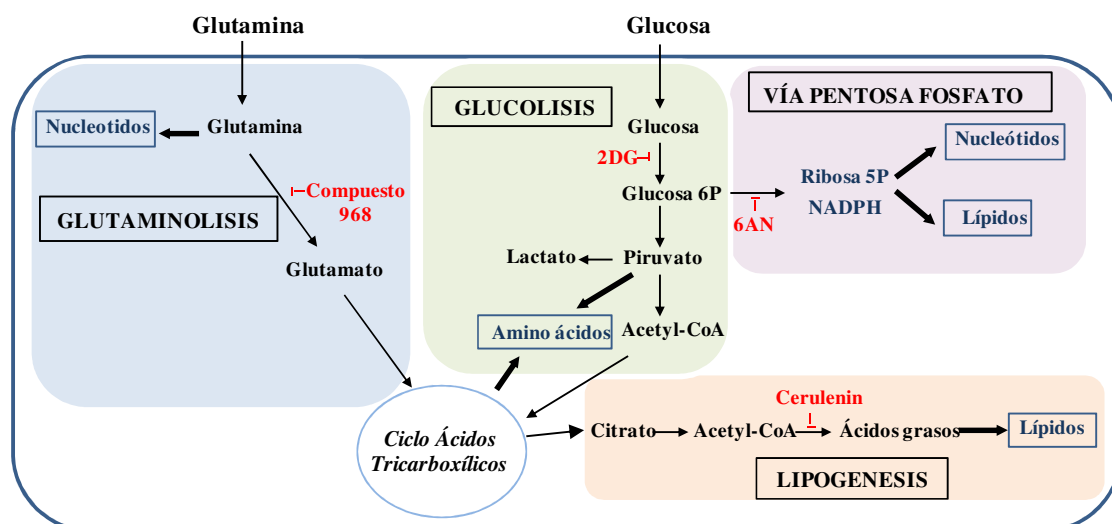
Como se observa en las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia (**Figura 33 a**), la expresión de PCLP1 en células Jurkat aumenta en el almacenamiento de vacuolas lipídicas, aunque en menor grado que en células Raji, lo que se confirmó posteriormente mediante la cuantificación del área de las vacuolas lipídicas por célula (**Figura 33 b**).



**Figura 33. PCLP1 induce la formación de vacuolas lipídicas en la línea celular Jurkat.** (a) Imágenes representativas de las células Jurkat-Ctrl y Jurkat-PCLP1 tras cultivarlas en las mismas condiciones en medio completo durante 48 h y marcarlas posteriormente con DAPI (columna izquierda en azul) y Rojo de Nilo (columna derecha en amarillo). Las imágenes se adquirieron con un microscopio de fluorescencia con un objetivo de 60X. La barra de escala mostrada en la parte inferior izquierda de cada foto equivale a 10µm. (b) Histograma de cuantificación del área de vacuolas lipídicas por célula en cada campo analizado mediante *ImageJ*. Los datos muestran la media  $\pm$  SD del área de vacuolas lipídicas por célula en cada campo analizando 10 campos en cada uno de los tres experimentos independientes realizados. Para el análisis estadístico se usó la prueba U de Mann-Whitney \*\*\* $P < 0,001$ .

### 3.3. La proliferación inducida por PCLP1 es modulada por inhibidores metabólicos

Una vez comprobado que PCLP1 desencadena diversos cambios metabólicos en las células de linfoma de células B, nos planteamos examinar las vías metabólicas implicadas en la proliferación celular inducida por PCLP1 utilizando para ello inhibidores específicos de enzimas metabólicas claves en el metabolismo celular (**Figura 34**).



**Figura 34. Representación esquemática de las rutas metabólicas y los inhibidores metabólicos correspondientes.** 2DG: 2-deoxiglucosa; 6AN: 6-aminonicotinamida.

Con la finalidad de estudiar la implicación de la glucólisis o glutaminolisis en la proliferación celular mediada por PCLP1, las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP se trataron con dosis crecientes de 2DG, un inhibidor de la glucólisis, o con el compuesto 968, un inhibidor selectivo de la glutaminolisis. La proliferación celular disminuyó levemente en las células Raji-PCLP1 comparado con las células Raji-Ctrl en respuesta al tratamiento con 2DG (**Figura 35 a**). En cambio, el tratamiento con el compuesto 968 provocó una disminución muy acusada en la proliferación de las células Raji-PCLP1 en comparación con las células Raji-Ctrl (**Figura 35 b**). Estos hallazgos indican que la glutaminolisis es esencial para el incremento de la proliferación de las células Raj inducida por PCLP1.

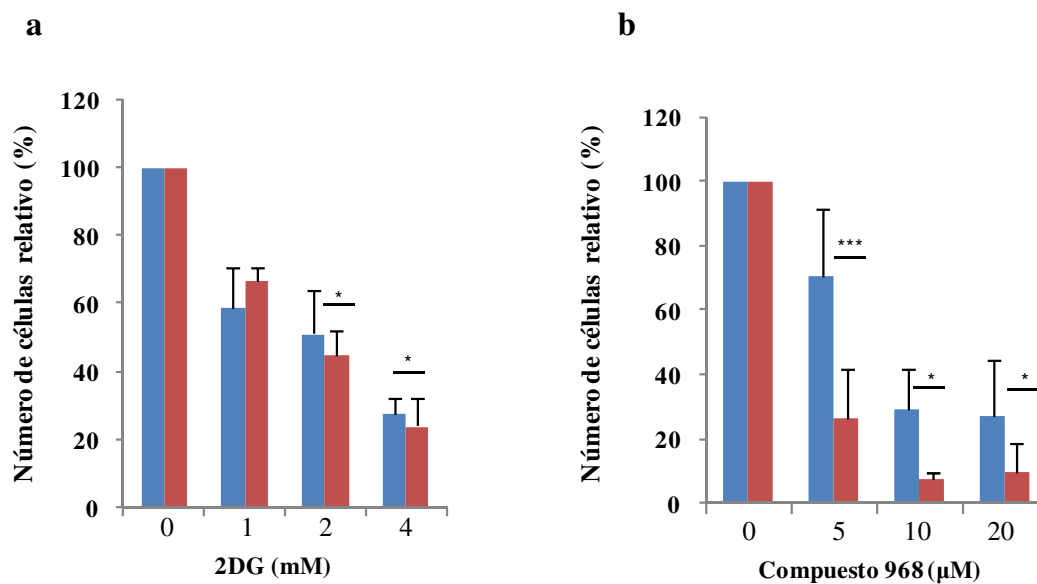
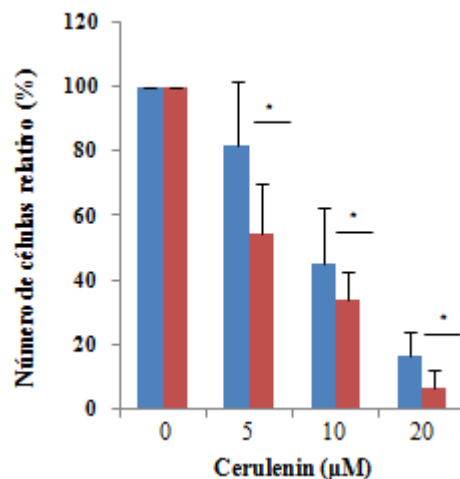


Figura 35. El incremento de la proliferación de las células Raji inducida por PCLP1 es dependiente de la glutaminólisis. (a) Proliferación celular de Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 tras tratamiento de las células con 2DG durante 72h o (b) con el compuesto 968 durante 168 horas. La proliferación celular en cada caso se expresó como el número total de células viables tras tratamiento con el inhibidor normalizado al número total de células viables tratadas con el vehículo. Los datos muestran la media  $\pm$  SD de 5 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student para muestras relacionadas. \*P < 0,05. \*\*\*P < 0,001.

A diferencia de las células normales, que tienen preferencia por los ácidos grasos exógenos, las células tumorales dependen de la síntesis *de novo* de ácidos grasos utilizando como sustratos los precursores derivados del ciclo de ácidos tricarbóxicos, una reacción catalizada por la enzima FASN.<sup>235</sup>

Los ácidos grasos se emplean para la síntesis de membranas y moléculas de señalización, se oxidan para producir energía o se acumulan en el interior celular en vacuolas lipídicas en forma de triacilglicéridos o ésteres de esterol. Como se muestra en la **Figura 36**, las células Raji-PCLP1 tratadas con cerulenina, un inhibidor de la enzima FASN, sufrieron una marcada supresión en la proliferación celular comparado con las células Raji-Ctrl, sugiriendo que el incremento de la proliferación celular de las células de linfoma de células B inducida por PCLP1 depende de la síntesis endógena de ácidos grasos.



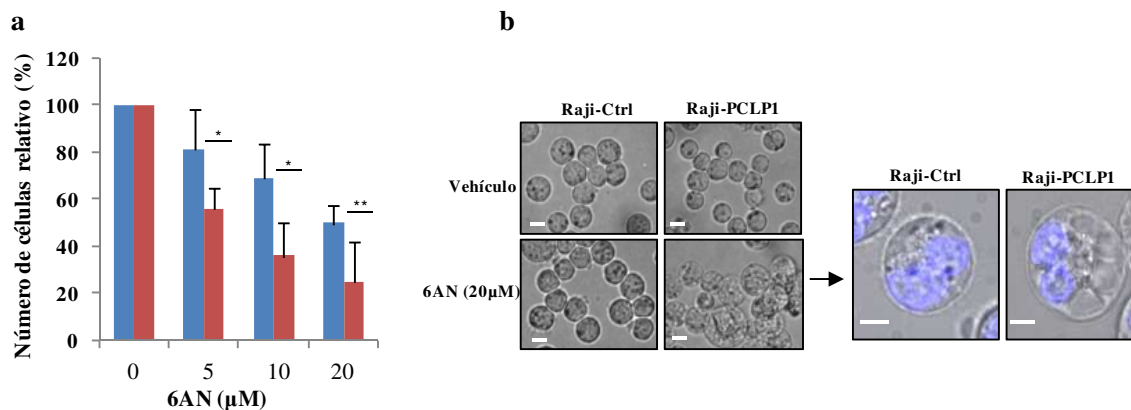


**Figura 36. El incremento de la proliferación de las células de Raji inducida por PCLP1 es dependiente de la síntesis endógena de ácidos grasos.** Proliferación celular de Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 tras tratamiento de las células con cerulenina durante 72h. La proliferación celular en cada caso se expresó como el número total de células viables tratadas con el inhibidor normalizado al número total de células viables tratadas con el vehículo. Los datos muestran la media  $\pm$  SD de 5 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student para muestras relacionadas. \*P < 0,05.

La PPP es una vía metabólica alternativa para el metabolismo de la glucosa que promueve la progresión del cáncer proporcionando a las células tumorales R5P, un monosacárido necesario para la síntesis de nucleótidos, y NADPH, una molécula crucial tanto para el mantenimiento celular bajo condiciones de estrés oxidativo como para la síntesis de lípidos y nucleótidos.<sup>236</sup>

Varias células tumorales aumentan el flujo hacia la PPP activando G6PD, una enzima que cataliza la primera reacción de esta ruta.<sup>236</sup> Con el propósito de conocer si PCLP1 induce la proliferación de las células de linfoma de células B mediante la activación de la PPP, se trataron las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 con 6AN, un inhibidor competitivo de G6PD. El efecto inhibitorio de 6AN en la proliferación celular fue notablemente más pronunciado en las células Raji-PCLP1 que en las células Raji-Ctrl (**Figura 37 a**), lo que indica que el aumento de la proliferación de las células Raji inducida por PCLP1 depende de la PPP.

Curiosamente, el examen microscópico reveló una extensa vacuolización citoplasmática en las células Raji-PCLP1 en respuesta al tratamiento con 6AN, a diferencia de las células Raji-Ctrl (**Figura 37 b**).



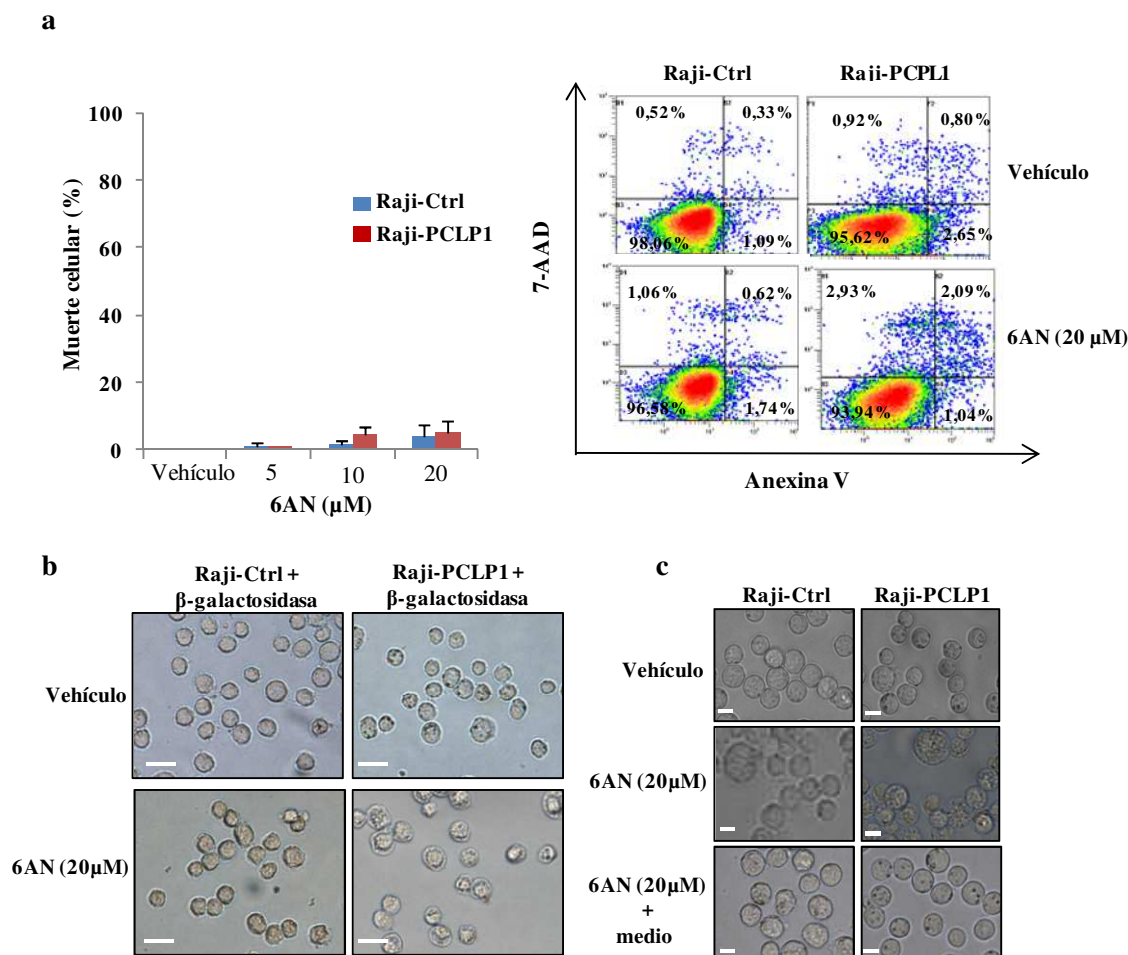
**Figura 37. El incremento de la proliferación de las células Raji inducida por PCLP1 es dependiente de la PPP.** (a) Proliferación celular de Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 tras tratamiento de las células con 6AN durante 72h. La proliferación celular en cada caso se expresó como el número total de células viables tras tratamiento con el inhibidor normalizado al número total de células viables tratadas con el vehículo. Los datos muestran la media ± SD de 5 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student para muestras relacionadas. \*P < 0,05. \*\*P < 0,01. (b) Fotografías de microscopía en contraste de fases de las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 tratadas con el vehículo (línea superior) o con 6AN (línea inferior) durante 72 h. La barra de escala que se muestra en la parte inferior izquierda de las imágenes equivale a 10 μm. En la parte derecha se muestran imágenes representativas ampliadas de las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 tratadas con 6AN adquiridas con microscopía fluorescencia en las que se puede observar la vacuolización en las células Raji-PCLP1. Se muestra en azul el núcleo teñido con Hoechst 33342. La barra de escala que se muestra en la parte inferior izquierda equivale a 5 μm.

Para evaluar la viabilidad de las células vacuoladas, se tiñeron las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 previamente incubadas en presencia de 6AN o el vehículo con Anexina V y 7ADD y se analizaron posteriormente por citometría de flujo. Los resultados revelaron que la muerte celular tras tratamiento con 6AN era inferior al 5% tanto en células Raji-Ctrl como en células Raji-PCLP1. Aunque la citotoxicidad inducida por 6AN fue ligeramente superior en las células Raji-PCLP1 que en las células Raji-Ctrl, el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas (**Figura 38 a**).

Dado que la aparición de vacuolas citoplasmáticas es un rasgo distintivo de las células que han sufrido senescencia, un estado en el que se detiene irreversiblemente el ciclo celular, se analizó la presencia de células senescentes mediante tinción de la actividad β-galactosidasa en las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 tratadas con vehículo o con 6AN. El examen microscópico reveló una ausencia del total de la coloración azul asociada a la actividad β-galactosidasa en las células Raji-PCLP1 (**Figura 38 b**), lo que indica que 6AN no induce senescencia en estas células.

La posterior adición de medio de cultivo nuevo sin 6AN a las células Raji-PCLP1 que presentaban la vacuolización citoplasmática provocó la completa desaparición de las vacuolas, lo que refleja la reversibilidad del proceso (**Figura 38 c**).

En conjunto, estos resultados indican que la disminución de la proliferación mediada por PCLP1 en respuesta a la inhibición de la PPP no tiene lugar a través de la inducción de la muerte celular ni de la senescencia en células Raji.



**Figura 38. El tratamiento con 6AN no produce citotoxicidad ni senescencia en células Raji.** (a) Porcentaje de muerte celular (Anexina V<sup>+</sup>/7ADD<sup>-</sup>, Anexina V<sup>-</sup>/7ADD<sup>+</sup>; Anexina V<sup>+</sup>/7ADD<sup>+</sup>) producida por concentraciones crecientes de 6AN en células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1. En la parte derecha se muestran las gráficas de dispersión de citometría de flujo representativas de la tinción con Anexina V y 7ADD. Los datos muestran la media ±SD de 3 experimentos independientes. (b) Imágenes representativas de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia tomadas con microscopía de fluorescencia de las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1. La barra de escala que se muestra en la parte inferior izquierda de las imágenes equivale a 25 μm. (c) Fotografías de microscopía en contraste de fases de las células Raji-Ctrl y Raji-PCLP1 tratadas con el vehículo (línea superior) o con 6AN (línea intermedia) durante 72 h. Posteriormente se cambió el medio, y se cultivaron las células en medio completo nuevo sin 6AN durante 96 h (línea inferior). La barra de escala que se muestra en la parte inferior izquierda de las imágenes equivale a 10 μm.



## **V. DISCUSIÓN**



## 1. PCLP1 INDUCE UN FENOTIPO MÁS MALIGNO EN CÉLULAS RAJI

En este trabajo, se demuestra por primera vez que el aumento de la expresión de PCLP1 incrementa la capacidad proliferativa y clonogénica de las células Raji. En consonancia con esta observación, estudios previos muestran que PCLP1 induce la proliferación celular en cáncer de mama,<sup>237</sup> glioblastoma<sup>206</sup> y carcinoma de células escamosas de boca,<sup>238</sup> aunque los mecanismos subyacentes aún se desconocen. En el estudio realizado en células de cáncer de mama, se demostró que promueve el crecimiento y proliferación celulares, así como la metástasis de los tumores a órganos lejanos tanto *in vitro* como *in vivo*.<sup>237</sup> En el segundo estudio realizado en células madre de glioblastoma, el silenciamiento de la expresión de PCLP1 con shRNAs específicos disminuyó significativamente la proliferación celular y la formación de oncosferas.<sup>206</sup> Por último, en carcinoma de células escamosas de boca, PCLP1 se relacionó con la capacidad migratoria de las células y con la agresividad del tumor en general, proponiendo a PCLP1 como posible diana terapéutica.<sup>238</sup>

En células de cáncer de mama, PCLP1 activa las vías de señalización MAPK y PI3K,<sup>201</sup> ambas implicadas en la proliferación, supervivencia y progresión de diferentes tumores, incluyendo NHL de células B. Un reciente trabajo realizado en un modelo murino ha demostrado la necesidad crucial de la activación de la vía de PI3K, además de la desregulación de *MYC*, para la transformación maligna de las células B normales en células de BL.<sup>239</sup> Por otro lado, un ensayo previo reveló que la vía Ras/MAPK contribuye a la linfomagénesis inducida por *MYC*.<sup>240</sup> Estas observaciones sugieren que PCLP1 podría cooperar con *MYC* en la linfomagénesis mediante la inducción de la activación de las vías de PI3K o MAPK en linfomas de células B.

El gen que codifica la proteína humana PCLP1 se localiza en la región cromosómica 7q32-q33. Se ha descrito que las ganancias que afectan a esta región predicen el riesgo de transformación de enfermedad agresiva en pacientes con FL<sup>241</sup> y BL.<sup>242</sup> De manera similar, un estudio citogenético llevado a cabo en 46 pacientes diagnosticados de BL detectó ganancias relacionadas con la región 7q32-q33 en tres de los pacientes y reveló la asociación de alteraciones en 7q con un peor pronóstico.<sup>243</sup> Por lo tanto, el aumento en la expresión de PCLP1 detectado en los linfocitos B malignos de los pacientes de FL y en la línea celular Raji de BL de nuestro estudio podría atribuirse a la alteración en el número de copias del gen *PODXL*. La expresión de esta proteína podría

asimismo resultar alterada por translocaciones que situaran al gen *PODXL* bajo el control transcripcional de un determinado promotor o por el aumento de la expresión de elementos transcripcionales reguladores de dicho gen. En este sentido, se ha observado que la unión del factor supresor de tumores WT1 a elementos conservados del promotor del gen *PODXL* induce una intensa activación transcripcional en células de riñón.<sup>156</sup> Otros autores han mostrado que p53 suprime la transcripción de *PODXL* y proponen que la expresión alterada de PCLP1 debida a cambios en WT1 y p53 podría contribuir a la tumorigénesis de Wilms.<sup>244</sup> La expresión aumentada de WT1 se ha asociado con pronóstico desfavorable en pacientes con NHL.<sup>245</sup> Por otro lado, la mutación en el gen *Tp53* está presente aproximadamente en el 50% de los tumores, alcanzando el 58,3% en el caso del BL.<sup>246</sup> La mutación en este gen se ha asociado con linfomas más agresivos<sup>247</sup> Un estudio previo ha revelado que la expresión de PCLP1 se encuentra también regulada positivamente por el factor de transcripción Sp1.<sup>155</sup> La proteína Sp1 juega un papel importante en varios procesos fisiológicos, que incluyen el ciclo celular, la regulación del control del crecimiento, la apoptosis, la angiogénesis, así como en la regulación del metabolismo de las células tumorales.<sup>248</sup> Alternativamente, ciertas modificaciones epigenéticas podrían alterar la expresión de PCLP1 en células de linfoma de células B. Varios estudios han demostrado la implicación de mecanismos epigenéticos en la linfomagénesis, entre los que destacan la desregulación de la metilación del ADN, las modificaciones postraduccionales de las histonas y los miRNAs.<sup>249</sup> En apoyo de esta hipótesis, la hipometilación del promotor de PCLP1 se ha asociado con la agresividad e invasión de las células de cáncer oral escamoso.<sup>238</sup> Por otro lado, se ha descrito que la metilación de los dinucleótidos CpG del promotor del gen *PODXL* reduce sustancialmente su actividad, disminuyendo de ese modo su expresión.<sup>155</sup> Un estudio reciente ha descrito la pérdida de miR-199b, un micro RNA que bloquea PCLP1 y el DDR1, en pacientes con leucemia mieloide aguda, lo que sugiere que la expresión deficiente de este miR podría conducir al aumento de la expresión de PCLP1 en pacientes con linfoma.<sup>222</sup> Además, se han asociado con la linfomagénesis los miRs: miR-155, miR-17-92, el grupo de miR-15a/16-1, miR-21, miR-34a y miR-125b.<sup>250</sup>

En el presente estudio se demuestra que PCLP1 induce la adhesión homotípica de células Raji mediante un proceso dependiente de integrinas  $\beta 2$ , lo que se corresponde con datos publicados en trabajos previos que describen la participación de integrinas en la adhesión inducida por PCLP1.<sup>251</sup> En estos estudios, la sobreexpresión de PCLP1 en células de ovario hámster Chino (CHO) potencia la adhesión celular a la fibronectina a



través de la integrina  $\alpha\beta3$  a la vez que aumenta la extensión y la migración celulares, mientras que la ausencia de PCLP1 ejerce un efecto inhibitorio en la adhesión. Hallazgos anteriores han demostrado que CD19, un importante activador del crecimiento neoplásico de células B impulsado por MYC a través de una vía independiente del BCR,<sup>252</sup> desencadena la adhesión homotípica en células B de CLL en parte a través de un proceso mediado por la interacción de integrinas  $\beta2$  con su ligando LFA1.<sup>253</sup> De manera similar, nuestros resultados muestran que los anticuerpos bloqueantes de la integrina LFA1 inhiben solo parcialmente la adhesión celular homotípica dependiente de PCLP1, lo que apunta a la intervención de moléculas de adhesión adicionales en este proceso. La adhesión celular remanente observada tras el bloqueo de las integrinas  $\beta2$  podría deberse a la interacción de PCLP1 con su ligando selectina L. Como se ha comentado anteriormente, PCLP1 expresada en HEV participa en el reclutamiento de los linfocitos a través de su unión con la selectina L.<sup>173</sup> Nuestros resultados muestran que el bloqueo de selectina L con un anticuerpo específico que impide la adhesión de los linfocitos a HEV es incapaz de inhibir la interacción homotípica inducida por PCLP1, sugiriendo que selectina L no participa en este proceso. No obstante, cabe la posibilidad de que PCLP1 se una a epítomos de selectina L diferentes al reconocido por el anticuerpo específico, por lo que no podemos descartar definitivamente la contribución de esta molécula. Por otra parte, quedan excluidos los otros ligandos de PCLP1 identificados hasta la fecha, selectina P y selectina E,<sup>209</sup> dado que no se expresan en células de linfomas B. Una posible alternativa es la participación de la integrina  $\alpha\beta3$  en la interacción homotípica inducida por PCLP1. En concordancia con esta hipótesis, se ha descrito que PCLP1 induce la interacción celular con las plaquetas mediante un mecanismo dependiente de las integrinas  $\alpha\beta3$  y  $\alpha5\beta3$ .<sup>166</sup> Se ha demostrado que  $\alpha\beta3$  activa señales de supervivencia y promueve la proliferación en linfomas de células T.<sup>254</sup> No obstante varios estudios han constatado la ausencia o baja expresión de  $\alpha\beta3$  en células Raji,<sup>255,256</sup> lo que excluye la participación de esta integrina en este proceso.

Se sabe que el contacto célula-célula aumenta la supervivencia y la proliferación,<sup>225,257,258</sup> por lo que la capacidad adherente que proporciona PCLP1 a la célula tumoral podría contribuir al crecimiento del tumor. En líneas celulares B y en células B normales, la adhesión mediada por la interacción de la integrina  $\beta2$  LFA-1 con su ligando ICAM-1 estimula la proliferación e inhibe la muerte celular apoptótica.<sup>225</sup> Asimismo, se ha demostrado que los estímulos de contacto pueden promover la

supervivencia de las células de FL mediante un mecanismo dependiente de ICAM-1.<sup>258</sup> Por otro lado, un estudio realizado en CLL ha constatado que la adhesión homotípica confiere protección a las células frente a la muerte espontánea, aunque a través de un mecanismo independiente del contacto directo célula-célula, lo que apunta a procesos autocrinos mediados por productos solubles como responsables de la supervivencia celular.<sup>257</sup> Basándonos en estos hechos, cabe la posibilidad de que la interacción de PCLP1 con su ligando active la afinidad de las integrinas  $\beta 2$  por ICAM-1, lo que desencadenaría señales intracelulares mediadas por integrinas que, conjuntamente con las generadas por PCLP1, promovería la proliferación y supervivencia de las células de linfoma B a la vez que estabilizaría la formación de los agregados.

Varios estudios han sugerido que la adhesión de células B malignas a las células del estroma o a superficies cubiertas de ligando pueden proteger a la célula tumoral de la apoptosis inducida por la quimioterapia.<sup>259</sup> Más concretamente, este fenómeno se produce cuando las células hematopoyéticas malignas se adhieren a la fibronectina, lo que eleva la expresión de p27Kip1,<sup>260</sup> un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (CDK), y que provoca el arresto en fase G1 y resistencia a fármacos que dañan el ADN, entre los que se encuentran los agentes alquilantes.<sup>259</sup> Este tipo de resistencia, denominada quimioresistencia mediada por adhesión celular, representa un obstáculo para el éxito del tratamiento de las neoplasias hematológicas.

Los datos obtenidos en este trabajo demuestran que la expresión forzada de PCLP1 aumenta la migración de las células de linfoma de células B hacia la quimiocina CXCL12. Nuestra observación concuerda con la evidencia reciente que revela un papel regulador de PCLP1 en la migración mediada por CXCR4 de las HSCs de ratón.<sup>261</sup> Según los autores del estudio, PCLP1 se asocia físicamente con CXCR4 y se distribuye unido a este receptor en dominios de membrana polarizados. Por ello, proponen que PCLP1, al igual que las sialomucinas relacionadas CD34, PSGL-1 y CD164, ejerce un papel activo en la migración de las células hematopoyéticas y en su reclutamiento a órganos distantes a través de la estabilización o el aumento de la señalización inducida por CXCR4. Dado que varios tipos de NHL expresan el receptor CXCR4,<sup>262</sup> nuestros resultados sugieren que PCLP1 podría dirigir la diseminación de las células malignas hacia los órganos que expresan su ligando CXCL12, incluyendo ganglios linfáticos, médula ósea y placas de Peyer. Además de regular la quimiotaxis mediada por CXCR4, se ha descrito que PCLP1 expresada en células pancreáticas metastásicas posee la capacidad de interactuar con

selectina E,<sup>209</sup> una molécula presente en el endotelio vascular y que participa en el reclutamiento de células metastásicas a órganos distantes.<sup>263</sup> Existe, por tanto, la posibilidad de que PCLP1 intervenga en la diseminación de las células de linfoma B a sitios extraganglionares a través de su interacción con selectina E.

En nuestro estudio observamos que PCLP1 se sitúa en la región del material pericentriolar, un componente del centrosoma necesario para el ensamblaje microtubular. En la interfase, etapa en la que el centrosoma se duplica, PCLP1 muestra una distribución asimétrica entre los dos centriolos, ubicándose preferentemente alrededor de uno de ellos. Durante la mitosis, a la vez que los dos centrosomas migran hacia los polos opuestos del huso mitótico para dirigir la correcta segregación cromosómica en las células hijas, PCLP1 se desplaza asociada a ellos, localizándose alrededor de cada uno de los centrosomas. Los centrosomas son orgánulos celulares que consisten en un par de conjuntos de microtúbulos en forma de barril denominados centriolos, embebidos en un material pericentriolar constituido por alrededor de 250 proteínas de interacción. Estas estructuras presentan una función esencial en las células eucariotas y sirven como centros organizadores de microtúbulos que controlan el número, la polaridad celular, la orientación de los microtúbulos del citoplasma y, en consecuencia, la formación del huso mitótico. Varios estudios han demostrado que las aberraciones en el centrosoma y la integridad del huso mitótico se asocian con una segregación cromosómica defectuosa y un genoma inestable y se ha comprobado que causan aneuploidias tanto en tumores sólidos como en hematológicos.<sup>264</sup> Así, diversos autores han puesto de manifiesto la relevancia de la integridad del centrosoma para el crecimiento celular normal.<sup>265,266</sup> Las células de BL muestran frecuentemente signos de infidelidad mitótica con ganancias y pérdidas de cromosomas enteros. Estas aberraciones cromosómicas provienen de divisiones celulares multipolares anormales tras errores en las duplicaciones del centrosoma y generación de husos supernumerarios.<sup>267</sup> Por tanto, cualquier defecto en la función de los centrosomas puede alterar la proliferación celular y la estabilidad cromosómica.<sup>264</sup>

En línea con nuestros resultados, se ha descrito que PCLP1 interactúa con la ezrina,<sup>150</sup> una proteína que conecta la membrana plasmática con el citoesqueleto de actina y es esencial para el posicionamiento del centrosoma.<sup>151</sup> Por otra lado, PCLP1 se une a la cortactina,<sup>151</sup> una proteína adaptadora que regula la polimerización de la actina y que media la separación del centrosoma dirigida por la actina en la fase de transición G2-M del ciclo celular. Además, PCLP1 activa Cdc42, un miembro de la familia Rho de

pequeñas GTPasas,<sup>268</sup> involucrado en la modulación de la dinámica de la actina, el ensamblaje de los microtúbulos, la posición del centrosoma, la orientación del huso mitótico y la segregación de los cromosomas.<sup>269</sup>

Recientemente se ha descrito la asociación de PCLP1 con Rab 35 GTPasa, una molécula que regula los endosomas de reciclaje.<sup>270</sup> Estas estructuras endocíticas se localizan en el compartimento pericentriolar durante la interfase y en los polos mitóticos durante la mitosis y juegan un papel crucial en la función de los centrosomas, incluyendo la formación del huso mitótico y la segregación cromosómica. Más específicamente, se ha descrito que los endosomas de reciclaje interactúan con los centriolos madre durante la interfase,<sup>271</sup> lo que se correlaciona con la localización asimétrica de PCLP1 en los centriolos observada en nuestro estudio. Estos hechos sugieren que PCLP1 podría participar en la dinámica del centrosoma través de su interacción con la ezrina, cortactina, Cdc42 y Rab35, influyendo de este modo en la orientación del huso mitótico y, por consiguiente, en la división celular. Por ello, sería de gran interés investigar si la alteración en la expresión de PCLP1 da lugar a una segregación cromosómica aberrante durante la mitosis, promoviendo finalmente la formación de tumores.

## **2. PCLP1 CONFIERE RESISTENCIA A DEXAMETASONA Y OBINUTUZUMAB EN CÉLULAS RAJI**

A pesar de que la tasa de supervivencia en pacientes con NHL ha aumentado de manera dramática durante los últimos años gracias a los avances en la inmunoterapia, muchos de los pacientes son refractarios a ellos o recaen tras el tratamiento.<sup>272</sup>

Una de las principales causas del fracaso de la terapia contra el cáncer es la adquisición de resistencia a múltiples fármacos, caracterizada por la ausencia de respuesta al efecto citotóxico de los diferentes fármacos.<sup>273</sup> Un mecanismo común de adquisición de quimioresistencia en los NHL consiste en el aumento de la activación de las vías de señalización antiapoptóticas PI3K/Akt y Erk1/2 MAPK, que actúan inhibiendo la muerte de las células tumorales inducida por fármacos.<sup>274-276</sup> En el caso del BL, se han propuesto varios mecanismos genéticos para explicar la adquisición de quimioresistencia, entre ellos, el aumento de la expresión de las proteínas de la familia de transportadores *ATP Binding Cassette* (ABC) y de enzimas reparadoras de ADN y la regulación de la apoptosis mediante la pérdida de *Tp53*.<sup>277</sup>

Como demuestran los resultados obtenidos en este trabajo, PCLP1 induce resistencia a dexametasona y  $H_2O_2$  en células Raji. Además, observamos que el tratamiento con dexametasona selecciona las células con mayor nivel de expresión de PCLP1. Son escasos los estudios que implican a PCLP1 en la resistencia a fármacos. En concordancia con nuestros resultados, un trabajo reciente demuestra que PCLP1 promueve la resistencia a cisplatino, un fármaco que tiene como principal diana el ADN,<sup>278</sup> en osteosarcoma a través de la disminución de la apoptosis inducida por este fármaco y mediante un mecanismo dependiente de PI3K.<sup>208</sup> Otro estudio realizado en carcinoma de células escamosas en la cavidad oral refiere que PCLP1 induce quimioresistencia a cisplatino a través de un mecanismo mediado por *BMI-1*.<sup>207</sup> *BMI-1* actúa como silenciador epigenético de varios genes, colabora con Myc en el desarrollo del linfoma murino<sup>279</sup> y causa quimioresistencia en los linfomas de células B.<sup>280</sup> Los autores del estudio demuestran que la sobreexpresión de PCLP1 en estas células aumenta la expresión de BMI-1 y reduce la apoptosis inducida por cisplatino. Por otra parte, se ha descrito que el potencial oncogénico de *BMI-1* se modula a través la fosforilación mediada por Akt.<sup>281</sup> Por tanto, PCLP1 podría inducir resistencia a otros fármacos con mecanismos de acción similares a cisplatino en linfomas a través de la activación de BMI-1.

La resistencia a los glucocorticoides es una de las características más habituales de los pacientes con ALL que recaen al tratamiento.<sup>282</sup> Así, los blastos de pacientes con ALL que recaen son significativamente más resistentes al tratamiento con prednisolona y dexametasona que los blastos presentes al diagnóstico,<sup>283</sup> y constituyen un marcador de pronóstico desfavorable. En los linfomas, la resistencia a los glucocorticoides sigue siendo uno de los mayores obstáculos en el éxito de la terapia farmacológica.<sup>284</sup> Entre los mecanismos responsables de la resistencia a la dexametasona destacan la insuficiencia de su ligando, mutaciones en el receptor de glucocorticoides y el aumento de la expresión de BCL2.<sup>285-287</sup> Varios estudios han mostrado la implicación de la activación de las vías de señalización PI3K y MAPK en la resistencia a glucocorticoides en una variedad de tumores, entre los que se incluyen leucemias y linfomas.<sup>288,289</sup> Así, la eliminación génica de MEK4, un miembro de la familia de la vía MAPK, aumenta la sensibilidad citotóxica, especialmente a la prednisolona, en células leucémicas mediante el aumentando de los niveles de los receptores de los glucocorticoides.<sup>290</sup> Por tanto, existe la posibilidad de que la resistencia a dexametasona inducida por PCLP1 esté mediada por la activación de las vías de PI3K/Akt y MAPK.

Las células tumorales pueden asimismo adquirir resistencia a fármacos a través del aumento de los niveles de expresión de la familia de transportadores ABC, que actúan incrementando el flujo activo de varios fármacos quimioterapéuticos hacia el exterior, causando resistencia a múltiples fármacos no relacionados estructuralmente. La resistencia a múltiples fármacos constituye el principal obstáculo para el éxito de la quimioterapia en linfomas de células B.<sup>273</sup> Existen evidencias de que la activación de la ruta PI3k/Akt puede influir en la resistencia a múltiples fármacos y en la expresión de transportadores ABC en linfomas.<sup>291,292</sup> Aunque en nuestro estudio no hemos abordado el efecto de PCLP1 sobre la expresión de estos transportadores, estos hechos sugieren que PCLP1 podría alterar su expresión a través de la activación de la ruta PI3K/Akt.

En el presente trabajo demostramos que la expresión de PCLP1 en células Raji disminuye la muerte celular inducida por el anticuerpo monoclonal anti-CD20 de tipo II obinutuzumab. Alduaij y colaboradores sostienen que obinutuzumab induce la localización de la actina en la zona de contacto intercelular, un fenómeno que promueve la adhesión celular homotípica. Durante este proceso, los lisosomas se dirigen hacia la zona de contacto, lo que provoca la rotura de la membrana lisosomal y la liberación de su contenido hacia el citosol, desencadenando de este modo la muerte celular no apoptótica.<sup>82</sup> Dado que PCLP1 altera la distribución de los filamentos de actina, PCLP1 podría inhibir la muerte celular inducida por obinutuzumab mediante la modulación de la reorganización del citoesqueleto de actina e impidiendo el tráfico lisosomal hacia la zona de contacto intercelular.<sup>153</sup> En línea con estos resultados, un estudio previo realizado en nuestro laboratorio en células de cáncer de mama reveló que PCLP1 confiere resistencia a la muerte mediada por células NK y proponía como posible mecanismo la alteración de la organización del citoesqueleto en la zona de contacto de las células tumorales con las células NK inducida por la expresión de PCLP1, un proceso que interferiría con la lisis tumoral.<sup>293</sup>

Un ensayo clínico multicéntrico en fase III ha mostrado que el tratamiento con obinutuzumab resulta efectivo en aquellos pacientes con NHL indolente refractario a rituximab.<sup>294</sup> Si bien obinutuzumab es uno de los anticuerpos monoclonales anti-CD20 más prometedores para el tratamiento de estas enfermedades, nuestros resultados parecen indicar que la adquisición de resistencia a este fármaco inducida por PCLP1 conduciría a una disminución de su eficacia y, como consecuencia, a una reducción de la supervivencia de los pacientes. Una de las ventajas que presentan los anticuerpos monoclonales de tipo II es la ausencia de la internalización de CD20, que se traduce en la

disminución de resistencia a estos fármacos.<sup>81</sup> En nuestro trabajo hemos comprobado que la expresión de PCLP1 provoca una disminución en la expresión de la molécula CD20, lo que podría explicar la reducción de la muerte directa producida por obinutuzumab en las células Raji que sobreexpresan PCLP1.

La función de PCLP1 mostrada en nuestro estudio presenta similitud con la atribuida previamente a varias moléculas de membrana expresadas en linfomas de células B. Como ejemplo, B7H6, una proteína perteneciente a la familia B7 y expresada en células tumorales, especialmente en neoplasias hematológicas, posee la capacidad de inducir resistencia a dexametasona y promover la proliferación, migración y formación de colonias en la línea celular CA46 de BL.<sup>295</sup> Asimismo, un estudio realizado en pacientes de ALL ha demostrado que la proteína 1 epitelial de membrana (EMP1), implicada en la unión celular y asociada con el cáncer de mama, induce resistencia a prednisolona, proliferación, migración y adhesión celulares.<sup>296</sup>

En conjunto, estas observaciones sugieren que PCLP1 podría constituir un marcador de resistencia a dexametasona y obinutuzumab en linfomas de células B, así como una nueva diana para el tratamiento de estas enfermedades

### **3. PCLP1 PROMUEVE LA REPROGRAMACIÓN METABÓLICA EN CÉLULAS RAJI**

Según nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que revela el papel de PCLP1 en la reprogramación metabólica de las células tumorales. Hemos demostrado que PCLP1 induce la adicción a la glutamina y aumenta la proliferación celular bajo condiciones de privación de glucosa en la línea celular Raji, proveniente de células de LB. En consonancia con esta observación, un estudio previo ha mostrado la función clave de la glutamina en la supervivencia y proliferación de células de BL en ausencia de glucosa, tanto en condiciones aeróbicas como en hipoxia, a través de un proceso dependiente de MYC.<sup>232</sup>

Un estudio previo revela que PCLP1 forma un complejo estable con el GLUT3 en células madre pluripotentes malignas.<sup>297</sup> GLUT3 se expresa en células con alta demanda energética, como las células tumorales,<sup>298,299</sup> incluyendo los linfomas de Hodgkin y NHL.<sup>300</sup> Se ha sugerido que una de las funciones de PCLP1 podría consistir en la regulación de la expresión de estos transportadores en la membrana de las células tumorales,<sup>297</sup> lo que estaría en desacuerdo con la ausencia de dependencia de glucosa que

presenta la proliferación inducida por PCLP1 observada en nuestro estudio. No obstante, y en línea con nuestros resultados, otro estudio ha demostrado que la expresión de GLUT3, a diferencia de GLUT1, no se asocia con la captación de glucosa en pacientes con linfoma.<sup>300</sup>

En cuanto a los mecanismos moleculares involucrados en la glutaminólisis inducida por PCLP1, PCLP1 podría incrementar la dependencia de la glutamina mediante la activación de MAPK. Como ya se ha comentado anteriormente, esta vía de señalización aumenta principalmente la captación de glucosa y la glucólisis en células tumorales a través de la regulación de enzimas metabólicas, aunque también se ha descrito su participación en la glutaminólisis.<sup>301</sup> Existe asimismo la posibilidad de que PCLP1 promueva la glutaminólisis a través de la activación de GTPasas de la familia Rho (Rho-GTPasas). Un estudio previo revela que PCLP1 posee la capacidad de activar las Rho-GTPasas Cdc42 y Rac1 en células de cáncer de mama, promoviendo de este modo la metástasis y la formación de invadopodios.<sup>302</sup> Las Rho-GTPasas se encuentran involucradas en la adquisición de todas las características distintivas de las células tumorales, incluyendo la proliferación aberrante, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis, invasión y metástasis,<sup>303</sup> gran parte de ellas compartidas por células tumorales que expresan PCLP1. En apoyo de la hipótesis señalada, un estudio previo ha revelado la capacidad de las Rho-GTPasas de inducir la transformación maligna de fibroblastos, así como el crecimiento de células de linfoma B y de células de cáncer de mama, a través del aumento del metabolismo de la glutamina.<sup>304</sup> Asimismo, los autores demuestran que la transformación de las células de cáncer de mama inducida por las Rho-GTPasas es bloqueada por el inhibidor de la GLS compuesto 968, lo que estría en consonancia con los resultados de nuestro estudio que muestran el efecto inhibitorio de este compuesto sobre la proliferación celular inducida por PCLP1. Estos hechos sugieren que PCLP1 podría potenciar el metabolismo de la glutamina a través de la activación de Cdc42 y Rac1 en células Raji.

En este sentido, se ha descrito que la vía de señalización PI3K/Akt promueve la supervivencia en condiciones limitantes de glucosa provocadas por el elevado nivel de consumo de nutrientes y la deficiente vasculatura del tumor en crecimiento.<sup>305</sup> En un estudio realizado en células HeLa de cáncer cervical se ha observado que la privación prolongada de glucosa induce la activación tanto de Akt como de los miembros de la familia MAPK, incluyendo Erk1/2 y p38MAPK.<sup>306</sup> Por otro lado, nuestros resultados muestran un incremento en la expresión de PCLP1 en respuesta a bajas concentraciones



de glucosa en células Raji, en concordancia con estudios previos realizados en células renales.<sup>233,234</sup>

Nuestros resultados sugieren que PCLP1 podría adquirir especial relevancia en tumores con elevada tasa de crecimiento y gran tamaño, como el LB. Así, la disminución de la concentración de glucosa en estos tumores incrementaría la expresión de PCLP1, lo que a su vez induciría la activación de las vías PI3K/Akt y MAPK, aumentando de este modo la supervivencia celular. Asimismo, PCLP1, a través de la activación de PI3K/Akt y MAPK y las moléculas de la familia de las Rho-GTPasas, incrementaría la captación de glutamina y la glutaminólisis para satisfacer las necesidades biosintéticas del tumor y mantener el equilibrio bioenergético y redox.

La glutaminólisis se encuentra relacionada directamente con el mantenimiento de los niveles celulares ROS,<sup>113</sup> lo que es crucial para el crecimiento y supervivencia celulares. Esta vía metabólica conduce a la producción de glutatión y NADPH, los principales agentes reductores de las células.<sup>113</sup> Además, el fumarato derivado de la glutamina ha demostrado ser importante en el control del estrés oxidativo a través de diferentes mecanismos, los que incluyen el aumento de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa 1 y la activación de señales antioxidantes como Nrf2.<sup>112</sup> Estos hechos sugieren que la adicción a la glutamina inducida por la expresión de PCLP1 podría generar moléculas reductoras que neutralizaran los ROS, confiriendo así a las células mayor resistencia a la muerte por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y dexametasona, tal y como hemos observado en nuestro trabajo. Por otro lado, el aumento de la glutaminólisis tiene como consecuencia la producción de amonio, con capacidad de neutralizar el pH ácido resultante de la actividad glucolítica.<sup>307</sup> En nuestro estudio observamos una disminución de la acidosis extracelular en respuesta al aumento de la expresión de PCLP1, lo que se encuentra en consonancia con la adicción a la glutamina generada por esta proteína. Esta peculiar capacidad de regular el pH tumoral a través de la glutaminólisis ha sido recientemente descrita en células tumorales de cáncer de mama y atribuida a la proteína *C-terminal-binding protein* (CtBP), una molécula involucrada en la transformación, progresión y metástasis tumorales a través de la regulación transcripcional de genes relacionados con la estabilidad genómica, el proceso EMT y el metabolismo del cáncer.<sup>307</sup> Varios estudios han demostrado que la acidificación del microambiente proporciona ciertas ventajas a las células tumorales,<sup>308</sup> incluyendo una capacidad invasiva superior y resistencia a la quimioterapia, por lo que la expresión PCLP1 representaría un obstáculo para estas células. No obstante, la acidificación del medio disminuye el crecimiento celular,<sup>309</sup> de

modo que la regulación del pH mediada por PCLP1 favorecería la proliferación de las células tumorales.

Varios estudios han demostrado que las células hipóxicas utilizan la glutamina como principal sustrato para la lipogénesis, mientras que la contribución de la glucosa es menor en estas condiciones,<sup>310,311</sup> lo que sugiere un papel de PCLP1 en el metabolismo tumoral en condiciones hipóxicas. La hipoxia consiste en la disminución de los niveles de oxígeno en la zona interior del tumor en crecimiento debido a su limitada difusión y al suministro deficiente de sangre, lo que estimula la expresión de HIF-1 $\alpha$ , un factor de transcripción que actúa como principal mediador de la respuesta a la hipoxia.<sup>312</sup> HIF-1 $\alpha$  promueve la acumulación de lípidos en las células tumorales y ejerce una función esencial en la reprogramación metabólica.<sup>312</sup> Aunque los experimentos de nuestro trabajo se han realizado en condiciones de normoxia, es posible que la formación de agregados celulares inducida por PCLP1 disminuya la difusión de oxígeno hacia las células del interior y estimule de este modo la expresión de HIF-1 $\alpha$  y la lipogénesis a partir de la glutamina. Por otra parte, la expresión de HIF-1 $\alpha$  bajo condiciones de hipoxia está regulada por varias vías de señalización, incluidas PI3k/Akt y  $\beta$ -catenina.<sup>312</sup> En este sentido, un trabajo reciente demuestra que PCLP1 promueve la proliferación e invasión de células de glioblastoma a través de la activación de la vía de señalización  $\beta$ -catenina.<sup>313</sup> Estas observaciones sugieren que PCLP1 podría promover la lipogénesis a partir de glutamina mediante la inducción de la expresión de HIF-1  $\alpha$  a través de la activación de las vías PI3k/Akt y  $\beta$ -catenina.

Este estudio revela un papel de PCLP1 en la formación de vacuolas lipídicas en células Raji y Jurkat, lo que sugiere la participación de esta proteína en la acumulación de las vacuolas lipídicas citosólicas que caracterizan morfológicamente a las células de BL. Nuestros resultados han demostrado asimismo que la proliferación celular inducida por PCLP1 es dependiente de la actividad de FASN, una enzima necesaria para la síntesis de ácidos grasos *de novo* o endógenos y cuya expresión y activación se han descrito previamente en NHL.<sup>314</sup>

El aumento de FASN se ha asociado con la metástasis tumoral y quimioresistencia y con una disminución en la supervivencia de los pacientes en varios tumores.<sup>315</sup> Como ya se ha comentado anteriormente, la quimioresistencia asociada al aumento de FASN se ha atribuido a la rigidez de la membrana lipídica que confieren los fosfolípidos saturados y monoinsaturados sintetizados a través de esta vía. Por otro lado, dado que los lípidos

saturados y monoinsaturados son menos susceptibles a la peroxidación lipídica que los lípidos poliinsaturados,<sup>125</sup> se ha propuesto que las células tumorales que presentan un aumento de FASN son más resistentes al estrés oxidativo generados por los fármacos.<sup>125</sup> Estos hechos sugieren que el aumento de resistencia a dexametasona y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducida por PCLP1 que muestra nuestro estudio podría explicarse en parte por el incremento en la síntesis de ácidos grasos endógenos asociada a la activación de FASN.

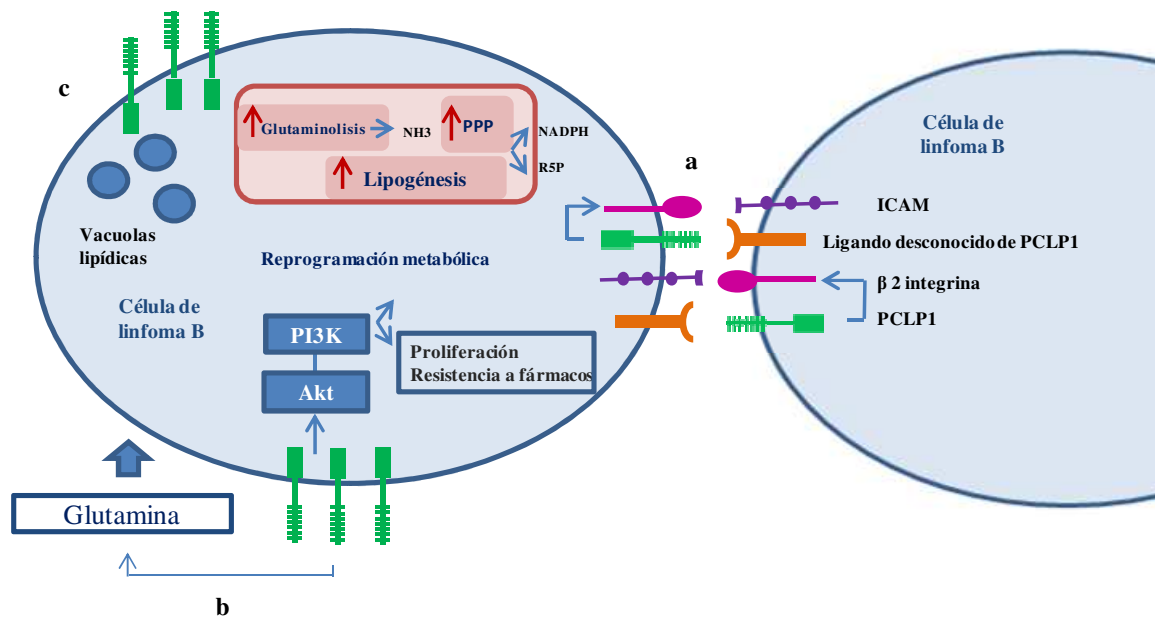
Nuestro trabajo demuestra que PPP presenta un papel crítico en la proliferación inducida por PCLP1, lo que sugiere que PCLP1 potencia el flujo metabólico a través de esta ruta. En concordancia con el fenotipo maligno de las células que expresan altos niveles de PCLP1, el aumento del flujo de PPP promueve la supervivencia, proliferación, la metástasis y la quimioresistencia tumoral y se asocia a tipos de tumores más agresivos.<sup>236</sup> El aumento de PPP conllevaría la generación de R5P necesaria para la síntesis de nucleótidos que permitiría la rápida proliferación de las células que expresan PCLP1. Por otra parte, PPP proporciona a las células NADPH necesaria para la neutralización de ROS y la biosíntesis de lípidos,<sup>236</sup> lo que podría explicar el aumento de la resistencia a dexametasona y la formación de vacuolas lipídicas inducido por PCLP1 observado en nuestro estudio. Se ha propuesto que la enzima G6PD de esta ruta podría estar regulada a nivel transcripcional por la vía de señalización PI3K/Akt, aunque los mecanismos subyacentes aún no se han caracterizado.<sup>316</sup> Por tanto, PCLP1 podría potenciar el flujo de PPP aumentando la expresión de G6PD a través de la activación de PI3K/Akt. En apoyo de esta hipótesis, varios tumores, entre ellos DLBCL, muestran un aumento en el flujo de PPP y sobreexpresión de G6PD, a través de un mecanismo mediado por PI3K/Akt.<sup>95</sup>

En resumen, nuestros resultados sugieren que las vías metabólicas implicadas en el aumento de la proliferación celular inducido por PCLP1 podrían constituir potenciales dianas terapéuticas en linfomas con elevada expresión de esta proteína.

#### **4. CONSIDERACIONES FINALES**

El presente trabajo muestra por primera vez el aumento de la expresión de PCLP1 en linfocitos B malignos de algunos pacientes diagnosticados de linfoma. Asimismo, los resultados demuestran que PCLP1 expresado en líneas celulares de BL estimula la reprogramación metabólica e induce un aumento en la proliferación celular, formación de colonias, migración y adhesión celular, a la vez que dota a las células de una aumentada

resistencia tanto a dexametasona como a obinutuzumab. En conclusión, PCLP1 contribuye al desarrollo del fenotipo maligno en estas células tumorales de linfoma B. La **Figura 39** muestra un modelo del mecanismo de linfomagénesis mediado por PCLP1.



**Figura 39. Modelo de la posible función de PCLP1 en células de linfoma de células B.** (a) La unión de PCLP1 a su ligando podría activar las integrinas  $\beta 2$ , lo que induciría su interacción con ICAM-1 y, como consecuencia, la adhesión célula-célula. (b) PCLP1 aumenta la adición a la glutamina, la glutaminólisis, la PPP y la síntesis *de novo* de lípidos, posiblemente a través de la activación de PI3K/Akt y ERK  $\frac{1}{2}$ , confiriendo de este modo a la célula una mayor capacidad de proliferación, resistencia a fármacos y neutralización del estrés oxidativo. (c) PCLP1 induce la formación de vacuolas lipídicas que servirían como reserva energética.

Aunque se ha logrado un significativo progreso en la terapia contra el cáncer mediante abordajes convencionales como la cirugía, la quimioterapia, la radiación o el trasplante de médula ósea, aún existe un número significativo de pacientes que recaen tras estos tratamientos. Actualmente se ha logrado un significativo progreso en el desarrollo de terapias inmunológicas que inhiben la progresión tumoral y previenen la metástasis de tumores hematológicos. La identificación de moléculas involucradas en la progresión tumoral permitirá el diseño de anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra esa diana molecular con la finalidad de erradicar el tumor.

Debido a que PCLP1 se expresa tanto en células tumorales como en células normales, los anticuerpos frente a esta proteína podrían resultar inapropiados como agentes terapéuticos por su toxicidad. No obstante, la expresión de glucoformas de PCLP1 específicas de tumor hace factible el desarrollo de anticuerpos que bloqueen la proliferación y metástasis mediadas por PCLP1 a la vez que eviten la aparición de efectos

secundarios adversos. En este sentido, un trabajo publicado recientemente describe el desarrollo de un anticuerpo frente a PCLP1 específica de tumores. Este anticuerpo es capaz de inhibir el crecimiento y la progresión metastásica de células tumorales de cáncer de mama humano sin causar toxicidad en un ensayo preclínico realizado en ratones.<sup>237</sup> Estos resultados sugieren que su uso en humanos podría prevenir el desarrollo de tumores que expresan PCLP1. Por otro lado, la evaluación de la expresión de esta proteína en carcinomas hematológicos podría proporcionar un rápido diagnóstico y un marcador pronóstico en pacientes con estos tipos de tumores.



## **VI. CONCLUSIONES**





## Conclusiones

1. Las células malignas de algunos pacientes con NHL de células B expresan niveles más elevados de PCLP1 que los linfocitos B normales del mismo paciente.
2. PCLP1 se expresa en la línea celular Raji de linfoma de Burkitt, tanto en la membrana plasmática como en la región pericentriolar, lo que sugiere un papel de esta proteína en el proceso de división celular.
3. PCLP1 incrementa la proliferación, capacidad de formación de colonias, y migración celular en células Raji.
4. PCLP1 promueve la adhesión intercelular a través de un mecanismo dependiente de integrinas  $\beta 2$ .
5. PCLP1 induce resistencia al tratamiento con dexametasona y el anticuerpo anti-CD20 obinutuzumab en células Raji.
6. PCLP1 aumenta la producción de vacuolas lipídicas, así como la dependencia a la glutaminólisis, la vía de las pentosas fosfato (PPP) y la síntesis *de novo* de ácidos grasos en células Raji, lo que demuestra la participación de esta proteína en la reprogramación metabólica.
7. Como conclusión final, los resultados de esta tesis sugieren que PCLP1 podría promover la linfomagénesis de células B y, por tanto, representar un marcador pronóstico y una nueva diana terapéutica en linfomas que expresan esta proteína.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



1. Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity*. 1995;3(4):459-473.
2. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S3-23.
3. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:541-570.
4. Abdou NL, Alavi JB, Abdou NI. Human bone marrow lymphocytes: B and T cell precursors and subpopulations. *Blood*. 1976;47(3):423-430.
5. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity*. 2007;27(2):190-202.
6. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med*. 2010;362(15):1417-1429.
7. Somasundaram R, Prasad MA, Ungerback J, Sigvardsson M. Transcription factor networks in B-cell differentiation link development to acute lymphoid leukemia. *Blood*. 2015;126(2):144-152.
8. Vaque JP, Martinez N, Batlle-Lopez A, et al. B-cell lymphoma mutations: improving diagnostics and enabling targeted therapies. *Haematologica*. 2014;99(2):222-231.
9. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(12):920-932.
10. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 1999;341(20):1520-1529.
11. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*. 2008;112(12):4384-4399.
12. Perry AM, Diebold J, Nathwani BN, et al. Non-Hodgkin lymphoma in the developing world: review of 4539 cases from the International Non-Hodgkin Lymphoma Classification Project. *Haematologica*. 2016.
13. Fisher SG, Fisher RI. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*. 2004;23(38):6524-6534.

14. Chihara D, Nastoupil LJ, Williams JN, Lee P, Koff JL, Flowers CR. New insights into the epidemiology of non-Hodgkin lymphoma and implications for therapy. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2015;15(5):531-544.
15. Sandlund JT, Downing JR, Crist WM. Non-Hodgkin's lymphoma in childhood. *N Engl J Med.* 1996;334(19):1238-1248.
16. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res.* 1971;31(11):1860-1861.
17. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol.* 1999;10(12):1419-1432.
18. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016;127(20):2375-2390.
19. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood.* 1994;84(5):1361-1392.
20. Board PDQATE. Adult Non-Hodgkin Lymphoma Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version. In: *PDQ Cancer Information Summaries.* Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002.
21. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet.* 2012;380(9844):848-857.
22. Lopez-Guillermo A, Cabanillas F, McDonnell TI, et al. Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma. *Blood.* 1999;93(9):3081-3087.
23. Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, et al. Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol.* 2003;30(2):110-115.

24. Leleu X, Gay J, Roccaro AM, et al. Update on therapeutic options in Waldenstrom macroglobulinemia. *Eur J Haematol.* 2009;82(1):1-12.
25. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood.* 2006;107(1):265-276.
26. Getta BM, Park JH, Tallman MS. Hairy cell leukemia: Past, present and future. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2015;28(4):269-272.
27. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood.* 2008;111(12):5446-5456.
28. Anaissie EJ, Kontoyiannis DP, O'Brien S, et al. Infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine. *Ann Intern Med.* 1998;129(7):559-566.
29. Ghia P, Caligaris-Cappio F. The origin of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol.* 2006;33(2):150-156.
30. Yustein JT, Dang CV. Biology and treatment of Burkitt's lymphoma. *Curr Opin Hematol.* 2007;14(4):375-381.
31. Piccaluga PP, De Falco G, Kustagi M, et al. Gene expression analysis uncovers similarity and differences among Burkitt lymphoma subtypes. *Blood.* 2011;117(13):3596-3608.
32. Subar M, Neri A, Inghirami G, Knowles DM, Dalla-Favera R. Frequent c-myc oncogene activation and infrequent presence of Epstein-Barr virus genome in AIDS-associated lymphoma. *Blood.* 1988;72(2):667-671.
33. Drotar ME, Silva S, Barone E, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 and Myc cooperate in lymphomagenesis. *Int J Cancer.* 2003;106(3):388-395.
34. Pope JH, Horne MK, Scott W. Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer.* 1968;3(6):857-866.

35. Delgado MD, Leon J. Myc roles in hematopoiesis and leukemia. *Genes Cancer*. 2010;1(6):605-616.
36. Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. 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*. 1982;79(24):7824-7827.
37. Slack GW, Gascoyne RD. MYC and aggressive B-cell lymphomas. *Adv Anat Pathol*. 2011;18(3):219-228.
38. Schmitz R, Young RM, Ceribelli M, et al. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature*. 2012;490(7418):116-120.
39. Drilenburg P, Pals ST. Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood*. 2000;95(6):1900-1910.
40. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69(1):11-25.
41. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest*. 1993;91(2):379-387.
42. Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol*. 1988;6:381-405.
43. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*. 1991;251(5000):1451-1455.
44. Takeichi M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*. 1988;102(4):639-655.
45. Ladedá V, Aguirre Ghiso JA, Bal de Kier Joffe E. Function and expression of CD44 during spreading, migration, and invasion of murine carcinoma cells. *Exp Cell Res*. 1998;242(2):515-527.
46. Gallatin M, St John TP, Siegelman M, Reichert R, Butcher EC, Weissman IL. Lymphocyte homing receptors. *Cell*. 1986;44(5):673-680.
47. Pals ST, Drilenburg P, Radaszkiewicz T, Mantén-Horst E. Adhesion molecules in the dissemination of non-Hodgkin's lymphomas. *Acta Haematol*. 1997;97(1-2):73-80.



48. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996;382(6592):635-638.
49. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med*. 2005;201(8):1307-1318.
50. O'Callaghan K, Lee L, Nguyen N, et al. Targeting CXCR4 with cell-penetrating pepducins in lymphoma and lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119(7):1717-1725.
51. Arai J, Yasukawa M, Yakushijin Y, Miyazaki T, Fujita S. Stromal cells in lymph nodes attract B-lymphoma cells via production of stromal cell-derived factor-1. *Eur J Haematol*. 2000;64(5):323-332.
52. Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand AV. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol*. 1996;92(1):97-103.
53. Konopleva M, Konoplev S, Hu W, Zaritskey AY, Afanasiev BV, Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia*. 2002;16(9):1713-1724.
54. Cojoc M, Peitzsch C, Trautmann F, Polishchuk L, Telegeev GD, Dubrovskaya A. Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *Onco Targets Ther*. 2013;6:1347-1361.
55. Santoro A, Balzarotti M, Castagna L. Intensified CHOP in non-Hodgkin's lymphoma: what we know and what we need to know. *Ann Oncol*. 1999;10(8):875-876.
56. Choe H, Ruan J. Next Generation of Targeted Molecules for Non-Hodgkin Lymphomas: Small-Molecule Inhibitors of Intracellular Targets and Signaling Pathways. *Oncology (Williston Park)*. 2016;30(9).
57. Liu T, Fei Z, Gangavarapu KJ, et al. Interleukin-6 and JAK2/STAT3 signaling mediate the reversion of dexamethasone resistance after dexamethasone withdrawal in 7TD1 multiple myeloma cells. *Leuk Res*. 2013;37(10):1322-1328.

58. Conklin KA. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr Cancer Ther.* 2004;3(4):294-300.
59. Tome ME, Jaramillo MC, Briehl MM. Hydrogen peroxide signaling is required for glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoma cells. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(11):2048-2059.
60. Lopez-Lazaro M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett.* 2007;252(1):1-8.
61. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res.* 2000;256(1):42-49.
62. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis.* 2000;5(5):415-418.
63. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 1991;51(3):794-798.
64. Questionable methods of cancer management: hydrogen peroxide and other 'hyperoxygenation' therapies. *CA Cancer J Clin.* 1993;43(1):47-56.
65. Davis TA, Czerwinski DK, Levy R. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clin Cancer Res.* 1999;5(3):611-615.
66. Jeha S, Behm F, Pei D, et al. Prognostic significance of CD20 expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2006;108(10):3302-3304.
67. Dalle S, Reslan L, Besseyre de Horts T, et al. Preclinical studies on the mechanism of action and the anti-lymphoma activity of the novel anti-CD20 antibody GA101. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(1):178-185.
68. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1997;90(6):2188-2195.
69. Ujjani C, Cheson BD. The current status and future impact of targeted therapies in non-Hodgkin lymphoma. *Expert Rev Hematol.* 2013;6(2):191-202; quiz 203.

70. Cheson BD, Leonard JP. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2008;359(6):613-626.
71. Rezvani AR, Maloney DG. Rituximab resistance. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011;24(2):203-216.
72. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2003;21(21):3940-3947.
73. Macor P, Tripodo C, Zorzet S, et al. In vivo targeting of human neutralizing antibodies against CD55 and CD59 to lymphoma cells increases the antitumor activity of rituximab. *Cancer Res.* 2007;67(21):10556-10563.
74. Kennedy GA, Tey SK, Cobcroft R, et al. Incidence and nature of CD20-negative relapses following rituximab therapy in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a retrospective review. *Br J Haematol.* 2002;119(2):412-416.
75. Terui Y, Mishima Y, Sugimura N, et al. Identification of CD20 C-terminal deletion mutations associated with loss of CD20 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(7):2523-2530.
76. Jazirehi AR, Vega MI, Bonavida B. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res.* 2007;67(3):1270-1281.
77. Burger JA, Gandhi V. The lymphatic tissue microenvironments in chronic lymphocytic leukemia: in vitro models and the significance of CD40-CD154 interactions. In: *Blood.* Vol 114. United States 2009:2560-2561; author reply 2561-2562.
78. Bonavida B. Postulated mechanisms of resistance of B-cell non-Hodgkin lymphoma to rituximab treatment regimens: strategies to overcome resistance. *Semin Oncol.* 2014;41(5):667-677.
79. Illidge T, Klein C, Sehn LH, Davies A, Salles G, Cartron G. Obinutuzumab in hematologic malignancies: lessons learned to date. *Cancer Treat Rev.* 2015;41(9):784-792.

80. Mossner E, Brunker P, Moser S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*. 2010;115(22):4393-4402.
81. Klein C, Lammens A, Schafer W, et al. Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *MAbs*. 2013;5(1):22-33.
82. Alduaij W, Ivanov A, Honeychurch J, et al. Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood*. 2011;117(17):4519-4529.
83. Honeychurch J, Alduaij W, Azizyan M, et al. Antibody-induced nonapoptotic cell death in human lymphoma and leukemia cells is mediated through a novel reactive oxygen species-dependent pathway. *Blood*. 2012;119(15):3523-3533.
84. Ratner M. Genentech's glyco-engineered antibody to succeed Rituxan. In: *Nat Biotechnol*. Vol 32. United States 2014:6-7.
85. Cragg MS, Glennie MJ. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood*. 2004;103(7):2738-2743.
86. Goede V, Fischer K, Busch R, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*. 2014;370(12):1101-1110.
87. Smits NC, Sentman CL. Bispecific T-Cell Engagers (BiTEs) as Treatment of B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2016;34(10):1131-1133.
88. Miller BC, Maus MV. CD19-Targeted CAR T Cells: A New Tool in the Fight against B Cell Malignancies. *Oncol Res Treat*. 2015;38(12):683-690.
89. Batlevi CL, Matsuki E, Brentjens RJ, Younes A. Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(1):25-40.
90. Munoz-Pinedo C, El Mjiyad N, Ricci JE. Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell Death Dis*. 2012;3:e248.
91. Mullen AR, DeBerardinis RJ. Genetically-defined metabolic reprogramming in cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(11):552-559.

92. Lukey MJ, Wilson KF, Cerione RA. Therapeutic strategies impacting cancer cell glutamine metabolism. *Future Med Chem.* 2013;5(14):1685-1700.
93. Daye D, Wellen KE. Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23(4):362-369.
94. Dang CV. Links between metabolism and cancer. *Genes Dev.* 2012;26(9):877-890.
95. Jiang P, Du W, Wu M. Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein Cell.* 2014;5(8):592-602.
96. Santos CR, Schulze A. Lipid metabolism in cancer. *Febs j.* 2012;279(15):2610-2623.
97. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309-314.
98. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science.* 1956;124(3215):269-270.
99. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:441-464.
100. Phan LM, Yeung SC, Lee MH. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biol Med.* 2014;11(1):1-19.
101. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009;324(5930):1029-1033.
102. Aykin-Burns N, Ahmad IM, Zhu Y, Oberley LW, Spitz DR. Increased levels of superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. *Biochem J.* 2009;418(1):29-37.
103. Spitz DR, Sim JE, Ridnour LA, Galoforo SS, Lee YJ. Glucose deprivation-induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism? *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:349-362.
104. Jelluma N, Yang X, Stokoe D, Evan GI, Dansen TB, Haas-Kogan DA. Glucose withdrawal induces oxidative stress followed by apoptosis in glioblastoma cells but not in normal human astrocytes. *Mol Cancer Res.* 2006;4(5):319-330.

105. Lin X, Zhang F, Bradbury CM, et al. 2-Deoxy-D-glucose-induced cytotoxicity and radiosensitization in tumor cells is mediated via disruptions in thiol metabolism. *Cancer Res.* 2003;63(12):3413-3417.
106. Simons AL, Ahmad IM, Mattson DM, Dornfeld KJ, Spitz DR. 2-Deoxy-D-glucose combined with cisplatin enhances cytotoxicity via metabolic oxidative stress in human head and neck cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67(7):3364-3370.
107. Maschek G, Savaraj N, Priebe W, et al. 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer Res.* 2004;64(1):31-34.
108. DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene.* 2010;29(3):313-324.
109. Hensley CT, Wasti AT, DeBerardinis RJ. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J Clin Invest.* 2013;123(9):3678-3684.
110. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(8):427-433.
111. Zhang Y, Xu W, Liu H, Li J. Therapeutic options in peripheral T cell lymphoma. *J Hematol Oncol.* 2016;9(1):37.
112. Jin L, Alesi GN, Kang S. Glutaminolysis as a target for cancer therapy. *Oncogene.* 2016;35(28):3619-3625.
113. Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(10):619-634.
114. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(49):19345-19350.
115. Jin L, Li D, Alesi GN, et al. Glutamate dehydrogenase 1 signals through antioxidant glutathione peroxidase 1 to regulate redox homeostasis and tumor growth. *Cancer Cell.* 2015;27(2):257-270.

116. Adam J, Hatipoglu E, O'Flaherty L, et al. Renal cyst formation in Fh1-deficient mice is independent of the Hif/Phd pathway: roles for fumarate in KEAP1 succination and Nrf2 signaling. *Cancer Cell*. 2011;20(4):524-537.
117. Chen L, Cui H. Targeting Glutamine Induces Apoptosis: A Cancer Therapy Approach. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):22830-22855.
118. Szeliga M, Obara-Michlewska M. Glutamine in neoplastic cells: focus on the expression and roles of glutaminases. *Neurochem Int*. 2009;55(1-3):71-75.
119. Riganti C, Gazzano E, Polimeni M, Aldieri E, Ghigo D. The pentose phosphate pathway: an antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radic Biol Med*. 2012;53(3):421-436.
120. Meadows AL, Kong B, Berdichevsky M, et al. Metabolic and morphological differences between rapidly proliferating cancerous and normal breast epithelial cells. *Biotechnol Prog*. 2008;24(2):334-341.
121. Tsouko E, Khan AS, White MA, et al. Regulation of the pentose phosphate pathway by an androgen receptor-mTOR-mediated mechanism and its role in prostate cancer cell growth. *Oncogenesis*. 2014;3:e103.
122. Kuhajda FP. Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res*. 2006;66(12):5977-5980.
123. Baenke F, Peck B, Miess H, Schulze A. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis Model Mech*. 2013;6(6):1353-1363.
124. Parks SK, Chiche J, Pouyssegur J. pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J Cell Physiol*. 2011;226(2):299-308.
125. Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, et al. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res*. 2010;70(20):8117-8126.
126. Flavin R, Peluso S, Nguyen PL, Loda M. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol*. 2010;6(4):551-562.

127. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008;7(1):11-20.
128. Jones RG, Plas DR, Kubek S, et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 2005;18(3):283-293.
129. Altman BJ, Dang CV. Normal and cancer cell metabolism: lymphocytes and lymphoma. *Febs j.* 2012;279(15):2598-2609.
130. Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature.* 2009;458(7239):762-765.
131. Yuneva M, Zamboni N, Oefner P, Sachidanandam R, Lazebnik Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol.* 2007;178(1):93-105.
132. Zhang J, Fan J, Venneti S, et al. Asparagine plays a critical role in regulating cellular adaptation to glutamine depletion. *Mol Cell.* 2014;56(2):205-218.
133. de Atauri P, Benito A, Vizan P, et al. Carbon metabolism and the sign of control coefficients in metabolic adaptations underlying K-ras transformation. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1807(6):746-754.
134. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science.* 2004;304(5670):554.
135. Jiang P, Du W, Wang X, et al. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat Cell Biol.* 2011;13(3):310-316.
136. Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, et al. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell.* 2012;22(1):66-79.
137. Michalek RD, Rathmell JC. The metabolic life and times of a T-cell. *Immunol Rev.* 2010;236:190-202.



138. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010;18(6):553-567.
139. Ward PS, Patel J, Wise DR, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. 2010;17(3):225-234.
140. Calvo-Vidal MN, Cerchietti L. The metabolism of lymphomas. *Curr Opin Hematol*. 2013;20(4):345-354.
141. Eberlin LS, Gabay M, Fan AC, et al. Alteration of the lipid profile in lymphomas induced by MYC overexpression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(29):10450-10455.
142. Gustafson WC, Weiss WA. Myc proteins as therapeutic targets. *Oncogene*. 2010;29(9):1249-1259.
143. Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG. Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol*. 1984;98(4):1591-1596.
144. Kershaw DB, Wiggins JE, Wharram BL, Wiggins RC. Assignment of the human podocalyxin-like protein (PODXL) gene to 7q32-q33. *Genomics* 1997 Oct 1;45(1):239-40.
145. Kershaw DB, Beck SG, Wharram BL, et al. Molecular cloning and characterization of human podocalyxin-like protein. Orthologous relationship to rabbit PCLP1 and rat podocalyxin. *J Biol Chem* 1997 Jun 20;272(25):15708-14.
146. Rodriguez RB, Butta N, Larrucea S, Alonso S, Parrilla R. Production and characterization of murine monoclonal antibodies against human podocalyxin. *Tissue Antigens* 2006 Nov;68(5):407-17.
147. Li J, Li Y, Brophy PD, Kershaw DB. Gene structure and alternative splicing of murine podocalyxin: a member of the CD34 sialomucin family. *DNA Seq* 2001 Dec;12(5-6):407-12.

148. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci* 2008 Nov 15;121(Pt 22):3683-92 doi: 101242/jcs037507.
149. Li Y, Li J, Straight SW, Kershaw DB. PDZ domain-mediated interaction of rabbit podocalyxin and Na(+)/H(+) exchange regulatory factor-2. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002 Jun;282(6):F1129-39.
150. Orlando RA, Takeda T, Zak B, et al. The glomerular epithelial cell anti-adhesin podocalyxin associates with the actin cytoskeleton through interactions with ezrin. *J Am Soc Nephrol* 2001 Aug;12(8):1589-98.
151. Kobayashi T, Notoya M, Shinosaki T, Kurihara H. Cortactin interacts with podocalyxin and mediates morphological change of podocytes through its phosphorylation. *Nephron Exp Nephrol* 2009;113(3):e89-96 doi: 101159/000235245 Epub 2009 Aug 14.
152. Takeda T. Podocyte cytoskeleton is connected to the integral membrane protein podocalyxin through Na+/H+-exchanger regulatory factor 2 and ezrin. *Clin Exp Nephrol* 2003 Dec;7(4):260-9.
153. Schmieder S, Nagai M, Orlando RA, Takeda T, Farquhar MG. Podocalyxin activates RhoA and induces actin reorganization through NHERF1 and Ezrin in MDCK cells. *J Am Soc Nephrol* 2004 Sep;15(9):2289-98.
154. Meder D, Shevchenko A, Simons K, Fullekrug J. Gp135/podocalyxin and NHERF-2 participate in the formation of a preapical domain during polarization of MDCK cells. *J Cell Biol* 2005 Jan 17;168(2):303-13 Epub 2005 Jan 10.
155. Butta N, Larrucea S, Alonso S, et al. Role of transcription factor Sp1 and CpG methylation on the regulation of the human podocalyxin gene promoter. *BMC Mol Biol* 2006 May 9;7:17.
156. Palmer RE, Kotsianti A, Cadman B, Boyd T, Gerald W, Haber DA. WT1 regulates the expression of the major glomerular podocyte membrane protein Podocalyxin. *Curr Biol* 2001 Nov 13;11(22):1805-9.
157. Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia* 2007 May;21(5):868-76 Epub 2007 Mar 15.

158. Wang D, Li Y, Wu C, Liu Y. PINCH1 is transcriptional regulator in podocytes that interacts with WT1 and represses podocalyxin expression. *PLoS One*. 2011;6(2):e17048.
159. Doyonnas R, Kershaw DB, Duhme C, et al. Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin. *J Exp Med* 2001 Jul 2;194(1):13-27.
160. Dekan G, Gabel C, Farquhar MG. Sulfate contributes to the negative charge of podocalyxin, the major sialoglycoprotein of the glomerular filtration slits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Jun 15;88(12):5398-402.
161. Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG. Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 1984 Apr;98(4):1591-6.
162. Takeda T, McQuistan T, Orlando RA, Farquhar MG. Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J Clin Invest* 2001 Jul;108(2):289-301.
163. Schnabel E, Dekan G, Miettinen A, Farquhar MG. Biogenesis of podocalyxin--the major glomerular sialoglycoprotein--in the newborn rat kidney. *Eur J Cell Biol* 1989 Apr;48(2):313-26.
164. Takeda T, Go WY, Orlando RA, Farquhar MG. Expression of podocalyxin inhibits cell-cell adhesion and modifies junctional properties in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 2000 Sep;11(9):3219-32.
165. Larrucea S, Butta N, Arias-Salgado EG, Alonso-Martin S, Ayuso MS, Parrilla R. Expression of podocalyxin enhances the adherence, migration, and intercellular communication of cells. *Exp Cell Res* 2008 Jun 10;314(10):2004-15 doi: 10.1016/j.yexcr.2008.03.009 Epub 2008 Mar 20.
166. Larrucea S, Butta N, Rodriguez RB, et al. Podocalyxin enhances the adherence of cells to platelets. *Cell Mol Life Sci* 2007 Nov;64(22):2965-74.

167. Sawada H, Stukenbrok H, Kerjaschki D, Farquhar MG. Epithelial polyanion (podocalyxin) is found on the sides but not the soles of the foot processes of the glomerular epithelium. *Am J Pathol* 1986 Nov;125(2):309-18.
168. Yu CY, Chen JY, Lin YY, et al. A bipartite signal regulates the faithful delivery of apical domain marker podocalyxin/Gp135. *Mol Biol Cell* 2007 May;18(5):1710-22 Epub 2007 Mar 1.
169. Cipollone JA, Graves ML, Kobel M, et al. The anti-adhesive mucin podocalyxin may help initiate the transperitoneal metastasis of high grade serous ovarian carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 2012 Mar;29(3):239-52 doi: 101007/s10585-011-9446-0 Epub 2012 Jan 20.
170. Nielsen JS, Graves ML, Chelliah S, Vogl AW, Roskelley CD, McNagny KM. The CD34-related molecule podocalyxin is a potent inducer of microvillus formation. *PLoS One* 2007 Feb 21;2(2):e237.
171. Horvat R, Hovorka A, Dekan G, Poczewski H, Kerjaschki D. Endothelial cell membranes contain podocalyxin--the major sialoprotein of visceral glomerular epithelial cells. *J Cell Biol* 1986 Feb;102(2):484-91.
172. Kershaw DB, Thomas PE, Wharram BL, et al. Molecular cloning, expression, and characterization of podocalyxin-like protein 1 from rabbit as a transmembrane protein of glomerular podocytes and vascular endothelium. *J Biol Chem* 1995 Dec 8;270(49):29439-46.
173. Sassetti C, Tangemann K, Singer MS, Kershaw DB, Rosen SD. Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34. *J Exp Med* 1998 Jun 15;187(12):1965-75.
174. Garcia-Frigola C, Burgaya F, Calbet M, Lopez-Domenech G, de Lecea L, Soriano E. A collection of cDNAs enriched in upper cortical layers of the embryonic mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2004 Mar 30;122(2):133-50.
175. Viturera N, McNagny K, Soriano E, Burgaya F. Pattern of expression of the podocalyxin gene in the mouse brain during development. *Gene Expr Patterns* 2005 Feb;5(3):349-54.

176. Vitureira N, Andres R, Perez-Martinez E, et al. Podocalyxin is a novel polysialylated neural adhesion protein with multiple roles in neural development and synapse formation. *PLoS One* 2010 Aug 10;5(8):e12003 doi: 101371/journalpone0012003.
177. Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, et al. Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN. *Stem Cells Transl Med* 2013 Apr;2(4):265-73 doi: 105966/sctm2012-0154 Epub 2013 Mar 22.
178. Schopperle WM, DeWolf WC. The TRA-1-60 and TRA-1-81 human pluripotent stem cell markers are expressed on podocalyxin in embryonal carcinoma. *Stem Cells* 2007 Mar;25(3):723-30 Epub 2006 Nov 22.
179. Boxall SA, Jones E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int* 2012;2012:975871 doi: 101155/2012/975871 Epub 2012 May 14.
180. Lee MW, Kim DS, Yoo KH, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell gene expression patterns vary with culture conditions. *Blood Res* 2013 Jun;48(2):107-14 doi: 105045/br2013482107 Epub 2013 Jun 25.
181. Lee RH, Seo MJ, Pulin AA, Gregory CA, Ylostalo J, Prockop DJ. The CD34-like protein PODXL and alpha6-integrin (CD49f) identify early progenitor MSCs with increased clonogenicity and migration to infarcted heart in mice. *Blood* 2009 Jan 22;113(4):816-26 doi: 101182/blood-2007-12-128702 Epub 2008 Sep 25.
182. Moscoso I, Tejados N, Barreiro O, et al. Podocalyxin-like protein 1 is a relevant marker for human c-kit cardiac stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2013 Jul 30 doi: 101002/term1795.
183. Doyonnas R, Nielsen JS, Chelliah S, et al. Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells. *Blood* 2005 Jun 1;105(11):4170-8 Epub 2005 Feb 8.
184. Hara T, Nakano Y, Tanaka M, et al. Identification of podocalyxin-like protein 1 as a novel cell surface marker for hemangioblasts in the murine aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity* 1999 Nov;11(5):567-78.

185. McNagny KM, Pettersson I, Rossi F, et al. Thrombomucin, a novel cell surface protein that defines thrombocytes and multipotent hematopoietic progenitors. *J Cell Biol* 1997 Sep 22;138(6):1395-407.
186. Kelley TW, Huntsman D, McNagny KM, Roskelley CD, Hsi ED. Podocalyxin: a marker of blasts in acute leukemia. *Am J Clin Pathol* 2005 Jul;124(1):134-42.
187. Kerosuo L, Juvonen E, Alitalo R, Gylling M, Kerjaschki D, Miettinen A. Podocalyxin in human haematopoietic cells. *Br J Haematol* 2004 Mar;124(6):809-18.
188. Riccioni R, Calzolari A, Biffoni M, et al. Podocalyxin is expressed in normal and leukemic monocytes. *Blood Cells Mol Dis* 2006 Nov-Dec;37(3):218-25 Epub 2006 Oct 23.
189. Miettinen A, Solin ML, Reivinen J, Juvonen E, Vaisanen R, Holthofer H. Podocalyxin in rat platelets and megakaryocytes. *Am J Pathol* 1999 Mar;154(3):813-22.
190. Pericacho M, Alonso-Martin S, Larrucea S, et al. Diminished thrombogenic responses by deletion of the Podocalyxin Gene in mouse megakaryocytes. *PLoS One* 2011;6(10):e26025 doi: 10.1371/journal.pone.0026025 Epub 2011 Oct 7.
191. Somasiri A, Nielsen JS, Makretsov N, et al. Overexpression of the anti-adhesin podocalyxin is an independent predictor of breast cancer progression. *Cancer Res* 2004 Aug 1;64(15):5068-73.
192. Casey G, Neville PJ, Liu X, et al. Podocalyxin variants and risk of prostate cancer and tumor aggressiveness. *Hum Mol Genet* 2006 Mar 1;15(5):735-41 Epub 2006 Jan 24.
193. Ney JT, Zhou H, Sipos B, et al. Podocalyxin-like protein 1 expression is useful to differentiate pancreatic ductal adenocarcinomas from adenocarcinomas of the biliary and gastrointestinal tracts. *Hum Pathol* 2007 Feb;38(2):359-64 Epub 2006 Nov 29.
194. Heukamp LC, Fischer HP, Schirmacher P, et al. Podocalyxin-like protein 1 expression in primary hepatic tumours and tumour-like lesions. *Histopathology* 2006 Sep;49(3):242-7.
195. Schopperle WM, Kershaw DB, DeWolf WC. Human embryonal carcinoma tumor antigen, Gp200/GCTM-2, is podocalyxin. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 Jan 10;300(2):285-90.

196. Larsson A, Johansson ME, Wangefjord S, et al. Overexpression of podocalyxin-like protein is an independent factor of poor prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2011 Aug 23;105(5):666-72 doi: 101038/bjc2011295 Epub 2011 Aug 9.
197. Hsu YH, Lin WL, Hou YT, et al. Podocalyxin EBP50 ezrin molecular complex enhances the metastatic potential of renal cell carcinoma through recruiting Rac1 guanine nucleotide exchange factor ARHGEF7. *Am J Pathol* 2010 Jun;176(6):3050-61 doi: 102353/ajpath2010090539 Epub 2010 Apr 15.
198. Yasuoka H, Tsujimoto M, Hirokawa M, et al. Podocalyxin expression in undifferentiated thyroid carcinomas. *J Clin Pathol.* 2008 Nov;61(11):1228-9. doi: 10.1136/jcp.2008.059956.
199. Koch LK, Zhou H, Ellinger J, et al. Stem cell marker expression in small cell lung carcinoma and developing lung tissue. *Hum Pathol* 2008 Nov;39(11):1597-605 doi: 101016/jhumpath200803008 Epub 2008 Jul 24.
200. Hayatsu N, Kaneko MK, Mishima K, et al. Podocalyxin expression in malignant astrocytic tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Sep 19;374(2):394-8 doi: 101016/j.bbrc200807049 Epub 2008 Jul 17.
201. Sizemore S, Cicek M, Sizemore N, Ng KP, Casey G. Podocalyxin increases the aggressive phenotype of breast and prostate cancer cells in vitro through its interaction with ezrin. *Cancer Res* 2007 Jul 1;67(13):6183-91.
202. Larsson A, Fridberg M, Gaber A, et al. Validation of podocalyxin-like protein as a biomarker of poor prognosis in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2012 Jul 8;12:282 doi: 101186/1471-2407-12-282.
203. Boman K, Larsson AH, Segersten U, et al. Membranous expression of podocalyxin-like protein is an independent factor of poor prognosis in urothelial bladder cancer. *Br J Cancer* 2013 Jun 11;108(11):2321-8 doi: 101038/bjc2013215 Epub 2013 May 7.
204. Kaprio T, Fermer C, Hagstrom J, et al. Podocalyxin is a marker of poor prognosis in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2014 Jul 8;14:493 doi: 101186/1471-2407-14-493.

205. Saukkonen K, Hagstrom J, Mustonen H, et al. Podocalyxin Is a Marker of Poor Prognosis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *PLoS One* 2015 Jun 8;10(6):e0129012 doi: 10.1371/journal.pone.0129012 eCollection 2015.
206. Binder ZA, Siu IM, Eberhart CG, et al. Podocalyxin-like protein is expressed in glioblastoma multiforme stem-like cells and is associated with poor outcome. *PLoS One* 2013 Oct 16;8(10):e75945 doi: 10.1371/journal.pone.0075945 eCollection 2013.
207. Zhou Y, Zhang L, Pan H, et al. Bmi1 essentially mediates podocalyxin-enhanced Cisplatin chemoresistance in oral tongue squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123208.
208. Huang Z, Huang Y, He H, Ni J. Podocalyxin promotes cisplatin chemoresistance in osteosarcoma cells through phosphatidylinositide 3-kinase signaling. *Mol Med Rep*. 2015;12(3):3916-3922.
209. Dallas MR, Chen SH, Streppel MM, Sharma S, Maitra A, Konstantopoulos K. Sialofucosylated podocalyxin is a functional E- and L-selectin ligand expressed by metastatic pancreatic cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012 Sep 15;303(6):C616-24 doi: 10.1152/ajpcell.00149.2012 Epub 2012 Jul 18.
210. Laubli H, Borsig L. Selectins as mediators of lung metastasis. *Cancer Microenviron* 2010 Feb 27;3(1):97-105 doi: 10.1007/s12307-010-0043-6.
211. Witte JS, Goddard KA, Conti DV, et al. Genomewide scan for prostate cancer-aggressiveness loci. *Am J Hum Genet* 2000 Jul;67(1):92-9 Epub 2000 May 24.
212. Witte JS, Suarez BK, Thiel B, et al. Genome-wide scan of brothers: replication and fine mapping of prostate cancer susceptibility and aggressiveness loci. *Prostate* 2003 Dec 1;57(4):298-308.
213. Kunapuli P, Kasyapa CS, Hawthorn L, Cowell JK. LGI1, a putative tumor metastasis suppressor gene, controls in vitro invasiveness and expression of matrix metalloproteinases in glioma cells through the ERK1/2 pathway. *J Biol Chem* 2004 May 28;279(22):23151-7 Epub 2004 Mar 26.



214. P Oc, Wongkajornsilp A, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Signaling pathways required for matrix metalloproteinase-9 induction by betacellulin in head-and-neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer* 2004 Aug 20;111(2):174-83.
215. Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Dotor A, Calero F, Hardisson D, Palacios J. Abnormal ezrin localization is associated with clinicopathological features in invasive breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2006 Jul;98(1):71-9 Epub 2006 Mar 15.
216. Elliott BE, Meens JA, SenGupta SK, Louvard D, Arpin M. The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res* 2005;7(3):R365-73 Epub 2005 Mar 21.
217. Khanna C, Wan X, Bose S, et al. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat Med* 2004 Feb;10(2):182-6 Epub 2004 Jan 4.
218. Hayashi Y, Molina JR, Hamilton SR, Georgescu MM. NHERF1/EBP50 is a new marker in colorectal cancer. *Neoplasia* 2010 Dec;12(12):1013-22.
219. Meng X, Ezzati P, Wilkins JA. Requirement of podocalyxin in TGF-beta induced epithelial mesenchymal transition. *PLoS One* 2011 Apr 12;6(4):e18715 doi: 101371/journalpone0018715.
220. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009 Jun;119(6):1420-8 doi: 101172/JCI39104.
221. Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, et al. Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia*. 1995;9(6):1060-1067.
222. Favreau AJ, McGlaufflin RE, Duarte CW, Sathyanarayana P. miR-199b, a novel tumor suppressor miRNA in acute myeloid leukemia with prognostic implications. *Exp Hematol Oncol*. 2015;5:4.
223. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008;111(8):3941-3967.
224. Lopez-Giral S, Quintana NE, Cabrerizo M, et al. Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic

- leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. *J Leukoc Biol.* 2004;76(2):462-471.
225. Sumimoto S, Heike T, Kanazashi S, et al. Involvement of LFA-1/intracellular adhesion molecule-1-dependent cell adhesion in CD40-mediated inhibition of human B lymphoma cell death induced by surface IgM crosslinking. *J Immunol.* 1994;153(6):2488-2496.
226. Zhang K, Chen J. The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell Adh Migr.* 2012;6(1):20-29.
227. Conduit PT, Wainman A, Raff JW. Centrosome function and assembly in animal cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(10):611-624.
228. Galvagni F, Baldari CT, Oliviero S, Orlandini M. An apical actin-rich domain drives the establishment of cell polarity during cell adhesion. *Histochem Cell Biol.* 2012;138(3):419-433.
229. Sionov RV, Spokoini R, Kfir-Erenfeld S, Cohen O, Yefenof E. Mechanisms regulating the susceptibility of hematopoietic malignancies to glucocorticoid-induced apoptosis. *Adv Cancer Res.* 2008;101:127-248.
230. Herting F, Friess T, Bader S, et al. Enhanced anti-tumor activity of the glycoengineered type II CD20 antibody obinutuzumab (GA101) in combination with chemotherapy in xenograft models of human lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(9):2151-5160.
231. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(2):85-95.
232. Le A, Lane AN, Hamaker M, et al. Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab.* 2012;15(1):110-121.
233. Economou CG, Kitsiou PV, Tzinia AK, et al. Enhanced podocalyxin expression alters the structure of podocyte basal surface. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 15):3281-3294.
234. Tsotakos NE, Sagnou M, Kotsopoulou ES, Tsilibary EC, Drossopoulou GI. Glucose-induced gradual phenotypic modulation of cultured human glomerular epithelial cells may be independent of Wilms' tumor 1 (WT1). *BMC Cell Biol.* 2013;14:28.

- 
235. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(10):763-777.
236. Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci*. 2014;39(8):347-354.
237. Snyder KA, Hughes MR, Hedberg B, et al. Podocalyxin enhances breast tumor growth and metastasis and is a target for monoclonal antibody therapy. *Breast Cancer Res*. 2015;17:46.
238. Lin CW, Sun MS, Wu HC. Podocalyxin-like 1 is associated with tumor aggressiveness and metastatic gene expression in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2014;45(2):710-718.
239. Sander S, Calado DP, Srinivasan L, et al. Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis. *Cancer Cell*. 2012;22(2):167-179.
240. Gramling MW, Eischen CM. Suppression of Ras/Mapk pathway signaling inhibits Myc-induced lymphomagenesis. *Cell Death Differ*. 2012;19(7):1220-1227.
241. Cheung KJ, Shah SP, Steidl C, et al. Genome-wide profiling of follicular lymphoma by array comparative genomic hybridization reveals prognostically significant DNA copy number imbalances. *Blood*. 2009;113(1):137-148.
242. Aquino G, Marra L, Cantile M, et al. MYC chromosomal aberration in differential diagnosis between Burkitt and other aggressive lymphomas. *Infect Agent Cancer*. 2013;8(1):37.
243. Garcia JL, Hernandez JM, Gutierrez NC, et al. Abnormalities on 1q and 7q are associated with poor outcome in sporadic Burkitt's lymphoma. A cytogenetic and comparative genomic hybridization study. *Leukemia*. 2003;17(10):2016-2024.
244. Stanhope-Baker P, Kessler PM, Li W, Agarwal ML, Williams BR. The Wilms tumor suppressor-1 target gene podocalyxin is transcriptionally repressed by p53. *J Biol Chem* 2004 Aug 6;279(32):33575-85 Epub 2004 May 21.

245. Ujj Z, Buglyo G, Udvardy M, Vargha G, Biro S, Rejto L. WT1 overexpression affecting clinical outcome in non-hodgkin lymphomas and adult acute lymphoblastic leukemia. *Pathol Oncol Res.* 2014;20(3):565-570.
246. Stengel A, Schnittger S, Weissmann S, et al. TP53 mutations occur in 15.7% of ALL and are associated with MYC-rearrangement, low hypodiploidy, and a poor prognosis. *Blood.* 2014;124(2):251-258.
247. Leroy K, Haioun C, Lepage E, et al. p53 gene mutations are associated with poor survival in low and low-intermediate risk diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol.* 2002;13(7):1108-1115.
248. Archer MC. Role of sp transcription factors in the regulation of cancer cell metabolism. *Genes Cancer.* 2011;2(7):712-719.
249. Alberghini F, Petrocelli V, Rahmat M, Casola S. An epigenetic view of B-cell disorders. *Immunol Cell Biol.* 2015;93(3):253-260.
250. Pan Y, Meng M, Zhang G, Han H, Zhou Q. Oncogenic microRNAs in the genesis of leukemia and lymphoma. *Curr Pharm Des.* 2014;20(33):5260-5267.
251. Larrucea S, Butta N, Arias-Salgado EG, Alonso-Martin S, Ayuso MS, Parrilla R. Expression of podocalyxin enhances the adherence, migration, and intercellular communication of cells. *Exp Cell Res.* 2008;314(10):2004-2015.
252. Chung EY, Psathas JN, Yu D, Li Y, Weiss MJ, Thomas-Tikhonenko A. CD19 is a major B cell receptor-independent activator of MYC-driven B-lymphomagenesis. *J Clin Invest.* 2012;122(6):2257-2266.
253. Behr SI, Korinth D, Schriever F. Differential adhesion pattern of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia.* 1998;12(1):71-77.
254. Cayrol F, Diaz Flaque MC, Fernando T, et al. Integrin alphavbeta3 acting as membrane receptor for thyroid hormones mediates angiogenesis in malignant T cells. *Blood.* 2015;125(5):841-851.

- 
255. Buttgereit P, Weineck S, Ropke G, et al. Efficient gene transfer into lymphoma cells using adenoviral vectors combined with lipofection. *Cancer Gene Ther.* 2000;7(8):1145-1155.
256. Nagel H, Maag S, Tassis A, Nestle FO, Greber UF, Hemmi S. The alphavbeta5 integrin of hematopoietic and nonhematopoietic cells is a transduction receptor of RGD-4C fiber-modified adenoviruses. *Gene Ther.* 2003;10(19):1643-1653.
257. Pettitt AR, Moran EC, Cawley JC. Homotypic interactions protect chronic lymphocytic leukaemia cells from spontaneous death in vitro. *Leuk Res.* 2001;25(11):1003-1012.
258. Shah N, Cabanillas F, McIntyre B, et al. Prognostic value of serum CD44, intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 levels in patients with indolent non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 2012;53(1):50-56.
259. Hazlehurst LA, Damiano JS, Buyuksal I, Pledger WJ, Dalton WS. Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). *Oncogene.* 2000;19(38):4319-4327.
260. Yin H, Miao X, Wu Y, et al. The role of the Chaperonin containing t-complex polypeptide 1, subunit 8 (CCT8) in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Res.* 2016;45:59-67.
261. McNagny KM, Hughes MR, Graves ML, et al. Podocalyxin in the Diagnosis and Treatment of Cancer. In: Mohan R, ed. *Advances in Cancer Management.* Rijeka, Croatia: InTech; 2012.
262. Peng SB, Zhang X, Paul D, et al. Inhibition of CXCR4 by LY2624587, a Fully Humanized Anti-CXCR4 Antibody Induces Apoptosis of Hematologic Malignancies. *PLoS One.* 2016;11(3):e0150585.
263. Brodt P, Fallavollita L, Bresalier RS, Meterissian S, Norton CR, Wolitzky BA. Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis. *Int J Cancer.* 1997;71(4):612-619.

264. Giehl M, Fabarius A, Frank O, et al. Centrosome aberrations in chronic myeloid leukemia correlate with stage of disease and chromosomal instability. *Leukemia*. 2005;19(7):1192-1197.
265. Gomez-Lopez S, Lerner RG, Petritsch C. Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(4):575-597.
266. Wang Q, Du X, Meinkoth J, et al. Characterization of Su48, a centrosome protein essential for cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(17):6512-6517.
267. Stavropoulou V, Xie J, Henriksson M, Tomkinson B, Imreh S, Masucci MG. Mitotic infidelity and centrosome duplication errors in cells overexpressing tripeptidyl-peptidase II. *Cancer Res*. 2005;65(4):1361-1368.
268. Fernandez D, Horrillo A, Alquezar C, Gonzalez-Manchon C, Parrilla R, Ayuso MS. Control of cell adhesion and migration by podocalyxin. Implication of Rac1 and Cdc42. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;432(2):302-307.
269. Mitsushima M, Toyoshima F, Nishida E. Dual role of Cdc42 in spindle orientation control of adherent cells. *Mol Cell Biol*. 2009;29(10):2816-2827.
270. Klinkert K, Rocancourt M, Houdusse A, Echard A. Rab35 GTPase couples cell division with initiation of epithelial apico-basal polarity and lumen opening. *Nat Commun*. 2016;7:11166.
271. Hung HF, Hehnly H, Doxsey S. Methods to analyze novel liaisons between endosomes and centrosomes. *Methods Cell Biol*. 2015;130:47-58.
272. Chao MP. Treatment challenges in the management of relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma - novel and emerging therapies. *Cancer Manag Res*. 2013;5:251-269.
273. Yagi K, Yamamoto K, Umeda S, et al. Expression of multidrug resistance 1 gene in B-cell lymphomas: association with follicular dendritic cells. *Histopathology*. 2013;62(3):414-420.

- 
274. Ma H, Cheng L, Hao K, et al. Reversal effect of ST6GAL 1 on multidrug resistance in human leukemia by regulating the PI3K/Akt pathway and the expression of P-gp and MRP1. *PLoS One*. 2014;9(1):e85113.
275. Zheng Y, Yang J, Qian J, et al. PSGL-1/selectin and ICAM-1/CD18 interactions are involved in macrophage-induced drug resistance in myeloma. *Leukemia*. 2013;27(3):702-710.
276. Liu Z, Zhu G, Getzenberg RH, Veltri RW. The Upregulation of PI3K/Akt and MAP Kinase Pathways is Associated with Resistance of Microtubule-Targeting Drugs in Prostate Cancer. *J Cell Biochem*. 2015;116(7):1341-1349.
277. Flinders C, Lam L, Rubbi L, et al. Epigenetic changes mediated by polycomb repressive complex 2 and E2a are associated with drug resistance in a mouse model of lymphoma. *Genome Med*. 2016;8(1):54.
278. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem*. 2007;7(1):3-18.
279. Haupt Y, Bath ML, Harris AW, Adams JM. bmi-1 transgene induces lymphomas and collaborates with myc in tumorigenesis. *Oncogene*. 1993;8(11):3161-3164.
280. Bhattacharyya J, Mihara K, Ohtsubo M, et al. Overexpression of BMI-1 correlates with drug resistance in B-cell lymphoma cells through the stabilization of survivin expression. *Cancer Sci*. 2012;103(1):34-41.
281. Nacerddine K, Beaudry JB, Ginjala V, et al. Akt-mediated phosphorylation of Bmi1 modulates its oncogenic potential, E3 ligase activity, and DNA damage repair activity in mouse prostate cancer. *J Clin Invest*. 2012;122(5):1920-1932.
282. Pieters R, den Boer ML, Durian M, et al. Relation between age, immunophenotype and in vitro drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia--implications for treatment of infants. *Leukemia*. 1998;12(9):1344-1348.
283. Klumper E, Pieters R, Veerman AJ, et al. In vitro cellular drug resistance in children with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1995;86(10):3861-3868.

284. Jiang L, Xu L, Xie J, et al. Inhibition of autophagy overcomes glucocorticoid resistance in lymphoid malignant cells. *Cancer Biol Ther.* 2015;16(3):466-476.
285. Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ.* 2004;11 Suppl 1:S45-55.
286. Bachmann PS, Gorman R, Mackenzie KL, Lutze-Mann L, Lock RB. Dexamethasone resistance in B-cell precursor childhood acute lymphoblastic leukemia occurs downstream of ligand-induced nuclear translocation of the glucocorticoid receptor. *Blood.* 2005;105(6):2519-2526.
287. Gazitt Y, Fey V, Thomas C, Alvarez R. Bcl-2 overexpression is associated with resistance to dexamethasone, but not melphalan, in multiple myeloma cells. *Int J Oncol.* 1998;13(2):397-405.
288. Bhadri VA, Trahair TN, Lock RB. Glucocorticoid resistance in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *J Paediatr Child Health.* 2012;48(8):634-640.
289. Miller AL, Garza AS, Johnson BH, Thompson EB. Pathway interactions between MAPKs, mTOR, PKA, and the glucocorticoid receptor in lymphoid cells. *Cancer Cell Int.* 2007;7:3.
290. Jones CL, Gearheart CM, Fosmire S, et al. MAPK signaling cascades mediate distinct glucocorticoid resistance mechanisms in pediatric leukemia. *Blood.* 2015;126(19):2202-2212.
291. Maxwell SA, Mousavi-Fard S. Non-Hodgkin's B-cell lymphoma: advances in molecular strategies targeting drug resistance. *Exp Biol Med (Maywood).* 2013;238(9):971-990.
292. Tazzari PL, Cappellini A, Ricci F, et al. Multidrug resistance-associated protein 1 expression is under the control of the phosphoinositide 3 kinase/Akt signal transduction network in human acute myelogenous leukemia blasts. *Leukemia.* 2007;21(3):427-438.
293. Amo L, Tamayo-Orbegozo E, Maruri N, et al. Podocalyxin-like protein 1 functions as an immunomodulatory molecule in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2015;368(1):26-35.



294. Sehn LH, Chua N, Mayer J, et al. Obinutuzumab plus bendamustine versus bendamustine monotherapy in patients with rituximab-refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (GADOLIN): a randomised, controlled, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(8):1081-1093.
295. Wu F, Wang J, Ke X. Knockdown of B7-H6 inhibits tumor progression and enhances chemosensitivity in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Int J Oncol.* 2016;48(4):1561-1570.
296. Aries IM, Jerchel IS, van den Dungen RE, et al. EMP1, a novel poor prognostic factor in pediatric leukemia regulates prednisolone resistance, cell proliferation, migration and adhesion. *Leukemia.* 2014;28(9):1828-1837.
297. Schopperle WM, Lee JM, Dewolf WC. The human cancer and stem cell marker podocalyxin interacts with the glucose-3-transporter in malignant pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;398(3):372-376.
298. Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T, Sonveaux P. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol.* 2011;2:49.
299. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol.* 2005;202(3):654-662.
300. Khandani AH, Dunphy CH, Meteesatien P, Dufault DL, Ivanovic M, Shea TC. Glut1 and Glut3 expression in lymphoma and their association with tumor intensity on 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Nucl Med Commun.* 2009;30(8):594-601.
301. Guo Y, Deng Y, Li X, et al. Glutaminolysis Was Induced by TGF-beta1 through PP2Ac Regulated Raf-MEK-ERK Signaling in Endothelial Cells. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162658.
302. Lin CW, Sun MS, Liao MY, et al. Podocalyxin-like 1 promotes invadopodia formation and metastasis through activation of Rac1/Cdc42/cortactin signaling in breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 2014;35(11):2425-2435.
303. Orgaz JL, Herraiz C, Sanz-Moreno V. Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases.* 2014;5:e29019.

304. Wang JB, Erickson JW, Fuji R, et al. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell*. 2010;18(3):207-219.
305. Roberts HR, Smartt HJ, Greenhough A, Moore AE, Williams AC, Paraskeva C. Colon tumour cells increase PGE(2) by regulating COX-2 and 15-PGDH to promote survival during the microenvironmental stress of glucose deprivation. *Carcinogenesis*. 2011;32(11):1741-1747.
306. Gao M, Liang J, Lu Y, et al. Site-specific activation of AKT protects cells from death induced by glucose deprivation. *Oncogene*. 2014;33(6):745-755.
307. Wang L, Zhou H, Wang Y, Cui G, Di LJ. CtBP maintains cancer cell growth and metabolic homeostasis via regulating SIRT4. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1620.
308. Bailey KM, Wojtkowiak JW, Hashim AI, Gillies RJ. Targeting the metabolic microenvironment of tumors. *Adv Pharmacol*. 2012;65:63-107.
309. Justus CR, Dong L, Yang LV. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. *Front Physiol*. 2013;4:354.
310. Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, et al. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*. 2011;481(7381):380-384.
311. Sun RC, Denko NC. Hypoxic regulation of glutamine metabolism through HIF1 and SIAH2 supports lipid synthesis that is necessary for tumor growth. *Cell Metab*. 2014;19(2):285-292.
312. Deep G, Schlaepfer IR. Aberrant Lipid Metabolism Promotes Prostate Cancer: Role in Cell Survival under Hypoxia and Extracellular Vesicles Biogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7).
313. Liu Y, Yang L, Liu B, Jiang YG. Podocalyxin promotes glioblastoma multiforme cell invasion and proliferation via beta-catenin signaling. *PLoS One*. 2014;9(10):e111343.
314. Bhatt AP, Jacobs SR, Freemerman AJ, et al. Dysregulation of fatty acid synthesis and glycolysis in non-Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(29):11818-11823.

315. Ventura R, Mordec K, Waszczuk J, et al. Inhibition of de novo Palmitate Synthesis by Fatty Acid Synthase Induces Apoptosis in Tumor Cells by Remodeling Cell Membranes, Inhibiting Signaling Pathways, and Reprogramming Gene Expression. *EBioMedicine*. 2015;2(8):808-824.
316. Wagle A, Jivraj S, Garlock GL, Stapleton SR. Insulin regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression is rapamycin-sensitive and requires phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 1998;273(24):14968-14974.



## **VIII. ANEXOS**



## Publicaciones relacionadas con la tesis

**Tamayo-Orbegozo E**, Amo L, Riñón M, Nieto N, Amutio E, Maruri N, Solaun M, Arrieta A, Larrucea S. Podocalyxin-like protein 1 promotes proliferation and survival in mature B-cell non-Hodgkin lymphoma cells. *Oncotarget*. 2017. **(En revisión)**.

## Otras publicaciones

**Tamayo-Orbegozo E**, Iruiñ-Sanz A, Oñate-Muzás E, Segrelles-Bellmunt G. Palmar-plantar erythrodysesthesia and non-pegylated liposomal doxorubicin. A case study. *Farm Hosp*. 2011; 35:46-47. doi: 10.1016/j.farma.2010.03.002.

Amo L †, **Tamayo-Orbegozo E** †, Maruri N, Eguizabal C, Zenarruzabeitia O, Riñón M, Arrieta A, Santos S, Monge J, Vesga MA, Borrego F, Larrucea S. Involvement of platelet-tumor cell interaction in immune evasion. Potential role of podocalyxin-like protein 1. *Front Oncol*. 2014; 4:245. doi: 10.3389/fonc.2014.00245. (†**Amo L and Tamayo-Orbegozo E have contributed equally to this work**). Review.

Eguizabal C, Zenarruzabeitia O, Monje J, Santos S, Vesga MA, Maruri N, Arrieta A, Riñón M, **Tamayo-Orbegozo E**, Amo L, Larrucea S, Borrego F. Natural killer cells for cancer immunotherapy: pluripotent stem cells-derived NK cells as an immunotherapeutic perspective. *Front Immunol*. 2014; 5:439. doi: 10.3389/fimmu.2014.00439. Review.

Amo L, **Tamayo-Orbegozo E**, Maruri N, Buqué A, Solaun M, Riñón M, Arrieta A, Larrucea S. Podocalyxin-like protein 1 functions as an immunomodulatory molecule in breast cancer cells. *Cancer Lett*. 2015; 368:26-35. doi: 10.1016/j.canlet.2015.06.029.





1 **Podocalyxin-like protein 1 promotes proliferation and survival in**  
2 **mature B-cell non-Hodgkinlymphoma cells**

3 **Estíbaliz Tamayo-Orbegozo<sup>1</sup>, Laura Amo<sup>1</sup>, Marta Riñón<sup>1</sup>, Naiara Nieto<sup>2</sup>, Elena**  
4 **Amutio<sup>3</sup>, Natalia Maruri<sup>1</sup>, Miren Solaun<sup>4</sup>, Arantza Arrieta<sup>1</sup>, Susana Larrucea<sup>1</sup>**

5 <sup>1</sup>Regulation of the Immune System Group, BioCruces Health Research Institute,  
6 Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Bizkaia, Spain.

7 <sup>2</sup>Cell Culture Unit, BioCruces Health Research Institute, Hospital Universitario Cruces,  
8 Barakaldo, Bizkaia, Spain.

9 <sup>3</sup>Department of Hematology and Hemotherapy, BioCruces Health Research Institute,  
10 Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Bizkaia, Spain.

11 <sup>4</sup>Flow Cytometry Unit, BioCruces Health Research Institute, Hospital Universitario  
12 Cruces, Barakaldo, Bizkaia, Spain.

13

14 **Correspondence:**

15 Dr. Susana Larrucea

16 Regulation of Immune System Group

17 BioCruces Health Research Institute

18 Plaza de Cruces s/n

19 Barakaldo, 48903, Spain

20 Telephone: +34 94 600 6144

21 Fax number: +34 94 600 6014

22 E-mail: slarrucea @osakidetza.eus

23

24 **Keywords:** podocalyxin, lymphomagenesis, obinutuzumabresistance, glutaminolysis;  
25 pentose phosphate pathway

26 **Total number of figures:** 6

27 **ABSTRACT**

28 Podocalyxin-like protein 1 (PCLP1) is a CD34-related sialomucin expressed by some  
29 normal cells and a variety of malignant tumors, including leukemia, and associated with  
30 the most aggressive cancers and poor clinical outcome. PCLP1 increases breast tumor  
31 growth, migration and invasion; however, its role in hematologic malignancies still  
32 remains undetermined. The purpose of this study was to investigate the expression and  
33 function of PCLP1 in mature B-cell lymphoma cells. We found that overexpression of  
34 PCLP1 significantly increases proliferation, cell-to-cell interaction, clonogenicity, and  
35 migration of B-cell lymphoma cells. Furthermore, PCLP1 overexpression results in  
36 higher resistance to death induced by dexamethasone, reactive oxygen species and type  
37 II anti-CD20 monoclonal antibody obinutuzumab. Strikingly, enforced expression of  
38 PCLP1 enhances lipid droplet formation as well as pentose phosphate pathway and  
39 glutamine dependence, indicative of metabolic reprogramming necessary to support the  
40 abnormal proliferation rate of tumor cells. Flow cytometry analysis revealed augmented  
41 levels of PCLP1 in malignant cells from some patients with mature B-cell lymphoma  
42 compared to their normal B-cell counterparts. In summary, our results demonstrate that  
43 PCLP1 contributes to proliferation and survival of mature B-cell lymphoma cells,  
44 suggesting that PCLP1 may promote lymphomagenesis and represents a therapeutic  
45 target for the treatment of B-cell lymphomas.

46

47

48

49

50

51

52 **INTRODUCTION**

53 Podocalyxin-like protein 1 (PCLP1) is a CD34-related sialomucin expressed in renal  
54 podocytes, vascular endothelia, platelets, a subset of neurons, haematopoietic  
55 progenitors, embryonic stem cells and various types of cancer[1]. PCLP1 expression is  
56 repressed by p53 and positively regulated by Wilms' tumor suppressor-1[2]. Through its  
57 association with actin cytoskeleton, PCLP1 regulates cellular morphology and adhesion,  
58 exhibiting both pro-adhesive and anti-adhesive properties depending on cellular  
59 context[3, 4]. In high endothelial venules, PCLP1 acts as a pro-adhesive molecule  
60 which binds to lymphocyte L-selectin during the homing process [4]. High expression of  
61 PCLP1 has been associated with an aggressive phenotype and unfavorable prognosis in  
62 breast, colorectal, prostate, ovarian and renal cancer [5, 6, 7, 8, 9]. In MCF7 breast  
63 cancer cells, PCLP1 enhances migration, invasion, and matrix metalloproteinase  
64 expression as well as activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and  
65 phosphoinositide-3 kinase (PI3K), both pathways involved in proliferation, survival and  
66 migration[10]. Moreover, PCLP1 regulates TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal  
67 transition, a mechanism endowing epithelial cells with migratory and invasive  
68 capabilities[11]. Recent reports highlight the participation of PCLP1 in  
69 chemoresistance to cisplatin[12, 13]. The expression of PCLP1 has been detected in  
70 blasts from the majority of acute myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia and  
71 cutaneous myeloid sarcoma patients [14], although the functional significance of this  
72 protein in the progression of haematological malignancies and its expression in  
73 lymphoma cells still remain undetermined. In acute myeloid leukemia, loss of miR-  
74 199b, a microRNA that targets PCLP1 and discoidin domain receptor 1 and regulates  
75 cell migration capacity, has been reported to correlate with poor survival [15].

76

77 Mature B-cell non-Hodgkin lymphomas comprise a biologically and clinically  
78 heterogeneous group of lymphoid malignancies ranging from indolent to highly  
79 aggressive cases, which includes diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), follicular  
80 lymphoma (FL), chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL),  
81 mantle cell lymphoma (MCL), marginal zone B-cell lymphoma (MZL), Burkitt  
82 lymphoma (BL), hairy cell leukemia (HCL), and lymphoplasmacytic  
83 lymphoma/Waldenström macroglobulinemia (WM)[16]. The molecular mechanisms that  
84 promote mature B cell lymphoma are only partially understood. In the last decades, many  
85 genes and signaling pathways whose deregulation induces B cell lymphoma cell  
86 proliferation and survival have been elucidated. These include *MYC*, *BCL2*  
87 and *BCL6* genes and PI3K, BCR/BTK and the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway,  
88 among others[17]. Despite progress in the treatment of mature B-cell lymphomas  
89 experienced with the addition of anti-CD20 monoclonal antibodies (mAb) to the  
90 standard therapy, the prognosis for patients with aggressive forms of the disease still  
91 remains poor due to the acquisition of drug resistance[18].

92

93 Cancer cells undergo specific alterations in their metabolic pathways to increase the  
94 synthesis of proteins, lipids, and nucleic acids necessary to sustain their high  
95 proliferation rate[19]. In addition, the metabolic shift allows tumor cells to maintain the  
96 redox balance through the generation of reducing molecules, thereby protecting cells  
97 from apoptosis[19]. One of the most significant metabolic changes consists in the  
98 enhancement of glucose uptake and aerobic glycolysis, referred to as the Warburg  
99 effect[19]. Tumor cells also exhibit an upregulation in glutamine import and  
100 glutaminolysis for the synthesis of macromolecules[20]. In lymphoma cells, the uptake  
101 and metabolism of these nutrients essential for tumor growth depend mainly on *MYC*,

102 PI3K, and p53 pathway activity[21]. The metabolic reprogramming in tumor  
103 cells contributes to drug resistance and can provide new targets for cancer therapy[21].

104

105 The aim of this study was to provide insight to the function of PCLP1 in mature B-cell  
106 lymphoma cells. Our findings revealed that PCLP1 expression is up-regulated in  
107 malignant cells of some mature B-cell lymphoma patients. Overexpression of PCLP1  
108 increases cell proliferation, cell-to-cell adhesion, colony formation and migration in B-  
109 cell lymphoma cells. Furthermore, PCLP1 promotes cell resistance to dexamethasone-,  
110 hydrogen peroxide- and obinutuzumab-induced cell death. Interestingly, PCLP1  
111 enhances B-cell lymphoma cell dependence on glutamine and pentose phosphate  
112 pathway (PPP) and markedly increases cytosolic lipid droplet production. The present  
113 work extends our understanding about the molecular mechanisms of mature B-cell  
114 lymphoma genesis.

115

## 116 **RESULTS**

### 117 **Analysis of PCLP1 expression in mature B-cell lymphomas**

118 We first determined PCLP1 surface expression in Raji, Ramos and Daudi B-  
119 lymphoma cell lines and Jurkat T-lymphoma cell line by flow cytometry. The data  
120 showed high levels of PCLP1 expression on the surface of Raji cells, whereas it was  
121 undetectable on the other cell lines tested (Figure 1A). Although the predicted molecular  
122 mass of PCLP1 is 55 kDa, the extensive post-translational modification with sialylated  
123 oligosaccharides gives rise to a protein with an apparent molecular weight of 160  
124 kDa[22]. Western-blot analysis showed a highly glycosylated form of 160 kDa PCLP1 in  
125 Raji cells that was undetectable in the other lymphoma cell lines and normal B cells  
126 (Figure 1B). Additional bands of around 70 kDa and 55 kDa were detected in the four

127 lymphoma cell lines examined and in B cells from healthy donors, which may  
128 correspond to an intermediate-glycosylated and the unglycosylated forms of PCLP1,  
129 respectively. Furthermore, bands of a lower molecular weight than 40 kDa were also  
130 observed in all cell types tested, likely representing proteolytic products (Figure 1B).

131

132 We next used fluorescence microscopy to define the subcellular localization of PCLP1  
133 in Raji-PCLP1 cells. PCLP1 was detected at the plasma membrane, cytoplasmic  
134 vesicles and the perinuclear/centrosomal region (Figure 1C). Using  $\gamma$ -tubulin staining as  
135 a marker of the pericentriolar area, we also observed that PCLP1 localizes to the  
136 pericentriolar region and the surrounding area at both interphase and mitosis (Figure  
137 1D). At interphase, PCLP1 displays an asymmetric distribution, localizing preferentially  
138 around one of the centrioles. During mitosis, PCLP1 migrates to opposite poles of the  
139 cell in association with the centrosomes (Figure 1D).

140

141 PCLP1 expression was further analyzed on the surface of mature normal and malignant  
142 B cells from a short cohort of patients with the following diagnosis: FL (5), CLL (3),  
143 HCL (2) and WM (1). Given that PCLP1 has been previously reported to be expressed  
144 on malignant B cells from B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) patients, we  
145 included the expression of this protein in 3 ALL patients as a positive procedure control.  
146 As expected, in 2 out of 3 patients with ALL, malignant B cells expressed higher levels  
147 of PCLP1 than normal B cells from the same patient (Figure 1E). The results revealed  
148 that PCLP1 expression levels were 3- to 8-fold higher in malignant B cells compared  
149 with normal B cells in 2 out of 5 patients diagnosed with FL and 1 out of 3 patients with  
150 CLL (Figure 1E and Supplementary Figure S1). In WM and HCL cases, PCLP1  
151 expression in malignant B cells was similar to normal B cells (Figure 1E).

152 **PCLP1 induces cell growth, clonogenicity, cell-cell adhesion, and chemotactic**  
153 **migration in mature B-cell lymphoma cells**

154 We next aimed at investigating the possible involvement of PCLP1 in mature B-cell  
155 lymphomagenesis by analyzing the effect of ectopic PCLP1 expression on cell  
156 proliferation and clonogenicity. For this purpose, we overexpressed PCLP1 in Raji cells  
157 by transfection with pEGFP1-PCLP1 or the empty vector. Three clones stably  
158 expressing PCLP1-GFP (Raji-PCLP1) or GFP (Raji-Ctrl) were obtained and the level of  
159 PCLP1 expression determined by Western-blot analysis, which shows a highly  
160 expressed protein of an apparent molecular weight of approximately 180 kDa  
161 corresponding to PCLP1-GFP fusion protein (Figure 2A). Raji-PCLP1 cells exhibited  
162 increased proliferation (Figure 2B) and higher colony forming ability than Raji-Ctrl cells  
163 (Figure 2C), supporting a role for PCLP1 in B-cell lymphoma cell proliferation and  
164 clonogenic growth.

165

166 We also observed that Raji cells overexpressing PCLP1 formed numerous large  
167 aggregates compared to control cells (Figure 2D), revealing the involvement of PCLP1 in  
168 cell-to-cell adhesion in B-cell lymphoma cells. As L-selectin is the only cognate PCLP1  
169 ligand expressed on B cells, we performed experiments to evaluate the participation of  
170 this molecule in PCLP1-induced cell-to-cell interaction using a function-neutralizing  
171 mAb against L-selectin (CD62L). Treatment of Raji-PCLP1 cells with anti-L-  
172 selectin mAb had no effect on PCLP1-induced cell-to-cell adhesion, which pointed to a  
173 process independent of L-selectin (Figure 2E, left). We further explored the contribution  
174 of integrins to this interaction evaluating the divalent cation-dependency of PCLP1-  
175 induced adhesion. The presence of EDTA, a chelator of calcium and magnesium,  
176 completely reduced PCLP1-induced adhesion whereas EGTA, a specific chelator for

177 calcium, partially attenuated this adhesion, suggesting an integrin-dependent  
178 mechanism (Figure 2E, middle). A blocking antibody against CD18, the  $\beta_2$  subunit of  
179 LFA-1 integrin, partially inhibited PCLP1-induced adhesion, indicating the involvement  
180 of  $\beta_2$ -integrin in this process (Figure 2E, right).

181

182 Lymphoma cells express the chemokine receptor type 4 (CXCR4), which mediates cell  
183 migration to organs expressing its ligand C-X-C motif chemokine 12  
184 (CXCL12)[23]. PCLP1 has been reported to associate with CXCR4 and to enhance  
185 CXCL12-mediated migration in mouse primary hematopoietic cells[24]. Similarly, we  
186 observed that Raji-PCLP1 cells displayed enhanced migration towards CXCL12  
187 compared to Raji-Ctrl cells (Figure 2F), suggesting that PCLP1 promotes B-cell  
188 lymphoma cell migration.

189

190 **PCLP1 expression augments mature B-cell lymphoma cell resistance to**  
191 **dexamethasone and reactive oxygen species.**

192 Glucocorticoids such as dexamethasone have been widely used to treat haematological  
193 malignancies including B-cell lymphoma and leukemia, although the development of  
194 therapy resistance restricts their effectiveness[25]. Given that PCLP1 has been recently  
195 involved in chemoresistance to cisplatin[12, 13], we next aim at determining the  
196 participation of PCLP1 in B-cell lymphoma resistance to dexamethasone. Raji cells were  
197 subjected to increasing concentrations of dexamethasone for 72 h. Subsequently,  
198 dexamethasone-induced cell death was assessed using Annexin V/7-AAD staining. The  
199 treatment with high concentrations of dexamethasone yielded a remarkable reduction of  
200 cell death in Raji-PCLP1 cells compared to empty vector-transfected cells (Figure 3A).  
201 In accordance with this result, Raji-PCLP1 cells that survive to dexamethasone



202 treatment displayed increased levels of PCLP1 compared to untreated cells, likely due to  
203 the death of PCLP1 low-expressing cells (Figure 3B). Altogether, these data indicate that  
204 PCLP1 expression confers resistance to high concentrations of dexamethasone in B-cell  
205 lymphoma cells.

206

207 As glucocorticoids induce lymphoma cell apoptosis through the production of peroxide  
208 hydrogen ( $H_2O_2$ ), we then assessed the effect PCLP1 expression on  $H_2O_2$ -induced  
209 apoptosis [26]. Flow cytometry analysis revealed that apoptotic response to  $H_2O_2$ -  
210 induced oxidative stress was significantly reduced in Raji-PCLP1 cells compared to  
211 control cells (Figure 3C). These findings demonstrate that PCLP1 partially inhibits  
212 reactive oxygen species-induced apoptosis in B-cell lymphoma cells.

213

#### 214 **PCLP1 increases B-cell lymphoma cell resistance to direct programmed cell death** 215 **induced by obinutuzumab**

216 We next examined the effect of PCLP1 expression on B-cell lymphoma cell  
217 susceptibility to anti-CD20 antibody-induced cell death. A recent study demonstrated  
218 that obinutuzumab, a novel type II anti-CD20 mAb, induces higher levels of direct, non-  
219 complement dependent cell death in various B-lymphoma cell lines and primary B-cell  
220 malignancies compared to rituximab [27, 28]. Obinutuzumab-induced cell death is  
221 mediated by lysosomes and critically depends on its ability to promote homotypic  
222 adhesion in an actin-dependent manner [29]. As PCLP1 is linked to actin cytoskeleton,  
223 we investigated whether this protein could modulate obinutuzumab-induced cell  
224 death. Flow cytometric analysis of cells stained with Annexin V/7AAD showed that  
225 Raji-PCLP1 cells displayed a marked increase in the resistance to obinutuzumab-induced  
226 cell death compared to Raji-Ctrl cells (Figure 3D). Accordingly, light microscopy

227 examination revealed that Raji-Ctrl cells treated with obinutuzumab experienced a  
228 prominent increase in homotypic adhesion, visualized through the presence of large  
229 clusters of cells, indicative of an elevated cell death (Figure 3D, left). On the contrary,  
230 Raji-PCLP1 cells exhibited a modest increase in homotypic adhesion in response to  
231 obinutuzumab treatment (Figure 3D, right). These data demonstrate that PCLP1  
232 expression inhibits obinutuzumab-induced cell death.

233

### 234 **PCLP1 regulates B-cell lymphoma cell metabolism**

235 Proliferating tumor cells display increased glucose consumption and lactate production,  
236 resulting in acidification of the extracellular medium [19]. Surprisingly, we observed a  
237 decreased acidification of the culture medium from Raji-PCLP1 cells over time  
238 compared to Raji-Ctrl cells, as revealed by the retarded change of phenol-red pH  
239 indicator to yellow color and confirmed by pH quantification (Figure 4A, left),  
240 suggesting that PCLP1 regulates pH homeostasis in B-cell lymphoma cells. Recently,  
241 tumor cells have been shown to maintain pH homeostasis by producing ammonia  
242 through glutaminolysis [30]. To analyze whether PCLP1 regulates pH homeostasis  
243 through this metabolic pathway, Raji-PCLP1 and Raji-Ctrl cells were cultured in  
244 medium without glutamine. In the absence of glutamine, no differences in medium pH  
245 were found between Raji-PCLP1 cells and Raji-Ctrl cells (Figure 4A, right). These  
246 findings point to a role for PCLP1 in regulating tumor cell pH homeostasis through a  
247 process dependent on glutaminolysis.

248

249 The preceding finding suggests that PCLP1 could activate glutaminolysis pathway and  
250 increase the dependency of B-cell lymphoma cells on glutamine to survive and  
251 proliferate. PCLP1 activates MAPK oncogenic pathway [10], which is known to regulate

252 glutamine metabolism and cell proliferation. Glutamine represents an alternative source  
253 of energy and macromolecular synthesis in tumor cells deprived of glucose[31]. In the  
254 absence of glucose, Raji-PCLP1 cells showed a significantly increase in cell  
255 proliferation compared to Raji-Ctrl cells (Figure 4B, left). On the contrary, in glutamine-  
256 deprivation conditions, Raji-PCLP1 cells exhibited a decreased proliferative capacity  
257 compared to Raji-Ctrl cells (Figure 4B, middle). When cells were cultured under  
258 glucose-free conditions with decreasing concentrations of glutamine, the enhanced  
259 effect of PCLP1 on cell proliferation gradually diminishes to the levels observed in  
260 Raji-Ctrl cells, indicating that the increase in cell proliferation induced by PCLP1 in the  
261 absence of glucose is dependent on glutamine (Figure 4B, right). We next evaluated the  
262 effect of PCLP1 expression on Raji cell survival in glutamine-deprivation conditions.  
263 Decreasing concentrations of glutamine in the presence of glucose yielded a  
264 significantly higher increase in total cell death in Raji-PCLP1 cells compared to Raji-  
265 Ctrl cells (Figure 4C). Altogether, these results demonstrate that PCLP1 induces  
266 glutamine dependency and reduces glucose dependency in B-cell lymphoma cells.

267

268 In human podocytes, high-glucose levels have been shown to dramatically down-  
269 regulate PCLP1 expression which is restored to normal values when cultured under  
270 low-glucose conditions[32, 33]. We therefore explored the effect of glucose depletion on  
271 PCLP1 expression in B-cell lymphoma cells. Flow cytometry analysis showed that Raji  
272 cells experienced an increase in surface PCLP1 expression when grown in low-glucose  
273 medium (0.5 mM) compared to high-glucose medium (11 mM) (Figure 4D). These data  
274 indicate that glucose deprivation enhances PCLP1 surface expression in B-cell  
275 lymphoma cells.

276

277 **PCLP1 expression induces lipid droplet synthesis.**

278 Alteration of lipid metabolism is a hallmark of many tumors. Highly proliferative tumor  
279 cells enhance the endogenous synthesis of lipids, which excess store in the form of lipid  
280 droplets[34].The examination of Raji-PCLP1 cells by bright-field microscopy revealed  
281 the presence of a high number of cytoplasmic vesicles compared to Raji-Ctrl cells(data  
282 not shown). To unveil the vesicle composition, cells were stained with the lipophilic dye  
283 Nile Red, a marker of neutral lipids, at different time points of culture in complete  
284 medium. Fluorescence microscopy analysis showed a markedly increased accumulation of  
285 cytoplasmic neutral lipid droplets in Raji-PCLP1 cells at 48 h of culture as compared to  
286 Raji-Ctrl cells (Figure 5A). Afterwards, lipid stores gradually decreased overtime,  
287 probably due to lipolysis and lipid oxidation induced by nutrient starvation.  
288 The overexpression of PCLP1 also increased lipid storage in Jurkat human acute  
289 leukemic T cells (Figure 5B), albeit to a lower extent than in Raji cells, which indicates  
290 that PCLP1-induced lipid droplet formation is not exclusive of B-cell lymphomas.

291

292 **PCLP1-induced cell proliferation is decreased by metabolic inhibitors**

293 We next sought to examine the metabolic pathways involved in PCLP1-induced B-cell  
294 lymphoma cell proliferation using specific inhibitors that target key metabolic enzymes  
295 (Figure 6A). Therefore, Raji-PCLP1 cells and Raji-Ctrl cells were treated with  
296 increasing doses of 2-deoxy-D-glucose (2DG), a well-characterized glycolysis inhibitor  
297 (Figure 6B). Cell proliferation was slightly decreased in Raji-PCLP1 relative to Raji-Ctrl  
298 cells in response to 2DG. To evaluate the dependence of PCLP-induced B-cell  
299 lymphoma cell proliferation on glutaminolysis, we tested its sensitivity to Compound  
300 968, a selective inhibitor of glutaminase 1 (GLS1). GLS1, the first enzyme in  
301 glutaminolysis pathway, converts glutamine to glutamate and plays a crucial role in cell

302 proliferation. Treatment with Compound 968 decreased cell proliferation in Raji-PCLP1  
303 cells to a significantly greater extent than in Raji-Ctrl cells (Figure 6C). These results  
304 indicate that glutaminolysis is essential for the increase of B-cell lymphoma cell  
305 proliferation induced by PCLP1.

306

307 Contrary to normal cells, which prefer exogenous fatty acids, tumor cells depends on *de*  
308 *novofatty* acidsynthesis from tricarboxylic acid cycle-derived precursors catalyzed by  
309 fatty acid synthase (FASN)[35]. Fatty acids are used for the synthesis of membranes  
310 and signaling molecules, oxidized to produce energy, or stored in lipids droplets.As  
311 shown in Figure 6D, Raji-PCLP1 cells treated with cerulenin, a FASN inhibitor,  
312 experienced a marked suppression in proliferation compared to Raji-Ctrl cells,  
313 suggesting that PCLP1-induced B-cell lymphoma cell proliferation relies on  
314 endogenous fatty acid synthesis.

315

316 PPP is an alternative metabolic pathway for glucose metabolism that promotes cancer  
317 progression by providing tumor cells with both ribose-5-phosphate, necessary for  
318 nucleotide synthesis, and NADPH, a molecule crucial for redox homeostasis  
319 maintenance and reductive biosynthesis of lipids and nucleotides[36].Many cancer cells  
320 increase the PPP flux via activation of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), the  
321 enzyme catalyzing the first reaction of this pathway[36].To determine whether PCLP1  
322 induces B-cell lymphoma cell proliferation through PPP, we treated Raji-PCLP1 cells  
323 and Raji-Ctrl cells with 6-aminonicotinamide (6AN), a competitive inhibitor of G6PD.  
324 The inhibitory effect of 6AN on cell proliferation was strikingly more pronounced in  
325 Raji-PCLP1 cells than in Raji-Ctrl cells (Figure 6E). Microscopic examination revealed  
326 extensive cytoplasmic vacuolation in Raji-PCLP1 cells upon 6AN treatment, which were

327 absent in Raji-Ctrl cells(Supplementary FigureS2, middle panels).The subsequent  
328 addition of fresh medium without 6AN to vacuolated Raji-PCLP1 cells led to complete  
329 disappearance of the cytoplasmic vacuoles, reflecting the reversibility of the  
330 effect(Supplementary FigureS2, bottom panels). These data indicate that PCLP1  
331 enhances the dependency of B-cell lymphoma cell proliferation on PPP.

332

### 333 **DISCUSSION**

334 In this work, we show for the first time that PCLP1 enhances the proliferative and  
335 clonogenic potential of mature B-cell lymphoma cells. PCLP1 function revealed in our  
336 study resembles that described for other cell-membrane molecules expressed on B-cell  
337 lymphomas, such as B7H6, which induces cell proliferation, colony formation,  
338 migration and dexamethasone resistance [37]. Our results are in line with previous  
339 reports showing that PCLP1 induces cell proliferation in breast cancer, oral squamous  
340 cell carcinoma andglioblastoma[38, 39, 40].In breast cancer cells, PCLP1 activatesPI3K  
341 and MAPK signalingpathways [10],both implicated in proliferation, survival and  
342 progression of B-cellnon-Hodgkinlymphomas. A recent work using a mouse model has  
343 demonstrated the critical need of PI3K pathway activation besides MYC deregulation  
344 for the malignant transformation of normal B cells in BL, an aggressive B-cell  
345 lymphoma with an extremely high proliferation index[41].Ras/MAPK pathway also  
346 contributes to MYC-induced lymphomagenesis[42].These observations suggest that  
347 PCLP1 might cooperate with MYC to promote lymphomagenesis though the activation  
348 of PI3K or/andMAPK pathways in B-cell lymphoma.

349

350 Wefound that PCLP1 induces cell-to-cell adhesion of B-cell lymphoma cells through a  
351 process dependent on  $\beta_2$ -integrin, which correlates with a report demonstrating

352 the dependency of PCLP1-induced adhesion on integrin function[43]. Similarly, a  
353 previous study on B-CLL revealed the participation of  $\beta_2$ -integrin in cell-to-cell adhesion  
354 induced by CD19 [44], a major B-cell receptor independent activator of MYC-driven B-  
355 cell neoplastic growth[45]. In B-cell lines and normal B cells, adhesion mediated by the  
356 interaction of the  $\beta_2$ -integrin LFA-1 with its ligand ICAM-1 stimulates proliferation and  
357 inhibits apoptotic cell death[46]. In the same way,  $\beta_2$ -integrin-mediated intracellular  
358 signals delivered as a consequence of PCLP1-induced cell-to-cell adhesion  
359 could promote B-cell lymphoma cell proliferation and survival. Although PCLP1  
360 expressed on high endothelial venules interacts with L-selectin during lymphocyte  
361 recruitment[4], the failure of a blocking anti-L-selectin antibody to abrogate PCLP1-  
362 induced cell-to-cell adhesion in B-cell lymphoma point to another ligand as responsible  
363 for this interaction. Our data also demonstrate that forced expression of PCLP1  
364 enhances B-cell lymphoma cell migration toward CXCL12, suggesting that it might  
365 direct the dissemination of lymphoma cells to organs expressing this chemokine,  
366 including lymph nodes, lungs, liver and bones.

367

368 PCLP1-induced resistance to dexamethasone could be due to both the direct activation of  
369 PI3K/Akt or MAPK pathways and the generation of survival signals elicited by PCLP1-  
370 induced cell-to-cell adhesion. PI3K/Akt and MAPK signaling pathways have been  
371 demonstrated to mediate glucocorticoid resistance in a variety of tumors, including  
372 leukemia[47]. In support of our results, a recent report demonstrates that PCLP1  
373 confers osteosarcoma chemoresistance to cisplatin via a PI3K-dependent  
374 mechanism[13]. In oral tongue squamous cell carcinoma, PCLP1 induces  
375 chemoresistance to cisplatin through a mechanism involving BMI-1[12], an oncogene  
376 that collaborates with MYC in the development of murine lymphoma[48] and which

377 causes drug resistance in B-cell lymphoma cells[49].Our study also shows that PCLP1  
378 diminishesobinutuzumab-induced cell death, which has been recently proven to be  
379 effective in the treatment of patients with rituximab-refractory indolent non-Hodgkin  
380 lymphoma[50].These observations suggest that strategies aimed at targeting PCLP1  
381 might be beneficial for the treatment of dexamethasone- and obinutuzumab-resistantB-  
382 cell lymphomas expressing PCLP1.

383

384 To our knowledge, this is the first study reporting a role for PCLP1 in cancer  
385 metabolism reprogramming. We demonstrate that PCLP1 induces glutamine addiction  
386 and enhances cell proliferation under glucose-deprived conditions in Raji B-cell  
387 lymphoma cells, which correlates with a previous study demonstrating a key role of  
388 glutamine in Burkitt lymphoma cell survival and proliferation under glucose  
389 deficiency[31].Glutamine, the most abundant amino acid in human body, is necessary  
390 as a nitrogen donor for the synthesis of purines and pyrimidines to form the  
391 nucleotidesas well as non-essential amino acids required for cell  
392 proliferation[20].PCLP1 may enhance glutamine dependency through the activation of  
393 MAPK, known to be involved in glutaminolysis.PI3K as well as MYC act as major  
394 determinants of glucose and glutamine metabolism in lymphoma cellsby regulating  
395 essential enzymesof these metabolic pathways[21].Furthermore, PI3K/Akt pathway  
396 promotes cell survival and proliferation in glucose limiting conditions due to high  
397 nutrient consumption and dysfunctional vasculature[51]. PCLP1 might regulate cell  
398 response to glucose-starvation conditionsthrough the enhancement of  
399 glutaminolysispathwayto support lymphoma cell survival and proliferation.In  
400 accordance with this notion, our results show an increase in PCLP1 expression under  
401 low-glucose conditions in lymphoma cells.



402

403 We observed that PCLP1 increases lipid droplet formation in Raji cells, suggesting the  
404 participation of this protein in the accumulation of the cytosolic lipid vacuoles that  
405 morphologically characterized BL cells. Our results also demonstrate that B-cell  
406 lymphoma cells overexpressing PCLP1 rely on FASN activity to proliferate, which  
407 correlates with a previous study reporting up-regulated expression and activity of FASN  
408 in these tumor cells [52]. Enhanced FASN expression has been associated with tumor  
409 metastasis, chemoresistance and decreased patient survival in many tumors [53]. Under  
410 adverse environmental conditions, such as hypoxia, tumor cells increase the uptake of  
411 glutamine to synthesize *de novo* high amounts of lipids that are accumulated in lipid  
412 droplets to protect cells from oxidative and endoplasmic reticulum stress [54]. Following  
413 re-oxygenation, tumor cells use the stored lipids to support cancer cell  
414 proliferation [54]. These observations suggest that PCLP1 could induce chemoresistance  
415 through the deregulation of lipid metabolism.

416

417 Our study shows that PCLP1 overexpressing cells depend on PPP to survive and  
418 proliferate, suggesting that PCLP1 increases PPP flux. Many tumors, including  
419 DLBCL, display an enhanced PPP flux and overexpression of G6PD [55]. PPP up-  
420 regulation enhances tumor cell survival, proliferation, metastasis and chemoresistance  
421 and is associated with aggressive forms of cancers [36]. PPP provides cells with ribose-5-  
422 phosphate for the synthesis of nucleotides required to sustain rapid cell proliferation, and  
423 NADPH for reactive oxygen species neutralization and biosynthesis of lipids and  
424 deoxyriboses [36]. Thus, the shift to PPP flux in PCLP1 expressing lymphoma cells  
425 could explain the increase in cell proliferation, lipid synthesis and resistance to  
426 dexamethasone observed in our study.

427

428 We also show that PCLP1 localizes to the pericentriolar material region, the centrosome  
429 component necessary for microtubule assembly and spindle formation. PCLP1 interacts  
430 with both ezrin[56], which crosslinks plasma membrane with actin cytoskeleton and  
431 is essential for centrosome positioning, and cortactin[57], an adapter protein that mediates  
432 actin-driven centrosome separation at cell cycle G2-M transition. Furthermore, PCLP1  
433 activates the small GTPase Cdc42[58], involved in the modulation of actin and  
434 microtubules dynamics, centrosome position, spindle orientation, and chromosome  
435 segregation[59]. It is tempting to speculate that PCLP1 could regulate centrosome  
436 dynamics, influencing spindle apparatus orientation and, consequently, cell division.

437

438 In summary, our study identifies a role for PCLP1 in mature B-cell lymphomagenesis  
439 and suggests PCLP1 and the metabolic pathways essential for PCLP1-induced cell  
440 survival and proliferation as potential therapeutic targets to improve patient's survival.

441

## 442 **MATERIALS AND METHODS**

### 443 **Cell lines and primary cells**

444 Human samples were obtained from patients and healthy donors after informed consent  
445 as approved by the Ethical Committee of the hospital and in accordance with the ethical  
446 guidelines of the Declaration of Helsinki. Malignant and peripheral blood mononuclear  
447 cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. Peripheral B  
448 cells were isolated from PBMCs by negative selection using the RosetteSep human B  
449 cell enrichment cocktail technique following the manufacturer's instruction (StemCell  
450 Technologies, Vancouver, Canada). The purity of isolated B cells was more than 90%  
451 as determined by flow cytometry on the basis of CD19 expression and CD3 negativity.

452

453 Human BL cell lines Raji, Ramos and Daudi and human acute T cell leukemia cell line  
454 Jurkat were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas,  
455 Virginia, USA) and cultured in RPMI 1640 medium (Lonza, Basel,  
456 Switzerland) containing 2 mM glutamine and 11 mM glucose and supplemented with  
457 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Lonza), 100 U/ml penicillin, and 100  
458 U/ml streptomycin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) under 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

459

460 The World Health Organization (WHO) classification of neoplastic diseases of the  
461 hematopoietic and lymphoid tissues was used to classify the tumors, which included FL,  
462 WM, ALL, HCL and CLL.

463

#### 464 **Cell surface staining**

465 Cells were resuspended in staining solution (PBS supplemented with 0.1% BSA and  
466 0.01% sodium azide) and incubated with 20 µg/ml human IgG for 15 min at room  
467 temperature to block nonspecific binding due to Fc receptors. Afterwards, cells were  
468 incubated with specific monoclonal antibodies for 30 min at room temperature. For the  
469 detection of PCLP1 on Raji cell line in high and low glucose conditions, cells were  
470 incubated with phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human PCLP1 mAb (R&D  
471 Systems). For the detection of PCLP1 on B cell lines and primary patient's samples,  
472 cells were incubated with a primary anti-human PCLP1 mAb (R&D Systems) followed  
473 by a PE-conjugated anti-mouse IgG polyclonal antibody (RD Systems) and the  
474 following antibodies: CD45, CD19, CD20 (all samples), CD10 (FL), CD34 and CD10  
475 (LLA), CD103 (HCL), and CD5 (LLC) (BD Biosciences, San José, California, USA).  
476 Isotype-matched control antibodies were used to evaluate nonspecific binding. Finally,

477 after fixing with 1% formaldehyde, cells were washed, resuspended in 500 µl PBS, and  
478 analyzed on a Cytomics FC500 flow cytometer equipped with the CXP analysis  
479 software (Beckman Coulter, Brea, California, USA) or a MACSQuantAnalyzer 10 flow  
480 cytometer equipped with the MACSQuantify software (version 2.6)(MiltenyiBiotec,  
481 BergischGladbach, Germany).A minimum of 30.000 events per sample were acquired.  
482 Data are presented as median fluorescence intensity (MFI) corrected for nonspecific  
483 staining using fluorescence minus one (FMO) and isotype controls. Gating strategies for  
484 flow cytometricimmunophenotyping are depicted in Supplementary FigureS3.

485

#### 486 **Generation of stable transfected cells**

487 Rajiand Jurkatcells were transfected with pEGFP-N1 expression vector encoding  
488 hPCLP1 (a gift from Dr. R. Parrilla, CIB-CSIC) or pEGFP-N1 empty vector as a  
489 negative control using Lipofectamine® 2000 (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts,  
490 USA), according to the manufacturer´s protocol. Briefly, 1 ug DNA was pre-incubated  
491 with 1ul PlusReagent® (Thermo Fisher) in 50ulOptiMEM (Thermo Fisher) for 10  
492 minutes. Separately, 2ul Lipofectamine® 2000 was incubated with 50ulOptiMEMfor 5  
493 minutes. Afterwards, both solutions were mixed and added to  $1 \times 10^5$  cells in 500 ul of  
494 RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and 1% of non-essential amino acid solution  
495 (NEAA Gibco®) (Thermo Fisher).Cells were then seeded in 24-wellculture  
496 platescontaining 1 mL of complete RPMI medium and geneticinat a final concentration  
497 of 800 µg/ml to select cells stably expressing the indicated vector. At 72 h post-  
498 transfection, cells were cultured under limiting dilution conditions in 96-well culture  
499 plates to isolate single clones expressing PCLP1.Protein expression was confirmed by  
500 flow cytometry, microscopy, and Western blotting.Cells stably expressing pEGFP-  
501 PCLP1 or empty vector were routinely grown in complete medium supplemented with

502 geneticin at a final concentration of 400 µg/ml. The maintenance of GFP expression over  
503 time was verified by FACS.

504

#### 505 **Cell proliferation and clonogenic assay**

506 To measure cell proliferation, cells were seeded at  $10^5$  cells /ml in complete, glutamine-  
507 free or glucose-free RPMI1640 medium (Lonza). Then, cells were counted at different  
508 time points using a hemocytometer by Trypan-Blue exclusion assay. When indicated,  
509 cells were incubated in the presence of the indicated metabolic pathway inhibitors.

510

511 Clonogenic assays were performed in triplicate by adding  $2 \times 10^3$  cells to 3 ml semi-solid  
512 medium (RPMI 1640 medium containing 1.5% methylcellulose, 30% FBS, 100 U/ml  
513 penicillin, and 100 U/ml streptomycin). The mixture was then plated in a 6-well plate  
514 and maintained in culture at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> for 11 days to allow colony formation.  
515 Colonies consisting of more than 50 cells in each well were counted using an inverted  
516 microscope. Images were captured after fixing the cells with 95% methanol and staining  
517 with 0.5% crystal violet.

518

#### 519 **Cytotoxic assays**

520 Cells were incubated with different concentrations of dexamethasone (Sigma-Aldrich),  
521 hydrogen peroxide (Industrias Noriega, Asturias, Spain), obinutuzumab (a gift from  
522 Roche), 6-Aminonicotinamide (6-AN) (Vitro, Madrid, Spain) or under conditions of  
523 decreasing concentrations of glutamine (Thermo Fisher) for different time points. Cell  
524 death was determined by staining with PE-conjugated AnnexinV and 7-amino  
525 actinomycin (7AAD) (Immunostep, Salamanca, Spain) and analysed by flow cytometry.  
526 The percentage of cell death, including early apoptosis, late apoptosis and

527 necrosis(Annexin V PE positive/7ADD negative, Annexin V PE positive/7ADD  
528 positive and Annexin V PE negative/7ADD positive cells) was calculated after  
529 subtracting the percentage of spontaneous death of cells incubated with the vehicle from  
530 the total cell death using the following formula: % specific lysis = [(% lysis of target  
531 cell - % spontaneous cell death)/(100%- %spontaneous cell death)]x100.

532

### 533 **Cell-to-cell adhesion**

534 Disaggregated cells were seeded at a density of  $1 \times 10^5$  cells/ml in 8 mL of complete  
535 RPMI1640 medium and the formation of aggregates was examined at 72 hours of  
536 culture by phase contrast with a 10X objective. To examine the effect of divalent  
537 cations on aggregate formation, cells were cultured in the presence or absence of 1 mM  
538 EDTA (Sigma-Aldrich) or EGTA (Sigma-Aldrich) for 24 h. For antibody-blocking  
539 experiments, cells were placed in 96-well culture plates at a density of  $0.5-1 \times 10^6$  cells/ml  
540 in 100-150  $\mu$ l/well of complete RPMI1640 medium containing 10  $\mu$ g/ml anti-CD18  
541 (BioLegend, San Diego, California, USA), anti-CD62L (BioLegend) mAbs or anti-  
542 mouse IgG2a isotype control (BioLegend) and then incubated at 37 °C for 2 h.  
543 Photomicrographs were taken using anORCA-ER monochrome cooled-CCD camera  
544 (Hamamatsu, Hamamatsu, Japan) coupled to an Eclipse TE2000-E inverted  
545 fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and NIS-Elements AR imaging  
546 software and the number of aggregates containing more than 20 cells per field was  
547 counted.

548

### 549 **Chemotaxis assay**

550 Cell chemotaxis was monitored using 6.5-mm-diameter 24-Transwell chemotaxis  
551 chambers with polycarbonate filters of 5- $\mu$ m pore size (Corning, Corning, New York,

552 USA). Briefly, the bottom compartment was filled with 600  $\mu$ L of assay buffer (serum-  
553 free RPMI-1640 medium with 1% BSA) containing 100 ng/ml of CXCL12, and  $5 \times 10^5$   
554 cells tumor cells in 100  $\mu$ L of assay buffer were seeded in the upper compartment. A  
555 negative control without CXCL12 was included to assess random migration. After 3 h  
556 at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, the cells that had migrated to the bottom  
557 compartment were collected and counted by flow cytometry. The chemotaxis index was  
558 calculated by dividing the number of migrating cells in the presence of CXCL12 by the  
559 number of migrating cells in the absence of chemoattractant.

560

### 561 **Western blotting**

562 Cells were washed with cold PBS and lysed in ice-cold Igepallysis buffer (1% Igepal,  
563 20 mM TrisHCL, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) containing complete protease  
564 inhibitor cocktail (Sigma) and 1mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) for 30  
565 min on ice. After centrifugation at 13000 g for 20 min at 4°C, the supernatant was  
566 collected and protein concentration determined by Bradford Protein Assay (Bio-Rad,  
567 Hercules, California, USA) using a POLARstar Omega microplate reader (BMG  
568 Labtech, Ortenberg, Germany). Equal amounts of total protein were subjected to 4%-  
569 12% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and  
570 transferred to a polyvinylidene difluoride membrane using the iBlotDry Blotting System  
571 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Next, the membranes were blocked with 1% BSA in  
572 Tris-buffered saline Tween 20 and incubated overnight with an anti-podocalyxin mAb  
573 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) diluted 1:200 in blocking solution at 4  
574 °C. Following extensive washing, membranes were incubated with goat anti-mouse IgG  
575 (H+L)-HRP-conjugated antibody (Bio-Rad) at a 1:3000 dilution for 1 h at room  
576 temperature and immunoreactive proteins detected by enhanced chemiluminescence.

577 Western blot images were captured using a G:BOX Bio-Imaging System and GeneSnap  
578 software (Syngene, Cambridge, UK). Equal loading of protein samples was verified  
579 with an anti-actin monoclonal antibody (Sigma-Aldrich). A parallel blot was performed  
580 using an isotype control antibody to exclude non-specific binding.

581

## 582 **Fluorescence microscopy**

583 To determine the subcellular location of PCLP1, cells were plated on 35 mm glass-  
584 bottom dishes (Ibidi, Martinsried, Germany) and stained with Hoechst 33342 (Thermo  
585 Fisher) to visualize the nuclei. For  $\gamma$ -tubulin staining, cells were plated on poli-D-lysine  
586 coated coverslips, fixed in methanol at -20 °C for 10 min and blocked in PBS containing  
587 1% FBS and 0.1% Triton X-100 for 30 min at room temperature. Afterwards, cells were  
588 incubated with anti-tubulinmAb(BioLegend) at 1:500 dilution overnight at 4° C,  
589 followed by an incubation with Alexa Fluor 546-conjugated anti-mouse IgG  
590 antibody(Thermo Fisher) at 1:500 dilution for 1 h. Finally, cells were mounted on slides  
591 using mounting medium containing DAPI (Abcam, Cambridge, UK). Images were  
592 captured using an AxioCamMRm camera coupled to a Zeiss Observer Z1 fluorescence  
593 microscope equipped with an ApoTome.2 module and with a 63X oil immersion  
594 objective and ZEN 2 Pro software (Zeiss, Oberkochen, Germany)

595

596 To visualize lipid droplets, cells were plated on poli-D-lysine coated coverslips, fixed in  
597 3.7% paraformaldehyde for 30 min at 4°C, stained with 40  $\mu$ g/ml Nile Red (MP  
598 Biomedicals, Santa Ana, California, USA) and then mounted on slides using mounting  
599 medium containing DAPI (Ancam). Cells were examined using a Plan-Apochromat  
600 60X/1.40 NA oil-immersion objective in an Eclipse TE2000-E inverted fluorescence  
601 microscope. For lipid droplet quantification, ten fields were randomly selected and



602 images were captured with anORCA-ER monochrome cooled-CCD camera and NIS-  
603 Elements AR imaging software. Then, the total area of lipid droplets per cell was  
604 calculated using ImageJ software (National Institute of Health) and the following  
605 formula: total lipid droplet area per field/cell number per field.

606

### 607 **Statistical analysis**

608 Data are expressed as mean values  $\pm$  standard deviation of the mean (mean  $\pm$  SD).  
609 Statistical analysis was performed using Prism 3.0 Software (GraphPad) and SPSS 23.  
610 Statistical significance was calculated by two-tailed, paired Student's t-test, no-paired  
611 Student's t-test or Mann-Whitney U test. Values lower than 0.05 were considered  
612 significantly different (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

613

### 614 **ABBREVIATIONS**

615 2DG, 2-deoxy-D-glucose;6AN, 6-aminonicotinamide; 7-AAD, 7-aminoactinomycin D;  
616 B-ALL, B-cell acute lymphoblastic leukemia; BL,Burkitt lymphoma; CXCL12,C-X-C  
617 motif chemokine 12; CXCR4,chemokine receptor type 4; CLL, chronic lymphocytic  
618 leukemia/small lymphocytic lymphoma; DLBCL, diffuse large B-cell  
619 lymphoma;FASN, fatty acid synthase; FL,follicular lymphoma; GFP, green  
620 fluorescence protein; G6PD, glucose 6-phosphate dehydrogenase;HCL,hairy cell  
621 leukemia; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MCL,mantle cell lymphoma;  
622 MZL,marginal zone B-cell lymphoma; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells;  
623 PCLP1, podocalyxin-like protein 1;PI3K,phosphoinositide-3 kinase;PPP, pentose  
624 phosphate pathway; WM, lymphoplasmacytic  
625 lymphoma/Waldenströmmacroglobulinemia.

626

627 **AUTHOR CONTRIBUTION**

628 E.T.O. performed flow cytometry experiments, cell proliferation assays, cytotoxic  
629 assays, cell transfection, western blotting, statistical analysis and data interpretation and  
630 contributed to write the manuscript; L.A. contributed to cell transfection and flow  
631 cytometry experiments; M.R., N.M., and M.S. obtained and interpreted flow cytometry  
632 data; E.A. recruited the patients and performed the diagnosis; N.N. contributed to  
633 fluorescence microscopy assays; A.A. contributed to interpret the data; S.L. designed  
634 the study, performed clonogenic and chemotaxis assays, interpreted the data, and wrote  
635 the manuscript. All authors gave final approval of the manuscript.

636

637 **ACKNOWLEDGEMENTS AND FUNDINGS**

638 This work was supported by grants from the Basque Government (SaiotekSAIO12-  
639 PE12BF005) and the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Programme  
640 for Stabilization of Researchers and Research Technician and Intensification of  
641 Research Activity in the National Health System). ET was recipient of a  
642 predoctoral fellowship from the University of the Basque Country EHU/UPV and a  
643 Post-MIR fellowship from Bilbao Bizkaia Kutxa. The authors would like to thank Roche  
644 for providing free obinutuzumab.

645

646 **CONFLICT OF INTEREST**

647 The authors declare no conflict of interest.

648

649 **REFERENCES**

650 1. Nielsen JS, McNagny KM. The role of podocalyxin in health and disease. *J Am*  
651 *Soc Nephrol.* 2009; 20:1669-76.

- 652 2. Stanhope-Baker P, Kessler PM, Li W, Agarwal ML, Williams BR. The Wilms  
653 tumor suppressor-1 target gene podocalyxin is transcriptionally repressed by p53. *J Biol*  
654 *Chem.* 2004; 279:33575-85.
- 655 3. Doyonnas R, Kershaw DB, Duhme C, Merkens H, Chelliah S, Graf T, McNagny  
656 KM. Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related  
657 protein podocalyxin. *J Exp Med.* 2001; 194:13-27.
- 658 4. Sassetti C, Tangemann K, Singer MS, Kershaw DB, Rosen SD. Identification of  
659 podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to  
660 CD34. *J Exp Med.* 1998; 187:1965-75.
- 661 5. Somasiri A, Nielsen JS, Makretsov N, McCoy ML, Prentice L, Gilks CB, Chia  
662 SK, Gelmon KA, Kershaw DB, Huntsman DG, McNagny KM, Roskelley CD.  
663 Overexpression of the anti-adhesin podocalyxin is an independent predictor of breast  
664 cancer progression. *Cancer Res.* 2004; 64:5068-73.
- 665 6. Larsson A, Johansson ME, Wangefjord S, Gaber A, Nodin B, Kucharzewska P,  
666 Welinder C, Belting M, Eberhard J, Johnsson A, Uhlen M, Jirstrom K. Overexpression  
667 of podocalyxin-like protein is an independent factor of poor prognosis in colorectal  
668 cancer. *Br J Cancer.* 2011; 105:666-72.
- 669 7. Casey G, Neville PJ, Liu X, Plummer SJ, Cicek MS, Krumroy LM, Curran AP,  
670 McGreevy MR, Catalona WJ, Klein EA, Witte JS. Podocalyxin variants and risk of  
671 prostate cancer and tumor aggressiveness. *Hum Mol Genet.* 2006; 15:735-41.
- 672 8. Cipollone JA, Graves ML, Kobel M, Kalloger SE, Poon T, Gilks CB, McNagny  
673 KM, Roskelley CD. The anti-adhesive mucin podocalyxin may help initiate the  
674 transperitoneal metastasis of high grade serous ovarian carcinoma. *Clin Exp Metastasis.*  
675 2012; 29:239-52.

- 676 9. Hsu YH, Lin WL, Hou YT, Pu YS, Shun CT, Chen CL, Wu YY, Chen JY, Chen  
677 TH, Jou TS. Podocalyxin EBP50 ezrin molecular complex enhances the metastatic  
678 potential of renal cell carcinoma through recruiting Rac1 guanine nucleotide exchange  
679 factor ARHGEF7. *Am J Pathol.* 2010; 176:3050-61.
- 680 10. Sizemore S, Cicek M, Sizemore N, Ng KP, Casey G. Podocalyxin increases the  
681 aggressive phenotype of breast and prostate cancer cells in vitro through its interaction  
682 with ezrin. *Cancer Res.* 2007; 67:6183-91.
- 683 11. Meng X, Ezzati P, Wilkins JA. Requirement of podocalyxin in TGF-beta induced  
684 epithelial mesenchymal transition. *PLoS One.* 2011; 6:e18715.
- 685 12. Zhou Y, Zhang L, Pan H, Wang B, Yan F, Fang X, Munnee K, Tang Z. Bmi1  
686 essentially mediates podocalyxin-enhanced Cisplatin chemoresistance in oral tongue  
687 squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2015; 10:e0123208.
- 688 13. Huang Z, Huang Y, He H, Ni J. Podocalyxin promotes cisplatin chemoresistance  
689 in osteosarcoma cells through phosphatidylinositide 3-kinase signaling. *Mol Med Rep.*  
690 2015; 12:3916-22.
- 691 14. Kelley TW, Huntsman D, McNagny KM, Roskelley CD, Hsi ED. Podocalyxin:  
692 a marker of blasts in acute leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2005; 124:134-42.
- 693 15. Favreau AJ, McGlaufflin RE, Duarte CW, Sathyanarayana P. miR-199b, a novel  
694 tumor suppressor miRNA in acute myeloid leukemia with prognostic implications. *Exp*  
695 *Hematol Oncol.* 2015; 5:4.
- 696 16. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R,  
697 Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health  
698 Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016; 127:2375-90.

- 699 17. Vaque JP, Martinez N, Batlle-Lopez A, Perez C, Montes-Moreno S, Sanchez-  
700 Beato M, Piris MA. B-cell lymphoma mutations: improving diagnostics and enabling  
701 targeted therapies. *Haematologica*. 2014; 99:222-31.
- 702 18. Bonavida B. Postulated mechanisms of resistance of B-cell non-Hodgkin  
703 lymphoma to rituximab treatment regimens: strategies to overcome resistance. *Semin*  
704 *Oncol*. 2014; 41:667-77.
- 705 19. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev*  
706 *Cancer*. 2011; 11:85-95.
- 707 20. DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in  
708 metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*. 2010; 29:313-24.
- 709 21. Calvo-Vidal MN, Cerchietti L. The metabolism of lymphomas. *Curr Opin*  
710 *Hematol*. 2013; 20:345-54.
- 711 22. Kershaw DB, Beck SG, Wharram BL, Wiggins JE, Goyal M, Thomas PE,  
712 Wiggins RC. Molecular cloning and characterization of human podocalyxin-like  
713 protein. Orthologous relationship to rabbit PCLP1 and rat podocalyxin. *J Biol Chem*.  
714 1997; 272:15708-14.
- 715 23. Lopez-Giral S, Quintana NE, Cabrerizo M, Alfonso-Perez M, Sala-Valdes M,  
716 De Soria VG, Fernandez-Ranada JM, Fernandez-Ruiz E, Munoz C. Chemokine  
717 receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly  
718 expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with  
719 widespread nodular dissemination. *J Leukoc Biol*. 2004; 76:462-71.
- 720 24. McNagny KM, Hughes MR, Graves ML, DeBruin EJ, Snyder K, Cipollone J,  
721 Turvey M, Tan PC, McColl S, Roskelley CD. Podocalyxin in the Diagnosis and  
722 Treatment of Cancer. In *Advances in Cancer Management*, Mohan, R., Ed. InTech:  
723 Rijeka, Croatia, 2012.

- 724 25. Sionov RV, Spokoini R, Kfir-Erenfeld S, Cohen O, Yefenof E. Mechanisms  
725 regulating the susceptibility of hematopoietic malignancies to glucocorticoid-induced  
726 apoptosis. *Adv Cancer Res.* 2008; 101:127-248.
- 727 26. Tome ME, Jaramillo MC, Briehl MM. Hydrogen peroxide signaling is required  
728 for glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoma cells. *Free Radic Biol Med.* 2011;  
729 51:2048-59.
- 730 27. Mössner E, Brünker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C, Herter S, Grau R,  
731 Gerdes C, Nopora A, van Puijenbroek E, Ferrara C, Sondermann P, Jäger C, et al.  
732 Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type  
733 II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell  
734 cytotoxicity. *Blood.* 2010; 115:4393-402.
- 735 28. Herting F, Friess T, Bader S, Muth G, Hölzlwimmer G, Rieder N, Umana P,  
736 Klein C. Enhanced anti-tumor activity of the glycoengineered type II CD20 antibody  
737 obinutuzumab (GA101) in combination with chemotherapy in xenograft models of  
738 human lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2014; 55:2151-60.
- 739 29. Alduaij W, Ivanov A, Honeychurch J, Cheadle EJ, Potluri S, Lim SH, Shimada  
740 K, Chan CHT, Tutt A, Beers SA, Glennie MJ, Cragg MS, Illidge TM. Novel type II  
741 anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-  
742 dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood.* 2011;  
743 117:4519-29.
- 744 30. Wang L, Zhou H, Wang Y, Cui G, Di LJ. CtBP maintains cancer cell growth  
745 and metabolic homeostasis via regulating SIRT4. *Cell Death Dis.* 2015; 6:e1620.
- 746 31. Le A, Lane AN, Hamaker M, Bose S, Gouw A, Barbi J, Tsukamoto T, Rojas CJ,  
747 Slusher BS, Zhang H, Zimmerman LJ, Liebler DC, Slebos RJ, et al. Glucose-

748 independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B  
749 cells. *Cell Metab.* 2012; 15:110-21.

750 32. Economou CG, Kitsiou PV, Tzinia AK, Panagopoulou E, Marinos E, Kershaw  
751 DB, Kerjaschki D, Tsilibary EC. Enhanced podocalyxin expression alters the structure  
752 of podocyte basal surface. *J Cell Sci.* 2004; 117:3281-94.

753 33. Tsotakos NE, Sagnou M, Kotsopoulou ES, Tsilibary EC, Drossopoulou GI.  
754 Glucose-induced gradual phenotypic modulation of cultured human glomerular  
755 epithelial cells may be independent of Wilms' tumor 1 (WT1). *BMC Cell Biol.* 2013;  
756 14:28.

757 34. Santos CR, Schulze A. Lipid metabolism in cancer. *Febs J.* 2012; 279:2610-23.

758 35. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in  
759 cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7:763-77.

760 36. Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem*  
761 *Sci.* 2014; 39:347-54.

762 37. Wu F, Wang J, Ke X. Knockdown of B7-H6 inhibits tumor progression and  
763 enhances chemosensitivity in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Int J Oncol.* 2016;  
764 48:1561-70.

765 38. Snyder KA, Hughes MR, Hedberg B, Brandon J, Hernaez DC, Bergqvist P, Cruz  
766 F, Po K, Graves ML, Turvey ME, Nielsen JS, Wilkins JA, McColl SR, et al.  
767 Podocalyxin enhances breast tumor growth and metastasis and is a target for  
768 monoclonal antibody therapy. *Breast Cancer Res.* 2015; 17:46.

769 39. Lin CW, Sun MS, Wu HC. Podocalyxin-like 1 is associated with tumor  
770 aggressiveness and metastatic gene expression in human oral squamous cell carcinoma.  
771 *Int J Oncol.* 2014; 45:710-8.

- 772 40. Binder ZA, Siu IM, Eberhart CG, Ap Rhys C, Bai RY, Staedtke V, Zhang H,  
773 Smoll NR, Piantadosi S, Piccirillo SG, Dimeco F, Weingart JD, Vescovi A, et al.  
774 Podocalyxin-like protein is expressed in glioblastoma multiforme stem-like cells and is  
775 associated with poor outcome. *PLoS One*. 2013; 8:e75945.
- 776 41. Sander S, Calado DP, Srinivasan L, Kochert K, Zhang B, Rosolowski M, Rodig  
777 SJ, Holzmann K, Stilgenbauer S, Siebert R, Bullinger L, Rajewsky K. Synergy between  
778 PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis. *Cancer Cell*. 2012; 22:167-79.
- 779 42. Gramling MW, Eischen CM. Suppression of Ras/Mapk pathway signaling  
780 inhibits Myc-induced lymphomagenesis. *Cell Death Differ*. 2012; 19:1220-7.
- 781 43. Larrucea S, Butta N, Arias-Salgado EG, Alonso-Martin S, Ayuso MS, Parrilla R.  
782 Expression of podocalyxin enhances the adherence, migration, and intercellular  
783 communication of cells. *Exp Cell Res*. 2008; 314:2004-15.
- 784 44. Behr SI, Korinth D, Schriever F. Differential adhesion pattern of B cell chronic  
785 lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 1998; 12:71-7.
- 786 45. Chung EY, Psathas JN, Yu D, Li Y, Weiss MJ, Thomas-Tikhonenko A. CD19 is  
787 a major B cell receptor-independent activator of MYC-driven B-lymphomagenesis. *J*  
788 *Clin Invest*. 2012; 122:2257-66.
- 789 46. Sumimoto S, Heike T, Kanazashi S, Shintaku N, Jung EY, Hata D, Katamura K,  
790 Mayumi M. Involvement of LFA-1/intracellular adhesion molecule-1-dependent cell  
791 adhesion in CD40-mediated inhibition of human B lymphoma cell death induced by  
792 surface IgM crosslinking. *J Immunol*. 1994; 153:2488-96.
- 793 47. Jones CL, Gearheart CM, Fosmire S, Delgado-Martin C, Evensen NA, Bride K,  
794 Waanders AJ, Pais F, Wang J, Bhatla T, Bitterman DS, de Rijk SR, Bourgeois W, et el.  
795 MAPK signaling cascades mediate distinct glucocorticoid resistance mechanisms in  
796 pediatric leukemia. *Blood*. 2015; 126:2202-12.



797 48. Haupt Y, Bath ML, Harris AW, Adams JM. bmi-1 transgene induces  
798 lymphomas and collaborates with myc in tumorigenesis. *Oncogene*. 1993; 8:3161-4.

799 49. Bhattacharyya J, Mihara K, Ohtsubo M, Yasunaga S, Takei Y, Yanagihara K,  
800 Sakai A, Hoshi M, Takihara Y, Kimura A. Overexpression of BMI-1 correlates with  
801 drug resistance in B-cell lymphoma cells through the stabilization of survivin  
802 expression. *Cancer Sci*. 2012; 103:34-41.

803 50. Sehn LH, Chua N, Mayer J, Dueck G, Trneny M, Bouabdallah K, Fowler N,  
804 Delwail V, Press O, Salles G, Gribben J, Lennard A, Lugtenburg PJ, et al.  
805 Obinutuzumab plus bendamustine versus bendamustine monotherapy in patients with  
806 rituximab-refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (GADOLIN): a randomised,  
807 controlled, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016; 17:1081-93.

808 51. Gao M, Liang J, Lu Y, Guo H, German P, Bai S, Jonasch E, Yang X, Mills GB,  
809 Ding Z. Site-specific activation of AKT protects cells from death induced by glucose  
810 deprivation. *Oncogene*. 2014; 33:745-55.

811 52. Bhatt AP, Jacobs SR, Freemerman AJ, Makowski L, Rathmell JC, Dittmer DP,  
812 Damania B. Dysregulation of fatty acid synthesis and glycolysis in non-Hodgkin  
813 lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:11818-23.

814 53. Ventura R, Mordec K, Waszczuk J, Wang Z, Lai J, Fridlib M, Buckley D,  
815 Kemble G, Heuer TS. Inhibition of de novo Palmitate Synthesis by Fatty Acid Synthase  
816 Induces Apoptosis in Tumor Cells by Remodeling Cell Membranes, Inhibiting  
817 Signaling Pathways, and Reprogramming Gene Expression. *EBioMedicine*. 2015;  
818 2:808-24.

819 54. Deep G, Schlaepfer IR. Aberrant Lipid Metabolism Promotes Prostate Cancer:  
820 Role in Cell Survival under Hypoxia and Extracellular Vesicles Biogenesis. *Int J Mol*  
821 *Sci*. 2016; 17:1061.

822 55. Jiang P, Du W, Wu M. Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer.  
823 Protein Cell. 2014; 5:592-602.

824 56. Orlando RA, Takeda T, Zak B, Schmieder S, Benoit VM, McQuistan T,  
825 Furthmayr H, Farquhar MG. The glomerular epithelial cell anti-adhesin podocalyxin  
826 associates with the actin cytoskeleton through interactions with ezrin. J Am Soc  
827 Nephrol. 2001, 12:1589-98.

828 57. Kobayashi T, Notoya M, Shinosaki T, Kurihara H. Cortactin interacts with  
829 podocalyxin and mediates morphological change of podocytes through its  
830 phosphorylation. Nephron Exp Nephrol. 2009; 113:e89-96.

831 58. Fernandez D, Horrillo A, Alquezar C, Gonzalez-Manchon C, Parrilla R, Ayuso  
832 MS. Control of cell adhesion and migration by podocalyxin. Implication of Rac1 and  
833 Cdc42. Biochem Biophys Res Commun. 2013; 432:302-7.

834 59. Mitsushima M, Toyoshima F, Nishida E. Dual role of Cdc42 in spindle  
835 orientation control of adherent cells. Mol Cell Biol. 2009; 29:2816-27.

836

837

838

839

840

841

842

843

844

845

846

847 **FIGURE LEGENDS**

848 **Figure 1:PCLP1 expression in mature B-cell lymphomas.** A.PCLP1 expression on  
849 the surface of B cell lines by flow cytometry.The grey line and the red line in the  
850 histograms represent isotype control (anti-mouse IgG1) and PCLP1 staining (anti-  
851 PCLP1 mAb), respectively.B.TotalPCLP1 expression in B cell lines and B cells from  
852 healthy donors analyzed by Western blot.Actin is shown as a loading control.C.  
853 Representative fluorescence microscope images of Raji-PCLP1 cells showing the  
854 localization of PCLP1 (green) to cell surface (I), vesicles (II), and centrosome (III),  
855 using a 60X objective. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue).  
856 **D.**Representative fluorescence microscope images of Raji-PCLP1 cells showing PCLP1  
857 localization (green) to the pericentriolar area at different cell-cycle phases. Cells were  
858 stained with anti- $\gamma$ -tubulin mAb (red) to visualize the centrioles and DAPI (blue) for  
859 nuclei detection.Insets at lower right corner show amplified images of the centrosomal  
860 region. The size bar indicates 5  $\mu$ m.E.PCLP1 expression was determined on the surface  
861 of malignant and normal B cells from 11 patients with different lymphoma subtypes and  
862 3 patients with ALL by flow cytometry. Median fluorescence intensity (MFI) of PCLP1  
863 expression on malignant B cells was normalized to that detected on normal B cells. FL:  
864 follicular lymphoma; WM: Waldenströmmacroglobulinemia; B-ALL: B-cell acute  
865 lymphoblastic leukemia; HCL: hairy cell leukemia; CLL: chronic lymphocytic  
866 leukemia.

867

868 **Figure 2:Exogeneous expression of PCLP1 induces lymphoma cell proliferation,**  
869 **clonogenicity, cell-to-cell adhesion, and chemotaxis.** Raji cells were transfected with  
870 pEGFP-PCLP1 (Raji-PCLP1) or pEGFP (Raji-Ctrl). A.Whole cell extracts from three  
871 different clones were analyzed for the expression of PCLP1 by Western-blotting using

872 an anti-hPCLP1 mAb. Actin is shown as a loading control. **B.** Cell proliferation was  
873 measured counting the number of viable cells at different time points of culture using  
874 the trypan blue exclusion assay. **C.** Raji-PCLP1 and Raji-Ctrl cells were cultured in  
875 methylcellulose medium for 11 days and the number of colonies were counted and  
876 photographed. The graph depicts the number of colonies per well from four independent  
877 experiments performed in triplicate. Representative microscope images of colony  
878 formation are shown. Statistical analysis of mean  $\pm$ SD was calculated using two-tailed  
879 paired Student's t-test. \*\*\*P < 0.001. **D.** Cell-to-cell adhesion was calculated as the  
880 number of cell aggregates formed at 72 h of culture. Representative microscope images  
881 of cell aggregates using a 10X objective are shown. The size bar indicates 100  
882  $\mu$ m. **E.** Cells were incubated in the presence of anti-CD62L mAb or isotype control  
883 (mIgG1) (left) or in the presence of anti-CD18 mAb or mIgG1 (right) and the number of  
884 aggregates were counted at 2 h. Cells were cultured in the presence of 1 mM EDTA, 1  
885 mM EGTA or vehicle and the number of aggregates were counted at 24 h (middle). The  
886 graphs in D and E represent the mean  $\pm$ SD of the number of aggregates per field  
887 containing more than 20 cells from 3 independent experiments and analyzing 10 fields in  
888 each experiment. Statistical analysis was calculated using no-paired Student's t-test (d)  
889 and Mann-Whitney U test (e, f, g). \*\*P < 0.01 \*\*\*P < 0.001. **F.** Chemotactic migration of  
890 Raji-PCLP1 or Raji-Ctrl toward 100 ng/ml CXCL12 using Transwell chambers. Data  
891 represents the mean chemotactic index  $\pm$ SD normalized to control cells from six  
892 independent experiments. Statistical analysis was calculated using Mann-Whitney U  
893 test \*\*P < 0.01

894

895 **Figure 3: PCLP1 provides resistance to dexamethasone, reactive oxygen species**  
896 **and obinutuzumab-induced death in B-cell lymphoma cells. A.** Raji-Ctrl and Raji-

897 PCLP1 cells were treated with increasing concentrations of vehicle or dexamethasone  
898 for 72 hours and cell death was analyzed after Annexin V-PE/7AAD staining by flow  
899 cytometry. The mean percentages  $\pm$ SD of total cell death including early apoptosis, late  
900 apoptosis and necrotic cells from six independent experiments after subtracting the  
901 spontaneous cell death (vehicle) is shown (left). Representative dot plots showing  
902 Annexin V/7AAD staining in cells treated with vehicle or 1000  $\mu$ M dexamethasone are  
903 shown. **B.** The expression of PCLP1 was analyzed on Annexin V and 7AAD double-  
904 negative population of cells treated with dexamethasone or vehicle by flow  
905 cytometry. **C.** Raji-Ctrl and Raji-PCLP1 cells were treated with increasing concentrations  
906 of vehicle or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 6 h and cell death was analyzed as indicated in A. The graph  
907 shows the mean percentages  $\pm$ SD of total cell death from five independent  
908 experiments after subtracting the spontaneous cell death (vehicle). Representative dot  
909 plots showing Annexin V/7AAD staining in cells treated with vehicle or 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
910 are shown. **D.** Cells were incubated overnight with increasing concentrations of  
911 obinutuzumab or vehicle and cell viability was measured based on Annexin V/7AAD  
912 double negative staining relative to vehicle-treated cells. Data show the mean  
913 percentages  $\pm$ SD of viable cells from six independent experiments. **E.** A representative  
914 image of the homotypic adhesion induced by obinutuzumab as visualized by light  
915 microscopy is shown. The size bar indicates 100  $\mu$ m. Statistical analysis was calculated  
916 using two-tailed paired Student's t-test. \*P < 0.05. \*\*P < 0.01. \*\*\*P < 0.001.

917

918 **Figure 4: PCLP1 regulates B-cell lymphoma cell metabolism.** **A.** Determination of  
919 pH in Raji-PCLP1 or Raji-Ctrl cell culture medium containing glutamine (complete  
920 medium) (left) or in the absence of glutamine (right) at the indicated time points.  
921 Photographs of Raji-PCLP1 and Raji-Ctrl cell cultures from a representative experiment

922 are shown. **B.** Proliferation of Raji-PCLP1 and Raji-Ctrl cells under glucose (left) or  
923 glutamine starvation (middle) conditions at different time points. The number of viable  
924 cells was normalized to their counterparts grown in complete medium. Data show the  
925 mean $\pm$ SD of five independent experiments. Proliferation of Raji-PCLP1 and Raji-Ctrl  
926 cells under glucose-starvation conditions and decreasing concentrations of glutamine at  
927 72 h of culture (right). The number of viable cells was normalized to their counterparts  
928 grown in complete medium. Data show the mean $\pm$ SD of six independent  
929 experiments. **C.** Cells were incubated in the presence of glucose and decreasing  
930 concentration of glutamine and the percentage of cell death was determined at 72 h of  
931 culture as indicated in Figure 3A. Data show the mean $\pm$ SD of five independent  
932 experiments. Representative dot plots showing Annexin V/7AAD staining in cells  
933 treated with complete medium (2 mM glutamine/11 mM glucose) or glutamine free  
934 medium (0 mM glutamine/11 mM glucose) are depicted. **D.** Raji cells were cultured in  
935 high-glucose medium (11 mM) or low-glucose medium (0.5 mM) for 72 h and the  
936 expression of PCLP1 on cell surface was determined by flow cytometry. Data show  
937 MFI of PCLP1 expression from five independent experiments. Statistical analysis was  
938 calculated using two-tailed paired Student's t-test. \*P < 0.05. \*\*P < 0.01. \*\*\*P < 0.001.  
939

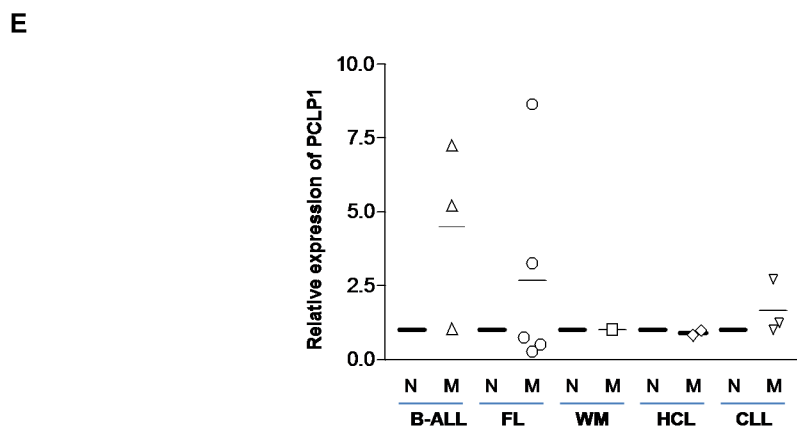
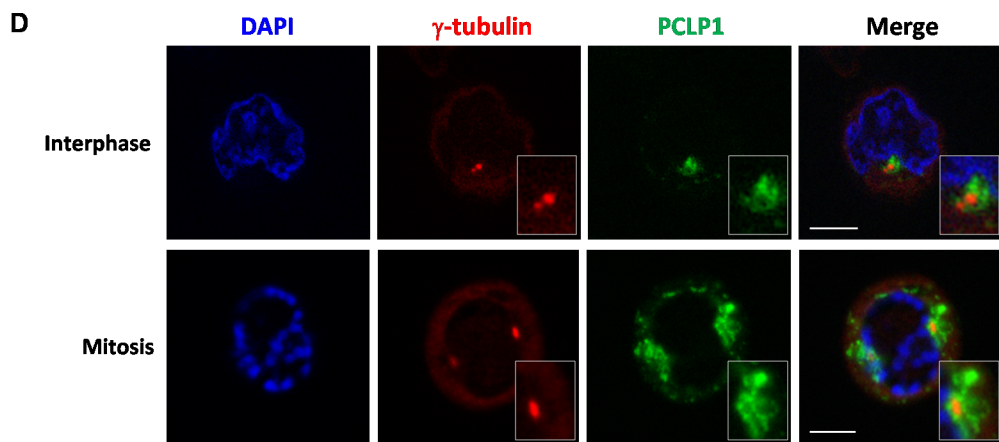
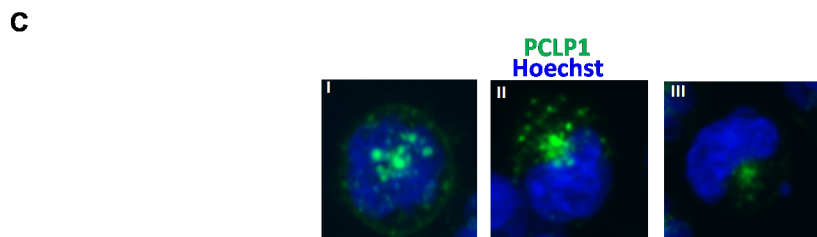
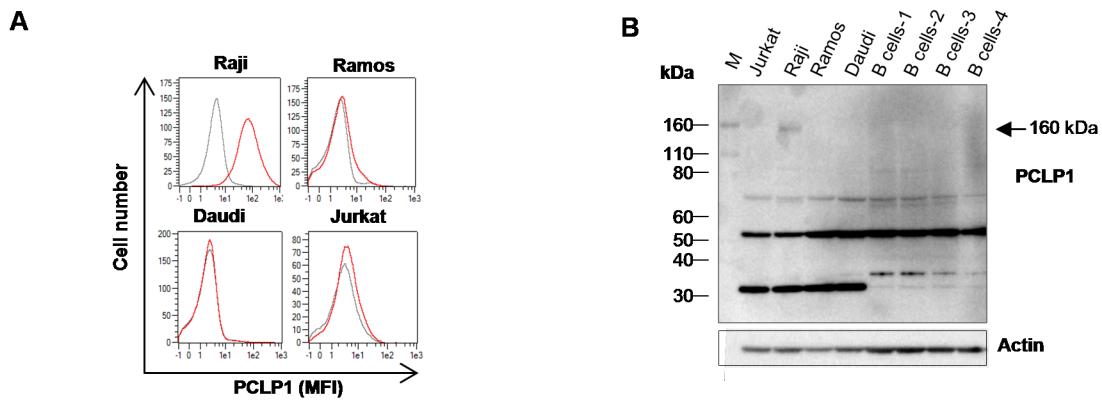
940 **Figure 5: PCLP1 induces lipid droplet synthesis.** Raji-PCLP1 and Raji-Ctrl cells (**A**)  
941 or Jurkat-PCLP1 and Jurkat-Ctrl cells (**B**) were cultured at different time points and  
942 stained with Nile Red for the detection of neutral lipid droplets. The data represent the  
943 mean area  $\pm$ SD of lipid droplets per cell as determined using ImageJ  
944 software. Representative fluorescence microscopy images using a 60X oil objective show  
945 lipid droplets (right panels, yellow). Nuclei were labeled with DAPI (left panels,

946 blue).The size bar indicates 10  $\mu$ m.Statistical analysis was calculated using Mann-  
947 Whitney U test. \*P < 0.05. \*\*P < 0.01. \*\*\*P < 0.001

948

949 **Figure 6: Effect of metabolic inhibitors on PCLP1-induced cell proliferation.**

950 **A.**Schematic representation of cancer cell metabolism. Once transported into cells,  
951 glucose is phosphorylated to glucose 6-phosphate by hexokinases. Glucose 6-phosphate  
952 can then be metabolized via aerobic glycolysis or PPP. Through the aerobic glycolysis,  
953 glucose 6-phosphate is sequentially converted to pyruvate. Afterwards, pyruvate is  
954 transformed to acetyl-CoA via TCA or to lactate. Acetyl-CoA can be used for the  
955 synthesis of fatty acids and lipids for biomembrane generation. Glucose 6-phosphate  
956 that enters PPP generates ribose, for nucleotides synthesis, and NADPH, for FA  
957 synthesis.Glutamine provides intermediates to maintain TCA function and contributes  
958 to lipid synthesis and the production of purines and pyrimidines for nucleotide  
959 synthesis. Glucose and glutamine also provide the carbon and nitrogen necessary for the  
960 synthesis of nonessential amino acids. Metabolic inhibitors are depicted in red color.  
961 2DG: 2-deoxyglucose; 6AN: 6 aminonicotinamide. **B., D., E.**Raji-PCLP1 and Raji-Ctrl  
962 cells were cultured in the presence of vehicle or increasing concentrations of the 2DG  
963 (glycolysis inhibitor) (B), cerulenin (fatty acid synthase inhibitor) (D), or 6AN (PPP  
964 inhibitor) for 72 h (E). **C.**To determine the effect of compound 968 (glutaminase  
965 inhibitor) on cell proliferation, cells were cultured for 7 days. The number of viable  
966 cells was normalized to their counterparts grown in the presence of vehicle. Data show  
967 the mean  $\pm$ SD of five independent experiments. Cell proliferation was expressed as  
968 mean  $\pm$ SD percentage relative to vehicle-treated cells. Statistical analysis was calculated  
969 using two-tailed paired Student's t-test. \*P < 0.05. \*\*P < 0.01. \*\*\*P < 0.001.



**Figure 1**



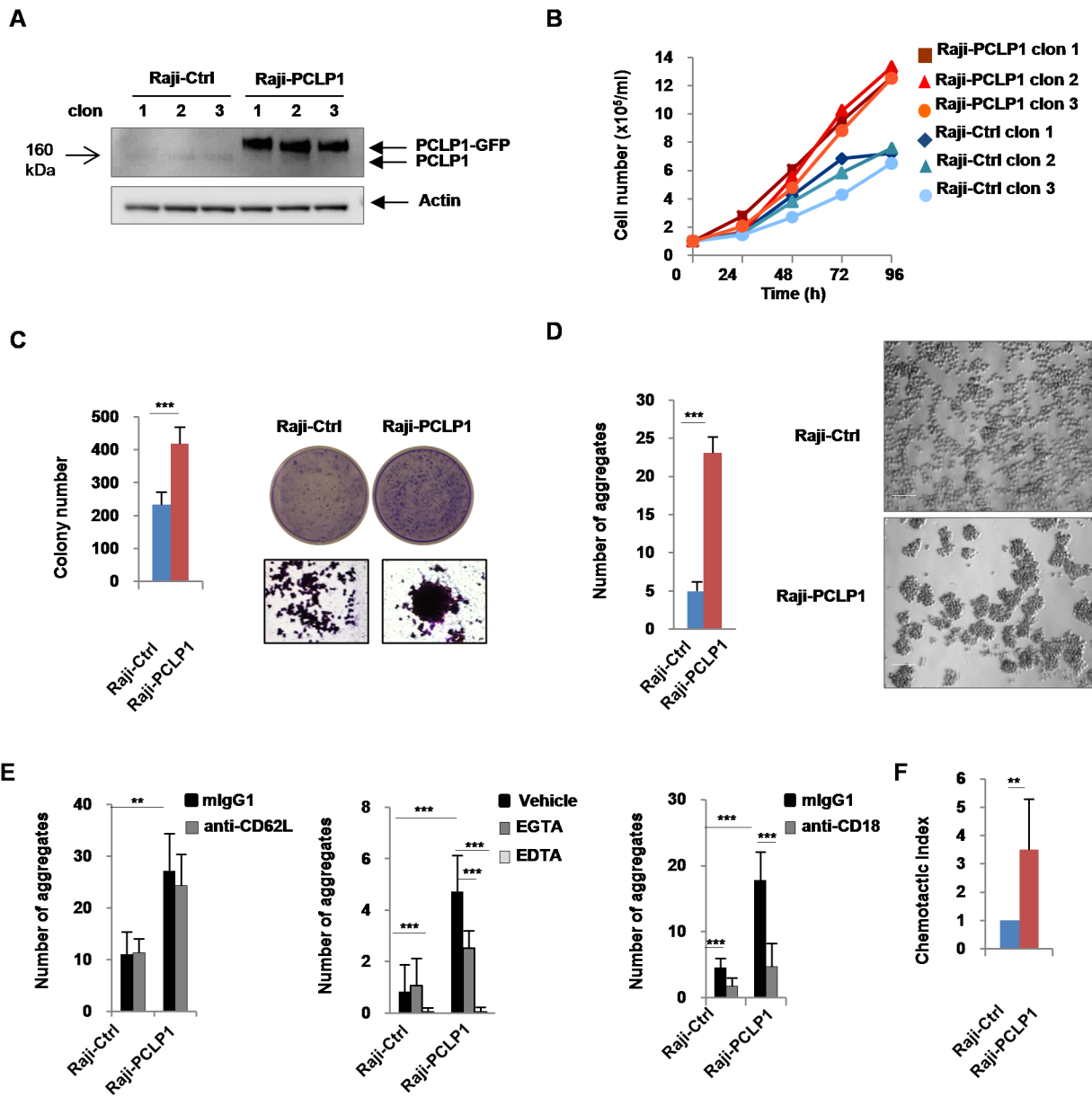
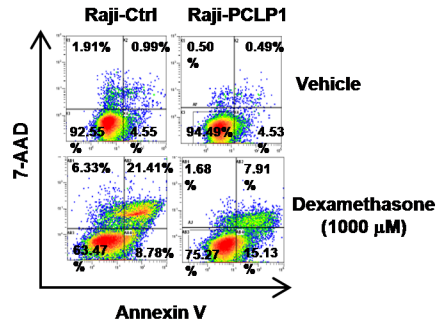
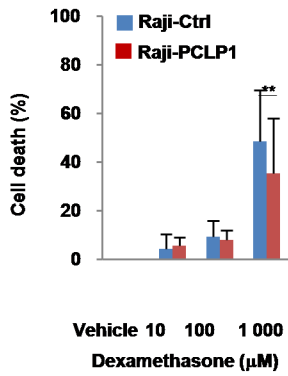
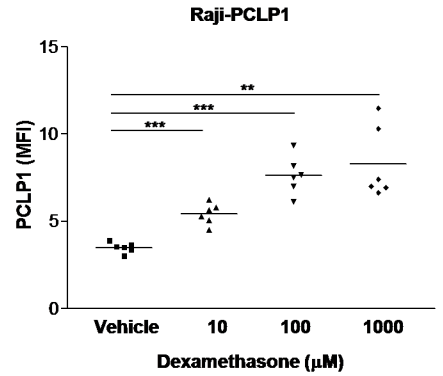


Figure 2

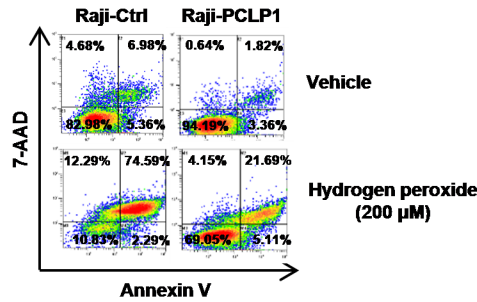
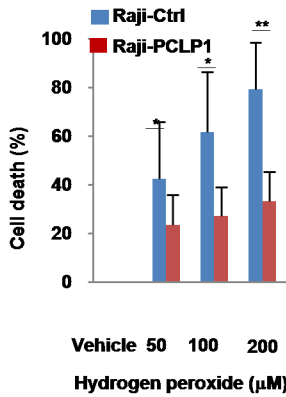
**A**



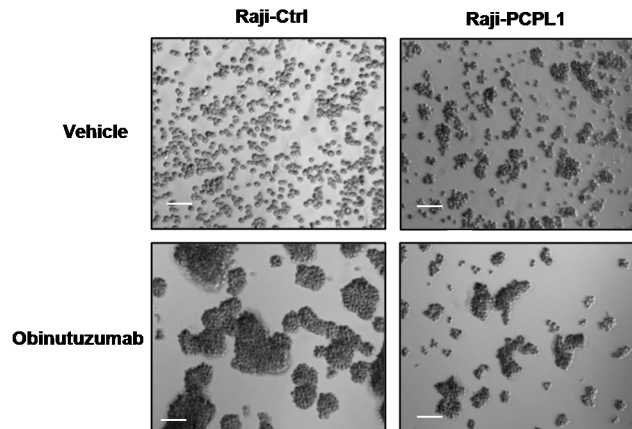
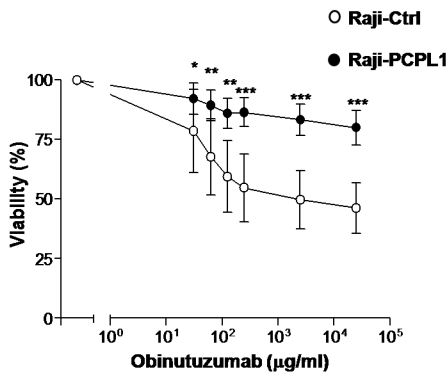
**B**



**C**

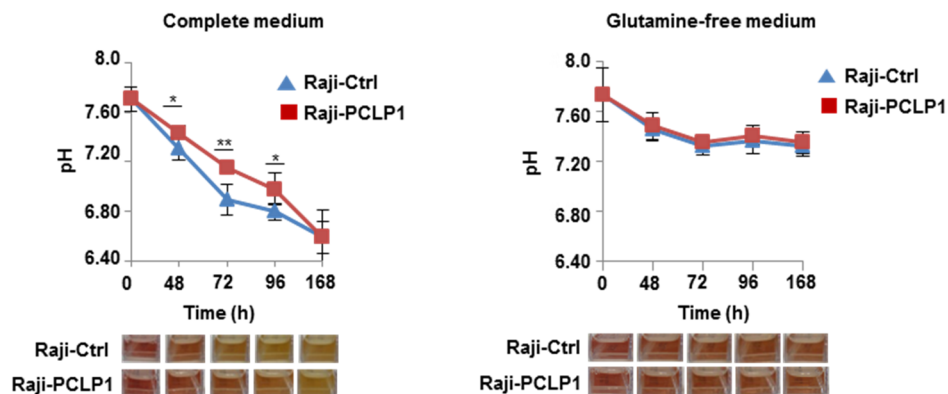


**D**

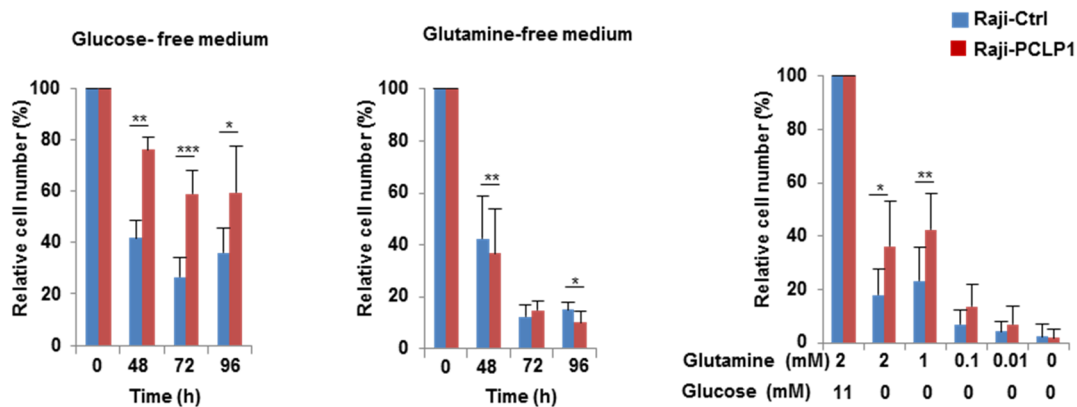


**Figure 3**

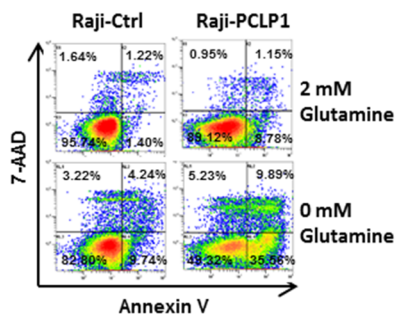
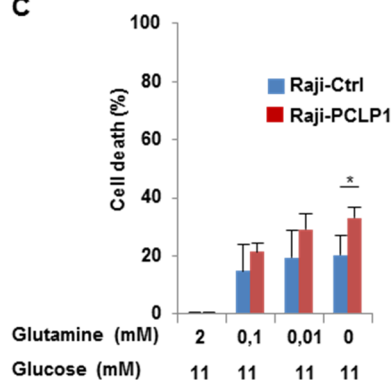
**A**



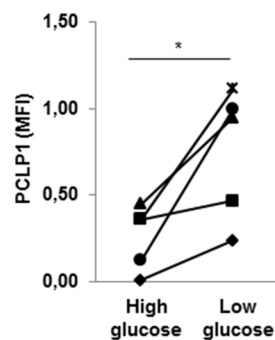
**B**



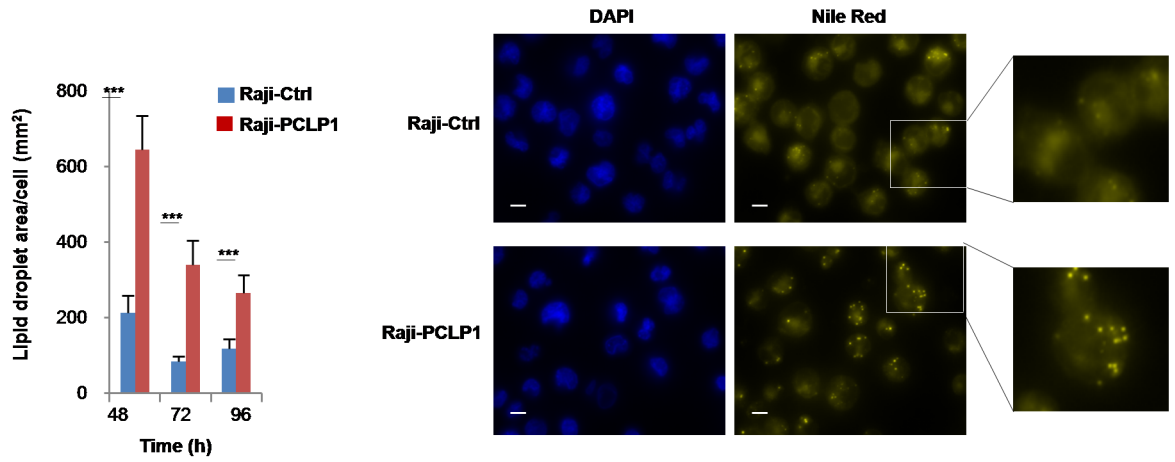
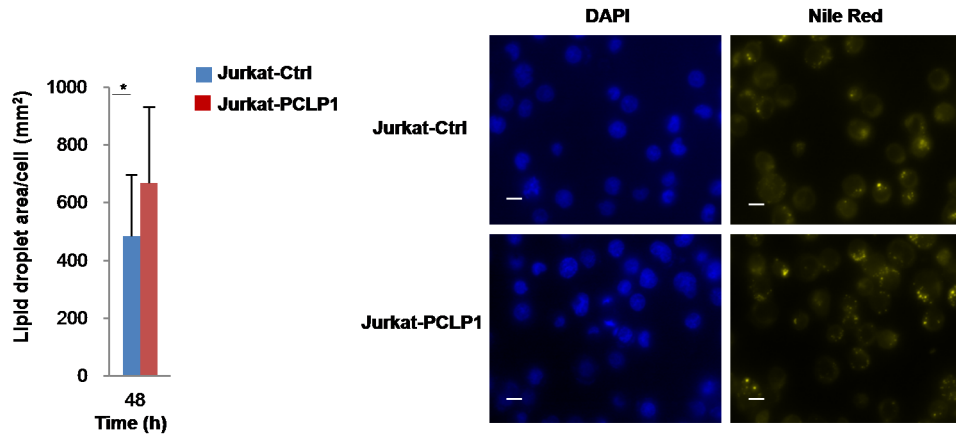
**C**



**D**



**Figure 4**

**A****B****Figure 5**

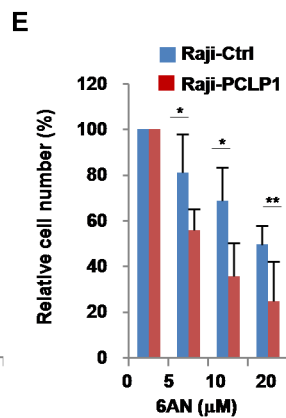
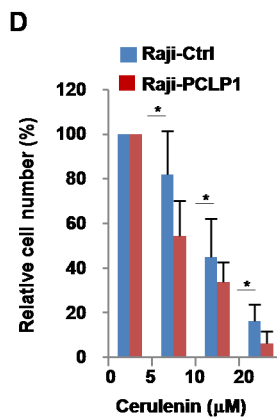
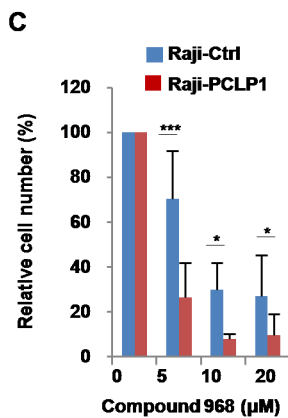
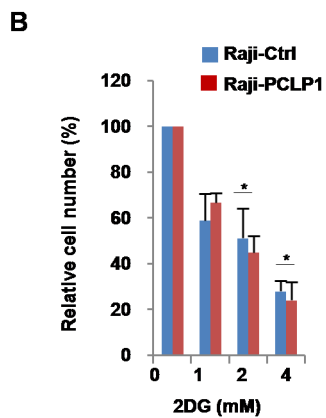
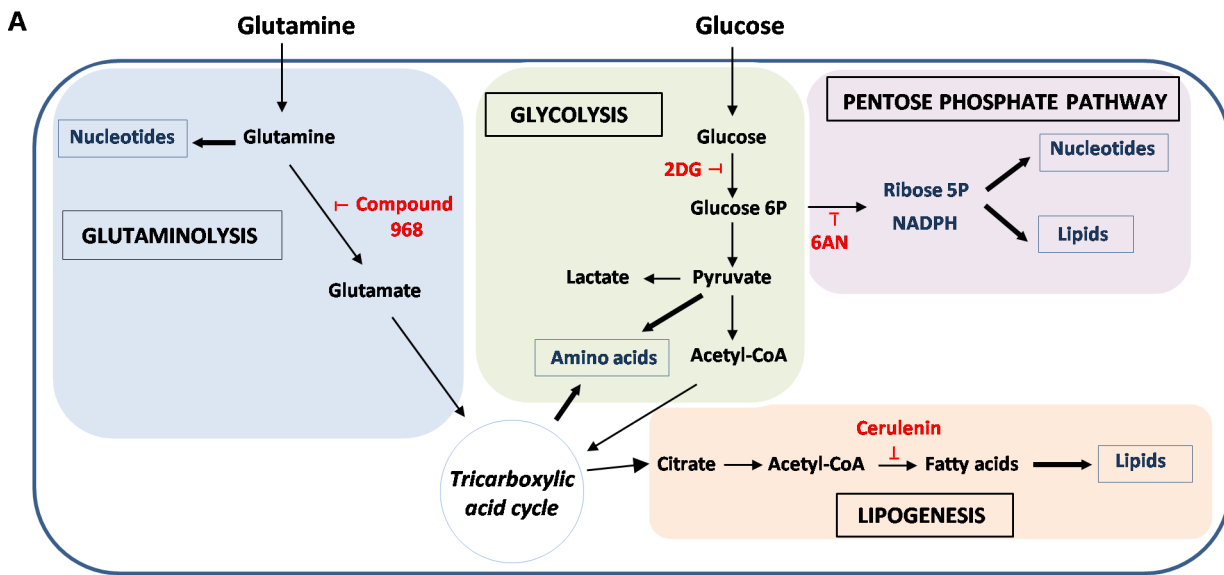
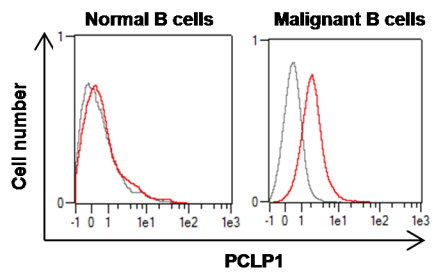
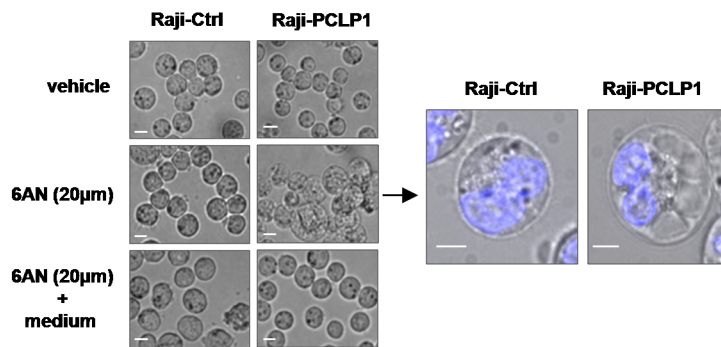


Figure 6

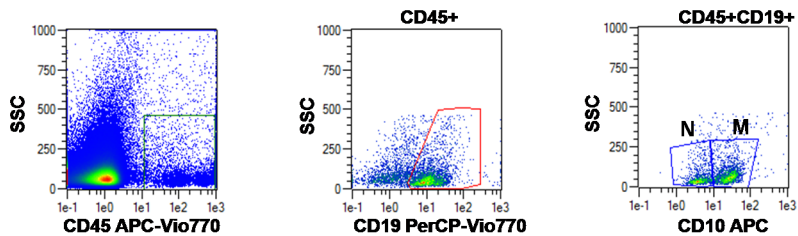


Supplementary Figure S1

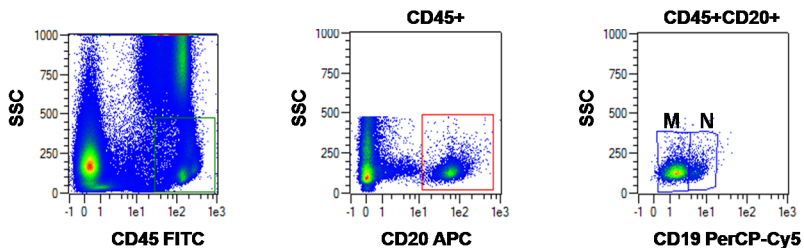


Supplementary Figure S2

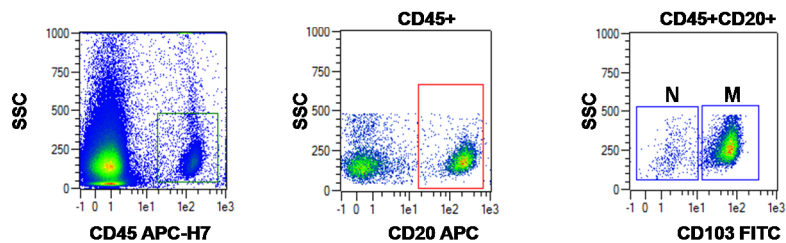
### Follicular lymphoma



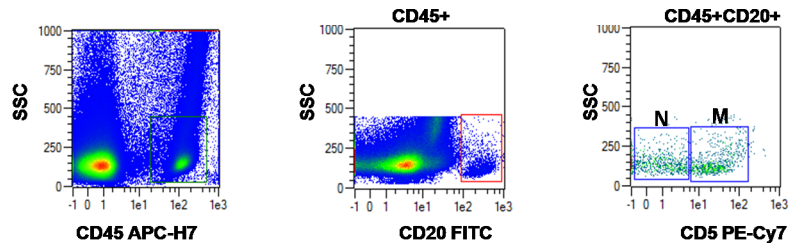
### Waldeström macroglobulinemia



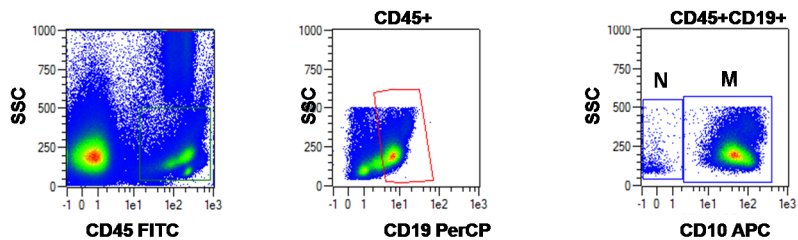
### Hairy cell leukemia



### Chronic lymphocytic leukemia



### Acute lymphoblastic leukemia





## 1 **Supplementary information**

### 2 **Supplementary figure legends**

3

#### 4 **Supplementary Figure S1: PCLP1 expression in mature B-cell lymphomas.**

5 Representative FACS histograms of a patient with lymphoma showing PCLP1  
6 expression on normal and malignant B cells are shown. The grey line and the red line in  
7 the histograms represent isotype control (anti-mouse IgG1) and PCLP1 staining (anti-  
8 PCLP1 mAb), respectively.

9

#### 10 **Supplementary Figure S2. The PPP inhibitor 6AN induces the vacuolation of Raji-**

11 **PCLP1 cells.** Raji-Ctrl and Raji-PCLP1 cells were cultured in the presence of vehicle  
12 (upper panels) or 6AN, an inhibitor of PPP, (middle panels) for 96 h and observed by  
13 bright field microscopy. Then, the medium containing 6AN was removed and cells were  
14 further cultured for 96 h in fresh medium without the inhibitor (lower panels). The size  
15 bar indicates 10  $\mu\text{m}$ . An amplified image of Raji-Ctrl and Raji-PCLP1 cells treated with  
16 6AN is depicted to show the vacuolization of 6AN-treated Raji-PCLP1 cells. Nuclei  
17 were stained with Hoechst 33342 (blue). The size bar indicates 5  $\mu\text{m}$ .

18

#### 19 **Supplementary Figure S3: Flow cytometric gating strategy for PCLP1 detection on** 20 **malignant and normal B cells from B-cell lymphoma and B-cell ALL patients.**

21 Cells were gated using a dot plot of side scatter (SSC) vs. CD45 to select CD45+ cells.  
22 Afterwards, B cells were identified based on CD19 (FL, ALL) or CD20 (WM, HCL,  
23 CLL) expression of CD45+ cells. Finally, normal and malignant cells were selected  
24 based on CD10 (FL, ALL), CD19 (WM), CD103 (HCL) or CD5 (CLL) expression.

25