

TESIS DOCTORAL



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

**Caracterización sistemática mediante
proteómica funcional de la disfunción de
la respuesta inmune en Leucemia
Linfocítica Crónica.**

Dña. Alicia Landeira Viñuela

Director:

Pr. Dr. Manuel Fuentes García

Salamanca 2023



Departamento de Medicina

D. Manuel Fuentes, Doctor en Bioquímica y Biología Molecular y Profesor Titular (Área Inmunología) del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado en formato de compendio de artículos/publicaciones bajo mi dirección por Dña. Alicia Landeira Viñuela y titulado **“Caracterización sistemática mediante proteómica funcional de la disfunción de la respuesta inmune en Leucemia Linfocítica Crónica”**, reúne las condiciones de originalidad y calidad científicas requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 28 de julio del año 2023.

Fdo.: Prof. Dr. D. Manuel Fuentes

Esta Tesis Doctoral fue desarrollada por Alicia Landeira Viñuela; siendo beneficiaria del Programa III: Ayudas para contratos predoctorales, en la Convocatorio del 2018 de ayudas para financiar treinta y cuatro contratos predoctorales de la Universidad de Salamanca, cofinanciadas por el Banco Santander.

Para el desarrollo de la misma, se contó además con el apoyo (financiación por proyectos, utilización de infraestructuras y/o cesión de muestras) de las siguientes instituciones:

- *Instituto de Salud Carlos III (FIS PI14/01538, PI17/01930, FIS 21/01545, CB16/12/00400).*
- *Fondos FEDER (EU) (SA198A12-2).*
- *Junta de Castilla y León (COV20EDU/00187).*
- *Unidad de Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca, España) que pertenece a ProteoRed - Instituto de Salud Carlos III (PRB3-ISCI) (PT17/0019/0023).*
- *Unidad de Proteómica de la Asociación Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias (Vizcaya, España).*
- *Fundación Solórzano (FS/38-2017).*
- *Nanomedicine CSIC-HUB (202180E048).*
- *Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Clínico Universitario de Salamanca (Salamanca, España).*
- *Servicio de Separación celular, Nucleus, Universidad de Salamanca (Salamanca, España).*

La presente tesis doctoral consta de cuatro artículos científicos originales. Dos de ellos ya publicado y dos en periodo de revisión en revistas indexadas en el *Science Citation Reports*, los cuales se detallan a continuación:

Deepening into Intracellular Signaling Landscape through Integrative Spatial Proteomics and Transcriptomics in a Lymphoma Model

Alicia Landeira-Viñuela¹, Paula Díez^{1,2}, Pablo Juanes-Velasco¹, Quentin Lécrevisse¹, Alberto Orfao¹, Javier De Las Rivas³, Manuel Fuentes^{1,2°}

Biomolecules **2021**, 11(12), 1776; <https://doi.org/10.3390/biom11121776>

Unravelling soluble immune checkpoints in chronic lymphocytic leukemia: Physiological Immunomodulators or immune dysfunction

Alicia Landeira-Viñuela¹, Carlota Arias-Hidalgo¹, Pablo Juanes-Velasco¹, Miguel Alcoceba⁴, Almudena Navarro-Bailón⁴, Carlos Eduardo Pedreira⁵, Quentin Lecrevisse¹, Laura Díaz-Muñoz¹, José Manuel Sánchez-Santos⁶, Ángela-Patricia Hernández^{1,7}, Marina L. García-Vaquero¹, Rafael Góngora¹, Javier De Las Rivas³, Marcos González⁴, Alberto Orfao¹, Manuel Fuentes^{1,2°}

Frontiers in Immunology **2022**, 13,965905; <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.965905>

Systematic evaluation of antigenic stimulation in Chronic Lymphocytic Leukemia: Viral immunity as biomarkers source for disease evolution

Alicia Landeira-Viñuela¹, Miguel Alcoceba⁴, Almudena Navarro-Bailón⁴, Carlota Arias-Hidalgo¹, Pablo Juanes-Velasco¹, José Manuel Sánchez-Santos⁶, Quentin Lecrevisse¹, Carlos Eduardo Pedreira⁵, Marina L. García-Vaquero¹, Ángela-Patricia Hernández^{1,7}, Enrique Montalvillo¹, Rafael Góngora¹, Javier De las Rivas³, Marcos González⁴, Alberto Orfao¹, Manuel Fuentes^{1,2°}

Cancers **2023**, 15(3), 1776. 891; <https://doi.org/10.3390/cancers15030891>

Proteome Landscape in Chronic Lymphocytic Leukemia: Unraveling therapeutic targets from cytogenetic alterations.

(En preparación)

¹ Departamento de Medicina y Servicio General de Citometría, CIBERONC-CB16/12/00400, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) e IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

² Unidad de Proteómica, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) e IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

³ Grupo de Bioinformática y Genómica Funcional, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) e IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

⁴ Departamento de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, CIBERONC-CB16/12/00233, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) e IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

⁵ Departamento de Sistemas y Computación (COPPE-PESC), Universidad Federal de Río de Janeiro (UFRJ), 21941-914, Río de Janeiro, Brasil.

⁶ Departamento de Estadística, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

⁷ Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Sección de Química Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

“Lo que más amo de la ciencia es que a medida que aprendes, realmente no obtienes respuestas, solo tienes mejores preguntas.”

John Green

Índice

Índice

Glosario.....	8
Introducción.....	17
1. Leucemia Linfocítica Crónica.....	18
1.1 Epidemiología y etiología de la Leucemia Linfocítica Crónica.....	18
1.2 Diagnóstico de la Leucemia Linfocítica Crónica.	20
1.2.1 Fenotipo del linfocito B clonal.....	23
1.3 Factores pronósticos en Leucemia Linfocítica Crónica.	23
1.3.1 Características clínicas.....	24
1.3.2 Características biológicas.	24
1.3.2.1 Estado mutacional de la IGHV.....	24
1.3.2.2 Alteraciones cromosómicas.	25
1.3.2.3 Mutaciones puntuales en genes directores.....	26
1.3.2.4 Perfiles proteicos de expresión diferencial.	28
1.4 Características, origen y diferenciación del linfocito B.	29
1.4.1 Origen del linfocito B.....	29
1.4.1.1 Ontogenia del Linfocito B.	29
1.4.1.2 Diferenciación de Linfocitos B antígeno independiente.	32
1.4.1.3 Diferenciación de Linfocitos B antígeno dependiente.	34
1.4.2 Determinación de los segmentos CDR de la IGHV.	35
1.4.3 Evolución clonal.....	37
1.4.4 Señalización intracelular del linfocito B clonal.....	38
1.4.4.1 Señalización intracelular mediada por BCR.....	39
1.4.4.2 Papel de los receptores tipo Toll en los linfocitos B.....	42
1.4.4.3 Papel de los receptores de quimiocinas en la activación del linfocito B. ...	43
1.4.5 Relación de la célula B y su microambiente.	43
1.5 Terapias para el tratamiento de la Leucemia Linfocítica Crónica.	46
1.5.1 Terapias dirigidas.....	46
1.5.1.1 Ibrutinib.	46
1.5.1.2 Venetoclax.	47
1.5.1.3 Idelalisib.....	47
1.5.1.4 Rituximab.....	48
1.5.2 Inmunoterapia celular en Leucemia Linfocítica Crónica: Receptores de antígenos quiméricos (CAR-T cell).....	48
1.5.3 Algoritmo terapéutico.....	49
1.5.4 Resistencia frente a terapias dirigidas.	50

1.6	Hipogammaglobulinemia en Leucemia Linfocítica Crónica.	52
1.7	Infecciones en pacientes de Leucemia Linfocítica Crónica.	52
2.	Proteómica.	53
2.1	Relevancia de la proteómica en la medicina de precisión.	54
2.1.1	Proyecto Proteoma Humano.	54
2.1.2	El panorama proteico de las células: el proteoma.	55
2.1.3	Estudio del panorama proteico de las células: la proteómica.	55
2.1.4	Técnicas proteómicas.	56
2.1.4.1	Proteómica basada en agentes de afinidad.	56
2.1.4.2	Proteómica basada en espectrometría de masas.	57
2.2	Caracterización proteómica de la leucemia linfocítica crónica.	62
2.2.1	Descripción de la caracterización proteómica en la leucemia linfocítica crónica. 63	
2.2.1.1	Perfiles proteicos diferenciales entre B-CLL y su contrapartida normal. ...	64
2.2.1.2	Perfiles proteicos diferenciales en base al pronóstico de la enfermedad...64	
2.2.2	Proteómica funcional de la leucemia linfocítica crónica.	65
2.2.3	Proteómica diferencial de la leucemia linfocítica crónica.	67
2.2.3.1	Caracterización proteómica e inmunofenotípica.	67
2.2.3.2	Caracterización proteómica intracelular.	67
2.2.3.3	Caracterización proteómica del secretoma.	68
	Objetivo general y específicos.	74
	Objetivo general.	75
	Objetivos específicos.	75
	Materiales y Métodos.	77
1.	Cultivos celulares.	78
2.	Sujetos y muestras de estudio.	78
1.1.	Sujetos de estudio.	78
1.2.	Procesamiento de las muestras de estudio.	80
1.2.1.	Recogida y pre-procesamiento.	80
1.2.2.	Proceso de preparación del suero sanguíneo.	81
1.2.3.	Proceso de purificación de los Linfocitos B clonales.	81
1.3.	Grupo control (referencia).	82
3.	Extracción de proteínas y fraccionamiento subcelular.	82
3.1	Protocolo #1.	82
3.2	Protocolo #2.	83
3.3	Protocolo #3.	83

3.4	Protocolo #4.	83
3.5	Protocolo #5.	83
3.6	Protocolo #6.	83
3.7	Protocolo #7.	86
3.8	Protocolo #8.	86
3.9	Protocolo #9.	87
4.	Determinación de concentración de proteínas.	89
4.1	Método de Bradford.....	89
4.2	Método Lowry/BCA.....	89
5.	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	90
5.1	Preparación de geles a una concentración de acrilamida del 12 %.	90
5.2	Separación.....	90
5.3	Tinción del gel de poliacrilamida.....	91
5.3.1.	Tinción de Coomassie.....	91
5.3.2	Tinción de Plata.	93
6.	Caracterización proteómica.	93
6.1	Evaluación del perfil de inmunoglobulinas y microambiente tumoral.	93
6.1.1.	Adquisición de las muestras.....	95
6.1.2.	Análisis cuantitativo.	97
6.2	Determinación de la señalización intracelular y perfil antigénico (autoanticuerpos y antígenos microbianos).....	98
6.2.1	Diseño y construcción de las micromatrices de proteínas.....	99
6.2.2	Determinación multiplex de complejos proteicos.	104
6.2.3	Determinación del perfil de autoanticuerpos.....	109
6.2.4	Determinación del perfil de estimulación antigénica persistente.	114
6.2.5	Adquisición y procesamiento de datos.	117
6.3	Determinación del perfil proteico intracelular.	119
6.3.1	Proteoma de la línea celular Ramos.....	119
6.3.2	Cohorte de estudio.....	122
7.	Procesamiento, bioestadística y análisis de datos.	124
7.1	Integración Ortogonal de datos proteómicos y transcriptómicos.	124
7.1.1	Efecto de la conjugación proteica con biotina.	124
7.1.2	Diseño y construcción de una base de datos ómicos.....	124
7.1.3	Comparación de procedimientos de extracción proteica.	125
7.1.4	Determinación de complejos multiproteicos.....	125
7.1.5	Determinación de isoformas y/o modificaciones postraduccionales.	126

7.1.6	Visualización del análisis SEC-MAP.....	126
7.1.7	Análisis de enriquecimiento funcional.....	127
7.2	Estudio del microambiente tumoral en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica.	127
7.2.1	Análisis estadístico.....	127
7.2.2	Clasificación de los factores solubles.....	130
7.2.3	Generación de árboles de decisión.....	130
7.2.4	Representación gráfica de los datos.....	130
7.2.5	Análisis de enriquecimiento funcional.....	130
7.3	Estudio del perfil de anticuerpos frente a antigénico microbianos y autoantígenos en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica.....	131
7.3.1	Análisis estadístico.....	131
7.3.2	Selección de la dilución de trabajo.....	131
7.3.3	Representación gráfica de los datos.....	132
7.4	Estudio del perfil proteico intracelular en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica.....	132
Capítulo 1: Evaluación de complejos multiproteicos mediante integración ortogonal multi- ómica en una línea celular como modelo.....		
	Introducción.....	136
	Objetivos.....	137
	Resultados.....	138
1.	Evaluación de la estrategia SEC-MAP.....	138
1.1.	Evaluación del rendimiento en la extracción de proteínas.....	138
1.2.	Evaluación de la compatibilidad del proceso de conjugación química de los extractos proteicos con el ensayo SEC-MAP.....	140
1.3.	Evaluación de la detección de proteínas mediante metodología SEC-MAP.....	143
2.	Determinación de perfiles proteicos.....	144
2.1.	Determinación de complejos multiproteicos.....	144
2.2.	Determinación de isoformas y modificaciones postraduccionales en los perfiles proteicos.....	145
3.	Integración ortogonal multi-ómica: Diseño y desarrollo.....	148
	Conclusiones.....	150
Capítulo 2: Alteraciones en el balance de los factores inmunológicos solubles en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica y Linfocitosis B Monoclonal. Papel del microambiente tumoral.		
	Introducción.....	153
	Objetivos.....	154
	Resultados.....	155

1. Perfil de factores inmunológicos solubles según diagnóstico y evolución de la enfermedad.....	155
1.1 Tendencia de los factores inmunológicos solubles evaluados y su implicación a nivel biológico.	155
1.2 Estudio del perfil diferencial de factores inmunológicos solubles.....	156
1.3 Evaluación de los factores inmunológicos solubles implicados en la regulación de la Interleucina 4.....	158
1.4 Potencial panel diferencial de factores inmunológicos solubles.	158
2. Perfil de factores inmunológicos solubles según diagnóstico y respuesta a tratamiento.	162
2.1 Tendencia de los factores inmunológicos solubles evaluados y su implicación a nivel biológico.	162
2.2 Estudio del perfil diferencial de los factores inmunológicos solubles.	163
2.3 Evaluación de los factores inmunológicos solubles implicados en la regulación de la Interleucina 4.....	165
2.4 Potencial panel diferencial de factores inmunológicos solubles.	165
3. Perfil de factores inmunológicos solubles según estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.	168
3.1 Tendencia de los factores inmunológicos solubles evaluados y su implicación a nivel biológico.	168
3.2 Estudio del perfil diferencial de factores inmunológicos solubles.....	169
3.3 Potencial panel diferencial de factores inmunológicos solubles.	169
Conclusiones	171
Capítulo 3: Evaluación del perfil serológico de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica y Linfocitosis B Monoclonal. Papel de la estimulación antigénica.....	174
Introducción.	175
Objetivos.	176
Resultados.....	177
1. Perfiles serológicos de inmunoglobulinas: Análisis cuantitativo.	177
1.1. Determinación de perfiles diferenciales de inmunoglobulinas según el estadio de la enfermedad.	177
2. Evaluación del perfil serológico de la respuesta humoral frente a un panel de autoantígenos y antígenos microbianos.	180
2.1 Determinación del perfil serológico frente a un panel autoantígenos.....	180
2.2 Determinación del perfil serológico frente a antígenos microbianos.....	182
Conclusiones	185
Capítulo 4: Evaluación del proteoma en la leucemia linfocítica crónica.....	188
Introducción.....	189
Objetivos.	189

Resultados.....	190
1. Caracterización del perfil proteico del linfocito B clonal.	190
2. Correlación del transcriptoma y proteoma del linfocito B clonal.	191
3. Caracterización del perfil funcional del linfocito B clonal.	191
3.1 Enriquecimiento funcional.	191
3.2 Evaluación del grupo funcional de las proteínas.....	193
3.3 Análisis de la fisiopatología del linfocito B clonal.	193
4. Caracterización del perfil funcional de la Leucemia Linfocítica Crónica.	194
Conclusiones	199
Discusión	201
Integración multi-ómica ortogonal.	202
Caracterización proteómica de la Leucemia Linfocítica Crónica.....	204
Evaluación del perfil serológico de las inmunoglobulinas en la cohorte de estudio.	205
Evaluación del perfil serológico de las inmunoglobulinas y factores inmunológicos de acuerdo al grupo clínico.	206
Perfil serológico según diagnóstico.....	208
Perfil serológico según el factor pronóstico.....	209
Perfil serológico según la evolución de la enfermedad.....	211
Perfil serológico según la respuesta a tratamiento.....	213
Evaluación del perfil proteico intracelular de las células B clonales.	214
Conclusiones	220
Bibliografía	223
Anexos.....	261
Anexo I: Listado Figuras Suplementarias.	
Anexo II: Listado Tablas Suplementarias.	
Anexo III: Listado de Archivos.	
Anexo IV: Landeira Viñuela et al. 2021.	
Anexo V: Landeira Viñuela et al. 2022.	
Anexo VI: Landeira Viñuela et al. 2023.	

Glosario.

A

Ag/ Ags: Antígeno/Antígenos.

aAg/ aAgs: Autoantígeno/Autoantígenos.

aAg array: Array de autoantígenos (del inglés, *AutoAntigen Array*).

Ab/Abs: Anticuerpo/Anticuerpos (del inglés, *Antibody/Antibodies*).

ACN: Acetonitrilo.

ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (del inglés, *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*).

ADN: Ácido DesoxirriboNucleico

AID: Citidina desaminasa inducida por activación (del inglés, *Activation Induced cytosine Deaminase*).

AP-1: Proteína activadora 1.

APCs: Células Presentadoras de Antígenos (del inglés, *Antigen-Presenting Cell*).

APS: Análisis de componentes principales (del inglés, *Analysis of Principal Components*).

ARN: Ácido RiboNucleico.

B

BCA: Ensayo de ácido bicinonínico (del inglés, *Bicinchoninic acid assay*).

B-CLL/B-CLLs: Linfocito/os B clonal/es de Leucemia Linfocítica Crónica (del inglés, *B cell- Chronic Lymphocytic Leukemia*).

BCL-2: Proteína reguladora antiapoptótica del Linfoma de célula B 2

BCR: Receptor de linfocito B (del inglés, *B Cell Receptor*).

BSA: Seroalbúmina bovina (del inglés, *Bovine Serum Albumin*).

BTK: Tirosina quinasa de Bruton (del inglés, *Bruton's Tyrosine Kinase*).

C

Cnº (C1-C12): Agrupamiento clínico.

CAR-T cell: Receptor de antígeno quimérico en linfocito T (del inglés, *Chimeric antigen receptor T-cell*).

CD: Célula Dendrítica.

CDC: Citotoxicidad Dependiente de Complemento.

CDR: Dominios de hipervariabilidad (del inglés, *complementarity determining region*).

C_f: Concentración final.

CG: Centro Germinal.

Cit: Citoplasma.

CLL: Leucemia Linfocítica Crónica de Célula B (del inglés, *Chronic Lymphocytic Leukemia*).

CLL-IPi: Índice pronóstico internacional para la Leucemia Linfocítica Crónica (del inglés, *International Prognostic Index for Chronic Lymphocytic Leukemia*).

CLL-PFT: Leucemia Linfocítica Crónica previa a la primera línea de tratamiento (del inglés, *Chronic Lymphocytic Leukemia Previously to 1st line Treatment*).

CLL-TFT: Leucemia Linfocítica Crónica tras primera línea de tratamiento (del inglés, *Chronic Lymphocytic Leukemia after 1st line Treatment*).

c-CLL: Leucemia Linfocítica crónica estable (del inglés, *Chronic lymphocytic leukemia stable/constant*).

CSR: Cambio de clase/isotipo de inmunoglobulina (del inglés, *Class switch recombination*).

CXCR: Receptor de quimiocinas.

D

DAG: Diacilglicerol.

DAMPs: Patrones moleculares asociados al daño (del inglés, *Damage-associated molecular patterns*).

DDA: Adquisición dependiente de datos (del inglés, *Data-dependent acquisition*).

Del(11q): Delección del brazo largo del cromosoma 11.

Del(13q): Delección del brazo largo del cromosoma 13.

Del(17p): Delección del brazo corto del cromosoma 17.

DIA: Adquisición independiente de datos (del inglés, *Data-independent acquisition*).

DTT: Ditiotreitól (del inglés, *Dithiothreitol*).

E

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima o enzoinmunoanálisis de absorción (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

EMA: Agencia europea del medicamento (del inglés, *European Medicines Agency*).

ESI: Ionización por electropulverización (del inglés, *Electrospray ionization*).

F

FA: Ácido fórmico (del inglés, *Formic acid*).

FBS: Suero Fetal Bovino (del inglés, *Fetal Bovine Serum*).

FDA: Administración de alimentos y medicamentos (del inglés, *Food and Drug Administration*).

FDR: Tasa de descubrimiento falso (del inglés, *False Discovery Rate*).

FISH: Hibridación *in situ* por fluorescencia (del inglés, *Fluorescence in-situ hybridization*).

FPKM: Fragmentos por kilobase por millón de fragmentos mapeados (del inglés, *Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped*).

G

GOBP: Procesos biológicos (del inglés, *Gene Ontology Biological Processes*).

H

h: Hora/Horas.

H₀: Hipótesis nula.

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico.

HLA-I/II: Sistema de Antígeno Leucocitario Humano tipo I/II (del inglés, *Human leukocyte antigen*).

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés, *High performance liquid chromatography*).

HUPO: Organización Mundial del Proteoma Humano (del inglés, *The Human Proteome Organization*).

HUS: Hospital Universitario de Salamanca.

I

IAA: Yodoacetamida (del inglés, *Iodoacetamide*).

iBTK: Inhibidores de BTK.

IGEPAL: Octilfenoxipolietoxietanol.

IGHV: Región Variable de la Cadena Pesada de las Inmunoglobulinas (del inglés, *Immunoglobulin Heavy Variable*).

IGLV: Región Variable de la cadena Ligera de las Inmunoglobulinas (del inglés, *Immunoglobulin Light*).

Ig/Igs: Inmunoglobulina/as.

IL-1: Interleucina 1.

IP3: Inositol trifosfato.

ITAM: Motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (del inglés, *Immune Receptor Tyrosine-based Activation Motif*).

ITK: Quinasa inducible por interleucina 2 (del inglés, *Interleukin 2 inducible T-cell Kinase*).

iTRAQ: Espectrometría de masas mediante etiquetado isobárico (del inglés, *Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation*).

K

KCl: Cloruro de potasio.

L

λ : Longitud de onda.

LB: Linfocito B o célula B.

LFQ: Valores de cuantificación sin etiqueta (del inglés, *Label-Free Quantification*).

LC: Cromatografía líquida (del inglés, *Liquid Chromatography*).

LC-MS/MS: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (del inglés, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*).

LNH: Linfoma no Hodgkin.

LT: Linfocito T.

LT Th1: Linfocito T cooperador tipo 1.

LT Th2: Linfocito T cooperador tipo 2.

M

M2: Macrófago tipo 2.

M ϕ : Macrófago.

mAb: Anticuerpo monoclonal (del inglés, *Monoclonal Antibody*).

mAg: Antígeno microbiano.

MALDI-TOF: Desorción/ionización láser asistida por matriz acoplado a un detector de iones (del inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight*).

MAPKs: Proteínas quinasas activadas por mitógenos (del inglés, *Mitogen Activated Protein Kinases*).

mARN: Ácido ribonucleico mensajero.

miARN: Moléculas pequeñas de ácido ribonucleico.

MBL: Linfocitosis Monoclonal de células B (del inglés, *Monoclonal B Lymphocytosis*).

Mem: Membrana.

MgCl₂: Cloruro de magnesio.

M-IGHV: Región Variable de la Cadena Pesada de las Inmunoglobulinas mutada

(del inglés, *Mutated Immunoglobulin Heavy Variable*).

min: Minuto/Minutos.

M&M: Materiales y Métodos.

MO: Médula Ósea.

MRM/SRM: Monitorización de reacciones múltiples/Monitoreo de reacciones seleccionadas (del inglés, *Multiple Reaction Monitoring /Selected Reaction Monitoring*).

MS: Espectrometría de Masas (del inglés, *Mass Spectrometry*).

MSig: Firmas moleculares funcionales (del inglés, *Molecular Signatures*).

MS/MS: Espectrometría de Masas en Tándem (del inglés, *Tandem Mass Spectrometry*).

MT: Microambiente Tumoral.

m/z: Masa/carga.

N

Nº: Número.

NaCl: Cloruro sódico.

NFAT: Factor nuclear de células T activadas (del inglés, *Nuclear Factor of Activated T cells*).

NF-κB: Factor nuclear κB.

NGS: Secuenciación masiva de alto rendimiento o nueva generación (del inglés, *Next-Generation Sequencing*).

NK: Células asesinas naturales (del inglés, *Natural Killer*).

Nuc: Núcleo.

O

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ON: Incubación durante toda la noche (del inglés, *OverNight*).

Org: Orgánulo.

P

PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (del inglés, *Pathogen-associated molecular patterns*).

p-CLL: Leucemia Linfocítica Crónica en progresión (del inglés, *Chronic lymphocytic leukemia progression*).

PBMC: Células mononucleadas de sangre periférica (del inglés, *Peripheral Blood Mononuclear Cell*).

PBS: Solución salina Na²⁺/K⁺ (del inglés, *Phosphate-Buffered Saline*).

PBST: Solución salina con 0,05 % Tween 20 (del inglés, *Phosphate-Buffered Saline-Tween 20*).

PFG: Grupos funcionales de proteínas (del inglés, *Protein Functional Groups*).

PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinasa.

PIP2: Fosfatidilinositol 3,4 difosfato.

PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato.

PLCγ2: Fosfatidilinositol específica de fosfolipasa Cγ2.

PM: Peso Molecular.

ppm: Partes Por Millón.

P/E: Penicilina/Estreptomicina.

PS: Conjunto de proteínas.

PSM: Espectros de péptidos coincidentes (del inglés, *Peptide Spectrum Matches*).

PTEN: Homólogo de fosfatasa y tensina (del inglés, *Phosphatase and Tensin homolog*).

PTMs: Modificaciones postraduccionales (del inglés, *Post-translational modifications*).

p/v: Peso/volumen.

R

Ref.: Muestra de referencia

mRMR: Análisis de mínima redundancia y máxima relevancia (del inglés, *Maximum Relevance Minimum Redundancy*).

RNA-seq: Secuenciación del ARN (del inglés, *RiboNucleic acid -RNA- sequencing*).

rpm: Revoluciones por minuto.

RSS: Secuencia señalización de recombinación (del inglés, *Recombination signal sequence*).

RT: Temperatura ambiente (del inglés, *Room temperature*).

S

s: Segundos.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés, *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*).

SEC: Cromatografía por exclusión de tamaño y microarrays de anticuerpos (del inglés, *Size Exclusion Chromatography*).

SEC-MAP: Cromatografía por exclusión de tamaño y microarrays de anticuerpos (del

inglés, *Size Exclusion Chromatography & Microarray of Antibody in format Planar*).

SG: Supervivencia global (dícese, del periodo de tiempo desde que se inicia tratamiento hasta el fallecimiento).

SHM: Hipermutación Somática (del inglés, *Somatic hypermutation*).

SLOs: Órganos Linfoide Secundarios (del inglés, *Secondary Lymphoid Organs*).

SLP: Supervivencia libre de progresión (en otras palabras, el periodo transcurrido durante y tras el tratamiento, en el que no hay crecimiento ni diseminación tumoral).

SLT: Supervivencia libre de tratamiento (es decir, periodo de tiempo que transcurre desde la detección de la enfermedad hasta el inicio de tratamiento).

SP: Sangre periférica.

SPA array: Array de estimulación antigénica persistente (del inglés, *Stimulation Persisten Antigenic Array*).

STING: Ruta de señalización de la proteína estimuladora de genes de interferón.

SWATH-MS: Espectrometría de masas mediante adquisición independiente de datos y análisis de datos específicos (del inglés, *Sequential Window Acquisition of All Theoretical Fragment Ion Mass Spectra*)

T

Tris/HCL:

Tris(hidroximetil)aminometano/Ácido clorhídrico.

TLR/TLRs: Receptor/es tipo Toll (del inglés, *Toll Like Receptor*).

Tregs: Linfocito T reguladores.

t-SNE: Incrustación de vecinos estocásticos distribuidos en t (del inglés, *T-distributed Stochastic Neighbor Embedding*).

U

U-IGHV: Región Variable de la Cadena Pesada de las Inmunoglobulinas no mutada (del inglés, *Unmutated Immunoglobulin Heavy Variable*).

V

V_F: Volumen final.

VLA-4: Integrina α 4.

v/v: Volumen/Volumen.

W

WES: Secuenciación del exoma completo (del inglés, *Whole-Exome Sequencing*).

WHO-HAEM: Clasificación de Neoplasias Linfoides de la Organización Mundial de la Salud (del inglés, *World Health Organization Classification of Haematolymphoid tumors: lymphoid neoplasms*).

X

xg: Revoluciones en fuerza centrífuga relativa.

Anotaciones/Observaciones

La notación científica será expresada como: $x \cdot 10^n$.

La notación de aproximación será denotada por el símbolo \sim

Los siguientes términos serán indicados a lo largo del presente documento como:

min para minutos.

h para horas.

Da/kDa para Dalton o Kilodalton.

\bar{x} para valores promedio.

El número de veces será indicado con la abreviatura N^ºx (por ejemplo, número de veces que se lleva a cabo un lavado: 3x).

Introducción.

I. Leucemia Linfocítica Crónica.

La Leucemia Linfocítica Crónica (CLL) es una neoplasia linfoide maligna asociada a edad, caracterizada por una acumulación de linfocitos B maduros CD5⁺ en sangre periférica (SP), médula ósea (MO) y ganglios linfáticos ^{1,2}.

Esta enfermedad forma parte de un amplio grupo de desórdenes hematológicos denominado Linfoma no Hodgkin (LNH), que incluye varias neoplasias linfoides que se originan en los linfocitos B (LB), mayoritariamente, linfocitos T (LT) y de células asesinas o *natural killer* (NK) ³⁻⁷. Generalmente son neoplasias que infiltran en los tejidos linfoides y hematopoyéticos; aunque pueden extenderse a otros órganos. Siendo el linfoma más indolente el Linfoma folicular y los más agresivos, el linfoma difuso de célula B grande y Linfoma de Burkitt ³⁻⁵.

A diferencia de los tumores sólidos, quienes suelen presentar una importante inestabilidad genómica, los linfomas suelen presentar cierta estabilidad. Aunque en ambos casos, se desarrollan debido a la adquisición progresiva de alteraciones a nivel genético (ácido desoxirribonucleico -ADN-); en el que se incluyen reordenamientos cromosómicos estructurales (amplificaciones, deleciones y/o traslocaciones), aneuploidías y/o mutaciones puntuales ^{3,5,6}.

Actualmente, los criterios de diagnóstico, monitorización y tratamiento de los diferentes subtipos de LNH, incluida la CLL, se realizan en base a los criterios definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en la 5ª Edición de la clasificación de la OMS para tumores linfoides publicado en Junio del 2022 ⁸. En ella se establece un sistema jerárquico de clasificación, en el que aparte de los criterios establecidos en las anteriores ediciones (información clínica, evaluación histológica y características inmunofenotípicas), se incorporan los nuevos biomarcadores identificados durante la última década; dado que resultan fundamentales tanto en la estratificación, monitorización de los pacientes o como dianas de las terapias emergentes ⁶.

I.I Epidemiología y etiología de la Leucemia Linfocítica Crónica.

La CLL es una de las leucemias más comunes (representa del 25 % - 30 % de todas ellas), y la principal causa de mortalidad entre las enfermedades hematológicas en los países occidentales. Solo en el año 2019 ha presentado una incidencia a nivel global de > 100000 casos y > 40000 muertes en todo el mundo ⁹⁻¹².

Esta neoplasia hematológica afecta en mayor medida a hombres que a mujeres (2:1) y se asocia a la edad, incrementándose su incidencia de 3 a 4 veces al llegar a los 70 años (**Tabla 1**) ^{10,11,13,14}. Por tanto, la relación con el envejecimiento implica cambios biológicos en las células madre hematopoyéticas (acumulación de múltiples mutaciones, cambios epigenéticos, acortamiento de telómeros y estrés oxidativo), que desencadenan la aparición de los clones leucémicos ¹².

Además, esta enfermedad tiene una considerable predisposición genética; siendo mayor el riesgo de desarrollo cuando se tienen parientes en 1º grado de parentesco que padecen la enfermedad. Aunque el papel de la herencia genética aún se desconoce, ya que gemelos idénticos que desarrollan CLL presentan mutaciones puntuales diferentes en distintos segmentos génicos ^{2,15,16}.

Tabla 1: Tasa de incidencia, prevalencia y mortalidad de la Leucemia Linfocítica crónica.

	Año	Género	Incidencia		Prevalencia		Muerte	
			50-69	>70	50-69	>70	50-69	>70
Global	1990	Ambos	3	10	16	42	1	6
		Hombre	3	12	18	49	1	7
		Mujer	2	8	13	36	1	5
	2019	Ambos	3	11	21	54	1	6
		Hombre	3	14	24	67	1	7
		Mujer	3	9	18	44	1	6
Europa Occidental	1990	Ambos	6	20	45	89	2	12
		Hombre	8	28	56	115	2	17
		Mujer	5	16	35	75	1	9
	2019	Ambos	7	29	58	156	1	13
		Hombre	10	38	73	204	2	18
		Mujer	5	22	43	121	1	10

* Casos por cada 100000 habitantes (Datos obtenidos del Institute for Health Metrics and Evaluation -IHME-)¹⁷

En los últimos 30 años, la tendencia de dicha enfermedad ha ido aumentando, tanto a nivel global como en Europa (**Tabla 1 y Figura 1**); debido principalmente al envejecimiento de la población. No obstante, se han observado discordancias entre las tasas de incidencia y mortalidad según la ubicación geográfica y la etnia. De hecho, se presenta una mayor tasa en Europa, Norteamérica y Australia (personas de origen caucásico) que en Asia (personas de origen asiático)^{12,14}.

Cuando estas observaciones se centran en España, la incidencia mantiene sus niveles respecto a los observados en Europa Occidental y a nivel global, al igual que la ratio para hombres y mujeres (2:1). La prevalencia a partir de los 70 años se dispara, presentando una tasa de mortalidad 10 veces mayor¹³ (**Tabla 2**).

Tabla 2: Incidencia, prevalencia y mortalidad de la Leucemia Linfocítica Crónica en España.

Año	Género	Incidencia			Prevalencia			Muerte		
		Total	50-69	>70	Total	50-69	>70	Total	50-69	>70
1990	Ambos	2	4	13	12	30	58	1	1	7
	Hombre	2	5	17	13	35	72	1	2	10
	Mujer	2	3	10	11	26	50	1	1	6
2019	Ambos	5	6	25	34	50	137	2	1	11
	Hombre	6	8	32	38	61	171	2	1	14
	Mujer	5	5	20	30	40	114	2	1	9

* Casos por cada 100000 habitantes. (Datos obtenidos del Institute for Health Metrics and Evaluation -IHME-)¹⁷

Al igual que ocurría a nivel global y en Europa en las últimas 3 décadas, la tendencia de la CLL a nivel nacional ha ido en aumento (**Figura 1**). En el año 1990 las tasas de incidencia, prevalencia y muerte eran cercanas a las presentes para ese mismo año a nivel global, ya fuera a nivel general (**Figura 1A**), para mujeres (**Figura 1B**) o para hombres (**Figura 1C**). Sin embargo, dichas tasas han ido aumentando a lo largo de los años hasta alcanzar, en el 2019, valores cercanos a los observados en Europa Occidental (**Figura 1**). Esta tendencia es muy parecida a la observada

cuando se realiza el estudio según la edad media al diagnóstico (70 años), independientemente del género (**Tabla 2 y Figura 2**).

1.2 Diagnóstico de la Leucemia Linfocítica Crónica.

El diagnóstico de CLL se realiza en base a la determinación de la presencia en SP de $\geq 5 \cdot 10^9$ linfocitos B monoclonales/L (≥ 5000 células/ μL) con fenotipo CD19⁺, CD5⁺, CD20⁺, CD23⁺ e Ig κ /Ig λ (mediante citometría de flujo), mantenidos al menos 3 meses^{8,11,18-22}.

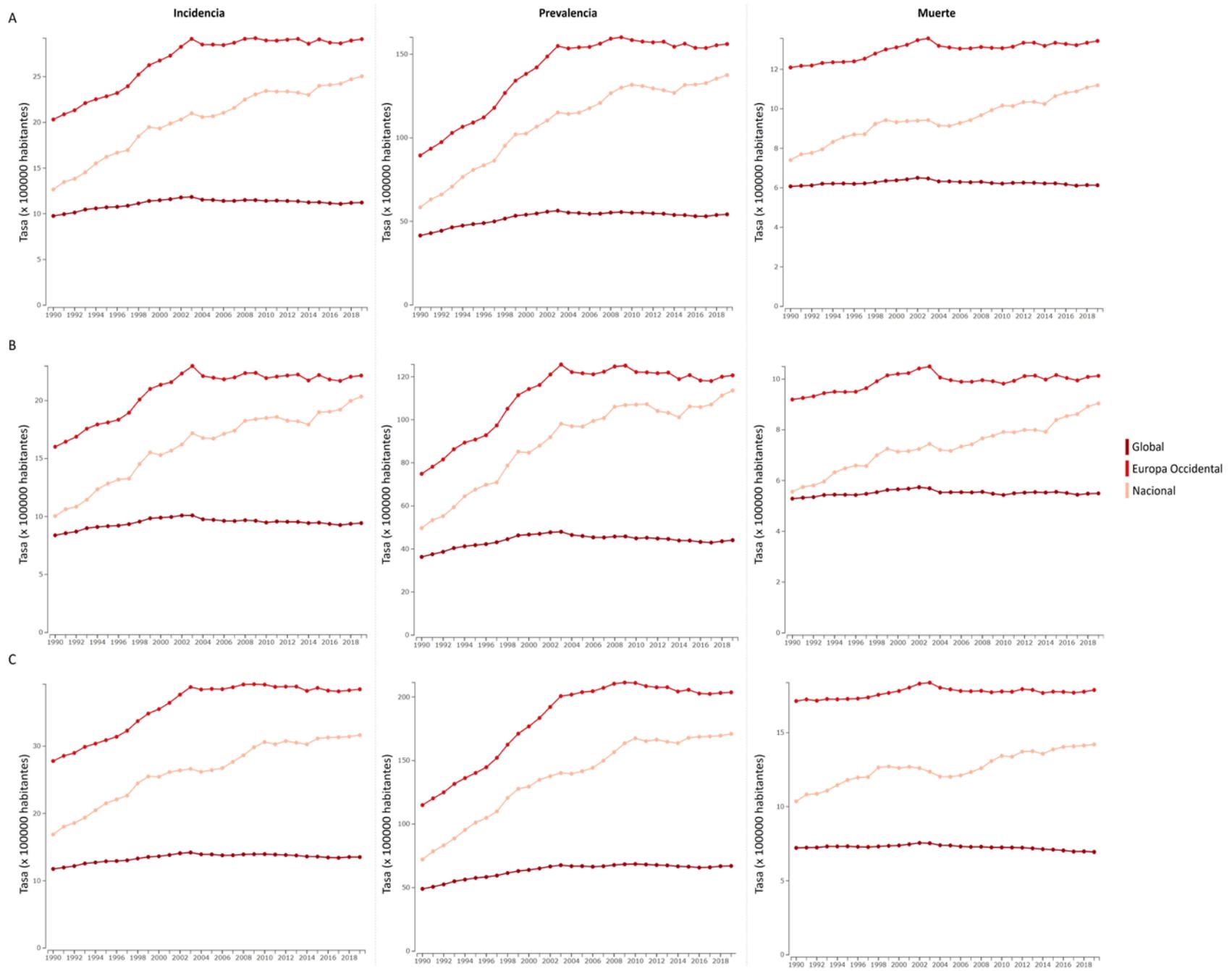
En frotis sanguíneo (coloreado mediante tinción May-Grünwald Giemsa), estos linfocitos B clonales tipo CLL (B-CLL) presentan una morfología pequeña, con borde estrecho y núcleos densos con cromatina parcialmente agregada, además, de aparecer lo que se conoce como sombras nucleares o manchas de Gumprecht (restos celulares). Pueden observarse linfocitos atípicos más grandes o prolinfocíticos, pero estos nunca deben superar el 55 % de las células totales en el diagnóstico^{8,11,19-22}.

La presencia en SP de $< 5 \cdot 10^9$ B-CLL/L y linfadenopatías y/o esplenomegalias (detectadas mediante examen físico o de imagen) se conoce generalmente como linfoma de linfocitos pequeños. Esta variante clínica de la enfermedad debe confirmarse mediante evaluación histopatológica a partir de la biopsia de ganglio linfático, siempre que sea posible. Sin embargo, cuando se determina el mismo recuento celular en ausencia de otras características clínicas asociadas a CLL, entonces se habla del estadio previo de la enfermedad, conocido como Linfocitosis monoclonal de célula B (MBL)^{8,11,19-22}.

La MBL es una afección hematológica asintomática caracterizada por la expansión de células B clonales en individuos aparentemente sanos (sin enfermedad linfoproliferativa crónica de célula B, infecciosa o autoinmune, sin esplenomegalia ni hepatomegalia o cualquier síntoma relacionado con CLL)^{18,23,24}. Se encuentra asociada a envejecimiento (aumento gradual del número de LB clonales en SP, raramente presentes en < 40 años y con aumento de la incidencia de hasta el 20 % en > 70 años y de hasta el 75 % en > 90 años), predisposición genética (antecedentes familiares de neoplasias malignas hematológicas o tumores sólidos entre miembros en 1º grado de parentesco) y exposición a infecciones e inmunodeficiencias (personas vacunadas frente a infecciones por neumococo o influenza no suele desarrollar MBL, mientras que la frecuencia de padecer MBL es elevada cuando los pacientes presentan infección por el virus de la hepatitis C)²³⁻²⁶. Su diagnóstico se delimita al recuento absoluto de LB clonales, permitiendo así diferenciar entre dos tipos de MBL: i) MBL de alto recuento (presencia en SP de $> 0,5 \cdot 10^9$ LB clonales/L), la cual suele ser indicativo de riesgo de progresión de la enfermedad y ii) MBL de bajo recuento (presencia en SP de $< 0,5 \cdot 10^9$ LB clonales/L), quien suele ser muy estable a largo plazo^{23,24,26}.

Cabe destacar, que un paciente que presenta MBL, no tiene porqué desarrollar CLL; aunque todos aquellos pacientes que padecen CLL si han desarrollado previamente MBL. La mayoría de los casos de MBL (75 %) presentan un fenotipo tipo CLL (véase sección 1.2.1), mientras que el resto (25 % de los casos) tienen otro tipo de firma inmunofenotípica que nos permite diferenciar dos grupos: MBL atípica (fuerte expresión de CD20 e Inmunoglobulina - Ig - de superficie y ausencia de CD23) y MBL CD5⁻ (CD5⁻, CD19⁺, CD20⁺ y expresión moderada/alta de Ig de superficie)^{23,24}.

Figura 1: Tendencia de la Leucemia Linfocítica crónica durante los últimos 30 años. A) Ambos sexos. B) Mujeres. C) Hombres. (Datos obtenidos del Institute for Health Metrics and Evaluation -IHME-)¹⁷



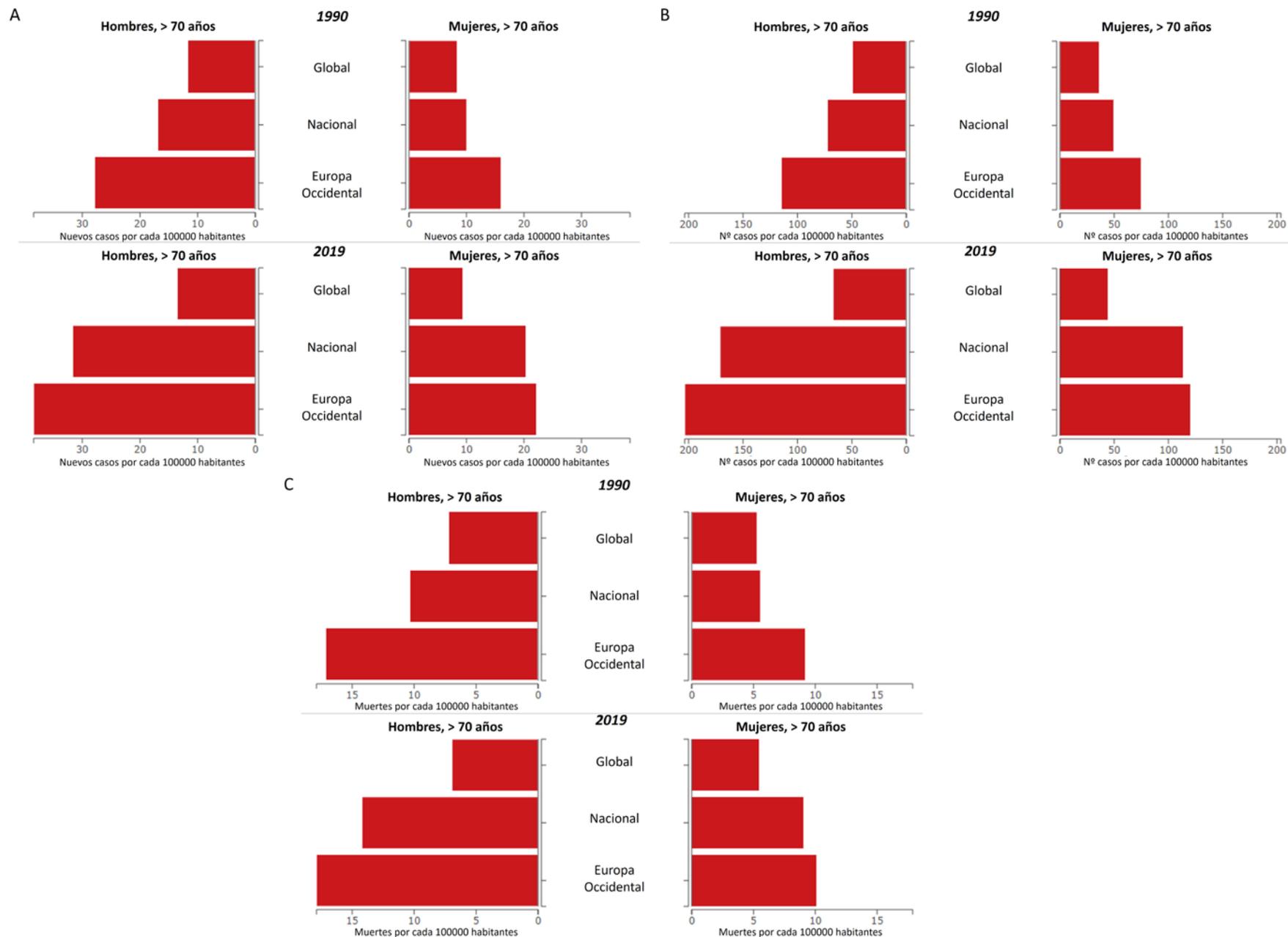


Figura 2:Tasa de incidencia, prevalencia y mortalidad de la Leucemia Linfocítica Crónica según el sexo en 1990 y 2019. A) Incidencia. B) Prevalencia. C) Mortalidad. (Datos obtenidos del Institute for Health Metrics and Evaluation -IHME-).¹⁷

I.2.I Fenotipo del linfocito B clonal.

La detección de clones B-CLL en SP se realiza mediante citometría de flujo. Presentando estos LB monoclonales maduros en su membrana una ^{9,11,18,27-29}:

- Co-expresión de los marcadores CD19, CD20 y CD5.
- Sobreexpresión de los marcadores de activación CD23, CD25, CD69 y CD71.
- Baja expresión de CD22, CD32b (FcγRIIb) y CD79b.
- Expresión uniforme de CD27.
- Aproximadamente (~) 10 veces menos expresión de Ig de superficie que los LB normales, co-expresando Ig M e Ig D en su membrana.
- Mayor presencia de clones con expresión en superficie de la cadena ligera κ que λ .
- Negativos para CD10.

I.3 Factores pronósticos en Leucemia Linfocítica Crónica.

La CLL presenta cursos clínicos muy heterogéneos, pudiendo tener pacientes completamente asintomáticos, estables durante periodos largos de tiempo y sin necesidad de iniciar tratamiento, mientras otros individuos presentan formas severas que necesitan prácticamente tratamiento inmediato en el momento del diagnóstico y pueden llegar a tener muerte prematura ^{3,30-32}. Anualmente, ~30 % de las CLL son estables (c-CLL) y no requieren ningún tipo de tratamiento; siendo su fallecimiento debido a otras causas. Además, de ellas ~1 – 2 % presentan regresión espontánea (mayoritariamente son pacientes con CLL con una serie de características concretas, tales como: mutación homogénea en la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas y no estereotipada, con baja actividad proliferativa y migratoria y alta tasa de proliferación de LT), mientras que el resto individuos con CLL, requieren de tratamiento y en ~2 – 10 % de los casos aparece una progresión agresiva de la enfermedad, convirtiéndose en un tipo de linfoma de crecimiento rápido o transformación de Richter (> 90 % de los casos suele ser un linfoma difuso de célula B grande) ².

Debido a esta heterogeneidad, los criterios pronósticos de la CLL han ido variando a lo largo del tiempo, e incluyendo los nuevos biomarcadores descubiertos recientemente. La OMS desde el año 1967 ha intentado aunar los criterios diagnósticos para la clasificación de neoplasias linfoides (WHO-HAEM); y desde el año 2016, existe para la CLL un índice pronóstico internacional (CLL-IPI). Actualmente, la 5ª edición de la WHO-HAEM y la CLL-IPI, emplea como marcadores pronósticos la deleción del brazo largo del cromosoma 13 (del[13q]), deleción del brazo largo del cromosoma 11 (del[11q]), deleción del brazo corto del cromosoma 17 (del[17p]), trisomía 12, mutación de TP53 y el estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGHV); junto con la edad, estadio clínico y los niveles de β 2-microglobulina como se comentarán a continuación ^{8,11,19,21,31,33-35}.

Por tanto, en base a la heterogeneidad clínico-biológica de la enfermedad es necesario establecer una serie de factores pronósticos clínicos útiles que presenten una base biológica.

I.3.1 Características clínicas.

En primer lugar, los pacientes diagnosticados con CLL son clasificados en base a los dos primeros sistemas de estadificación de pacientes con neoplasias desarrollados por Binet ³⁶ (ampliamente usado en Europa) y Rai ³⁷ (usado generalmente en Estados Unidos). Ambas estadificaciones se realizan en base a la evaluación de los siguientes parámetros: linfadenopatías (inflamación de ganglios linfáticos), organomegalias (agrandamiento de órganos como por ejemplo el bazo o el hígado) y citopenias (disminución/ausencia de alguna o todas las células presentes en SP) (**Tabla 3**).

Tabla 3: Sistemas convencionales de estadificación de pacientes.

Estadio Rai	Estadio Binet	Linfocitos (niveles)	Linfadenopatía	Organomegalia	Anemia	Plaquetas (niveles)	Grupo de riesgo (CLL-IPi)
0	A	Altos	No	No	No	-	Bajo
I		Altos	Sí	No	No	-	
II	B	Altos	Sí/No	Sí	No	-	Intermedio
III	C	Altos	Sí/No	Sí/No	Sí	-	
IV		Altos	Sí/No	Sí/No	Sí/No	Bajos	Alto

I.3.2 Características biológicas.

Debido a la dificultad que presentan los sistemas convencionales de estadificación de aquellos pacientes con rápida evolución, en los últimos años se han llevado a cabo diferentes estudios que han permitido determinar variedad de mutaciones puntuales, anomalías cromosómicas, mutaciones somáticas en segmentos génicos codificantes de la IGHV o, en los niveles de expresión de ciertas proteínas, pequeñas moléculas de ácido ribonucleico (miARN)s, etc. ^{10,38,39}.

En esta sección se describen los biomarcadores de valor pronóstico más utilizados en clínica, entre los que se incluye estado mutacional de la IGHV, anomalías cromosómicas, mutaciones puntuales y alteraciones en la expresión proteica (**Figura 3**) ^{8,11,40-44}.

I.3.2.1 Estado mutacional de la IGHV.

Actualmente, el estado mutacional de la IGHV es considerado una de las piedras angulares de la estratificación de pacientes con CLL. Demostró gran relevancia a partir de los estudios realizadas en 1999 sobre la IGHV en pacientes con CLL ^{45,46} y hasta la fecha, es uno de los biomarcadores pronósticos más robustos debido a que: i) se mantiene estable a lo largo del tiempo (independientemente de la evolución de la enfermedad y el agente terapéutico), ii) es marcador de buen pronóstico y iii) presenta alto valor predictivo.

Aproximadamente el 40 % de los pacientes de CLL presentan una IGHV no mutada (U-IGHV), es decir, hay un 98 % de homología con la línea germinal, mientras que el resto de pacientes presentan una IGHV mutada (M-IGHV). Esto indica un origen diferente de la B-CLL durante la etapa madurativa del LB (véase sección 1.4.1.1). Además, aquellos pacientes con U-IGHV presentan un mal pronóstico debido a que este tipo de clones tiene una mayor activación del

receptor de antígeno del linfocito B (BCR), manifestando corta supervivencia libre de tratamiento (SLT), supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG). Sin embargo, aquellos pacientes con M-IGHV presentan niveles más bajos de Ig M en superficie celular y en consecuencia, menor activación celular mediada por BCR y entrada en anergia ^{20,21,29,31,35,47}.

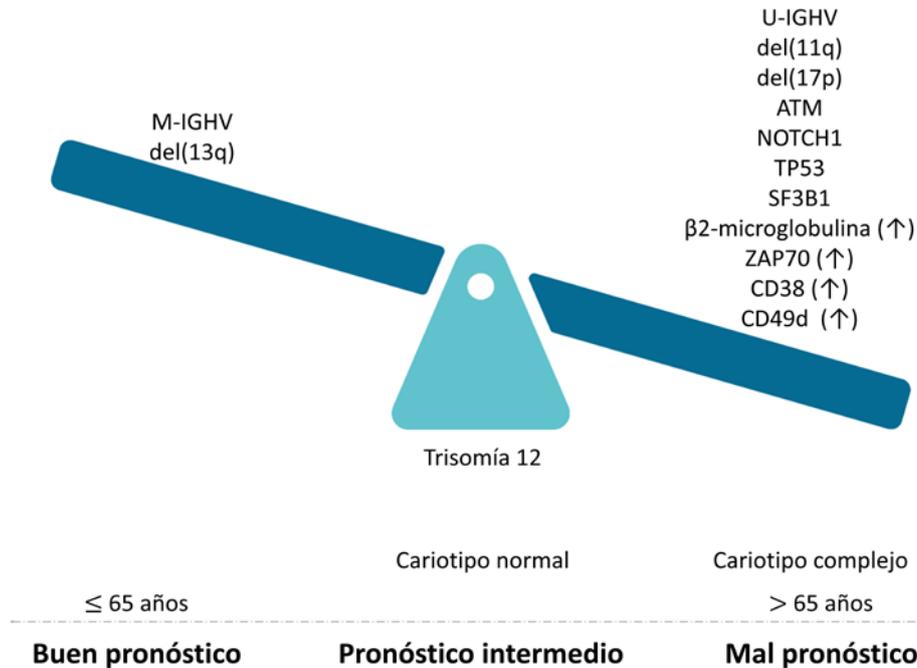


Figura 3: Biomarcadores pronósticos descritos con mayor relevancia en Leucemia Linfocítica Crónica.

I.3.2.2 Alteraciones cromosómicas.

Generalmente las alteraciones cromosómicas son evaluadas mediante estudio citogenético, utilizando hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH). Además, estas alteraciones van variando durante el curso de la enfermedad, agregando una mayor severidad. Entre las anomalías cromosómicas más frecuentes en CLL, se describen en orden de mayor a menor abundancia/prevalencia: del(13q) > FISH normal > Trisomía 12 > del(11q) > del(17p) ^{31,32,35,41}.

A continuación, se describen las características, desde el punto de vista clínico-biológico, más relevantes asociadas a cada una de ellas.

Del(13q) y traslocación 13q14

Se encuentra presente en el 40 % - 60 % de los casos de CLL, por lo que se ha considerado como un evento clonal. Está asociada con un curso benigno de la enfermedad, aunque el porcentaje de clones con dicha delección, permite estratificar en dos grupos: SLT corta con > 80 % de las células con dicha delección y mayor SLT con < 80 % de las células con del(13q) ^{11,20,31,41,48}.

Por otro lado, existe la presencia de una traslocación recurrente en CLL que involucra al cromosoma 13q14 cuando los pacientes presentan M-IGHV, aumentando la supervivencia de las B-CLL de estos individuos. Esto es debido a que en este cromosoma se encuentra localizado el gen DLEU2, quien contiene los clústeres de miARN 15a y 16-1; encargados de regular la subexpresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Por lo cual, delecciones grandes en 13q o

disrupciones dentro del cluster de miARN, pueden relacionarse con un aumento de la abundancia relativa y/o expresión de BCL2 en estas B-CLL ^{11,20,31,42,48}.

Trisomía 12

Esta anomalía cromosómica está presente en ~10 % - 20 % de los casos de CLL y es considerada, al igual que la anterior, un evento clonal. Se asocia con progresión temprana y pronóstico intermedio, donde la SLP es corta; aunque la SG suele ser más larga ^{11,20,31,41}.

Del(11q)

La del(11q) se encuentra en ~20 % de las CLL y se asocia a mal pronóstico. Por lo que aquellos pacientes con este tipo de anomalías, presentan inflamación exacerbada de los ganglios linfáticos (linfadenopatía) junto con una rápida progresión y en consecuencia una SLT y SG cortas ^{11,31}.

Del(17p)

La anomalía cromosómica menos abundante (~5 % - 8 % de los casos de CLL) y se considera un evento subclonal (se producen después del desarrollo de la enfermedad). La del(17p) siempre incluye la supresión del gen TP53, localizado en este cromosoma, lo que promueve una de las formas severas de CLL. La carga de células con del(17p) o mutación del gen TP53 (véase sección 1.3.2.3) permite estratificar a los pacientes en dos grupos: < 20 % de células con del(17p) (curso más indolente de la enfermedad) y > 20 % de células con esta delección (pronósticos adversos, progresión rápida, inicio de tratamiento inminente y resistencia a terapias) ^{31,48,49}.

I.3.2.3 Mutaciones puntuales en genes directores.

El estudio del perfil genético usando nuevas metodologías de análisis (secuenciación de nueva generación -NGS-, secuenciación masiva del exoma completo -WES-, ...) ha supuesto toda una revolución en el estudio de la genética molecular, revelando una alta heterogeneidad en el perfil mutacional. En CLL, las primeras mutaciones puntuales observadas y consideradas con valor pronóstico fueron TP53 y ATM. En las últimas décadas, nuevas mutaciones genéticas en CLL se han ido identificando, como por ejemplo NOTCH1, MYD88 o SF3B1 ^{31,35,42}.

En un estudio realizado por Landau et al. en el 2017, con una cohorte de 538 muestras de pacientes con CLL, se identificaron 44 segmentos de ADN de posibles *driver genes* o genes directores y 11 combinaciones tenían una coexistencia estadísticamente significativa entre anomalías cromosómicas y genes directores, entre las que destacan: i) TP53 y del(17p); ii) ATM y del(11q); iii) Trisomía 12 y las mutaciones en BIRC3 y BCOR ⁵⁰.

En esta sección, se describirán brevemente las características más interesantes de los genes directores con mayor relevancia en CLL.

NOTCH1

Este gen se encuentra en el brazo largo del cromosoma 9 y está involucrado en procesos de angiogénesis, diferenciación y regulación de la transcripción celular. La mutación en este gen (~12 % de los casos) genera una isoforma truncada de la proteína NOTCH1 (estable y activa), la cual se acumula en el interior de la célula y activa la vía de señalización de NOTCH, controlando así el destino de la célula. La presencia de esta mutación, conlleva una corta SLT y se relaciona

con estadios avanzados de la enfermedad. Además, esta mutación se encuentra asociada a otros marcadores pronósticos como son U-IGHV, Trisomía 12 o sobreexpresión de las proteínas CD38 y ZAP70 (estas dos últimas serán tratadas en la sección 1.3.2.4) ^{20,31,42,51,52}.

ATM

El gen ATM se localiza en el brazo largo del cromosoma 11. Codifica una serina/treonina proteína quinasa implicada en la ruta de señalización encargada de reparar el ADN dañado. Las mutaciones en este gen (~11 % de los casos) consisten en un polimorfismo puntual (polimorfismo de un solo nucleótido) en uno de los alelos del gen, inactivándolo. Se suele presentar junto con la del(11q), quien puede comprometer el área donde se encuentra localizado dicho gen, generando una inactivación del otro alelo y, en consecuencia, la inactivación bialélica del gen ATM. Aquellos pacientes con CLL con ambas alteraciones en el gen ATM presentan linfadenopatía voluminosa, rápida progresión y SG corta. Cabe destacar, que esta mutación es considerada un evento subclonal intermedio/tardío, ya que normalmente se encuentra una población de B-CLL con del(11q) y subclones con mutaciones puntuales en el otro alelo. Además, se encuentra asociada con otros marcadores pronósticos como son U-IGHV y la expresión de ZAP70 ^{20,31,42,52,53}.

SF3B1

Este gen se sitúa en el brazo largo del cromosoma 2 y codifica para una ribonucleoproteína encargada de formar el espliceosoma (procesamiento y maduración del ácido ribonucleico -ARN-). Esta mutación (~8 % de los casos) se suele encontrar asociada a un estado mutacional que se considera intermedio de la IGHV y BCR estereotipado (véase sección 1.4.2); confiriendo un mal pronóstico de la enfermedad a aquellos pacientes que la presentan. Es por ello que se considera un evento subclonal intermedio ^{20,29,31,42,49,52,54}.

TP53

El gen TP53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 y codifica la proteína p53; quien actúa como agente supresor de tumores (implicada en la apoptosis, regulación del ciclo celular y transcripcional, etc.). Las mutaciones en dicho gen (~5 % de los casos de CLL), son consideradas eventos subclonales tardíos, promoviendo un contexto genético permisivo generando una inestabilidad genómica en dichos B-CLL, lo cual permite la proliferación de los mismos y que, además, puede conferirle resistencia a tratamiento. También, se asocia de forma recurrente con del(17q) (como se comentó en la sección 1.3.2.2), produciendo en los individuos que la padecen una inactivación bialélica del gen TP53. Esta mutación en TP53 se asocia con mal pronóstico, curso agresivo de la enfermedad, corta SG y resistencia a fármacos ^{11,20,35,40,42,49,52,53}.

Por todos estos motivos, las mutaciones puntuales en el gen TP53 son consideradas uno de los biomarcadores pronósticos y de elección de tratamiento de mayor capacidad discriminatoria junto con la edad, estadio clínico (véase sección 1.3.1), estado mutacional de la IGHV (véase sección 1.3.2.1) y el nivel de β 2-microglobulina (véase sección 1.3.2.4) ^{8,11,34,44}.

MYD88

El gen MYD88 está situado en el brazo corto del cromosoma 3. Este gen codifica una proteína adaptadora (MYD88) involucrada en la vía de señalización del receptor tipo Toll (TLR) y el receptor de interleucina 1 en respuesta inmunitaria. Esta mutación se encuentra con baja

frecuencia (~3 % de los casos), los pacientes que la presentan tienen un pronóstico favorable y se asocia con M-IGHV, baja expresión de ZAP70, CD38 y niveles normales de β 2-microglobulina^{31,52}.

I.3.2.4 Perfiles proteicos de expresión diferencial.

La mejora en las técnicas de análisis proteómico ha permitido detectar en CLL numerosas alteraciones en la abundancia relativa de expresión proteica^{55,56}.

Actualmente, en clínica se lleva a cabo el estudio de la expresión de ciertas proteínas sérica como la β 2-microglobulina y antigénicas como CD38, ZAP70, CD49d, las cuales presentan un valor pronóstico relevante durante la evolución de la enfermedad^{19,34}. En esta sección, se describirán brevemente las características de cada una de ellas.

β 2-microglobulina

Esta proteína se encuentra asociada al sistema de antígeno leucocitario humano tipo I (HLA-I), cuyo gen se localiza en el cromosoma 15, y su forma soluble se debe a la liberación intracelular de dicha molécula del dominio tipo Ig (cadena pesada α). Desde el año 1996 es considerada un predictor de SLP⁵⁷. Se encuentra asociada con el estadio de la enfermedad y carga tumoral, siendo los niveles elevados de dicha proteína (> 3,5 mg/dL) valorados como factor de mal pronóstico^{21,33,58}.

CD38

Es una proteína de membrana plasmática con múltiples funciones, entre las que se encuentran la proliferación y supervivencia celular o la movilización de iones Ca^{2+} . Alta expresión de esta proteína (> 30 % de las B-CLL presentan expresión positiva) se relaciona con un mal pronóstico y respuesta a tratamiento, niveles altos de β 2-microglobulina y corta SLT, SLP y SG^{10,21,31,33}.

ZAP70

Es una proteína citoplasmática expresada en LT, NK y B-CLL implicada en la señalización del receptor específico de antígeno (Ag). Esta proteína se asocia en B-CLL con un elevado número de tirosinas fosforiladas, cuya fosforilación se relaciona con la activación celular. Sus niveles de expresión permiten, junto con el estado mutacional de la IGHV, predecir la SLT, SLP y SG; correlacionando niveles altos de ZAP70 (> 20 % de las B-CLL presentan expresión positiva) con progresión de la enfermedad y una corta SLT^{10,21,31,33,59}.

CD49d

Es una de las subunidades de la integrina α 4 (VLA-4), un receptor de membrana plasmática que promueve las interacciones entre la B-CLL y el microambiente. Niveles de expresión altos de esta subunidad (> 30 % de las B-CLL presentan expresión positiva) se relacionan con una corta SG y resistencia a tratamiento^{34,60}.

I.4 Características, origen y diferenciación del linfocito B.

La CLL, al igual que cualquier otro proceso neoplásico, presenta un desequilibrio entre protección de las células clonales y su muerte celular. En el caso de las B-CLL los cambios genéticos, como se ha descrito anteriormente, le conceden ciertas ventajas de expansión y supervivencia respecto a su contrapartida normal, mientras que la fuerza impulsora que sustenta dicha protección se basa en las características de la célula origen, el LB. Cada día se generan $100 \cdot 10^6$ LB de los cuales, solo sobreviven aquellos capaces de activar las rutas de supervivencia celular a través del BCR u otros receptores de membrana⁶¹. Además, estas B-CLL exhiben reordenamientos idénticos o similares, debido a que la CLL es una neoplasia de proliferación clonal⁶

Por otro lado, la proliferación, supervivencia y migración de las B-CLL se debe a su interacción con el microambiente y a la activación de la ruta de señalización del BCR. Esta última, propiciada por la transmisión de la señal, por parte de la Ig de membrana que conforma el BCR, hacia las proteínas SYK, BTK (tirosina quinasa de Bruton) y PI3K (fosfatidilinositol 3 quinasa) encargadas de activar factores de transcripción relacionados con diferenciación celular⁶².

I.4.1 Origen del linfocito B.

El LB clonal proviene de una célula B madre pluripotencial, la cual pasa por diferentes etapas de diferenciación hasta convertirse en un LB maduro, a partir del cual se produce un proceso de expansión clonal y selección, acompañado de una diversificación del BCR (**Figura 4**).

I.4.1.1 Ontogenia del Linfocito B.

El origen del LB parte de una célula pluripotencial, denominada célula madre hematopoyética, localizada en MO. Esta célula madre hematopoyética interacciona con células del estroma en MO (células endoteliales, osteoblastos o células mesenquimales), quienes liberan citocinas que permiten el posicionamiento correcto de las células y el envío de señales de supervivencia y diferenciación a las mismas (como por ejemplo SCF requerida para activar c-KIT, o la liberación de IL-7 encargada de la proliferación y supervivencia). Además, estas interacciones entre la célula madre hematopoyética y las células del estroma se intensifican mediante el contacto directo por medio de moléculas de adhesión e integrinas, proporcionando señales de autorrenovación y diferenciación. De este modo, las células madre hematopoyéticas consiguen diferenciarse a células Pro-B⁶³.

Las células Pro-B sufren reordenamientos en los segmentos V-D-J de la IGHV (a nivel genómico) de forma que^{54,63}:

- Si estos reordenamientos son exitosos, se expresa en la superficie de estas células un BCR inmaduro (IGHV reorganizada y cadena ligera sustituida -CD179A/CD179B-), convirtiéndose en células Pre-B.
- Si estos reordenamientos no son exitosos, las células Pro-B entran en apoptosis.

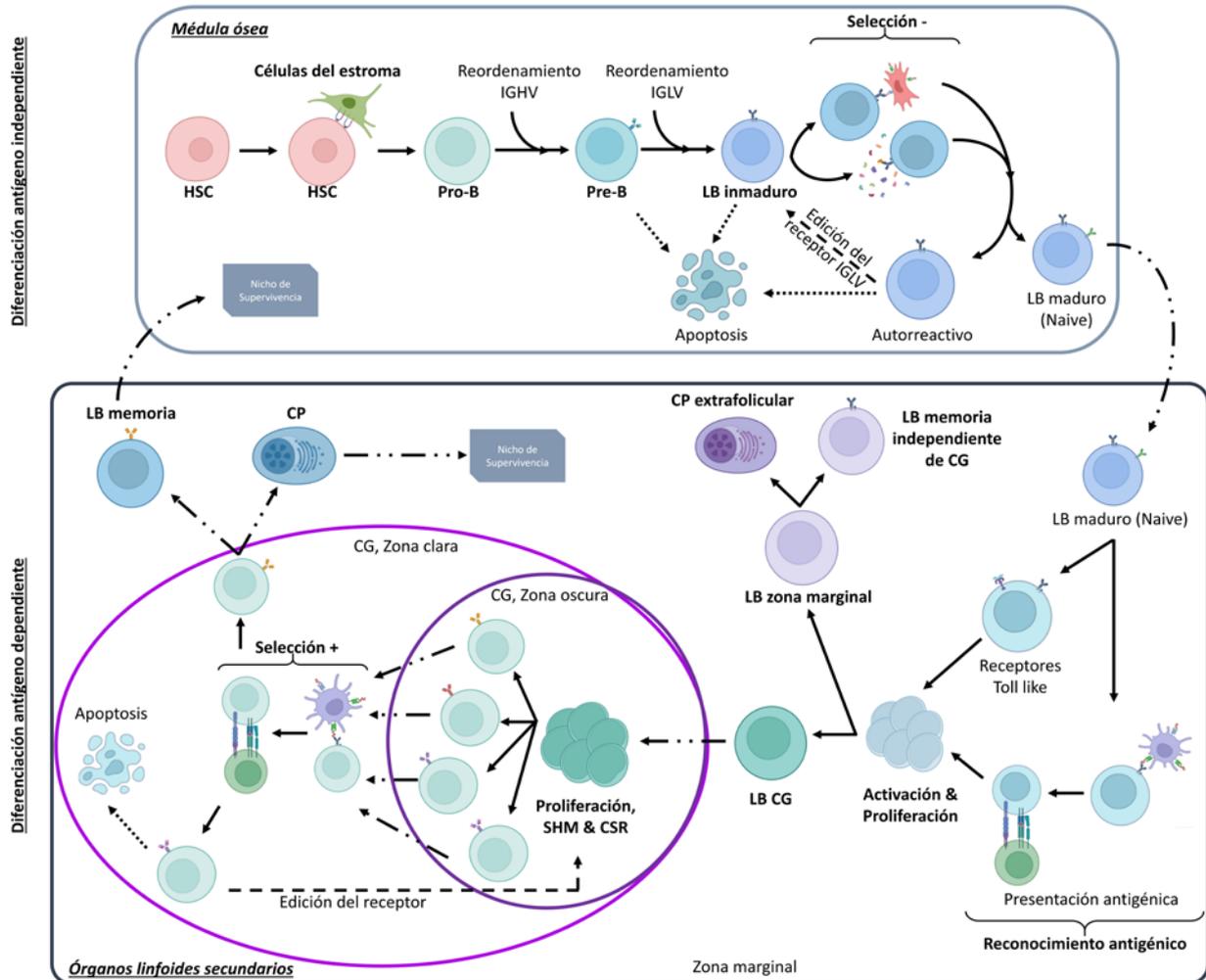


Figura 4: Proceso de diferenciación del linfocito B. HSC: Célula madre hematopoyética, IGHV: Región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, IGLV: Región variable de la cadena ligera de las inmunoglobulinas, LB: Linfocito B, CG: Centro germinal, CP: Célula plasmática, SHM: Hipermutación somática, CSR: Cambio de isotipo.

A continuación, las células Pre-B sufren reordenamientos de los segmentos V-J de la región variable de la cadena ligera de las Igs (IGLV); por lo tanto, al igual que ocurrió anteriormente, cuando son productivos las células Pre-B se convierte en LB inmaduros y si no es así, entran en apoptosis^{54,63}.

El LB inmaduro es sometido a selección negativa, de forma que aquellos LB cuyo BCR reconoce antígenos propios/autoantígenos (aAg) pueden entrar en apoptosis o volver a llevar a cabo un proceso de edición del receptor (IGLV). Si este proceso de edición transforma el LB en autorreactivo, entra en apoptosis o anergia, mientras que si no es autorreactivo, el LB pasa a ser un LB maduro o naive que expresa simultáneamente un BCR tipo Ig M e Ig D^{54,63}.

Este LB naive, con fenotipo RNASEH2C, MRPL21, PURB, NDUFA3, HBQ1, PCBD2 y C9orf64, disminuye la expresión en superficie de Ig M y aumenta o mantiene la expresión de Ig D, permitiendo el paso de dicho LB de MO a los órganos linfoides secundarios (SLOs) (ganglios linfáticos, bazo, amígdala palatina, placas de Peyer, etc.)⁵⁴.

Una vez localizado el LB naive en los SLOs, este aumenta la expresión de VLA-4 y es activado. El proceso de activación se inicia cuando un Ag es presentado por parte de las células dendríticas (CD), localizadas en el folículo, a los LB para que sea reconocido mediante su BCR. Dicho

reconocimiento se facilita y estabiliza por medio de la interacción entre las proteínas de adhesión VCAM1 (presente en las CD) y VLA-4 (localizada en el LB). Tras dicha presentación, el BCR es internalizado en la célula y los péptidos antigénicos son expuestos al Linfocito T folicular a través del receptor de membrana del sistema de antígeno leucocitario humano tipo II (HLA-II). Asimismo, para que dicho proceso de reconocimiento entre la molécula HLA-II y el receptor de membrana del LT se lleve a cabo de forma adecuada, es necesaria una segunda señal mediada por la unión entre CD40/CD40L (presentes en la membrana del LB y LT respectivamente), desencadenando, en la zona borde LT-LB del folículo, la activación del LB naive y su proliferación. Además, estos LB naive son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), por medio de los TLRs, activando al propio LB naive sin depender del LT^{54,63-65}. A partir de este punto, los LB naive activados pueden diferenciarse en LB de zona marginal o LB de centro germinal (CG) (**Figura 4**).

LB de zona marginal.

Aquellos LB naive que presentan una iteración de la señalización CD40 o activación debida al reconocimiento de PAMPs, van a permanecer en la zona marginal del folículo, donde se diferenciará hacia plasmoblasto y finalmente a células plasmáticas extrafoliculares (productoras de anticuerpos -Abs- tipo Ig M mayoritariamente, que son la primera defensa contra patógenos en los SLOs) o LB de memoria independientes de CG (con mayor expresión de Ig M que de Ig D). En ambos casos, células de vida corta^{63,64,66} (**Figura 4**).

LB de centro germinal.

Los LB de CG, con fenotipo MED21, DDX47, GINS3, GTF2A2, EIF4G2, NUP62 e HIST2HBC, son aquellos LB naive en los que durante su proceso de presentación antigénica los LT foliculares han llevado a cabo un aumento en la liberación y producción de IL-21 y CD40L. Estos LB de CG entran dentro del CG para su proceso de expansión clonal⁶³⁻⁶⁵.

El LB de CG localizado en la zona oscura del CG aumenta la expresión de BCL-6 y del receptor de esfingosina-1 fosfato 2 acoplado a proteína G (S1P2), reteniendo así a dichos LB en la zona oscura y permitiendo el proceso de proliferación, hipermutación somática (SHM) y/o cambio de clase/isotipo de inmunoglobulina (CSR). De este modo y mediante los patrones diferenciales de expresión de citocinas y de receptores de quimiocinas (CXCR4, AID, CXCL12 entre otros), los LB migran hacia la zona clara, donde sufren un proceso de selección positiva. Esta selección positiva no es más que una segunda ronda de presentación antigénica por parte de las células presentadoras de antígenos (APCs). De forma que cuanto mayor es la afinidad por el Ag, mayor captura del mismo se produce y, por tanto, un mayor número de moléculas HLA pueden ser reconocidas por los LT foliculares. Esto hace que células con BCR de baja afinidad entren en apoptosis o bien, vuelvan a la zona oscura del CG para sucesivas rondas de SHM y CSR. Si no es así, los clones seleccionados pasarán a transformarse en células B de memoria (quienes presentan un menor número de rondas de SHM y menor afinidad del BCR por el Ag que las células plasmáticas), con un fenotipo EBF1, BCL2L13, LRBA, IRF9, ITGB1, NMI, MRPL55 y THEMIS2, o células plasmáticas (quienes presentan una gran afinidad del BCR por el Ag y presencia de niveles constantes o aumentado de IRF4), quienes expresan el siguiente fenotipo: IGKV3-11, IGKV3-15, IGHD, IGLC3, JCHAIN, COX6B1, COX7C, IRF4, GTF2A1, LZTFL1 y ABL1. Migrando los primeros hacia el nicho de supervivencia localizado en MO y los últimos a SLOs^{54,63-67} (**Figura 4**).

I.4.I.2 Diferenciación de Linfocitos B antígeno independiente.

Tal y como se ha descrito previamente (1.4.1.1), durante el desarrollo del LB en MO se producen, en primer lugar, a nivel genómico el reordenamiento de los genes de la IGHV y, posteriormente, los de la IGLV.

Este reordenamiento se produce entre los segmentos V-D-J para la IGHV y entre los segmentos V-J para la IGLV. Cada uno de estos segmentos a su vez presenta unas regiones adyacentes denominadas secuencias señalizadoras de recombinación (RSS); compuestas por una secuencia heptámera consenso, una región espaciadora de entre 12-23 pares de bases y una secuencia nonamérica consenso ^{68,69} (**Figura 5**).

Las RSS de los segmentos objetivo V(D)J son reconocidas por el heterodímero enzimático RAG1/2 (*V(D)J recombination-activating protein 1/2*), generando una rotura en la doble hélice del ADN adyacente a cada segmento. El ADN intermedio une las regiones complementarias para formar una estructura circular que será eliminada. De forma simultánea, los 4 extremos del ADN próximos a los segmentos V(D)J son estabilizados por la enzima RAG1/2, generando una unión muy estable entre el extremo señal y una horquilla en el extremo codificante para su protección. Posteriormente, se lleva a cabo la apertura de las horquillas y la unión de las regiones codificantes de los dos segmentos V(D)J seleccionados. Esta unión se lleva a cabo mediante un mecanismo de unión de extremos no homólogos, en el que interviene la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal o TdT, encargada de aumentar aún más la diversidad del BCR mediante la introducción de nucleótidos al azar ^{68,69} (**Figura 5**).

Este proceso permite la generación de un amplio repertorio casi ilimitado de posibles especificidades de unión a Ags, ya que la diversidad de uniones se realiza al azar a nivel de rotura y selección de las RSS y a nivel de unión de extremos no homólogos. Sin embargo, debido a la gran diversidad de uniones posibles, puede que no todos los reordenamientos sean productivos, propiciando varios ciclos de reordenamientos tanto a nivel de la IGHV como de la IGLV. Se estima que aproximadamente el 40 % de las células B normales presentan dos reordenamientos V(D)J, uno productivo y otro no productivo ^{68,69}.

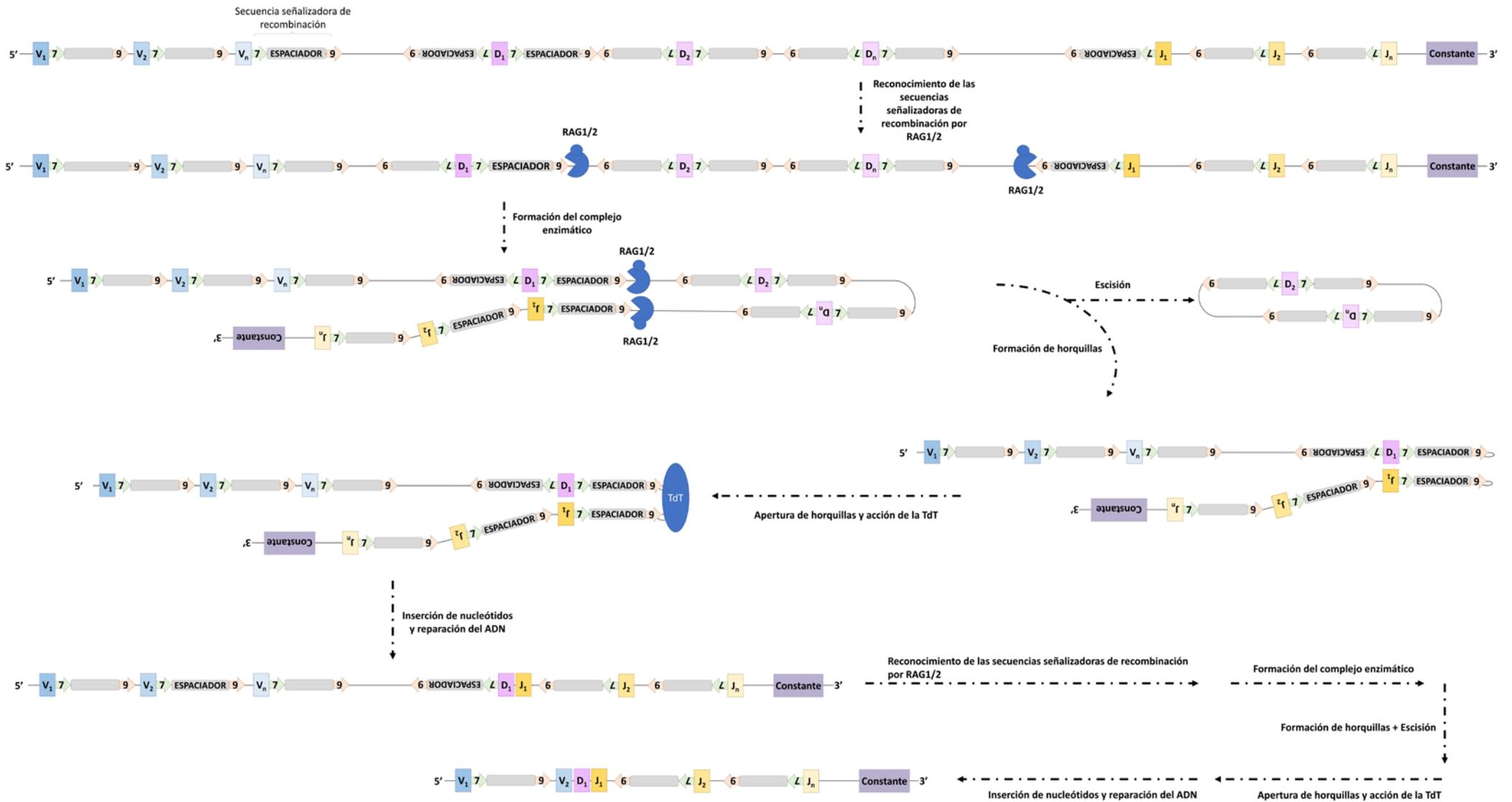


Figura 5: Esquema del proceso de recombinación somática que forma parte del proceso de diferenciación B antígeno independiente.

I.4.I.3 Diferenciación de Linfocitos B antígeno dependiente.

Los LB maduros (con al menos un reordenamiento productivo V(D)J) salen de MO y migran hacia los SLOs, donde serán activados (véase sección 1.4.1.1). De este modo, dependiendo de las características del Ag reconocido por el BCR se puede producir un aumento de su diversidad por medio de dos mecanismos, la SHM y/o CSR (compartidos con el proceso de diferenciación de los LT). Los cuales aumentan el repertorio (SHM) o realizan un cambio de isotipo de las Igs (CSR).

Tanto la SHM como el CSR necesitan de la presencia de una lesión a nivel de ADN para poder llevarse a cabo. Es por ello que existe un sistema, denominado citidina desaminasa inducida por activación (AID), que reconoce residuos citosina en las regiones de hipervariabilidad (IGHV e IGHJ) o en las secuencias de señalización de cambio de clase (C_H), produciendo una desaminación de citidinas a uridinas en estas regiones. Esto genera un daño a nivel del ADN en dos puntos que debe ser reparado. Para ello, ambos puntos deben encontrarse rotos y yuxtapuestos físicamente, generando un lazo con el ADN intermedio; el cual será eliminado ⁶⁸ (Figura 6).

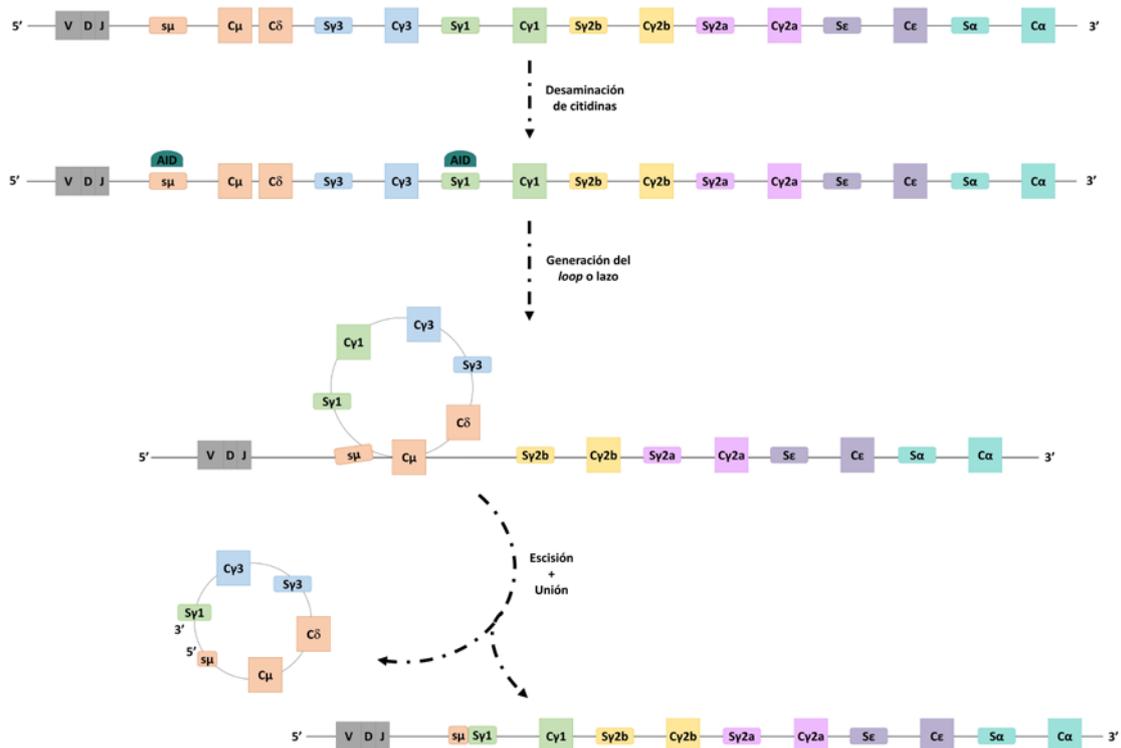


Figura 6: Esquema del proceso de cambio de isotipo implicado en la diferenciación B antígeno dependiente.

En el caso de la SHM, mayoritariamente entra en juego el proceso de reparación por escisión de base. Este consiste en el reconocimiento de la base desaminada por parte de la Uracil-ADN-glicosilasa, quien se une a la uridina y la escinde. Posteriormente, una endonucleasa localiza el sitio apurínico/apirimidínico y produce una rotura en la hebra de ADN. Esta rotura permite la actuación de la ADN polimerasa β , quien desplaza a la hebra antigua (eliminada por la acción de la endonucleasa FEN1 -elimina los extremos 5'-) y polimeriza una nueva región de ~ 2 a 10 pares de bases, las cuales serán unidas mediante la acción de la ADN ligasa 1 o 3 con enlaces covalentes entre el extremo 5' y el 3' ⁶⁸.

En cambio, en el caso del CSR, mayoritariamente, se conduce a la reparación del daño en el ADN mediante un mecanismo de reparación de errores de emparejamiento o desajuste de bases. Este consiste en un reconocimiento de la zona desajustada por el heterodímero MSH2-MSH6, encargado de reclutar al complejo MutL α (MLH1 y PMS2). Este último, escinde la zona de ADN que rodea el desajuste de pares de bases con ayuda de la exonucleasa EXO1, generando una rotura en la cadena del ADN que será reparada por la ADN polimerasa δ y unida por su extremo terminal gracias a la ADN ligasa 1⁶⁸.

Hipermutación somática.

Este proceso se produce únicamente en los CG y conduce a la maduración de la afinidad del BCR frente al Ag, por lo tanto, este mecanismo puede generar un aumento, disminución o inactivación del BCR, conllevando la selección positiva del clon, entrada en sucesivas rondas de SHM o la apoptosis celular respectivamente⁶⁸.

Durante este proceso se conduce a la generación controlada de lesiones (mutaciones puntuales o pequeñas inserciones/deleciones), las cuales deben ser reparadas, sobre las 3 regiones determinantes de complementariedad o CDR (dominios de hipervariabilidad), localizadas en los exones V(D)J de las regiones IGHV e IGLV con reordenamiento productivo⁶⁸.

Cambio de clase/isotipo de inmunoglobulina.

Este mecanismo se puede generar tanto dentro como fuera del CG. Produce una alteración a nivel funcional en el BCR, debido al reconocimiento de los Ags, proporcionando una forma de respuesta adecuada para la eliminación del patógeno; al tiempo que sigue manteniendo su afinidad por el mismo. Siendo el isotipo Ig G responsable del reconocimiento de virus y bacterias, Ig E de parásitos e Ig A de microbios localizados en mucosas^{54,68}.

En este caso, la generación de mutaciones controladas (desajuste de bases Uracilo/Guanina) se producen sobre unas secuencias repetitivas no codificantes que flanquean los exones C μ -C δ , C γ 3, C γ 1, C γ 2b, C γ 2a, C ϵ y C α de la cadena pesada de las Igs, denominadas secuencias de señalización de cambio de clase⁶⁸ (**Figura 6**).

I.4.2 Determinación de los segmentos CDR de la IGHV.

Como se describió en las secciones 1.4.1.2 y 1.4.1.3, el BCR del LB es un receptor versátil generado por recombinación somática y moldeado por SHM⁷⁰. Este receptor presenta dos cadenas pesadas y dos ligeras, las cuales tienen 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) separadas por regiones marco o FWR. Siendo de todas estas CDR, la región más variable la CDR3⁶⁸.

Se estima que ~30 % - 40 % de todos los casos de CLL presenta una restricción del uso de los segmentos génicos V(D)J; de los cuales, $\frac{2}{3}$ presentan U-IGHV. Esto genera una cierta asimetría y sesgo en cuanto a la disponibilidad de las regiones V(D)J de la IGHV e IGLV; y en consecuencia, proporciona una especificidad ante Ag compartida entre pacientes^{2,20,54,61,71,72}.

Se ha descubierto que el reordenamiento estereotipado más abundante es el codificado por el gen IGHV1-69/IGHJ6, presente en el 13 % de las CLL, seguido de IGHV3-21/IGHJ6. Otros

estereotipos identificados son IGHV4-34 e IGHV4-39, que se dan en pacientes con cambio de isotipo a Ig G. Pacientes con IGHV3-21 e IGHV4-39 presentan una enfermedad agresiva, mientras que aquellos con IGHV4-34 suelen presentar una enfermedad indolente, debido a la entrada en anergia de estos tipos celulares. También, cabe señalar que tanto IGHV1-69 e IGHV4-39 son estereotipos presentes en U-IGHV, mientras que IGHV4-34 está presente en M-IGHV, e IGHV3-21 se encuentra presente tanto en U-IGHV como M-IGHV ^{1,2,20,54,61,71-73}.

Por consiguiente, estas restricciones a nivel de los segmentos V(D)J generan una baja diversidad de secuencias CDR, proporcionando patrones de aminoácidos distintivos que confieren a los pacientes características clínicas, genéticas, epigenéticas o de respuesta funcional y de transmisión de la señal a través del BCR o TLRs comunes, permitido clasificarlos en subgrupos ^{54,72}.

A continuación destacamos los 4 subgrupos mayoritarios de receptores estereotipados con características clínico-biológicas homogéneas y consistentes (subgrupo 1, 2, 4 y 8); todos ellos con enfermedad agresiva salvo el subgrupo 4, quien presenta curso clínico indolente ^{2,20,54,61,71,72} (**Tabla 4**).

Tabla 4: Características de los 4 grupos más relevantes de receptores estereotipados.

	Segmento génico estereotipado			
	1	2	4	8
Genes	IGHV1-5-7 IGHD6-19 IGHJ4	IGHV3-21 IGHL3-21	IGHV4-34	IGHV4-39
Estado mutacional IGHV	U-IGHV	M-IGHV (~60 %) U-IGHV (~40 %)	M-IGHV	U-IGHV
Curso clínico	Agresivo	Agresivo	Indolente	Agresivo (Transformación de Richter)
Tipo de BCR	Funcional	Funcional	Anérgico	Funcional
Alteraciones genéticas asociadas	Del(11q) Del(17p) NOTCH1 NFKB1E	Del(13q) SF3B1	Del(13q) -	Trisomía 12 NOTCH1
Cambio de isotipo	NO	NO	SÍ (Ig G)	SÍ (Ig G)

U-IGHV: Región Variable de la Cadena Pesada de las Inmunoglobulinas (IGHV) no mutada; M-IGHV: IGHV mutada.

Subgrupo 1.

Se encuentra codificado por los segmentos génicos IGHV1-5-7, IGHV4-39 e IGHJ4 y representa ~2,2 % de todas las CLL. Se asocia con una U-IGHV y lesiones genéticas como la del(11q), del(17p) y alta frecuencia de mutaciones en NOTCH1 y NFKB1E (implicada en la señalización de la ruta de supervivencia del clon). Además, cabe destacar en este subgrupo de pacientes, el aumento de expresión de proteínas implicadas en la activación del LB vía TLR, como son TLR7 y NFKB1A ^{1,54,73}.

Subgrupo 2.

Codificado por los segmentos génicos IGHV3-21 e IGH3-21. Representa del 2,5 % - 3 % de todas las CLL y presenta un sesgo claro hacia una M-IGHV (~60 % de los casos del subgrupo), aunque también se asocia con U-IGHV (~40 % de los casos del subgrupo). Presenta una alta frecuencia de lesiones genéticas como la del(13q) y de mutaciones SF3B1 (sobre todo vinculadas a M-IGHV) ^{1,54,73}.

Además, en este subgrupo encontramos un conjunto de pacientes (independientemente del estado mutacional de la IGHV u otras características) que presenta el estereotipo IGLV3-21*01, el cual se asocia a cursos clínicos muy agresivos y se adquiere por acumulación de mutaciones durante el proceso de maduración de afinidad. Dichos clones presentan un aumento de la expresión de MYC y una disminución de la expresión en superficie de CXCR4, indicando una activación constante del BCR de la B-CLL. Siendo esta debida al reconocimiento de la región enlace entre el dominio constante y variable del BCR por parte del clon ^{54,73}.

Subgrupo 4.

Presenta un BCR codificado por el segmento génico IGHV4-34. Representa ~1 % de todas las CLL, se asocia con una M-IGHV y es uno de los subgrupos, junto con el 8 (se comenta a continuación), capaz de realizar CSR a Ig G. Con un bajo enriquecimiento a nivel de lesiones genéticas, donde cabe destacar la del(13q) ^{1,54,73}.

Dichas B-CLL presentan características funcionales y bioquímicas de anergia, debida a una activación constitutiva de ERK1/2 y la falta de señalización por parte de las proteínas MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) y liberación de Ca²⁺ tras el proceso de internalización del BCR ⁵⁴.

Subgrupo 8.

Codificado por el segmento génico IGHV4-39, con capacidad de CSR (al igual que el subgrupo 4) y una frecuencia muy alta de transformación de Richter. Representa ~0,5 % de todas las CLL y se asocia con U-IGHV. Presenta un enriquecimiento en la frecuencia de mutaciones de NOTCH1 y trisomía 12. Cabe destacar, que los BCR de estas B-CLL tienen un reconocimiento robusto y promiscuo tanto por antígenos microbianos (mAgs) como aAgs ^{1,54,73}.

I.4.3 Evolución clonal.

Como se comentó anteriormente, la CLL es una enfermedad muy heterogénea, con cursos normalmente prolongados y en los que las B-CLL se encuentran en continuo movimiento entre SP y tejido linfoide/MO.

La CLL como cualquier otra neoplasia, se comporta como un sistema complejo, darwiniano y adaptativo dentro de un microambiente en el que los clones deben competir por el espacio y los recursos existentes, sometiéndolos a selección natural ⁷⁴. Esto facilita la adquisición de alteraciones cromosómicas por parte de los clones durante el transcurso de la enfermedad, debido a errores en el mecanismo de reparación del ADN o por la exposición a agentes genotóxicos (como por ejemplo moléculas carcinógenas, luz ultravioleta o sustancias farmacológicas), aumentando así la heterogeneidad y propiciando la aparición de nuevas poblaciones clonales ^{74,75}.

En consecuencia, la evolución clonal es el resultado de la competencia e interacción entre clones de CLL genéticamente diferentes y con dinámica evolutiva propia. Dicha dinámica evolutiva del clon se basa mayoritariamente en la generación de mutaciones a nivel genómico (con efectos positivos, negativos o neutros) y selección de aquellas más exitosas, originando alteraciones genéticas y microambientales ^{74,75}.

Por tanto, la evolución clonal es una fuerza propulsora del desarrollo y expansión del tumor. Esta evolución es debida principalmente a 3 causas: aparición de nuevas poblaciones clonales que tienen alta capacidad proliferativa, aparición de cariotipo complejo (debido a la adquisición y acumulación progresiva de 3 o más alteraciones genéticas -numéricas o estructurales-) y una fuerte presión selectiva (potenciada de forma artificial mediante el uso de fármacos, seleccionando clones resistentes) ^{35,50,74}.

En la CLL, la evolución clonal puede considerarse un evento clave en el desarrollo y recaída de la enfermedad, haciéndola cada vez más agresiva y resistente. Los estudios llevados a cabo sobre el genoma completo han demostrado la presencia de mutaciones impulsoras presentes durante los eventos tempranos de la CLL (como del(13q), Trisomía 12 o MYD88), mientras que otros (como TP53, SF3B1 o NOTCH1) se manifiestan a medida que la enfermedad avanza, considerándose así eventos subclonales. Es por ello que, a través del estudio de las secuencias acumulables de alteraciones genéticas, se puede reconstruir genealógica la historia evolutiva de los clones y subclones B-CLL ^{35,41,50,74}.

A su vez, la heterogeneidad intra-tumoral es un proceso dinámico, que se ve enriquecido en poblaciones clonales, haciéndolas cada vez más complejas a medida que la enfermedad progresa y se aplican terapias. Ejemplo de ello es la presencia de del(17p) o la mutación en TP53 (véase sección 1.3.2.2 y 1.3.2.3). Tienen un valor pronóstico desfavorable muy robusto, se encuentran en ~3 % de las CLL en estadio temprano, aumenta con la 1ª línea de tratamiento hasta ~12 % y se dispara hasta el 37 % en los casos que no responden a terapia (enfermedad refractarios). Otro ejemplo de ello es la mutación puntual de NOTCH1 (véase sección 1.3.2.3), cuya frecuencia de aparición va aumentando a medida que la enfermedad progresa, ya que en el momento del diagnóstico se encuentra presente en ~11 % de las CLL, aumenta en los casos de resistencia a fármacos hasta ~20 % y está presente en ~30 % de las CLL que sufren transformación de Richter. Por lo que el empleo de los fármacos ejerce una presión selectiva sobre las B-CLL, que se ve reflejada en el perfil genético y epigenético; pero no en el perfil fenotípico evaluado en el diagnóstico (véase sección 1.2.1) ^{31,35,50,76}.

I.4.4 Señalización intracelular del linfocito B clonal.

Como se describió anteriormente, la CLL es una linfadenopatía que acumula B-CLL con un fenotipo hiperactivado (CD23⁺, CD25⁺, CD69⁺ y CD71⁺), con una gran heterogeneidad a nivel clínico-biológico y un panorama mutacional muy diverso ^{2,77}.

Una de las vías de señalización intracelular más conocidas en LB es la que se promueve a través del BCR, principal responsable del reconocimiento antigénico por parte del LB durante el proceso de la respuesta inmunitaria y principal responsable de la supervivencia y proliferación de dicha célula. Por tanto, una de las características principales de las B-CLL es su capacidad para alterar las vías de activación del propio LB, como son la señalización a través del BCR y la coestimulación inmunitaria dentro del entorno leucémico a través de las señales antigénicas y microambientales (de estas últimas se hablará en la sección 1.4.5). Lo cual le permite cooptar a

varias vías de señalización y en consecuencia, favorecer su supervivencia y proliferación^{32,54,77-80}.

En esta sección se describirán las rutas de señalización intracelular más relevantes en el proceso de activación del LB y que son susceptibles de verse alteradas en la B-CLL; las cuales se encuentran esquemáticamente descritas en la **Figura 7**.

I.4.4.I Señalización intracelular mediada por BCR.

Es la principal vía de activación de LB y, por tanto, también de la B-CLL. Es iniciada por el compromiso y multimerización del BCR en el reconocimiento antigénico (formación del complejo de señalización), dando lugar a una serie de cascadas de señalización encargadas de regular, transmitir y amplificar la señal con la finalidad de incrementar la supervivencia, proliferación y respuesta de las células^{54,77-80}.

Debido a la buena respuesta clínica observada tras el tratamiento de los pacientes con agentes dirigidos directamente a intermediarios de dicha ruta (véase sección 1.5) o por la importancia del estado mutacional de la IGHV en cuanto al pronóstico de la enfermedad (véase sección 1.3.2.1), se ha promovido la hipótesis de que la señalización intracelular del BCR tiene gran relevancia en el desarrollo de la CLL³².

Es conocido que las B-CLL presentan una fosforilación tónica en la vía de señalización del BCR, presentando tasas de expresión de BTK de 2 a 3 veces más elevadas que su contrapartida normal (sin correlación directa con su estado activado). Asimismo, en las B-CLL se presentan sobreexpresadas y fosforiladas de forma constitutiva las proteínas tirosina quinasa SYK y LYN y expresión aberrante de ZAP70 asociada a la expresión de SYK. Además, las B-CLL tienen características funcionales de anergia reversible (más pronunciada en B-CLLs con M-IGHV que en las U-IGHV) y activación constitutiva de PI3K (particularmente la isoforma PI3K δ) y de la cascada de señalización por debajo de AKT^{54,71,80,81}.

Por tanto, las B-CLL no presentan un perfil diferencial a nivel del complejo de señalización BCR respecto a su contrapartida normal (formado por una Ig de superficie, el heterodímero CD79a/CD79b -Ig α /Ig β - y asociado al complejo co-receptor CD19 – regulación positiva-), sino en las vías de señalización localizadas debajo de dicho complejo. Asimismo, los BCR de las B-CLL forman dímeros u oligómeros en ausencia de estímulo antigénico, los cuales tras la unión al Ag se disocian y reorganizan para calibrar la señalización y activación del BCR; evidenciando así dos tipos de activación: dependiente de Ag e independiente de Ag^{61,80-82}.

Activación intracelular del BCR dependiente de reconocimiento antigénico.

El reconocimiento de un aAg/Ag por parte del BCR desencadena la fosforilación de los residuos ITAM (tirosina del motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina), presentes en los dominios citoplasmáticos del heterodímero CD79a/CD79b, por parte de la quinasa LYN. Esta fosforilación proporciona sitios de acoplamiento para la quinasa SYK, encargada de llevar a cabo una segunda fosforilación sobre los motivos conservados ITAM del heterodímero; propagando la señal de activación del BCR^{77,81}. La presencia de ZAP70 en la B-CLL además, facilita el reclutamiento de SYK, potenciando la señalización del BCR⁷⁸ (**Figura 7**).

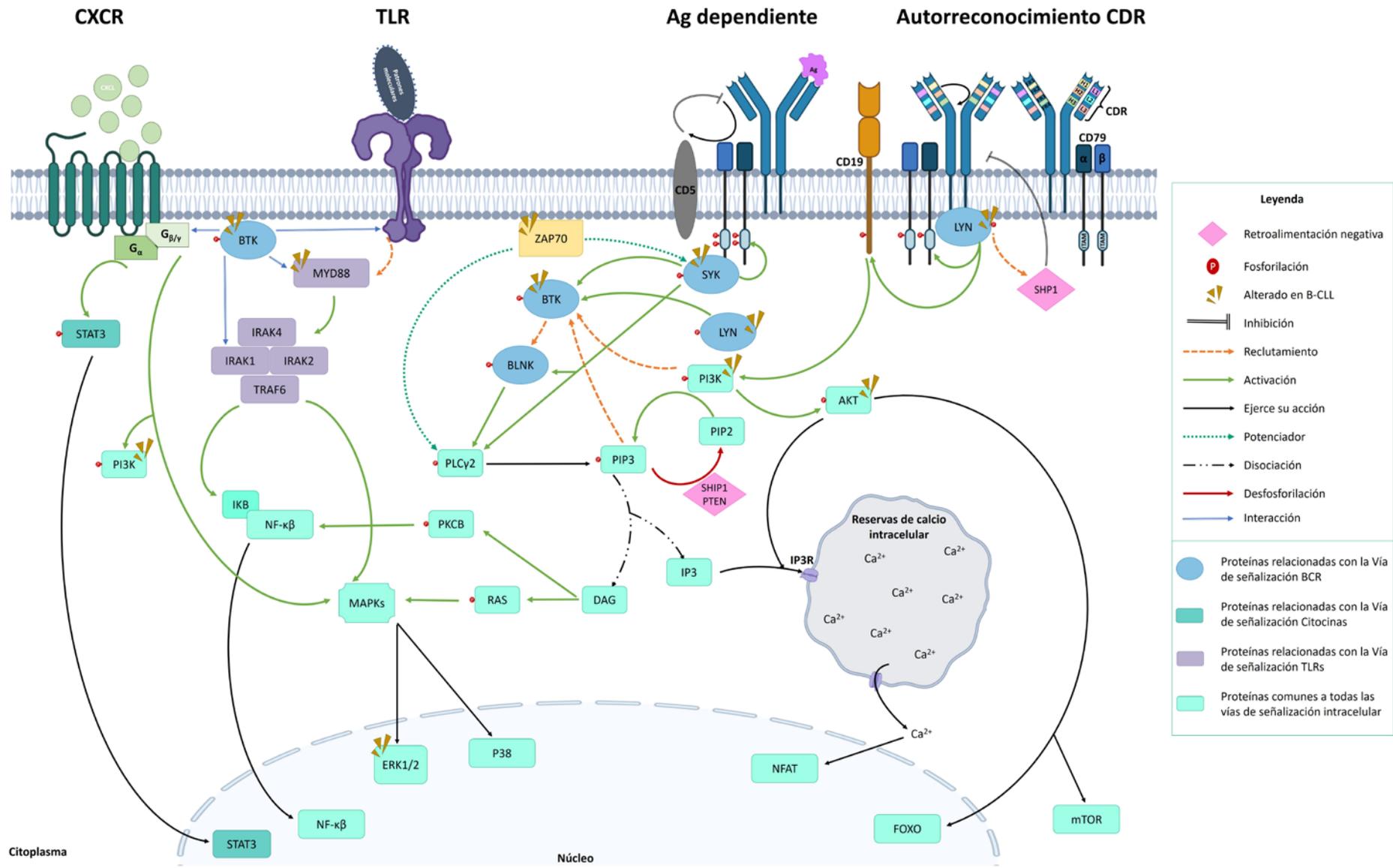


Figura 7: Principales rutas de activación del linfocito B y del clon leucémico.

Por otro lado, la tirosina quinasa LYN produce una fosforilación de los residuos tirosina del amino terminal del co-receptor activador CD19, el cual va a facilitar la activación y unión de PI3K a VAV (factor de intercambio de nucleótidos de guanina – GEF-). Esto último, genera la activación de la serin-treonin quinasa AKT o el proceso de fosforilación de PIP2 (fosfatidilinositol 3,4 difosfato)⁸¹. Asimismo, otra de las funciones de LYN es el reclutamiento y activación de SHP1 (proteína tirosina fosfatasa), quien ejerce una retroalimentación negativa sobre el BCR; inhibiendo el reconocimiento antigénico por parte del BCR^{80,83} (**Figura 7**).

Durante el proceso de fosforilación de PIP2, por parte de PI3K activada, se genera PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato), encargado del reclutamiento y unión de BTK a la membrana plasmática. Una vez allí, SYK (activada) y/o LYN (activada) fosforilan la posición Y551 de BTK. Tras esta fosforilación, se produce una autofosforilación por parte de BTK en la posición Y223, activándola completamente. Este proceso de activación se encuentra modulada por SHIP1 y PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina), encargadas de inhibir la unión de BTK a la membrana plasmática mediante la desfosforilación de PIP3^{81,84}. Por otro lado, la BTK fosforilada puede reclutar a PIP5K (independientemente de su actividad quinasa) generando un bucle de retroalimentación positiva sobre PIP2, quien actúa como sustrato de PI3K⁸¹ (**Figura 7**).

BTK fosforilada (forma activa) es capaz de reclutar a SLP65 o BLNK, permitiendo así crear sitios de acoplamiento para la fosfolipasa PLC γ 2 en el complejo formado por PI3K, VAV y SLP65/BLNK y activarla. La PLC γ 2 activada escinde PIP3 formando los 2^o mensajeros IP3 (inositol trifosfato) y DAG (diacilglicerol), encargados de regular la liberación de Ca²⁺ citoplasmático y la subsiguiente activación de las rutas MAPK, respectivamente^{81,84} (**Figura 7**).

La fosforilación de AKT en la membrana plasmática (desencadenada por PI3K y PDK1) envía señales de pro-supervivencia a la célula. Esto se produce tras la migra de AKT al citoplasma celular donde desencadenará un aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular. La elevación de los niveles de ion Ca²⁺ en el citosol posibilitan su actuación sobre la vía de señalización de la calmodulina y calcineurina, encargadas de activar el factor de transcripción NFAT (factor nuclear de células T activadas). Este último se traslada a núcleo donde ejerce su acción⁸¹ (**Figura 7**).

Por lo tanto, una estimulación antigénica constante (proporcionada por las células presentes en los centros de proliferación -localizados en los tejidos linfoides- o presencia de aAgs) sobre las B-CLL origina un mecanismo de supervivencia. Esta estimulación constante aparte de activar la vía de señalización del BCR, aumenta la expresión de co-receptores inhibidores (CD5, CD22, Fc γ RIIB, CD72, ...), los cuales son capaces de unirse al mismo Ag/aAg que desencadena la señal de activación del BCR, confiriéndole a la célula el fenotipo característico de CLL (véase sección 1.2.1)^{61,79,80,83}.

Cabe destacar que una unión prolongada entre el Ag y BCR facilita la amplificación y fortalecimiento de la transmisión de la señal, induciendo en las B-CLL la liberación de las citocinas CCL3 (MIP-1 α) y CCL4 (MIP-1 β). Estas moléculas solubles tienen como principal función atraer hacia las B-CLL distintas células accesorias, como los Linfocitos T reguladores (Tregs), para proporcionarles a estos clones las condiciones óptimas de crecimiento y supervivencia dentro de los centros de proliferación (localizados en los tejidos linfoides)^{54,78,81,85}.

Activación intracelular del BCR independiente de reconocimiento antigénico.

Se debe a la autoasociación u homodimerización del complejo BCR. Esta capacidad de unión, ya sea entre complejos BCR próximos o de otras B-CLL, permite el autorreconocimiento de las

regiones CDR del BCR. Este autorreconocimiento se puede producir por la presencia de un epítopo conservado dentro de las regiones específicas de la IGHV e IGLV, concretamente en la región marco 2 del CDR (FR2), que es reconocida por el CDR3^{54,61,79-81} (**Figura 7**).

Este proceso de activación de la señal debido a características intrínsecas de la Ig (independiente de Ag y dependiente de SHM), desencadena la señalización intracelular mediada por LYN, SYK, AKT y MAPKs descritas anteriormente, aumentando así los niveles de Ca²⁺ intracelular (**Figura 7**). Cabe destacar que dichos niveles de Ca²⁺ aunque son mayores que en los LB, se encuentran por debajo de los niveles observados tras la activación intracelular del BCR dependiente de Ag. Por tanto, aunque estas interacciones Ig-Ig contribuyen a la supervivencia de la B-CLL y ayuda a activar dicha ruta, por sí sola no es suficiente para generar la proliferación del clon, pero sí para promover el estado anérgico del mismo^{61,77,84,85}.

Por consiguiente, tanto la activación intracelular del BCR dependiente como independientemente de Ag hacen que las B-CLL presenten^{54,71,80,81}:

- i) Niveles de Ig M en superficie bajos, debido a la continua internalización del BCR a causa de los sucesivos reconocimientos antigénicos.
- ii) Niveles altos de Ca²⁺ intracelular como consecuencia del autorreconocimiento de los CDR, localizados en los BCR de la propia B-CLL o de células vecinas.
- iii) Fosforilación constitutiva de MEK/ERK/NFAT en ausencia de AKT fosforilada, debido a la rápida pérdida de la señal desencadenada por la unión del BCR al Ag, quien es reconocido de forma constante y poco prolongada generando un estado de desensibilización del BCR.

I.4.4.2 Papel de los receptores tipo Toll en los linfocitos B.

De forma general, los receptores tipo Toll (TLR) presentan un papel relevante en la respuesta de inmunidad innata, ya que reconocen patrones moleculares específicos estructuralmente conservados en microorganismos (lipopolisacáridos, ARN bicatenario, ADN bacteriano, flagelina, etc.), desencadenando la activación del LB y por tanto de las B-CLL^{78,80,81}.

Dentro de las mutaciones puntuales descubiertas en CLL se encuentran las alteraciones producidas en la proteína adaptadora MYD88 (presente en ~3 % de los casos). MYD88 es la proteína encargada de transmitir la señal del receptor TLR al factor de transcripción NF-κB (factor nuclear κB) (véase sección 1.3.2.3). Además, existen otras perturbaciones en la ruta de señalización intracelular activada por los TLR, como por ejemplo, a causa de la generación de formas truncadas de las proteínas TLR2 e IRAK1 (receptor de interleucina 1) en aquellos pacientes con M-IGHV^{32,81}.

El reconocimiento de patrones moleculares por parte de los TLR permite la formación de homodímeros o heterodímeros, los cuales desencadenan el reclutamiento de MYD88 (excepto el TLR3, quien es independiente de dicha proteína adaptadora). Este reclutamiento de MYD88 origina la activación de los miembros de la familia de la quinasa asociada al receptor de interleucina 1 (IRAK), quienes formarán un complejo e interactuarán con la ubiquitina ligasa TRAF6, formando el complejo IκB. El complejo IκB libera NF-κB y actúa sobre las MAPK

permitiendo el desplazamiento hacia el núcleo de NF- κ B y AP-1 (proteína activadora 1). Esto último, desencadena la activación y proliferación de la B-CLL ^{80,81} (**Figura 7**).

Cabe destacar que BTK interactúa con cuatro proteínas implicadas en la cascada de señalización por debajo del TLR, que son: el dominio intracelular del propio TLR, MYD88 y su molécula adaptadora TIRAP y la proteína IRAK1, cuando se encuentra formando complejo con el resto de miembros de la familia (IRAK2 e IRAK4). Por tanto, la interconexión entre las rutas de señalización del BCR y TLRs se encuentran estrechamente relacionadas; pudiendo amplificar y/o fortalecer las vías de señalización intracelular del BCR ⁸¹ (**Figura 7**).

I.4.4.3 Papel de los receptores de quimiocinas en la activación del linfocito B.

Debido a la gran relevancia que presentan los procesos de quimiotaxis, migración y el *homing* o anidamiento de la B-CLL en los centros de proliferación ^{78,81,85}, en esta sección se aborda la señalización intracelular de los LB a través de los receptores de quimiocinas (CXCR).

Las B-CLL expresan altos niveles de CXCR4 y CXCR5 en su membrana, permitiendo el envío de señales de supervivencia a partir de la interacción con sus ligandos CXCL12 y CXCL13, respectivamente, los cuales son secretados por varios tipos celulares (como por ejemplo, las células estromales, los macrófagos -M \emptyset - o las células nodriza -*Nurse cell*-) ⁸¹.

La unión entre ligando y receptor genera un cambio conformacional en el dominio citosólico del CXCR, facilitando la interacción con las proteínas G heterodiméricas (G $\alpha\beta\gamma$). Esta interacción produce la disociación de la subunidad G α de la G $\beta\gamma$ y la fosforilación de STAT3; además de la activación de PI3K (quien activa AKT y las MAPK) y la unión directa al dominio de homología de pleckstrina (amino terminal) y dominio de homología TEC (rico en prolinas) de BTK ⁸¹ (**Figura 7**).

I.4.5 Relación de la célula B y su microambiente.

Tal y como se ha descrito anteriormente en la sección 1.4.4, la B-CLL necesita del reconocimiento antigénico para su proliferación y expansión. Cuando estas B-CLL circulan en SP, se encuentran en un estado de reposo, mientras que cuando se localizan en los tejidos linfoides (concretamente en los centros de proliferación) la tasa de crecimiento aumenta. Esto se debe a que la salida a SP impide la llegada de estímulos a las B-CLL (como por ejemplo Ags, citocinas/quimiocinas, factores de crecimiento y supervivencia, ...) ^{61,78}.

Durante los últimos años, numerosas investigaciones han puesto de manifiesto la importancia del microambiente en la evolución, progresión y activación de estas células. De hecho, es bien conocido que estos clones leucémicos presentan dificultades para su cultivo *in vitro*, dado que entran inmediatamente en apoptosis, mientras que cuando son co-cultivadas *in vitro* con células accesorias y complementación de citocinas, las B-CLL son capaces de proliferar. *In vivo*, las B-CLL se seleccionan, desarrollan y crecen en los centros de proliferación debido a las interacciones que establecen con las células dendríticas foliculares/nodriza, M \emptyset , linfocitos (T, B, B-CLL) y células estromales (si nos encontramos en médula osea) ^{11,39,62,78,86}.

De este modo, la interacción multidireccional con estos tipos celulares, además de la activación del BCR (véase sección 1.4.4.1), se encuentra implicada en el crecimiento y desarrollo de las B-CLL; así como en la alteración del comportamiento del resto de células del microambiente. Las

B-CLL aumenta la expresión de ligandos de puntos de control inmunitarios (como por ejemplo PD-L1) y disminuyen la expresión de moléculas HLA-I/II y de Ig de superficie; evadiendo así la acción de las NK. Por otro lado, estas B-CLL liberan quimiocinas (como CCL3 o CCL4, dependientes de la estimulación del BCR y quimioatrayentes de LT/ MØ) y factores de crecimiento/reguladores capaces de modelar las funciones de las células proximales (interacción constitutiva de los puntos de control inmunitario inhibidores -como la vía PD1-PDL1 o CTLA-4-B7 -, deterioro de la actividad proliferativa de los LT y NK, reducción de la liberación de citocinas, inhibición/reducción de la actividad citotóxica, etc.). La interacción entre LT y B-CLL a través de la señalización por la unión de CD40 (expresado en las B-CLL) con su ligando CD40L (expresado por los LT), ejerce como resultado la activación del clon, envío de señales de supervivencia y proliferación mediante la activación de MAPK, PI3K/AKT y NF-κB (**Figura 8**)^{35,38,54,80,81,87-89}.

Las B-CLL localizadas en los centros de proliferación aumentan los niveles de expresión de los receptores de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), facilitando así la unión con sus ligandos (BAFF, APRIL, BCMA o TACI) producidos por las células nodrizas de los centros de proliferación y MO. Esta interacción activa NF-κB, quien a su vez induce la expresión de miARN 155 (subexpresando el gen SHIP1) y en consecuencia, mejora la señalización a nivel del BCR (**Figura 8**)^{61,78}.

Por otro lado, la expresión de proteínas WNT por parte de las células presentes en el microambiente (como las células estromales), proporcionan los ligandos necesarios (como Wnt5a) para activar tanto la vía canónica como la no canónica de la señalización mediada por WNT de las B-CLL. Esta unión desencadena la activación de ROR1, quien activa NF-κB, y en consecuencia incrementa la proliferación y activación de ese clon. Esto promueve la migración del mismo en respuesta a quimiocinas y la producción de IL-6 (induce la activación de STAT3 en otras B-CLL vecinas y células accesorias -como macrófagos tipo 2 [M2] o NK-) e IL-10 (inhibiendo la síntesis de citocinas por parte de MØ y LT). Finalmente, la liberación de IL-4 por parte de los LT (presentes en el microambiente) e IL-6 autocrina, permite a las B-CLL que salen a SP aumentar sus niveles de Ig M en membrana (**Figura 8**)^{61,78}.

Por otra parte, la expresión de las integrinas CD49d, CD38 o CD44 por las B-CLL, permite establecer contacto célula-célula a través de sus ligandos expresados en las células accesorias, como son la fibronectina, VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular 1) o el ácido hialurónico en la superficie de las células estromales o CD31 por parte de las células nodrizas y estromales. Ejerciendo así su efecto sobre la activación de las vías de señalización de ZAP70 y ERK1/2 en las B-CLL e influyendo en la migración, invasión y anidamiento de los centros de proliferación (**Figura 8**)⁷⁸.

Por último, como se describió previamente en la sección 1.4.4.3, los niveles de expresión de CXCR en las B-CLL modulan la migración de las mismas hacia SP o tejidos linfoides. Por ejemplo, cuando las B-CLL localizadas en los centros de proliferación expresan altos niveles de CXCR4, estos interactúan con su ligando (CXCL12) induciendo la modulación a la baja de su receptor y en consecuencia, incentivando la salida de las B-CLL hacia SP. Por otro lado, cuando esta alta expresión se da en ausencia de estímulos (fuera del microambiente tumoral), origina una migración de las células desde SP hasta los tejidos linfoides⁶¹.

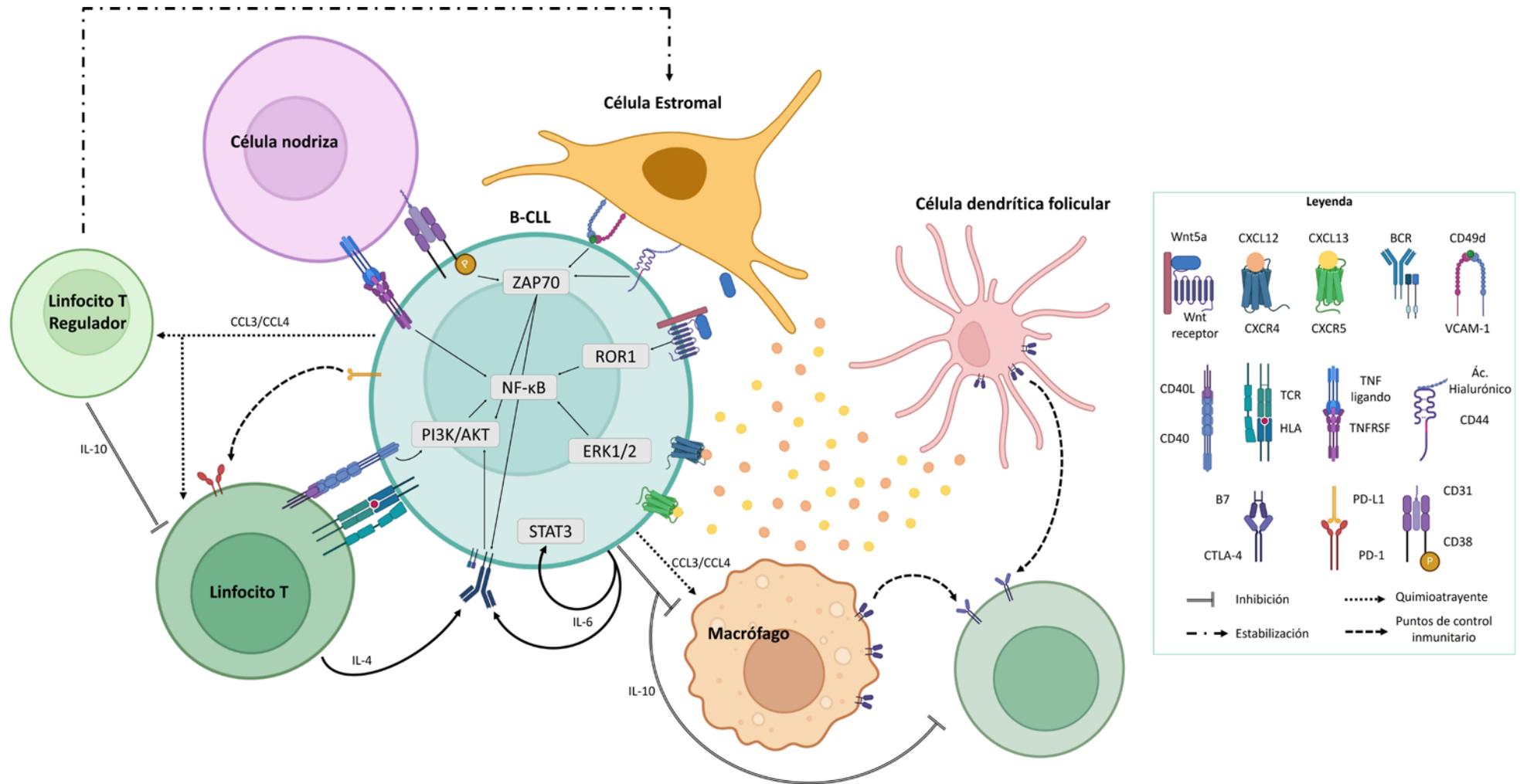


Figura 8: Interacción de la B-CLL con el microambiente tumoral en los centros de proliferación y médula ósea.

I.5 Terapias para el tratamiento de la Leucemia Linfocítica Crónica.

Debido a la alta heterogeneidad genética presente en la CLL, la elección de la terapia más beneficiosa para cada uno de los pacientes es complicada y en ocasiones puede ser ineficiente. Hecho que se dificulta cuando dichos pacientes ya han sido sometidos a una primera línea de tratamiento y presentan recidivas. Por tanto, la propia heterogeneidad de la enfermedad junto con las sucesivas líneas de tratamiento, hacen difícil identificar dianas eficientes y reduce las posibilidades de terapias disponibles, debido al enriquecimiento en factores de alto riesgo (como, por ejemplo, del(17p) o mutación de TP53). Por ello, la continua búsqueda de nuevas dianas farmacológicas es inherente a la comprensión desde el punto de vista biológico de la enfermedad. En las últimas décadas, el empleo de la quimioinmunoterapia ha producido un cambio drástico en el tratamiento de la CLL, debido a la introducción de moléculas pequeñas inhibitoras de tirosina quinasas implicadas en la ruta de señalización del BCR. Aunque ninguno de los actuales tratamientos son totalmente curativos, a excepción del trasplante alogénico de células madre ^{20,38,44,53,54,62,90-92}.

En esta sección, se describirán las principales terapias dirigidas e inmunoterapias utilizadas actualmente para el tratamiento de la CLL, así como los principales retos aún abiertos.

I.5.I Terapias dirigidas.

Las opciones de tratamiento para los pacientes con CLL se han ido perfeccionando durante la última década, debido a la mejor comprensión de la biología y fisiología de la B-CLL. Aunque la revolución del tratamiento en este tipo de pacientes se dio con la aparición de pequeñas moléculas inhibitoras de tirosina quinasas (como SYK, BTK o PI3K), por su notable actividad antitumoral y gran eficacia clínica. Este tipo de fármacos actúan sobre una molécula diana, ejerciendo un bloqueo sobre alguna de las cascadas de señalización relacionadas con el crecimiento, supervivencia y desarrollo de la B-CLL ^{38,44,62,92}.

Actualmente, el tratamiento de la CLL se lleva a cabo mediante terapias dirigidas con Ibrutinib (inhibidor de BTK), Idelalisib (inhibidor de PI3K), Venetoclax (inhibidor de BCL-2) y Rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20); junto a la quimioterapia convencional con Clorambucilo, Ciclofosfamida, Fludarabina y Bendomustina ^{11,20,54,62,90,91}.

I.5.I.I Ibrutinib.

Fue el primer inhibidor oral frente a BTK aprobado para el tratamiento de la CLL por la administración de alimentos y medicamentos (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) ⁶².

Esta molécula pequeña se une de forma covalente a BTK, inhibiendo la cascada de señalización intracelular del BCR (interrumpiendo la transducción de la señal a las rutas de las MAPK, PI3K y NF-κB) (véase apartado 1.4.4.1); y en consecuencia, implica un aumento de la expresión de proteínas pro-apoptóticas ^{10,11,62,93}. De este modo, Ibrutinib interviene en la migración y adhesión de las B-CLL en los tejidos linfoides (inhibe los receptores CXCR y las moléculas de adhesión), paraliza su proliferación y las redistribuye desde los tejidos linfoides a SP; privando así del estímulo pro-tumoral del microambiente ^{10,29,93,94}.

Además, Ibrutinib presenta una actividad inmunomoduladora sobre los LT y MØ. Por un lado, Ibrutinib actúa sobre la quinasa de células T inducible por interleucina 2 (ITK). Esta activa a los LT, desencadenando su proliferación y la liberación de citocinas; así como un aumento de la respuesta de los LT CD4⁺ Th1 (LT Th1), y por consiguiente, se restablece su efecto anti-tumoral^{38,54,62,89}. También, disminuye los niveles de PD-1 y CTLA-4, revirtiendo el fenotipo de agotamiento inmunológico; mejorando las características citotóxicas de los LT. Por otro lado, la inhibición de BTK en los MØ, interrumpe la liberación de citocinas quimiotácticas (CXCL12 y CXCL13) y regulando la diferenciación hacia M2 (macrófagos pro-tumorales)^{54,62,89,94}.

Debido a los efectos duraderos, incluso en pacientes considerados de alto riesgo o con recidiva, se ha aprobado la aplicación de dicho fármaco como primera línea de tratamiento en CLL^{50,93}. Aunque uno de los efectos secundarios más relevantes, asociados a este tratamiento, es la aparición o incremento de infecciones víricas¹¹.

I.5.I.2 Venetoclax.

Corresponde con otro de los tratamientos dirigidos aprobados por la FDA y EMA²⁰. Es un fármaco específico frente a la proteína reguladora antiapoptótica del Linfoma de célula B 2 (Bcl-2), localizada en la membrana mitocondrial externa. Venetoclax está diseñado para inhibir la función de la Bcl-2 (encargada de bloquear el proceso de apoptosis e impulsar la supervivencia celular), induciendo la muerte rápida de las B-CLL; debido a que esta proteína se encuentra sobreexpresada y es vital para estas células clonales^{11,62,93}.

Se ha observado que la terapia con Venetoclax reactiva la apoptosis de las B-CLL y en consecuencia, disminuye también el subconjunto de LT pro-tumorales (Tregs y LT CD4⁺ Th2 - LT Th2-) y obstaculiza la constante unión entre PD-L1 y PD-1, este último presente en los LT^{38,62}.

Venetoclax es usado en clínica tanto como primera línea de tratamiento (solo o en combinación con Rituximab -véase sección 1.5.1.4-) y en enfermedad refractaria, a pesar de haberse observado ciertos efectos secundarios como neutropenia, infecciones, anemia o trombocitopenia. Es considerado una alternativa frente al uso de Ibrutinib y otros inhibidores de BTK (iBTK), sobre todo en aquellos pacientes que presentan alteraciones cardíacas o resistencia a dichos fármacos^{11,93}.

I.5.I.3 Idelalisib.

Se ha descrito como el primer inhibidor selectivo de administración oral de la isoforma δ de PI3K aprobado para el tratamiento de la CLL por la FDA y la EMA^{54,62}.

Este fármaco se une de forma selectiva a PI3K δ (isoforma restringida a las células de origen hematopoyético y cuya ruta está constitutivamente activada en las B-CLL), ejerciendo su efecto sobre las vías de señalización de AKT y MAPK y reduce la quimiotaxia de la B-CLL mediada por CXCL12 y CXCL13. Esto bloquea las rutas de señalización del BCR y de los CXCR, promoviendo la apoptosis de las B-CLL y su redistribución hacia SP^{11,54,62,93}.

Este tipo de tratamiento se basa en realizar un mecanismo antagonista de las señales de supervivencia procedentes del BCR (reduciendo así la producción de CCL3 y CCL4 por parte de las B-CLL)⁵⁴, y del microambiente (vía CD40-CD40L y de los receptores de integrinas, quimiocinas y TNF)^{54,62}. Por otro lado, afecta a la diferenciación y funcionalidad de los Tregs. Esto induce un

bloqueo en su actividad supresora y en consecuencia, promueve la ruptura de la tolerancia inmune ejercida en los centros de proliferación³⁸. También reduce la liberación de citocinas proinflamatorias por parte de los LT y NK (como IL-6, IL-10, TNF- α o INF- γ).

Se ha observado que el tratamiento con Idelalisib genera respuestas antitumorales duraderas, incluso en pacientes muy pretratados y/o características citogenéticas de alto riesgo (como del(17p) o del(11q)), aunque este tipo de terapia aumenta el riesgo de toxicidad, infecciones (enterocolitis y neumonitis) y erupciones cutáneas. En consecuencia, este fármaco presenta un uso restringido en clínica y suele ser utilizado junto con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 Rituximab^{38,54,62,93}.

I.5.1.4 Rituximab.

Rituximab es un anticuerpo monoclonal (mAb) quimérico (humano-ratón) frente a la proteína de membrana CD20, cuyo efecto es la activación de la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (-ADCC- implica la actuación de NK y M ϕ /Monocitos)^{38,62}.

Fue el primer tratamiento aprobado por la FDA cuya diana terapéutica se focaliza sobre un Ag presente en la superficie de las células tumorales³⁸.

En CLL, la expresión de CD20 en la membrana de las B-CLL es baja, mientras que su forma soluble presenta una alta concentración y, en consecuencia, la actividad de dicho tratamiento se ve limitada. Por esta razón, Rituximab se utiliza en combinación con otras terapias dirigidas como por ejemplo Fludarabina-Ciclofosfamida, Bendamustina, Idelalisib o Venetoclax^{38,62,93}.

I.5.2 Inmunoterapia celular en Leucemia Linfocítica Crónica: Receptores de antígenos quiméricos (CAR-T *cell*).

Es una estrategia clínica basada en la expresión de un receptor de antígeno quimérico (CAR), frente a una proteína antigénica (normalmente CD19 presente en los LB), en un LT autólogo o alogénico, junto con un receptor coestimulador de LT (4-1BB) y un componente de transducción de la señal del receptor de LT (CD3 ζ)^{11,62,95}.

Este tipo de estrategia ha sido aprobada por la FDA y la EMA para tratar pacientes con linfomas agresivos de célula B, mientras que en otras neoplasias, como por ejemplo el tema que se aborda en la presente Tesis, aún se deben superar ciertos desafíos para la obtención de resultados exitosos^{38,95}.

La acción de estas CAR-T *cell* se fundamenta en la activación antígeno específica del LT, generando una respuesta citotóxica frente a los LB CD19⁺^{38,62,95,96}.

Actualmente, la administración de las CAR-T *cell* en personas con CLL se utiliza para el tratamiento de pacientes con enfermedad refractaria (resistencia frente a iBTK y Venetoclax)^{62,95} y características clínicas de alto riesgo (del(17p), mutación de TP53 y/o U-IGHV)^{93,95}.

Cuando se generan y administran las CAR-T *cell* de/en personas con CLL, debido al estado inmunodeficiente y la inmunosubversión que presentan, los LT de dichos enfermos muestran un

fenotipo agotado (mayor expresión de CD244, CD160 y PD-1 en superficie). Por dichos motivos, las CAR-T autólogas de este tipo de pacientes van a presentar un defecto funcional (proliferación y citotoxicidad) y expresión de PD-1⁺. Además de que las propias B-CLL tras la administración del tratamiento van a influir en la capacidad funcional de dichas CAR-T *cell*. Esto es debido a la liberación de vesículas y citocinas dentro del microambiente tumoral protector (véase sección 1.4.5) por parte de las B-CLL y, en consecuencia, inducen sobre las CAR-T *cell* un fenotipo agotado. Se ha observado que aquellos pacientes con una alta proporción de CAR-T *cell* con fenotipo CD8⁺, CD27⁺ y PD-1⁻ tienen mejor respuesta a este tipo de tratamiento que los que presentan aumento en la expresión de PD-1, TIM-3 y LAG-3 (fenotipo de agotamiento) ^{62,95}.

Como efectos secundarios producidos tras la administración de este tipo de terapia en pacientes con CLL, se encuentran el síndrome de liberación de citocinas y la neurotoxicidad; factores de riesgo que pueden ser determinados mediante un panel de 4 biomarcadores: INF- γ , IL-13, CCL3 (MIP1 α) e IL-6 ⁹⁵.

Por dichos motivos, el tratamiento con CAR-T *cell* en pacientes con CLL ha demostrado presentar peores resultados, tanto a nivel de respuesta como de supervivencia, a los obtenidos para otras enfermedades neoplásicas linfoides (como, por ejemplo, el linfoma difuso de células B grandes o la leucemia linfoblástica aguda de células B). De modo que este tipo de terapia celular, aunque sigue siendo actualmente el método estándar de tratamiento, necesita de un mayor perfeccionamiento para este tipo de pacientes ^{38,62,93,95}.

I.5.3 Algoritmo terapéutico.

Debido a la gran heterogeneidad de la enfermedad a nivel clínico-biológico, la elección de una terapia idónea para cada uno de los pacientes requiere de experiencia, juicio clínico, uso adecuado de las herramientas diagnósticas, conocimiento de las comorbilidades y otras medicaciones que tiene el paciente, tiempo de tratamiento y los efectos secundarios de cada una de las terapias ^{11,19,22,97}.

Se ha observado que aquellos pacientes con del(17p) o mutación en TP53 siempre presentan mal pronóstico, independientemente del tipo de terapia utilizada (quimioterapia o terapias dirigidas), mientras que aquellos pacientes con del(11q), cuando son tratados con quimioterapia (concretamente la combinación de Fludarabina, Ciclofosfamida y Rituximab) o terapias dirigidas mejoran su pronóstico. Por último, cuando se tiene en cuenta el estado mutacional de la IGHV, se ha observado que el 60 % de los pacientes que presentan U-IGHV requieren de tratamiento ²².

Por tanto, atendiendo a todos estos parámetros y características clínico-biológicas de la CLL, fue diseñada una herramienta que permitiera integrar dicha información y estratificara a los pacientes en base a los diferentes marcadores pronósticos ^{22,97}. Dicha herramienta es el índice pronóstico internacional para pacientes con CLL (CLL-IPI) ³⁴. En él se establecen 5 factores asociados de forma independiente a la SG y actualmente es un buen indicador del tiempo hasta primera línea de tratamiento. Dichos 5 factores son la edad (>65 años), estadio Binet/Rai, >3,5 mg/L de β 2-microglobulina en plasma, U-IGHV y del(17p)/mutación TP53. De este modo, se identificaron 4 grupos de riesgo: riesgo bajo (SG del 93 % a 5 años y no deben ser tratados), riesgo intermedio (SG del 79 % a 5 años y con buenos resultados tras tratamiento con quimioterapia/terapia dirigida), riesgo alto (SG del 63 % a los 5 años y con buen resultado clínico independientemente del tipo de terapia) y riesgo muy alto (SG del 23 % a los 5 años y necesidad

de tratamiento de 1º línea con una terapia dirigida) (**Tabla 5**)^{22,34,97}. Aunque dicha herramienta actualmente es muy valiosa, debe usarse con cierta precaución, sobre todo en aquellos pacientes con edad avanzada, comorbilidades o inmunodeprimidos.

Tabla 5: Índice pronóstico internacional para pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica.

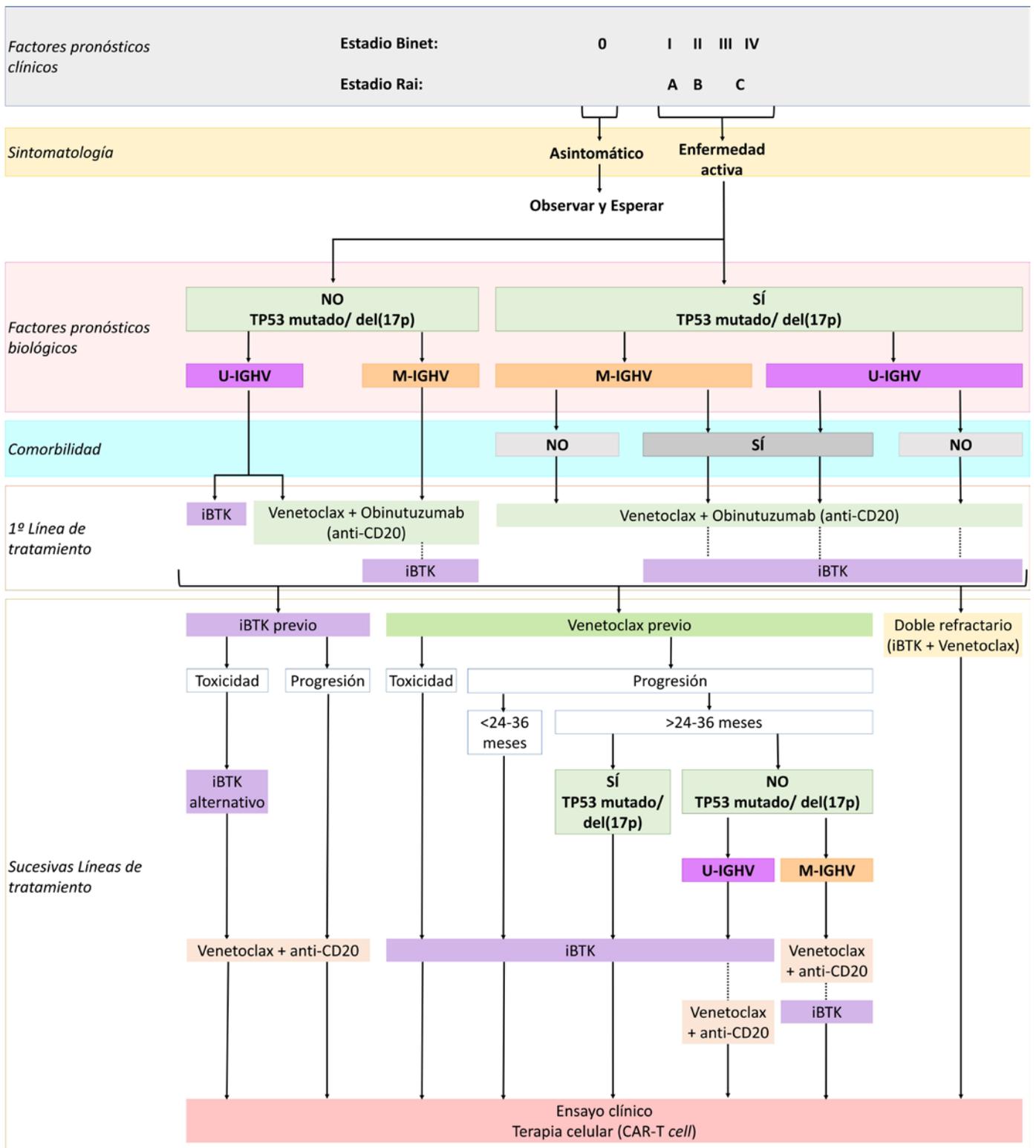
Factor pronóstico		Puntuación (CLL-IPI)	Índice CLL-IPI		A 5 años	
			Grupo de riesgo	Puntuación	Supervivencia global	Progresión
Alteraciones citogenéticas/mutaciones	Del(17p)/mutación TP53	4	Bajo	0-1	93%	23%
IGHV	U-IGHV	2	Medio	2-3	79%	58%
B2-microglobulina	> 3,5 mg/L	2	Alto	4-6	63%	77%
Estadio	Rai (I-IV) Binet (B-C)	1	Muy Alto	7-10	23%	87%
Edad	> 65 años	1				

Por ello, actualmente, la elección de tratamiento se establece en base a las características biológicas de cada paciente, estableciendo el actual algoritmo terapéutico, el cual se encuentra recogido en el **Esquema 1**.

I.5.4 Resistencia frente a terapias dirigidas.

A pesar de la potente actividad antitumoral de este tipo de terapias, se ha observado durante los últimos años un aumento de resistencias frente a dichos fármacos, debido a la aparición y acumulación de mutaciones puntuales^{38,92,98}.

Se han identificado resistencias a Ibrutinib relacionadas con mutaciones puntuales en BTK (70 % de los casos resistentes a este tratamiento), que impiden la unión del fármaco a la diana. Del mismo modo, el 10 % de las resistencias a Ibrutinib son debidas a mutaciones con ganancia de función en PLC γ 2, desencadenando la ruta de señalización del BCR independientemente de BTK. En otros casos, las resistencias al tratamiento con Venetoclax son debidas a mutaciones en la proteína Bcl-2, lo cual disminuye y complica la unión del fármaco a su objetivo. Se está observando por tanto, que todos estos tratamientos ejercen una fuerte presión selectiva que conlleva una evolución clonal (enriquecimiento en factores de mal pronóstico); proporcionando ciertas ventajas que les hacen resistentes, generando nuevas poblaciones subclonales que conllevan la recaída^{20,29,35,54,62,93}.



Las líneas discontinuas indican que los tratamientos están posicionados por orden de recomendación. Del(17p): Delección del brazo corto del cromosoma 17; U-IGHV: Región variable de la cadena pesada no mutada; M-IGHV: IGHV mutada; iBTK: Inhibidor de BTK.

Esquema 1: Algoritmo terapéutico utilizado en el tratamiento de la Leucemia Linfocítica Crónica.

I.6 Hipogammaglobulinemia en Leucemia Linfocítica Crónica.

La hipogammaglobulinemia consiste en una disminución de los niveles de Ig. Se ha observado que ~60 % de los pacientes con CLL la presentan en el momento del diagnóstico, mientras que ~25 % la desarrollan durante los 7 años posteriores al mismo y solo el 15 % siguen presentando niveles normales de Ig. El origen de esta disminución de Ig aún se desconoce, aunque algunas de las posibles respuestas son la reducción del número de LB no leucémicos y/o descenso de la producción de anticuerpos (Ab) policlonales ^{38,99-101}.

Los isotipos de Ig más afectados son, por el siguiente orden, Ig G, Ig A e Ig M y por ende, la gravedad de la hipogammaglobulinemia en estos pacientes está claramente correlacionada con: periodos cortos de SLT, etapas avanzadas y características de alto riesgo ^{38,99-101}.

I.7 Infecciones en pacientes de Leucemia Linfocítica Crónica.

La CLL es una enfermedad que conlleva la desregulación del Sistema Inmunitario a nivel de respuesta innata y adaptativa; lo cual, implica la pérdida, por parte del huesped, de una respuesta defensiva eficaz ante posibles infecciones.

Se ha observado que pacientes con CLL, y personas con MBL, son más propensos a sufrir infecciones que la población general, causando la gran morbilidad y mortalidad de dichos pacientes. Asimismo, este mayor riesgo de infecciones recurrentes y graves puede deberse a la propia enfermedad (estadio) o como consecuencia del tratamiento (duración/líneas). De forma que todas estas infecciones son clasificadas en clínica según el tipo de patógeno o microorganismo (bacteriana, fúngica o vírica) y la gravedad (leve – necesidad de tratamiento o atención sintomática -, grave – se precisa hospitalización y tratamiento – y mortal – muerte del paciente por infección-). Siendo las infecciones bacterianas mayoritarias en este tipo de pacientes las producidas por *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli*, afectando al tracto respiratorio, urinario y a la piel ^{19,99,102,103}.

Se ha descrito que pacientes tratados con Idelalisib y Alemtuzumab son más propensos a presentar infecciones oportunistas por parte de la familia Herpesviridae (Herpes virus, Virus de la Varicela, Citomegalovirus o Epstein-Barr) y que pacientes tratados con anticuerpos anti-CD20 son más proclives a padecer reinfecciones por el Virus de la Hepatitis B ¹⁹.

Por otro lado, el uso de Ibrutinib ha demostrado aumentar el riesgo de infección en aquellos pacientes que son sometidos a dicho tratamiento, incluso al compararlo con la quimioterapia. Asociándose su uso a altas tasas de infecciones graves por parte de cualquier tipo de agente infeccioso, independientemente de si se usa como primera línea de tratamiento (tasas de infección de entre el 4 al 10 % de los pacientes) o como fármaco de rescate (tasas de infección de entre el 24 al 50 % de los casos). Siendo el efecto secundario más relevante las infecciones víricas del tracto respiratorio y la infección micótica producida por *Pneumocystis jirovecii* (en el 4,2 % de los pacientes), esta última asociada al uso de Ibrutinib en monoterapia ^{11,104,105}.

Finalmente, cabe destacar que el tratamiento con Venetoclax aumenta el riesgo de infecciones respiratorias en el 48 % de los casos. Asociándose el uso de Venetoclax en monoterapia con una

mayor tasa de infecciones graves (en el 20 % de los pacientes) y como terapia de rescate, tras recaída por Ibrutinib, al desarrollo de neumonías graves en el 6% de los pacientes ^{11,105}.

2. Proteómica.

La gran heterogeneidad observada a nivel genético en la CLL, junto a un sinfín de alteraciones puntuales descritas (como NOTCH1, SF3B1, ZNF292, ZMYM3, ARID1A o PTPN11) ^{42,53} proporciona una explicación parcial de la enfermedad, donde ciertas alteraciones citogenéticas y mutaciones puntuales (como del(13q) o TP53) han sido usadas tradicionalmente como factor pronóstico. Además, las terapias dirigidas han puesto en evidencia la necesidad de buscar nuevas dianas moleculares, capaces de solventar las resistencias generadas tras la administración de las terapias, y de conocer la biología funcional y los eventos moleculares que influyen en el comportamiento de la B-CLL y en los procesos de resistencia a terapias ^{106,107}

La medicina de precisión considera la variabilidad individual como un ejecutor intrínseco de la enfermedad, influenciando dicho hecho en el pronóstico y tratamiento del paciente. Por tanto, una medicina de precisión requiere de una integración y comprensión a nivel genómico, transcriptómico, proteómico y metabolómico (**Figura 9**) ^{107,108}. Esta necesidad de conocer la biología funcional, eventos moleculares, influencia del entorno celular, genética y expresión génica es muy evidente cuando hablamos de CLL, ya que se ha observado que en un mismo paciente pueden coexistir varios eventos moleculares diferentes (como por ejemplo, presencia de trisomía 12 y 19 o presencia de del(11q), del(13q) y adición de material desconocido en el cromosoma 18), desencadenando lo que se conoce como cariotipo complejo ¹⁰⁷.

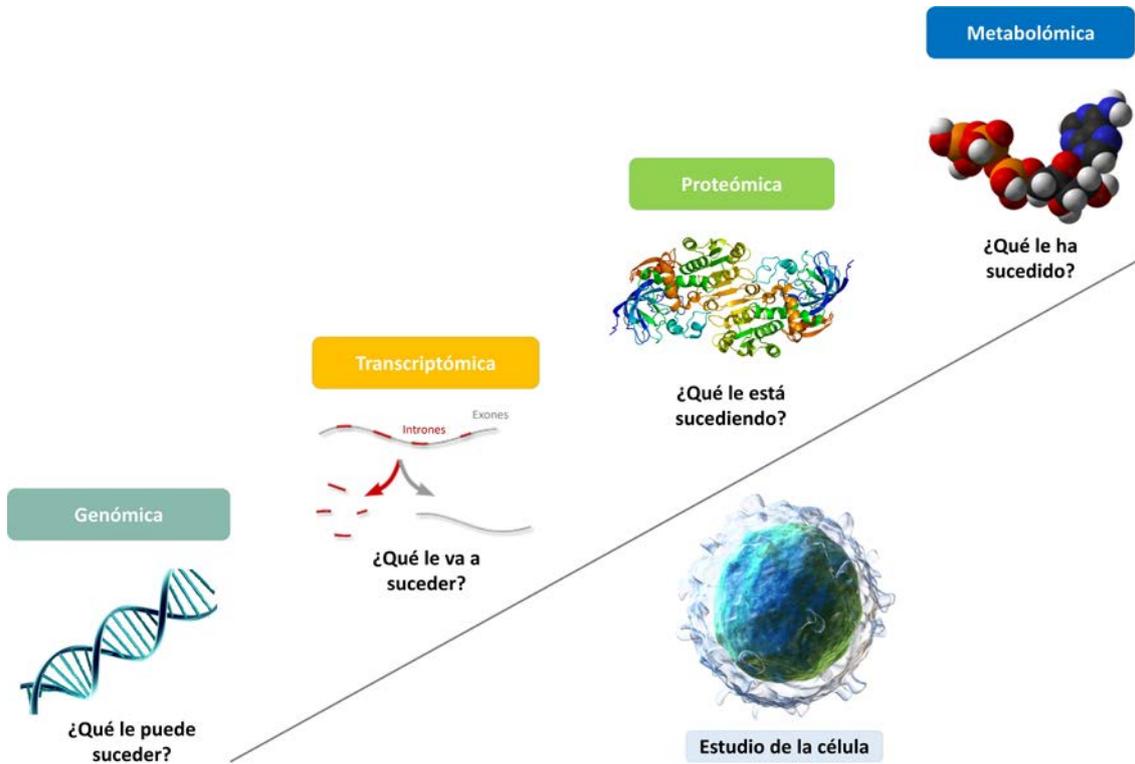


Figura 9: Cascada ómica para el estudio molecular de las células.

2.1 Relevancia de la proteómica en la medicina de precisión.

El mantenimiento de la homeostasis celular se encuentra controlado por una serie de moléculas biológicas, como son el ADN, ARN, proteínas, lípidos y metabolitos, que se encuentran en continua interacción y equilibrio. Cada una de ellas con una función muy concreta a nivel celular (tales como el almacenamiento y codificación de la información, transporte, defensa, reguladora, reserva energética, etc.) y con repercusión recíproca sobre cada una de ellas (como, por ejemplo, la generación de proteínas truncadas debido a mutaciones en el ADN o alteraciones durante el proceso de empalme o *splicing* del ARN). Por lo tanto, alteraciones o defectos sobre alguna de estas moléculas pueden estar relacionadas con el desarrollo de patologías ^{108,109}.

En CLL se han detectado sobreexpresadas ciertas proteínas, como por ejemplo CD49d, CXCR4 o Bcl-2, las cuales presentan una correlación directa entre los niveles de ARN y proteína ¹¹⁰⁻¹¹². Sin embargo, esta correlación directa entre transcrito y proteína no siempre ocurre ^{109,113,114}. Una de las evidencias conocidas sobre este tipo de desconexión en CLL se da en relación a los niveles de abundancia relativa de la proteína CD38 (descrita en la sección 1.3.2.4), la cual no presenta cambios a nivel de transcrito, pero sí respecto a los niveles de expresión proteica ^{114,115}. Evidenciando la importancia de las proteínas en el comportamiento de la CLL ^{106,115}.

2.1.1 Proyecto Proteoma Humano.

La Organización Mundial del Proteoma Humano (HUPO -<https://www.hupo.org/>-), desde el año 2010 con el Proyecto Proteoma Humano, ha intentado estimular el progreso a nivel mundial de la construcción y utilización de los conocimientos proteómicos en base a dos objetivos ¹¹⁶:

- Identificación constatada de las proteínas (sobre todo las descubiertas mediante espectrometría de masas -MS-).
- Hacer de la proteómica una parte integral de los estudios multi-ómicos para comprender mejor los estados de salud y enfermedad.

Este proyecto se asienta en 4 pilares fundamentales de recursos para la identificación y localización de las proteínas, los cuales son: anticuerpos (Abs), espectrometría de masas (MS), bases de datos (en las que se documenta y recopila toda la información de las proteínas - NextProt-) y patologías. De este modo, establece 4 grupos de proteínas en base al grado de evidencia de las mismas: PE1 (proteínas con evidencia a nivel proteico), PE2 (proteínas con evidencia a nivel de expresión génica), PE3 (proteínas con expresión homóloga en otras especies) y PE4 (proteínas en base a pseudogenes que pueden ser traducidos) ¹¹⁶.

En las últimas dos décadas, las patologías han sido el modelo central del Proyecto Proteoma Humano, con el objetivo de desentrañar la biología tumoral para mejorar el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la enfermedad. Además de contribuir a la integración ortogonal de dicha información con otras ómicas (genómica, transcrición, metabolómica, lipidómica,...) **(Figura 9)** ^{43,116}.

2.1.2 El panorama proteico de las células: el proteoma.

Las proteínas son consideradas las principales efectoras de los procesos celulares y estas, forman entidades altamente estructuradas que conforman el proteoma (conjunto completo de proteínas generadas por un organismo) ^{56,114,117}. Los niveles de expresión relativa de las proteínas se van modificando conforme a los factores intrínsecos y/o extrínsecos de las células, permitiendo así adaptarse ante las perturbaciones del entorno y definiendo su estado funcional y fenotípico ^{114,117}.

Se ha observado que el proteoma presenta una gran complejidad debida al amplio rango dinámico en el que se pueden expresar las proteínas (órdenes de magnitud entre 10^8 - 10^{12}) ¹⁰⁸. A lo que se le suma el aumento de la heterogeneidad a causa de la patología, tanto a nivel proteico como por interacciones con otros factores como el genético, hormonal y el ambiental ¹¹⁴.

Cuando se examina el proteoma en SP (modelo de fluido biológico y fuente de información clínico-biológica, fácil de obtener y que aporta información sistémica del organismo), se observa un rango dinámico de concentración de proteínas que se mueve en órdenes de magnitud de entre 10^{10} a 10^{12} ^{108,118,119}. Con una elevada abundancia de un grupo pequeño de proteínas (como la albumina, haptoglobina, serotransferrin, Ig, α -1 antitripsina, α -2 macroglobulina, α -1 glicoproteína ácida, apolipoproteína A1/2, componente 3 del sistema de complemento, transtirretina, cadena α de fibrinógeno, ...) que hace difícil la detección del resto (>90 %); incluidas proteoformas minoritarias generadas durante la patología y muy relevantes como biomarcadores o dianas terapéuticas ^{108,119}.

2.1.3 Estudio del panorama proteico de las células: la proteómica.

La proteómica es el estudio sistemático del proteoma de un sistema biológico, ya sea una célula, un tejido, órgano, fluido biológico o un organismo, permitiendo la caracterización global de las proteínas y su abundancia (incluyendo su distribución espacial y dinámica temporal -como por ejemplo modificaciones postraduccionales -PTMs-, interacciones o estructura-) ^{113,118,120}.

Aebersold y Mann, en el año 2016, describieron que la caracterización del proteoma permite ¹¹⁷:

- La identificación y cuantificación de cualquier proteína expresada.
- El reconocimiento y localización sistemática de PTMs dentro de la cadena polipeptídica.
- La determinación tanto de la composición, estequiometría y topología de las subunidades que componen todos los complejos multiproteicos.
- La determinación de la estructura de las proteínas.

Por tanto, el estudio proteómico se caracteriza por la ejecución de un análisis a gran escala de diferentes aspectos relacionados con las proteínas (perfil de expresión, PTMs, localización celular y subcelular, función, formación de complejos -proteína/proteína, proteína/ácido

nucleico o proteína/lípido-, etc.). Permitiendo identificar y cuantificar la expresión, de forma simultánea, de una gran variedad de ellas ^{106,108,119}.

Esta forma de análisis sistemático contribuye al estudio exhaustivo del proteoma, mediante la generación masiva de datos (*big data*) esenciales para la: i) comprensión de los sistemas biológicos a nivel funcional, ii) disección de la complejidad celular y iii) priorización de candidatos a biomarcadores ^{108,119}.

Aunque uno de los principales retos del estudio proteómico es la elevada complejidad presente en los sistemas biológicos. Esto se debe a que un único gen puede presentar un número indeterminado de transcritos (como resultado del proceso de empalme o *splicing* del ARN, polimorfismos de un solo nucleótido, etc.), desembocando en la producción de múltiples isotipos de una misma proteína o varias. Siendo estas últimas susceptibles de sufrir PTMs, aumentando aún más el número de posibilidades ^{118,120}. Por ello es necesario reducir la complejidad del proteoma y aplicar herramientas y flujos de trabajo bioinformáticos que permitan aprovechar y explorar el conjunto de datos. Todo ello con la finalidad de identificar e interpretar funcionalmente a cada una de las proteínas, ayudando así a desentrañar los mecanismos biológicos funcionales y de desarrollo de patologías ^{106,108,119}.

2.1.4 Técnicas proteómicas.

El estudio proteómico favorece la identificación de múltiples proteínas, mejorando la comprensión funcional de las mismas y reconociendo alteraciones en diferentes rutas de señalización implicadas en el desarrollo y evolución de las patologías ¹²¹.

En las últimas décadas, el rápido crecimiento y progreso de los avances tecnológicos ha favorecido el uso de herramientas capaces de reducir la complejidad de los sistemas biológicos, permitiendo su estudio de forma global. Aunque aún se requiere la superación de ciertos desafíos como la solubilidad de las proteínas, rango dinámico, análisis de datos e interpretación y correlación entre proteoformas y su función ¹⁰⁸.

Actualmente existen dos tipos de estudios proteómicos, los métodos bioquímicos o biofísicos y los sistemáticos. Los métodos bioquímicos o biofísicos son ensayos altamente optimizados y comúnmente usados en laboratorios clínicos, los cuales permiten la caracterización de una única proteína en varias muestras (como por ejemplo el aislamiento de proteínas específicas). Por su parte, las metodologías sistemáticas a gran escala, permiten la exploración funcional de los sistemas biológicos (como son las micromatrices o la MS) y requieren de la estandarización de flujos de trabajo y análisis computacional, por lo que hoy en día son ampliamente usadas en investigación biomédica ^{107,117,119}.

2.1.4.1 Proteómica basada en agentes de afinidad.

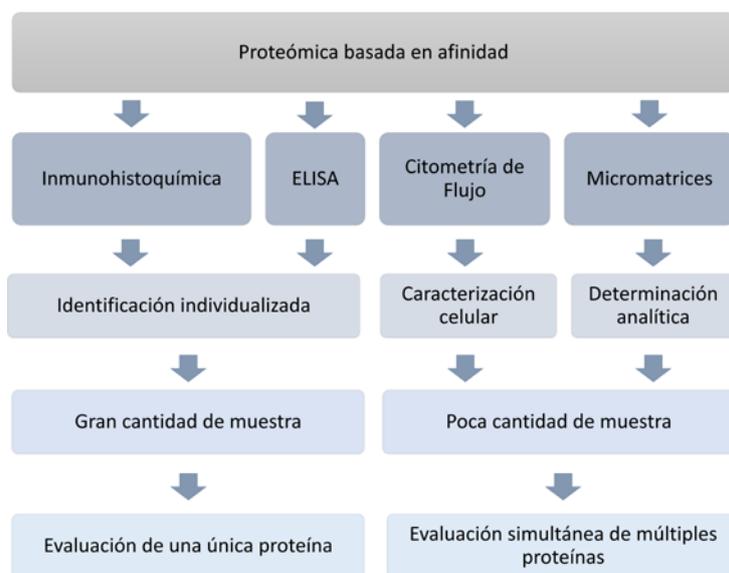
Este tipo de ensayos se basan en la utilización de Abs para la identificación específica y selectiva de proteínas ¹⁰⁸. Son utilizados ampliamente en clínica e investigación biomédica debido a su sensibilidad y especificidad, ya que los Abs se diseñan con el fin de reconocer de forma precisa y con alta afinidad epítopos concretos de una determinada proteína ^{107,108}.

Con este tipo de técnicas, por tanto, se pueden llevar a cabo análisis de proteínas intactas o ante PTMs específicas, haciendo de este tipo de tecnología una herramienta muy útil, sobre todo a

nivel de análisis de fluidos biológicos (donde el rango de expresión de las proteínas se mueven en órdenes de magnitud de 10^{12} y con presencia de un pequeño grupo de proteínas con gran abundancia relativa) ^{108,119}.

Dentro de este grupo de técnicas proteómicas se encuentran la inmunohistoquímica, la citometría de flujo, el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) o las micromatrices de proteínas (**Esquema 2**) ¹⁰⁷.

La inmunohistoquímica y el ELISA son dos metodologías que requieren una gran cantidad de muestra para llevar a cabo la detección de una única proteína. Proporcionando información muy concreta y escueta sobre un analito específico, lo cual le convierte en una herramienta muy útil a nivel clínico y muy poco aplicable cuando se requieren estudios a gran escala ¹⁰⁷.



Esquema 2: Técnicas proteómicas basadas en afinidad.

La necesidad actual de realizar análisis de alto rendimiento de forma rápida y simultánea de múltiples analitos en grandes cohortes de estudio ¹¹⁹, ha contribuido al desarrollo de la citometría de flujo, para la caracterización celular mediante paneles de Abs combinados, y de micromatrices, para la determinación analítica de las células. Ambas técnicas utilizan muy poca cantidad de muestra y permite la evaluación simultánea de múltiples proteínas. De forma que este

tipo de metodologías son muy aplicables en estudios a gran escala, debido a la enorme cantidad de información que se obtiene de cada una de las muestras de una forma rápida ¹⁰⁷.

Por tanto, pese a que este tipo de metodologías presenta gran sensibilidad y especificidad, también tiene ciertas limitaciones, ya que únicamente son aplicables para detectar dianas proteicas conocidas. Además de la costosa y tediosa forma de producción de los reactivos, la relativa baja estabilidad de dichas moléculas, la necesidad de caracterizar su especificidad para limitar los posibles efectos de reactividad cruzada de los Abs, el tipo de etiquetado para su identificación y en consecuencia, su correspondiente señal de fondo, o la aportación de datos parciales sobre el estado del sistema biológico o de las rutas de señalización celular ^{108,118,122}.

2.1.4.2 Proteómica basada en espectrometría de masas.

La espectrometría de masas (MS) determina la masa/carga (m/z) de una molécula ionizada. Es por ello que los péptidos/proteínas deben ser en primer lugar volatilizados (pasar de fase líquida a gaseosa) y cargados, obteniendo iones que posteriormente serán separados según su m/z ¹¹⁸. De este modo, la MS permite, a partir de cantidades pequeñas de muestra, una rápida caracterización de la mayor parte del proteoma en una mezcla compleja (como por ejemplo un extracto de lisis celular), detectando así perfiles de expresión proteica, PTMs o la localización

subcelular de las proteínas. Aumentando la comprensión de las funciones biológicas, desentrañando los mecanismos que desencadenan la enfermedad o el descubrimiento de posibles biomarcadores ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

Esta tecnología ha sufrido un rápido desarrollo en las últimas décadas. Aunque uno de los principales problemas a los que se enfrenta la MS para poder detectar el proteoma completo es su rango dinámico ^{108,118}. En un estudio publicado por Geiger y colaboradores, en el año 2012, fueron capaces de detectar un promedio de 10000 proteínas por cada célula eucariota humana, que se movían en rangos dinámicos de expresión de 7 órdenes de magnitud, usando la MS ¹²³. En base a estos datos, el rango dinámico de expresión de las proteínas excede la capacidad de detección de las actuales metodologías de MS, las cuales se mueven en órdenes de magnitud de 10^5 a 10^6 . Por lo que es necesario llevar a cabo un enriquecimiento y un fraccionamiento subcelular de las muestras complejas antes de ser analizadas, ya que los péptidos/proteínas no pueden ser amplificados como ocurre en los estudios genómicos/transcriptómicos ^{108,118}.

Por tanto, el estudio proteómico con este tipo de tecnología requiere de la realización sistemática del siguiente flujo de trabajo (**Esquema 3**):

1.- **Diseño experimental.** En el que se incluye el tipo de experimento a realizar, tamaño de muestra, condiciones para la preparación de las muestras y del análisis, etc. ^{106,118}.

2.- **Preparación de muestras.** Es un paso clave en el análisis de MS, ya que la forma de recolección de la muestra, procesado y almacenamiento, tipo de etiquetado proteico, forma de desnaturalización, reducción o digestión enzimática son puntos clave que dependen del método de MS elegido y repercute en la reproducibilidad y precisión del análisis ^{106,118}.

3.- **Reducción de la complejidad.** Es un proceso necesario antes del análisis por MS, encargado de reducir el submuestreo o la pérdida de detección de proteínas poco abundantes ^{106,118} y que puede darse:

- A nivel proteico. Mediante protocolos de fraccionamiento subcelular (lisado y separación de las proteínas en base a la localización subcelular), en los que se utilizan detergentes o surfactantes que permitan solubilizar las proteínas, sobre todo las presentes en membrana y matriz extracelular ^{108,114}, y/o mediante electroforesis en gel unidimensional, en base al punto isoeléctrico, o bidimensional, en base a su punto isoeléctrico y el peso molecular de las proteínas.

- A nivel peptídico. Mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), basada en el tiempo de retención del péptido en la fase estacionaria (interacciones hidrofóbicas entre los péptidos y la columna) al hacer pasar la fase móvil en gradiente de concentración creciente (contenido orgánico) ^{106,118}.

4.- **Determinación de la masa del péptido o el fragmento peptídico.** Permite la identificación de los péptidos y su sensibilidad depende de la complejidad de la propia muestra. Siendo necesario para ello alcanzar los límites de detección de concentración de los átomos ^{106,118}.

Es necesario por tanto un primer paso de ionización mediante una fuente de iones. Se consigue utilizando dos metodologías: i) MALDI (Ionización por desorción laser asistida por matriz) que consiste en la sublimación e ionización de las muestras incluidas en una matriz cristalina seca a través de pulsos láser y ii) ESI (Ionización por electropulverización), metodología basada en la ionización de la proteína/péptido incluida en una solución. Siendo el método ESI el más utilizado para el análisis de muestras biológicas complejas.

Posteriormente, se realiza un segundo paso que permite analizar la masa y el estado de carga del péptido (m/z), registrando la intensidad de señal (corriente de iones espectrales) usando como analizadores el tiempo de vuelo (TOF), la trampa de iones, el analizador triple cuadrupolo o el Orbitrap. Todos ellos caracterizados por parámetros clave como la sensibilidad, velocidad de exploración, resolución (capacidad de distinguir 2 péptidos con m/z parecidos como diferentes) y la precisión de masa (identificación precisa del péptido en partes por millón) ¹¹⁸.

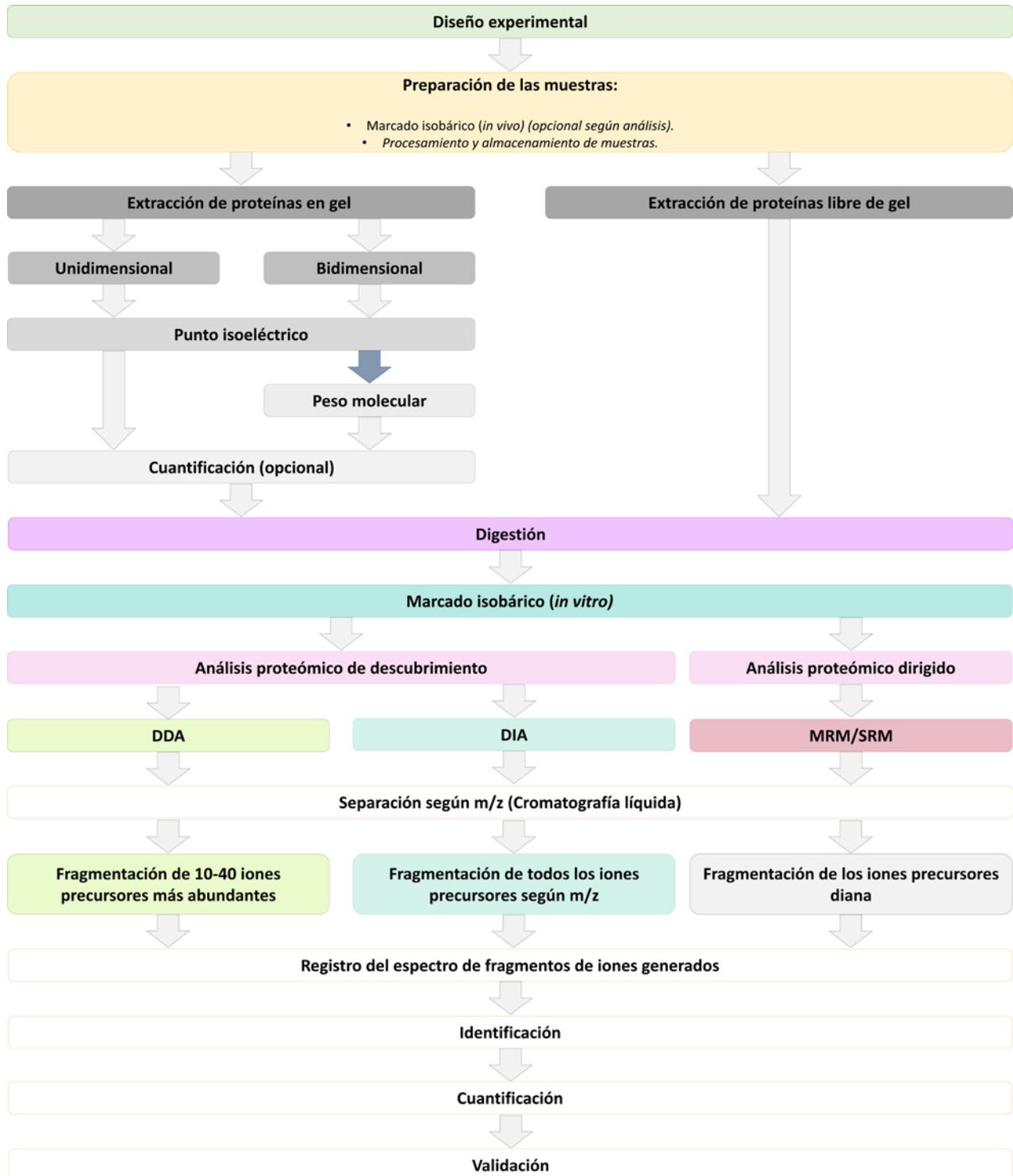
Dicho registro de m/z se lleva a cabo a través de dos fases. La fase 1 o MS1 que se encarga de determinar la m/z del ion precursor y la fase 2 o MS2, en la que los péptidos seleccionados en el MS1 (10-40 péptidos) son fragmentados por disociación inducida por colisión con un gas inerte (nitrógeno, argón o helio) y la m/z de los fragmentos de iones generados son registrados para su posterior identificación y cuantificación ¹¹⁸.

5.- Identificación y cuantificación de proteínas. Se lleva a cabo mediante algoritmos de identificación de proteínas y softwares de forma automatizada ¹¹⁸.

La identificación puede realizarse mediante uso de bases de datos (forma más común de identificación de proteínas) o *de novo*. El uso de bases de datos permite comparar los espectros de los fragmentos de iones generados durante el análisis con la información recopilada en una base de datos mediante el uso de motores de búsqueda (como: MASCOT, SEQUEST, X! Tandem, OpenSWATH o Skyline). De este modo, la coincidencia de los espectros teóricos y observados recibe una puntuación, donde los péptidos con puntuación más alta son los que conducen a la identificación de la proteína y siempre teniendo en cuenta las PTMs o modificaciones artificiales generadas durante el proceso de alquilación con yodoacetamida. Obteniendo para cada proteína identificada una tasa de descubrimiento falso (FDR), aportando información sobre la confianza estadística de la identificación. Por otro lado, la identificación *de novo* infiere, a partir de la diferencia de masas obtenida para 2 espectros de iones fragmentados consecutivamente, el correspondiente aminoácido de cada uno de los iones reconstruyendo la secuencia aminoacídica y, por ende, la identificación de la proteína. Este tipo de determinación se lleva a cabo mediante el uso del software PEAKS ¹¹⁸.

La cuantificación de las proteínas puede llevarse a cabo mediante cuantificación en gel o sin marcaje. Cuando se realiza en gel, la cuantificación se da a partir de las bandas obtenidas tras la electroforesis mediante densitometría y la determinación de la expresión diferencial mediante el uso de software de imágenes que permiten comparar las bandas de varias muestras y/o geles, mientras que cuando se cuantifica sin etiqueta, puede realizarse: i) en base al número de espectros MS2 asignados a una misma proteína en diferentes muestras o ii) según la intensidad de señal ¹¹⁸.

6.- **Validación.** Se realiza tras el análisis bioinformático de los resultados obtenidos con el análisis por MS, con el objetivo de confirmar mediante la aplicación de técnicas independientes (como Wester Blot o Inmunohistoquímica) las proteínas seleccionadas como biomarcadores de interés ¹¹⁸.



DDA: Adquisición dependiente de datos. DIA: Adquisición independiente de datos. MRM/SRM: Monitorización de reacciones múltiples/Monitoreo de reacciones seleccionadas. m/z: masa/carga.

Esquema 3: Flujo de trabajo empleado para el análisis de proteínas por espectrometría de masas

El proceso de desarrollo de la MS y su tecnología ha permitido el desarrollo de nuevas formas de detección mucho más sensibles y reproducibles^{114,124}. Ampliando las formas de identificación de las proteínas y la disponibilidad de métodos de cuantificación y detección¹⁰⁸.

Actualmente, existen dos tipos de estudios proteómicos. Por un lado, encontramos la proteómica de arriba hacia abajo. Este tipo de metodología permite analizar las proteínas en su conformación nativa antes de llevar a cabo el proceso de fragmentación, con el objetivo de obtener la secuencia aminoacídica completa. Este tipo de análisis solo es factible en muestras biológicas sencillas y con la finalidad de detectar proteínas con gran abundancia relativa. Extrayendo información sobre la estequiometría de las PTMs de la/as proteína/as diana y/o su isoforma. Por otro lado, la proteómica de abajo hacia arriba identifica proteínas a través de inferencia peptídica. Es por ello que en este tipo de metodología se necesita antes de la identificación un proceso de digestión proteolítica. Esta digestión proteolítica de forma general suele ser la Tripsinización, ya que genera péptidos con un rango de peso molecular (PM) de 0,5 a 3 kDa, mediante escisión enzimática sobre el carboxilo de los aminoácidos Lisina o Arginina (excepto cuando alguno de ellos es seguido de prolina), y presenta una alta especificidad de escisión, eficiencia y es muy económica^{108,118}.

En cuanto a la forma de cuantificación, se ha pasado de la realización en gel unidimensional o bidimensional a métodos sin marcaje^{108,118}. Estos últimos incorporan marcadores de isótopos estables a las proteínas/péptidos mediante reacción química o procesos metabólicos/enzimáticos. Combinan isótopos pesados y ligeros, los cuales presentan eficiencias de ionización y separación similares (sin influencia durante el proceso de separación realizado con HPLC o durante la fase MS1), siendo únicamente distinguibles durante la fase MS2 del análisis por MS debido a la liberación de la región de equilibrio de la etiqueta isobárica (región que compensa las diferencias de masa entre etiquetas). Entre los métodos de cuantificación sin etiqueta más comunes encontramos: i) el etiquetado estable de isótopos con aminoácidos en cultivo celular (SILAC), que es un marcaje metabólico *in vivo* a nivel de proteína, ii) la etiqueta de masa en tándem (TMT), usada para el marcaje de péptidos *in vitro* y iii) la etiqueta de cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ), para el marcaje de péptidos *in vitro*¹¹⁸.

Finalmente, según el tipo de análisis por MS que queramos realizar podemos encontrar los siguientes tipos de adquisición¹¹⁸:

Análisis proteómico para el perfilado del proteoma o descubrimiento de biomarcadores.

DDA (Adquisición dependiente de datos): Es un tipo de adquisición que proporciona información sesgada, ya que solo identifica y cuantifica aquellas proteínas cuyos péptidos únicos han sido seleccionados de forma aleatoria para su fragmentación en iones; en base a su abundancia relativa, intensidad de señal y carga. Fijándose un número determinado de iones precursores, como por ejemplo los 10 o los 40 iones precursores más abundantes.

DIA (Adquisición independiente de datos): El objetivo de este tipo de adquisición es la obtención de los espectros de iones fragmentados de todos los iones precursores detectados, independientemente del conocimiento previo y su abundancia. Para ello, la adquisición se realiza por ventanas de aislamiento secuencial predefinidas en base a la *m/z* del ion, registrando así todos los

posibles precursores, generando un mapa de espectros de iones fragmentados completo.

Análisis proteómico dirigido.

MRM/SRM/ PRM (Monitorización de reacciones múltiples/Monitoreo de reacciones seleccionadas/ Monitorización de la reacción en paralelo): Este tipo de adquisición permite la cuantificación precisa de proteínas específicas. Es un tipo de tecnología usada en los procesos de validación y complementación de datos obtenidos tras la fase de descubrimiento. Ofrece una gran sensibilidad, reproducibilidad y precisión cuantitativa, aunque la detección se encuentra limitada a un número concreto de péptidos (un máximo de 100 analizados simultáneamente) preseleccionados sobre los que se tiene un conocimiento previo. Dichos péptidos tienen que presentar unas características muy concretas como: ser completamente tripticos, sin gran cantidad de PTMs o aminoácidos susceptibles a modificación química (como desaminación de la asparragina u oxidación de la metionina) o de longitud media entre otras.

Por ello, la MS es una de las técnicas proteómicas más utilizadas en investigación, ya que facilita el estudio de perfiles proteómicos en múltiples muestras en paralelo e integrarla con otras bases de datos (como pueden ser clínicos, genómicos o transcriptómicos), mejorando la comprensión funcional del sistema biológico de interés^{56,108}. Aunque uno de los principales problemas a solventar es la gran cantidad de tiempo requerido para llevar a cabo el análisis estadístico y la dificultad de extraer conclusiones, debido a la gran cantidad de datos generados de una única muestra. Haciendo difícil su uso en grandes cohortes de pacientes y a nivel clínico^{107,119}.

2.2 Caracterización proteómica de la leucemia linfocítica crónica.

En los últimos años, la realización de estudios proteómicos y su integración ortogonal con otras ómicas (genómica, transcriptómica y/o epigenómica) o información clínico-biológica, han permitido arrojar luz sobre la importancia de la proteómica en el estudio de la CLL.

Knisbacher y colaboradores⁴⁹ realizaron una integración de datos proteómicos, genómicos y transcriptómicos (obtenidos por NGS y epigenómica) a partir de una cohorte de pacientes con CLL (1095 muestras) y MBL (54 muestras), revelando la importancia de correlacionar diferentes conjuntos de datos ómicos, mientras que Herbst y colaboradores⁵⁶ realizaron un estudio con el objetivo de correlacionar el impacto del genoma y transcriptoma sobre el proteoma. Para ello, llevaron a cabo un estudio proteómico de descubrimiento en una cohorte de 68 pacientes con CLL mediante el uso de la tecnología de espectrometría de masas HiRIEF-LC-MS (*high resolution isoelectric focusing liquid chromatography mass*), junto con su análisis transcriptómico. Dichos resultados fueron validados en: una cohorte independiente de 165 pacientes con CLL mediante análisis DIA-MS, información proteómica publicada¹²⁵, información transcriptómica obtenida de una cohorte independiente de 169 pacientes con CLL y dos cohortes clínicas de validación con 620 pacientes de CLL no tratados y de 463 pacientes tratados con Ibrutinib. Para realizar la integración de los datos genómicos, transcriptómicos y proteómicos fue usada la aproximación bioinformática MOFA (*Multi-omics factor analysis*), a partir de las 2000 proteínas con la varianza más alta. Obteniendo como resultado que los niveles de ARN y proteínas se encuentran

completamente desconectados de ciertos genes directores (como TP53 o XPO1) y que el mayor aporte informativo sobre la biología molecular de la enfermedad es proporcionado por los datos proteómicos y no tanto por los genómicos/transcriptómicos. Concluyendo que la proteómica es capaz de clasificar al 20 % de los pacientes con CLL en los diferentes grupos diagnósticos/pronósticos ya conocidos (como M-IGHV, U-IGHV, Trisomía del 12 y M-IGHV y Trisomía del 12 y U-IGHV) e identificar nuevos grupos (caracterizados por una baja abundancia relativa de proteínas relacionadas con la señalización del BCR, alta abundancia relativa de los componentes del espliceosoma, mal pronóstico -independientemente de las características clínico-biológicas- y corta SG).

Por tanto, la interpretación del proteoma completo de la CLL, junto con la integración de datos ómicos o información clínico-biológica, es esencial para desentrañar los mecanismos biológicos/funcionales del desarrollo de la enfermedad.

Por consiguiente, en esta sección se realizará un breve resumen de los estudios proteómicos más significativos llevados a cabo en CLL y los cuales se encuentran recogidos de forma resumida en la **Tabla 6**.

2.2.1 Descripción de la caracterización proteómica en la leucemia linfocítica crónica.

Uno de los primeros estudios clave en los que se utilizó la proteómica y como modelo de estudio la CLL fue en el llevado a cabo por Dalchau, Kirkley y Fabre en 1980¹²⁶, con el objetivo de caracterizar la proteína homóloga humana del Ag leucocitario común (actualmente conocido como molécula HLA). Para ello, mediante citometría de flujo (FACS - *Fluorescent Activated Cell Sorter*-), cromatografía de afinidad y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) identificaron un Ag muy parecido al Ag leucocitario común de rata (tanto a nivel bioquímico como de distribución). El cual estaba únicamente presente en leucocitos como componente importante de su membrana plasmática.

Posteriormente, Willard-Gallo en 1984¹²⁷ y en colaboración con Humblet y Symann en 1985¹²⁸ identificaron perfiles de proteínas diferenciales entre las B-CLL y LB normales. Dicho estudio se realizó mediante electroforesis bidimensional (SDS-PAGE) a partir de lisados celulares, enriquecidos en proteínas de membrana (Mem.), procedentes de 22 individuos (2 controles sano y 20 pacientes con CLL). Obteniendo como resultado variaciones de expresión cuantitativa de las proteínas Ig M (con una expresión muy baja), molécula HLA tipo I y II, la subunidad β 2-microglobulina y dos proteínas desconocidas detectadas con los anticuerpos OKT.10 y OKT.4 (actualmente llamadas CD38 y CD4 respectivamente). Algunas de ellas utilizadas hoy en día para el pronóstico de la enfermedad (véase sección 1.3.2.4).

Esto abrió la puerta a otros estudios, cuyo objetivo era la identificación de patrones proteicos diferenciales que permitieran arrojar luz a los mecanismos biológicos que desencadenan la enfermedad, ya sea comparando los perfiles proteicos de las B-CLL vs. contrapartida normal^{124,129,130} como en relación al pronóstico de la CLL (mayoritariamente estado mutacional de la IGHV)¹³¹⁻¹³⁶.

2.2.I.1 Perfiles proteicos diferenciales entre B-CLL y su contrapartida normal.

Johston y colaboradores en el 2018 ¹²⁹ identificaron un perfil proteico diferencial capaz de distinguir entre B-CLL y su contrapartida normal, partiendo de una cohorte de 17 individuos (3 controles sanos y 14 pacientes con CLL). En él, a partir de lisados celulares se llevó a cabo una fase de descubrimiento, utilizando MS y un analizador Orbitrap, y una fase de validación, mediante Western Blot. Obteniendo como resultado que las B-CLL tienen una alta expresión de fosfolípidos (INPP5F) y proteínas relacionadas con citoesqueleto (CKAP4 -en superficie-), señalización del BCR (LAX1, ATP2B4 y CLEC17A) y apoptosis (WEE1, HMOX1/2 y HDAC1/3/7).

Por otro lado, Mayer et al., en ese mismo año ¹³⁰, publicaron un estudio en el que se usaba la misma tecnología de MS (Orbitrap). Cuyo objetivo era la identificación de mecanismos proteicos y metabólicos que pudieran predisponer al desarrollo de la CLL, a partir de lisados celulares con fraccionamiento subcelular (fracciones de citoplasma -Cyt.- y núcleo -Nuc.-) en una cohorte de 32 individuos (16 controles sano y 16 CLL). En este caso, se observó que las B-CLL aumentan la expresión de proteínas implicadas en transcitosis (PIGR) y disminución de proteínas relacionadas con la respuesta celular a estímulos (PLSCR1, SLC6A4, LAIR1, HMOX1 y ATOX1).

Posteriormente, en el año 2019, Thurgood y colaboradores ¹²⁴ llevaron a cabo un estudio en el que no solo se analizaban los perfiles proteicos diferenciales entre individuos sanos y enfermos de CLL, sino que además se añadió el grupo pronóstico en base al estado mutacional de la IGHV. De este modo, a partir de los lisados celulares con fraccionamiento subcelular (fracciones de Cyt. y Mem.) procedentes de una cohorte de 19 individuos (5 controles sanos y 14 CLL), se realizó un análisis DDA-MS y SWATH-MS (*Sequential Window Acquisition of all Theoretical Spectra*) usando Triple TOF. En él, se obtuvo como resultado que:

- Las B-CLL tienen un aumento de expresión de proteínas relacionadas con la β -oxidación (como HADH y HADHB), transporte de lípidos (como OSBPL1A) y fosfolípidos (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidilinositol).
- Los pacientes con M-IGHV presentan una menor expresión de proteínas de transcitosis (FKBP4), proliferación celular (RAP1A y CAT), migración (ITGB1 y DESG1) y metabolismo (GAPDH, GLUT2 y NAXE).

2.2.I.2 Perfiles proteicos diferenciales en base al pronóstico de la enfermedad.

Cochran et al., en el año 2003 ¹³¹, publicaron un estudio en el que se realizaba un análisis proteómico en base al estado mutacional de la IGHV. Dicho análisis se realizó en una cohorte de 12 muestras (6 U-IGHV y 6 M-IGHV), mediante electroforesis bidimensional (SDS-PAGE) y MS con MALDI-TOF. Desvelando una alta expresión en pacientes con M-IGHV de la proteína del citoesqueleto CAPZB, de la molécula adaptadora YWHAB, de la proteína de adhesión RSSA y la proteína NPM1 (implicada en procesos de transcripción).

Posteriormente, en el año 2005 fueron publicados 3 estudios, con el fin de identificar perfiles de expresión diferencial entre M-IGHV y U-IGHV, por parte de Barnidge y colaboradores ¹³², estudiar la expresión de proteínas relacionadas con la transcripción celular en base al estado

mutacional de la IGHV, por parte de Boelens y colaboradores ¹³³, y el estudio de la expresión diferencial de HS1 en pacientes con U-IGHV y M-IGHV, por parte de Scielzo y colaboradores ¹³⁴.

Barnidge et al. ¹³², a partir de lisados celulares con fraccionamiento subcelular (Cyt. y Mem.), procedentes de una cohorte de 12 individuos (6 U-IGHV y 6 M-IGHV), realizó un análisis de MS mediante trampa de iones y cuyos resultados fueron validados por Western Blot. Concluyendo que aquellos pacientes con M-IGHV presentan mayor expresión de COXG (proteína mitocondrial). Por su parte, Boelens y colaboradores ¹³³ realizaron un estudio proteómico mediante Western Blot a partir de una cohorte de 12 muestras (6 U-IGHV y 6 M-IGHV). En él se observó la presencia de la forma metabolizada de NPM1 (implicada en procesos de transcripción) en aquellos pacientes que presentaban U-IGHV y cuya expresión se veía disminuida cuando estos pacientes a mayores eran ZAP70⁺. Finalmente, Scielzo y colaboradores ¹³⁴, a partir de una cohorte de 40 individuos (15 U-IGHV, 23 M-IGHV y 2 sin especificar), determinó mediante electroforesis bidimensional (SDS-PAGE) y MALDI-TOF, que aquellos pacientes que presentaban U-IGHV tienen una fosforilación constitutiva de la proteína HS1 (proteína de unión a la actina).

Más adelante, en el año 2010, Rees-Unwin et al. ¹³⁵ realizaron un estudio sobre el perfil de expresión de NPM1 según el estado mutacional de la IGHV. Para ello, a partir de una cohorte de 11 individuos (6 U-IGHV y 5 M-IGHV) se realizó un análisis de MS usando electroforesis bidimensional (SDS-PAGE) junto a MALDI-TOF y un proceso de validación por Western Blot. De este modo, los autores identificaron un aumento de la expresión de NPM1 en pacientes con U-IGHV.

Por último, en el año 2011, Perrot y colaboradores ¹³⁶ llevaron a cabo un análisis proteómico funcional que permitiera una mejor comprensión del comportamiento diferencial de los pacientes según pronóstico (estado mutacional de la IGHV). Para ello, realizaron su estudio partiendo de una cohorte de 6 muestras (3 U-IGHV y 3 M-IGHV). El análisis se efectuó mediante electroforesis bidimensional (DIGE gel) y MALDI-TOF y el proceso de validación mediante Western Blot. Obteniendo como resultado la identificación de un grupo intermedio entre U-IGHV y M-IGHV con ZAP70⁻ y la presencia, en pacientes con U-IGHV, de fosforilación constitutiva de HCLS1 (sustrato de la tirosina quinasa acoplada al receptor de Ag -BCR-) y disminución de la expresión de PDCD4 (muerte celular) y RAD23B (degradación del proteasoma).

2.2.2 Proteómica funcional de la leucemia linfocítica crónica.

Uno de los primeros estudios exploratorios del proteoma completo en CLL fue el publicado por Alsagaby y colaboradores en el 2014 ¹³⁷. Cuyo objetivo era la identificación de biomarcadores capaces de diferenciar las B-CLL de su contrapartida normal. Dicho estudio se realizó a partir de 12 muestras de pacientes con CLL de las que se purificaron los LB no clonales y las B-CLL. El análisis exploratorio se efectuó mediante LC-MALDI-TOF y la validación de los resultados por Western Blot. Además, de llevarse a cabo una integración de dichos resultados con información transcriptómica. De este modo, los autores asociaron la sobreexpresión de las proteínas TCL-1 (activación de AKT) con características de mal pronóstico (U-IGHV, del(11q) o ZAP70⁺), TR150 (activación de las rutas de señalización de transcripción y empalme del ARN) como indicativo de tratamiento temprano y S100A8 (activación de las rutas de las MAPK y NF-Kb) con rápida progresión y SLT corta, mientras que la subexpresión de Miosina-9 (participa en la adhesión de las B-CLL a los centros de proliferación) se asociaba a los niveles de ZAP70.

Posteriormente, en el 2021, este mismo autor publicó otro artículo con el objetivo de identificar proteínas diferenciales en CLL ¹¹⁵. Para ello, realizaron dos análisis de MS a partir de lisados celulares enriquecidos en proteínas de Mem. y Nuc. o de proteína total, procedentes de una cohorte de 15 individuos (4 controles sanos y 11 CLL). Los lisados celulares enriquecidos en proteínas de Mem. y Nuc. (6 CLL) fueron analizados mediante LC-MALDI-TOF, mientras que los lisados celulares de proteína total (5 CLL) se analizaron usando electroforesis unidimensional (pre-cast NuPAGE 4–12% Bis-Tris Zoom) y ESI Q/TOF. Siendo dichos resultados validados por Western Blot. Identificando como posible biomarcador pronóstico de la CLL el incremento de la expresión de las proteínas NCL, THARAP3 y HP1BP3 (proteínas implicadas en la supervivencia y proliferación celular).

Eagle y colaboradores ¹²⁵, en el año 2015, publicaron un artículo con el objetivo de dilucidar el mecanismo molecular que definiera el factor pronóstico de la IGHV. Para ello, analizaron un total de 18 muestras de CLL (9 U-IGHV y 9 M-IGHV) mediante MS con Triple TOF y DDA-MS, siendo la validación de los resultados realizada mediante Western Blot. De este modo, los autores encontraron que las B-CLL con U-IGHV tenían un defecto en la migración y disminución de la expresión de proteínas de activación de AKT (TCL-1) y de la ruta de señalización de Ca₂⁺ (MNDA y LEF-1).

Más tarde, en el 2021, este mismo autor y colaboradores evaluaron la importancia de la variabilidad biológica y técnica de los datos proteómicos generados con SWATH-MS ¹³⁸. Para ello, realizaron un análisis por DDA-MS de 14 muestras de CLL en diferentes estadios, de las que se purificaron B-CLL y LB normales, para la generación de una librería peptídica y un SWATH-MS de una cohorte de 6 pacientes (3 U-IGHV y 3 M-IGHV). Obteniendo como resultado que el procesamiento y preparación de las muestras permitía agruparlas tras el proceso de adquisición por LC-MS, aunque dicho agrupamiento podía ser corregido mediante el uso de métodos de corrección por lotes. Permitiendo dicha corrección la identificación proteica compartida por ambas metodologías de adquisición (DDA-MS y SWATH-MS) del 95 %, siendo el descubrimiento de proteínas adicionales mayor por parte del análisis SWATH-MS. Finalmente, dicho estudio permitió concluir que la mayor parte de las proteínas diferenciales entre los estados mutacionales de la IGHV se encontraban relacionadas con metabolismo, regulación del citoesqueleto de actina y moléculas de adhesión celular; existiendo una alta correlación entre niveles de transcrito y proteína de p62 y NFE2L2/NRF2 (altamente expresadas en los casos de U-IGHV).

Otro de los estudios publicados en los dos últimos años sobre el proteoma global de la CLL fue el realizado por Meier-Abt y colaboradores ⁵⁵. En él se evaluaron las repercusiones de las mutaciones genéticas sobre el perfil de expresión de las proteínas en CLL. Para ello se partió de una cohorte de 117 muestras de CLL (91 muestras usadas para el análisis proteómico y 26 muestras para el enriquecimiento en genes directores) usando DIA-MS y secuenciación genómica y transcriptómica. De este modo, dichos autores identificaron una elevada variabilidad en la expresión de proteínas cuando los pacientes presentaban cariotipo complejo o mutaciones en SF3B1, DDX3X o MED12. Además de la sobreexpresión de STAT2 y PTPN11 en aquellos pacientes con trisomía 12, junto con el enriquecimiento en proteínas implicadas en la ruta de señalización PI3K-AKT-MTOR.

2.2.3 Proteómica diferencial de la leucemia linfocítica crónica.

Como se comentó en la sección 2.1.4.2, una de las mayores limitaciones del estudio proteómico con MS es el rango dinámico de expresión de las proteínas, las cuales se mueven en órdenes de magnitud de 10^7 - 10^{12} en células eucariotas y de 10^{10} - 10^{12} en fluidos biológicos (SP), excediendo la capacidad de detección de dicha tecnología. Por lo que una de las alternativas para el estudio del perfil proteico diferencial es la micromatriz.

En esta sección se recogerán los principales estudios proteómicos sobre el perfil diferencial de las proteínas en CLL, en los que se han utilizado diferentes tipos de micromatrices y formas de presentación de las muestras.

2.2.3.I Caracterización proteómica e inmunofenotípica.

Uno de los primeros estudios realizados con micromatrices en CLL fue el publicado por Belov y colaboradores a principios del siglo XXI ¹³⁹. Su objetivo era la evaluación de Ag de superficie de las B-CLL, en busca de nuevos marcadores pronósticos, y la identificación del estado madurativo de las células. Para ello, partieron de una cohorte de 40 individuos (20 controles sanos y 20 pacientes con CLL) y de la creación de una micromatriz de Abs frente a 60 Ags de superficie. De este modo, observaron que las B-CLL presentaban un inmunofenotipo basado en el aumento de la expresión de CD19, CD20, CD22, CD24 y CD37 y disminución de la expresión de CD2, CD3, CD4, CD7, CD11b, CD14, CD32 y CD64.

Una década después, en el año 2014, Huang y colaboradores publicaron un estudio con el objetivo de identificar firmas de expresión proteica que permitieran clasificar a los pacientes con CLL según pronóstico y curso de la enfermedad ¹⁴⁰. Para ello partieron de 100 muestras, procedentes de pacientes con CLL en distintos estadios de la enfermedad, y una micromatriz comercial de Abs frente a 182 Ags de superficie. Identificando un inmunofenotipo de 27 Ags de superficie con capacidad de discriminación entre CLL estable y en progresión (CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD19, CD20 -dos epítomos-, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD38, CD40, CD43, CD45, CD45RA, CD52, CD69, CD81, CD84, CD98, CD102, CD148, CD180, CD196 y CD270).

2.2.3.2 Caracterización proteómica intracelular.

Uno de los primeros estudios proteómicos en los que se utilizaron micromatrices en formato plano para la evaluación del perfil diferencial a partir de lisado celular de B-CLLs, fue el publicado por Yu y colaboradores en el 2008 ¹⁴¹. En él, a partir de 5 muestras de CLL con indicadores de buen pronóstico y 3 donantes sanos, se llevó a cabo la evaluación del perfil de expresión de citocinas y sus receptores. Para ello, usaron una micromatriz comercial de Abs frente a 174 citocinas y sus receptores. Obteniendo como resultado una disminución de la liberación de IL-6 y un ligero aumento de Eotaxin por parte de las B-CLL.

Más tarde, en el 2016, Díez y colaboradores publicaron un estudio en el que se realizó la evaluación del perfil proteico diferencial de la CLL, a partir de una cohorte de 77 individuos (63 controles sanos y 14 pacientes con CLL) y el uso de una micromatriz comercial de Abs frente a 224 proteínas ⁴³. En él se identificó que aquellos pacientes con mutación en NOTCH1

presentaban baja expresión de CCNB1, PKCG y SNCB, mientras que los individuos con del(13q) tenían un aumento de JUN y disminución de PRKC y que los casos con del(17p) o mutación TP53 manifestaban una disminución de p21 y aumento de CDEKN2A.

2.2.3.3 Caracterización proteómica del secretoma.

Burgess y colaboradores, en el año 2012, estudiaron el microambiente tumoral *in vitro* e *in vivo*, con el objetivo de identificar que quimiocinas influyen en la CLL ¹⁴². Para ello, partieron de plasma (estudio *in vivo*) y células mononucleares de SP en cultivo (estudio *in vitro*) de 60 pacientes con CLL sin tratamiento previo y 13 donantes sanos. De modo que la identificación de patrones proteicos diferenciales fue evaluada mediante estudio *in vitro* con micromatrices comerciales de Abs frente a 42 citocinas y quimiocinas y su validación se realizó mediante el estudio *in vivo* por ELISA. Obteniendo como resultado del estudio que los niveles en plasma de IL-8, IL-6 y CXCL2 son mayores en pacientes con CLL que en personas sanas.

Al año siguiente, en el 2013, Schröder y colaboradores publican un artículo cuyo objetivo es la identificación de biomarcadores capaces de clasificar distintos tipos de linfomas, entre ellos la CLL ¹⁴³. Para ello construyeron una micromatriz de Abs frente a 668 proteínas con gran importancia a nivel transcriptómico en diferentes tipos de tumores sólidos (mama, colon y páncreas) y partieron de plasma procedente de una cohorte de 40 individuos, de los cuales 25 eran controles sanos y 15 pacientes con CLL. Evidenciando un patrón proteico diferencial de 21 proteínas para CLL (TSN16, SMAD2, MCM5, NPT1, PCNA, CATD, LEP, IL1B, IL12A, CFLAR, IL1A, IL12A, TR10B -dos isoformas-, TNFA, TR10C, TNFB, TNFR6, IL8, VCAM1 e INF- γ).

Posteriormente, en el 2014, Edlefsen y colaboradores publicaron un artículo en el que se llevó a cabo la evaluación del riesgo asociado al desarrollo de linfomas como consecuencia de las alteraciones en los niveles de citocinas ¹⁴⁴. En él, realizaron la medición de 11 citocinas mediante micromatrices de Abs en formato esfera, a partir de plasma de un control sano y 142 muestras de CLL. Estos autores, observaron una asociación entre el aumento de los niveles plasmáticos de 2 citocinas (TNF e IL-10) y el desarrollo de CLL; pudiendo ser detectado dicho aumento en un rango de 3 a 6 años antes del diagnóstico de la enfermedad.

Más adelante, Niemann y colaboradores en el 2016 publicaron un estudio sobre los cambios del microambiente durante el tratamiento con Ibrutinib en pacientes con CLL ¹⁴⁵. En este estudio, se llevó a cabo la evaluación de los niveles en plasma de 36 citoquinas mediante el uso de micromatrices de Abs en formato esfera, a partir de muestras de 80 pacientes de CLL tratados con 420 mg/día de Ibrutinib (30 CLL refractarias y 50 CLL con tratamiento naive). Dicho estudio obtuvo como resultado: i) un aumento de los niveles en plasma de Eotaxin tras 4 semanas de tratamiento, ii) una disminución significativa de 6 quimiocinas y 1 citocina de forma sostenida durante el tratamiento (CCL22, IL-8, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4 y CCL7), iii) una disminución de los niveles, durante las 4 primeras semanas de tratamiento, de IL-10, IL-1RA, TNF- α e INF- α y iv) una disminución a partir de las 24 semanas de los niveles de INF- γ e IL-4.

Finalmente, uno de los últimos estudios publicados sobre el perfil diferencial de la CLL fue el realizado por Griffen y colaboradores en 2022 ¹⁰⁷. El objetivo de dichos autores era la identificación de firmas de expresión proteica con valor predictivo (SG, tiempo hasta tratamiento y respuesta a terapia), capaces de clasificar a los pacientes con CLL e identificar nuevos grupos. Para ello, se partió de una cohorte de 871 individuos (de los cuales 5 eran donantes sanos, 795 pacientes con CLL y 4 presentaban MBL) y la construcción de una

micromatriz de proteínas en fase inversa, donde se realizó la evaluación de 5 diluciones de 384 Abs (302 frente a proteínas, 72 frente a fosfoproteínas, 4 frente a proteínas activadas y 6 frente a modificaciones postraduccionales frente a H3). De forma que dichos autores identificaron un aumento de la expresión de 6 proteínas a nivel global de la enfermedad (LEF1, PXN, ZAP70, CD4, S100A4 y PDCD4) y 10 como posibles biomarcadores pronósticos (H3K27Me3, MCL1, BCL2L11, NCSTN, SGK3, HSPD1, VTCN1 TRAP1, SOD1 y TAZ).

Tabla 6: Estudios proteómicos que usan la Leucemia Linfocítica Crónica como modelo.

Año	Estudio	Integración ómica	Metodología	Autores
1980	Caracterización de moléculas homólogas humanas del antígeno leucocitario	-	Citometría de flujo (citómetro separador FACS)	Dalcau, Kirkley Fabre ¹²⁶
1984-85	Identificación de proteínas capaces de diferenciar entre B-CLL y LB	-	Electroforesis bidimensional (SDS-PAGE)	Willard-Gallo, Humblet y Symann ^{127,128}
2001	Evaluación del inmunofenotipo de la B-CLL	-	Micromatriz de anticuerpos (frente a 60 antígenos de superficie)	Belov et. al ¹³⁹
2003	Análisis proteómico en base al estado mutacional de la IGHV	-	Electroforesis bidimensional (SDS-PAGE) y MS con MALDI-TOF	Cochran et. al ¹³¹
2005	Identificación de perfiles diferenciales de expresión relativa de las proteínas según el estado mutacional de la IGHV	-	MS con Trampa de iones. Validación por Western Blot	Barnidge et. al ¹³²
2005	Estudio de la expresión de proteínas relacionadas con la transcripción celular	-	Western Blot	Boelens et. al ¹³³
2005	Estudio del perfil de expresión de HS1 según el estado mutacional de la IGHV	-	Electroforesis bidimensional (SDS-PAGE) y MS con MALDI-TOF	Scielzo et. al ¹³⁴
2008	Evaluación del perfil de expresión de citocinas y receptores en CLL	-	Micromatriz de Abs (frente a 174 citocinas y receptores de citocinas)	Yu et. al ¹⁴¹
2010	Estudio del perfil de expresión de NPM1 según el estado mutacional de la IGHV	-	Electroforesis bidimensional (SDS-PAGE) y MS con MALDI-TOF. Validación por Western Blot	Rees-Unwin et. al ¹³⁵
2011	Análisis proteómico funcional para la mejor comprensión del comportamiento diferencial de los pacientes según el estado mutacional de la IGHV	-	Electroforesis bidimensional (DIGE gel) y MS con MALDI-TOF. Validación por Western Blot	Perrot et. al ¹³⁶
2012	Evaluación del microambiente tumoral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	-	Micromatriz de anticuerpos (frente a 42 citocinas y quimiocinas). Validación con ELISA	Burgess et. al ¹⁴²

Continuación Tabla 6: Estudios proteómicos que usan la Leucemia Linfocítica Crónica como modelo.

Año	Estudio	Integración ómica	Metodología	Autores
2013	Identificación de biomarcadores capaces de diferenciar distintos tipos de linfomas	-	Micromatriz de anticuerpos (frente a 668 proteínas)	Schröder et. al ¹⁴³
2014	Identificar proteínas de interés para diferenciar las B-CLL del resto de células B normales	Proteómica y Transcriptómica	MS con MALDI-TOF. Validación por Western Blot	Alsagaby et. al ¹³⁷
2014	Evaluación del riesgo asociado al desarrollo de linfomas como consecuencia de las alteraciones en los niveles plasmáticos de citocinas	-	Micromatriz de anticuerpos en formato esfera (frente a 11 citocinas)	Edlefsen et. al ¹⁴⁴
2014	Identificación de firmas de expresión proteicas que permitan clasificar a los pacientes de CLL según el riesgo y curso de la enfermedad	-	Micromatriz de anticuerpos (frente a 182 antígenos de superficie)	Huang et. al ¹⁴⁰
2015	Dilucidar el mecanismo molecular que define el factor pronóstico de la IGHV	Proteómica y Transcriptómica	MS con Triple TOF (DDA-MS análisis). Validación por Western Blot	Eagle et. al ¹²⁵
2016	Evaluación del perfil proteico diferencial de la CLL	-	Micromatriz de anticuerpos (frente a 224 proteínas)	Díez et. al ⁴³
2016	Estudio del efecto del tratamiento con Ibrutinib sobre el microambiente tumoral de la B-CLL	-	Micromatriz de anticuerpos en formato esfera (frente a 36 citocinas)	Niemann et. al ¹⁴⁵
2018	Identificación de perfiles proteicos capaces de diferenciar entre CLL y controles sanos	Proteómica y Transcriptómica	MS con Orbitrap. Validación por Western Blot	Johnston et. al ¹²⁹
2018	Identificación de mecanismos proteicos y metabólicos que predisponen el desarrollo de la CLL	Proteómica y Metabolómica	MS con Orbitrap	Mayer et. al ¹³⁰
2019	Identificación de perfiles proteicos capaces de diferenciar entre grupos pronósticos de CLL (U-IGHV vs. M-IGHV) y controles sanos	Proteómica y Metabolómica	MS con Triple TOF (análisis con DDA-MS y SWATH-MS -DIA-MS-)	Thurgood et. al ¹²⁴

Continuación Tabla 6: Estudios proteómicos que usan la Leucemia Linfocítica Crónica como modelo.

Año	Estudio	Integración ómica	Metodología	Autores
2021	Identificación de proteínas diferenciales en CLL	-	Electroforesis unidimensional (pre-cast NuPAGE 4–12% Bis-Tris Zoom) y MS con ESI Q/TOF. Electroforesis bidimensional (HPLC) y MS con MALDI TOF. Validación por Western Blot	Alsagaby et. al ¹¹⁵
2021	Destacar la importancia de evaluar la variabilidad biológica y técnica de los datos proteómicos generados por SWATH-MS	Proteómica y Transcriptómica	MS con Triple TOF (DDA-MS análisis) (Creación de la librería) y SWATH-MS (DIA-MS análisis) (Cohorte)	Eagle et. al ¹³⁸
2021	Evaluar las repercusiones de las mutaciones genéticas sobre el perfil de expresión de las proteínas en CLL	Proteómica, Transcriptómica y Genómica	MS con timsTOF (DIA-MS análisis)	Meier-Abt et. al ⁵⁵
2022	Identificación de firmas de expresión proteica, con valor predictivo (supervivencia global, tiempo hasta tratamiento y respuesta a terapia), que clasifique a los pacientes con CLL e identifique nuevos grupos	Proteómica e Información clínica	Micromatriz de proteínas en fase inversa (anticuerpos frente a 302 proteínas, 72 fosfoproteínas, 4 proteínas activas y 6 modificaciones postraduccionales frente a H3)	Griffen et. al ¹⁰⁷
2022	Análisis multi-ómico	Proteómica, Transcriptómica, Genómica, Tratamiento e Información clínica	MS con HiRIEF-LC-MS. Validación con MS con LC-Q/Orbitrap (DIA-MS análisis)	Herbst et. al ⁵⁶

**Objetivo
general y
específicos.**

Objetivo general.

Establecer una estrategia sistemática que permita la caracterización multi-ómica para la evaluación de perfiles proteicos diferenciales y desvele la importancia de la respuesta humoral y el microambiente tumoral en el desarrollo y progresión de la Leucemia Linfocítica Crónica, así como la evaluación del proteoma del linfocito B clonal.

Objetivos específicos.

Para ello se propusieron los siguientes objetivos:

1. Diseñar y desarrollar un método sistemático que permita la integración multi-ómica, capaz de caracterizar perfiles de expresión diferencial característicos en el desarrollo de tumores, utilizando una línea celular como modelo.
2. Estudiar los perfiles séricos cuantitativos de factores inmunológicos e inmunoglobulinas en pacientes con *Leucemia Linfocítica Crónica* y el estadio previo de la enfermedad.
3. Evaluar la respuesta humoral mediante el análisis cualitativo de perfiles de autoantígenos y antígenos microbianos en pacientes con *Leucemia Linfocítica Crónica* y el estadio previo de la enfermedad.
4. Evaluar el perfil proteico intracelular del linfocito B clonal en pacientes con *Leucemia Linfocítica Crónica* y el estadio previo de la enfermedad.

Materiales y Métodos.

I. Cultivos celulares.

La integración ortogonal a nivel multi-ómico (proteómica y transcriptómica) se realizó empleando la línea celular Ramos, procedente de un Linfoma de Burkitt humano (Linfoma no Hodgkin) (Cod.: CRL-1596™).

El mantenimiento del cultivo celular se llevó a cabo en RPMI 1640 suplementado con: L-glutamina, 10 % volumen/volumen (v/v) de suero fetal bovino (FBS) y 1 % (v/v) Penicilina/Estreptomicina a 10000 unidades/mL (P/E).

El monitoreo del crecimiento celular se realizó diariamente, con cambio de medio cada 2-3 días e incubación a 37 °C con un 5 % de CO₂.

De acuerdo a los requerimientos de las diversas caracterizaciones, se prepararon diferentes pellets de 40 · 10⁶ y 200 · 10⁶ células. El número de células estimado se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer, a partir de la línea celular en cultivo, y centrifugadas a 1200 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos (min) a temperatura ambiente (RT).

Posteriormente, estos pellets fueron lavados 3 veces (3x) con solución salina Na⁺/K⁺ a pH 7,4 (PBS), donde los procesos de centrifugación fueron a 1200 rpm durante 5 min a RT. Estos pellets fueron almacenados a -80 °C hasta su empleo en las distintas aproximaciones metodológicas.

2. Sujetos y muestras de estudio.

La evaluación del microambiente tumoral, la respuesta humoral (niveles de Igs, perfil de autoantígenos y perfil antigénico) y señalización intracelular de la B-CLL, esta última en proceso de estudio (por lo que no será tratado dicho estudio en el documento de Tesis), se realizó mediante un estudio prospectivo a partir de muestras de sangre periférica (SP) de pacientes diagnosticados previamente con MBL o CLL, cuyas características y procesamiento se irán describiendo a lo largo de la presente sección y cuyo flujo de trabajo se encuentra recogido en la **Figura 10**.

I.I. Sujetos de estudio.

Se han incluido 67 pacientes (57 adultos diagnosticados con CLL y 10 con MBL) con una media de edad de 70 años, recolectadas entre mayo del 2018 y octubre del 2020, procedentes del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Los criterios diagnósticos y pronósticos se realizaron de acuerdo a la reunión internacional de Leucemia Linfocítica Crónica (iwCLL)¹⁹ y la estadificación según los criterios de Rai³⁷ y Binet³⁶ (**Tabla 7**). La información pormenorizada y de interés para este trabajo de cada una de las muestras se encuentra recogida en la **Tabla Suplementaria 1**.

Todas las muestras de este estudio se han obtenido mediante procedimiento descrito y aprobado por el comité ético del Hospital Universitario de Salamanca (HUS) e Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL) (Cod.: CEIm PI 2021 02 694) y donde todos los pacientes han firmado consentimiento informado de participación en el estudio

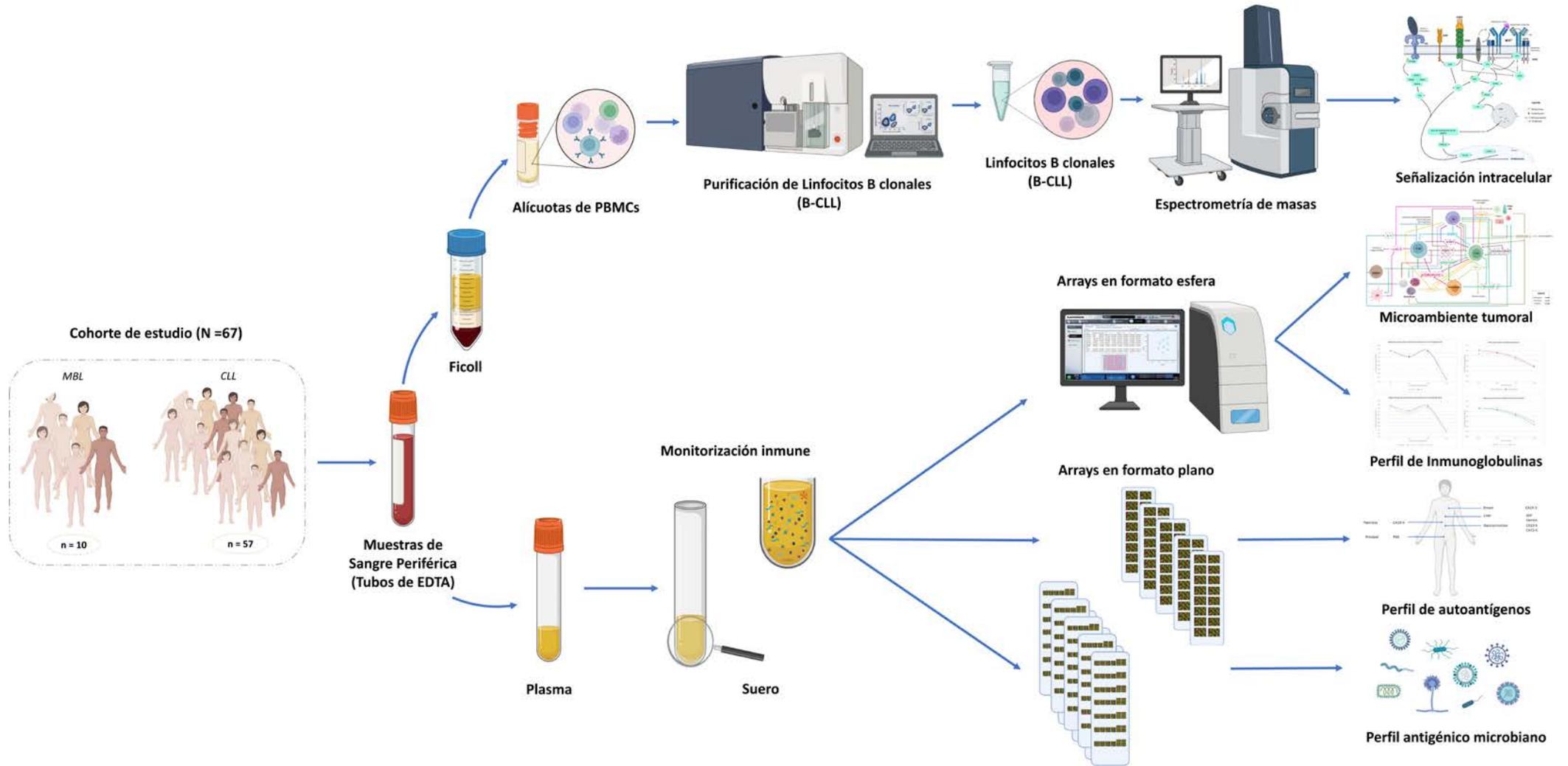


Figura 10: Flujo de trabajo empleado para el estudio del microambiente tumoral, y evaluación de la respuesta humoral en muestras de sangre periférica procedente de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica (CLL) y Linfocitosis B monoclonal (MBL) incluidos en este estudio.

Tabla 7: Datos clínicos de la cohorte de estudio.

Información Clínica		Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Género	<i>Mujer</i>	29	43,3
	<i>Hombre</i>	38	56,7
Edad	≤ 65	24	35,8
	> 65	43	64,2
Diagnóstico	<i>MBL</i>	10	14,9
	<i>CLL</i>	57	85,1
Estado de la CLL	<i>c-CLL</i>	42	73,7
	<i>p-CLL</i>	15	26,3
	<i>A</i>	54	80,6
Clasificación Binet	<i>B</i>	6	9
	<i>C</i>	7	10,4
	<i>0</i>	45	67,2
	<i>I</i>	5	7,5
Clasificación Rai	<i>II</i>	10	14,9
	<i>III</i>	1	1,5
	<i>IV</i>	6	9
	<i>CLL-PFT</i>	9	60
Situación terapéutica	<i>CLL-TFT</i>	5	33,3
	<i>M-IGHV</i>	45	67,2
Estado mutacional de la IGHV	<i>U-IGHV</i>	22	32,8
	<i>Normal</i>	24	35,8
Citogenética	<i>Con alteraciones</i>	43	64,2
	Total	67	100

*c-CLL: Leucemia Linfocítica Crónica estable | p-CLL: CLL en progresión | CLL-TFT: CLL previa a 1ª línea de tratamiento | CLL-TFT: CLL tras 1ª línea de tratamiento o sucesivas | M-IGHV: Región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas Mutada | U-IGHV: IGHV no mutada.

I.2. Procesamiento de las muestras de estudio.

I.2.1. Recogida y pre-procesamiento.

Un total de 67 muestras de SP, procedentes de cada uno de los pacientes, fueron recogidas en tubos de 5-10 mL de EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) y procesadas dentro de las primeras 24 horas desde su extracción.

Los tubos de 5-10 mL de SP se centrifugaron a 800 revoluciones en fuerza centrífuga relativa (xg) durante 10 min a RT. El plasma fue recogido en alícuotas de 0,5 mL y guardado a -80 °C hasta su posterior análisis.

De forma inmediata, fue re-constituida la homeostasis del componente celular presente en la SP mediante la adición de PBS en un volumen proporcional al del plasma retirado.

Una vez re-constituida la homeostasis, se procedió a realizar el aislamiento de células mononucleares (PBMCs) por gradiente de densidad, agregando con una pipeta serológica el

contenido re-constituido sobre el tubo que contenía la solución de separación *Biocoll* (Cod.: BS.L 6115, Bio&SELL GmbH, Alemania) y se centrifugó a 800 xg, sin freno, durante 30 min a RT (con una relación de volúmenes 1:1:1 de Sangre, PBS y *Biocoll*).

Tras el proceso de centrifugación, se recogió la interfase (capa que contenía los PBMCs) en un tubo de 10 mL y se enrasó hasta un volumen final (V_F) de 10 mL con PBS para realizar un lavado. El proceso de centrifugación fue de 10 min a 1200 xg y RT.

Finalmente, se almacenó el pellet en alícuotas de $20 - 25 \cdot 10^6$ células en FBS suplementado con 1 % P/E (v/v) y 10 % (v/v) dimetilsulfóxido (DMSO - $\geq 99,9$ % de pureza-). Estas alícuotas se almacenaron a -80 °C hasta su separación.

I.2.2. Proceso de preparación del suero sanguíneo.

Para el estudio del microambiente y evaluación de la respuesta humoral era necesario trabajar con suero. Por ello, 1 mL de plasma de cada una de las muestras fue descongelado en hielo y centrifugado durante 5 min a 2000 xg a RT. Inmediatamente, se hicieron alícuotas de 100 μ L de suero en placas de PCR de 96 pocillos, y se almacenaron a -80 °C hasta la realización de los inmunoensayos.

I.2.3. Proceso de purificación de los Linfocitos B clonales.

Para el estudio de la señalización intracelular de la B-CLL fue necesario la separación selectiva y purificación específica de los linfocitos B clonales.

Se partió de las alícuotas de PBMCs ($20 - 25 \cdot 10^6$ células) anteriormente guardadas (véase sección 2.2.1 de materiales y métodos -M&M-). Estas fueron descongeladas en baño a 37 °C y su contenido fue pasado a un tubo libre de seroalbúmina bovina (BSA) con FBS atemperado (V_F de 5 mL).

Los tubos fueron centrifugados a 540 xg durante 5 min a RT y el pellet fue re-suspendido en 500 μ L de PBS.

Las células fueron marcadas usando los siguientes Abs: anti CD45 en Fluoresceína (CD45-FITC, clon 2D1, Cod. 345808, BD Biosciences, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos), CD19 en Ficoeritrina-Cianina7 (CD19 PE-Cy7, clon J3.119, Cod. 19PC73-100T, Immunostep, España) y CD5 en Alofocianina (CD5-APC, clon L17F12, Cod. 340658, BD Biosciences, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos); e incubadas durante 30 min en oscuridad y RT.

La separación de los linfocitos B-CLL fue realizada con el citómetro separador FACS Aria III (Becton Dickinson -BD-, EE.UU.) utilizando PBS como medio de separación, con una media de tiempo de adquisición de 30-45 min/muestra y obteniendo una pureza del 99 % durante el proceso.

La población de interés con inmunofenotipo CD19⁺ y CD5⁺ fue recogida en tubos de 5 mL libres de BSA que inmediatamente fueron centrifugados a 1200 xg durante 10 min a RT. El sobrenadante se eliminó, hasta dejar 0,5 mL en los que las células fueron re-suspendidas.

Los linfocitos B-CLL purificados fueron pasadas a eppendorfs y centrifugados a 2000 xg durante 7 min a RT. Se eliminó el sobrenadante, hasta dejar aproximadamente un volumen de 100 μ L en

los que fueron re-suspendidos. Finalmente, el pellet fue almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

1.3. Grupo control (referencia).

Para la evaluación de la respuesta humoral fue utilizada una muestra de referencia (Ref.) procedente del *National Institute of Standards and Technology* (NIST) en los Estados Unidos (909c Fozen Human Serum); obtenida de un grupo de individuos sanos de entre 25 y 80 años.

La muestra de suero liofilizada fue diluida en PBS e inmediatamente se hicieron alícuotas de $30\text{ }\mu\text{L}$, que se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis posterior.

3. Extracción de proteínas y fraccionamiento subcelular

Se han realizado 9 protocolos diferentes de extracción de proteínas debido en gran parte por la complejidad intrínseca de los perfiles proteicos de acuerdo a su amplio rango dinámico, diversidad de localizaciones subcelulares, tamaño y abundancia relativa. De ellos, 4 corresponden con métodos de extracción de proteína total (Protocolo #1-#4), 2 más que permiten el enriquecimiento en proteínas de membrana (Protocolo #1-#4), 1 que permite realizar un fraccionamiento subcelular de dos fracciones (Membrana [Mem] y Citoplasma [Cit] - Protocolo #7 -) y 2 más que permiten el fraccionamiento subcelular en cuatro fracciones (Mem, Cit, Orgánulo [Org] y Núcleo [Nuc] - Protocolo #8 y #9 -).

En todos los ensayos se partió de $40 \cdot 10^6$ células de la línea celular Ramos, salvo para los protocolos #8 y #9, cuyo número de células fue 10 veces más ($400 \cdot 10^6$ células) (véase sección 1.2 de M&M para la obtención de los pellets celulares).

Todas las soluciones de lisis fueron suplementadas con inhibidores de fosfatasa y proteasa (Tabla 8). Además, para la incubación de las muestras con la solución de lisis se estableció, para los protocolos #8 y #9, una relación de 5 veces (5x) el volumen del pellet celular, mientras que para el resto de protocolos (#1-#7) se utilizó un volumen de $375\text{ }\mu\text{L}$ por cada $1 \cdot 10^6$ células.

En todos los protocolos de extracción los procesos de centrifugación e incubación se realizaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y los extractos proteicos fueron almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

El flujo de trabajo para cada uno de los protocolos de extracción de proteínas se encuentra detallado en la Figura 11 (#1-#7) y Figura 12 (#8 y #9). Por otro lado, la composición de la solución de lisis, procesos de centrifugación e incubación se especifican en la Tabla 8.

3.1 Protocolo #1.

La composición de la solución de lisis es de 140 mM cloruro sódico (NaCl), 50 mM EDTA, 20 mM Tris(hidroximetil)aminometano/Ácido clorhídrico (Tris/HCl) a pH 7, 10% (v/v) glicerol y 1% (v/v) Octilfenoxipolietoxietanol (IGEPAL) (Tabla 8).

El pellet fue descongelado en la solución de lisis. Seguidamente, fue re-suspendido e incubado durante 15 min con dicha solución. Posteriormente, se realizó un proceso de centrifugación de

15 min a 15000 xg y el sobrenadante con el extracto proteico fue almacenado (**Figura 11 y Tabla 8**).

3.2 Protocolo #2.

La solución de lisis se compone de 9 M urea y 20 mM ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES) a pH 8 (**Tabla 8**).

Durante este proceso, el pellet fue descongelado directamente en la solución de lisis y posteriormente, se llevaron a cabo 3 ciclos/pulsos de sonicación en hielo (5 s de sonicación y 1 min de reposo). Finalmente, la muestra se centrifugó durante 15 min a 15000 xg y el sobrenadante con el extracto proteico fue almacenado (**Figura 11 y Tabla 8**).

3.3 Protocolo #3.

Para este protocolo, la solución de lisis estaba compuesta por 7 M urea, 2 M tiourea y 30 mM Tris/HCl a pH 8,5 (**Tabla 8**).

El pellet fue descongelado en la solución de lisis y re-suspendido en dicha solución, seguidamente se centrifugó durante 15 min a 12000 xg y el sobrenadante con el extracto proteico fue almacenado (**Figura 11 y Tabla 8**).

3.4 Protocolo #4.

En este proceso, la solución de lisis celular está formada por 10 mM Cloruro de magnesio ($MgCl_2$), 140 mM NaCl, 5 mM HEPES a pH 8 y 0,01 % (v/v) Tween 20 (**Tabla 8**).

Al igual que con el protocolo anterior (#3), el pellet fue descongelado, re-suspendido y centrifugado durante 15 min a 12000 xg y el sobrenadante con el extracto proteico fue almacenado (**Figura 11 y Tabla 8**).

3.5 Protocolo #5.

La solución de lisis utilizada consta de 15 mM Cloruro de potasio (KCl), 2 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 30 mM HEPES a pH 8 y 20 % (v/v) glicerol. Esta solución fue suplementada con 10 % (v/v) n-Dodecil- β -D-maltosido para realizar la extracción (**Tabla 8**).

El pellet fue descongelado directamente en la solución de lisis, re-suspendido e incubado con dicha solución de lisis suplementada durante 30 min en rotación. Finalmente, se realizó un proceso de centrifugación durante 5 min a 16000 xg y el sobrenadante con el extracto proteico fue almacenado (**Figura 11 y Tabla 8**).

3.6 Protocolo #6.

Para este protocolo se utilizó la misma solución de lisis y misma metodología que para el protocolo #5; solo que, en este caso, la solución de lisis se suplementa con 1,5 % (v/v) Triton X-100 (**Figura 11 y Tabla 8**).

Tabla 8: Tabla resumen de las principales características de las estrategias de extracción de proteínas y fraccionamiento subcelular.

			Protocolo											
			Componentes (Fórmula molecular)		#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	
Solución de lisis	Inhibidor de fosfatasa (mM)	<u>$C_9H_{16}ClO_6P$</u>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
		<u>$C_7H_7FO_2S$</u>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
		<u>NaF</u>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
		<u>Na_3O_4V</u>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
		<u>$C_3H_9Na_2O_6P$</u>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
		<u>$Na_4O_7P_2$</u>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Sal (mM)	<u>$NaCl$</u>	140	-	-	140	-	-	140	-	-	400	-	400
		<u>KCl</u>	-	-	-	-	15	15	-	15	15	-	15	-
		<u>$MgCl_2$</u>	-	-	-	10	2	2	10	2	2	10	2	2
	Inhibidor de metaloproteasas (mM)	<u>$C_{10}H_{12}N_2Na_4O_8 \cdot xH_2O$</u>	50	-	-	-	1	1	-	1	1	1	1	
	Agente caotrópico (M)	<u>CH_4N_2O</u>	-	9	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<u>CH_4N_2S</u>	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Solución tampón (mM)	<u>$Tris/HCl$</u>	20	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<u>$C_{13}H_{20}BCIN_2O_4$</u>	-	20	-	5	30	30	5	30	30	5	30	30	
Agente gelificante (% - v/v-)	<u>$C_3H_8O_3$</u>	10	-	-	-	20	20	-	20	20	-	20	-	
Paso 1	Detergente no iónico (% - v/v-)	<u>$C_{16}H_{26}O_2$ (IGEPAL)</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		<u>$(C_2H_4O)_y(C_2H_4O)_w(C_2H_4O)_x(C_2H_4O)_zC_{18}H_{34}O_6$</u>	-	-	-	0,1	-	-	0,1	-	-	-	-	
		<u>$C_{24}H_{46}O_{11}$</u>	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	
		<u>$C_{16}H_{26}O_2$</u>	-	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-	-	
		<u>$C_{56}H_{92}O_{29}$</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,015	0,015	-	
		<u>$C_{14}H_{28}O_6$</u>	-	-	-	-	-	-	38	-	-	-		

Continuación de la Tabla 8: Tabla resumen de las principales características de las estrategias de extracción de proteínas y fraccionamiento subcelular.

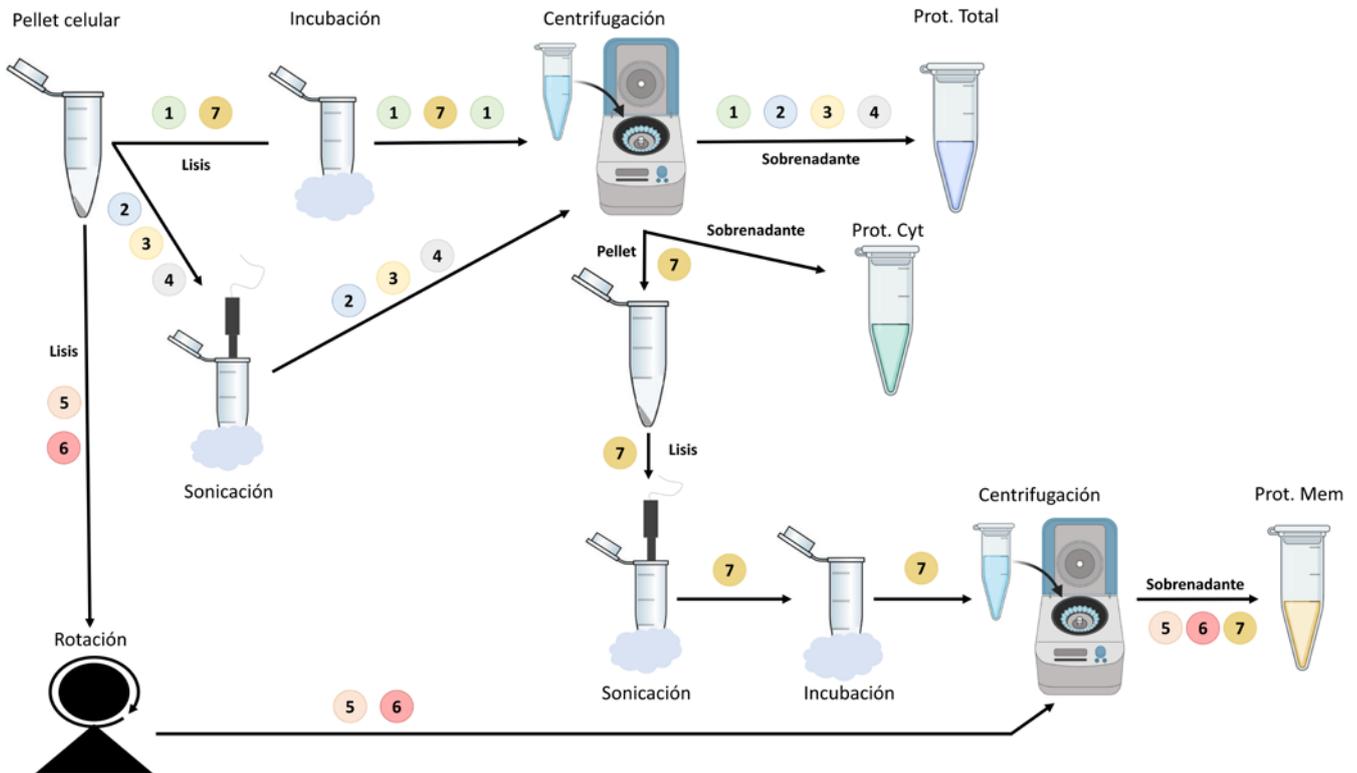
		Protocolo									
Componentes (Fórmula molecular)		#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	
Paso 2	Detergente no iónico (% - v/v-)	$(C_2H_4O)y(C_2H_4O)w(C_2H_4O)x(C_2H_4O)zC_{18}H_{34}O_6$	-	-	-	-	-	-	5	5	-
Paso 3	Sal (mM)	$NaCl$	-	-	-	-	-	-	14	-	-
	Detergente no iónico (% - v/v-)	$C_{16}H_{26}O_2$ (IGEPAL)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5
Paso 4	Detergente no iónico (% - v/v-)	$C_{24}H_{46}O_{11}$	-	-	-	-	-	-	1	-	1

Incubación (4 °C)	Tiempo (min)	15	-	-	-	30*	30*	30	30*/15*/30*/5*	30*/15*	10*/30* + 5*
Sonicación	ciclos/tiempo (s)/ intervalo de incubación (en hielo)	-	3/5/1	5/10/1	3/10/1	-	-	3/3/1	-	-	-
Centrifugación	Tiempo (min)	15	15	15	15	5	5	15	5	5	5
	$\times 10^3$ xg	15	15	12	12	16	16	15	0,5	0,5	3/15
Lavados	Repeticiones	-	-	-	-	-	-	-	3/3/3/-	3/3	3/-

* La incubación se llevó a cabo en rotación.

s: segundos; N°: número; min.: minutos; v/v: volumen/volumen; xg: revoluciones en fuerza centrífuga relativa.

Tris(2-carboxietil)fosfina: $C_9H_{16}ClO_6P$ | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo: $C_7H_7FO_2S$ | Fluoruro sódico: NaF | Ortovanadato de sodio: Na_3O_4V | β -glicerofosfato: $C_3H_9Na_2O_6P$ | Pirofosfato de sodio: $Na_4O_7P_2$ | Cloruro de sodio: $NaCl$ | Cloruro de potasio: KCl | Cloruro de magnesio: $MgCl_2$ | Ácido etilendiaminotetraacético: $C_{10}H_{12}N_2Na_4O_8 \cdot xH_2O$ | Urea: CH_4N_2O | Tiourea/Tiocarbamida: CH_4N_2S | Tris(hidroximetil)aminometano/Ácido clorhídrico: $Tris/HCl$ | Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico: $C_{13}H_{20}BCIN_2O_4$ | Glicerol: $C_3H_8O_3$ | Octilfenoxipolietoxietanol: $C_{16}H_{26}O_2$ (IGEPAL) | Tween 20: $(C_2H_4O)y(C_2H_4O)w(C_2H_4O)x(C_2H_4O)zC_{18}H_{34}O_6$ | n-Dodecil- β -D-maltosido: $C_{24}H_{46}O_{11}$ | Triton X-100: $C_{16}H_{26}O_2$ | Digitonina: $C_{56}H_{92}O_{29}$ | n-Octil- β -D-glucopiranosido: $C_{14}H_{28}O_6$



*Los números incluidos en los círculos representan cada uno de los protocolos de extracción.

Figura 11: Flujo de trabajo para los protocolos del #1-#7.

3.7 Protocolo #7.

En este protocolo se utilizó la misma solución de lisis que la empleada para el protocolo #4 (Tabla 8).

En un primer paso, se dejó descongelar la muestra con la solución de lisis, se re-suspendió y se centrifugó durante 15 min a 13000 xg. El sobrenadante con la fracción de proteínas de Cyt se recogió y almacenó.

Seguidamente, el pellet fue re-suspendido en el mismo buffer de lisis suplementado con 38 % (v/v) n-Octil- β -D-glucopiranosido. En este segundo paso, la muestra fue sonicada en 3 ciclos/pulsos de 3 s de sonicación y 1 min de reposo en hielo. A continuación, se incubó durante 30 min y finalmente, se centrifugó durante 15 min a 13000 xg para recoger el sobrenadante con la fracción enriquecida en proteínas de Mem y almacenarlo (Figura 11 y Tabla 8).

3.8 Protocolo #8.

En el caso del fraccionamiento en cuatro localizaciones subcelulares, se emplea para la primera fracción (Cyt.) una solución que contiene 15 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 30 mM HEPES a pH 8 y 20 % (v/v) glicerol y se suplementa con 0,015 % (v/v) de Digitonina. De forma que el pellet celular se descongeló, re-suspendió e incubó en rotación durante 30 min. Seguidamente, fue centrifugado durante 5 min a 500 xg y el sobrenadante con el extracto proteico citoplasmático fue almacenado (Figura 12 A y Tabla 8).

El precipitado resultante se lavó 3x con la misma solución de lisis sin suplementar y el sobrenadante fue desechado (los procesos de centrifugación fueron de 5 min a 500 xg).

Posteriormente, se re-suspendió el precipitado lavado en la solución de lisis suplementada con 5 % (v/v) Tween 20. Se incubó durante 15 min en rotación y se centrifugó durante 5 min a 500 xg. El sobrenadante con el extracto proteico de organela fue almacenado (**Figura 12 B y Tabla 8**).

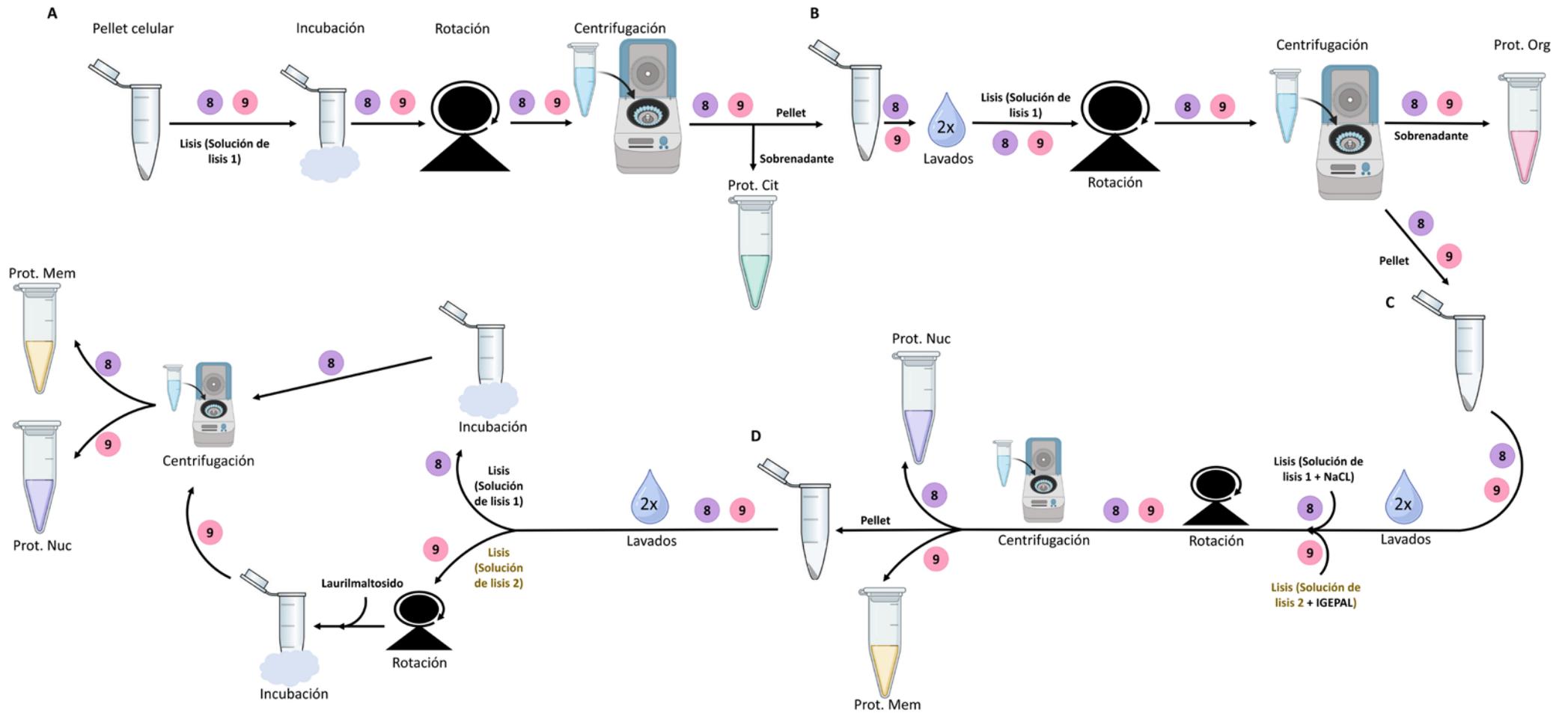
El precipitado resultante se lavó (3x) con la solución de lisis sin suplementar, se centrifugó durante 5 min a 500 xg y de nuevo, el precipitado obtenido fue re-suspendido en la misma solución de lisis suplementada con 14 mM de NaCl (concentración final – C_F -). Se incubó en rotación durante 30 min y se repitió el proceso de centrifugación anteriormente citado para los fraccionamientos subcelulares. El sobrenadante con el extracto proteico nuclear fue recogido y almacenado (**Figura 12 C y Tabla 8**).

Finalmente, se realizó un proceso de lavado (3x) siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito. El precipitado fue re-suspendido en la solución de lisis suplementada con 1 % (v/v) n-Dodecil- β -D-maltosido y se incubó durante 5 min en rotación. Seguidamente, fue centrifugada y el sobrenadante con el extracto proteico de membrana fue recogido y almacenado (**Figura 12 D y Tabla 8**).

3.9 Protocolo #9.

En este caso, la obtención de la fracción citoplasmática y de organela se llevó a cabo igual que para el protocolo #8 (misma solución de lisis, detergentes y condiciones de incubación) (**Figura 12 A y B y Tabla 8**). Tras la obtención del sobrenadante con el extracto proteico de organela, el precipitado fue re-suspendido en una solución de lisis cuya composición es la siguiente: 400 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 30 mM HEPES a pH 8, y se suplementa con 0,5 % (v/v) de IGEPAL. Seguidamente se incubó durante 10 min en rotación y posteriormente se centrifugó durante 5 min a 3000 xg. El sobrenadante con el extracto proteico de membrana fue recogido y almacenado (**Figura 12 C y Tabla 8**).

Por último, el precipitado fue lavado (usando la misma metodología que en la sección 3.8 de M&M) e incubado durante 30 min, en rotación, con la solución de lisis empleada anteriormente. A continuación, se añadió 1 % n-Dodecil- β -D-maltosido, se incubó durante 5 min y finalmente, se procedió a la extracción de las proteínas de la fracción nuclear con una centrifugación de 5 min a 15000 xg (**Figura 12 D y Tabla 8**).



* Los números incluidos en los círculos representan cada uno de los protocolos de extracción. Laurilmaltosido = n-Dodecil-β-D-maltosido

Solución de lisis 1 (15 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 30 mM HEPES pH 8 y 20 % -v/v- glicerol).

Solución de lisis 2 (400 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 30 mM HEPES pH 8).

Figura 12: Flujo de trabajo para los protocolos de extracción de proteínas en cuatro fracciones subcelulares.

4. Determinación de concentración de proteínas.

Teniendo en cuenta la composición química de las distintas soluciones de lisis, se utilizaron dos métodos de cuantificación proteica comercial, como son el método Bradford (Coomassie Plus - Bradford- Assay Kit; Cod.: 23236, ThermoFisher Scientific, EE.UU.-) y el ensayo Lowry/BCA (ácido bicinconínico) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit - Cod.: 23225, ThermoFisher Scientific, EE.UU.-).

4.1 Método de Bradford.

Se determinó la concentración de proteína por medio de la absorbancia, a una longitud de onda (λ) de 595 nm, de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer* y correspondiente con un rango de detección lineal de concentración de 25-2000 $\mu\text{g/mL}$.

Para ello se preparó una recta patrón con seis diluciones seriadas 3:4 (v/v) con BSA (rango de detección lineal de 25-2000 $\mu\text{g/mL}$) en PBS y el blanco (diluyente).

En base a las limitaciones del método Bradford (Coomassie Plus -Bradford- Assay Kit; Cod.: 23236, ThermoFisher Scientific, EE.UU.), en cuanto a las interferencias debidas a la composición química de las distintas soluciones de lisis, se llevaron a cabo las correspondientes diluciones de los extractos proteicos en PBS, de acuerdo al requerimiento metodológico y composición de la solución.

Posteriormente, se realizó el ensayo por duplicado con una relación 4:125 (v/v) de muestra (patrón, blanco o dilución de la muestra) y reactivo Coomassie Plus Reagent. La placa se incubó en oscuridad durante 10 min a RT.

Finalmente, se determinó la absorbancia a una λ de 595 nm con un Synergy 4 multi-detectin microplate reader y el software Gen 5 v. 1.05 (BioTeck Agilent Technologies, EE.UU.) y los resultados obtenidos fueron exportados en formato .xlsx. Posteriormente se llevó a cabo la relación lineal entre la absorbancia y la concentración.

4.2 Método Lowry/BCA.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante la absorbancia a una λ de 562 nm, de acuerdo con el estado redox del ion cuproso (Cu^+). En este método, el ion Cu^+ se genera debido a la oxidación del ion cúprico (Cu^{2+}) al interactuar con las proteínas en un medio alcalino; permitiendo así, formar un complejo entre la sal sódica BCA presente en la solución y el ion Cu^+ , produciendo una absorbancia a 562 nm y que presenta una relación directa con la concentración de proteína en la solución acuosa estudiada.

Para dicha determinación de la concentración proteica se preparó una recta patrón con seis diluciones seriadas 3:4 (v/v) en PBS, con rango de detección lineal de 25-2000 $\mu\text{g/mL}$.

Como blanco se utilizó el diluyente (PBS) y las diluciones, correspondientes a cada una de las muestras, se realizaron en base a los requerimientos metodológicos de compatibilidad química de la composición de la solución de lisis para el método Lowry/BCA (Pierce™ BCA Protein Assay

* Ley de Lambert-Beer: $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ donde

A es la absorbancia de la disolución a una λ determinada, ϵ es el coeficiente de extinción molar, l la longitud de la cubeta y c la concentración de la disolución.

Kit - Cod.: 23225, ThermoFisher Scientific, EE.UU.). Además, se preparó una solución de trabajo con una relación 50:1 (v/v) del reactivo A y B del kit.

Posteriormente, se llevó a cabo el ensayo por duplicado con una relación 1:8 (v/v) de muestra (patrón, blanco o dilución de la muestra) y solución de trabajo. La placa se incubó en oscuridad durante 30 min a 37 °C.

A continuación, la absorbancia se determinó mediante la lectura de la placa a una λ 562 nm con el Synergy 4 multi-detectin microplate reader y el software Gen 5 v. 1.05 (BioTeck Agilent Technologies, EE.UU.).

Finalmente, la determinación de la concentración proteica se realizó usando la misma metodología que en la sección anterior (4.1 de M&M).

5. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

5.1 Preparación de geles a una concentración de acrilamida del 12 %.

La mezcla de los diferentes compuestos para preparar el gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 % de acrilamida se realizó en H₂O miliQ.

En primer lugar, se preparó la mezcla del gel separador que contenía: 374 mM Tris/3,5 mM dodecil sulfato de sodio (SDS) a pH 8,8, 12 % Protogel (Cod.: EC890, National Diagnostics, EE.UU.), 0,1 % (v/v) TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, - Cod.: T9281, Sigma-Aldrich, EE.UU.-) y 0,1 % peso/volumen (p/v) APS (persulfato de amonio, - Cod.: 7727-54-0, Merck, Alemania-).

La mezcla fue agregada entre los dos cristales incluidos en el soporte, con cuidado de no generar burbujas, y para proteger dicha mezcla del oxígeno presente en el ambiente, se enrasó con isopropanol (Cod.: 33539, Honeywell, EE.UU.) y se dejó gelificar durante 30-45 min.

Posteriormente, se eliminó el isopropanol y se agregó la mezcla del gel concentrador que se componía de: 125 mM Tris/3,5 mM SDS a pH 6,8, 5 % Protogel (Cod.: EC890, National Diagnostics, EE.UU.), 0,1 % (v/v) TEMED (Cod.: T9281, Sigma-Aldrich, EE.UU.) y 0,05 % (p/v) APS (Cod.: 7727-54-0, Merck, Alemania). Seguidamente, se introdujeron los peines, para generar los carriles del gel, y se dejó gelificar la mezcla.

Una vez gelificado el gel se retiraron los cristales y se procedió a la carga del mismo.

5.2 Separación.

Con el fin de determinar la existencia de posibles sesgos en la distribución proteica, debido a la realización de las diferentes técnicas de extracción de proteínas, se realizó la separación de las mismas en geles SDS-PAGE.

20 µg de proteína extraída con cada uno de los protocolos fueron separados en condiciones reductoras y desnaturalizantes. La distribución fue estudiada en un rango de peso molecular (PM) de entre 10 a 250 kDa (PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus, Cod.: 26619, ThermoFisher Scientific, EE.UU.).

Para ello, se hicieron diluciones en H₂O miliQ de cada uno de los protocolos de extracción proteica (V_F de 20 µL) que contenían: 20 µg de proteína extraída, 40 mM ditioneitol (DTT) y 1 % (v/v) *Sample buffer* (2x Laemmli Sample Buffer, Cod.: #1610737EDU, BIO-RAD, EE.UU.). A continuación, las diluciones de las muestras fueron desnaturalizadas a 99 °C durante 5 min. Posteriormente, se cargó el gel con las muestras/*Sample buffer* y se dejó correr durante 1h a 130 Voltios. Finalmente, se procedió a la tinción del gel.

5.3 Tinción del gel de poliacrilamida.

La presencia de proteínas en el gel SDS-PAGE se determinó mediante tinción. Para ello se emplearon dos métodos diferentes según el procedimiento estándar del laboratorio: i) 0,1 % (p/v) de azul de Coomassie y ii) tinción de plata (**Figura 13** - Corresponde con la [Figura S1B](#) del anexo IV ¹⁴⁶).

En ambos casos, todas las soluciones se llevaron a cabo en H₂O miliQ y los procesos de incubación y revelado de bandas fueron a RT.

5.3.1. Tinción de Coomassie.

Las proteínas y péptidos separados en base a su tamaño en cada uno de los carriles se determinaron mediante una solución con 0,5 % Coomassie G-250 (Cod.: 115444, Sigma-Aldrich, EE.UU.), 50 % (v/v) metanol y 10 % (v/v) ácido acético durante 1 h en agitación suave.

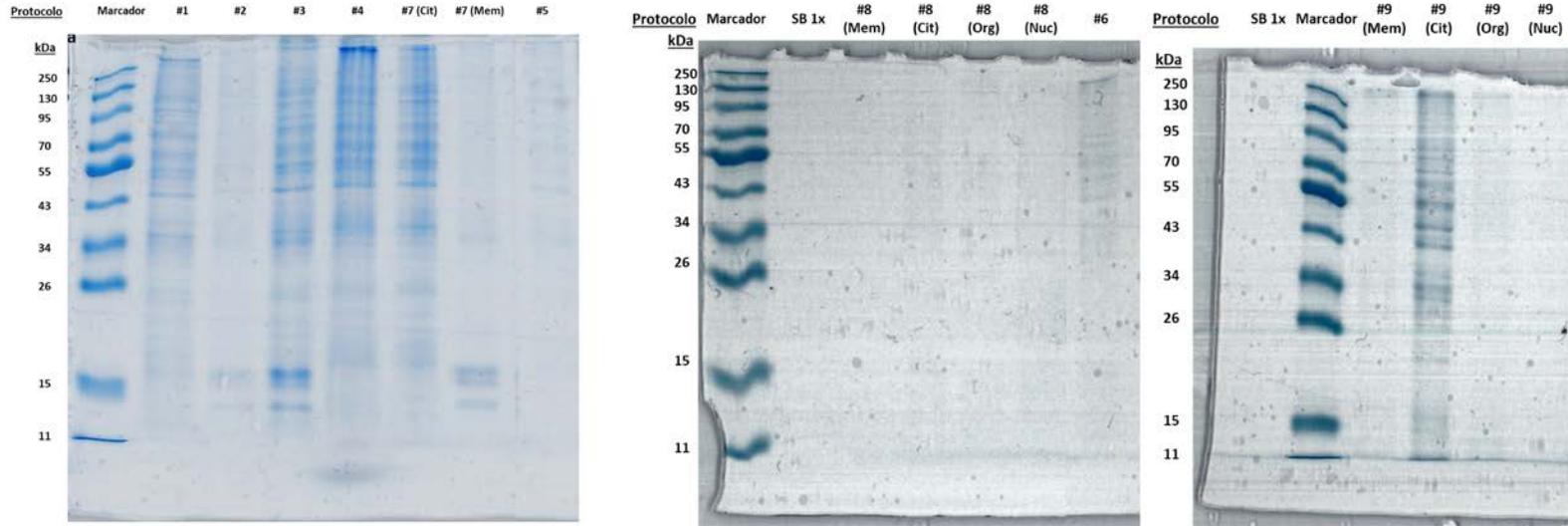
A continuación, se retiró la solución de tinción y se destiñó el gel con una solución con 50 % (v/v) metanol y 10 % (v/v) ácido acético. Durante la primera hora fue lavado varias veces con dicha solución y finalmente, el gel fue dejado durante toda la noche (ON) con solución nueva a RT.

Al día siguiente, se cambió la solución por una nueva y se dejó en agitación durante 1h. Seguidamente, se retiró la solución y se realizaron unos breves lavados en agitación con H₂O destilada. Posteriormente, se cambió el H₂O y se dejó en agitación durante 30 min con el fin de hidratar el gel.

Finalmente, se eliminó el agua y se procedió con el escaneo del mismo (**Figura 13A** - Corresponde con la [Figura S1B.1](#) del anexo IV ¹⁴⁶).

Esta metodología no reveló las proteínas que se encontraban en menor concentración y/o abundancia relativa (límite de detección mediante tinción de Coomassie de < 1 µg), por lo que para poder ser detectadas se procedió a la realización de la tinción con plata (**Figura 13A** - Corresponde con la [Figura S1B.1](#) del anexo IV ¹⁴⁶).

A



Leyenda

Cit.: Fracción citoplasmática.

Mem.: Fracción de membrana.

Org.: Fracción de organela.

Nuc.: Fracción nuclear

B

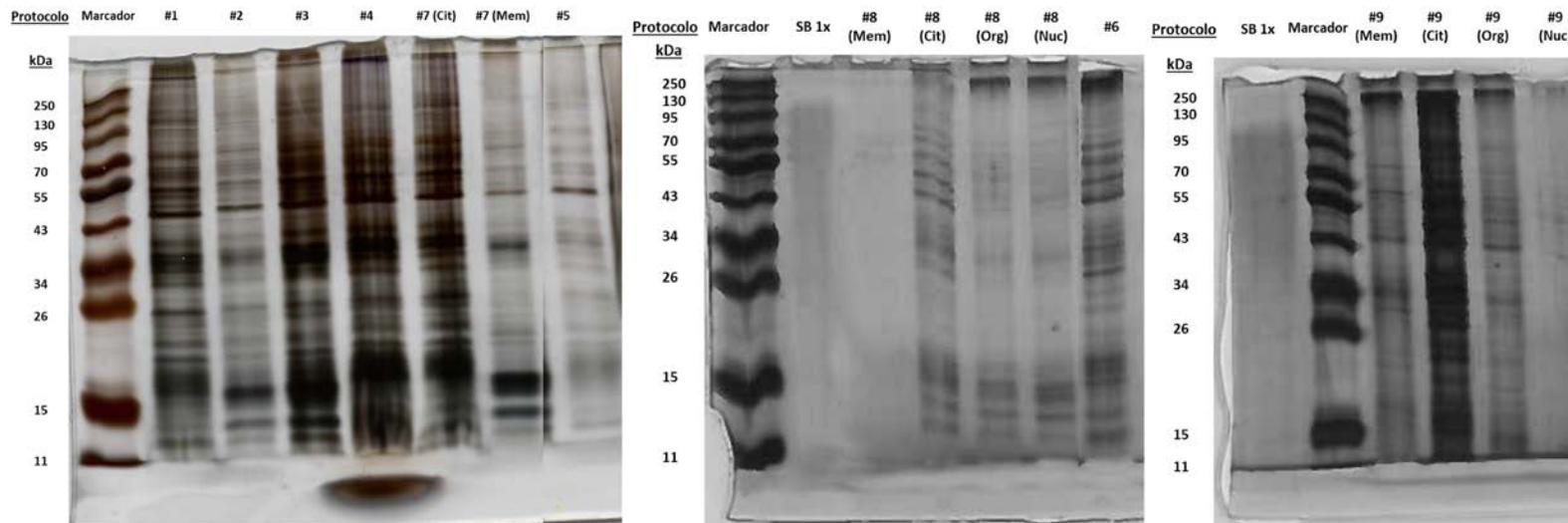


Figura 13: Distribución de los perfiles proteicos obtenidos tras el proceso de extracción de proteínas. A) Tinción de azul de Coomassie B) Tinción de plata.

5.3.2 Tinción de Plata.

En primer lugar, se realizó un proceso de sensibilización con una solución que contenía 30 % (v/v) etanol, 0,2 % (p/v) tiosulfato de sodio y 6,8 % (p/v) acetato sódico durante 30 min en agitación.

A continuación, se eliminó la solución de sensibilización y se procedió a la realización de 3x lavados de 5 min en agitación con H₂O miliQ.

Seguidamente, se agregó la solución de tinción de plata, que contenía 2,5 µg/mL de AgNO₃, y se incubó durante 20 min en agitación.

Posteriormente, se retiró la solución de tinción y se procedió con 2x lavados de 1 min en agitación con H₂O miliQ.

Consecutivamente, se agregó la solución de revelado fría que contenía 2,5 % (p/v) de carbonato de sodio y 0,04 % (v/v) formaldehído y se agitó manualmente hasta discriminar la presencia de proteínas en el gel.

Una vez se distinguieron bandas en el gel, inmediatamente se procedió a agregar la solución de parada, que contenía 1,46 % (p/v) EDTA, y se dejó en agitación durante 10 min.

Finalmente, el gel fue lavado 3x con H₂O miliQ en agitación durante 5 min.

Al igual que en la sección anterior, se eliminó el agua y se procedió con el escaneo del gel (**Figura 13B** - Corresponde con la [Figura S1B.2](#) del anexo IV ¹⁴⁶).

6. Caracterización proteómica.

El análisis masivo y sistemático del perfil proteico diferencial se ha realizado (tanto para la línea celular como para la cohorte de estudio) mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS) y distintos tipos de micromatrices; cuyos procesos se describen a continuación.

6.1 Evaluación del perfil de inmunoglobulinas y microambiente tumoral.

La caracterización de los perfiles serológicos diferenciales de Inmunoglobulinas y microambiente tumoral en la cohorte de estudio, se llevó a cabo mediante el uso de la tecnología Luminex (Luminex Inc, EE.UU.). Siendo:

- **Microambiente tumoral.** El perfil cuantitativo de citocinas e inmunomoduladores en suero se ha evaluado con los kits ProcartaPlex de ThermoFisher Scientific (EE.UU.): Human Monitoring 65-plex para MAGPIX® (Cod.: EPX650-16500-091) y tres paneles de Immuno-Oncology Checkpoint Human (Cod.: EPX14A-15803-901, EPX 140-15815-901 y EPX-100-1582-901) (**Tabla 9**). La información detallada de dichas proteínas solubles de interés en esta Tesis Doctoral se encuentra recogida en la **Tabla suplementaria 2** - Corresponde con la [Tabla 2](#) del anexo V -).

Tabla 9: Citocinas e inmunomoduladores estudiados en el suero de la cohorte de estudio.

Puntos de control de la respuesta inmune		Quimiocinas (n = 18)	Factor de crecimiento/regulación (n = 6)	Citocinas (n = 33)	
LT (n = 22)	NK (n = 17)				
sGITR	sMICA	CXCL1/ Gro α	HGF	G-CSF	IL-21
sHVEM	sMICB	CXCL10/ IP-10	MMP-1	GM-CSF	IL-22
sCD28	sULBP-1	CXCL11/ I-TAC	SCF	IFN α	IL-23
sCD80 / sB7-1	sULBP-3	CCL2/ MCP-1	β -NGF	IFN γ	IL-27
s4-1BB/ sCD137	sULBP-4	CCL8/ MCP-2	FGF-2	IL-1 α	IL-31
sCD27	sCD96/ sTactile	CCL7/ MCP-3	VEGF-A	IL-1 β	LIF
sCD152/ sCTLA4	sCD155/ sPVR	CCL22/ MDC		IL-2	M-CSF
sPD1	sCD112/ sNectin-2	CXCL9/ MIG		IL3	MIF
sPD-L1	sCD73/ sNT5E	CCL3/ MIP-1 α		IL-4	TNF- α
sPD-L2	sArginase-1	CCL4/ MIP-1 β		IL-5	TNF- β
sIDO	sSiglec-7	CCL20/ MIP-3 α		IL-6	TSLP
sBTLA	sSiglec-9	CXCL12/ SDF-1 α		IL-7	
sLAG-3	sPerforin	CXCL13/ BLC		IL-8	
sTIM-3	sE-Cadherin	CXCL5/ ENA-78		IL-9	
sCD134/ sOX40	sB7-H6	CCL11/ Eotaxin		IL-10	
sCD276/ sB7-H3	sS100A8	CCL24/ Eotaxin-2		IL-12p70	
sCD47/ sIAP	sS100A9	CCL26/ Eotaxin-3		IL-13	
sCD48/ sBLAST-1		CX3CL1/ Fractalkine		IL-15	
sGalectin-9				IL-16	
sICOS Ligand/ sB7-H2				IL-17A	
sTIMD-4				IL-18	
sVISTA/ sB7-H5				IL-20	

* Aquellos puntos de control de la respuesta inmune que se encuentran en color verde son activadores, en rojo son inhibidores y en morado cuando tienen ambos efectos según las condiciones. | LT: Linfocito T. NK: Células asesinas naturales (*Natural Killers*)

- **Perfil de Inmunoglobulinas.** En el caso del estudio cuantitativo del perfil diferencial de inmunoglobulinas plasmáticas (Ig A, Ig M e Ig E y las 4 clases de Ig G -Ig G1, Ig G2, Ig G3 e Ig G4-) fue realizado con el kit *Procarta Plex Human antibody isotyping* (Cod.: EPX070-10818-901, ThermoFisher Scientific, EE.UU.).

Para dichos análisis, las muestras de suero fueron diluidas 1:20000 (v/v) en solución universal (Componente del kit Cod.: UABEX/11) y los ensayos fueron realizados siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para cada uno de los ensayos, se estableció una curva de calibración a partir de diluciones seriadas 1:4 (v/v) (para el estudio de proteínas inmunomoduladoras) y 1:2 (v/v) (para el estudio de los niveles de Ig) de los estándares de Ags de estudio (Componente del kit Cod.: SVM183) en solución universal (un total de 7 diluciones). En aquellos kits en los que había presencia de controles internos del propio ensayo, dichos controles fueron re-constituidos en una solución universal (Componente del kit Cod.: UABEX/11) según las instrucciones del fabricante. Finalmente, como blanco fue utilizada la solución universal.

6.I.I. Adquisición de las muestras.

La mezcla de esferas conjugadas con Abs fue agregada a cada pocillo de una placa opaca negra de 96 (Corning®, EE.UU.); en base a las indicaciones del kit (**Figura 14A**).

Posteriormente, la placa de 96 pocillos fue incorporada en un separador magnético (ThermoFisher Scientific, EE.UU.). De este modo las microesferas fueron capturadas, permitiendo llevar a cabo un proceso de separación magnética para la eliminación del sobrenadante de todos los pocillos (**Figura 14B**).

Los procesos de lavado se ejecutaron con una dilución 1:10 (v/v) de solución de lavado (Componente del kit Cod.: WBEX/28) en H₂O miliQ (**Figura 14B**).

La ratio de incubación por pocillo fue de 1:1 (v/v) solución universal/muestra, control, blanco o recta de calibración (**Figura 14C**). La placa fue sellada, tapada para mantenerla en oscuridad (Componente del kit Cod.: SVM16 y SVM104) e, incubada 30 min a RT y en agitación (500 rpm a excepción del kit de monitorización inmune que se realizó a 600 rpm - Fisherbrand™ Microplate Vortex Mixers, EE.UU.-) (**Figura 14D**).

Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de incubación ON a 4 °C en oscuridad.

Al día siguiente, se incubó la placa en agitación durante 30 min a RT en oscuridad. Seguidamente, se hicieron 2x lavados. A continuación, cada muestra fue incubada durante 30 min a RT en oscuridad y en agitación con una dilución 1:50 (v/v) de mix de Abs de detección en solución de dilución de Abs de detección (Componente del kit Cod.: DDBHEX/4) (**Figura 14E**).

Antes del proceso de lectura de la placa, se realizaron 2x lavados y la incubación, durante 30 min en agitación a RT, con 50 µL de Estreptavidina-Ficoeritrina (Componente del kit Cod.: SA-PE) (**Figura 14F**).

Posteriormente se realizaron 2x lavados. Inmediatamente después, se agregaron 120 µL de solución de lectura (Componente del kit Cod.: RBEX/46). La placa fue sellada, tapada e incubada durante 5 min a RT y en agitación (**Figura 14G**).

Finalmente, la adquisición se realizó con el MAGPIX® Instrument y el software xMAP® component v. 4.2 (Luminex Corporation, EE.UU.) (**Figura 14H**).

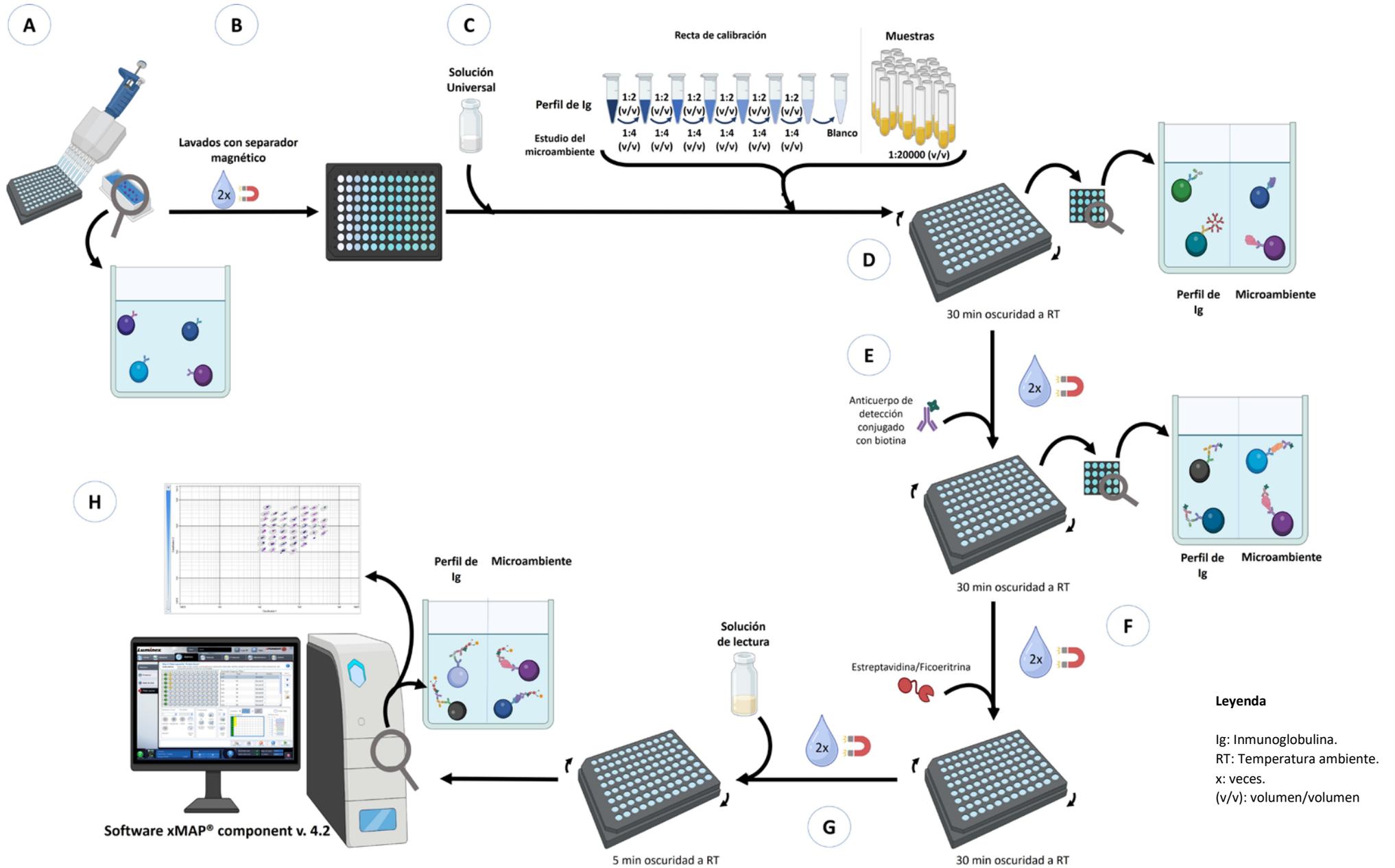


Figura 14: Flujo de trabajo para el estudio de los perfiles serológicos de Inmunoglobulinas y factores inmunológicos solubles.

6.1.2. Análisis cuantitativo.

Para cada uno de los factores inmunológicos solubles e Igs evaluados mediante la metodología Luminex se realizó una curva de calibración con los siguientes criterios/parámetros:

- i) Adquisición con un número mínimos de 50 eventos.
- ii) Coeficiente de determinación (R^2) y coeficiente de determinación ajustado (R_a^2) > 0,99.
- iii) Ecuación logarítmica con 5 parámetros logísticos:

$$y = a + \frac{b-a}{(1 + (\frac{x}{c})^f)^f}; \text{ donde}$$

a, **b**, **c**, **d** y **f** son coeficientes constantes, **y** es la intensidad de fluorescencia media neta y **x** es la concentración en pg/mL.

Esta curva se empleó para la determinación cuantitativa de todos los factores solubles. En el caso de que la adquisición no diese lugar a un valor bien definido de intensidad media de fluorescencia (MFI), se procedió de acuerdo a (**Esquema 4**):

1º Selección de uno de los estándares intermedios (3-5):

$$Std = \min(|10| \leq \text{concentración esperada} - \text{concentración observada})$$

donde **Std** es el estándar seleccionado y **min** es el valor mínimo obtenido para los estándares intermedios.

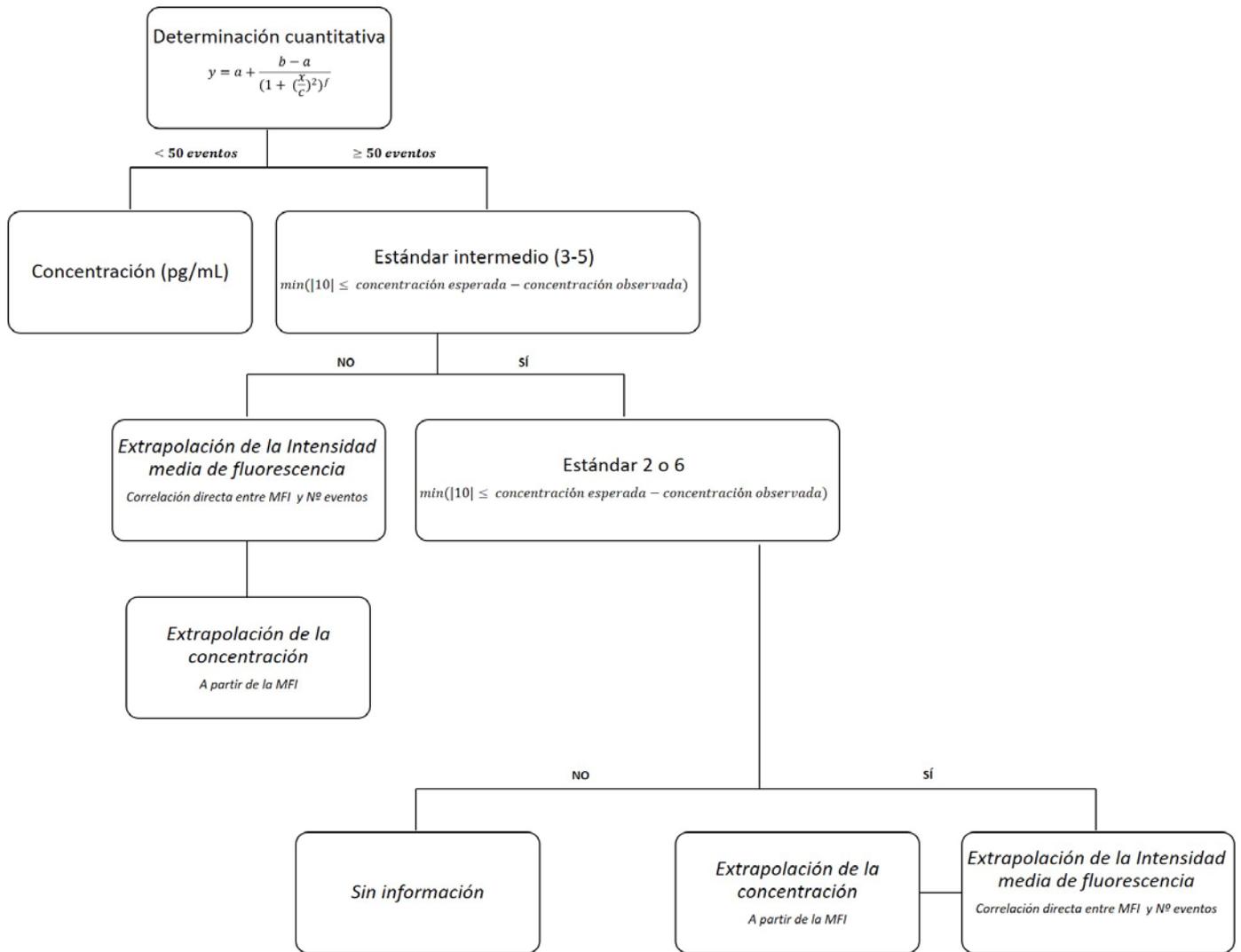
2º Si para dichos estándares anteriormente citados no se cumplían dichos requisitos, se lleva a cabo el mismo proceso para los estándares 2 y 6.

3º Tras la selección del punto de la recta de calibración, se llevó a cabo la extrapolación de los valores de Intensidad media de fluorescencia perdidos a partir de los valores de intensidad media de fluorescencia y número de eventos obtenidos para dicho punto seleccionado.

4º Finalmente, los valores extrapolados de intensidad media de fluorescencia para dicha proteína fueron sustituidos en la ecuación de la recta y despejada la **x**.

Aquellos valores de concentración por debajo del límite de detección del ensayo, fueron sustituidos por el 10 % del valor mínimo para cada analito; siguiendo la misma metodología propuesta por Dong y colaboradores ¹⁴⁷.

Para el posterior tratamiento de los datos y representación de los mismos, los valores de concentración obtenidos fueron convertidos al \log_{10} .



a, b, c, d y f son coeficientes constantes, y es la intensidad de fluorescencia media neta (MFI) y x es la concentración en pg/mL.
min: mínimo.

Esquema 4: Árbol de decisión para la determinación cuantitativa de los perfiles serológicos de Inmunoglobulinas y factores inmunológicos solubles.

6.2 Determinación de la señalización intracelular y perfil antigénico (autoanticuerpos y antígenos microbianos).

Según la caracterización proteómica objetivo y la gran variedad de matrices que pueden ser diseñadas según la naturaleza del agente de captura, este proceso presenta gran influencia en los resultados finales de nuestros ensayos. Por dichos motivos, para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se utilizó una matriz comercial de autoantígenos (aAg array – Array de autoantígenos-) de GeneCopoeia™ Expressway to Discovery (EE.UU. - OmicsArray™ Antigen Microarray, Cod.: PA003-) y se diseñaron dos tipos de matrices diferentes:

- i) Una micromatriz de anticuerpos (SEC-MAP - Cromatografía por exclusión de tamaño & microarray de proteínas -) para el estudio del comportamiento celular a partir de

extractos proteicos obtenidos mediante los procedimientos anteriormente descritos en la sección 3 de M&M (#1 y del #4-#9).

- ii) Una micromatriz de antígenos (SPA array - Array de estimulación antigénica persistente -) para el estudio del perfil antigénico en suero de pacientes frente a antígenos microbianos más comunes.

En esta sección se describen los aspectos metodológicos más relevantes tanto a nivel general como particular y/o específico de cada uno de ellos y cuyo flujo de trabajo puede verse resumido en la **Figura 15**.

6.2.1 Diseño y construcción de las micromatrices de proteínas.

Diseño de la micromatriz.

El primer paso en el diseño fue el establecimiento del contenido de la micromatriz (véase sección 6.2.2 y 6.2.4 de M&M) en función de las características de cada uno de los ensayos.

Seguidamente, y en base a la metodología publicada por Juanes-Velasco y colaboradores¹⁴⁸, en una hoja de cálculo se estableció la disposición final de cada una de las muestras en la micromatriz y dicho documento fue exportado en formato .csv (**Figura 16**).

Posteriormente, en el software de trabajo Command Centre™ for Marathon v. 2.1.0.6 (Arrayjet Inc., Reino Unido) se fijó el tipo de placa a utilizar (en este caso de 348 pocillos), la disposición de las muestras dentro de la placa y el tipo de Jet Spyder™ (ArrayJet, Reino Unido), en nuestro caso de 12 inyectores. Debido a que el equipo Nanoinjection printer Marathon ArrayJet con la JetSpyder™ 12 samples (Arrayjet Inc., Reino Unido) necesita la indicación de la organización de las muestras para su deposición ordenada y sin contacto sobre la micromatriz.

A continuación, se asoció el archivo .csv creado anteriormente y se generó un archivo de texto con la disposición espacial de cada una de las muestras dentro de la placa de 348 pocillos.

Preparación del contenido de la micromatriz.

Las muestras contenidas en la micromatriz (anticuerpos, antígenos y controles - positivos/negativos, de ensayo y de generación de la micromatriz -) fueron diluidas en PBS.

Posteriormente, en base al diseño espacial comentado anteriormente, en una placa de 348 pocillos (JetStar™ Microarray-Specific 384-well Microplates, ArrayJet, Reino Unido) se agregó un V_f de 30 μ L que podía contener:

- i) Una ratio 1:1 (v/v) de solución de impresión (47 % -v/v- glicerol)/dilución de muestras, controles o etiquetas.
- ii) Una ratio 1:1 (v/v) de solución de impresión/PBS.
- iii) Reactivo con un contenido en glicerol del 47 % (v/v).

Seguidamente, la placa fue sellada, sometida a centrifugación y almacenada a -20 °C hasta la generación de la micromatriz.

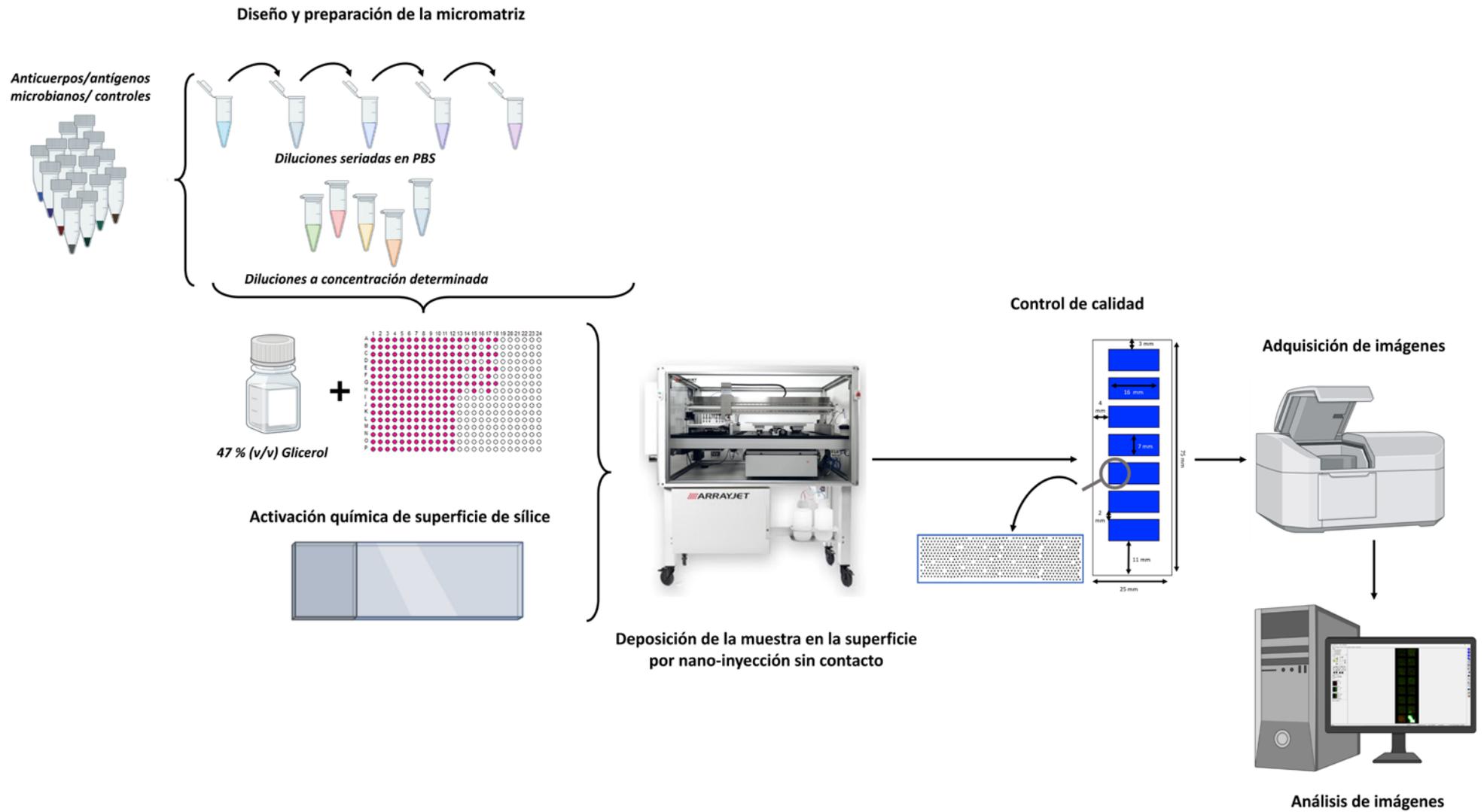


Figura 15: Descripción del flujo de trabajo para la creación y generación de las matrices de anticuerpos y antígenos microbianos

A

GST	TRAP1	p-KDR (Tyr1212)	MDM2	HIF1A	IFNG	TNF	IL6*	CSF1R	IL2*	IL4	GST
Serum	IL6	IL5	IL8	CXCR2	FOS	CSF2	Empty	PECAM1	Biotin	CASP2	Serum
CRADD	GST	ATF4	ATF6	CCN1	FGF13	MAPK1	FLG	NFKBIA	RELA	IGF1R	MDM2
NFATC1	NRG3	BBC3	PIDD1	PDGFRB	PAK1IP1	p-PDGFRB (Tyr857)	p-GAB1 (Tyr627)	p-TYR	p-H3C1 (Ser10)	p-MAPK1	p-STAT3 (Tyr705)
STAT3	SOCS6	HGF	PMAIP1	BCL2	PIM1*	IRF4	MAX	HDAC8	SQSTM1	SOCS3	HLA-DRA*
SERPINC1	SPP1	CD44	CD21	ACTB	CTSK	MCL1	AK1	Ac-H3C1 (Lys9)	Ac-H4-16 (Lys8)	AIFM1	AKT1
p-AKT1 (Ser473)	p-AKT1 Substrate (RXXS*/I*)	BAD	p-BAD (Ser112)	BCL2L1	BID	BAX	HSPA5	BCL2L11	BAK1	CASP3	CASP7
CASP8	CASP9	CANX	MYC	p-MYC (Ser62)	CCND2	GAPDH	p-CDK1	CDK1	p-EIF4EBP1	KIF11	HSF1
DNAJB1	HSPD1	HSPA1A	HSP90AA1	P4HB	MAP2K1	p-MAP2K1 (Ser217/221)	p-MAPK1 (Thr202/Tyr204)	p-RAF1 (Ser 338)	RPS6	p-RPS6 (Ser235/236)	TSC2
PAK1IP1*	p-AKT1S1 (Thr246)	AKT1S1	PIM1	PIM2	PIM3	EIF4EBP1	p-GSK3B	TP53	IKZF1	IKZF1	p-H2AX(Ser139)
p-CHEK1 (Ser345)	p-CHEK2(Thr68)	p-ATM (Ser1981)	p-ATR (Ser428)	p-BRCA1 (Ser1524)	BRCA1	KRAS	PRKAA2	p-PRKAA2 (Thr172)	MCL1	p-TP53 (Ser15)	PARP1
PARP1 (Asp214)	COX4I1	ENO1	CDC25A	HK2	MAD1L1	CCNE1	LDHA	SLC2A1	CDK4	CASP12	ITGA6
BIRC2	CCND1	CCND3	FOS*	JUN1	JUN2	CDKN1B	MAPK11	p-MAPK11 (Thr180/Tyr182)ja	Ac-TP53 (Lys382)	CSF1R	NFKBIB
p-BTK	p-KDR (Tyr1175)	KIT	SP1	p-CTNNB1 (Thr41/Ser45)	TGFB11	BIRC5	RB1	p-RB1 (Ser807/811)	p-KDR (Tyr1212)	E2F1	CEBPA
p-AKT1 (Thr308)	NFKB2	NFKB1	p-MDM2 (Ser116)	NCL	VDAC1	MCL1	CASP2	CXCR4	JUN*	CRBN	TUBA1A
CDKN2A	HLA-DRA	CD4	IL8*	CDKN2A	IL10	IL5*	TUBB	HBA1	BCR	ABL1	SOD2
VIM	MKI67	CYCS	CXCL13	Ig G	HALO	CD19	Biotin 1:10 ¹¹	EIF4EBP1	Ig G Ab	Biotin 1,200	Biotin 1,200
p-BIK	p-KDR (Tyr1175)	IL2	GST	Biotin 1:10 ¹¹	Serum	Biotin 1,200	MM1	MM5	MM6	MM7	MM11
p-CD79A (Tyr182)	p-SRC family (Tyr416)	p-BLNK (Tyr96)	EPHB2	p-BTK	p-CBL (Tyr700)	p-PLCG2 (Tyr759)	p-ZAP70 (Tyr319)/Syk (Tyr352)	p-SYK (Tyr525/526)	LYN	p-CD19 (Tyr531)	p-MAPK11 (Thr180/Tyr182) ⁵ p-TBC1D4 (Thr642)

B

Cy3	MV(N)_0.08	MP_Ant_0.08	CB	CMV_CL_0.01	BB	Cy3	PB_C	CMV_Ant_0.001	AdvH.40(P)_0.001	HCV(Core)_Ant_0.001	Cy3
CMV_CL_0.08	EV.COXB3(VP1)_0.08	BB	EV_Ant_0.08	CMV_Ant_0.01	AdvH.40(H)_0.01	NovGli.1(VLP)_0.01	SPN_Ant_0.01	PV(VP2)_0.001	AdvH.5(H)_0.001	RSV_B_CL_0.001	FLU.H1N1(HA)_0.001
CMV_Ant_0.08	Peroxidasa_IgG	NovGli.1(VLP)_0.08	SPN_Ant_0.08	IgG_0.01	AdvH.40(P)_0.01	NovGli.4(VLP)_0.01	LB.Patoc1_0.01	CAV_Ant_0.001	HSV.1_Ant_0.001	IgG_0.001	HSV.1_CL_0.001
PV(VP2)_0.08	AdvH.40(H)_0.08	NovGli.4(VLP)_0.08	LB.Patoc1_0.08	PV(VP2)_0.01	AdvH.5(H)_0.01	PB	FLU.H1N1(HA)_0.01	HAsIV.1_0.001	HSV2_CL_0.001	FLU.Ohio(NA)_0.001	RV(VP7)_0.001
CAV_Ant_0.08	AdvH.40(P)_0.08	HCV(Core)_Ant_0.08	FLU.H1N1(HA)_0.08	CAV_Ant_0.01	HSV.1_Ant_0.01	HCV(Core)_Ant_0.01	HSV.1_CL_0.01	MV_CL_0.001	RSV(gE_gI)_0.001	RhV.1A_CL_0.001	SARS_Cov2(N)_0.001
PBS	AdvH.5(H)_0.08	AlexaFluor647_IgM	HSV.1_CL_0.08	HAsIV.1_0.01	CB	RV(CL)_0.01	PBS	RV(CL)_0.001	Peroxidasa_IgG	STY(HiE)_0.001	CB
HAsIV.1_0.08	HSV.1_Ant_0.08	RSV_B_CL_0.08	RV(VP7)_0.08	MV_CL_0.01	HSV.2_CL_0.01	FLU.Ohio(NA)_0.01	RV(VP7)_0.01	AlexaFluor647_IgM	hMPV.16_CL_0.001	STY(OMP)_0.001	PBS
MV_CL_0.08	HSV2_CL_0.08	FLU.Ohio(NA)_0.08	PB_C	RV_CL_0.01	VZV(gE_gI)_0.01	RhV.1A_CL_0.01	SARS_Cov2(N)_0.01	MuV_CL_0.001	hMPV.9_CL_0.001	EV_Ant_0.001	SARS_Cov2(RBD)_0.001
RV_CL_0.08	VZV(gE_gI)_0.08	RhV.1A_CL_0.08	SARS_Cov2(N)_0.08	MuV_CL_0.01	hMPV.16_CL_0.01	STY(HiE)_0.01	Cy3_IgG	EBV(gp125)_0.001	MP_Ant_0.001	PB	SARS_Cov2(M)_0.001
MuV_CL_0.08	hMPV.16_CL_0.08	PB	Cy3_IgG	EBV(gp125)_0.01	hMPV.9_CL_0.01	STY(OMP)_0.01	SARS_Cov2(RBD)_0.01	MV(N)_0.001	NovGli.1(VLP)_0.001	SPN_Ant_0.001	BB
EBV(gp125)_0.08	hMPV.9_CL_0.08	STY(HiE)_0.08	SARS_Cov2(RBD)_0.08	MV(N)_0.01	MP_Ant_0.01	EV_Ant_0.01	SARS_Cov2(M)_0.01	EV.COXB3(VP1)_0.001	NovGli.4(VLP)_0.001	LB.Patoc1_0.001	AlexaFluor647_IgM
Peroxidasa_IgG	IgG_0.08	STY(OMP)_0.08	SARS_Cov2(M)_0.08	EV.COXB3(VP1)_0.01	AlexaFluor647_IgM	Peroxidasa_IgG	CMV_CL_0.001	AdvH.40(H)_0.001	PBS	PB_C	Peroxidasa_IgG
CMV_CL_0.0001	RV_CL_0.0001	AdvH.5(H)_0.0001	BB	PB	HSV.1_CL_0.0001	CMV_Ant_0.00001	MuV_CL_0.00001	HSV.1_Ant_0.00001	NovGli.1(VLP)_0.00001	STY(OMP)_0.00001	SARS_Cov2(N)_0.00001
CMV_Ant_0.0001	MuV_CL_0.0001	HSV.1_Ant_0.0001	NovGli.1(VLP)_0.0001	STY(HiE)_0.0001	RV(VP7)_0.0001	IgG_0.00001	EBV(gp125)_0.00001	CB	NovGli.4(VLP)_0.00001	EV_Ant_0.00001	Cy3_IgG
PV(VP2)_0.0001	EBV(gp125)_0.0001	HSV2_CL_0.0001	NovGli.4(VLP)_0.0001	STY(OMP)_0.0001	PB_C	PV(VP2)_0.00001	MV(N)_0.00001	HSV.2_CL_0.00001	PB	SPN_Ant_0.00001	SARS_Cov2(RBD)_0.00001
PBS	MV(N)_0.0001	VZV(gE_gI)_0.0001	HCV(Core)_Ant_0.0001	CB	SARS_Cov2(N)_0.0001	CAV_Ant_0.00001	EV.COXB3(VP1)_0.00001	VZV(gE_gI)_0.00001	HCV(Core)_Ant_0.00001	LB.Patoc1_0.00001	SARS_Cov2(M)_0.00001
CAV_Ant_0.0001	EV.COXB3(VP1)_0.0001	hMPV.16_CL_0.0001	AlexaFluor647_IgM	EV_Ant_0.0001	Cy3_IgG	HAsIV.1_0.00001	BB	hMPV.16_CL_0.00001	RSV_B_CL_0.00001	FLU.H1N1(HA)_0.00001	PB_C
HAsIV.1_0.0001	AlexaFluor647_IgM	hMPV.9_CL_0.0001	RSV_B_CL_0.0001	SPN_Ant_0.0001	SARS_Cov2(RBD)_0.0001	MV_CL_0.00001	AdvH.40(H)_0.00001	hMPV.9_CL_0.00001	FLU.Ohio(NA)_0.00001	HSV.1_CL_0.00001	PBS
MV_CL_0.0001	AdvH.40(H)_0.0001	IgG_0.0001	FLU.Ohio(NA)_0.0001	LB.Patoc1_0.0001	SARS_Cov2(M)_0.0001	RV_CL_0.00001	AdvH.40(P)_0.00001	MP_Ant_0.00001	RhV.1A_CL_0.00001	PBS	PBS
Cy3	AdvH.40(P)_0.0001	MP_Ant_0.0001	RhV.1A_CL_0.0001	FLU.H1N1(HA)_0.0001	CMV_CL_0.00001	Cy3	AdvH.5(H)_0.00001	Cy3_IgG	STY(HiE)_0.00001	RV(VP7)_0.00001	Cy3

*Señalados en colores se encuentran los controles para cada una de las micromatrices.

Figura 16: Diseño y distribución espacial del contenido de las micromatrices. A) Diseño de la micromatriz de anticuerpos. B) Diseño de la micromatriz de antígenos.

Activación química de la superficie de sílice.

La superficie de sílice de los portaobjetos se activó químicamente para permitir la unión de las moléculas a la superficie, mediante enlaces covalentes, de acuerdo al método descrito por González-González y colaboradores¹⁴⁹.

En primer lugar, se seleccionaron los portaobjetos que no presentaban ningún tipo de defecto sobre su superficie y se colocaron en un cestillo de metal.

Posteriormente, se preparó la solución que contenía una ratio 1:50 (v/v) de 3-(2-aminoetilamino)propildimetoximetilsilano (MANAE, Cod.: 06667, Sigma Aldrich, EE.UU.) en acetona (Cod.: : 606-001-00-8, Sigma Aldrich, EE.UU.). Siendo un 2 % (v/v) la concentración final de MANAE.

A continuación, el cestillo con los portaobjetos seleccionados fue sumergido en la solución con 2 % (v/v) de MANAE e incubados durante 30 min en agitación orbital a RT.

Seguidamente, se eliminó la solución y los portaobjetos fueron lavados durante 30 min en agitación orbital a RT con acetona. Inmediatamente después, los portaobjetos fueron lavados 3x con H₂O miliQ durante 15 min en agitación orbital a RT.

Finalmente, los portaobjetos fueron secados con aire comprimido y almacenados en cámara oscura en condiciones de humedad y temperatura controladas.

Preparación del Nanoinjection printer Marathon ArrayJet.

El proceso de deposición sin contacto de la micromatriz se realizó con el Nanoinjection printer Marathon ArrayJet con la JetSpyder™ 12 samples (Arrayjet Inc., Reino Unido). Para ello, el dispositivo es encendido con anterioridad a su uso, con el objetivo de conseguir los niveles de temperatura y humedad adecuados (20 - 22 °C y 50 – 60 % humedad relativa).

Una vez se obtuvieron los niveles de temperatura y humedad apropiados, se procedió con el proceso de mantenimiento del equipo y la revisión del sistema de nano-inyección.

Tras la verificación del equipo, los portaobjetos con la superficie activada y la placa de 348 pocillos fueron incluidos en los soportes correspondientes del mismo.

Deposición de las muestras sobre la superficie activada.

En el software de trabajo Command Centre™ for Marathon v. 2.1.0.6 (Arrayjet Inc., Reino Unido) se fijó el tipo de placa a utilizar (en este caso de 348 pocillos), número de muestras por placa, la disposición de las mismas, el tipo de JetSpyder™ (Arrayjet Inc., Reino Unido), en nuestro caso de 12 inyectores, y el número de portaobjetos en los que queremos incluir la micromatriz.

A continuación, fue establecido el número de submatrices que conforman la micromatriz, sus medidas y la distancia entre cada una de ellas y los bordes del portaobjetos.

Seguidamente, se fijaron las características de cada uno de los puntos de unión de la muestra (a partir de este momento denominados *spots*): número de réplicas, número de gotas por *spot*, distancia entre *spots* y disposición/diseño de impresión.

Posteriormente, se seleccionó la carpeta en la que guardar toda la información relativa al proceso de impresión y la micromatriz de análisis en formato .gal.

Finalmente, se procedió al inicio del proceso de deposición de las muestras sin contacto sobre la superficie activada químicamente de los portaobjetos con el Nanoinjection printer Marathon ArrayJet con la JetSpyder™ 12 samples (Arrayjet Inc., Reino Unido).

Al finalizar el proceso de generación de las micromatrices, los portaobjetos se rotularon y almacenaron en un cestillo de metal para llevar a cabo un proceso de secado en dos fases; permitiendo la unión adecuada de las moléculas a la superficie. El proceso de secado consistió en un:

- i) Incubación durante 2 días en cámara oscura a RT con humedad relativa controlada.
- ii) Incubación durante 10 días en cámara oscura a 37 °C con humedad relativa controlada.

Por último, las micromatrices fueron guardadas a RT en cámara oscura con humedad controlada hasta el inicio de los ensayos.

Control de calidad y adquisición/procesamiento de imágenes.

Tras la finalización del proceso de generación de las micromatrices, se llevaron a cabo dos puntos de verificación en base a la metodología publicada por Juanes-Velasco y colaboradores¹⁴⁸.

1. Control de calidad del proceso de deposición.

Esta información se obtuvo tras finalizar el proceso de deposición de las muestras sobre la superficie del portaobjetos y fue aportada por el propio software de trabajo (Command Centre™ for Marathon v. 2.1.0.6 -Arrayjet Inc., Reino Unido-).

Los criterios de selección para considerar que el proceso de deposición de las muestras era correcto fue el siguiente:

- i) A nivel global, el proceso de deposición se consideró válido cuando el % máximo de pérdida de spots era del 5 %.
- ii) A nivel de cada micromatriz, el % máximo tanto de defectos (por ejemplo, tamaño o forma irregular del *spot*, localización inadecuada, etc.) como de pérdida de *spots* eran del 5 %.

2. Control de calidad de la disposición de la micromatriz.

A posteriori del proceso de secado de las micromatrices, se llevó a cabo una selección aleatoria de varias de ellas, pertenecientes al mismo proceso de impresión.

Tras la selección, dichas micromatrices fueron escaneadas con el SensoSpot® Fluorescence Mircoarray (Miltenyi Biotec, Alemania) a una λ de 532 nm y de 635 nm.

Seguidamente, el archivo .tif obtenido con el escáner fue analizado con el software de análisis de imágenes GenePix Pro v. 6.0 (Axon Instrument, EE.UU.). Comprobando de forma visual la morfología de los spots, la disposición del diseño de la micromatriz y su correlación con el archivo de análisis tipo .gal.

6.2.2 Determinación multiplex de complejos proteicos.

A continuación, se describe la metodología SEC-MAP empleada para la determinación multiplex de interacciones proteína-proteína, identificación de complejos proteicos y localización subcelular de los mismo. Además,

detallan los pasos seguidos para la realización del ensayo SEC-MAP y cuyo flujo de trabajo se encuentra recogido en la **Figura 17**.

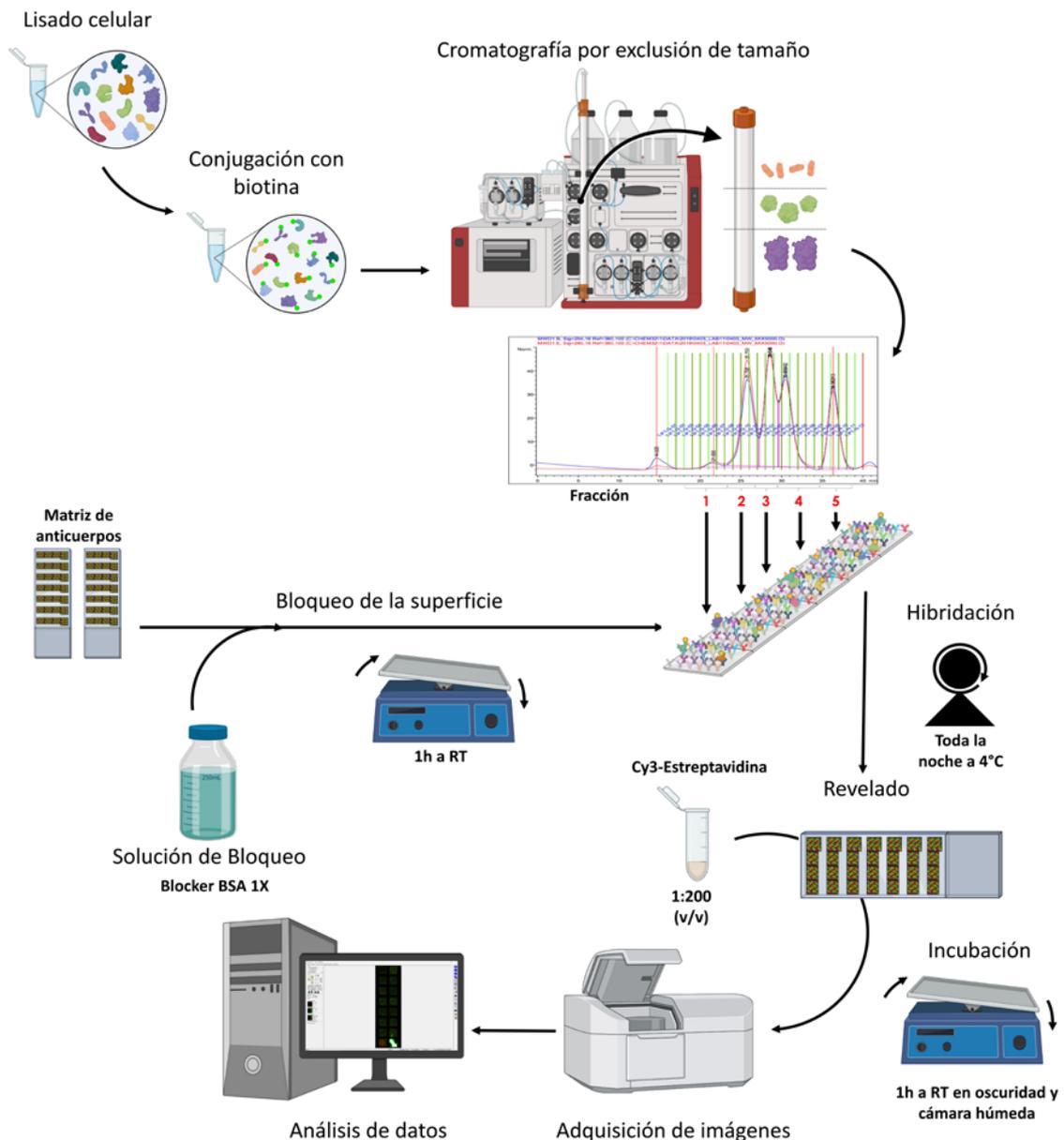


Figura 17: Flujo de trabajo de la determinación multiplex de complejos proteicos.

Diseño de la micromatriz SEC-MAP.

Cada micromatriz se distribuía en 7 submatrices idénticas. Cada una de ellas con 5 réplicas técnicas de 205 Abs (dirigidos frente a 162 proteínas) y un total de 16 controles (7 positivos y 9 negativos) (**Tabla 10**). La información detallada de dichos Abs se encuentra recogida en la **Tabla suplementaria 3** (Corresponde con la [Tabla S2](#) del anexo IV).

Etiquetado y reducción de la complejidad de los extractos proteicos.

Todos los extractos proteicos obtenidos de acuerdo a los protocolos #1 y #4-#9 (véase sección 3 de M&M) se conjugaron con biotina (como agente de marcaje) y posteriormente fueron separados por peso molecular (PM) mediante cromatografía por exclusión de tamaño (SEC).

Para la obtención de los datos sobre interacción proteína-proteína y localización subcelular, fue necesario llevar a cabo un proceso de etiquetado de los lisados con biotina (NHS-PEG4-biotin; Cod.: 21363, ThermoFisher Scientific, EE.UU.) y una separación macromolecular mediante cromatografía por exclusión de tamaño (SEC).

1. Conjugación/ Etiquetado con Biotina.

75 µg de proteína extraída con los protocolos #1 y #4-#9 fueron incubados durante 2 h a 4 °C con 10 µg/µL de biotina (NHS-PEG4-biotin; Cod.: 21363, ThermoFisher Scientific, EE.UU.) (Protocolo A), mientras que, en paralelo, se llevó a cabo el mismo protocolo, solo que en este caso el etiquetado se llevó a cabo con 1 µg/µL de biotina (Protocolo B). Ambos procesos se realizaron de acuerdo a las descripciones realizadas previamente por Häggmark y colaboradores¹⁵⁰, junto con las optimizaciones realizadas posteriormente por Sierra-Sánchez y colaboradores¹⁵¹.

La reacción de conjugación se detuvo mediante la adición de 4,5 µL de 0,5 M Tris/HCL pH 8 para el protocolo A y con el 50 % del volumen de la solución de etiquetado de la solución 0,5 M Tris/HCL pH 8 para el protocolo B.

Posteriormente, el exceso de biotina se eliminó mediante centrifugación en columnas Amicon® Ultra-0.5 centrifugal filter 3K (Millipore-Merk, Alemania) y seguidamente, los extractos proteicos conjugados fueron llevados hasta un V_f de 110 µL con PBS.

Finalmente, se obtuvieron los lisados proteicos biotinilados a una concentración final de 0,68 µg/µL.

2. Cromatografía por exclusión de tamaño.

La separación por exclusión de tamaño molecular se realizó empleando un equipo Agilent HPLC serie 1100 (Agilent Technologies, EE.UU.) con una columna Superdex® 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare, Sigma-Aldrich, EE.UU.-); siendo la fase móvil una solución de PBST y con un flujo de 0,5 mL/min.

Inicialmente se realizó una recta de calibrado con 5 proteínas, con concentración y PM conocidos, como patrón (Ferritina -440 kDa -, Aldolasa – 158 kDa -, Conalbúmina -75 kDa -, Ovoalbúmina – 43 kDa - y Ribonucleasa A – 13,7 kDa -). De cada una de ellas se emplearon 75 µg en un V_f de inyección de 100 µL, los cuales fueron recogidos finalmente en un total de 24 alícuotas en placas de 96 pocillos.

Posteriormente, en estas mismas condiciones se llevó a cabo la separación por PM de los distintos extractos proteicos conjugados con biotina.

Los perfiles de separación por PM se encuentran recogidos en la **figura suplementaria 1**.

Tabla 10: Proteínas diana del estudio SEC-MAP.

Gen ID	Diana	Gen ID	Diana	Gen ID	Diana	Gen ID	Diana
EIF4EBP1	EIF4EBP1	BCR	BCR	CD79A	p-CD79A (Tyr182)	FGF13	FGF13
	p-EIF4EBP1	BID	BID	CDK1	CDK1	FLG	FLG
ABL1	ABL1	BIK	p-BIK		p-CDK1	FOS	FOS
ACTB	ACTB	BCL2L11	BCL2L11	CDC25A	CDC25A	FOS	FOS*
AIFM1	AIFM1	HSPA5	HSPA5	CDK4	CDK4		GAB1
IKZF1	IKZF1	CXCL13	CXCL13	CHEK1	p-CHEK1 (Ser345)	GAPDH	GAPDH
AK1	AK1	BLNK	p-BLNK (Tyr96)	CHEK2	p-CHEK2(Thr68)	SLC2A1	SLC2A1
AKT1	AKT1	BRCA1	BRCA1	CYCS	CYCS	CSF2	CSF2
	p-AKT1 (Ser473)		p-BRCA1 (Ser1524)	COX4I1	COX4I1	GSK3B	p-GSK3B
	p-AKT1 Sustrato (RXXS/T)	BTK	p-BTK	RAF1	p-RAF1 (Ser 338)	H2AX	p-H2AX(Ser139)
	p-AKT1 (Thr308)		p-BTK	CRBN	CRBN	CD44	CD44
PRKAA2	PRKAA2	CANX	CANX	CSF1R	CSF1R	HDAC6	HDAC6
	p-PRKAA2 (Thr172)	CASP12	CASP12	CXCR2	CXCR2	HBA1	HBA1
TBC1D4	p-TBC1D4 (Thr642)	CASP2	CASP2	CXCR4	CXCR4	HK2	HK2
ATF4	ATF4	CASP2	CASP2	CCNB1	CCNB1	HGF	HGF
ATF6	ATF6	CASP3	CASP3	CCND1	CCND1	HIF1A	HIF1A
SERPINC1	SERPINC1	CASP7	CASP7	CCND2	CCND2	HIST1H3A	ac-H3C1 (Lys9)
ATM	p-ATM (Ser1981)	CASP8	CASP8	CCND3	CCND3		p-H3C1 (Ser10)
ATR	p-ATR (Ser428)	CASP9	CASP9	CCNE1	CCNE1	HIST1H4A	ac-H4-16 (Lys8)
CTNNB1	p-CTNNB1 (Thr41/Ser45)	CTSK	CTSK	E2F1	E2F1	HLADRA	HLA-DRA
BAD	BAD	CBL	p-CBL (Tyr700)	CEBPA	CEBPA	HLADRA	HLA-DRA*
	p-BAD (Ser112)	CD19	p-CD19 (Tyr531)	KIF11	KIF11		HSF1
BAK1	BAK1		CD19	ENO1	ENO1	DNAJB1	DNAJB1
BAX	BAX	CD21	CD21	MAPK1	p-MAPK1	HSPD1	HSPD1
BCL2	BCL2	PECAM1	PECAM1		p-MAPK1 (Thr202/Tyr204)	HSPA1A	HSPA1A
BCL2L1	BCL2L1	CD4	CD4		MAPK1	HSP90AA1	HSP90AA1

Continuación Tabla 10: *Proteínas diana del estudio SEC-MAP.*

Gen ID	Diana	Gen ID	Diana	Gen ID	Diana	Gen ID	Diana
BIRC2	BIRC2	MAD1L1	MAD1L1	MAPK11	p-MAPK11 (Thr180/Tyr182) ^a	RPS6	RPS6
IFNG	IFNG	MAX	MAX		p-MAPK11 (Thr180/Tyr182) ^b	SOCS3	SOCS3
IGF1R	IGF1R		MCL1	EPHB2	EPHB2	SOCS6	SOCS6
NFKBIB	NFKBIB	MCL1	MCL1*		ac-TP53 (Lys382)	SOD2	SOD2
IKZF1	IKZF1		MCL1	TP53	TP53	SQSTM1	SQSTM1
NFKBIA	NFKBIA		p-MDM2 (Ser116)		p-TP53 (Ser15)	SRC	p-SRC family (Tyr416)
IL10	IL10	MDM2	MDM2	PARP1	PARP1 (Asp214)	STAT3	p-STAT3 (Tyr705)
IL2	IL2		MDM2		PARP1		STAT3
	IL2*		MAP2K1	PDGFRB	PDGFRB	BIRC5	BIRC5
IL4	IL4	MAP2K1	p-MAP2K1 (Ser217/221)		p-PDGFRB (Tyr857)	SYK	p-SYK (Tyr525/526)
IL5	IL5		MYC	P4HB	P4HB	TGFB111	TGFB111
	IL5*	MYC	p-MYC (Ser62)	PIDD1	PIDD1	TNF	TNF
IL6	IL6	NFATC1	NFATC1	PIM1	PIM1	TRAP1	TRAP1
	IL6*	NRG3	NRG3		PIM1*	TSC2	TSC2
IL8	IL8	RELA	RELA	PIM2	PIM2	TUBA1A	TUBA1A
	IL8*	NFKB1	NFKB1	PIM3	PIM3	TUBB	TUBB
ITGA6	ITGA6	NFKB2	NFKB2	PLCG2	p-PLCG2 (Tyr759)	TYR	p-TYR
IRF4	IRF4	PMAIP1	PMAIP1		p-AKT1S1 (Thr246)	VDAC1	VDAC1
	JUN*	NCL	NCL	AKT1S1	AKT1S1		p-KDR (Tyr1175)
JUN	JUN ¹	SPP1	SPP1		SPI1	KDR	p-KDR (Tyr1212)
	JUN ²		CDKN2A	BBC3	BBC3		p-KDR (Tyr1175)
MKI67	MKI67	CDKN2A	CDKN2A	CRADD	CRADD		p-KDR (Tyr1212)
KIT	KIT		PAK1IP1	KRAS	KRAS	ZAP70	p-ZAP70 (Tyr319)/Syk (Tyr352)
LDHA	LDHA	PAK1IP1	PAK1IP1*		p-RB1 (Ser807/811)	VIM	VIM
LYN	LYN	CDKN1B	CDKN1B	RB1	RB1		
CSF1R	CSF1R	MAPK11	MAPK11	RPS6	p-RPS6 (Ser235/236)		

* Anticuerpo frente a la misma proteína procedente de diferente clon. ^a Anticuerpo monoclonal (mAb). ^b Anticuerpo policlonal (pAb). ^c Ratón. ^d Conejo. p-: Fosfo. ac-: Acetil

Detección multiplex de complejos proteicos en formato micromatriz.

Las 24 fracciones obtenidas por SEC fueron agrupadas en 5 fracciones para el análisis de rendimiento del etiquetado proteico (protocolo #1) y en 8 fracciones para el estudio proteómico MAP (microarray de proteínas) (protocolos #1 y #4-#9) (**Tabla 11**).

Tabla 11: Fracciones y rangos de Peso molecular (PM) establecidos para los diferentes ensayos.

Fracción	Rango de PM (kDa)	
	Etiquetado	MAP
1	265-1413	166-473
2	102-209	121-142
3	50-80	74-103
4	24-39	54-63
5	6-19	33-46
6	-	24-28
7	-	17-21
8	-	11-15

Cada rango de PM se filtró con columnas Amicon® Ultra de 3K (Millipore-Merk, Alemania) y fue llevado hasta un V_f de 100 μ L con PBS a 4 °C. Cada fracción de rango de PM fue almacenada a -20 °C hasta su posterior análisis.

1. Acondicionamiento de los extractos proteicos (fracciones de PM) y bloqueo de la superficie de la micromatriz de anticuerpos.

Todas las fracciones proteicas, en los distintos rangos de PM, fueron sometidas a un proceso de desnaturalización por choque térmico con el objetivo de detectar la aparición de epítopos (*epitope retrieval*). Para ello, un 50 % del volumen de cada una de las fracciones de rango de PM se incubó durante 30 min a 56 °C y seguidamente, durante 1 min a 20 °C. Posteriormente, dicho volumen se incorporó a su correspondiente alícuota.

De forma paralela al acondicionamiento de las fracciones de PM, se realizó el bloqueo de la superficie de la micromatriz de anticuerpos para evitar adsorciones inespecíficas. Para ello, las micromatrices fueron incubadas durante 1 h a RT y en agitación suave con una solución de bloqueo Blocker™ BSA 1X (Cod.: 37525, ThermoFisher Scientific, EE.UU.). Finalmente, se llevaron a cabo varios lavados con agua destilada.

2. Hibridación.

Cada una de las 5 u 8 fracciones de PM del SEC se incubaron en su submatriz correspondiente a 4 °C en agitación orbital y ON.

3. Revelado.

Transcurrido el tiempo de incubación, se llevaron a cabo 3x lavados de 5 min a RT en agitación fuerte con PBS con 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBST).

Seguidamente, se agregaron 200 μL /micromatriz de 1:200 (v/v) Cy3 conjugada con estreptavidina (Cy3 Mono-Reactive CyDye, Cod.: PA23001, GE Healthcare, EE.UU.) en solución de bloqueo Blocker™ BSA 1X (Cod.: 37525, ThermoFisher Scientific, EE.UU.) y se incubó durante 1 h a RT en oscuridad y cámara húmeda.

4. Lavado y secado de las micromatrices.

Posteriormente, la micromatriz fue lavada con PBST, en agitación fuerte durante 5 min a RT, y a continuación, se realizaron lavados con agua destilada (3x) de 5 min en agitación fuerte a RT.

Finalmente, las matrices fueron secadas mediante proceso de centrifugación durante 3 min a 1200 rpm y RT.

Adquisición de imágenes y análisis de datos.

Las imágenes de las micromatrices fueron obtenidas usando el escáner SensoSpot® Fluorescence Microarray (Miltenyi Biotec, Alemania) a una λ 532 nm para la etiqueta Cy3 (canal de fluorescencia verde) y exportadas en formato .tiff.

Dichas imágenes fueron procesadas y analizadas usando el software GenePix Pro v. 6.0 (Axon Instrument, EE.UU.), de acuerdo al archivo tipo .gal correspondiente, el cual contiene la disposición de la micromatriz.

6.2.3 Determinación del perfil de autoanticuerpos.

En esta sección se detallan los pasos seguidos para la realización del ensayo de detección de autoanticuerpos frente a autoantígenos (aAgs). El flujo de trabajo se encuentra descrito en la **Figura 18**.

Diseño de la micromatriz de autoantígenos.

Se ha empleado una micromatriz comercial *OmicsArray™ Antigen Microarray* (Cod.: PA003, GeneCopoeia™ Expressway to Discovery, EE.UU.).

Esta micromatriz de aAgs consta de 16 submatrices; cada una con 122 aAgs por duplicado junto a 4 controles positivos (**Tabla 12**). La información pormenorizada de aAgs se encuentra recogida en la **Tabla suplementaria 4** (Corresponde con la [Tabla S1](#) del anexo VI).

Detección del perfil serológico de autoanticuerpos.

1. Preparación de las muestras.

Se preparó una solución de digestión (eliminar el ADN presente en la muestra) en agua DEPC (libre de nucleasas - Cod.: AM9922, Invitrogen™, EE.UU.) que contenía 1 unidad de DNasa I (Cod.: #M0303S, New England BioLabs Inc, EE. UU.), 1 % solución tampón de DNasa I (Cod.: #B0303S, New England BioLabs Inc, EE. UU.) y 10 mM de DTT (Cod.: 10708984001, Roche, Suiza).

Seguidamente, se prepararon diluciones 1:10 (v/v) de las muestras de suero en solución de digestión. Como control negativo en el perfil serológico de autoanticuerpos se ha utilizado dicha solución de digestión.

A continuación, las diluciones de las muestras y el control negativo fueron incubados durante 30 min en agitación suave y RT.

1. Bloqueo de la superficie de la micromatriz de autoantígenos.

El bloqueo de la superficie de la micromatriz de autoantígenos, para evitar adsorciones inespecíficas, se realizó mediante la incubación de 100 μ L/submatriz de solución de bloqueo (PBST y 5 % -p/v-BSA) durante 30 min a RT en agitación.

Posteriormente, se realizaron 2x lavados con PBST durante 5 min a RT en agitación suave.

2. Hibridación.

Se realizó una segunda dilución 1:10 (v/v) de la anterior para todas las muestras/control negativo en PBST. De forma que 100 μ L/submatriz de esta dilución final 1:100 (v/v) fue incubada durante 1 h a RT y en agitación.

Seguidamente, las micromatrices fueron lavadas 3x. El 1º y 3º lavado fueron realizados con PBST y el 2º con la solución de bloqueo.

3. Revelado.

100 μ L/subarray de dilución 1:1000 (v/v) C_F de anticuerpos secundarios monoclonales anti-Ig G humana, desarrollado en ratón, conjugado con Cy3 (Cod.: 709-165-149, Jackson ImmunoResearch, Reino Unido) y anti-Ig M humana, desarrollado en cabra, conjugado con Alexa Fluor (Cod.: 109-605-043, Jackson ImmunoResearch, Reino Unido) en PBST fueron incubados durante 1 h a RT en agitación.

4. Lavado y secado de las micromatrices.

Se hicieron lavados (7x) en agitación durante 5 min a RT. Los 3 primeros fueron con PBST, los 2 siguientes con PBS y los 2 últimos con agua DEPC.

Por último, las micromatrices fueron secadas a 1100 rpm durante 3 min.

Adquisición de imágenes y análisis de datos.

Las micromatrices fueron escaneadas con el equipo GenePix® 4000B Microarray Scanner (Axon, EE. UU.) a una λ 532 nm para Cy3 (canal de fluorescencia verde) y de 635 nm para Alexa Fluor 647 (canal de fluorescencia roja) y exportadas en formato .tiff.

Dichas imágenes fueron procesadas y analizadas usando el software GenePix Pro v. 6.0 (Axon Instrument, EE.UU.), de acuerdo al archivo tipo .gal correspondiente, el cual contiene la disposición de la micromatriz.

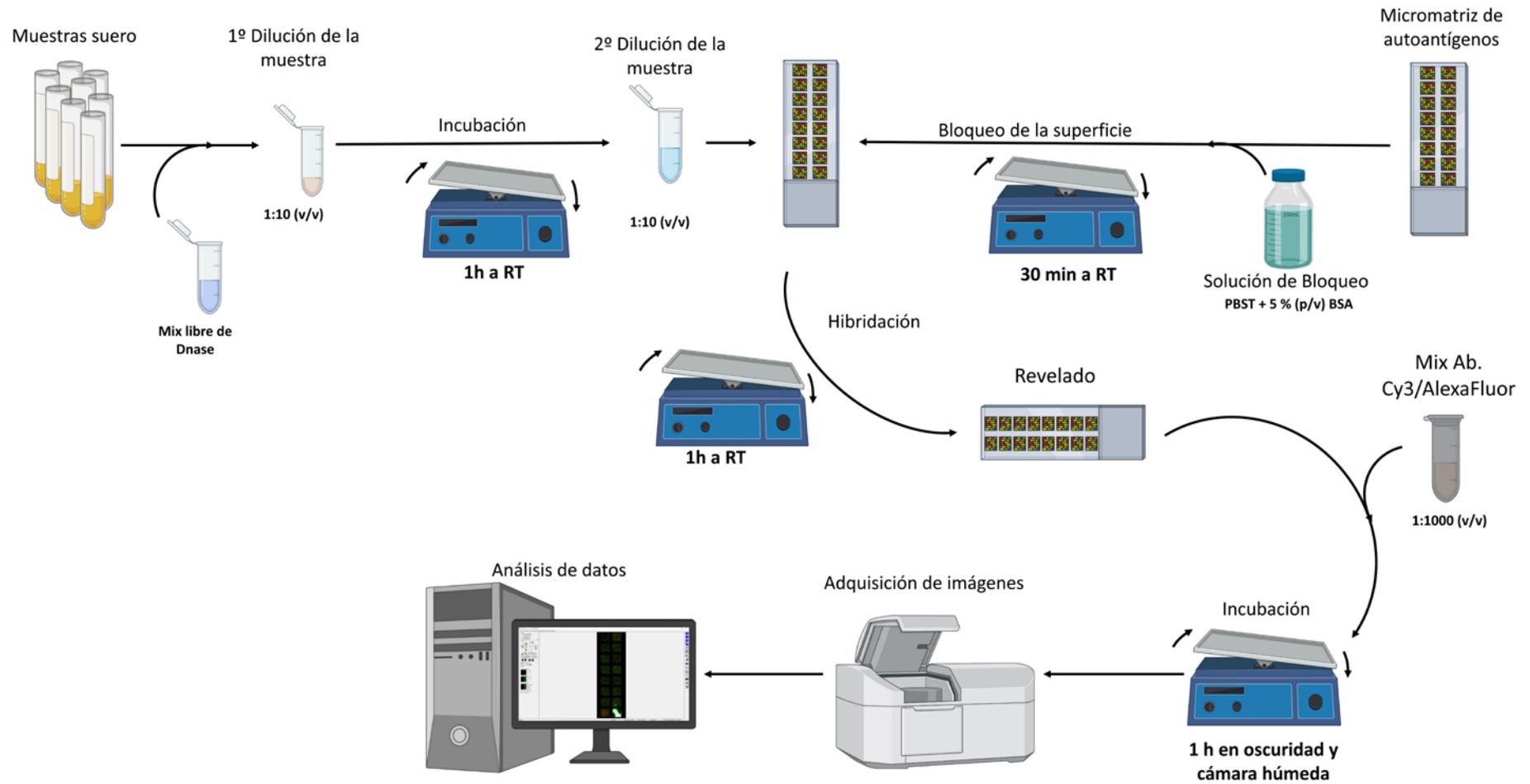


Figura 18: Flujo de trabajo correspondiente a la determinación del perfil serológico de autoanticuerpos.

Tabla 12: Autoantígenos presentes en la micromatriz.

Nombre de la proteína	Símbolo	Nombre de la proteína	Símbolo
72 kDa type IV collagenase	MMP-2	C-X-C motif chemokine 10	CXCL10
Aldolase (muscle)	ALDOA	Cyclin-dependent kinase 2	CDK2
Alpha-2-macroglobulin-like 1	A2ML1	Cytokeratin 19 Ag	K1C19
Alpha-fetoprotein	AFP	Cytotoxic T-lymphocyte protein 4	CTLA4
alpha-fodrin	SPTAN1	dsDNA	dsDNA
Angiotensin II type 1 Receptor	AGTR1	Dynein axonemal light chain 1	LC1
Annexin A1	ANXA1	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21	Ro-SSA (52+60)
Antígeno carbohidratado 125 (Mucin-16)	CA125	Elastase	ELNE
Antígeno carbohidratado 242	CA242	ELAV-like protein 4	HuD/ELAVL4
Antígeno carbohidratado 27-29	CA27-29	Endoplasmic reticulum resident protein 29	ERP29
Antígeno carbohidratado 50	CA50	Endothelial Cell Extract	Endothelial Cell Extract
Antígeno carbohidratado 72-4	CA72-4	Enolase	ENOB
Antígeno carbohidrato 15-3 (Mucin-1)	CA15-3	Eotaxin	CCL11
Antígeno carbohidrato 19-9/ antígeno sializado de Lewis	CA19-9	Epidermal growth factor receptor	EGFR
Apolipoprotein B/E	APOB	Epstein-Barr nuclear antigen 1	EBNA1
Azurocidin	CAP7	Ferritin	FTMT
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	PGBM	Fructose-bisphosphate aldolase C	ALDOC
beta-glucuronidase	BGLR	Galactocerebroside	GALC
Breast cancer type 1/2 susceptibility protein	BRCA2/BRCA1	Gamma-enolase	ENOG
Calmodulin (brain)	PCP4	Glioblastoma multiforme	GBM
Calreticulin(rabbit calreticulin)	CALR	Glutamate decarboxylase-65/GAD2	DCE2
Cancer/testis antigen 1	NY-ESO-1	Guanine nucleotide-binding protein G(olf) subunit alpha	GNAL
Carbonic Anhydrase 6	CA6	Hepatitis B antigen	HBsAg
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	CEA	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain	CD74
Catalase	CATA	HPV-11 E1	HPV-11 E1
Cathepsin G	CATG	HPV-11 E2 (aa 1-367)	HPV-11 E2
C-C motif chemokine 2	CCL2	HPV-11 E4 (aa 1-108)	HPV-11 E4
C-C motif chemokine 3	CCL3	HPV-11 E5B (aa 1-74)	HPV-11 E5B
C-C motif chemokine 5	CCL5	HPV-11 E6 (aa 1-150)	HPV-11 E6
Cellular tumor antigen p53	P53	HPV-11 E7 (aa 1-98)	HPV-11 E7
Cholinergic Receptor Muscarinic 3	CHRM3	HPV-16 E6	HPV-16 E6
CMV native protein	CMV	HPV-16 E7	HPV-16 E7

Continuación de la Tabla 12: Autoantígenos presentes en la micromatriz.

Nombre de la proteína	Símbolo	Nombre de la proteína	Símbolo
HPV-18 E7	HPV-18 E7	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX53	DDX53
HPV-6 E2	HPV-6 E2	Programmed cell death 1 ligand 1	PD-L1
HPV-6 E6	HPV-6 E6	Programmed cell death protein 1	PD-1
HPV-6 E7	HPV-6 E7	Proline-rich acidic protein 1	uPA
HPV-6 L1	HPV-6 L1	Prostate Specific Antigen	PSA
HPV-6 L2	HPV-6 L2	Prostate Specific Membrane Antigen	PSMA
HPV-6a E4 (aa 1-99)	HPV-6a E4	Prostatic Acid Phosphatase	PPAP
Integral membrane protein 2B	ITM2B	Proteasome subunit alpha type-3	PSMA
Interferon alpha-2	IFN-a	Putative ATP-dependent RNA helicase TDRD12	GBU4-5/TDRD-12
Interferon beta/alpha	IFN-b/IFN-a2	Pyruvate kinase PKM	KPYM
Interleukin-1 alpha/beta	IL-1a/IL-1b	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2	ERBB2
Interleukin-12	IL-12 (p70)	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3/4	ErbB3 + ErbB4
Interleukin-17A	IL-17A	Ribo_PO.P1.P2 mix	RLA0/1/2
Interleukin-2	IL-2	RNA-binding region-containing protein 3	Sm/RNP
Interleukin-6	IL-6	Salivary Gland Protein 1	SP1
Interleukin-8	IL-8	Serpin B3	SCCA
Lactoferrin	TRFL	Sphingomyelin	ASM
Lysosomal Associated Protein 2	LAMP-2	Thrombopoietin	TPO
Melanoma-associated antigen 3	MAGEA3	Thyroglobulin	THYG
Melanoma-associated antigen 4	MAGA4	Tissue alpha-L-fucosidase	FUCO
Myc proto-oncogene protein	MYC	Tissue Transglutaminase	TTG
Myelin basic protein	MBP	Transcription factor SOX-2	SOX2
Myelin-associated glycoprotein	MAG	Transforming growth factor beta-1 proprotein	TGF-b1
Neuropilin-1	VEGF-165	Troponin I	TNNI3
Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha 3	AChR3	Troponin I-T-C ternary complex mixture	TNNI3/TNNT2/TNNC2
Nucleosome assembly protein 1-like 3/like 4	NP1L3/NP1L4	Tumor necrosis factor alpha/beta	TNF-a/TNF-b
Parotid Secretory Protein	PSP	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 12	TWEAK (CD255)
Peptidyl Arginine Deiminases 1&2&3&4	PADI1/2/3/4	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 13B	BAFF
Phosphatidyl-l-serine	PISD	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 4	Ox40L

6.2.4 Determinación del perfil de estimulación antigénica persistente.

Aquí se detallan todos los aspectos concretos y los procesos seguidos para la realización del ensayo de detección de anticuerpos frente a los patógenos y agentes microbianos más comunes y recurrentes a nivel nacional y europeo. El flujo de trabajo se encuentra descrito en la **Figura 19**.

Diseño de la micromatriz de antígenos microbianos.

La distribución espacial de la micromatriz se disponía en 7 submatrices idénticas. Cada una de ellas contenían triplicados técnicos de 5 diluciones seriadas de 37 antígenos microbianos (mAg) y 10 controles (5 positivos y 5 negativos) (**Tabla 13**).

Las diluciones seriadas abarcaban un rango de concentración de Ag entre 0,08 a $1 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Los controles (ya fueran positivos o negativos) presentaban una única dilución a una concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La información detallada de los mAgs utilizados se encuentra recogido en la **tabla suplementaria 5** (Corresponde con la [Tabla S2](#) del anexo VI).

Detección del perfil serológico de anticuerpos frente a antígenos microbianos.

1. Preparación de las muestras.

Las muestras de suero fueron diluidas 1:10 (v/v) en Blocker™ BSA 1X (Cod.: 37525, ThermoFisher, EE.UU.).

Como control negativo en el perfil serológico de anticuerpos frente a antígenos microbianos fue utilizada una dilución 1:10 (v/v) de PBS en Blocker™ BSA 1X (Cod.: 37525, ThermoFisher, EE.UU.).

2. Bloqueo de la superficie de la micromatriz de antígenos microbianos.

La superficie de la micromatriz fue bloqueada con 6 mL/micromatriz de solución de bloqueo Blocker™ BSA 1X (Cod.: 37525, ThermoFisher, EE.UU.) durante 1 h en agitación y RT.

Seguidamente, se realizaron lavados (3x) de 5 min a RT en agitación con agua destilada.

3. Hibridación.

100 μL /submatriz del control negativo/muestras diluidas fueron incubadas ON a 4 °C en agitación orbital.

Posteriormente, las micromatrices fueron lavados 3x con PBST durante 5 min en agitación a RT.

4. Revelado.

La misma metodología comentada en la sección 6.2.3 de M&M para el revelado fue llevada a cabo.

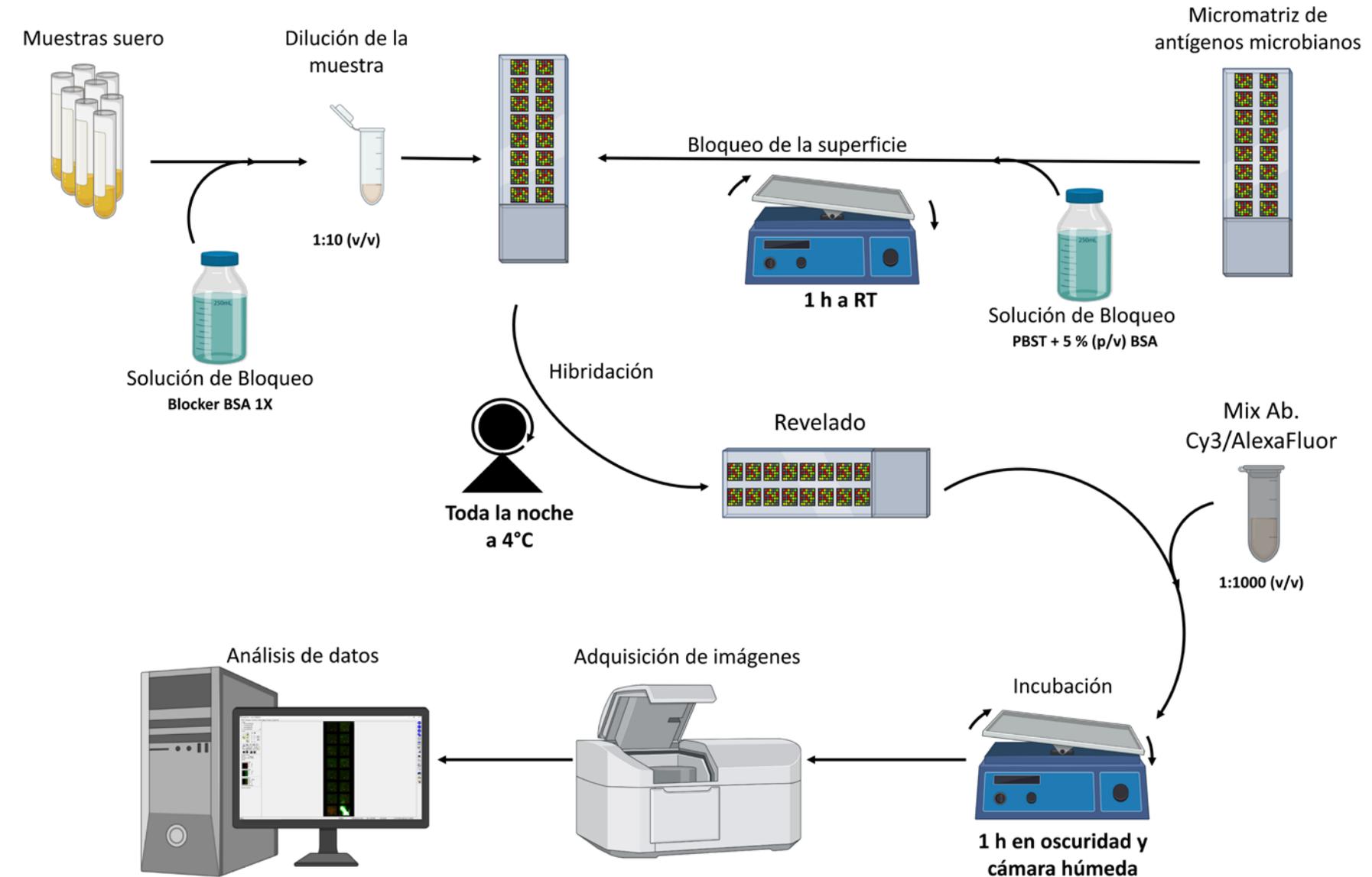


Figura 19: Flujo de trabajo correspondiente a la determinación del perfil de estimulación antigénica persistente

Tabla 13: Patógenos y agentes microbianos (mAg) presentes en la micromatriz.

Microorganismo	Antígeno	Símbolo del mAg
Adenovirus [Type]40	Adenovirus Type 40 Hexon Protein	AdvH.40(H)
	Adenovirus Type 40 Particles, Group F	AdvH.40(P)
Adenovirus [Type]5	Adenovirus Type 5 Hexon Protein	AdvH.5(H)
Astrovirus	Astrovirus Antigen (Type 1)	HASV.1
<i>Candida albicans</i>	Candida Albicans Antigen	CAV_Ant
Cytomegalovirus	Cytomegalovirus Cell Lysate Antigen	CMV_CL
	Cytomegalovirus Purified Antigen	CMV_Ant
Echovirus	Echovirus Antigen, Recombinant	EV_Ant
Enterovirus	Enterovirus CoxB3 VP1 Protein	EV.COXB3(VP1)
Epstein-Barr	Epstein Barr Virus gp125, Human Fc	EBV(gp125)
Hepatitis C Virus	Hepatitis C Virus Core Antigen (HCcAg)	HCV(Core)_Ant
Herpes simplex Virus 1	Herpes Simplex Virus 1 Antigen	HSV.1_Ant
	Herpes Simplex Virus 1 Lysate Antigen	HSV.1_CL
Herpes simplex Virus 2	Herpes Simplex Virus 2 Lysate Antigen	HSV.2_CL
Human Metapneumovirus	Human Metapneumovirus (hMPV) 16 Type A1 Lysate	hMPV.16_CL
	Human Metapneumovirus (hMPV) 9 Type A1 Lysate	hMPV.9_CL
Influenza A	Influenza A [A/Ohio/2017] Neuraminidase (NA), His-Tag,	FLU.Ohio(NA)
	Influenza A [A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)] Hemagglutinin (HA), His-Tag	FLU.H1N1(HA)
Leptospira biflexa	Leptospira Biflexa Antigen (Strain Patoc 1)	LB.Patoc1
Measles Virus	Measles Virus Lysate	MV_CL
Measles Virus	Measles Virus Nucleoprotein (HEK293)	MV(N)
Mumps Virus	Mumps Virus Lysate	MuV_CL
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Mycoplasma Pneumoniae Antigen	MP_Ant
Norovirus GI.1	Norovirus GI.1 VLP	NoVGi.1(VLP)
Norovirus GII.4	Norovirus GII.4 VLP	NoVGii.4(VLP)
Parvovirus	Parvovirus VP2 Recombinant Protein	PV(VP2)
Respiratory Syncytial Virus B	Respiratory Syncytial Virus B Lysate	RSV.B_CL
Rhinovirus [Type] 1A	Rhinovirus Type 1A Lysate	RhiV.1A_CL
Rotavirus	Rotavirus VP7 Protein, Sheep Fc-Tag	RV(VP7)
Rubella Virus	Rubella Virus Lysate	RV_CL
<i>Salmonella typhi</i>	Salmonella Typhi Hemolysin E (HlyE) Protein, His-Tag (E. coli)	STY(HlyE)
	Salmonella Typhi Outer Membrane Protein (OMP), His-Tag (E. coli)	STY(OMP)
SARS-CoV2	SARS-CoV2-Nucleocapside	SARS_CoV2(N)
	SARS-CoV2-RBD	SARS_CoV2(RBD)
	SARS-CoV2-MPRO	SARS_CoV2(M)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Streptococcus Pneumoniae Antigen, Native Extract	SPN_Ant
Varicella-Zoster Virus	Varicella-Zoster Virus Heterodimer gE/gI (HEK293), His-tag	VZV(gE_gI)

5. Lavado y secado de las micromatrices.

Se realizaron lavados (7x) en agitación durante 5 min a RT. Los 3 primeros fueron con PBST, los 2 siguientes con PBS y los 2 últimos con agua destilada.

Por último, las micromatrices fueron secadas a 1100 rpm durante 3 min a RT.

Adquisición de imágenes y análisis de datos.

Finalmente, se realizó el mismo procesamiento descrito en la sección de adquisición de imágenes y análisis de datos de la sección 6.2.3 de M&M.

6.2.5 Adquisición y procesamiento de datos.

Análisis de las imágenes.

Se obtuvieron archivos en formato .xlsx tras el análisis con el software GenePix Pro v. 6.0 (Axon Instrument, EE.UU.). En dichos archivos se encontraba la información relativa a la intensidad de señal de cada una de las micromatrices, a partir de los cuales, se llevó a cabo el procesamiento de datos.

Procesamiento de la intensidad de señal.

Para la determinación de los valores de intensidad de señal, se realizó un proceso de normalización en base a la eliminación del ruido de fondo y posibles falsos positivos. En esta sección se detallarán, para cada una de las micromatrices utilizadas en la evaluación del comportamiento celular y perfil antigénico, los pasos seguidos para la determinación de la intensidad de señal.

Detección de complejos proteicos.

- i) *Reducción del ruido de fondo o “background subtraction” (BS):*

$$BS = \frac{\tilde{F}_\lambda - \tilde{B}_\lambda}{B\sigma_\lambda}$$

Donde \tilde{F}_λ es la mediana de la intensidad de señal emitida por cada pixel que conforma el *spot*; \tilde{B}_λ es la mediana de la intensidad de señal emitida por cada pixel que conforma el fondo; $B\sigma_\lambda$ es la desviación estándar de la intensidad de señal del fondo y λ 532 nm.

- ii) *Evaluación de la variabilidad intermatriz.*

$$S_{neg} = \max(BS_c) + \max(BS_c) \cdot 0,05$$

Donde S_{neg} es la señal específica de cada control negativo y BS_c es la señal adquirida para cada *spot* tras la eliminación del ruido de fondo para dicho control negativo.

- iii) *Evaluación de la variabilidad intramatriz.*

$$S_i = BS_i - S_{neg}$$

Donde S_i es la señal específica de cada *spot*, BS_i es la señal obtenida tras la eliminación del ruido de fondo para cada *spot* y S_{neg} es la señal específica del respectivo control negativo para cada *spot*.

- iv) *Determinación de la señal específica para cada Ag de estudio.*

$$\bar{I}_{Ag} = \frac{\sum S_{Ag}}{n_i}$$

Donde \bar{I}_{Ag} es la intensidad de señal para un Ag determinado, S_{Ag} es la señal específica de cada *spot* para dicho Ag y n_i es el número de réplicas.

- v) *Proceso de selección/filtrado o “filtering”.*

Fueron considerados únicamente los Ags con al menos el 50 % de las réplicas con valores $S_i > 0$.

- vi) *Normalización.*

$$\text{Unidad tipificada o Z score} = \frac{\bar{I}_{Ag}}{\bar{I}_e}$$

Donde \bar{I}_{Ag} es la intensidad de señal promedio del Ag e \bar{I}_e es la intensidad de señal promedio para la etiqueta (Biotina).

Análisis de los perfiles serológicos de aAgs y mAgs.

- i) *Reducción del ruido de fondo o “background subtraction” (BS):*

$$BS = \frac{\tilde{F}_\lambda - \tilde{B}_\lambda}{B\sigma_\lambda}$$

Donde \tilde{F}_λ es la mediana de la intensidad de señal emitida por cada pixel que conforma el *spot*; \tilde{B}_λ es la mediana de la intensidad de señal emitida por cada pixel que conforma el fondo; $B\sigma_\lambda$ es la desviación estándar de la intensidad de señal del fondo y λ es la λ 532 nm o 635 nm.

- ii) *Evaluación de la variabilidad intermatriz.*

$$S_{neg} = \frac{\sum BS_i}{N}$$

Donde S_{neg} es la señal específica de cada *spot* incubado con el control negativo, BS_i es la señal adquirida para cada *spot* tras la eliminación del ruido de fondo para dicho control negativo y N el número de submatrices incubadas simultáneamente con el control negativo.

- iii) *Evaluación de la variabilidad intramatriz.*

$$S_a = BS_a - S_{neg}$$

Donde S_a es la señal específica de cada *spot* incubado con la muestra, BS_a es la señal adquirida para cada *spot* tras la eliminación del ruido de fondo para dicha muestra y S_{neg} es la señal específica del control negativo para dicho *spot*.

- iv) *Determinación de la señal específica para cada Ag (aAg/mAg) de estudio.*

$$\bar{I}_{Ag} = \frac{\sum S_{Ag}}{n_i}$$

Donde \bar{I}_{Ag} es la intensidad de señal para un Ag determinado, S_{Ag} es la señal específica de cada *spot* para dicho Ag y n_i es el número de réplicas.

- v) *Proceso de selección/filtrado o “filtering” respecto a la muestra de referencia (Ref.).*

- a. *Se consideran únicamente los Ags cuya intensidad de señal es > 0 .*
- b. *Para los Ags con intensidad de señal positiva se seleccionan solo aquellos que presentan:*

$$\bar{I}_{Ag}^m > \bar{I}_{Ag}^{Ref.} + I_{Ag}^{Ref.} \cdot \sigma$$

Donde \bar{I}_{Ag}^m e $\bar{I}_{Ag}^{Ref.}$ es la intensidad de señal del Ag para la muestra y la Ref., respectivamente, e $I_{Ag}^{Ref.} \cdot \sigma$ es la desviación estándar de la intensidad de señal de dicho Ag para la Ref.

- vi) *Normalización.*

$$\text{Unidad tipificada o Z score} = \frac{\bar{I}_{Ag}^m}{\bar{I}_{Ag}^{Ref.} + I_{Ag}^{Ref.} \cdot \sigma}$$

- vii) *Conteo del número de veces que aparece un Ag (Hits) en diferentes condiciones.*

6.3 Determinación del perfil proteico intracelular.

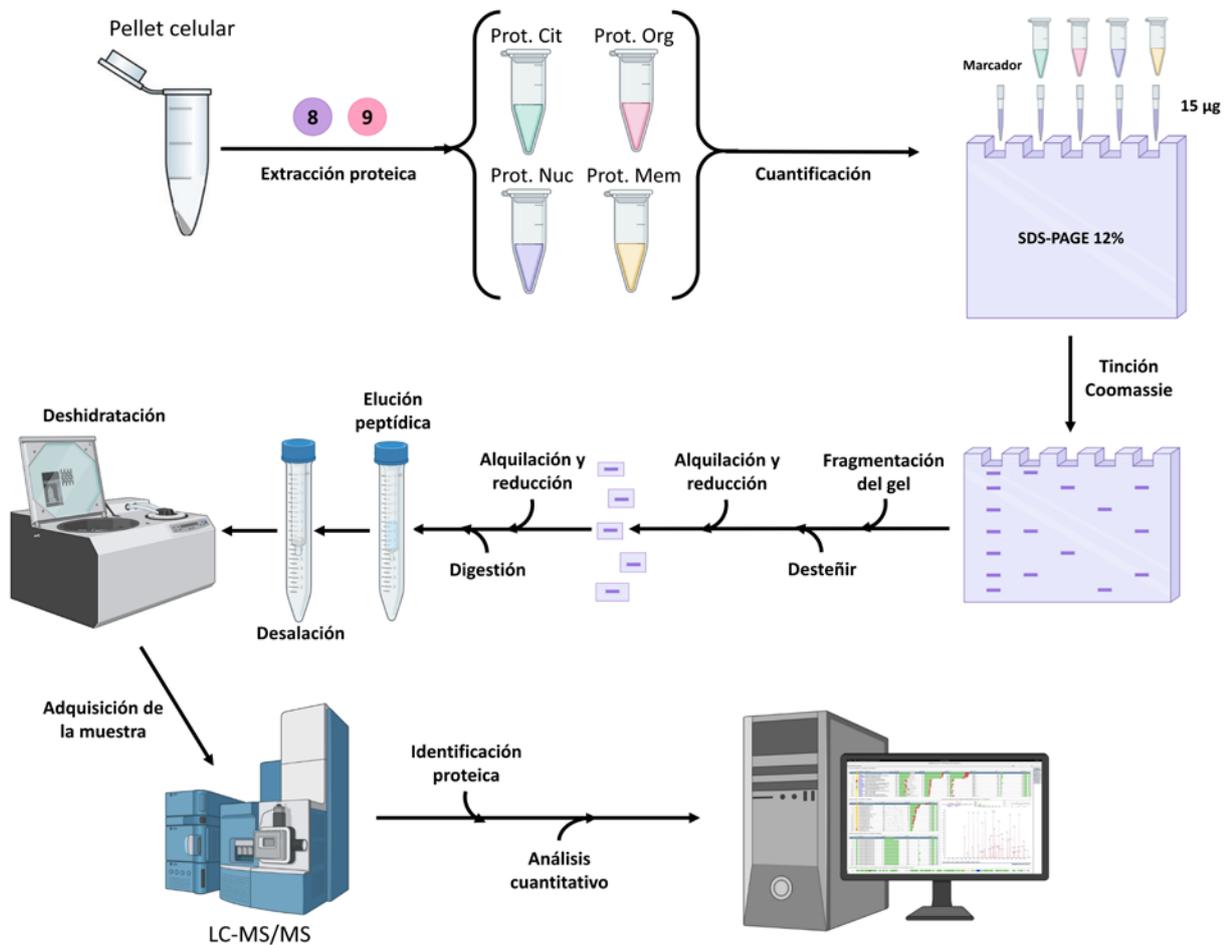
Tanto para la línea celular Ramos como para la cohorte de estudio se llevó a cabo un análisis proteico por medio de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

6.3.1 Proteoma de la línea celular Ramos.

En esta sección se recopilan a modo de resumen los ensayos llevados a cabo, para la generación del set de datos de la línea celular ramos, por Díez y colaboradores y publicados en el 2015 ¹⁵² (Figura 20).

Lisado celular.

Se llevó a cabo una extracción proteica, por triplicado, a partir de pellets de $30 \cdot 10^6$ células (usando la misma metodología comentada en la sección 1 de M&M) con los protocolos #8 y #9 (véase sección 3.8 y 3.9 de M&M).



*Los números dentro de los círculos representan cada uno de los protocolos de extracción.

Figura 20: Flujo de trabajo para la determinación del proteoma de la línea celular Ramos

Concentración proteica.

En esta ocasión, la cuantificación de los extractos proteicos se realizó en base al método de Lowry (basado en la Ley de Lambert-Beer*) con el kit Lowry-DC-Protein Assay (Cod.: #5000119, Bio-Rad Laboratories, EE.UU.) de acuerdo a las indicaciones del fabricante (véase sección 4.2 de M&M).

Electroforesis y proceso de tinción en gel.

15 µg de proteína total fueron separados en condiciones reductoras y desnaturizantes en SDS-PAGE al 12% (para cada fracción subcelulares obtenida con cada protocolo de extracción proteica) (véase sección 5 de M&M).

Posteriormente, el gel fue teñido usando la tinción de Coomassie (véase sección 5.3.1 de M&M) y fue almacenado a 4 °C en solución acuosa con ácido acético al 1 % (v/v) hasta ser analizados.

Reducción, alquilación y digestión proteica.

Cada uno de los carriles del gel fue dividido en 5 fragmentos iguales, según el método descrito por Shevchenko y colaboradores¹⁵³ con pequeñas modificaciones.

Cada fragmento se destiñó y se llevó a cabo un proceso de reducción y alquilación con 15 mM de ferrocianuro de potasio y 50 mM de tiosulfato de sodio.

A continuación, se llevó a cabo un proceso de reducción y alquilación de los enlaces disulfuro presentes en las proteínas se realizó con DTT (10 mM DTT durante 45 min a 56 °C) y yodoacetamida (55 mM IAA durante 30 min a RT).

Posteriormente, las proteínas fueron digeridas enzimáticamente con 6,25 ng/mL de tripsina durante 18 h a 37 °C.

Elución peptídica, desalación y deshidratación de la muestra.

La elución peptídica se hizo con 0,1 % ácido fórmico (FA) y el proceso de desalación con puntas C18 de acuerdo a lo descrito por Rappsilver y colaboradores ¹⁵⁴.

Las muestras fueron deshidratadas y almacenadas a – 20 °C hasta el análisis por LC-MS/MS.

Análisis por espectrometría de masas.

La adquisición de las muestras se realizó en un sistema nanoUPLC (nanoAcquity, Waters Corp., EE.UU) acoplado a un MS/MS LTQ-Velos-Orbitrap (ThermoFisher Scientific, EE.UU) con ionización por nano electro-espray (NanoSpray flex, Proxeon, Thermo, EE.UU.) mediante análisis DDA-MS y marcaje isobárico; en base a lo propuesto por Olsen y colaboradores ¹⁵⁵, aunque con ligeras modificaciones. Para ello:

- i) Los péptidos fueron diluidos en 0,5 % (v/v) de FA y 3 % (v/v) de acetonitrilo (ACN).
- ii) Los péptidos se cargaron en una columna de captura C18 de 180 µm x 20 mm y de 5 µm de tamaño de partícula (nanoACQUITY UPLC 2G-V/M Trap Symmetry; Waters Corp., EE.UU.).
- iii) La separación se realizó en un gradiente lineal, con un flujo de 250 nL/min durante 2 h y un rango del 7 % al 35 % de disolvente (ACN/0,1 % -v/v- FA) en una columna C18 de 75 µm x 250 mm y 1,7 µm de tamaño de partícula (nanoACQUITY UPLC BEH, Waters Corp., EE.UU.).
- iv) La adquisición se hizo en un rango de masa (m)/carga (z) de 400 a 1600 y un bloqueo de los iones con m/z de 445,120025. Donde la trampa de iones indujo la disociación con un 35 % de energía de colisión, 10 ms de tiempo de activación y, una diferencia de masa entre dos picos adyacentes en el segundo cuadrupolo de $0,25 \pm 2$ m/z.

Identificación y cuantificación de proteínas.

Se seleccionaron los 20 picos con mayor intensidad que cumplieran los siguientes requisitos: un estado de carga ≥ 2 y una intensidad por encima del umbral de 500.

La identificación de los picos obtenidos se realizó con los software Cornet 2015.01 rev.2 ¹⁵⁶ y SearchGUI v. 1.30.1 ¹⁵⁷.

Como ajustes para la identificación de las proteínas con la versión de neXtProt 2016-02 y SearchGUI v. 1.30.1 (diseño de las secuencias señuelo) se establecieron:

- i) Un máximo de 2 escisiones perdidas por la digestión trípica.
- ii) Una tolerancia de 10 partes por millón (ppm) en el primer analizador de masas (MS1) y de 0,5 Da para el segundo analizador de masas (MS2).
- iii) Una modificación fija de carbamitación/desmetilación de la cisteína (57,021464 Da) y modificaciones variables como la acetilación del amino terminal (42,010565 Da) y la oxidación de la metionina (15,994915 Da).

La inferencia de péptidos y proteínas fue ejecutada con PeptideShaker v. 0.41.1¹⁵⁸ y se validó su distribución en cada una de las réplicas en base a la tasa de descubrimiento falso (FDR) (< 1 % para espectros de péptidos coincidentes -PSM- y nivel de proteína); siendo el FDR de las proteínas valores estimados, debido a que no todas las proteínas que superaban el umbral eran identificadas con certeza.

La cuantificación (valores de cuantificación sin etiqueta -LFQ-) fue realizada con MaxLFQ¹⁵⁹ mediante el uso del software MaxQuant Suite v. 1.5.3.30¹⁶⁰.

El control de calidad y el análisis de datos para cada una de las fracciones subcelulares (Mem, Cyt, Org, y Nuc) fue realizado con el paquete TXQC 0.80.1 de R v. 3.2.4 y el software Perseus v. 1.5.3.2. Además, se realizó un mapeo cromosómico con el paquete R BiomaRt¹⁶¹ de cada uno de los genes que codificaban las proteínas detectadas.

Los resultados de dicho experimento se encuentran depositados en el *ProteomeXchange Consortium*¹⁶² a través del repositorio asociado PRIDE (<http://www.ebi.ac.uk/pride/archive/login>)¹⁶³ con el ID PXD003939 y 10.6019/PXD003939.

Las credenciales de acceso son: Nombre de usuario: reviewer85106@ebi.ac.uk, Contraseña: 0fVloZfQ.

6.3.2 Cohorte de estudio.

Lisado celular.

Se llevó a cabo una extracción proteica, por triplicado, a partir de pellets de 2000-3000 B-CLLs (purificados según la metodología descrita en la sección 2.2.3 de M&M) con los protocolos #8 y #9 (véase sección 3.8 y 3.9 de M&M) según lo descrito por Díez y colaboradores en el 2015¹⁵².

Reducción, alquilación y digestión proteica.

El proceso de reducción y alquilación de los enlaces disulfuro presentes en las proteínas se realizó con DTT (10 mM DTT durante 45 min a 56 °C) y yodoacetamida (55 mM IAA durante 30 min a RT). Siguiendo la metodología descrita por Díez et al. en el 2017¹⁶⁴.

Posteriormente, las proteínas fueron digeridas enzimáticamente con 6,25 ng/mL de tripsina durante 18 h a 37 °C.

Elución peptídica, desalación y deshidratación de la muestra.

La elución peptídica se hizo con 0,1 % ácido trifluoroacético (TFA) y el proceso de desalación con puntas C18 de acuerdo a lo descrito por Rappsilver y colaboradores¹⁵⁴.

Las muestras fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis por LC-MS/MS.

Análisis por espectrometría de masas.

La adquisición de las muestras se realizó en un sistema nanoUPLC (nanoElute, Bruker., EE.UU) acoplado a un TimsTOF Pro (Bruker., EE.UU) con fragmentación en serie de acumulación paralela (PASEF) utilizando el software Compass Hystar v. 5.036.0. (Bruker., EE.UU). Para ello ¹⁶⁵:

- i) Los péptidos se cargaron en una columna de captura C18 de 15 cm x 75 μm y de 1,6 μm de tamaño de partícula (Ion Optics Inc., EE.UU.).
- ii) La separación se realizó en un gradiente lineal, con un flujo de 300 nL/min durante 2 h y un rango del 3 % al 50 % de disolvente (ACN/0,1 % -v/v- FA).
- iii) La adquisición se hizo en un rango de m/z de 100 a 1700, con inicio 1/K0 de 0,6 V s/cm² y fin de 1,6 V s/cm². Tiempo de rampa de 110,1 ms y ciclo de trabajo de bloqueo del 100 %. Volumen del capilar de 1600 V, flujo de gas seco de 3 L/min y temperatura seca de 180 $^{\circ}\text{C}$.
- iv) La configuración PASEF fue de 10 escaneos por análisis MS/MS (tiempo total por ciclo de 1,27 s), rango de carga de 0-5, exclusión activa de 0,4 min, intensidad diana de 10000 unidades arbitrarias y umbral de 2500 unidades arbitrarias y energía de disociación inducida por colisión de 42 eV.

Identificación y cuantificación de proteínas.

Se llevó a cabo mediante el software MaxQuant v. 1.6.6.0 ¹⁶⁶ utilizando el motor de búsqueda integrado Andromeda.

El análisis de MS fue configurado como un análisis DDA-MS, sin modificar la configuración predeterminada del equipo.

Como ajustes para la identificación de las proteínas y sus isoformas con la versión de Uniprot 2023_03 y SearchGUI v. 4.2.17 (diseño de las secuencias señuelo) se establecieron:

- i) Un máximo de 2 escisiones perdidas por la digestión trípica.
- ii) Una tolerancia de 70 y 30 partes por millón (ppm) en el primer analizador de masas (MS1) y el resto de las características en base a la configuración predeterminada del software de análisis.
- iii) Una longitud mínima del péptido de 7 aminoácidos y masa máxima de 8000 Da.
- iv) Una modificación fija de carbamilo/desmetilación de la cisteína (57,021464 Da) y modificaciones variables como la acetilación del amino terminal (42,010565 Da) y la oxidación de la metionina (15,994915 Da).

7. Procesamiento, bioestadística y análisis de datos.

7.1 Integración Ortogonal de datos proteómicos y transcriptómicos.

7.1.1 Efecto de la conjugación proteica con biotina.

Se llevó a cabo a partir de las 5 fracciones de rango de PM (**Tabla 11**) correspondientes al extracto proteico obtenido con el protocolo #1 y conjugado con ambos protocolos de etiquetado con biotina.

Para ello se realizó un análisis bioestadístico descriptivo que permitiera evaluar el efecto del etiquetado con biotina de los extractos proteicos a partir de los resultados obtenidos por duplicado del ensayo SEC-MAP (**Tabla Suplementaria 6**).

La evaluación de la eficacia en la conjugación de biotina, sin comprometer el reconocimiento del Ag por parte del Ab presente en la micromatriz, se realizó mediante el control estadístico de procesos o *statistical process control (SPC)* (**Figura Suplementaria 2**) y una comparativa estadística de los valores de unidad tipificada o *Z score* (nivel de significación $-\alpha = 0,05$) para cada uno de los extractos proteicos en todas las fracciones de rango de PM en base a dos H_0 (**Tabla Suplementaria 7**):

1º Ambos protocolos de etiquetado con biotina tienen un efecto similar.

2º El protocolo B es mejor que el protocolo A.

Los valores de *Z score* fueron obtenidos de la siguiente forma:

a. A nivel global:

$$Z \text{ score} = \frac{n^{\circ} \text{ Proteínas no detectadas}}{n^{\circ} \text{ Total de proteínas}}$$

b. Según fracciones de rango de PM:

$$Z \text{ score} = \frac{n^{\circ} \text{ Spots sin señal}}{n^{\circ} \text{ Total de spots}}$$

7.1.2 Diseño y construcción de una base de datos ómicos.

Base de datos transcriptómico de la línea celular Ramos.

Los datos transcriptómicos fueron obtenidos mediante RNA-seq con Illumina Genome Analyzer Iix (ID. Experimento: SRX105534: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX105534>) mediante secuenciación por pares en base al estudio SRP00931, cuya información se encuentra localizada en la base de datos *Sequence Read Archive (SRA)* (<http://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/?study=SRP009316>)¹⁶⁷.

El análisis de la expresión génica, se estableció en el cálculo de los valores de los fragmentos por kilobase por millón de fragmentos mapeados (FPKM) para cada gen, usando la herramienta SRA para construir la base de datos transcriptómicos ¹⁶⁸.

El tratamiento de los datos se llevó a cabo con Trimmomatic ¹⁶⁹, mientras que la alineación de las secuencias se hizo con ENSEMBL v. 88 y el programa STAR v. 2.1.4 (*Spliced Transcripts Alignment to a Reference*). El mapa de alineamiento por pares de secuencias se realizó con la herramienta SAMtools (*Sequence Alignment/Map tools*) ¹⁷⁰. El cálculo de los valores FPKM para cada gen se realizó con CuffLinks, y el mapeo de los códigos de cada uno de ellos con neXtProt 2016-02 (<https://www.nextprot.org/>).

De este modo, se detectaron un total de 19518 secuencias codificantes diferentes de los que solo 9523 presentaban un valor de FPKM > 1 (secuencias de interés).

Construcción de la base de datos combinando proteómica y transcriptómica.

Se construyó una base de datos en la que se incluyó toda la información relativa al ensayo SEC-MAP (Protocolos #1 y del #4-#9), ensayo LC-MS/MS (Protocolos #8 y #9) y meta-análisis por RNA-seq para cada una de las proteínas estudiadas con el inmunoensayo.

En dicha base, también se incorporó información complementaria y adicional de cada una de las proteínas identificadas: localización subcelular esperada, rango de PM esperado, código identificador de la proteína y del gen que la codifica (en base a los datos publicados en neXtProt - <https://www.nextprot.org/>- y UniProt - <https://www.uniprot.org/>-) y el tipo de Ab utilizado en el inmunoensayo.

Las bases de datos que integran esta información transcriptómica y proteómica se encuentran recogidas para cada uno de los protocolos de estudio (#1 y del #4-#9) en la **Tabla Suplementaria 8**.

7.1.3 Comparación de procedimientos de extracción proteica.

A partir de los resultados obtenidos para el análisis SEC-MAP (**Tabla Suplementaria 9**), se realizó una estadística descriptiva (**Tabla Suplementaria 10**) y una comparativa estadística de los valores de *Z score* ($\alpha = 0,05$) para cada uno de los protocolos de extracción proteica, por localización subcelular (si procedía) y fracciones de rango de PM; en base a las siguientes H_0 (**Tabla Suplementaria 11**):

1º Los protocolos de extracción proteica utilizados tienen efectos similares.

2º El protocolo #4-#9 es mejor que el protocolo #1 (ya sea a nivel global o a nivel de fracciones de rango de PM).

Se determinaron los valores de *Z score* tal y como se describió previamente en la sección 7.1.1 de M&M.

7.1.4 Determinación de complejos multiproteicos.

Mediante la metodología SEC-MAP se determinó la presencia de complejos multiproteicos, junto con la localización subcelular como prueba de concepto en base a ¹⁷¹⁻¹⁷⁴:

- i) Rutas de señalización bien caracterizadas para la línea celular Ramos.
- ii) Patrones moleculares asociados a daño (DAMPs).
- iii) Señalización intracelular implicada en la ruta del BCR.
- iv) Rutas de señalización intracelular intervenidas por terapias dirigidas (como, por ejemplo, Ibrutinib, Venetoclax o Nutlin-3).

Se estudiaron ocho rutas de señalización celular y tres rutas con moléculas diana para 3 fármacos dirigidos (Venetoclax, Ibrutinib y Nutlin-3 α) (**Tabla Suplementaria 12 y Archivo I -** Corresponde con la [Tabla S7](#) y el [dataset II](#) del anexo IV):

1. Apoptosis celular: i) Regulación del proceso de apoptosis (BAD, BCL2L1 y BCL-2) y ii) Inhibición de la apoptosis (BID, CASP3, CASP6, CASP7, CASP8 y CASP9).
2. Ruta de señalización del BCR (BCR, LYN, SYK, BTK, NFKB y BCL2L1).
3. Ruta de señalización de la proteína estimuladora de genes de interferón (STING) (NFKB1, RELA, IL-6, IL-8 e INF- γ).
4. Patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) (BAK1, BAX, BCL-2, CASP8, HIST1H3A, HIST1H4A, DNAJB1, HSPD1, HSPA1A, HSP90AA1, IFN- γ , IL-10, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-8).
5. Rutas de señalización intracelular mediadas por MAPKs (KRAS, MAP2K1, MAP2K2 MAPK1 y FOS).
6. Señales de senescencia (MAPK1, MAPK11, TP53, PAK1|P1, CDKN2A, CDKN1B, CCNB1, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CDK4, MDM2, ATM, ATR, RB1 y E2F1).
7. Control del ciclo celular y Nutlin-3 α (MDM2 y TP53).
8. Venetoclax (BIM/BCL2L11, BID, BAD, BAK, CASP3, CASP8, BCL-2).
9. Ibrutinib (PLC γ 2, SYK, CD19, ZAP70, LYN, BLNK, BTK).

Todas las interacciones descritas en las rutas de interés fueron estudiadas de acuerdo a la base datos de STRING v. 11.0 (<https://version-11-0.string-db.org/>)¹⁷⁵.

7.1.5 Determinación de isoformas y/o modificaciones postraduccionales.

El análisis de isoformas proteicas y/o la presencia de modificaciones postraduccionales (PTMs) se realizó de acuerdo al contenido de la micromatriz (**Tabla Suplementaria 3**) y el protocolo de extracción proteica utilizado. Permitiendo evaluar la presencia de isoformas para 12 proteínas y el estado postraduccionales de otras 19 proteínas (**Tabla Suplementaria 13 y Archivo I -** Corresponde con la [Tabla S9](#) y el [dataset II](#) del anexo IV).

7.1.6 Visualización del análisis SEC-MAP.

La visualización multidimensional y multiparamétrica del análisis SEC-MAP para cada uno de los ensayos anteriores se realizó con Infinicyt™ v. 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España) (**Archivo II**

- Corresponde con el [dataset I](#) del anexo IV). Donde la base del análisis para cada inmunoensayo fue la localización subcelular esperada y teórica; junto con la localización subcelular observada en la caracterización por LC-MS/MS.

De este modo, las proteínas se clasificaron por selección positiva de acuerdo a la localización subcelular, desde una única localización, dos localizaciones subcelulares hasta múltiples en el siguiente orden: Nuc, Cit, Mem, Org, Nuc-Org, Nuc-Cit, Nuc-Mem, Org-Cit, Org-Mem, Cit-Mem, Nuc-Org-Cit, Nuc-Org-Mem, Nuc-Cit-Mem, Org-Cit-Mem y Nuc-Org-Cit-Mem.

Posteriormente, para cada grupo se realizaron múltiples representaciones gráficas (análisis de componentes principales (APS), incrustación de vecinos estocásticos distribuidos en t-t-SNE- y de 2 dimensiones -2D: eje y = tipo de inmunoensayo y eje x = localización subcelular o eje y = Log_{10} LFQ y eje x = Log_{10} FPKM-) para la determinación de los perfiles de localización subcelular de los complejos multiproteicos y de sus componentes individualmente.

Finalmente, se exploró la correlación entre los niveles de expresión proteica y nivel de transcrito para cada una de las proteínas caracterizadas por LC-MS/MS, junto a su localización subcelular (**Figura Suplementaria 3** - Corresponde con la [Figura S7](#) del anexo IV). Dichos agrupamientos se hicieron en base a:

1. Valores promedio de LFQ & FPKM.
2. Valor bajo de LFQ & valor gradual/progresivamente aumentado de FPKM.
3. Valores altos de LFQ & valores bajos de FPKM.
4. Valores altos de LFQ & FPKM.
5. Valores atípicos.

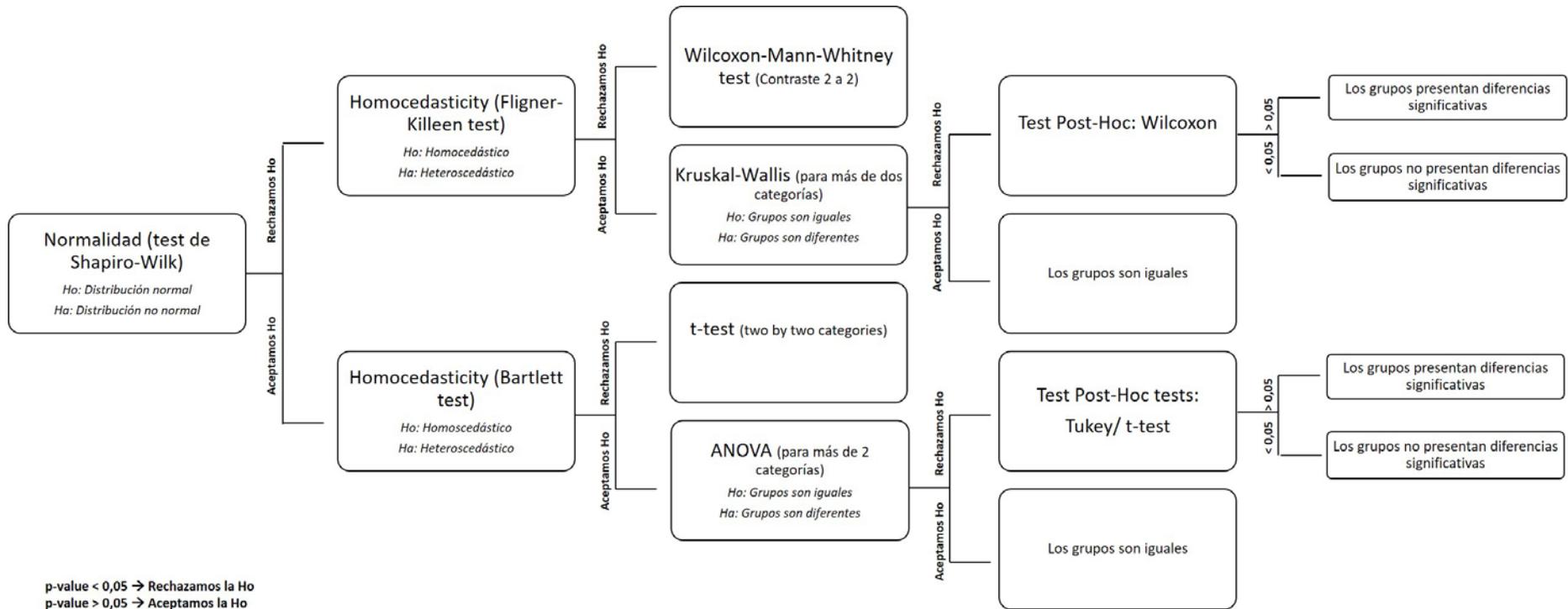
7.1.7 Análisis de enriquecimiento funcional.

Se realizó un análisis de las rutas de señalización, para cada uno de los 5 grupos que contenían la integración proteómica y transcriptómica, mediante el uso de las herramientas KEGG v. 93.0¹⁷⁶ y Reactome v. 71¹⁷⁷ (**Tablas suplementarias 14 y 15** - Corresponden con las [Tablas S11](#) y [S12](#) del anexo IV).

7.2 Estudio del microambiente tumoral en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica.

7.2.1 Análisis estadístico.

Se llevó a cabo un análisis estadístico convencional que se corroboró con un modelo lineal para cada una de las proteínas solubles evaluadas (**Tabla 9**), en base a las características clínicas de los pacientes según: diagnóstico (MBL o CLL), evolución (estable -c-CLL- o en progresión -p-CLL-), tratamiento (previo a 1º línea de tratamiento -CLL-PFT- o tras 1º línea de tratamiento -CLL-TFT-) y estado mutacional de la IGHV (M-IGHV o U-IGHV) (**Esquema 5**).



Esquema 5: Árbol de decisión para el análisis estadístico convencional.

Estadística convencional.

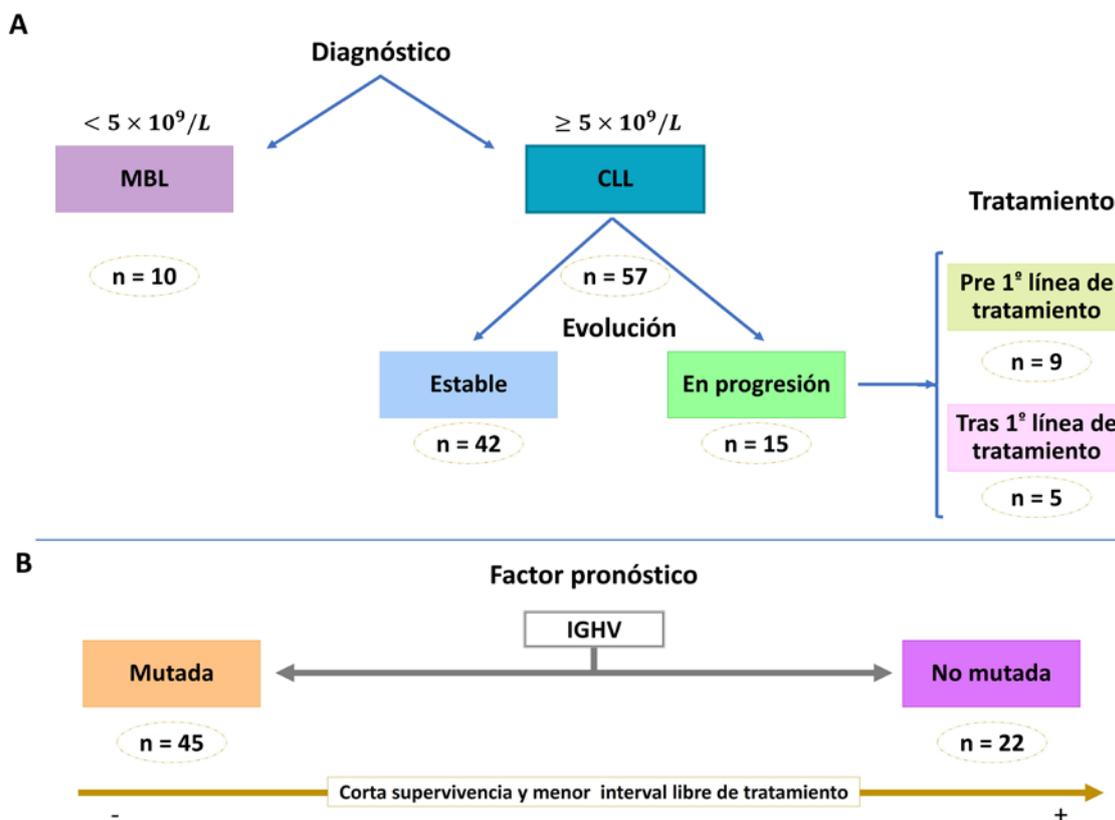
Se realizó con el software R v. 4.1 en RStudio 2022.02.0, en base al árbol de decisión descrito en el **Esquema 6**. Siendo el nivel de significación para todas las pruebas estadísticas del 5 % (**Tabla Suplementaria 16**).

En primer lugar, se evaluó la distribución de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Debido a la ausencia de normalidad en alguna de las variables, se realizó una correlación de Spearman entre las proteínas de estudio (**Tabla Suplementaria 17 y Figura Suplementaria 4** - Corresponden con la [Tabla S6](#) y la [Figura S7](#) del anexo V).

Posteriormente, se estudió la homocedasticidad entre categorías usando la prueba de Fligner-Killeen (para distribuciones no normales) y Bartlett (para distribuciones normales).

Según las características de cada una de las variables (normal/no normal), se hizo un estudio de diferencias significativas utilizando *t-Student* o prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney para dos categorías (en caso de heterocedasticidad) o ANOVA o Kruskal-Wallis para más de dos categorías (en caso de homocedasticidad).

Finalmente, se realizaron pruebas Post-Hoc usando Tukey, *t-test* o Wilcoxon según correspondiera.



Modelo lineal.

El modelo lineal se realizó con el paquete *limma*¹⁷⁸ para R, en base a 6 covariables principales (Diagnostico, evolución, tratamiento, estado mutacional de la IGHV, edad y sexo).

Las diferencias significativas encontradas para la abundancia de las proteínas en la cohorte de estudio se basaron en 3 niveles de significación ($\alpha < 0,1$, $\alpha < 0,05$ y $\alpha < 0,01$), que fueron corregidos usando el procedimiento de Benjamin-Hochberg (**Tabla Suplementaria 18** - Corresponden con la [Tabla S8](#) del anexo V).

7.2.2 Clasificación de los factores solubles.

Se utilizó una metodología cuantitativa basada en el algoritmo de mínima redundancia y máxima relevancia (mRMR) ^{179,180}.

Este análisis mRMR se basó en iteraciones con 1000 conjuntos diferentes. Donde cada conjunto estaba constituido por dos subconjuntos: i) 80 % de la cohorte era aleatorizada para el conjunto de validación; ii) 20 % de la cohorte constituía el conjunto de entrenamiento.

A partir de la información obtenida por mRMR, se realizó una clasificación de las proteínas tomando las 25, 30 o 35 mejores en base al número de veces que aparecen con la mejor puntuación (**Tabla Suplementaria 19** - Corresponden con la [Tabla S7](#) del anexo V).

7.2.3 Generación de árboles de decisión.

Se usaron varios modelos de árboles de decisión ^{181,182} para clasificar las muestras según: el diagnóstico (MBL/CLL), evolución (c-CLL/p-CLL), tratamiento (CLL-PFT o CLL-TFT) y estado mutacional de la IGHV (M-IGHV/ U-IGHV).

Los datos utilizados para conformar dichos árboles de decisión, fueron las 5 primeras proteínas solubles obtenidas por análisis mRMR y las proteínas solubles con diferencias significativas coincidentes obtenidas con la estadística clásica y el modelo de regresión lineal.

Los resultados se resumieron en matrices de confusión (**Figura Suplementaria 5** - Corresponden con la [Figura S8](#) del anexo V), donde el error se estimó mediante validación cruzada *K-fold* ¹⁸³.

7.2.4 Representación gráfica de los datos.

Las representaciones gráficas se llevaron a cabo con GraphPad Prims v. 8.0.2 (GraphPad Software Inc, San Diego, EE. UU.) e Infinicyt™ v. 2.0.5 (Cytognos SL, Salamanca, España).

7.2.5 Análisis de enriquecimiento funcional.

El análisis de rutas de señalización y enriquecimiento funcional se hizo con Reactome (<https://reactome.org>) ¹⁸⁴ en relación a:

- i) El perfil proteico de acuerdo a la evolución de la enfermedad (**Tabla Suplementaria 20** - Corresponden con la [Tabla S2](#) del anexo V).
- ii) Proteínas con diferencias significativas de acuerdo a la evolución de la enfermedad (**Tabla Suplementaria 21** - Corresponden con la [Tabla S4](#) del anexo V).
- iii) Proteínas con diferencias significativas según su tendencia de acuerdo a la evolución de la enfermedad (**Tabla Suplementaria 22** - Corresponden con la [Tabla S5](#) del anexo V).

- iv) El perfil proteico de acuerdo a la situación terapéutica (**Tabla Suplementaria 23** - Corresponden con la [Tabla S9](#) del anexo V)
- v) Proteínas con diferencias significativas de acuerdo a la situación terapéutica (**Tabla Suplementaria 24** - Corresponden con la [Tabla S10](#) del anexo V).
- vi) El perfil proteico de acuerdo al estado mutacional de la IGHV (**Tabla Suplementaria 25** - Corresponden con la [Tabla S11](#) del anexo V).
- vii) Proteínas con diferencias significativas según el estado mutacional de la IGHV (**Tabla Suplementaria 26** - Corresponden con la [Tabla S12](#) del anexo V).

7.3 Estudio del perfil de anticuerpos frente a antigénico microbianos y autoantígenos en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica.

7.3.1 Análisis estadístico.

Al igual que en la sección 7.2, las muestras fueron clasificadas en base a las características clínicas de los pacientes (**Esquema 5**).

Perfil cuantitativo de inmunoglobulinas en suero.

El análisis estadístico convencional se realizó con la misma metodología comentada en la sección 7.2.1 con el software R v. 4.1 en RStudio v. 2022.02.0 y cuyo árbol de decisión se recoge en el **Esquema 6 (Tabla Suplementaria 27)**.

Perfil antigénico microbiano y de autoantígenos.

Se realizó una estadística descriptiva a partir de la detección del número de aAgs (**Tabla Suplementaria 28**) y mAgs examinados (aAg array y SPA array) (**Tabla Suplementaria 29**); tanto de forma general como a nivel de grupos clínicos.

En el caso de la determinación de los perfiles de estimulación antigénica persistente (SPA array), un paso previo a la realización de la estadística descriptiva fue la selección de la dilución de trabajo del mAg (se describe en la sección 7.3.2 de M&M) a partir de la cual se estableció el ratio y el conteo del número de mAgs detectados (**Tabla Suplementaria 30**).

7.3.2 Selección de la dilución de trabajo.

Se determinó la dilución de trabajo usando el software de análisis y visualización Infinicyt™ v. 2.0.5 (Cytognos SL, Salamanca, España).

Se estableció una clasificación de los mAgs detectados en base al tipo de Ab analizado (Ig M, Ig G o Ig M & Ig G – ambos isotipos-) para cada una de las diluciones de estudio (**Archivo III-VII**).

Una vez clasificados estos mAgs, se realizó el recuento en base al isotipo (Ig M, Ig G o la presencia de ambos - Ig M & Ig G-). De este modo, se obtuvo el número de mAgs detectados y no detectados en la cohorte de estudio y el tipo de isotipo de detección (**Tabla Suplementaria 31**).

Finalmente, se seleccionaron aquellos mAbs que formaban parte del top 5 y se realizó el recuento a nivel general y por isotipo de detección (**Archivo III-VII y Tabla Suplementaria 31**).

7.3.3 Representación gráfica de los datos.

La visualización de los datos fue realizada con GraphPad Prism v. 8.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, EE.UU.), Infinicyt™ v. 2.0.5 (Cytognos SL, Salamanca, España) y hojas de cálculo; en las que se incluyó toda la información relativa a los resultados obtenidos con los ensayos y procedente de las bases de datos neXtProt¹⁸⁵, String v. 11.5¹⁷⁵, Reactome¹⁸⁶ y la base del *Human Protein Atlas* (www.proteinatlas.org)^{187,188}.

7.4 Estudio del perfil proteico intracelular en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica.

Para el estudio del perfil proteico intracelular en la cohorte de estudio, se evaluó el efecto del lote tras la adquisición y el análisis de las muestras por MS, utilizando el análisis de componentes principales (PCA). Siendo dicho efecto corregido mediante la función *combate* del paquete SVA de R.

Seguidamente, se llevó a cabo el filtrado de 1176 proteínas, las cuales contenían más del 15 % de valores omitidos (NA) y 5 muestras con más del 15 % de NA. Estos NA se imputaron utilizando la función *imputar.knn* del paquete Imputar de R y se escaló la intensidad de LFIQ; la cual fue transformada al Log₂. Posteriormente, se realizó una corrección de datos mediante la evaluación comparativa del sumatorio de las intensidades brutas y procesadas, utilizando el PCA (**Figura Suplementaria 6**)

La diferencia en la abundancia de expresión de proteínas entre los grupos clínicos de pacientes (según el estado mutacional de la IGHV y alteraciones cromosómicas) se expresó como relación Z ($Z \text{ ratio} = \frac{a-b}{\sigma}$; donde a y b son los valores obtenidos para cada condición y σ la desviación estándar) y la significación estadística de las mismas fue evaluada mediante la prueba de Wilcoxon *Rank Sum*.

Los perfiles transcriptómicos (procedentes de micromatrices y RNA-seq) fueron recuperados de la base de datos GEO ([Gene Expression Omnibus](#)). Los datos procedentes de micromatrices fueron normalizados usando la función *justRMA* del paquete affy de R y el efecto de los lotes mediante la función *combate* del paquete SVA de R. Las intensidades fueron escaladas para posteriormente, llevar a cabo el cálculo de la expresión diferencial entre muestras control (LB normales) y B-CLL como Log₂ Z ratio, mientras que los datos procedentes del estudio de RNA-seq fueron normalizados y transformados utilizando la función *varianceStabilizingTransformation* del paquete genefilter de R. De este modo, la expresión diferencial entre muestras de CLL de acuerdo al estado mutacional de la IGHV y alteraciones cromosómicas se calculó como el Log₂ FC (*Fold change*) usando la función *DESeq2* del paquete DESeq2 de R

El perfil proteico funcional de los LB fue caracterizado mediante un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA), usando los paquetes msigdb y fgsea de R, en base a las proteínas preclasificadas de acuerdo con la relación Z entre muestras agrupadas en el *cluster 4* y el 1, que presentaban 1000 permutaciones y un p-valor < 0,05. Los grupos funcionales de proteínas (PFG)

fueron caracterizados en base al trabajo publicado por Griffen y colaboradores en el 2022 ¹⁰⁷. De forma que la recuperación de las proteínas seleccionadas y asociadas a 18 procesos biológicos se realizó mediante la función *getBM* del paquete *biomaRt* de R. Asignándose a los grupos biológicos funcionales más amplios su conjunto de genes y procesos de forma manual.

La superposición de proteínas entre los grupos biológicos funcionales se evaluó mediante el coeficiente de similitud de Simpson, que calcula el número total de elementos comunes entre el conjunto A y B dividido el tamaño mínimo del conjunto A o B.

Finalmente, el procesamiento y análisis de datos se realizó con el software R v. 4.1 en RStudio v. 2022.02.0, utilizando el paquete *ComplexHeatmap* para la generación de los mapas de calor y *clusters* y el resto de gráficos fueron generados usando el paquete *ggplot2*.

Capítulo 1: Evaluación de complejos multiproteicos mediante integración ortogonal multi-ómica en una línea celular como modelo.

Alicia Landeira-Viñuela¹, Paula Díez^{1,2}, Pablo Juanes-Velasco¹, Quentin Lécrevisse¹, Alberto Orfao¹, Javier De Las Rivas³, Manuel Fuentes^{1,2°}

¹ Departamento de Medicina y Servicio General de Citometría, CIBERONC-CB16/12/00400, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) e IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

² Unidad de Proteómica, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) e IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

³ Grupo de Bioinformática y Genómica Funcional, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) e IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

Biomolecules 2021, 11, 1776.

Doi: 10.3390/biom11121776

Introducción.

Actualmente, la gran mayoría de los fármacos en oncoterapias dirigidas presentan como dianas terapéuticas proteínas o complejos multiproteicos bien caracterizados. De hecho, la gran mayoría de estas proteínas diana forman parte de amplias redes que presentan un papel claro en la señalización intracelular.

Por otro lado, el creciente campo de estudio de las ómicas permite responder a diferentes preguntas según el área en el que nos encontremos. Siendo la genómica la encargada de responder a la pregunta de ¿qué le puede suceder a la célula?, la transcriptómica de ¿qué le va a suceder a la célula?, la proteómica de ¿qué le está sucediendo a la célula? y la metabolómica de ¿qué le ha sucedido a la célula?

Es por ello que debido a la gran complejidad presente en la célula (unidad fisiológica funcional de los seres vivos) y los efectos cruzados que pueden tener las terapias dirigidas sobre otras rutas de señalización intracelular/células no diana y/o resistencias, está siendo cada vez más importante conocer el comportamiento a nivel biológico las células. Actualmente, metodologías de alto rendimiento (RNA-seq, SEC, LC-MS/MS, etc.) han permitido desentrañar la alta complejidad de los procesos intracelulares (como, por ejemplo, los parámetros funcionales y/o compartimento celular). Abriendo nuevas posibilidades ante el estudio de las moléculas de ADN, ARN, proteínas y metabolitos a gran escala (genoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma).

Cabe destacar que la gran mayoría de los estudios ómicos realizados, aportan una gran cantidad de información sobre las biomoléculas y sus interacciones, además de su organización intracelular espacial. Aunque debido a la diversa naturaleza intrínseca de las moléculas de interés, cada una de las ómicas se centra en un único tipo de biomolécula aportando información en diferentes rangos dinámicos y de profundidad de análisis.

Por ello, en este estudio se lleva a cabo la evaluación de parámetros relevantes para la integración ortogonal multi-ómica, que permita incorporar información complementaria procedente de diferentes ensayos (RNA-seq, LC-MS/MS y de detección de complejos proteicos), con el fin de comprender el comportamiento del linfocito B clonal.

Objetivos

En este trabajo se propone como objetivo general:

- Evaluar y desarrollar una estrategia de análisis que aporte información complementaria entre estrategias ómicas y permita la integración ortogonal entre ellas.

Y como objetivos específicos:

- i) Evaluar la estrategia SEC-MAP para la determinación de complejos multiproteicos y su potencial de integración ortogonal multi-ómico (LC-MS/MS y RNA-seq).
- ii) Determinar perfiles proteicos a nivel espacial y funcional (localización subcelular, su estado y el tipo de isoforma/PTMs).
- iii) Generar una estrategia sistemática que permita la integración ortogonal multi-ómica (localización subcelular de las proteínas, SEC-MAP, MS/MS y RNA-seq), a fin de establecer y/o caracterizar complejos multiproteicos intracelulares.

Resultados.

Teniendo en cuenta las múltiples caracterizaciones ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica), las cuales analizan distintas biomoléculas (con naturalezas químicas diferentes, rangos dinámicos capaces de influir en su abundancia relativa y rendimiento) obtenidas a partir de diversas estrategias metodológicas de extracción (químicas y/o físicas) que pueden afectar en su análisis posterior y en los procesos de obtención de información e integración con otros datos ómicos. En esta Tesis Doctoral se propone la aproximación SEC-MAP (Cromatografía por exclusión de tamaño & microarray de proteínas) que implica la combinación de técnicas, en sí diferentes, y con características intrínsecas propias para poder evaluar el perfil multiproteico de las células.

Por tanto, para poder valorar las características intrínsecas de cada una de las técnicas utilizadas en el procesamiento de las muestras y minimizar la variabilidad asociada a las muestras procedentes de pacientes, se emplea una línea celular como modelo (línea celular Ramos). Estableciéndose en este contexto:

- i) La evaluación del rendimiento de los procedimientos de extracción de proteínas.
- ii) La evaluación de la compatibilidad de la conjugación química (biotina) de los extractos proteicos con el ensayo SEC-MAP.
- iii) La evaluación de la detección de proteínas mediante la metodología SEC-MAP.
- iv) El análisis e identificación de complejos multiproteicos, isoformas proteicas y PTMs.
- v) La generación de una herramienta simple para la integración ortogonal multi-ómica, a partir de los datos obtenidos por diferentes ómicas y procedentes de una misma muestra (línea celular Ramos).

I. Evaluación de la estrategia SEC-MAP.

I.1. Evaluación del rendimiento en la extracción de proteínas.

Cada uno de los protocolos de extracción proteica realizados (véase sección 3 de M&M) presentan composición química diferente en la solución de lisis.

La comparación inicial más rápida, y que presenta una repercusión directa en su posterior análisis, se centró en la cantidad total de proteína extraída por una cantidad de células determinada (en este caso 10^6 células). De este modo, se observa que el empleo de solubilización mecánica, junto con la presencia de agentes caotrópicos (Urea), tiene un menor rendimiento en el proceso de extracción proteica (34 μg de proteína extraída -protocolo #2-) que cuando se lleva a cabo dicha solubilización con detergentes no iónicos (270 μg de proteína extraída -protocolo #6 -) (**Figura 21A**).

Sin embargo, cuando estas observaciones se realizan de acuerdo a la extracción proteica realizada (proteína total, enriquecimiento o fraccionamiento subcelular), se aprecia:

- En el caso de los protocolos de extracción de proteína total, se obtiene un rendimiento parecido para los protocolos con soluciones de lisis que contienen agentes caotrópicos (Urea y Tiourea - protocolos #2 y #3 respectivamente-) e inferior a los protocolos de extracción proteica con soluciones de lisis que contienen detergentes no iónicos (protocolos #1 y #4). Siendo mayor la efectividad de la solubilización de estos últimos cuando se realiza además un proceso de solubilización mecánica (protocolo #4) (**Figura 21A**) y cuyos resultados son confirmados mediante SDS-PAGE (**Figura 13**).

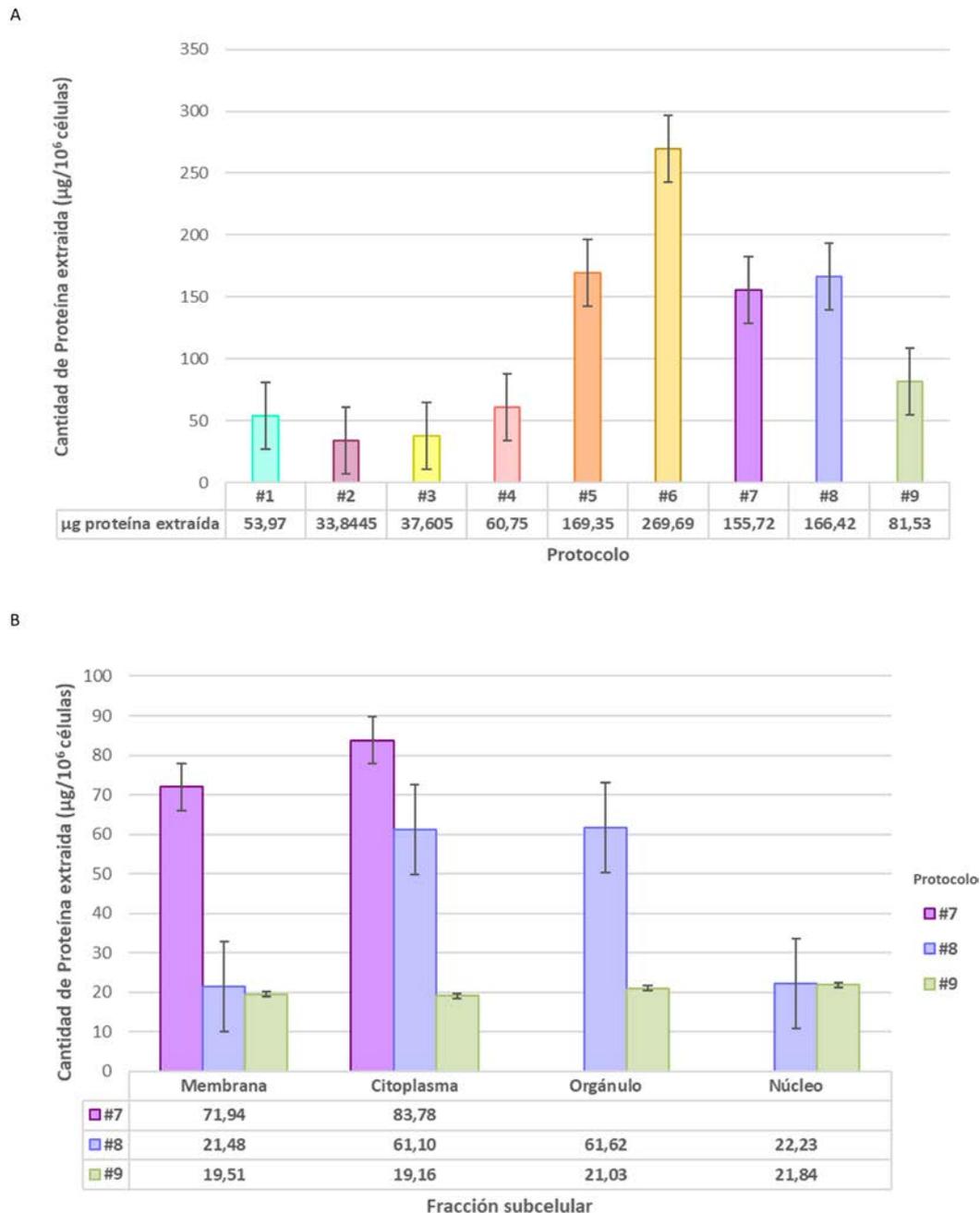


Figura 21: Rendimiento de los protocolos de extracción de proteínas evaluados. A) Cantidad total de proteína extraída por cada millón de células. B) Cantidad de proteína extraída según fracción subcelular.

- Respecto al rendimiento de extracción de proteínas de membrana (protocolos de enriquecimiento) con detergentes no iónicos, la cantidad de proteína extraída se encuentra en un rango de ~170 – 270 µg/10⁶ células (**Figura 21A**). Aunque dicha

horquilla de rendimiento no es observable tras la separación del extracto proteico por electroforesis (SDS-PAGE) (**Figura 13**).

- En los casos de protocolos con fraccionamiento subcelular, se observa un bajo rendimiento en la extracción de proteínas para el protocolo #9 y rendimiento parecido para los otros dos protocolos (#7 y #8) (**Figura 21A**). Además, como cabe esperar, el rendimiento de extracción de proteínas de Mem. y Cit. es mayor para el protocolo #7 (**Figura 21B**), ya que este es únicamente de 2 fracciones, mientras que los otros dos permiten la extracción de las proteínas en 4 fracciones subcelulares (Cit., Mem., Org. y Nuc.). Sin embargo, al comparar estos dos últimos (#8 y #9), la cantidad de proteína extraída es similar para las fracciones subcelulares de Mem. y Nuc. y mayor en las fracciones de Cit. y Org. para el protocolo #8 (**Figura 21B**). Sin embargo, estos resultados no se corroboran fácilmente por SDS-PAGE (**Figura 13**).

A pesar de estas discordancias entre el proceso de cuantificación y electroforesis en gel SDS-PAGE. La distribución de las proteínas extraídas no se encuentra influenciada dentro del rango de PM de estudio (10 a 250 kDa), independientemente del protocolo de extracción examinado (**Figura 13** - Corresponde con la [Figura S1](#) del anexo IV -).

I.2. Evaluación de la compatibilidad del proceso de conjugación química de los extractos proteicos con el ensayo SEC-MAP.

Los procesos de extracción proteica deben ser compatibles y/o idóneos para el método o estrategia de detección cuantitativa y/o cualitativa de la proteína y/o grupo de interés. Siendo estrategias habituales de etiquetado las llevadas a cabo mediante el marcaje con fluorocromo o la conjugación química con biotina entre otras muchas.

En esta Tesis Doctoral, el proceso de marcaje elegido es la conjugación química con biotina de grupos amino primarios. Esta conjugación se realiza mediante un proceso de reacción del grupo NHS (grupo éster N-hidroxisuccinimida - NHS-PEG4-biotin -) (**Figura 22A**) con los grupos amino lisina y amino primarios (**Figura 22B**) presentes en todas las proteínas (extremo amino terminal y cadenas laterales de los aminoácidos).

En este contexto, las múltiples soluciones de lisis que presentan en su composición química tiourea (**Figura 22C**) y urea (**Figura 22D**), protocolos de extracción #2 y #3 respectivamente, producen interacciones no deseadas con el grupo NHS de la molécula de biotina, debido a la producción de reacciones paralelas o competitivas entre el grupo NHS y todos los grupos amino primarios presentes en la muestra. Produciendo un efecto no deseado en el rendimiento de la conjugación química con biotina a las proteínas presentes en el extracto proteico.

Por estos motivos, el proceso de conjugación con biotina de las proteínas se realiza para todos los protocolos de extracción proteica cuya solución de lisis no contiene ninguno de estos compuestos (protocolos #1 y #4-#9).

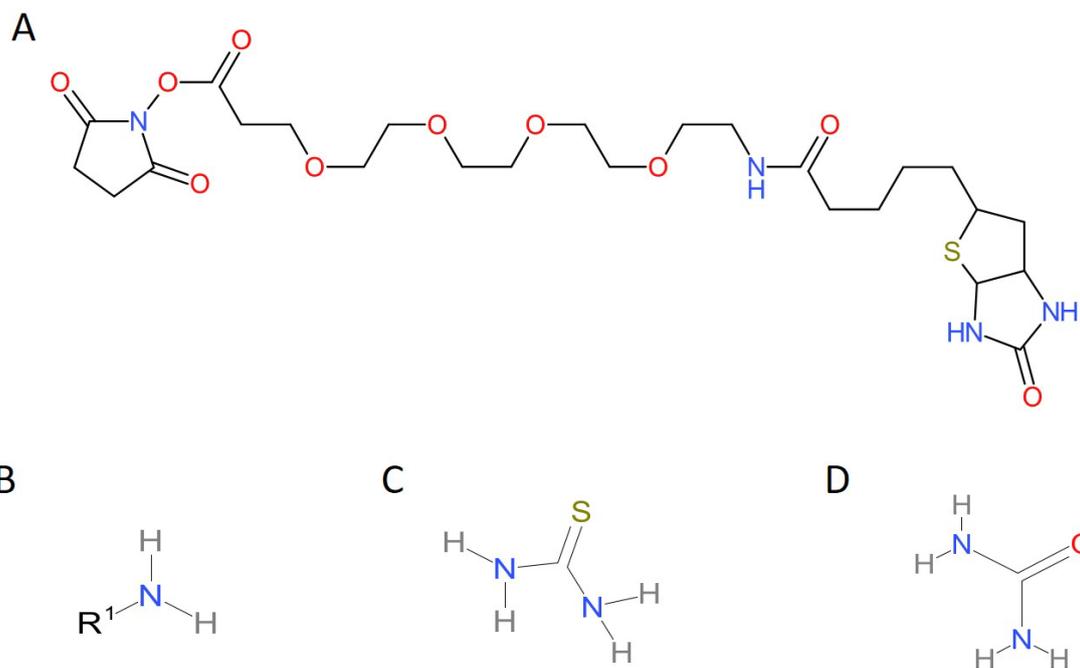


Figura 22: Fórmulas químicas estructurales. A) NHS-PEG4-biotin B) Amino primario. C) Tiourea. D) Urea.

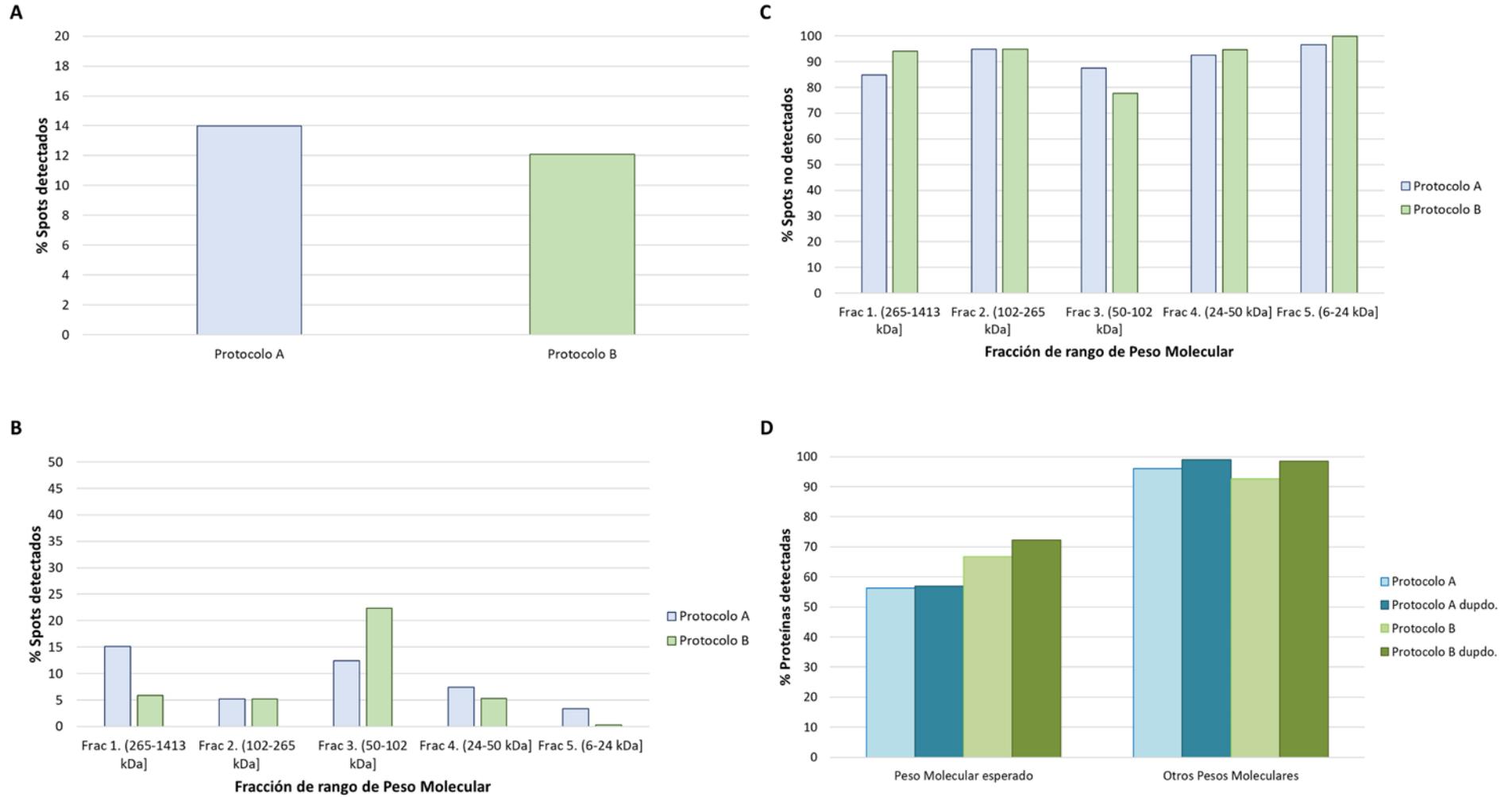
Además, de acuerdo al amplio rango dinámico de las proteínas, la manifestación de su abundancia relativa será diversa y, en consecuencia, también lo será su concentración. Por lo que es necesario evaluar la repercusión de la conjugación a diferentes concentraciones sobre la identificación de proteínas en las diferentes fracciones de PM. Siendo dicho análisis realizado mediante control estadístico de procesos o *statistical process control (SPC)*.

Se observó que la conjugación con biotina llevada a cabo con el protocolo A presentaba una gran variabilidad. Localizándose la gran mayoría de los valores obtenidos para cada fracción de rango de PM fuera de los límites establecidos para el control de calidad (**Figura Suplementaria 2**).

Por otro lado, el análisis estadístico revela una mayor eficiencia en el proceso de identificación de proteínas cuando se conjugan con el protocolo B, tanto a nivel general como para las fracciones de rangos de PM 1 (265-1413 kDa) y 5 (6-19 kDa). Para el resto de las fracciones de rango de PM la eficiencia fue similar, salvo para la fracción 3 (50-80 kDa), donde el protocolo A es más eficiente en la identificación que el B (**Tabla Suplementaria 7**).

Además, como se observa en la **Figura 23**, el protocolo A permite detectar un mayor N° de *spots* tanto a nivel global (**Figura 23A**) como por fracciones de rango de PM (salvo para la Fracción 2 y 3) (**Figura 23B**). Sin embargo, en cuanto al N° de *spots* no detectados (**Figura 23C**) no presenta grandes diferencias con respecto al protocolo B y sin embargo, reconoce un menor N° de proteínas (**Figura 23D**).

Atendiendo a todo lo anterior, aunque el protocolo B detecte menos N° de *spots* (ya sea a nivel general o por fracciones de rango de PM) **Figura 23A-B**, presenta una menor variabilidad (**Figura Suplementaria 2**), mejor eficiencia de identificación a nivel estadístico (**Tabla Suplementaria 7**) y un mayor reconocimiento de proteínas diferentes (**Figura 23D**).



*dupdo.: duplicado. (]: intervalo abierto por la izquierda y cerrado por la derecha.

Figura 23: Análisis cuantitativo de los resultados obtenidos para los protocolos de etiquetado proteico con el protocolo #1 de extracción de proteínas. A) Representación gráfica del porcentaje (%) total de spots detectados. B) Representación del % total de spots detectados en cada fracción de peso molecular. C) Representación del % total de spots no detectados en cada fracción de peso molecular. D) Representación del % de proteínas detectadas en cada uno de los duplicados.

I.3. Evaluación de la detección de proteínas mediante metodología SEC-MAP.

En cuanto al efecto en el rendimiento de la estrategia SEC-MAP para cada uno de los protocolos de extracción de proteínas conjugado con biotina, se observó que el Nº de proteínas identificadas en la micromatriz difería según el método empleado (**Tabla Suplementaria 10**).

El valor más bajo en cuanto a Nº de proteínas detectadas con la estrategia SEC-MAP se da con el protocolo #6 (enriquecimiento en proteínas de Mem. -16 de 162; 9,9 %-) y el mayor con el protocolo #1 (proteína total -120 de 162; 74,1 %-), ya sea a nivel global (**Figura 24A**) como por rangos de PM (**Figura Suplementaria 7**).

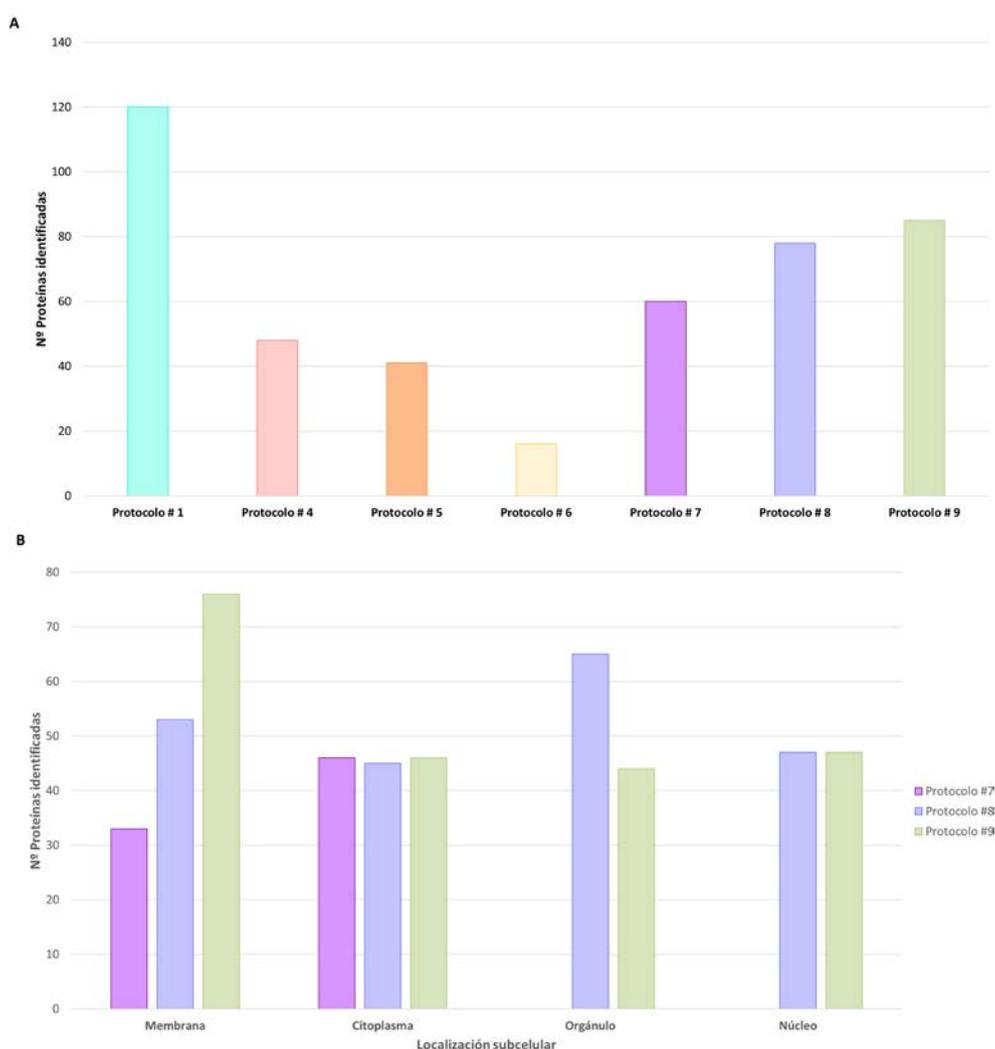


Figura 24: Análisis cuantitativo del número de proteínas detectadas según el método de extracción. A) Estudio a nivel global del rendimiento de identificación proteica según el método. B) Estudio del rendimiento de identificación proteica según el protocolo de fraccionamiento subcelular.

Cuando se realiza esa misma observación para aquellos protocolos de enriquecimiento en proteínas de Mem., hay una mayor detección de proteínas con el protocolo #5 (**Figura 24A**).

En el caso de los protocolos de fraccionamiento subcelular, se detecta un mayor Nº de proteínas en la fracción subcelular de Mem. con el protocolo #9 (76 de 162; 46,9 %), mientras que para

Org. es con el protocolo #8 (65 de 162; 40,1 %) y en el caso de Cit. y Nuc. el Nº de proteínas detectada es similar con cualquiera de ellos (**Figura 24B**).

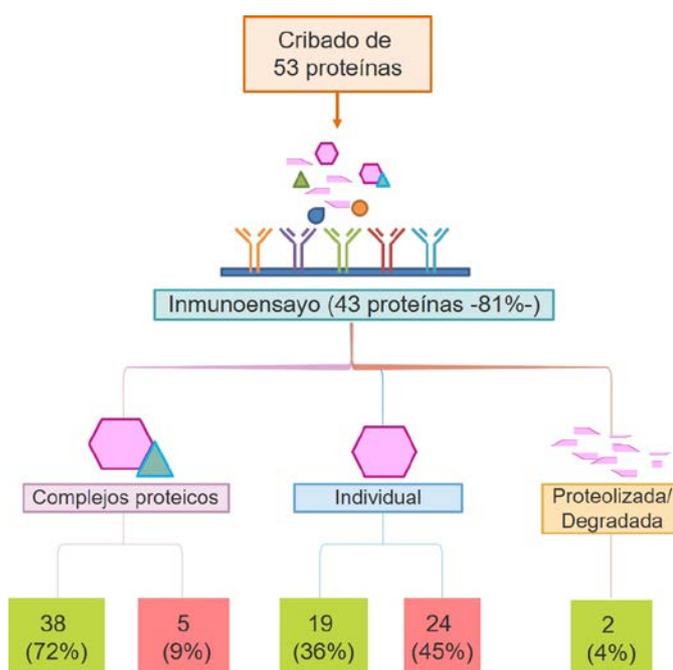
Cabe destacar también, el hecho de que la tendencia de las proteínas detectadas, independientemente del protocolo empleado, presenta una distribución Gaussian (**Figura Suplementaria 7**); donde el menor Nº de proteínas detectadas siempre se da en las fracciones de rangos de PM de mayor o menor tamaño.

2. Determinación de perfiles proteicos.

2.1. Determinación de complejos multiproteicos.

Con el fin de identificar el estado de las proteínas (formando complejos proteicos, de forma individual y/o proteolizada), se seleccionan 53 proteínas involucradas en las rutas de señalización intracelular de interés implicadas directamente en apoptosis celular, senescencia, control del ciclo celular, ruta de señalización del BCR, ruta de señalización de STING, DAMPs, rutas de señalización intracelular mediadas por MAPKs y rutas diana de los fármacos Ibrutinib, Venetoclax y Nutlin-3 α (véase sección 7.1.4 de M&M).

Del total de las 53 proteínas diana seleccionadas, se han detectado un 81,1 % (43 proteínas) mediante SEC-MAP y solamente el 3,8 % (2 proteínas) se han encontrado proteolizadas y/o degradadas (**Figura 25** y **Tabla Suplementaria 12** - Corresponden con la [Figura 3A](#) y la [Tabla S7](#) del anexo IV-).



* En rojo el número de proteínas no detectadas y en verde el número de proteínas detectadas.

Figura 25: Número de proteínas detectadas mediante SEC-MAP.

De modo, que es posible determinar mediante SEC-MAP la presencia de proteínas en el contexto de su tamaño molecular y localización subcelular, tanto para cada proteína individualmente como en complejos o grupos multiproteicos. Obteniéndose como resultado de dicho análisis que (**Tabla Suplementaria 12** - Corresponden con la [Tabla S7](#) del anexo IV-):

1. La metodología de extracción proteica más adecuada para la identificación de perfiles de complejos multiproteicos es el Protocolo #1 (extracción de proteína total).
2. Existe una correlación de los datos obtenidos mediante SEC-MAP, LC-MS/MS y RNA-seq para las proteínas BID, CASP7, CASP8, LYN, SYK, BTK, CDKN1B, DNAJB1, HSPD1, HSP90AA1, HIST1H4A, BAX, BAK1, PAK1|1 y CCNB1.

3. La técnica SEC-MAP permite determinar la presencia de proteínas y sus complejos de acuerdo a su localización subcelular, como, por ejemplo:
 - a. La detección de la proteína BCL-2 en más de un compartimento celular tanto con el protocolo #8 (Mem., Cit., Org., Nuc.) como el #9 (Cit., Org. y Nuc.).
 - b. La proteína RELA en la fracción citoplasmática con el protocolo #7, localización subcelular que se corrobora con la identificación por SEC-MAP para el protocolo #8 y confirmada por LC-MS/MS.
 - c. La proteína MAPK1 en Cit. (protocolos #7 y #8) y Nuc. (protocolo #9). Cuyas localizaciones subcelulares se confirman mediante LC-MS/MS.

Por otro lado, la identificación de complejos proteicos también es posible con la metodología SEC-MAP. En los casos de las rutas de señalización en las que se encuentran involucradas las proteínas diana de los fármacos Venetoclax, Ibrutinib y Nutlin-3 α , con el protocolo #1 se observan interacciones entre todas las proteínas estudiadas, salvo para BTK en el caso de Ibrutinib. Siendo dichas interacciones corroboradas con la base de datos STRING (**Figura 26** y **Archivo I** – Corresponden con la [Figura 4](#) y el [Dataset II](#) del anexo IV -).

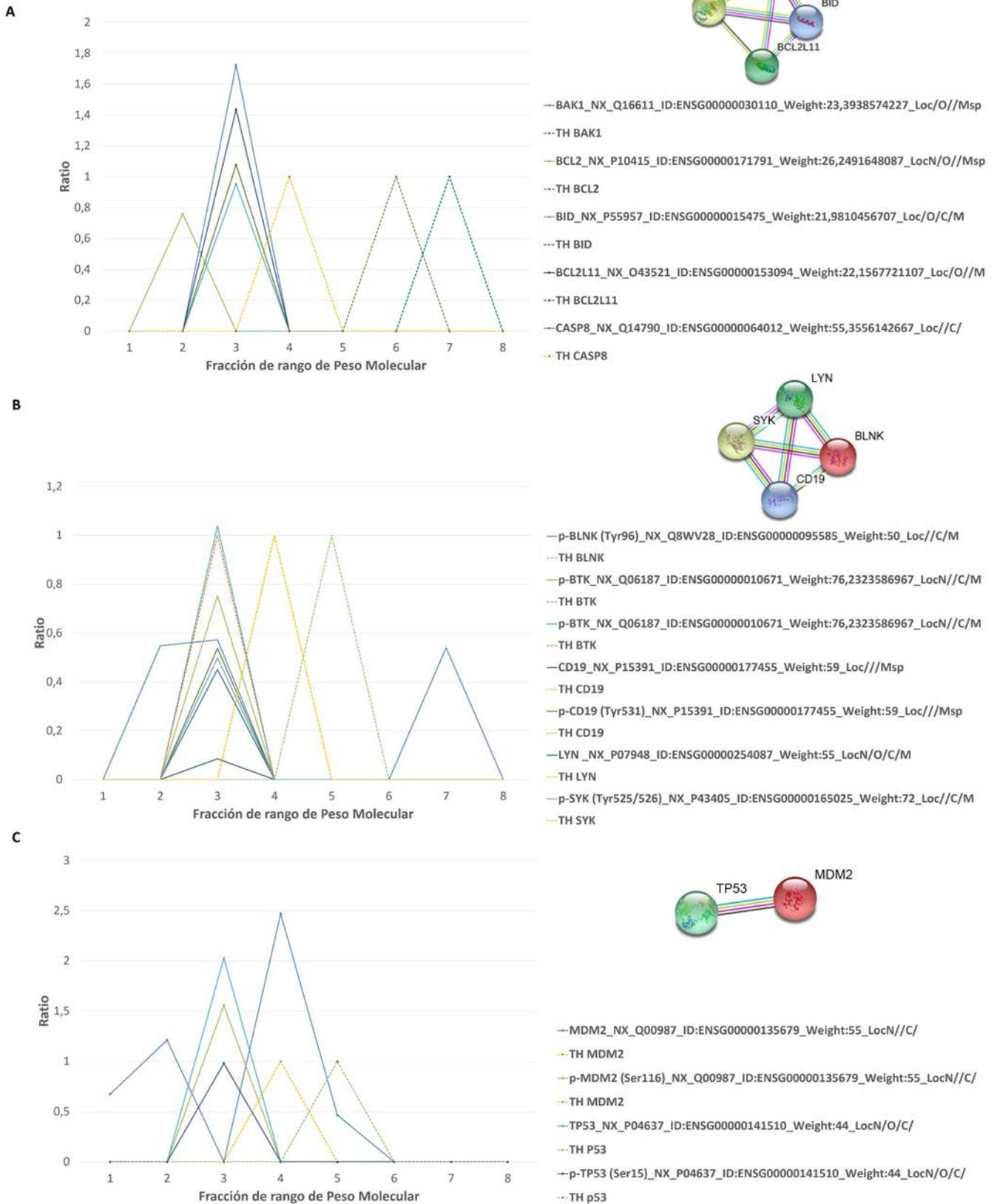
Cuando este mismo análisis se realiza en base a la localización subcelular, la presencia de complejos multiproteicos se encuentran asociados a la señalización por BCR a nivel de Mem., Org., y Nuc. con el protocolo #8 (**Figura 27** y **Archivo I** – Corresponden con la [Figura 5C](#) y el [Dataset II](#) del anexo IV -).

2.2. Determinación de isoformas y modificaciones postraduccionales en los perfiles proteicos.

La presencia de varios Abs incluidos en la micromatriz frente a diferentes epítomos de la misma proteína, permite evaluar PTMs e isoformas debido a la especificidad y/o selectividad de los mismos (**Tabla Suplementaria 13** - Corresponde con la [Tabla S9](#) del anexo IV -).

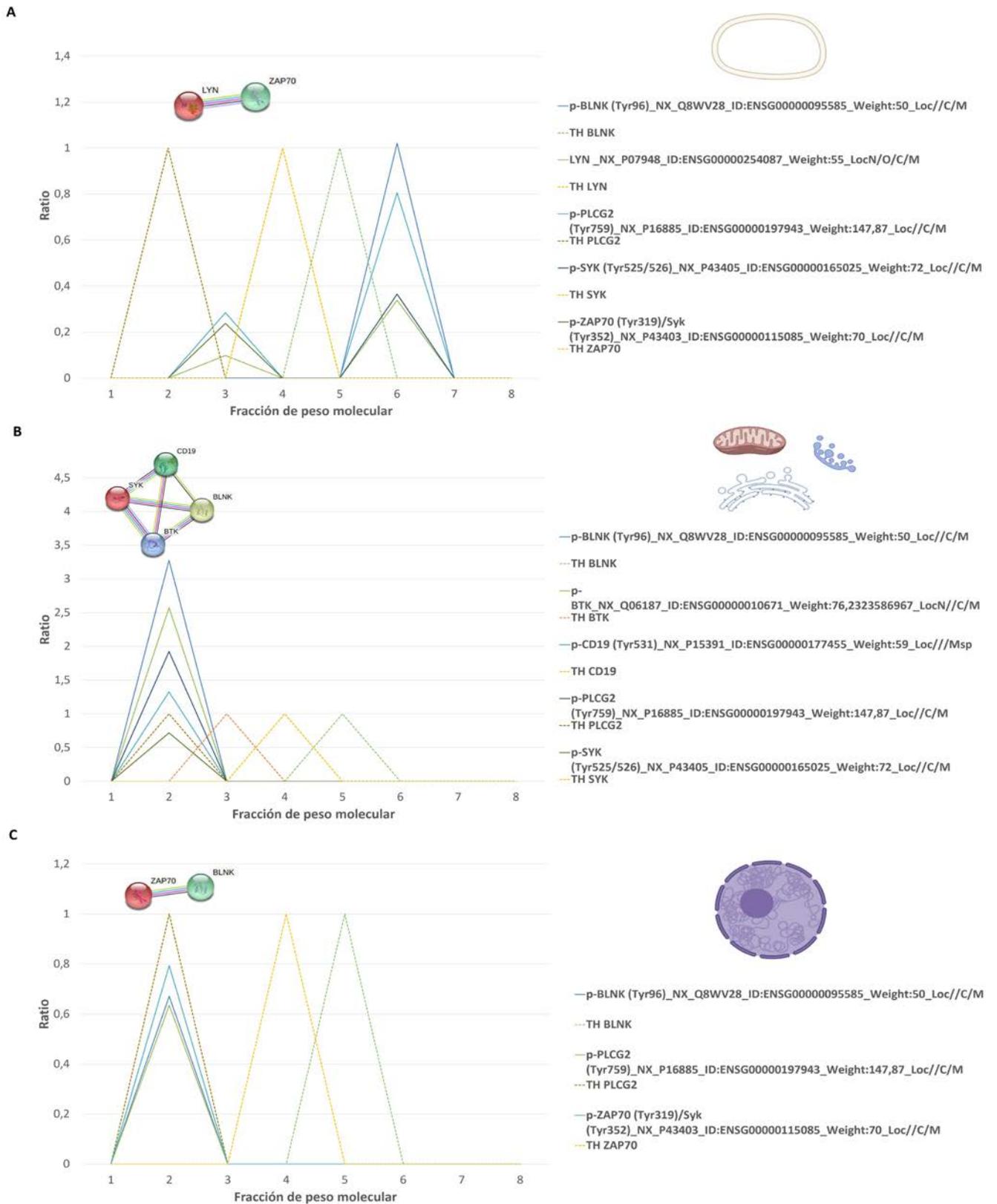
De este modo, es revelada la detección de la proteína FOS en localizaciones subcelulares diferentes según el Abs empleado (**Tabla Suplementaria 13**). En uno de los casos detectada en Org. y Cit. con el protocolo #8 y en Mem., Org. y Nuc. con el protocolo #9.

Además, se identificaron PTMs para las proteínas 4E-BP1, STAT3, MAPK11 (p38) o p53 (TP53) (**Tabla Suplementaria 13**). En el caso de 4E-BP1, el reconocimiento se produjo con un Ab monoclonal (sin restricciones en la detección) en los protocolos #1, #4, #5, #7 (Cit.), #8 (menos en Nuc.) y #9, mientras que la proteína fosforilada en los residuos Thr37 y 46 solo fue detectada con el protocolo #1. Por otro lado, la proteína STAT3 fue identificada independientemente de la PTM que tuviera (fosforilada en el residuo Tyr705) y del método de extracción utilizado (salvo para los protocolos #7 - Mem. - y #9 - Nuc. -). La proteína MAPK11 (p38) fue reconocida con mayor eficiencia por aquellos Abs más selectivos. Demostrando la abundancia relativa de dicha proteína y la isoforma en la que se encuentra mayoritariamente (fosforilada en los residuos Thr180 y Tyr182). Finalmente, la proteína p53 fue únicamente identificada con un Abs policlonal (sin restricciones en la detección) con los protocolos #1, #4 y #9 (Mem.), mientras que su forma fosforilada en el residuo Ser15 fue detectada con un Abs monoclonal únicamente con el protocolo #1.



* La línea discontinua representa la fracción de peso molecular teórico, la continua la fracción en la que se detecta dicha proteína. Los picos indican la detección de la proteína en esa fracción.

Figura 26: Detección de complejos proteicos mediante SEC-MAP para el protocolo #1 y corroboración con STRING. A) Interacciones afectadas por la acción de Venetoclax. B) Interacciones afectadas por la acción de Ibrutinib. C) Interacciones afectadas por la acción de Nutlin-3a.



* La línea discontinua representa la fracción de peso molecular teórico, la continua la fracción en la que se detecta dicha proteína. Los picos indican la detección de la proteína en esa fracción.

Figura 27: Detección de complejos proteicos mediante SEC-MAP según localización subcelular y corroboración con STRING. A) Interacciones encontradas en la fracción subcelular de membrana. B) Interacciones encontradas en la fracción subcelular de orgánulo. C) Interacciones encontradas en la fracción subcelular de núcleo.

3. Integración ortogonal multi-ómica: Diseño y desarrollo.

La propuesta de realizar una integración de los distintos conjuntos de datos ómicos (SEC-MAP, RNA-seq y LC-MS/MS) para la línea celular ramos, permite aportar o discriminar aspectos o perspectivas de interés biológico y/o funcional de utilidad en el diagnóstico, pronóstico o identificación de nuevas dianas. Para ello, teniendo en cuenta las características de cada una de las estrategias metodológicas y biomoléculas de interés, se evalúa la compatibilidad entre ellas por medio de la integración dos a dos de los conjuntos de datos. Así se observa una correlación del 55,90 % de las proteínas caracterizadas por SEC-MAP y LC-MS/MS, un 50,93 % se identifican por SEC-MAP y RNA-seq y un 99,59 % lo hace por RNA-seq y LC-MS/MS (**Tabla Suplementaria 32** - Corresponde con la [Tabla S10](#) del anexo IV -).

Cuando esta correlación se realiza según la clasificación de proteínas establecida por la HUPO (*The Human Proteome Organization*), de acuerdo a su nivel de detección peptídica por LC-MS/MS. De todas las proteínas caracterizadas por RNA-seq y LC-MS/MS del estudio, 5121 forman parte del grupo PE1 (existen evidencias a nivel proteico), 3 al grupo PE2 (hay evidencias a nivel de transcrito) y 3 al grupo PE5 (incierto). En cambio, de las proteínas únicamente detectadas por LC-MS/MS, 518 pertenecían al grupo PE1, 6 al PE2 y 6 al PE5. Todo ello, de acuerdo a la información publicada en la base de datos nexProt 2020.01-17 y recogidas en la **Tabla Suplementaria 14** (Corresponde con la [Tabla S11](#) del anexo IV -).

Finalmente, esta aproximación sistemática permite clasificar cada uno de los datos multi-ómicos junto con la información cuantitativa (a nivel transcriptómico -FPKM- y proteómico -LFQ-), revelando la presencia de 5 grupos que contienen proteínas implicadas en (**Figura 28B**, **Archivo II y Tabla Suplementaria 15** - Corresponden con la [Figura 7](#), el [Dataset I](#) y la [Tabla S12](#) del anexo IV -):

1. Rutas de señalización relacionadas con el Sistema Inmune y metabolismo.
2. Rutas de metabolismo de proteínas y ARN, respuesta celular a estimulación antigénica, reparación a nivel de ADN y del ciclo celular en 4 de los 5 grupos.
3. Rutas implicadas en la organización de la cromatina en 3 de los 5 grupos.

También, se identifican valores cuantitativos relativamente altos para ambas estrategias que implican a proteínas involucradas en el transporte mediado por vesículas (**Figura Suplementaria 3A** - Corresponde con la [Figura S7A](#) del anexo IV -) y biogénesis celular (**Figura Suplementaria 3B** - Corresponde con la [Figura S7B](#) del anexo IV -). Por otro lado, los valores cuantitativos promedios atípicos presentan proteínas involucradas en la homeostasis, replicación del ADN y muerte celular programada (**Figura Suplementaria 3C y D** - Corresponde con la [Figura S7C-D](#) del anexo IV -).

Con respecto a la localización subcelular y sus posibles combinaciones (**Figura Suplementaria 3E-J y Tabla Suplementaria 15** - Corresponden con la [Figura S7E-J](#) y la [Tabla S12](#) del anexo IV -), se observa en el caso de Cit., un grupo de proteínas con valores bajos de LFQ y aumento progresivo de FPKM (**Figura Suplementaria 3E** - Corresponde con la [Figura S7E](#) del anexo IV). Todas ellas, implicadas en procesos de comunicación celular, muerte celular programada y mantenimiento de la homeostasis.

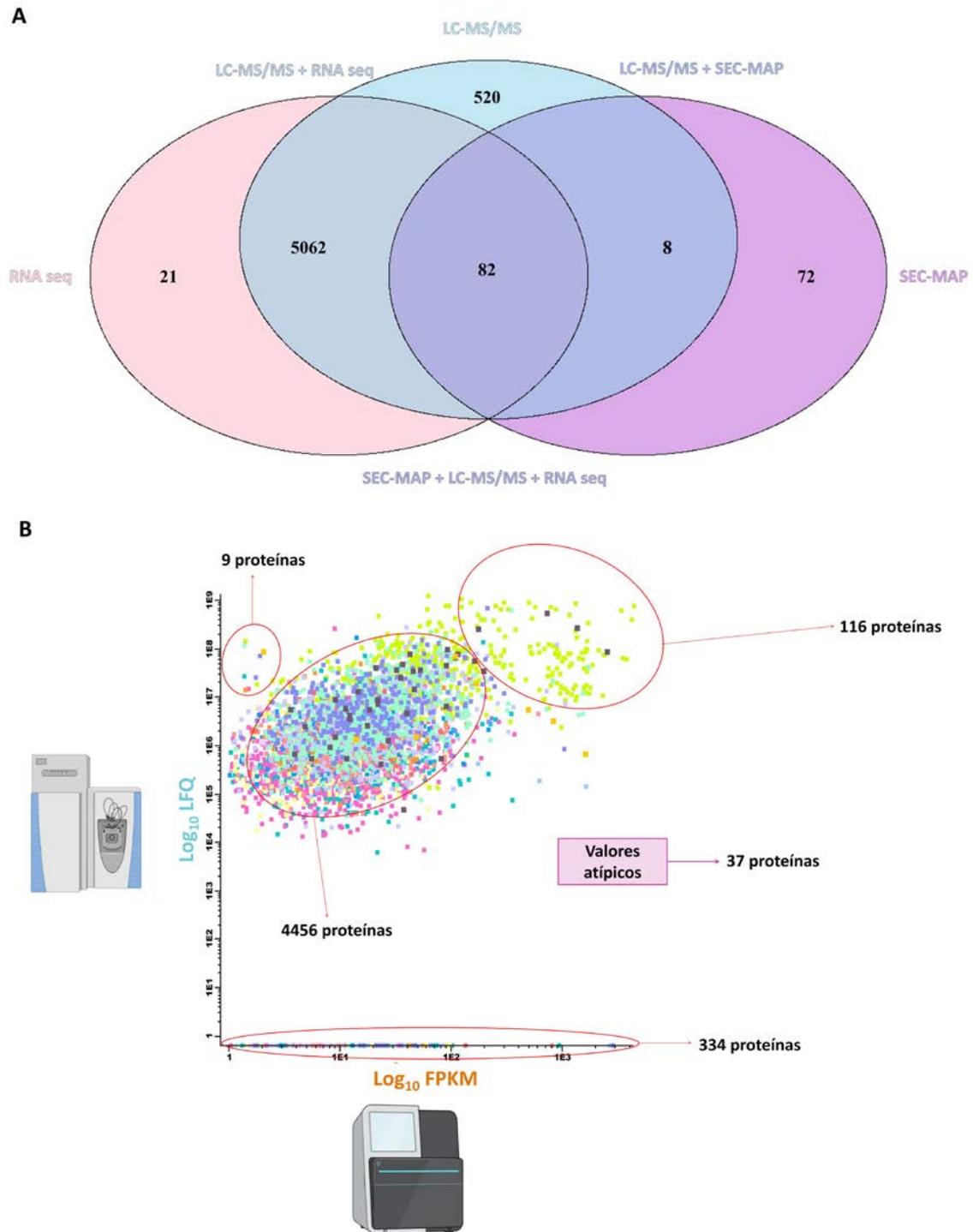
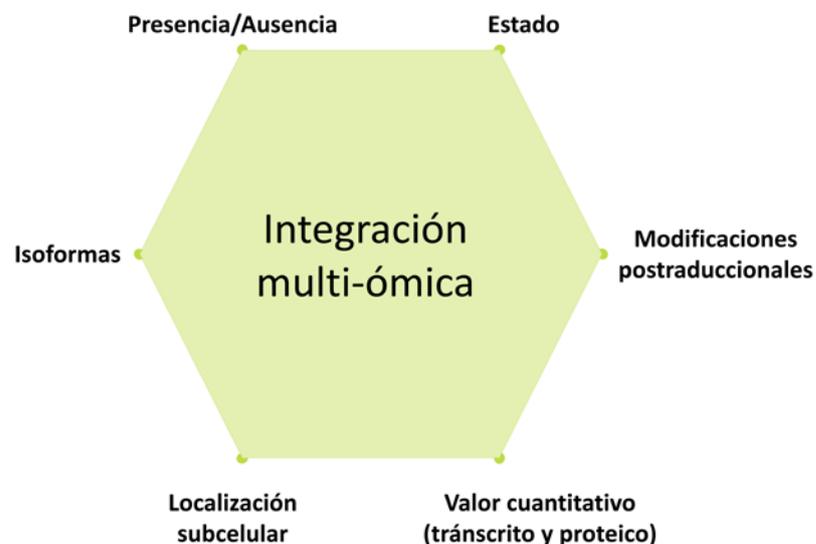


Figura 28: Integración ortogonal multi-ómica. A) Diagramas de Venn (número de proteínas detectadas con cada estrategia de análisis). B) Correlación de péptidos y proteínas tras la integración transcriptómica (RNA-seq) y proteómica (ensayo LC-MS/MS).

Conclusiones

La integración de datos multi-ómicos es dependiente de los aspectos metodológicos básicos de cada metodología, tanto a nivel experimental como de detección.

- La estrategia utilizada para la extracción de proteínas y su conjugación con biotina afecta en la detección por SEC-MAP. Esto es debido a las propiedades y características químicas de los compuestos utilizados y cualidades de las proteínas (solubilidad, características químicas, etc.) o influencia en los sitios de unión del Ag al Ab, entre otras muchas particularidades. Cabe destacar que, aunque la abundancia relativa de las proteínas difiere del método utilizado, esta no genera ningún sesgo en cuanto a la distribución de las proteínas extraídas por rango de PM y fracción subcelular. Donde el mejor protocolo para la detección de proteínas y del estado de las mismas, se atribuye a un protocolo de proteína total (Protocolo #1). En cambio, para el enriquecimiento en proteínas de Mem., el mejor método de extracción es el protocolo #5 y para determinar la localización subcelular, cualquiera de los protocolos de 4 fracciones puede ser utilizado (aunque a nivel de Mem. y Org. presentan eficiencias diferentes).
- La estrategia SEC-MAP permite:
 - o La identificación de la localización subcelular y fracción de rango de PM de las proteínas. Cuya información es corroborada a nivel peptídico (LC-MS/MS) y de transcrito (RNA-seq).
 - o La evaluación de interacciones proteína-proteína y su seguimiento a través de los compartimentos celulares.
 - o El estudio de complejos proteicos, isoformas y PTMs relevantes en las rutas de señalización involucradas en el desarrollo de linfomas y/o cánceres.
- La integración multi-ómica aporta información acerca de la presencia/ausencia de las proteínas, cuantificación transcriptómica y proteómica, localización subcelular, estado proteico, PTMs e identificación de isoformas (**Esquema 7**).



Esquema 7: Integración ortogonal multi-ómica.

Capítulo 2: Alteraciones en el balance de los factores inmunológicos solubles en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica y Linfocitosis B Monoclonal. Papel del microambiente tumoral.

Alicia Landeira-Viñuela¹, Carlota Arias-Hidalgo¹, Pablo Juanes-Velasco¹, Miguel Alcoceba², Almudena Navarro-Bailón², Carlos Eduardo Pedreira³, Quentin Leclercq¹, Laura Díaz-Muñoz¹, José Manuel Sánchez-Santos⁴, Ángela-Patricia Hernández^{1,5}, Marina L. García-Vaquero¹, Rafael Góngora¹, Javier De Las Rivas⁶, Marcos González², Alberto Orfao¹, Manuel Fuentes^{1,7}

¹ Departamento de Medicina y Servicio General de Citometría, CIBERONC-CB16/12/00400, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) e IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

² Departamento de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, CIBERONC-CB16/12/00233, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) e IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

³ Departamento de Sistemas y Computación (COPPE-PESC), Universidad Federal de Río de Janeiro (UFRJ), 21941-914, Río de Janeiro, Brasil.

⁴ Departamento de Estadística, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España

⁵ Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Sección de Química Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

⁶ Grupo de Bioinformática y Genómica Funcional, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) e IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

⁷ Unidad de Proteómica, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) e IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

Frontiers in Immunology. 13:965905.

Doi: 10.3389/fimmu.2022.965905

Introducción

La CLL es una de las leucemias más comunes en los países occidentales en edad adulta, en la que los pacientes presentan fuertes anomalías en la vigilancia inmune tanto a nivel de respuesta innata como adaptativa. Esta desregulación tiene especial relevancia en el inicio, así como durante la evolución y respuesta a tratamiento. Por dichos motivos, se han llevado a cabo estudios sobre el papel de los LT, células nodrizas, células dendríticas (CD) o las células del estroma de la MO a nivel de inmuno-vigilancia tumoral y patogénesis. Se ha observado que las B-CLLs necesitan de las interacciones con el microambiente tumoral para poder sobrevivir y proliferar. Estas interacciones generan una red bidireccional entre las B-CLLs y otros tipos celulares presentes en el microambiente, a través de los cuales conduce a la manipulación y alteración del equilibrio de citocinas y puntos de control inmunológicos, desencadenando el desarrollo y la progresión de la enfermedad. Todo ello, aumenta la tolerancia inmunológica ante dichas B-CLLs, quienes adquieren la capacidad de evasión de la respuesta inmunitaria, provocando la ruptura de la homeostasis y, por consiguiente, la supervivencia de las mismas.

Objetivos

En este estudio el objetivo principal es dilucidar los perfiles de los factores inmunológicos solubles (citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento/regulación, puntos de control inmunitario y receptores solubles) relacionados con el microambiente tumoral, según el estadio de la enfermedad y el factor pronóstico asociado al estado mutacional de la IGHV.

Resultados

Con el fin de identificar los perfiles proteicos diferenciales en el suero de pacientes con CLL o estadio previo de la enfermedad (MBL), se llevó a cabo el estudio de 103 proteínas que fueron agrupadas en los siguientes tres conjuntos de proteínas solubles (**Tabla Suplementaria 2** - Corresponde con la [Tabla 2](#) del anexo V -):

- Conjunto 1: citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento/reguladores y receptores solubles).
- Conjunto 2: puntos de control inmunológico solubles relacionados con LT.
- Conjunto 3: puntos de control inmunológico solubles relacionados con las células NK.

I. Perfil de factores inmunológicos solubles según diagnóstico y evolución de la enfermedad.

I.I Tendencia de los factores inmunológicos solubles evaluados y su implicación a nivel biológico.

En base a las variaciones cuantitativas observadas para cada uno de los conjuntos según el grupo diagnóstico, se observa que:

- a. Para el conjunto 1. El 18,46 % (12/65) de las proteínas solubles presentan una desviación cuantitativa aumentada respecto a los valores promedio de concentración para dicho grupo (sIL-2R, IL-16, CXCL5/ENA-78, CXCL12/SDF-1 α , CXCL13/BLC, CCL2/MCP-1, CCL22/MDC, CCL24/Eotaxin-2, sTRAIL, sTWEAK, sCD30 o sAPRIL) y un 15,38 % (10/65) muestra valores cuantitativos inferiores (IL-1 α , IL-7, IL-8, IL-10 o CX3CL1/Fractalkine entre otros) (**Figura 29A**).
- b. Para los conjuntos 2 y 3. El 21,05 % (8/38) de las proteínas solubles presentan concentraciones promedio más elevadas (sTIM3, sBTLA, sPD-L2, sCD27, sCD155/sPVR, sCD276/sB7-H3, sPerforin, o sE-Cadherin) que el resto de proteínas presentes en dichos grupos, mientras que el 18,42 % (7/38) tienen concentraciones más bajas que los valores promedio observados para dichos grupos (sCD47/sIAP, sCD48/sBLAST-1, sCD134/sOX40, sPD-L1, sMICA, sMICB, sArginase-1)(**Figura 29B y C**).

También se evaluó la tendencia de dichas proteínas en base al diagnóstico y la evolución de la enfermedad, junto con su correspondiente enriquecimiento proteico. Cuya información se encuentra recogida en la **Figura suplementaria 8** (Corresponde con la [Figura S2](#) del anexo V -) y **Tabla suplementaria 20** (Corresponde con la [Tabla S2](#) del anexo V), respectivamente, para cada uno de los grupos clínico-biológicos.

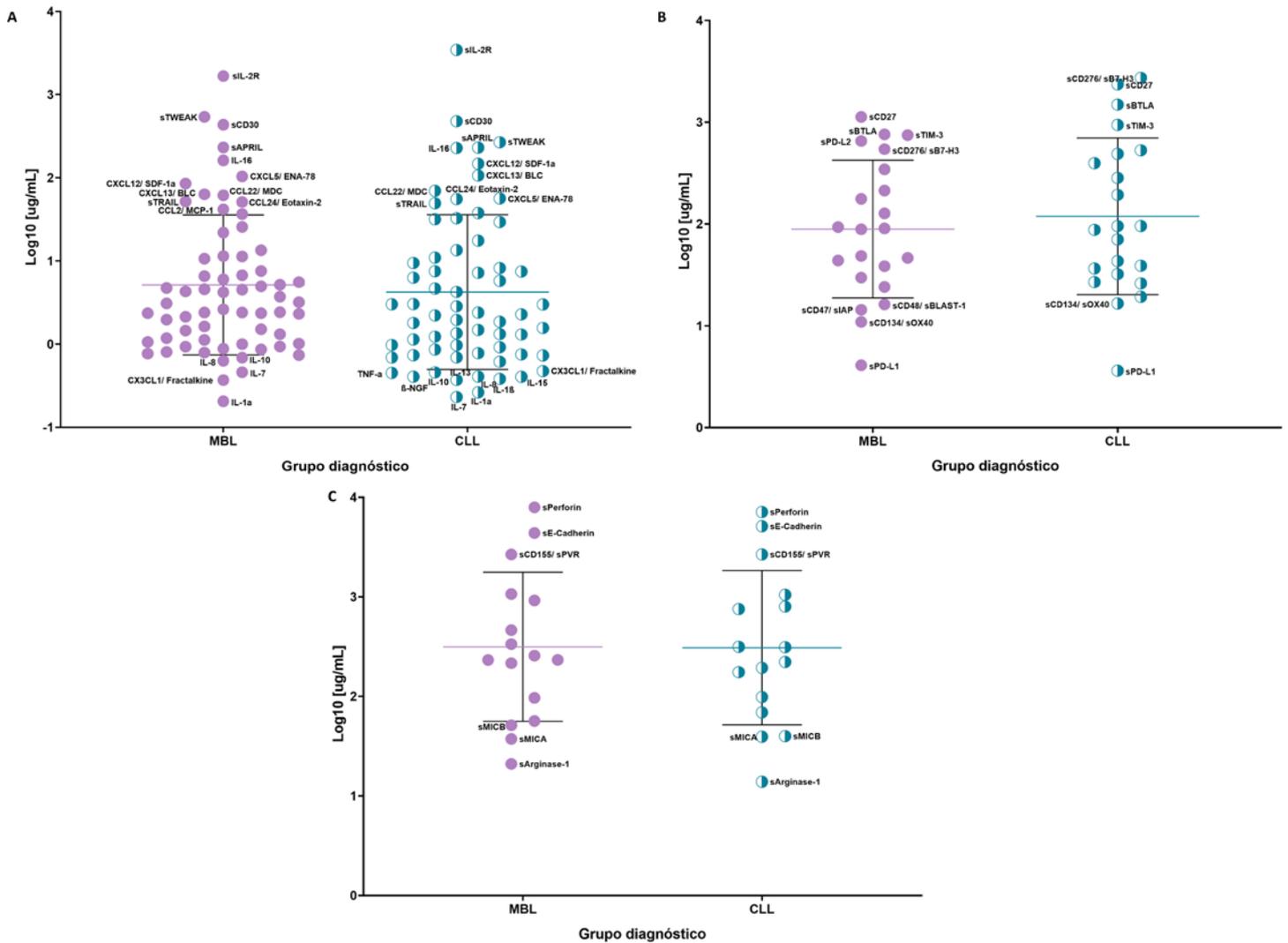


Figura 29: Distribución del promedio de la concentración para el grupo diagnóstico. A) Conjunto 1: Citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento/regulación y receptores solubles. B) Conjunto 2: Puntos de control inmunológico solubles relacionados con linfocito T. C) Conjunto 3: Puntos de control inmunológico solubles relacionados con célula NK.

1.2 Estudio del perfil diferencial de factores inmunológicos solubles.

Al evaluar por estadística clásica dichas proteínas solubles, se identificaron diferencias significativas entre los grupos diagnóstico para sTIMD-4, sCD27, sCD47/sIAP, IL-13 e IL-31 (**Figura 30A y Tabla suplementaria 33** - Corresponden con la [Figura S3A](#) y [Tabla S3](#) del anexo V -). Estas se encuentran implicadas en la organización de la matriz extracelular, comunicación célula a célula o en la señalización mediada por citocinas entre otras funciones (**Tabla suplementaria 21** - Corresponde con la [Tabla S4](#) del anexo V -).

Cuando las diferencias significativas se determinaban entre los grupos diagnóstico y la evolución de la enfermedad, se observa que ciertas proteínas presentan variaciones cuantitativas ascendentes con la progresión de la enfermedad (sTIMD-4, sGalectin-9, s4-1BB o sCD134/sOX40) (**Figura 30B y C y Tabla suplementaria 33** - Corresponden con la [Figura S3B-C](#) y [Tabla S3](#) del anexo V -). Estas se encuentran implicadas en el reclutamiento celular ante una respuesta pro-inflamatoria, regulación de la muerte y ciclo celular y quimiotaxis (**Tabla suplementaria 22** - Corresponde con la [Tabla S5](#) del anexo V -).

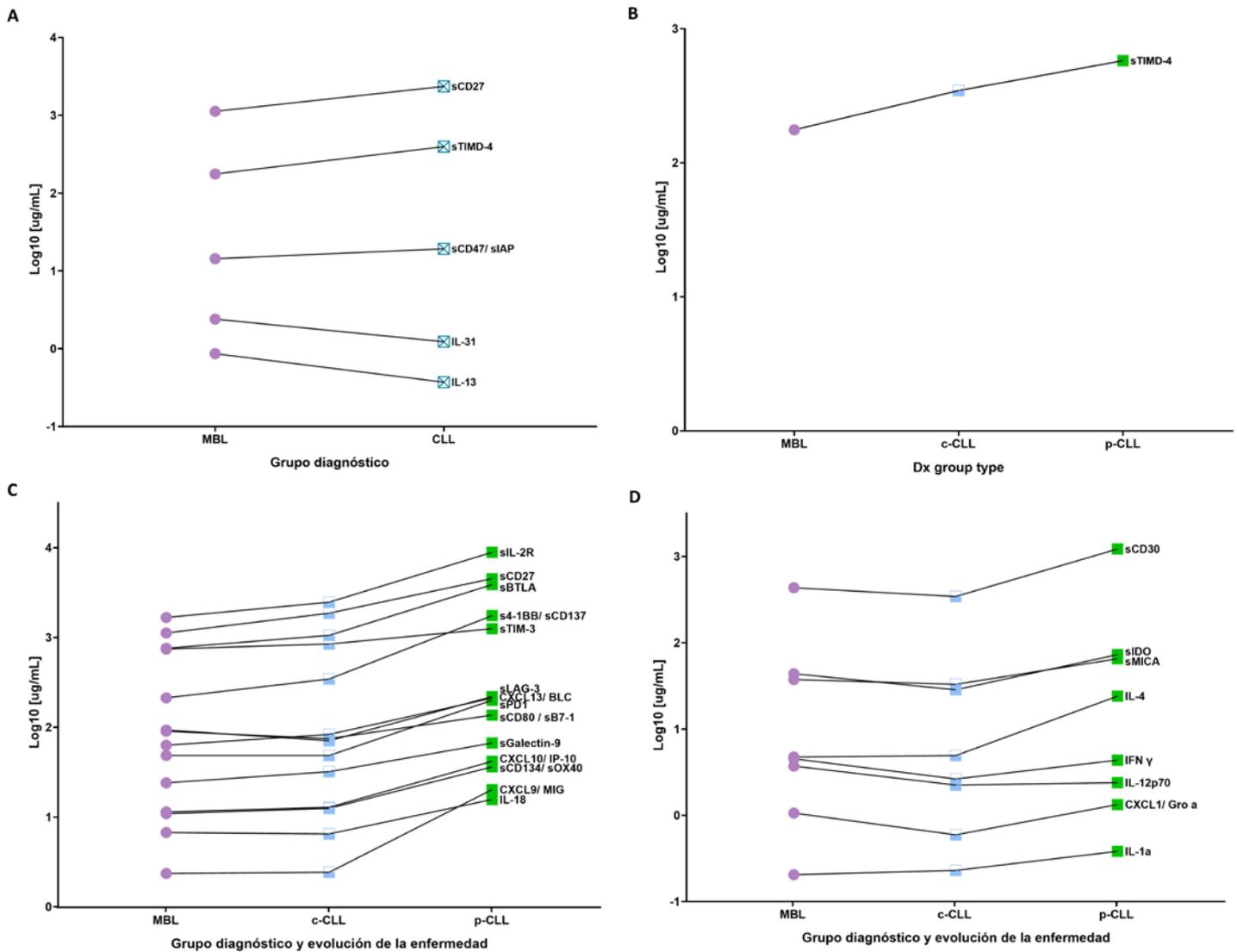


Figura 30: Perfil diferencial de las proteínas solubles. A) Proteínas significativas para la comparativa según grupo diagnóstico. B) Proteínas significativas para todas las comparativas entre linfocitosis B monoclonal (MBL) y evolución de la enfermedad. C) Proteínas significativas para todas las comparativas entre progresión de la enfermedad (p-CLL) y resto de estadios. D) Proteínas significativas para la comparativa entre estadios de evolución de la enfermedad (c-CLL vs. p-CLL).

Por el contrario, había otras proteínas significativas cuyas concentraciones promedio disminuían al iniciarse la enfermedad (sCD30, INF-γ y sIDO) (Figura 30D y Tabla suplementaria 33 - Corresponden con la Figura S3D y Tabla S3 del anexo V -); y son responsables de la señalización intracelular del INF-γ, coestimulación mediada por CD28, catabolismo del triptófano o sinapsis inmunitaria entre otras muchas funciones biológicas (Tabla suplementaria 22 - Corresponde con la Tabla S5 del anexo V -). Asimismo, el 34,8 % (8/23) de las proteínas significativas al comparar la evolución de la enfermedad fueron únicas para dicha comparación (c-CLL vs. p-CLL) (sCD30, IL-1 α, IL-4, IL-12p70, INF-γ, CXCL1/Gro-α, sIDO y sMICA) (Tabla suplementaria 33 y Tabla suplementaria 21 – Corresponden con la Tabla S3 y Tabla S4 del anexo V -).

I.3 Evaluación de los factores inmunológicos solubles implicados en la regulación de la Interleucina 4.

La IL-4 es una citocina con varias funciones biológicas importantes como, por ejemplo, la defensa ante infecciones por virus, regulación negativa de la ruta de señalización PI3K/AKT o en la regulación de los LT y granulocitos (basófilos, eosinófilos, mastocitos).

Esta citocina presenta un perfil diferencial al comparar la evolución de la enfermedad; por lo que al estudiar de forma pormenorizada las concentraciones para cada uno de los grupos clínico-biológicos y otras proteínas involucradas en su regulación (IL-9, CD28 y CD40L) se observa (**Figura 31** - Corresponde con la [Figura 2](#) del anexo V -):

- Una disminución progresiva de las concentraciones en suero para sCD40L.
- Un descenso de los niveles en suero de sCD28 al desarrollarse la enfermedad y un aumento de los mismos cuando la enfermedad progresa. De forma contraria a lo que ocurre con los niveles de IL-9, quien aumenta sus concentraciones al desarrollar la enfermedad y los disminuye con la progresión.
- Las concentraciones séricas de IL-4 se mantienen en pacientes de MBL y c-CLL y aumentan con la progresión de la enfermedad (p-CLL).

I.4 Potencial panel diferencial de factores inmunológicos solubles.

Tras el análisis de correlaciones de las proteínas consideradas diferenciales con los análisis estadísticos clásico (**Tabla Suplementaria 17**), lineal (**Tabla Suplementaria 18** - Corresponde con la [Tabla S8](#) del anexo V -) y por mRMR (**Tabla Suplementaria 19** - Corresponde con la [Tabla S7](#) del anexo V -) se obtiene:

- Un panel de 5 proteínas solubles (sCD47/sIAP, sCD27, sTIMD-4, sIL-2R y sULBP-1) capaz de clasificar las muestras en el grupo MBL con un 90 % de aciertos y con un 71 % de aciertos en el grupo CLL (**Figura Suplementaria 5A** - Corresponde con la [Figura S8A](#) del anexo V -). Con puntos de corte para clasificar las muestras en el grupo de MBL de $\geq 1716,48 \text{ pg/mL}$ para sTIMD-4 o de $< 1975,5 \text{ pg/mL}$ para sULBP-1. Asimismo, para clasificarlas en el grupo CLL, se obtienen puntos de corte de $< 1716,48 \text{ pg/mL}$ para sTIMD-4, $\geq 2317,44 \text{ pg/mL}$ para sCD27, $< 619,99 \text{ pg/mL}$ para sIL-2R o $\geq 1975,5 \text{ pg/mL}$ para sULBP-1 (**Figura 32A** - Corresponde con la [Figura 3](#) del anexo V -).
- Un panel de 6 proteínas solubles (sCD27, sCD48/sBLAST-1, sArginase-1, sLAG-3, IL-4 y sIL-2R) que clasifica las muestras con un porcentaje de aciertos del 90 %, 76 % y 79 % en los grupos MBL, c-CLL y p-CLL respectivamente (**Figura Suplementaria 5B** - Corresponde con la [Figura S8B](#) del anexo V -). Cuyos puntos de corte son para (**Figura 32B** - Corresponde con la [Figura 4](#) del anexo V -):
 - sCD27 de $\geq 618,73 \text{ pg/mL}$ para c-CLL, $< 618,73 \text{ pg/mL}$ para MBL y $\geq 2579 \text{ pg/mL}$ para p-CLL.

- sArginase-1 de $\geq 443,64 \text{ pg/mL}$ para MBL, $\geq 14,14 \text{ pg/mL}$ para c-CLL o de $\geq 39,05 \text{ pg/mL}$ cuando los niveles de sCD48/sBLAST-1 son $< 14,56 \text{ pg/mL}$ y $< 14,14 \text{ pg/mL}$ para p-CLL.
- sLAG-3 con $\geq 468,22 \text{ pg/mL}$ para MBL y $< 468,22 \text{ pg/mL}$ para p-CLL.
- sIL-4 con $\geq 134,61 \text{ pg/mL}$ para c-CLL.
- sIL-2R para niveles en suero $\geq 619,98 \text{ pg/mL}$ para MBL y $< 619,98 \text{ pg/mL}$ para c-CLL.

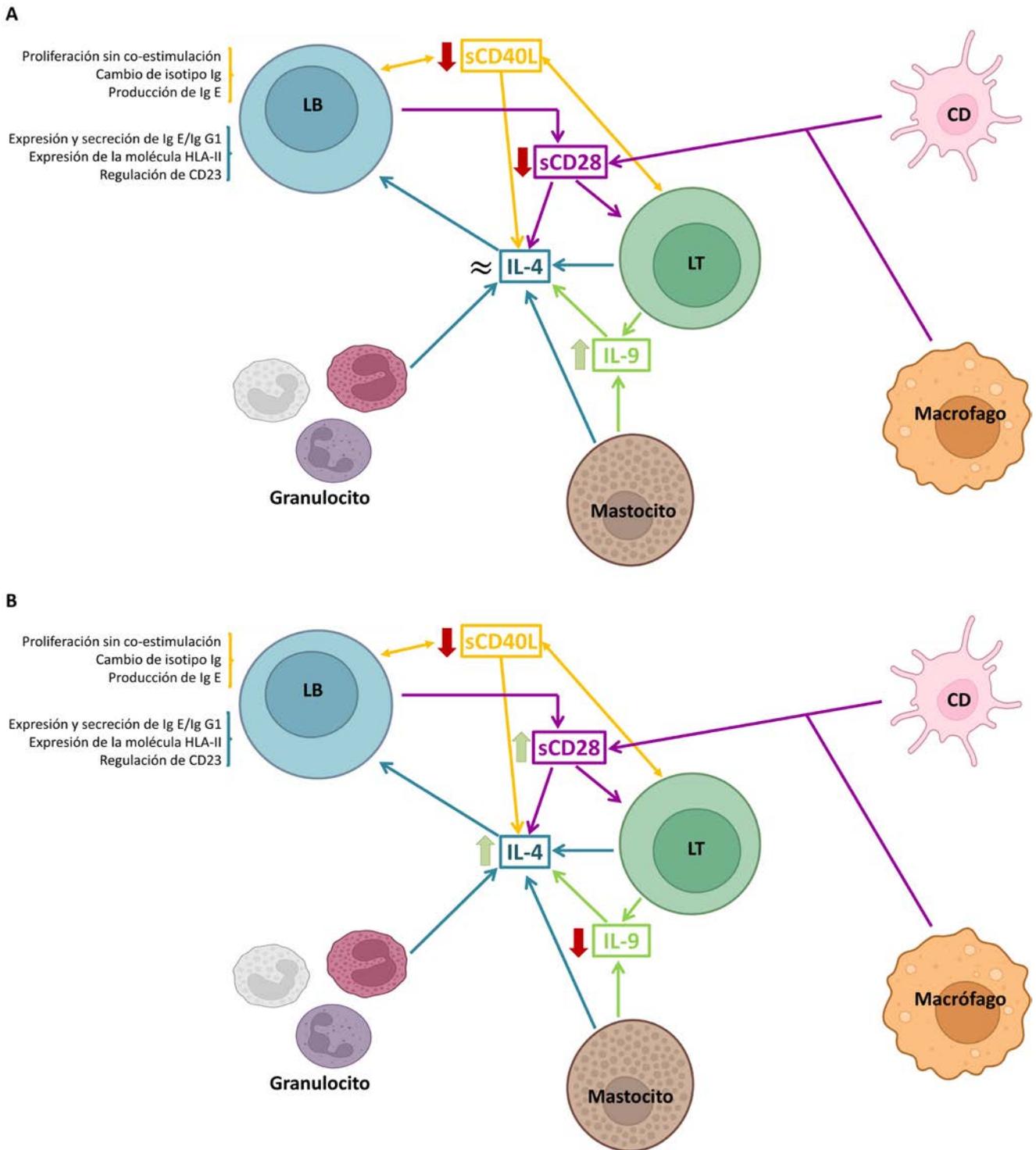
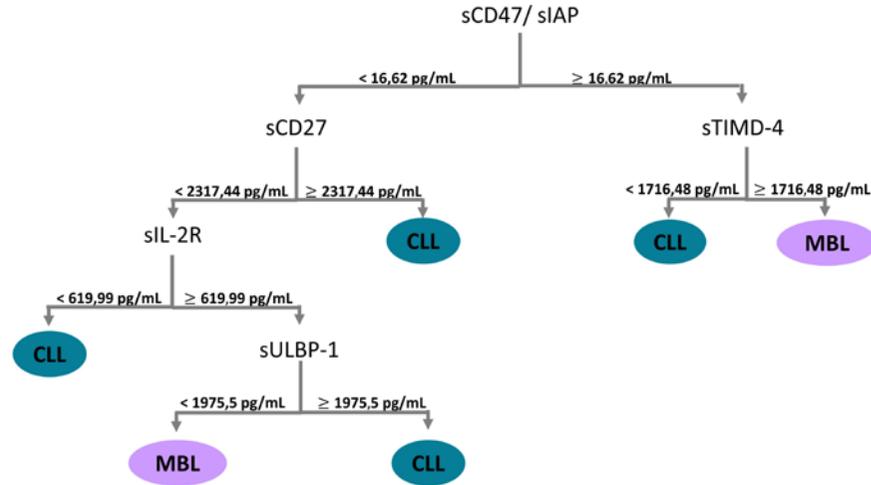


Figura 31: Modelo del perfil diferencial de IL-4 en el microambiente tumoral. A) Tendencia observada en la comparativa Linfocitosis B Monoclonal vs. Leucemia Linfocítica Crónica estable. B) Tendencia observada en la comparativa Leucemia Linfocítica Crónica estable vs. progresión.

A



B

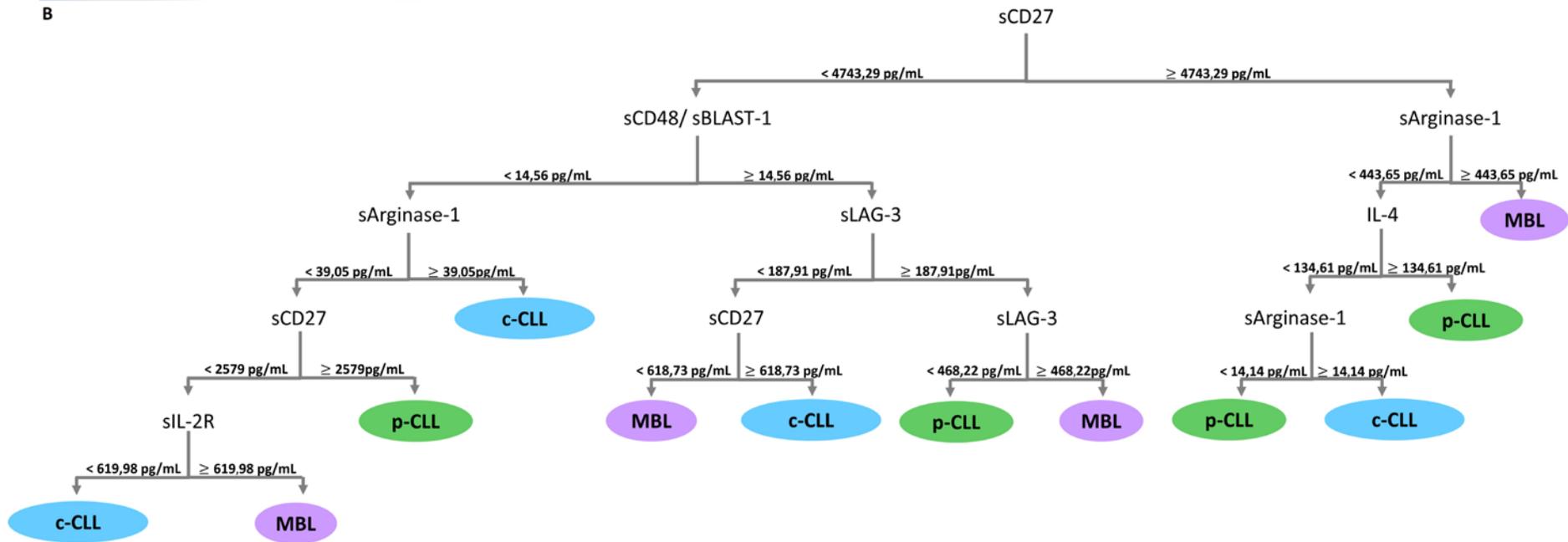


Figura 32: Panel de proteínas diferenciales. A) Clasificación de la cohorte de estudio según diagnóstico. B) Clasificación de la cohorte de estudio según diagnóstico y evolución de la enfermedad.

- b. Para los conjuntos 2 y 3. El 23,68 % (9/38) de las proteínas solubles tienen concentraciones más elevadas (sCD276/sB7-H3, sPD-L2, sPerforin, proteínas de adhesión -sE-Cadherin y sCD155/sPVR -y receptores - sTIM3, sBTLA, sCD27-), mientras que el 21,05 % (8/38) presenta concentraciones más bajas que los valores promedio observados para dichos grupos (sCD47/sIAP, sCD48/sBLAST-1, sCD134/sOX40, sPD-L1, sMICA, sMICB, sArginase-1 y sULBP-3)(**Figura 33B y C**).

Asimismo, para cada una de dichas proteínas se evaluó la tendencia y se realizó un enriquecimiento proteico, los cuales pueden verse resumidos en la **Figura Suplementaria 9** y **Tabla Suplementaria 23** (Corresponden con la [Figura S10](#) y [Tabla S9](#) del anexo V -). Siendo la tendencia mayoritaria de dichas proteínas para el grupo CLL-PFT ascendente, mientras que dichos niveles en suero descienden tras el tratamiento (CLL-TFT). Estando la mayor parte de ellas relacionadas con las rutas de señalización intracelular de PI3K/AKT, senescencia celular, procesos de modificaciones postraduccionales de fosforilación o en defensa ante infecciones víricas.

2.2 Estudio del perfil diferencial de los factores inmunológicos solubles.

La estadística convencional revela a sLAG-3 y sPD-1 como proteínas significativas para las comparativas MBL vs. CLL-PFT y entre las comparativas c-CLL vs. CLL-PFT/CLL-TFT. Por otro lado, sIL-2R, CXCL9/MIG, s4-1BB/sCD137 y sBTLA son diferenciales para las comparativas entre CLL-PFT vs. MBL/c-CLL, mientras que para las comparativas c-CLL vs. CLL-PFT/CLL-TFT son las proteínas IL-4 e INF- γ . Finalmente, como proteínas diferenciales únicas para la comparativa MBL vs. CLL-PFT se encuentra la proteína sTIMD-4 y para la comparativa c-CLL vs. CLL-PFT las proteínas CXCL10/IP-10, CXCL13/BLC, CCL3/MIP-1 α , sIDO, sCD30 e IL-18 (**Tabla Suplementaria 33 y Figura 34** - Corresponden con la [Tabla S3](#) y [Figura S11](#) del anexo V -).

Dichas proteínas se encuentran relacionadas en su mayoría con las rutas de señalización de coestimulación mediada por la familia de receptores CD28 y señalización inmune. Cabe destacar, que como rutas de señalización diferencial para la comparativa c-CLL vs. CLL-PFT se encuentra las vías de señalización relacionadas con el metabolismo de aminoácidos y la muerte celular programada (**Tabla Suplementaria 24** - Corresponde con la [Tabla S10](#) del anexo V -).

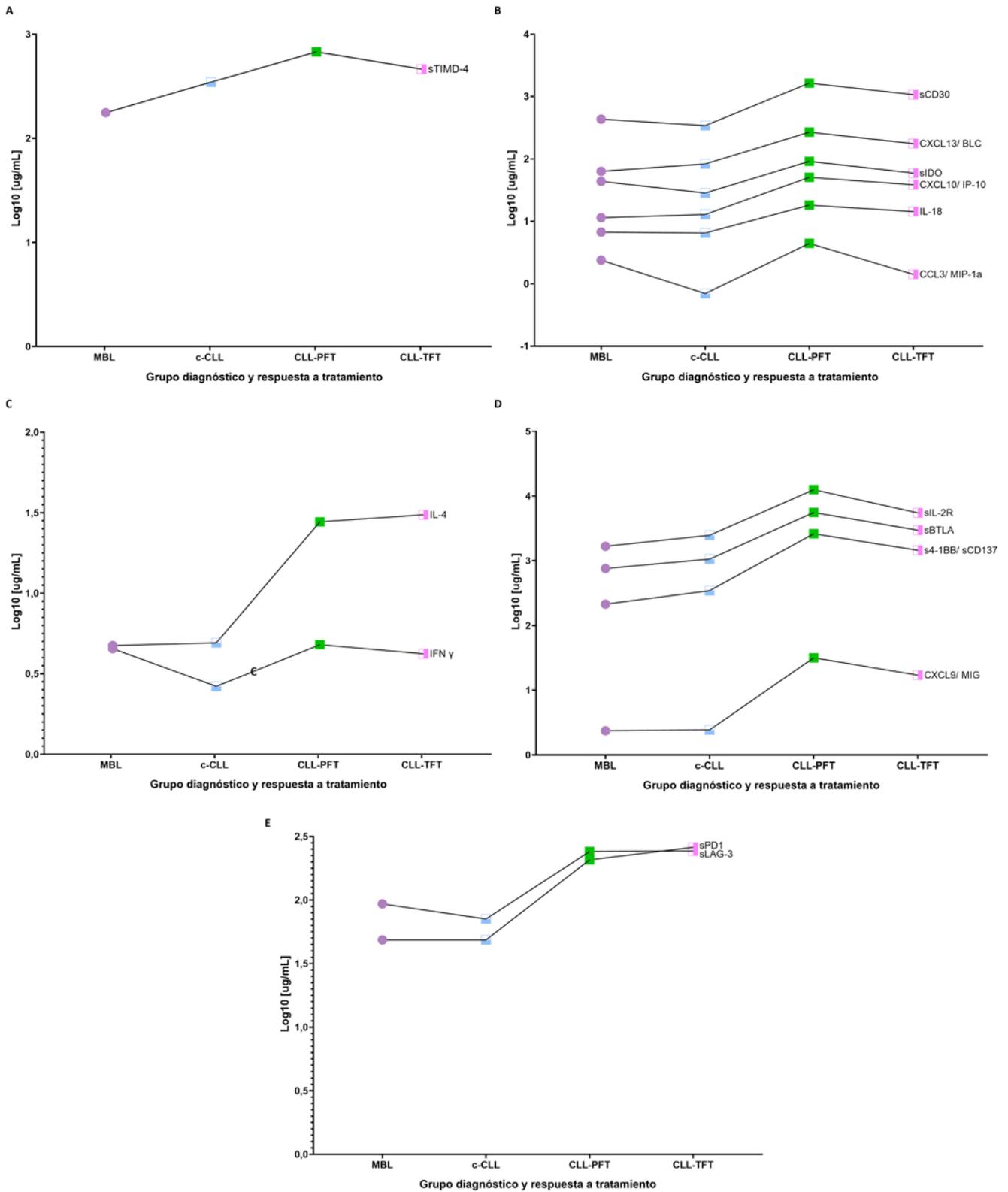


Figura 34: Perfil diferencial de las proteínas solubles. A) Proteínas significativas para la comparativa Linfocitosis B Monoclonal (MBL) y Leucemia Linfocítica Crónica previa a 1ª línea de tratamiento (CLL-PFT). B) Proteínas significativas para la comparativa entre Leucemia Linfocítica Crónica estable (c-CLL) y CLL-PFT. C) Proteínas significativas para las comparativas c-CLL vs. CLL-PFT o Leucemia Linfocítica Crónica tras 1ª línea de tratamiento (CLL-TFT). D) Proteínas significativas para la comparativa MBL vs. CLL-PFT y c-CLL vs. CLL-PFT o CLL-TFT.

2.3 Evaluación de los factores inmunológicos solubles implicados en la regulación de la Interleucina 4.

El estudio de los perfiles de IL-4 en suero durante el diagnóstico y la respuesta a tratamiento revelan una (**Figura 35** - Corresponde con la [Figura 5](#) del anexo V -):

- Disminución de los niveles en suero para las proteínas IL-9 y sCD40L a medida que la enfermedad es más severa (CLL-PFT y CLL-TFT).
- Una disminución de las concentraciones de IL-4 tras haber recibido tratamiento.
- Un incremento progresivo de los niveles de sCD28 a medida que el estadio es más avanzado.

2.4 Potencial panel diferencial de factores inmunológicos solubles.

Al igual que en el caso anterior, el análisis de correlaciones de las proteínas diferenciales por estadística (**Tabla Suplementaria 17 y Tabla Suplementaria 18**) y por mRMR (**Tabla Suplementaria 19**) permite la obtención de un panel con 7 proteínas solubles (sIL-2R, sTIMD-4, sSiglec-9, INF- γ , SPD-L1, sCD48/sBLAST-1 y sLAG-3) que clasifica las muestras con un porcentaje de aciertos del 93 % para MBL, 48 % para c-CLL, 95 % para CLL-PFT y 100 % para CLL-TFT (**Figura Suplementaria 5C** - Corresponde con la [Figura S8C](#) del anexo V -).

Dicho panel presenta como puntos de corte para (**Figura 36** - Corresponde con la [Figura 6A](#) del anexo V -):

- sCD48/sBLAST-1 de $\geq 14,56$ *pg/mL* para c-CLL.
- sSiglec-9 de $\geq 330,32$ *pg/mL* para MBL o de $< 352,41$ *pg/mL* cuando los niveles de sCD48/sBLAST-1 son $< 14,56$ *pg/mL*, mientras que para CLL-TFT los niveles son $< 618,73$ *pg/mL* y de $\geq 352,41$ *pg/mL* para c-CLL cuando los niveles de INF- γ son $\geq 2,27$ *pg/mL*.
- SPD-L1 de $\geq 3,39$ *pg/mL* para CLL-PFT y $< 3,39$ *pg/mL* para CLL-TFT cuando los niveles de sSiglec-9 son $< 276,37$ *pg/mL*. Por el contrario, cuando los niveles de sSiglec-9 son $\geq 276,37$ *pg/mL*, entonces el punto de corte para SPD-L1 es $\geq 12,73$ *pg/mL* para CLL-TFT.
- sLAG-3 con $\geq 348,13$ *pg/mL* para MBL y $< 348,13$ *pg/mL* para c-CLL.
- sTIMD-4 con $\geq 251,38$ *pg/mL* para CLL-PFT y de $< 251,38$ *pg/mL* para MBL.

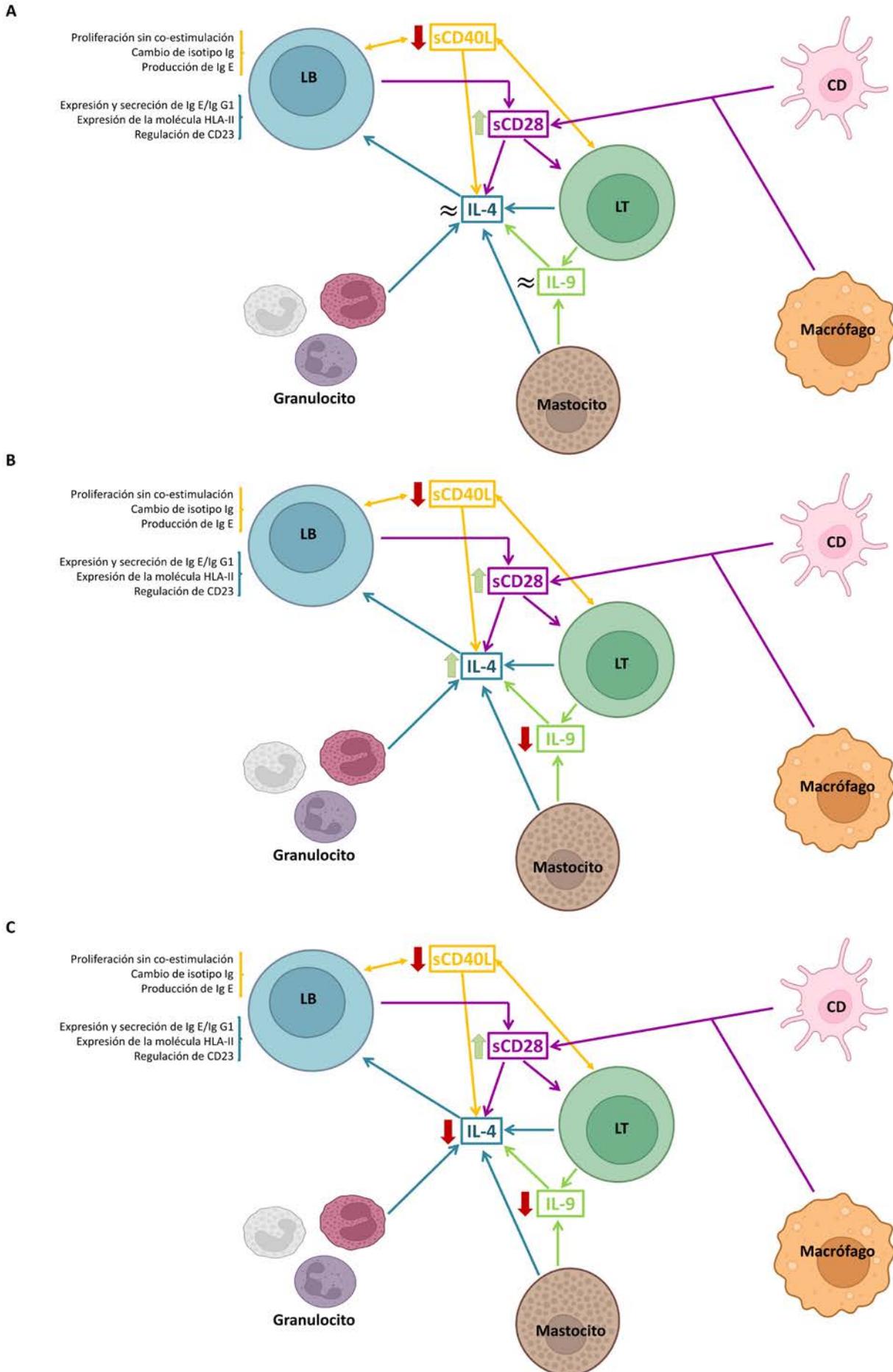


Figura 35: Modelo del perfil diferencial de IL-4 en el microambiente tumoral. A) Tendencia observada en la comparativa Linfocitosis B Monoclonal vs. Leucemia Linfocítica Crónica estable (c-CLL). B) Tendencia observada en la comparativa c-CLL vs. Leucemia Linfocítica Crónica previa a 1ª línea de tratamiento (CLL-PFT). C) Tendencia observada en la comparativa CLL-PFT vs. Leucemia Linfocítica Crónica tras 1ª línea de tratamiento

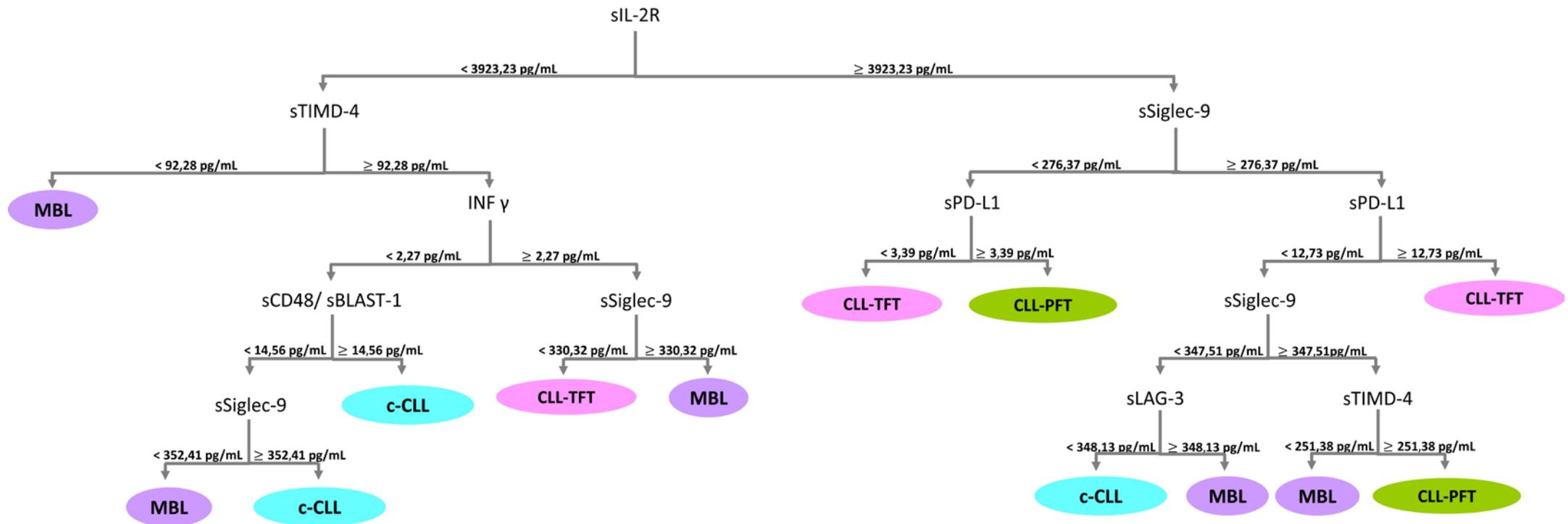


Figura 36: Panel de proteínas diferenciales: Clasificación de la cohorte de estudio según diagnóstico y respuesta a tratamiento

3. Perfil de factores inmunológicos solubles según estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

3.1 Tendencia de los factores inmunológicos solubles evaluados y su implicación a nivel biológico.

Cuando se realiza el estudio de las variaciones cuantitativas de los niveles en suero de las proteínas para el estado mutacional de la IGHV, se observa que:

- a. El conjunto 1 presenta un 16,9 % (11/65) de las proteínas con mayores concentraciones en suero que la media de concentración para dicho conjunto (sIL-2R, IL-16, CXCL5/ENA-78, CXCL12/SDF-1 α , CCL24/Eotaxin-2, sCD30, sTWEAK y sAPRIL), mientras que el 15,38 % (10/65) de las proteínas tiene concentraciones más bajas que la media (IL-1 α , IL-1 β , IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, TNF- α , β -NGF y CX3CL1/Fractalkine) (**Figura 37A**).

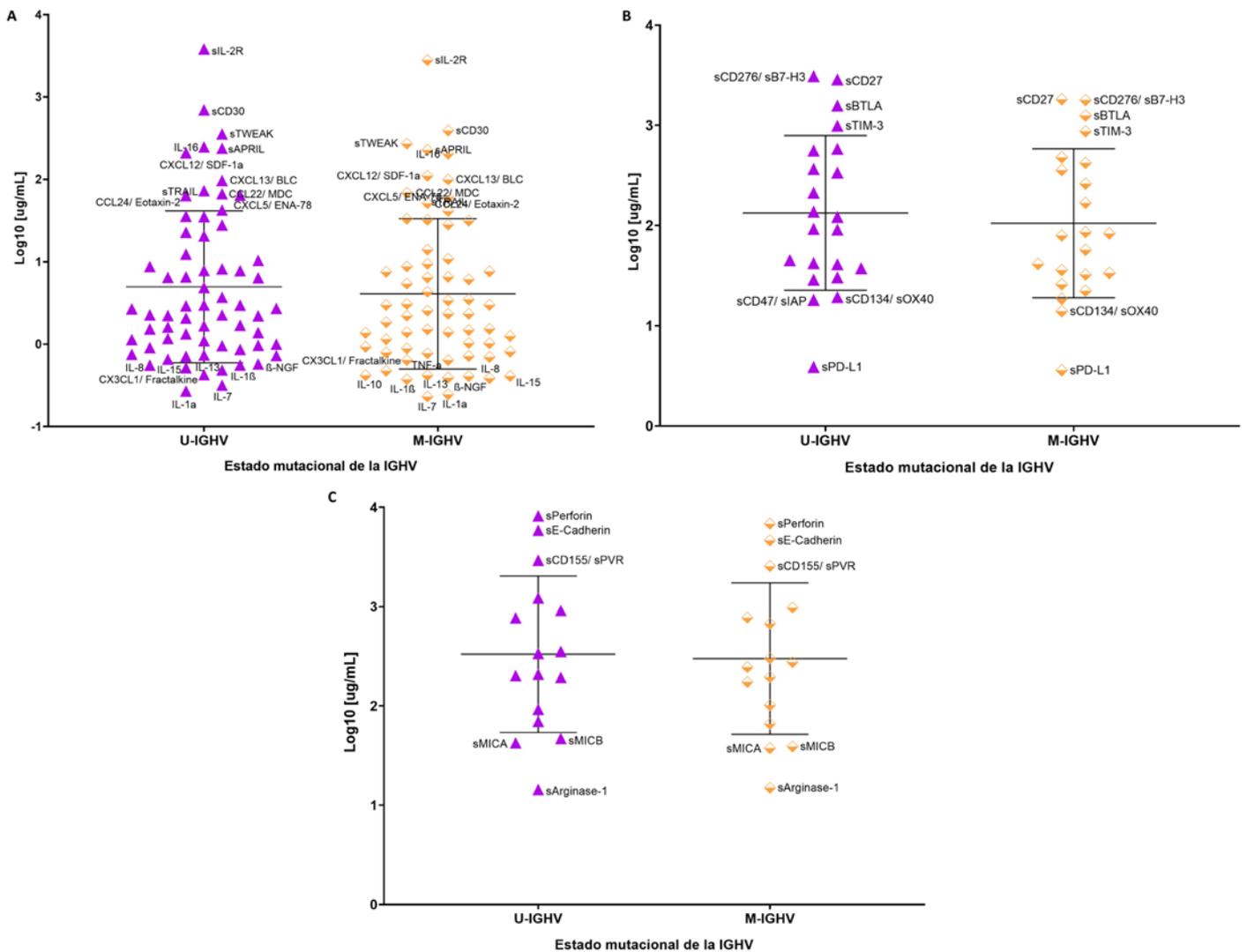


Figura 37: Distribución del promedio de la concentración de acuerdo al estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las Inmunoglobulinas. A) Conjunto 1: Citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento/regulación y receptores solubles. B) Conjunto 2: Puntos de control inmunológico solubles relacionados con linfocito T. C) Conjunto 3: Puntos de control inmunológico solubles relacionados con célula NK.

- b. Los conjuntos 2 y 3 muestran un 18,42 % (7/38) de las proteínas con valores superiores a la media para dichos conjuntos (sCD27, sCD155/sPVR, sCD276/sB7-H3, sBTLA, sTIM-3, sPerforin y sE-Cadherin,) y un 15,79 % (6/38) niveles inferiores (sPD-L1, sCD47/sIAP, sCD134/sOX40, sMICA y sMICB) (**Figura 37By C**).

Cabe destacar, que la mayor parte de las proteínas solubles (83,5 % - 86/103-) tienen niveles cuantitativos más elevados para la U-IGHV que para la M-IGHV. Estando todas ellas relacionadas con la coestimulación mediada por CD28, regulación de los receptores tipo Toll por reconocimiento de ligandos endógenos, infecciones, señalización constitutiva de PI3K aberrante, interacciones por uniones adherentes, respuesta a estrés celular y regulación de la necrosis y piroptosis. Todo ello se encuentra recogido en la **Figura suplementaria 10** y la **Tabla suplementaria 25** (Corresponde con la [Figura S13](#) y la [Tabla S11](#) del anexo V -).

3.2 Estudio del perfil diferencial de factores inmunológicos solubles.

En este grupo se encontraron diferencias significativas para las proteínas CXCL11/I-TAC, CXCL10/IP-10, sHVEM y sLAG-3 (**Tabla Suplementaria 33**); quienes se encuentran implicadas en los procesos de presentación antigénica y en la cascada de señalización de citocinas (**Tabla suplementaria 26** - Corresponde con la [Tabla S12](#) del anexo V -).

3.3 Potencial panel diferencial de factores inmunológicos solubles.

Para la obtención de un posible panel de factores inmunológicos solubles que permita clasificar las muestras según el estado mutacional de la IGHV, se realizó un análisis de correlaciones entre las proteínas consideradas diferenciales por medio de los análisis estadístico clásico (**Tabla Suplementaria 17**), modelo lineal (**Tabla Suplementaria 18** - Corresponde con la [Tabla S8](#) del anexo V -) y por mRMR (**Tabla Suplementaria 19** - Corresponde con la [Tabla S7](#) del anexo V -). Esto permite obtener un panel de 4 proteínas involucradas en la presentación antigénica e interacción con los LT (CXCL10/IP-10, sCD134/sOX40, sULBP-1 y sLAG-3). Dicho panel clasifica las muestras con un porcentaje de aciertos del 70 % para M-IGHV y del 77 % para U-IGHV (**Figura Suplementaria 5D** - Corresponde con la [Figura S8D](#) del anexo V -).

Estas proteínas presentan puntos de corte para (**Figura 38** - Corresponde con la [Figura 7A](#) del anexo V -):

- CXCL10/IP-10 de $< 9,05 \text{ pg/mL}$ para M-IGHV.
- sCD134/sOX40 de $< 17,87 \text{ pg/mL}$ para U-IGHV.
- sULBP-1 de $< 1105,11 \text{ pg/mL}$ para M-IGHV.
- sLAG-3 con $\geq 147,24 \text{ pg/mL}$ para U-IGHV y $< 147,24 \text{ pg/mL}$ para M-IGHV.

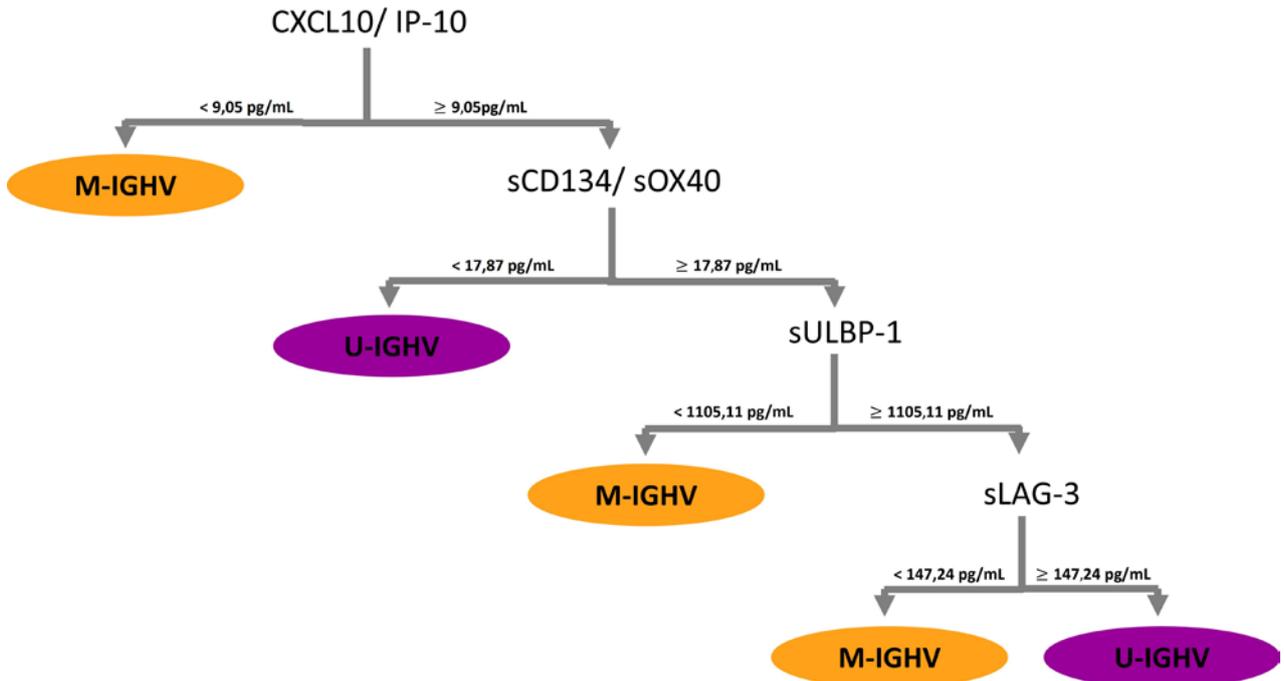


Figura 38: Panel de proteínas diferenciales: Clasificación de la cohorte de estudio de acuerdo al estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las Inmunoglobulinas.

Conclusiones

El estudio de los niveles cuantitativos de los factores inmunológicos solubles, ha revelado la importancia del LT dentro del microambiente tumoral para la cohorte de estudio (**Figura 39** - Corresponde con la [Figura 8](#) del anexo V -).

- Las tendencias observadas para las proteínas solubles según diagnóstico, evolución, respuesta a tratamiento y estado mutacional de la IGHV muestran:
 - o Mayores niveles en suero para los factores inmunológicos solubles cuando el estado mutacional de la IGHV es no mutado (U-IGHV) y, un aumento de los niveles cuantitativos durante la progresión de la enfermedad que disminuyen tras el tratamiento.
 - o En los casos de las proteínas sLAG-3, sPD-L1 e INF- γ , hay presencia de bajos niveles en los estadios más tempranos de la enfermedad, mientras que para sCD47/sIAP y sTIMD-4, las concentraciones séricas no varían según el estado mutacional de la IGHV; al contrario de lo que ocurre con la sArginase-1, cuyos niveles son mayores en el grupo M-IGHV que en el grupo U-IGHV.
- Las concentraciones séricas de IL-4 revelan un aumento a medida que la enfermedad evoluciona, proporcionando una mayor supervivencia a las B-CLL y una diferenciación de los LT y Macrófagos hacia LT Th2 y M2 (fenotipo pro-tumoral).
- Las proteínas diferenciales con capacidad para clasificar entre grupos de factor pronóstico y clínico-biológicos, muestra que:
 - o El grupo M-IGHV tiene una proliferación comprometida por parte de los LT (sLAG-3, INF- γ , sCD134/sOX40 y sCD27), ineficiencia de la presentación antigénica por parte de las APCs (sLAG-3, IL-4 y sTIMD-4), inhibición de los LT CD8⁺ y del reclutamiento y activación de las NK (CXCL10/IP-10, sULBP-1 y sCD48/sBLAST-1) e inhibición de la fagocitosis por parte de los M \emptyset (sCD47/sIAP). También, cabe destacar que el grupo U-IGHV presenta un microambiente protector para las B-CLLs (sArginase-1); confiriéndoles una mayor supervivencia.
 - o Con la evolución y progresión de la enfermedad, se produce una inhibición de la actividad de los LT (sULBP-1 y sPD-L1) y disminución de la defensa antitumoral por parte de los mismos y las células NK (sLAG-3 y sSiglec-9). Además de un aumento de la resistencia a tratamientos y, en consecuencia, la supervivencia de las B-CLLs (sArginase-1). También se observa un aumento de los niveles de sCD48/sBLAST-1, quien estimula la citotoxicidad de los LT CD8⁺ y las NK frente a infecciones víricas. Finalmente, el aumento de las concentraciones séricas de sCD47/sIAP durante el desarrollo de la enfermedad, pueden indicar una inhibición de las capacidades migratorias y fagocíticas de las células mieloides (monocitos, M \emptyset y CDs).

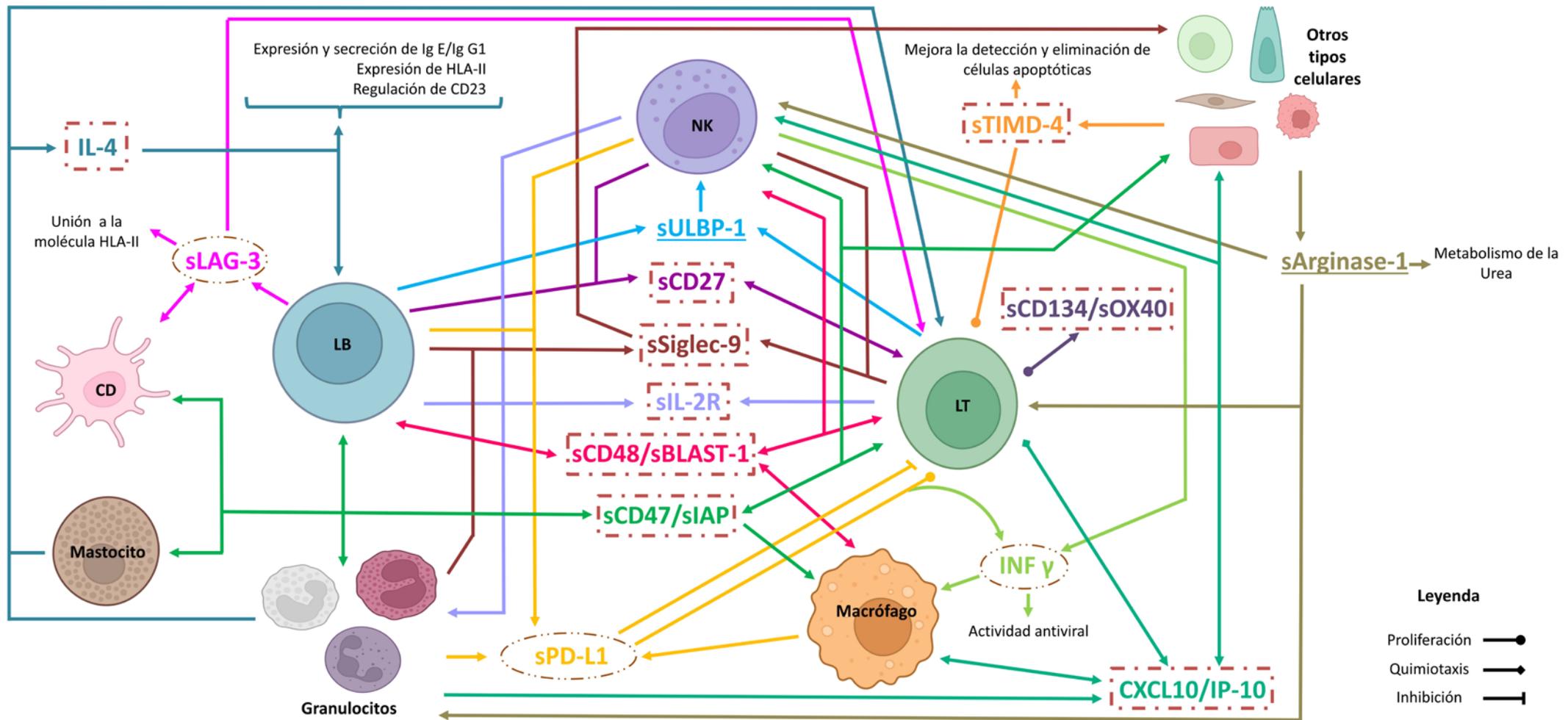


Figura 39: Modelo de interacciones entre los factores inmunológicos solubles diferenciales encontrados en la cohorte de estudio. Dentro de los círculos se encuentran las proteínas con perfil cuantitativo decreciente para la evolución de la enfermedad. En el interior de los recuadros, las proteínas con niveles decrecientes para el estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas mutada (M-IGHV). Subrayadas, las proteínas con perfiles cuantitativos fluctuantes a lo largo de la evolución de la enfermedad y estado mutacional de la IGHV.

Capítulo 3: Evaluación del perfil serológico de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica y Linfocitosis B Monoclonal. Papel de la estimulación antigénica.

Alicia Landeira-Viñuela¹, Miguel Alcoceba², Almudena Navarro-Bailón², Carlota Arias-Hidalgo¹, Pablo Juanes-Velasco¹, José Manuel Sánchez-Santos³, Quentin Lecrevisse¹, Carlos Eduardo Pedreira⁴, Marina L. García-Vaquero¹, Ángela-Patricia Hernández^{1,5}, Enrique Montalvillo¹, Rafael Góngora¹, Javier De las Rivas⁶, Marcos González², Alberto Orfao¹, Manuel Fuentes^{1,7°}

¹ Departamento de Medicina y Servicio General de Citometría, CIBERONC-CB16/12/00400, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) e IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

² Departamento de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, CIBERONC-CB16/12/00233, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) e IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

³ Departamento de Estadística, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

⁴ Departamento de Sistemas y Computación (COPPE-PESC), Universidad Federal de Río de Janeiro (UFRJ), 21941-914, Río de Janeiro, Brasil.

⁵ Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Sección de Química Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

⁶ Grupo de Bioinformática y Genómica Funcional, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) e IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

⁷ Unidad de Proteómica, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) e IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007, Salamanca, España.

Cancers 2023, 15, 891.

Doi: 10.3390/cancers15030891

Introducción.

Los LB son las células responsables de la respuesta humoral del organismo (encargadas de producir Abs) y, además, actúan como APCs. Los procesos de diferenciación, selección, desarrollo, proliferación y supervivencia de las células B se basan en la activación de las vías de señalización del BCR en respuesta a la estimulación antigénica, por medio del reconocimiento, específico y selectivo, del Ag por parte del BCR (Ig de membrana).

Actualmente, el estado mutacional de la IGHV es uno de los biomarcadores pronósticos más empleado en clínica para estratificar a los pacientes con CLL, ya que su estado es estable a lo largo del desarrollo de la enfermedad. Además, se sabe que aquellos pacientes con M-IGHV presentan enfermedad indolente con respuesta anérgica y antiapoptótica, mientras que aquellos pacientes con U-IGHV, desarrollan una respuesta activa y proliferativa que conduce a la rápida progresión de la enfermedad y, en consecuencia, tienen una SG más corta.

Por otro lado, la hipermutación somática, proceso inherente a la diferenciación Ag dependiente de los LB, es responsable de producir mutaciones genéticas sobre el BCR de los LB. Aunque dicho proceso solo puede darse cuando los LB naive activos y LB de memoria antes de diferenciarse a células plasmáticas (células secretoras de Abs) se encuentran en los centros germinales. Se ha observado que pacientes con CLL presentan BCR estereotipado en el 30 % de los casos, haciendo que dichos pacientes compartan similitudes estructurales en las regiones determinantes de complementariedad. Identificándose subgrupos mayoritarios de receptores estereotipados con características clínico-biológicas homogéneas, entre los que destacan IGHV1-69, IGHV3-7, IGHV3-21 o IGHV4-34 entre otros.

Asimismo, las B-CLL frecuentemente presentan Ig M en su membrana plasmática como isotipo mayoritario, ya que permite responder de forma rápida a gran variedad de Ags; debido a su alta naturaleza polirreactiva. Aunque la autoinmunidad desarrollada por pacientes con CLL parece estar mediada por aAbs Ig G, los cuales se encuentran restringidos al reconocimiento de Ags expresados principalmente por células sanguíneas (eritrocitos, plaquetas y granulocitos).

Además, en el momento del diagnóstico, la gran mayoría de los pacientes con CLL o MBL presentan hipogammaglobulinemia, es decir, niveles séricos de Igs bajos (principalmente Ig G, Ig M e Ig A). Lo cual se correlaciona con un aumento del riesgo de infecciones y, en consecuencia, aumenta el riesgo de morbilidad y mortalidad de dichos pacientes. Asimismo, el estadio de la enfermedad y el uso de terapias (tipo de tratamiento y duración) se encuentra directamente relacionado con el riesgo de infecciones, identificándose una amplia gama de infecciones bacterianas (como por ejemplo *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli*), reinfecciones víricas (Varicela-Zoster, Herpes simplex virus, Citomegalovirus y Epstein-Barr), infecciones oportunistas (*Listeria*, *Aspergillus*, *Candida* y *Cryptococcus*), parásitos y micobacterias entre otros.

Teniendo en cuenta todas estas características, en este estudio se quiere evaluar los niveles cuantitativos de las Igs en suero a lo largo de la enfermedad, así como examinar la respuesta humoral de dichos pacientes frente a aAgs y mAgs más prevalentes en la población.

Objetivos.

En el presente trabajo se propone como objetivo general:

- Determinar los perfiles serológicos diferenciales de las Igs y evaluar la respuesta humoral frente a un panel de autoantígenos (aAgs) y antígenos microbianos (mAgs).

Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- i) Analizar los niveles séricos de las Igs (Ig G y sus subclases, Ig M, Ig A e Ig E) y su correlación con la progresión de la enfermedad.
- ii) Evaluar el perfil serológico frente a aAgs y mAgs, tanto para el isotipo Ig G e Ig M, en la progresión de la enfermedad.

Resultados.

I. Perfiles serológicos de inmunoglobulinas: Análisis cuantitativo.

El estudio de los niveles de Igs Ig A, Ig M, Ig E y los subtipos de Ig G, revelan una distribución normal únicamente para la Ig G2 (**Figura Suplementaria 11** - Corresponde con la [Figura S1](#) del anexo VI -). Además, de diferencias significativas para la Ig A respecto a la progresión de la enfermedad, ya que c-CLL presenta 3 veces más concentración de Ig A que p-CLL (c-CLL con niveles séricos promedio (\bar{x}) de 44 ± 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y p-CLL con \bar{x} de 18 ± 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Ig G1 respecto al estado mutacional de la IGHV, donde los pacientes con U-IGHV presentan 2 veces más concentración de Ig G1 que los que presentan M-IGHV (U-IGHV con \bar{x} de 1071 ± 270 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y M-IGHV con \bar{x} de 472 ± 74 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Figura Suplementaria 12** - Corresponde con la [Figura S2](#) del anexo VI - y **Tabla Suplementaria 27**).

I.I. Determinación de perfiles diferenciales de inmunoglobulinas según el estadio de la enfermedad.

Al analizar los niveles en suero de las Igs, se observa que los valores promedio para cada uno de los isotipos se encuentran por debajo de los límites normales establecidos en la población general (límite inferior en suero: Ig G = 7000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Ig A = 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Ig M = 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Ig E = 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y límite superior en suero: Ig G = 16000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Ig A = 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Ig M = 2300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Ig E = 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)¹⁸⁹ independientemente del grupo de estudio (**Figura 40** - Corresponde con la [Figura 1](#) del anexo VI -).

Al realizar un análisis pormenorizado por grupos (**Esquema 5**), se obtiene como resultado que:

- ***Grupo diagnóstico (Figura 40A).***

Los niveles de Igs en suero para el isotipo Ig A son mayores para aquellos pacientes diagnosticados con MBL ($\bar{x} = 43 \pm 10$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) que para CLL ($\bar{x} = 35 \pm 5$ $\mu\text{g}/\text{mL}$), mientras que, las concentraciones de Ig M son más elevadas para los pacientes que presentan un diagnóstico de CLL ($\bar{x} = 211 \pm 62$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) que de MBL ($\bar{x} = 160 \pm 28$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Tabla 14**).

En cuanto a los subtipos de Ig G, al comparar dichos grupos, se observa que la MBL presenta valores promedio más bajos para la Ig G2 ($\bar{x} = 482 \pm 67$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) y más altos para la Ig G4 ($\bar{x} = 29 \pm 8$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) que el grupo de CLL (Ig G2 con $\bar{x} = 591 \pm 52$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ e Ig G4 con $\bar{x} = 26 \pm 8$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Tabla 14**).

- ***Evolución de la enfermedad (Figura 40B).***

Los niveles de Igs en suero para todos los isotipos se ven disminuidos de 1 a 2 veces a medida que la enfermedad progresa (Ig G con 156 ± 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Ig M con $\bar{x} = 136 \pm 93$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, Ig A con 18 ± 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e Ig E con $0,05 \pm 0,01$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Tabla 14**).

Con respecto a los subtipos de Ig G, la Ig G2 e Ig G3 presentan los niveles más bajos para el grupo p-CLL (Ig G2 con $\bar{x} = 434 \pm 87$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ e Ig G3 con $\bar{x} = 126 \pm 26$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) y los más altos para c-CLL (Ig G2 con $\bar{x} = 660 \pm 77$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ e Ig G3 con $\bar{x} = 193 \pm 30$ $\mu\text{g}/\text{mL}$). En

cambio, el grupo p-CLL presenta los valores más elevados para la Ig G1 ($\bar{x} = 679 \pm 186 \mu\text{g/mL}$) y los más bajos para la Ig G4 ($\bar{x} = 16 \pm 3 \mu\text{g/mL}$) (**Tabla 14**).

- **Respuesta a tratamiento (Figura 40C).**

Los niveles más bajos de Igs y subtipos de Ig G en suero se encuentran presentes en aquellos pacientes pertenecientes al grupo CLL-PFT (Ig G con $\bar{x} = 125 \pm 30 \mu\text{g/mL}$ – Ig G1 con $\bar{x} = 525 \pm 172 \mu\text{g/mL}$, Ig G2 con $\bar{x} = 366 \pm 74 \mu\text{g/mL}$, Ig G3 con $\bar{x} = 102 \pm 29 \mu\text{g/mL}$ e Ig G4 con $\bar{x} = 13 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ -, Ig M con $\bar{x} = 95 \pm 33 \mu\text{g/mL}$, Ig A con $\bar{x} = 14 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ e Ig E con $\bar{x} = 0,04 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$) y aumenta tras el tratamiento con Ibrutinib (Ig G con $\bar{x} = 202 \pm 78 \mu\text{g/mL}$ – Ig G1 con $\bar{x} = 811 \pm 461 \mu\text{g/mL}$, Ig G2 con $\bar{x} = 540 \pm 161 \mu\text{g/mL}$, Ig G3 con $\bar{x} = 164 \pm 64 \mu\text{g/mL}$ e Ig G4 con $\bar{x} = 23 \pm 11 \mu\text{g/mL}$ -, Ig M con $\bar{x} = 214 \mu\text{g/mL}$, Ig A con $\bar{x} = 23 \mu\text{g/mL}$ e Ig E con $\bar{x} = 0,06 \mu\text{g/mL}$). Aunque no se restablecen los niveles previos al inicio de la enfermedad (Ig G con $\bar{x} = 197 \mu\text{g/mL}$ – Ig G1 con $\bar{x} = 646 \mu\text{g/mL}$, Ig G2 con $\bar{x} = 482 \mu\text{g/mL}$, Ig G3 con $\bar{x} = 166 \mu\text{g/mL}$ e Ig G4 con $\bar{x} = 29 \mu\text{g/mL}$ -, Ig M con $\bar{x} = 160 \pm 142 \mu\text{g/mL}$, Ig A con $\bar{x} = 43 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ e Ig E con $\bar{x} = 0,06 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$) (**Tabla 14**).

- **Según el estado mutacional de la IGHV (Figura 40D)**

Las concentraciones en suero de las Igs y subtipos de Ig G son siempre de 1 a 2 veces menores en el grupo M-IGHV que en U-IGHV; salvo en el caso de la Ig E (M-IGHV con $\bar{x} = 0,06 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ y U-IGHV con $\bar{x} = 0,07 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$) e Ig G4 (M-IGHV con $\bar{x} = 26 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ y U-IGHV con $\bar{x} = 27 \pm 8 \mu\text{g/mL}$), cuyos niveles son parecidos (**Tabla 14**).

Tabla 14: Niveles serológicos promedio de las inmunoglobulinas.

$\mu\text{g/mL}$	Cohorte de estudio								Población general ¹⁸⁹	
	MBL	CLL	c-CLL	p-CLL	CLL-PFT	CLL-TFT	M-IGHV	U-IGHV	Límite inferior	Límite superior
Ig E	0,06	0,06	0,07	0,05	0,04	0,06	0,06	0,07	0,24	0,24
Ig A	42,52	34,75	44,38	17,52	13,59	23,08	33,50	41,06	700	4000
Ig M	160,43	210,84	246,40	136,29	95,24	214,84	178,09	263,04	400	2300
Ig G	196,66	200,13	218,61	156,29	125,18	202,27	177,86	252,75	7000	16000
Ig G1	645,61	613,14	591,20	679,01	524,78	810,86	472,29	1070,53	-	-
Ig G2	482,00	591,24	660,25	434,03	365,72	540,31	541,30	645,40	-	-
Ig G3	165,64	172,29	192,70	125,93	101,80	164,28	153,34	214,77	-	-
Ig G4	29,02	25,69	30,36	16,08	12,57	23,26	25,53	27,50	-	-

MBL: Linfocitosis Monoclonal de célula B | CLL: Leucemia Linfocítica Crónica | c-CLL: Leucemia Linfocítica Crónica estable | p-CLL: Leucemia Linfocítica Crónica en progresión | CLL-PFT: Leucemia Linfocítica Crónica previa a primera línea de tratamiento | CLL-TFT: Leucemia Linfocítica Crónica tras primera línea de tratamiento | M-IGHV: Región Variable de la Cadena Pesada de las Inmunoglobulinas Mutada | U-IGHV: Región Variable de la Cadena Pesada de las Inmunoglobulinas No Mutada.

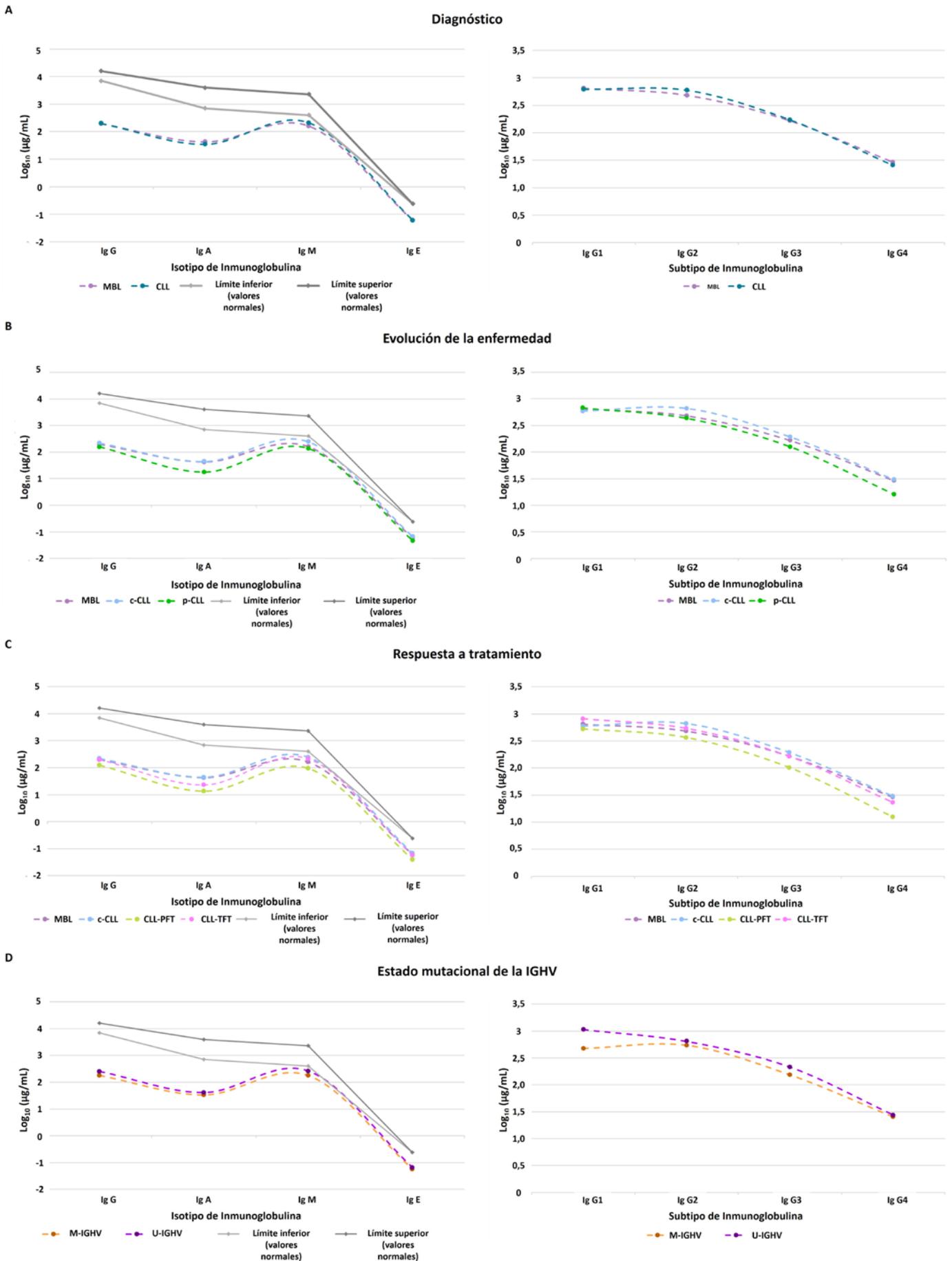


Figura 40: Perfil de las inmunoglobulinas según estadio de la enfermedad. A) Grupo diagnóstico. B) Evolución de la enfermedad. C) Respuesta a tratamiento. D) Estado mutacional de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

2. Evaluación del perfil serológico de la respuesta humoral frente a un panel de autoantígenos y antígenos microbianos.

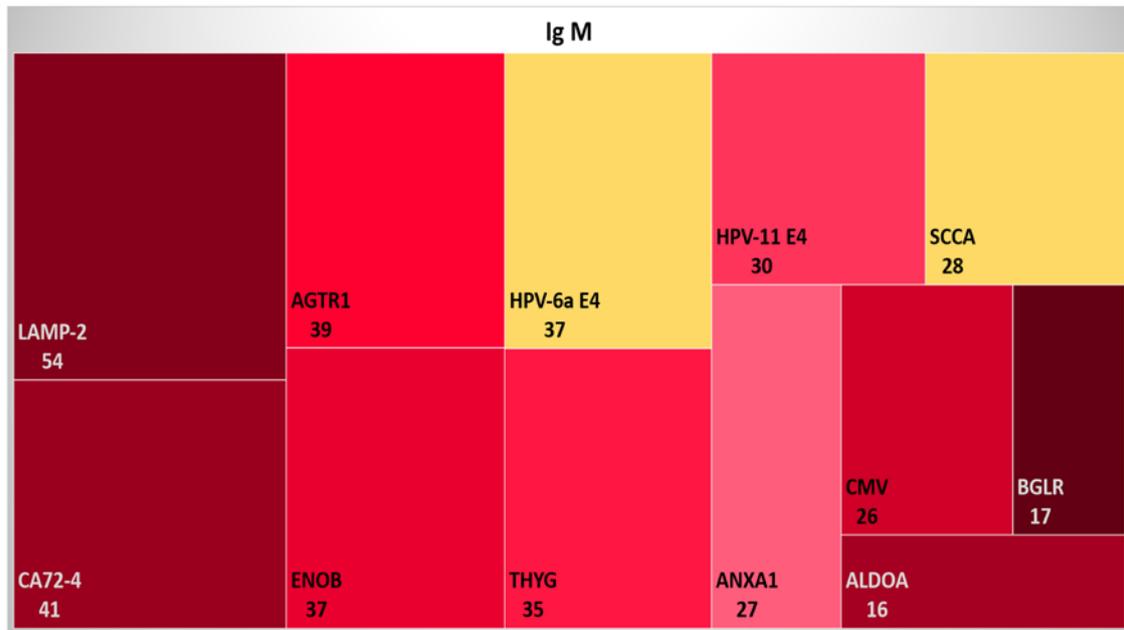
2.1 Determinación del perfil serológico frente a un panel autoantígenos.

El estudio de los niveles cuantitativos de intensidad de señal promedio para cada uno de los isotipos de Igs (Ig G e Ig M) en la cohorte de estudio respecto a las muestras de Ref., reveló que estos eran de 0,3 - 15 veces superiores para la Ig M y de 0,2 - 42 veces mayores para la Ig G (**Tabla Suplementaria 28** - Corresponde con la [Tabla S4](#) del anexo VI -) y cuyos perfiles de distribución para cada uno de los aAgs evaluados se encuentran en la **Figura Suplementaria 13** (Corresponde con la [Figura S3](#) del anexo VI).

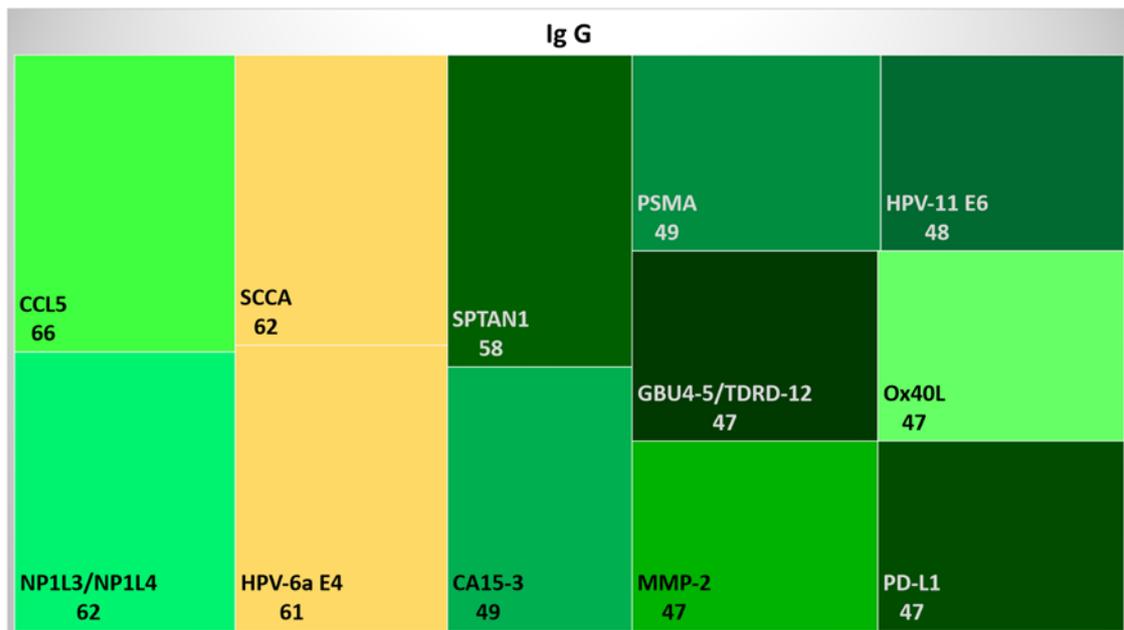
Desde el punto de vista de los 10 aAgs más frecuentemente observados en la cohorte de estudio (**Tabla Suplementaria 34** - Corresponde con la [Tabla S5](#) del anexo VI -), se destaca la presencia para el isotipo Ig M de proteínas mutagénicas (ALDOA, ANXA1, THYG, BGLR o LAMP-2) localizadas en Ves. y Cit., mayoritariamente. Asimismo, el marcador tumoral CA72-4, Citomegalovirus (CMV) y la proteína E4 del Virus del Papiloma Humano tipo 11 (HPV-11 E4), también se encuentran dentro de este top 10 (**Figura 41A** - Corresponde con la [Figura 2A](#) del anexo VI -). Por otro lado, los marcadores tumorales CA15-3 y CD274, la proteína E6 del HPV-11 (HPV-11 E6) y proteínas no mutagénicas (PD-L1, NP1L3, NP1L4, MMP-2, Ox40L, GBU4-5/TDRD-12) son de los 10 aAgs frecuentemente detectados con presencia de Ig G en la cohorte de estudio (**Figura 41B** - Corresponde con la [Figura 2B](#) del anexo VI -). También, cabe destacar dentro de este top 10, la presencia de ambos isotipos de Igs frente al marcador tumoral SCCA y la proteína E4 del Virus del Papiloma Humano tipo 4 (HPV-4 E4) (**Figura 41C** - Corresponde con la [Figura 2C](#) del anexo VI -).

Finalmente, entre los 5 aAgs más recurrentes en todos los grupos de estudio, se encuentran principalmente proteínas no mutagénicas localizadas en Ves. (AGRT1, MMP-2, Ox40L o TWEAK). Además, independientemente del estadio de la enfermedad, se observa la presencia de Abs Ig G frente a LAMP-2 y AGTR1, de Ig M frente a MMP-2 (excepto en el subgrupo CLL-TFT) y de ambos isotipos de Igs frente a ENOB (**Tabla Suplementaria 35** - Corresponde con la [Tabla S6](#) del anexo VI -).

A



B



C

aAg	Nº muestras			% Cohorte		
	Ig G	Ig M	Ig M & Ig G	Ig G	Ig M	Ig M & Ig G
HPV-6a E4	26	2	35	39	3	52
SCCA	36	2	26	54	3	39

* En rojo los autoantígenos (aAgs) detectados con el isotipo Ig M, en verde los detectados con el isotipo Ig G y en amarillo aquellos detectados por ambos isotipos de Igs.

Figura 41: Resumen del número de muestras positivas para cada uno de los 10 autoantígenos (aAgs) más recurrentes identificados en la cohorte de estudio. A) aAgs con presencia de autoanticuerpos Ig M. B) aAgs con presencia de autoanticuerpos Ig G. C) Resumen de los aAgs con presencia de autoanticuerpos Ig M e Ig G.

2.2 Determinación del perfil serológico frente a antígenos microbianos.

Inicialmente, para facilitar la comparación entre grupos clínico con el fin de determinar los perfiles serológicos diferenciales frente a mAgs, se realiza una evaluación de la concentración óptima de mAgs capaz de determinar el perfil serológico de las Igs, tanto del isotipo Ig M como de Ig G (Tabla 15 - Corresponde con la Tabla 2 del anexo VI -).

Tabla 15: Resumen del número de antígenos microbianos (mAgs) detectados para cada concentración evaluada.

μg/μL	Nº mAgs						
	$\bar{I}_m^s < Ref.$	$\bar{I}_m^s > Ref.$			Top 5 ($\bar{I}_m^s > Ref.$)		
	Total	Ig M	Ig G	Ig M & Ig G	Ig M	Ig G	Ig M & Ig G
$8 \cdot 10^{-2} / 6 \cdot 10^{-2}$	11	11	7	8	3	0	3
$1 \cdot 10^{-2}$	3	26	1	7	7	0	3
$1 \cdot 10^{-3}$	8	16	1	12	4	0	5
$1 \cdot 10^{-4}$	12	10	3	12	1	0	5
$1 \cdot 10^{-5}$	5	12	1	19	5	0	5

\bar{I}_m^s intensidad de señal promedio del Ag para la muestra; Ref. = $\bar{I}_m^r + I_m^r \sigma$ (intensidad de señal promedio del Ag para la muestra de referencia y su desviación estándar).

En base a estos resultados, la concentración de trabajo elegida es de $1 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (0,0001 μg/μL). Donde la mayor parte de los mAgs detectados presentan ambos isotipos de Igs en suero y son virus causantes de infecciones a nivel del tracto respiratorio y gastrointestinal (Figura 42 - Corresponde con la Figura S4A del anexo VI -). Dichos resultados están recogidos de forma pormenorizada en la Figura suplementaria 14 (Corresponde con la Figura S4 del anexo VI).

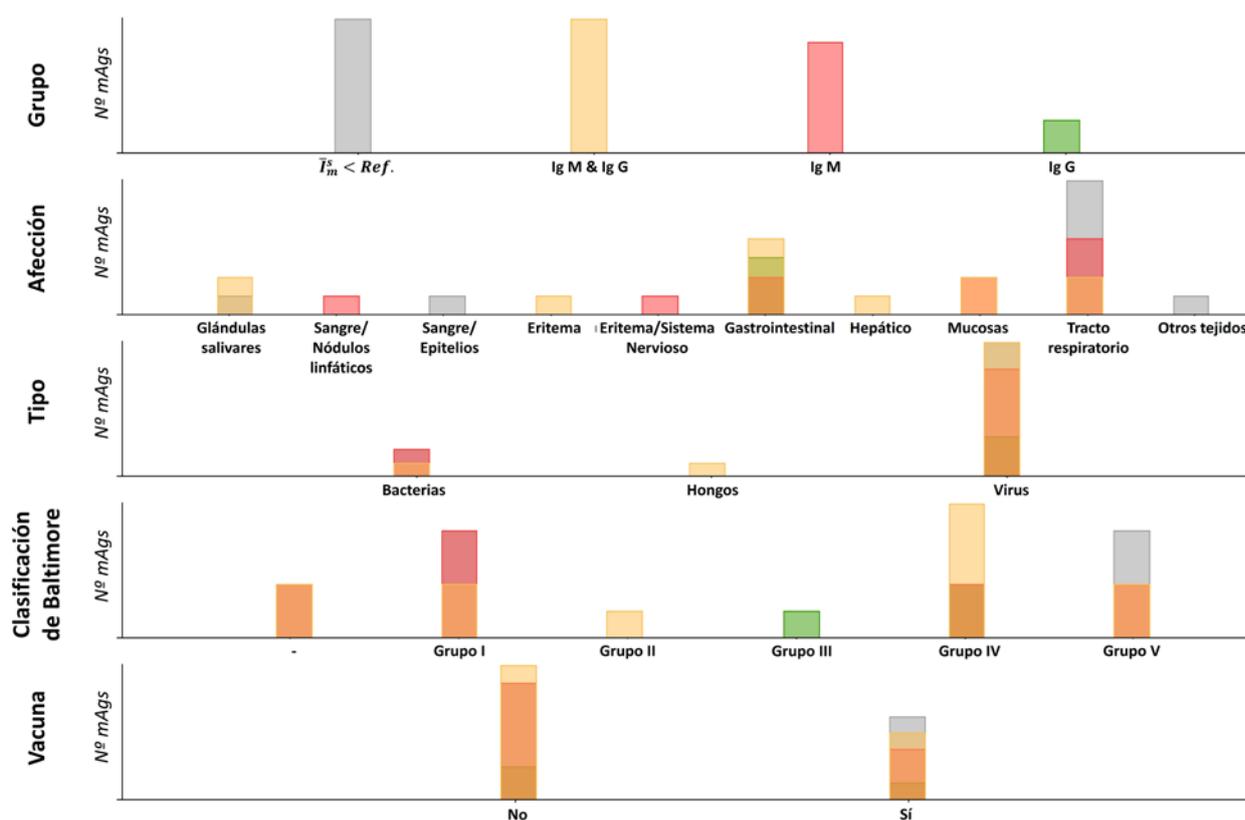


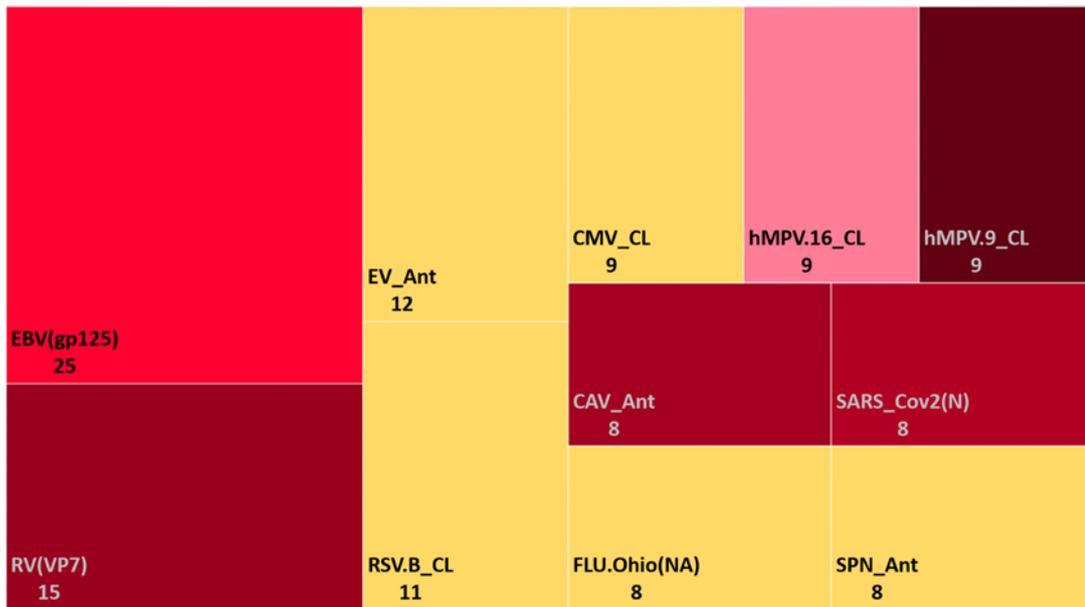
Figura 42: Número de antígenos microbianos detectados a concentración de antígeno microbiano de $1 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

El estudio de los niveles cuantitativos de intensidad de señal promedio para cada uno de los isotipos de Igs (Ig G e Ig M) en la cohorte de estudio respecto a las muestras de Ref., reveló un perfil de distribución mucho más homogéneo para el isotipo Ig M que para el isotipo Ig G (**Figura Suplementaria 15** - Corresponde con la [Figura S5](#) del anexo VI -). Además de una ratio de intensidad de señal promedio respecto a la Ref. de 0,5 - 4 veces mayor para Ig M y de 0,3 - 1 vez más para Ig G (**Tabla Suplementaria 30** - Corresponde con la [Tabla S7](#) del anexo VI -).

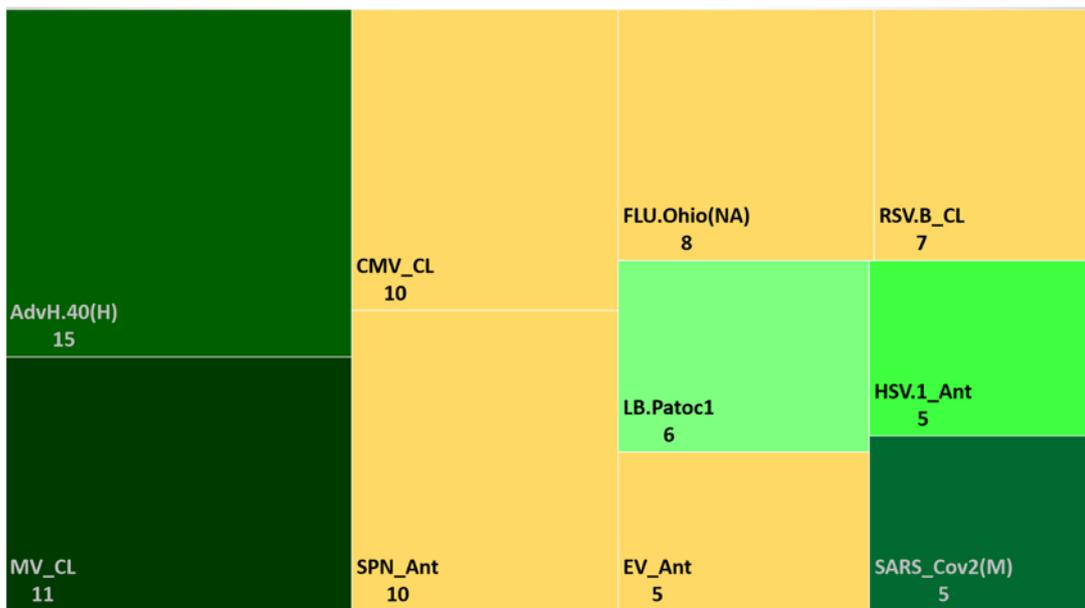
Dentro de los 10 mAgs más recurrentes en la cohorte de estudio (**Tabla Suplementaria 36** - Corresponde con la [Tabla S8](#) del anexo VI -), se detecta la presencia de Abs Ig M frente a virus y bacterias del tracto respiratorio (virus de la Influenza A -FLU.Ohio-, Metapneumovirus humano -hMPV.16 y hMPV.9-, virus respiratorio sincitial -RSV.B-, Coronavirus relacionado con el síndrome respiratorio agudo grave -SARS-CoV-2- y *Streptococcus pneumoniae* -SPN-) o el hongo *Candida albicans* (CAV – infección micótica de las mucosas -) (**Figura 43A** - Corresponde con la [Figura 3A](#) del anexo VI -). Asimismo, se encuentran Abs Ig G frente a bacterias como *Leptospira biflexa* o SPN y virus del tracto respiratorio (FLU.Ohio, Sarampión -MV-, RSV.B y SARS-CoV-2) (**Figura 43B** - Corresponde con la [Figura 3B](#) del anexo VI -). Por otro lado, solo entre ~1,5 % y el ~4,5 % de los pacientes presentan ambos isotipos frente a SPN, Citomegalovirus (CMV), Echovirus (EV), FLU.Ohio y RSV.B (**Figura 43C** - Corresponde con la [Figura 3C](#) del anexo VI -).

Por último, CAV, *Salmonella typhi* (STY) y en su mayoría virus gastrointestinales (EV, Norovirus -NoVGi.1 y NoVGii.4-, Rotavirus -RV-, Astrovirus -Hast.V.1- Enterovirus -EV.COXB3-) son detectados dentro de los 5 mAgs más comunes en base al grupo de estudio. La presencia de Abs Ig M frente a hMPV.16 e Ig G frente a EV y Parvovirus (PV) se da en todos los grupos de pacientes, salvo para CLL-TFT (**Tabla Suplementaria 37** - Corresponde con la [Tabla S9](#) del anexo VI -). Además, cabe destacar la presencia de Ig M frente a la proteína hemolítica de la bacteria STY (SYT[HlyE]) en los grupos de buen pronóstico (c-CLL y M-IGHV) y del isotipo Ig G frente a las proteínas de la membrana externa de dicha bacteria (SYT[OMP]) en los grupos de mal pronóstico (p-CLL, CLL-TFT y U-IGHV).

A



B



C

mAg	Nº muestras			% Cohorte		
	Ig G	Ig M	Ig M & Ig G	Ig G	Ig M	Ig M & Ig G
CMV_CL	7	6	3	10	9	4
EV_Ant	3	10	2	4	15	3
FLU.Ohio(NA)	5	5	3	7	7	4
RSV.B_CL	6	10	1	9	15	1
SPN_Ant	8	6	2	12	9	3

* En rojo los antígenos microbianos (mAgs) detectados con el isotipo Ig M, en verde los detectados con el isotipo Ig G y en amarillo aquellos detectados por ambos isotipos de Igs.

Figura 43: Resumen del número de muestras positivas para cada uno de los 10 antígenos microbianos (mAgs) más prevalentes en la cohorte de estudio. A) mAgs con presencia de anticuerpos Ig M. B) mAgs con presencia de anticuerpos Ig G. C) Resumen de los mAgs con presencia de ambos isotipos de inmunoglobulinas (Ig M e Ig G).

Conclusiones

El análisis del perfil serológico de las Igs y del perfil antigénico, en la cohorte de estudio, revela que:

- Pacientes con MBL y CLL (independientemente del estadio de la enfermedad) presentan niveles cuantitativos menores al límite inferior establecido como normal en la población general para todos los isotipos de Igs evaluados (Ig M, Ig G, Ig A e Ig E). Presentándose como perfiles cuantitativos diferenciales los niveles de Ig A para la evolución de la enfermedad (3 veces mayor su concentración en p-CLL que en c-CLL) y los niveles de Ig G1 para el estado mutacional de la IGHV (2 veces más concentración en pacientes con U-IGHV que con M-IGHV). Además, se observa una disminución de los niveles cuantitativos para todos los isotipos y subtipos de Igs evaluados a medida que la enfermedad progresa, obteniéndose los valores más bajos cuando los pacientes requiere tratamiento (CLL-PFT), y se ven aumentados cuando los pacientes son tratados con Ibrutinib (CLL-TFT); aunque dicha terapia no restablece los valores previos al desarrollo de la enfermedad (MBL).
- La determinación de los perfiles serológicos de aAbs más comunes muestra:
 - o A nivel general para la cohorte de estudio, la presencia de Ig M frente a aAgs mutagénicos con localización subcelular mayoritaria en Cit. y Ves. Destacando dentro de los 10 aAgs más frecuentes para dicha cohorte, los marcadores tumorales CA15-3 (MUC-1 soluble) y CD274 (PD-L1 soluble), con presencia de Abs Ig G, y el marcador tumoral CA72-4 (TAG-72), con presencia de Abs Ig M. Asimismo, dentro de este top 10, ~40 % de los casos presentan ambos isotipos de Igs frente a la proteína mutagénica SCCA (presente en Nuc. y Cit.).
 - o En base a cada grupo de pacientes incluidos en el estudio, la existencia de un aumento en la producción de Abs *de novo* a medida que la enfermedad avanza. Además de la presencia de Abs Ig M frente a la proteína MMP-2 (implicada en el metabolismo y procesos enzimáticos/tráfico vesicular), Ig G frente a AGTR1 (componente del sistema Renina-Angiotensina) y LAMP-2 (encargada de la estabilización de la estructura del lisosoma) y ambos isotipos de Igs frente a ENOB (implicada en el catabolismo y anabolismo de la glucosa) dentro de los 5 aAgs más frecuentemente detectados, independientemente del estadio de la enfermedad o grupo clínico.
- La determinación de los perfiles serológicos de Abs frente a mAgs más frecuentes reveló que:
 - o A nivel general para la cohorte de estudio, la mayor parte de los microorganismos detectados infectan el tracto respiratorio. Siendo los mAgs más comunes el virus del Sarampión (MV) con presencia de Abs Ig G, *C. albicans* (CAV) con presencia de Abs Ig M y *S. pneumoniae* (SPN) y Citomegalovirus (CMV) con presencia de ambos isotipos.
 - o En base a cada grupo de pacientes incluidos en el estudio, la gran mayoría de los microorganismos identificados como más frecuentes para cada grupo clínico

son aquellos capaces de producir infecciones gastrointestinales. Destacando la presencia:

- Independientemente del estadio de la enfermedad, como mAgS más comunes a Echovirus (EV) y Parvovirus (PV), con Abs Ig G, y Metapneumovirus humano tipo 16 (hMV.16), con Abs Ig M.
- Abs Ig M frente a CMV en aquellos grupos clínicos de buen pronóstico, Ig G frente a dicho mAg en aquellos con mal pronóstico y ambos isotipos únicamente en aquellos pacientes con U-IGHV.
- Abs Ig G frente a la proteína de membrana externa de *S. typhi* (STY) en los grupos p-CLL, CLL-TFT y U-IGHV, mientras que los grupos CLL, c-CLL y M-IGHV tienen Abs Ig M frente a la proteína hemolítica de esta misma bacteria.

Capítulo 4: Evaluación del proteoma en la Leucemia Linfocítica Crónica.

En preparación.

Introducción.

La CLL es una neoplasia linfoide maligna de LB maduros CD5⁺, que se expanden clonalmente y se acumulan en SP, MO, ganglios linfáticos y bazo. Cuyo curso clínico es muy heterogéneo, ya que la enfermedad puede permanecer estable e indolente a lo largo del tiempo o volverse agresiva, desencadenando en recaídas frecuentes e incluso, transformarse en un linfoma agresivo conocido como Transformación de Richter.

En las últimas décadas, los estudios genómicos y epigenómicos han ampliado notablemente el conocimiento de la patogenia de la CLL, desentrañando un alto número de nuevas alteraciones que podrían estar implicadas en la evolución de la enfermedad y que serían de gran utilidad en la estratificación de los pacientes, ayudando en su pronóstico y/o selección de estrategias terapéutica. Actualmente se utilizan las alteraciones citogenéticas (del-13q-, del-11q-, del-17p- o la Trisomía 12), mutaciones genéticas (estado mutacional de la IGHV, NOCHT1, ATM, SF3B1, TP53, etc.) o cambios en la hipometilación de ciertos factores de transcripción (TCF3, NFAT o EGR entre otros) involucrados en la modulación de genes implicados en las rutas de señalización del BCR o de activación de NF- κ B.

A pesar de todo ello, se sigue sin conocer/comprender como afecta dicha heterogeneidad molecular en el comportamiento de la enfermedad. Actualmente, el progreso de la biología molecular y genética ha permitido desentrañar una pequeña fracción del proteoma y caracterizarlo desde el punto de vista bioquímico y funcional. De hecho, la gran complejidad del proteoma y genoma y su gran tamaño requieren de herramientas de alto rendimiento y enfoques que permitan analizar simultáneamente proteínas, centrándose en la evaluación cuantitativa y funcional de las mismas, identificando así biomarcadores clave en el desarrollo de la enfermedad y necesarios para la generación de nuevos fármacos.

Hoy en día, existen proyectos internacionales cuyos objetivos son la caracterización exhaustiva y sistemática de los mapas proteómicos. Ejemplos de ello son el Consorcio de Análisis Proteómico Clínico de Tumores (CPTAC- <https://proteomics.cancer.gov/> -), el Proyecto Proteoma Humano (HPP - <https://www.hupo.org/human-proteome-project> -) o el *Human Protein Atlas* (HPA - www.proteinatlas.org/ -).

Por ello, en este estudio se plantea la evaluación del proteoma de la CLL con el fin de identificar proteínas o patrones de proteoformas que permitan estratificar a los pacientes, así como nuevos biomarcadores o moléculas diana útiles para el desarrollo de nuevos fármacos.

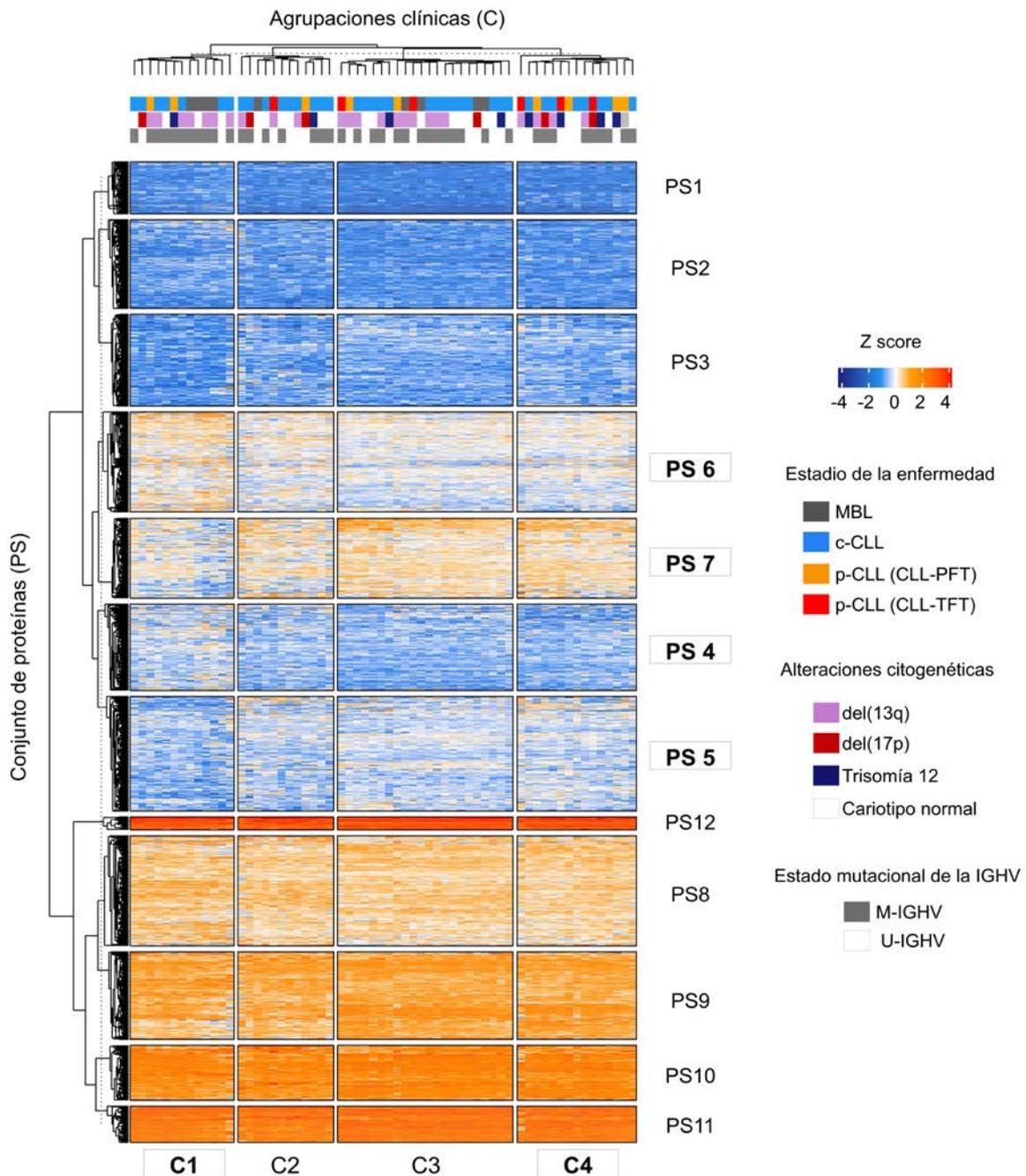
Objetivos.

El objetivo de este trabajo es evaluar los perfiles cuantitativos de las proteínas intracelulares de las B-CLL y su correlación con el estadio de la enfermedad y alteraciones citogenéticas.

Resultados.

I. Caracterización del perfil proteico del linfocito B clonal.

La caracterización del perfil proteico de las B-CLL reveló la presencia de 2897 proteínas que podían ser agrupadas según su K-media en 12 grupos de proteínas (PS1-12) y 4 agrupaciones clínicas (C1-4) (Figura 44).



Remarcados se encuentran: i) aquellos agrupamientos de muestras que presentaron mayor divergencia a nivel de abundancia de proteínas y características clínicas y ii) los conjuntos de proteínas con mayor diferencia significativa en cuanto a la abundancia de las proteínas entre C1 y C4.

Figura 44: Perfil proteico del linfocito B clonal.

De estas agrupaciones clínicas, C1 y C4 mostraron una gran divergencia entre el conjunto de muestras que los componían, tanto a nivel de patrones de abundancia de las proteínas como en cuanto a características clínicas.

El agrupamiento clínico C1 estaba compuesto en su mayoría por pacientes con MBL y c-CLL, quienes presentaban del(17p) o trisomía 12 en el 16 % de los casos y, además, el 18 % de ellos presentaban U-IGHV. Por otro lado, el agrupamiento C4 estaba formado por un 50 % muestras procedentes de pacientes p-CLL. Presentando casi la mitad de los pacientes que formaban parte de dicho agrupamiento del(17p) o trisomía 12 y, además, un 40 % de todos ellos con U-IGHV (**Figura Suplementaria 16A**).

Por otro lado, los conjuntos de proteínas PS4, PS5, PS6 y PS7 mostraron ser los que tenían una mayor diferencia en cuanto a la abundancia de proteínas entre agrupamientos clínicos C1 y C4. Destacando en estos casos que aquellas proteínas que conformaban PS4 y PS6 tenían significativamente menos abundancia para el agrupamiento C4 que para el C1, mientras que las proteínas contenidas en PS5 y PS7 presentaban una mayor abundancia en el agrupamiento clínico C4 que en C1 (**Figura Suplementaria 16B**).

2. Correlación del transcriptoma y proteoma del linfocito B clonal.

La correlación proteómica y transcriptómica se realizó entre la abundancia de las 2897 proteínas identificadas por LC-MS/MS y el perfil transcriptómico previamente publicado por Dietrich y colaboradores en el 2018¹⁹⁰ para LB normales y la información procedente de la base de datos de NCBI para B-CLL (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE50006>). Evidenciándose una inexistencia de correlación positiva entre los niveles de transcrito y proteína (**Figura Suplementaria 17**).

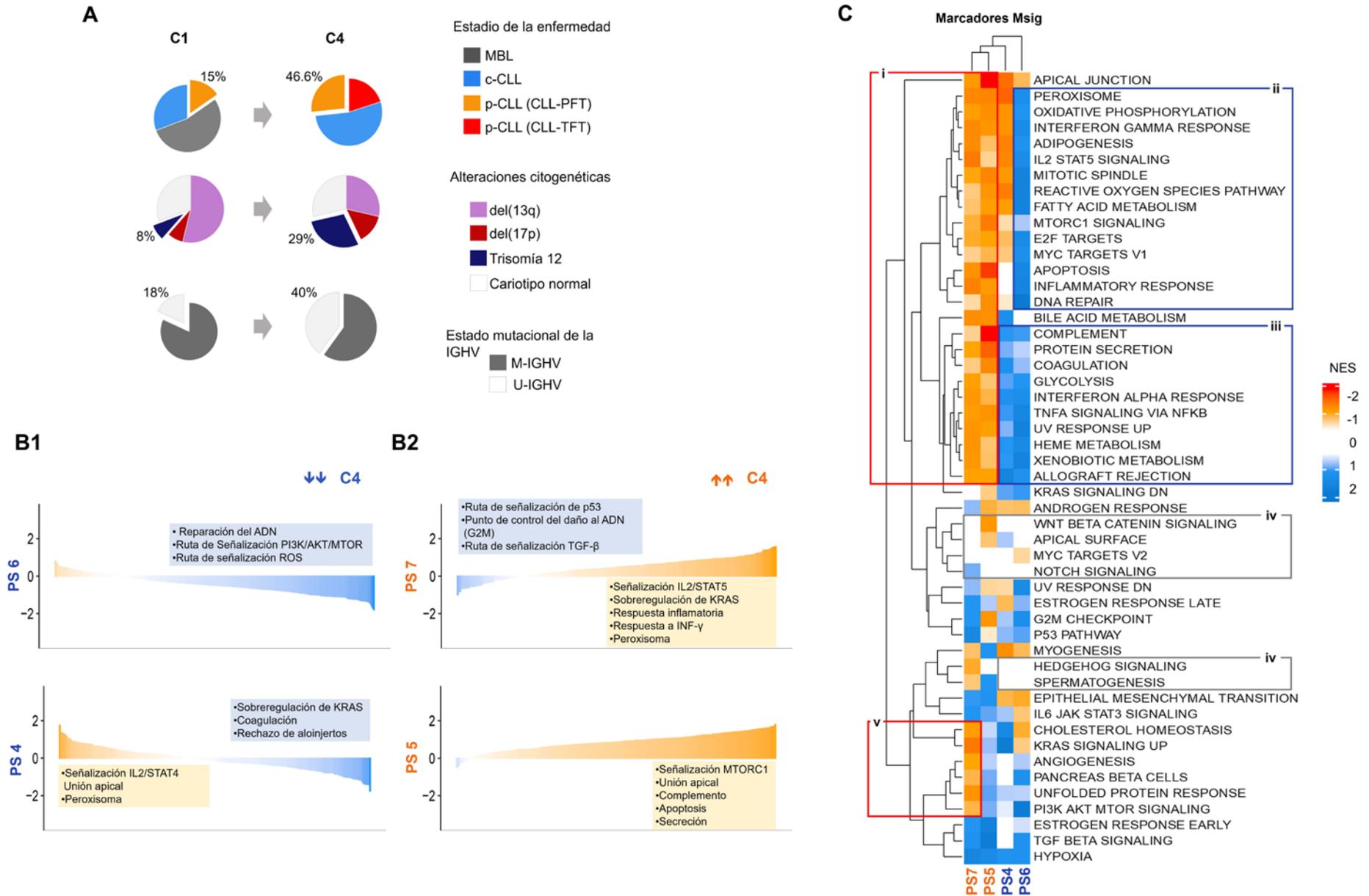
3. Caracterización del perfil funcional del linfocito B clonal.

La caracterización del perfil proteómico funcional de las B-CLL se realizó mediante un análisis de enriquecimiento funcional, superposición de los PS y sus firmas moleculares funcionales (Msig) con los grupos funcionales de proteínas propuestos por Griffen et al.¹⁰⁷ y la evaluación de procesos biológicos (GOBP) de las proteínas solapadas, con el objetivo de conocer los procesos moleculares involucrados en la fisiopatología de la B-CLL.

3.1 Enriquecimiento funcional.

El análisis de firmas moleculares funcionales asociadas a los conjuntos de proteínas PS4-7 (aquellos grupos con expresión diferencial entre los agrupamientos clínicos C1 y C4) (**Figura 45A**) identifica 27 de ellas asociadas a proteínas con sobreexpresión y subexpresión (**Figura 45B**) y 50 asociadas a todo el conjunto de PS (**Figura 45C**).

Los conjuntos PS4 y PS6 revelan una acumulación de proteínas subexpresadas en aquellos pacientes englobados en el C4 relacionadas con rutas de señalización de ROS, MAPK/AKT/MTOR o de reparación del ADN entre otras (**Figura 45B1**).



Para los conjuntos PS5 y PS7, estos pacientes presentan un enriquecimiento de proteínas sobreexpresadas relacionadas con la respuesta inflamatoria, complemento, apoptosis, peroxisoma, secreción, etc. (**Figura 45B2**).

De forma que el enriquecimiento funcional permite:

- Corroborar las funciones moleculares de las proteínas asociadas a los conjuntos PS4-7 con los ya conocidos para CLL, como proteínas del complemento, implicadas en la secreción o glicólisis, etc. (**Figura 45C, recuadros i y iii**).
- Asociar funciones específicas a cada PS. Como, por ejemplo, para el conjunto PS7 aquellas proteínas relacionadas con la respuesta a proteínas desplegadas o angiogénesis o en el caso de PS6, con proteínas involucradas en apoptosis o adipogénesis entre otras (**Figura 45C, recuadros ii y v**).
- Identificar funciones moleculares que no parecen afectar en el desarrollo del LB clonal, como, por ejemplo, las rutas de señalización de WNT/ β -Catenina o la vía de NOTCH (**Figura 45C, recuadros iv**).

3.2 Evaluación del grupo funcional de las proteínas.

El análisis funcional de las proteínas reveló que 117 de ellas eran comunes para las 27 MSig establecidas por LC-MS/MS y los 40 grupos funcionales de proteínas (PFG), publicados por Griffen y colaboradores¹⁰⁷, para los conjuntos PS4-7 (**Figura Suplementaria 18A**).

Además, este estudio revela una alta correlación entre las MSig y los PFG de las proteínas detectadas por LC-MS/MS (**Figura Suplementaria 18B**) y determinar que el 35,7 % de ellas comparten MSig y PFG (**Figura Suplementaria 18C**).

3.3 Análisis de la fisiopatología del linfocito B clonal.

El estudio de la fisiopatología de la B-CLL se realizó en base a 18 procesos biológicos seleccionados (GOBP) (**Tabla Suplementaria 38**). Evidenciándose para dichos términos GOBP seleccionados la presencia de un alto número de proteínas detectadas por LC-MS/MS y que forman parte de los conjuntos PS4-7 (**Figura Suplementaria 19**).

Asimismo, se observó una alta correlación entre los 27 MSig y los términos GOPS seleccionados para el conjunto de proteínas detectadas por LC-MS/MS (**Figura Suplementaria 20A**) y con altos porcentajes de identificación comunes entre ellos (**Figura Suplementaria 20B**).

Sin embargo, al evaluarse los 40 PFG seleccionados por Griffen et al.¹⁰⁷ y los términos GOBP seleccionados para identificar los procesos biológicos en los que se encuentran implicadas las proteínas detectadas por LC-MS/MS, se observó una limitada correlación entre ellos (**Figura Suplementaria 20C**). Manifestando la complementariedad de ambos procesos sobre la caracterización de la fisiopatología de la B-CLL.

4. Caracterización del perfil funcional de la Leucemia Linfocítica Crónica.

Se llevó a cabo tras la identificación de las características funcionales que se encontraban asociadas a cada conjunto PS4-7 en los agrupamientos clínicos C1 y C4 (los cuales presentan la mayor diferencia en cuanto a abundancia de proteínas se refiere).

La caracterización del perfil funcional de la CLL reveló cambios en la abundancia de las proteínas entre los diferentes grupos clínicos presentes en la cohorte de estudio, presentándose la mayor desregulación de proteínas entre los siguientes contrastes (**Tabla 16**):

Tabla 16: Contrastes con resultados significativos evaluados.

Estadio de la enfermedad									
	<i>c-CLL</i>	<i>p-CLL</i>	<i>CLL-PFT</i>	<i>CLL-TFT</i>					
<i>MBL</i>	38	92	0	0					
<i>c-CLL</i>	-	21	0	0					
<i>p-CLL</i>	-	-	0	0					
<i>CLL-PFT</i>	-	-	-	85					
Estado mutacional de la IGHV									
	<i>MBL</i>	<i>c-CLL</i>	<i>p-CLL</i>	<i>CLL-PFT</i>	<i>CLL-TFT</i>	<i>Global</i>			
<i>M-IGHV vs. U-IGHV</i>	0	13	54	36	0	7			
Alteraciones citogenéticas y estado mutacional de la IGHV									
	<i>Global</i>			<i>MBL</i>			<i>c-CLL</i>		
	<i>Todas</i>	<i>M-IGHV</i>	<i>U-IGHV</i>	<i>Todas</i>	<i>M-IGHV</i>	<i>U-IGHV</i>	<i>Todas</i>	<i>M-IGHV</i>	<i>U-IGHV</i>
<i>Cariotipo normal vs. del(17p)</i>	24	0	0	0	0	0	74	126	0
<i>Cariotipo normal vs. del(13q)</i>	9	0	0	60	0	0	17	24	0
<i>Cariotipo normal vs. Trisomía 12</i>	30	0	0	0	0	0	39	63	50

* Nº de proteínas totales que se encuentra significativamente desreguladas en cada uno de los contrastes, con un valor Z score < |0,5| y p-valor < 0,05 (para la prueba de Wilcoxon). Resaltadas en azul se encuentran los 8 mejores resultados para dichos contrastes.

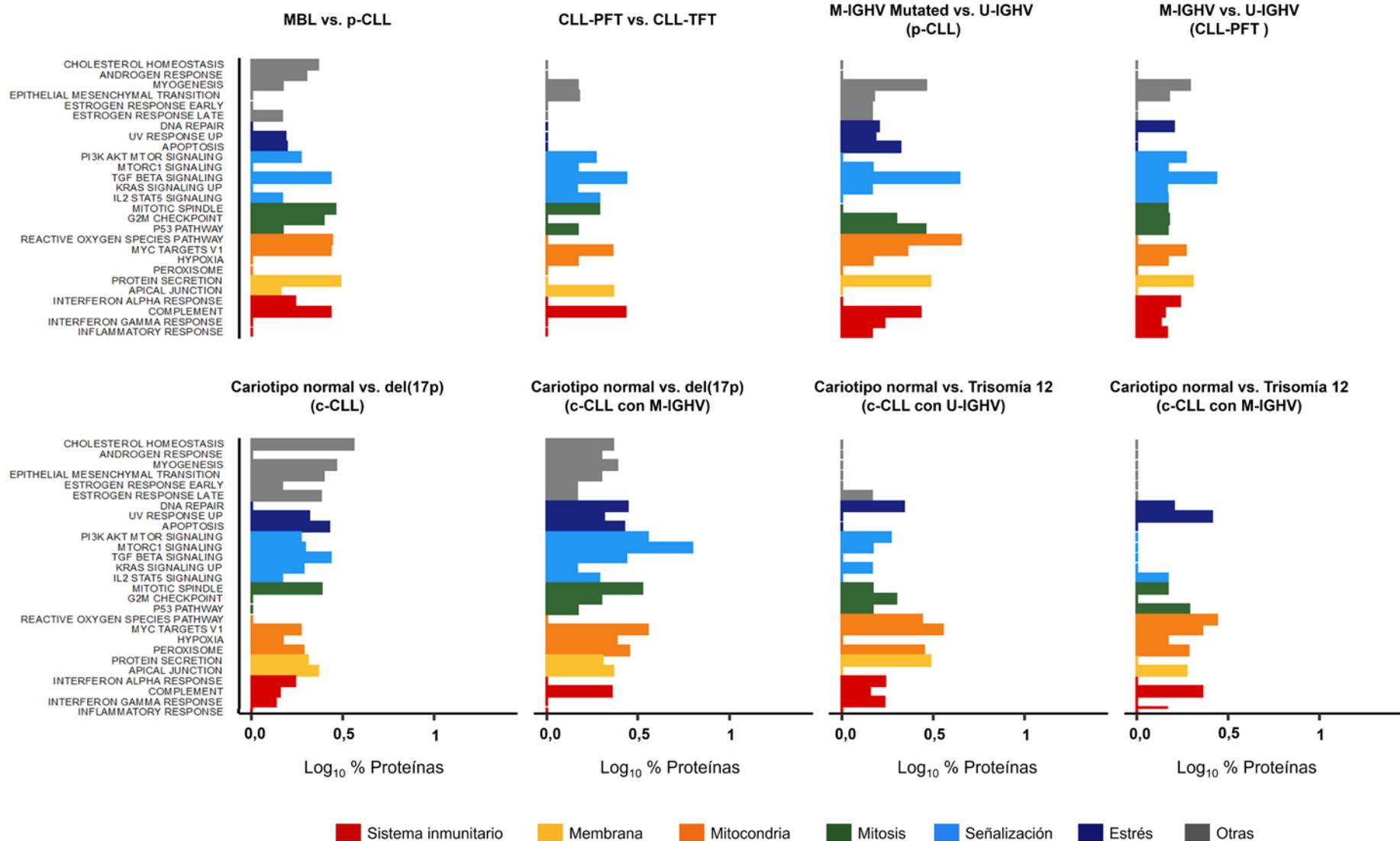
- Progresión de la enfermedad (*p-CLL*) y estadio previo de la misma (*MBL*).
- Situación terapéutica (*CLL-TFT* y *CLL-PFT*).
- Estado mutacional de la IGHV de los grupos *p-CLL* y *CLL-TFT*.
- Presencia de la *del(17p)* y cariotipo normal para el grupo *c-CLL* y el grupo *c-CLL* cuando presentan *M-IGHV*.
- Presencia de la trisomía 12 y cariotipo normal en pacientes con enfermedad estable, independientemente del estado mutacional de la IGHV.

La evaluación para cada una de las comparativas del grupo funcional, en base a las MSig en los conjuntos PS4-7 en los agrupamientos clínicos C1 y C4 (agrupamientos clínicos con mayor diferencia en cuanto a abundancia de proteínas) (**Figura Suplementaria 21**), y la fisiopatología de la enfermedad, a partir de los 18 términos GOBP seleccionados (**Figura Suplementaria 22**), desvela la presencia de firmas moleculares distintivas para cada uno de los contrastes (**Figura 46**) y un alto porcentaje de proteínas consideradas dianas farmacológicas para cada MSig (**Figura 47A**) y término GOBP (**Figura 47B**) identificado en cada contraste. Cabe destacar, que las

proteínas involucradas en procesos relacionados con el sistema inmunitario, mitocondria o estrés presentan porcentajes similares para todos los contrastes establecidos.

Finalmente, el estudio de los términos GOBP en los que se encuentran implicadas las proteínas significativamente desregulas durante la progresión de la enfermedad, revelan (**Figura 48**):

- Una desregulación de las proteínas RAB32, SETDB1 y AKT1 a lo largo del desarrollo de la enfermedad, involucradas en el procesamiento y presentación antigénica, transducción de la señalización mediadas por RAS y ruta de señalización NF- κ B respectivamente.
- Diferencias significativas entre el estadio previo de la enfermedad y la progresión para la proteína RAB10, involucrada en el procesamiento y presentación antigénica.
- Una desregulación de las proteínas BLNK, DNMT1, DOK2, RB1, SYK y FERMT3 según la respuesta a tratamiento, asociadas a procesos de activación del LB, transducción de la señalización mediadas por RAS, señalización a través de los receptores tipo Toll (TLR) y la adhesión celular.
- Cambios significativos en la abundancia de la proteína TOLLIP entre los grupos c-CLL y CLL-PFT, implicada en la señalización a través de TLR.



MBL: Linfocitosis Monoclonal de célula B | CLL: Leucemia Linfocítica Crónica | c-CLL: Leucemia Linfocítica Crónica estable | p-CLL: Leucemia Linfocítica Crónica en progresión | CLL-PFT: Leucemia Linfocítica Crónica previa a primera línea de tratamiento | CLL-TFT: Leucemia Linfocítica Crónica tras primera línea de tratamiento | M-IGHV: Región Variable de la Cadena Pesada de las Inmunoglobulinas Mutada | U-IGHV: Región Variable de la Cadena Pesada de las Inmunoglobulinas No Mutada.

Figura 46: Perfil funcional de las proteínas desreguladas obtenidos por los contrastes presente en el top 8. Porcentaje de proteínas desreguladas en cada firma molecular (MSig).

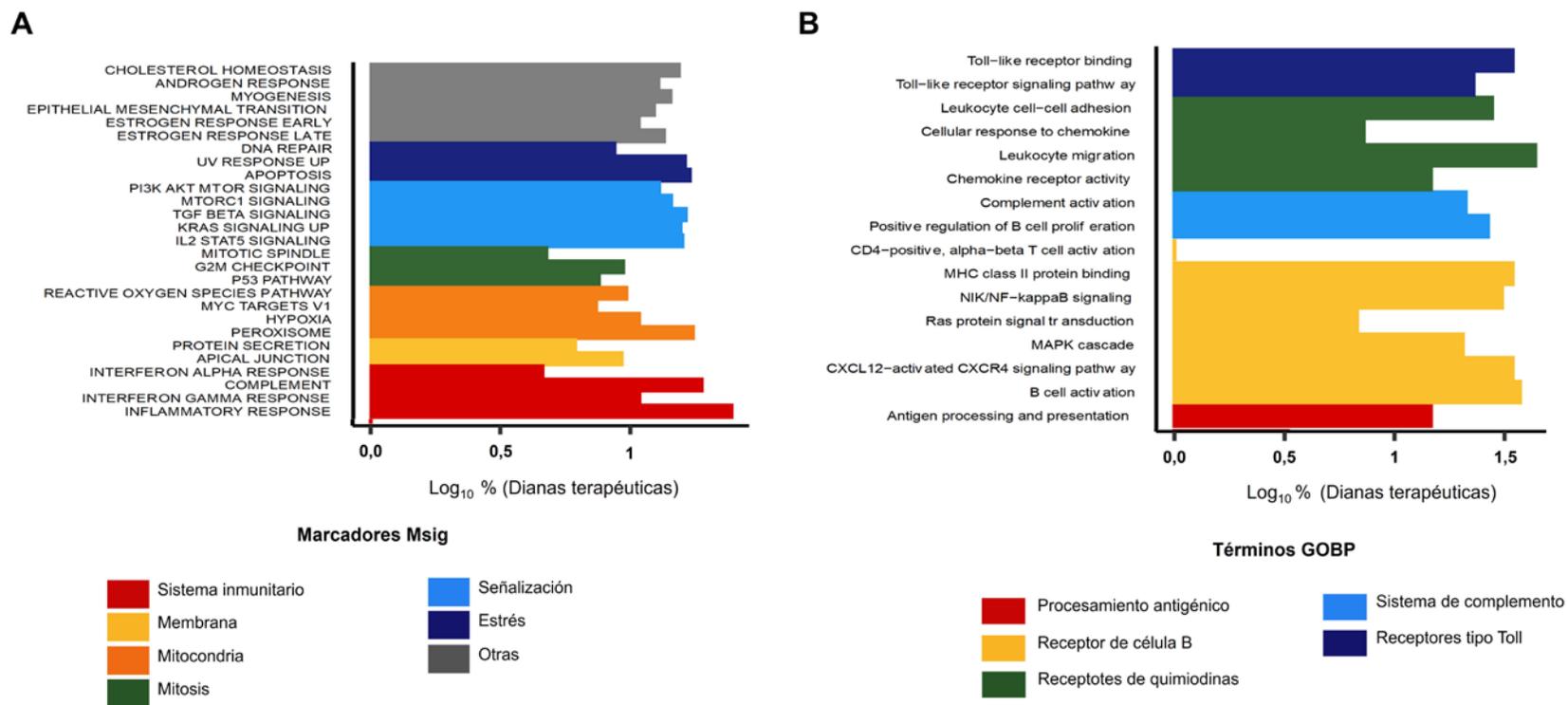
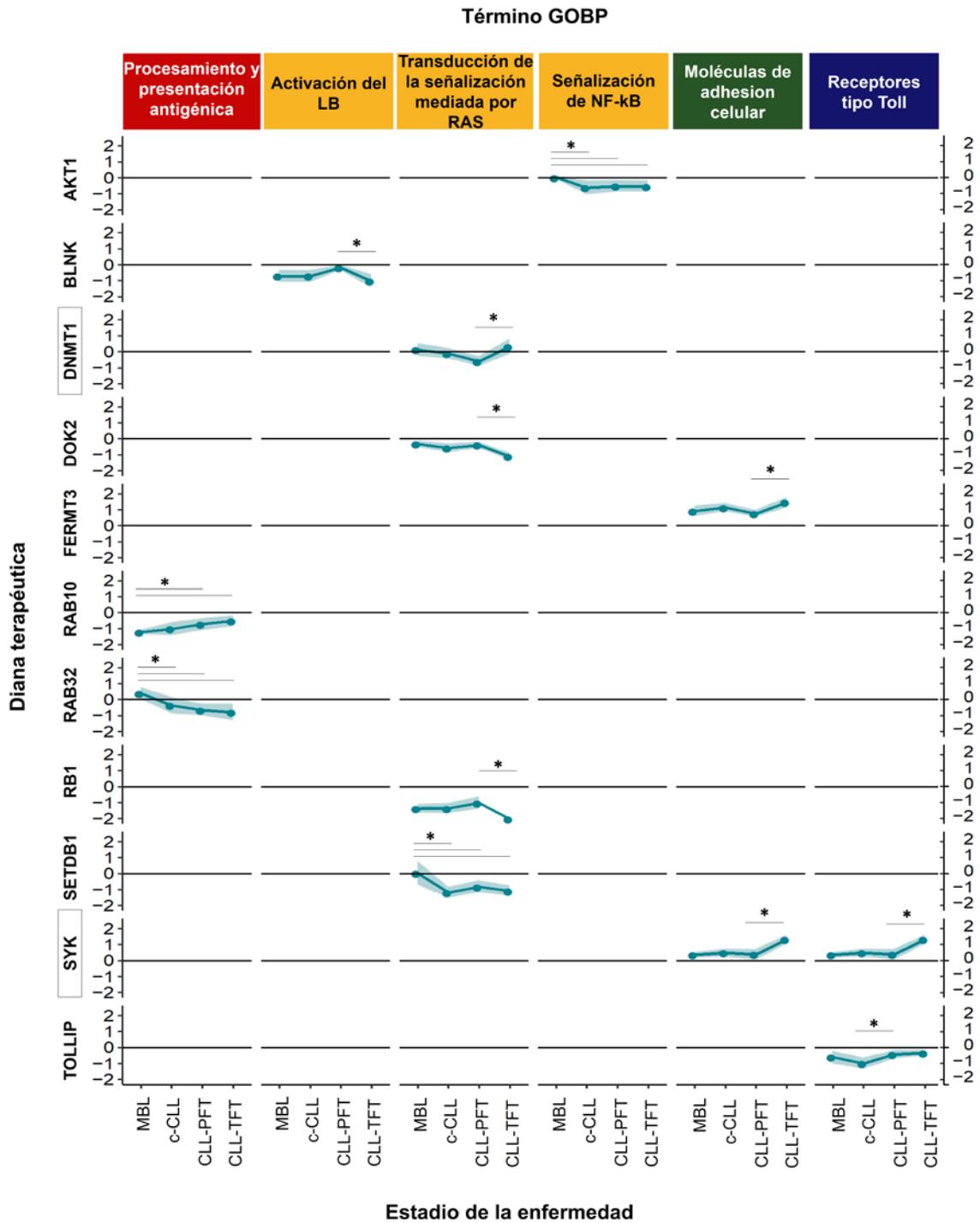


Figura 47: Proporción de proteínas identificadas en cada uno de los contrastes del top 8 como dianas terapéuticas según la base de datos DrugBank (mayo del 2022). A) Resumen de la proporción de proteínas consideradas diana incluidas en cada firma molecular (Msig). B) Resumen de la proporción de proteínas consideradas diana incluidas en cada proceso biológico seleccionado (GOBP).



* p-valor <0,05. La desviación estándar se representa mediante la línea sombreada. | MBL: Linfocitosis Monoclonal de célula B | c-CLL: Leucemia Linfocítica Crónica estable | CLL-PFT: Leucemia Linfocítica Crónica previa a primera línea de tratamiento | CLL-TFT: Leucemia Linfocítica Crónica tras primera línea de tratamiento.

Figura 48: Perfil de procesos biológicos (GOBP) de las proteínas significativamente desreguladas en la progresión de la enfermedad.

Conclusiones

La evaluación del proteoma de la B-CLL ha revelado cambios significativos en la expresión de proteínas involucradas principalmente en la vía de señalización de RAS-MAPK/AKT, desvelando que:

- Las B-CLLs de pacientes con MBL incrementan el metabolismo celular, debido al aumento de expresión de la proteína RAB32, y activan la ruta de señalización de AKT, mediante la interacción de las proteínas SETDB1 y AKT1. Esto propicia la supervivencia y crecimiento de dichas células, desencadenando un aumento en el número de B-CLL y, por tanto, el desarrollo de la enfermedad (CLL).
- Aquellos pacientes con progresión de la enfermedad, aumentan los niveles de expresión de RAB10. Esto facilita el proceso de biogénesis y secreción de pequeñas vesículas extracelulares involucradas en la comunicación celular. De este modo, las B-CLL aumentan la liberación de vesículas con el objetivo de educar al resto de células presentes en el microambiente tumoral, proporcionándoles un ambiente protector que desencadena la evolución de la enfermedad.
- El aumento de la expresión de TOLLIP en pacientes con CLL-PFT podría ser asociada con un peor pronóstico de la enfermedad, ya que dicha proteína activaría la ruta de señalización PI3K/AKT, desencadenando la proliferación y supervivencia de las B-CLL.
- El tratamiento con Ibrutinib dificulta la adhesión de las B-CLL a otras células presentes en el microambiente (reducción de FERMT3), reprimiendo así del estímulo pro-tumoral. Por otro lado, se observa que, tras dicha terapia, los niveles de expresión de RB1 siguen reduciéndose, mientras que los de DNMT1 aumentan. Esto implicaría que el tratamiento con Ibrutinib intenta restaurar el complejo regulador del ciclo celular, a pesar de la pérdida irreversible de la proteína RB1. Asimismo, la terapia con Ibrutinib regula positivamente la activación de la vía de señalización RAS-MAPK/AKT (disminuyendo los niveles de DOK2) y bloquea el nodo central de la ruta de señalización del BCR (con la disminución de BLNK), impidiendo la transmisión de la señal mediada por SYK (quien presenta altos niveles de expresión).

Discusión

Hoy en día, uno de los grandes retos en Biomedicina es diseccionar la complejidad del proteoma, dado que este depende de las necesidades de las propias células, permitiendo así su adaptación ante las perturbaciones del medio ^{56,114,117}. A lo cual se le añaden los niveles de expresión proteica, los cuales se mueven en un amplio rango dinámico que comprende varias órdenes de magnitud (10^6 - 10^{12}) ¹⁰⁸, junto con las distintas localizaciones subcelulares presentes en la célula eucariota, donde se lleva a cabo su síntesis y/o su acción biológica, de acuerdo a las necesidades o requerimientos fisiológicos de la célula ¹⁹¹⁻¹⁹³.

Por dichos motivos, las interacciones proteína-proteína contribuyen e influyen en la señalización intracelular, y, en consecuencia, provoca cambios fenotípicos que desencadenan la modulación del microambiente en el que se mueven dichas células. De modo que el enfoque de la presente tesis doctoral ha permitido desarrollado una estrategia capaz de reducir la complejidad del proteoma (SEC-MAP) e integrar su información con otras ómicas y caracterizar los perfiles proteicos serológicos e intracelulares de la CLL/MBL.

Integración multi-ómica ortogonal.

La integración multi-ómica, necesita tener en cuenta cada una de las características y propiedades intrínsecas de las biomoléculas desde las diferentes metodologías con las que se ha obtenido la información. Especialmente cuando el análisis se hace desde el punto de vista proteómico, siendo esencial conocer desde el tipo de procesamiento de las muestras hasta las diferentes PTMs implicadas.

En proteómica, un primer paso para la reducción de la complejidad es el uso de protocolos de extracción proteica, los cuales se llevan a cabo empleando diferentes soluciones de lisis que contienen distintos componentes, entre los que encontramos surfactantes/detergentes ^{108,114}. Los surfactantes/detergentes son compuestos que existen como moléculas anfipáticas que reducen la tensión interfacial entre dos fases líquidas. De forma que reducen la tensión superficial permitiendo la reorientación de las moléculas al interactuar con la fase acuosa, generando un equilibrio entre la formación de micelas y las proteínas solubilizadas. Siendo dicho equilibrio conocido como CMC (concentración micelar crítica) y el cual es dependiente de diversos factores como la utilización de tensioactivos, presencia de componentes adicionales en la solución de lisis (espesantes, metaloproteasas, etc.), pH o temperatura entre otros, modificando así dicha concentración específica para cada uno de los detergentes ¹⁹⁴. En base a todas estas características, comprobamos que los diferentes métodos utilizados de extracción proteica, tanto si son de proteína total como de fraccionamiento subcelular o enriquecimiento, no muestran sesgos en cuanto a la distribución por rango de PM de las proteínas analizadas. Aunque el tipo de detergente utilizado y el pH de la solución de lisis parecen influir en la eficiencia de extracción, ya que el uso de detergentes no iónicos presenta un mayor rendimiento que los detergentes caotrópicos y, además, la efectividad de la solubilización de las proteínas parece ser mayor con IGEPAL a pH 7 que con Tween 20 a pH 8 (en el estudio proteómico) y con Laurilmaltosido que con Tritón X-100 a pH 8 (cuando se lleva a cabo el enriquecimiento en proteínas de membrana).

Por otro lado, la integración multi-ómica ortogonal también requiere considerar las características de las estrategias de detección de las proteínas y sus interacciones. Hoy en día existen diversos estudios basados en la metodología SEC para el análisis de los perfiles proteómicos en modelos celulares y en tumores primarios (como *Escherichia coli*, HEK293,

células de osteosarcoma o en tejido humano hepático), los cuales se enfocan en el análisis de las interacciones proteicas (proteína-proteína, proteína-metabolito, proteína-moléculas pequeñas), la diferencia entre los niveles de expresión génica-proteica o en combinación con la proteómica espacial. Sin embargo, ninguno de ellos se encuentra enfocado desde el punto de vista de la integración multi-ómica¹⁹⁵⁻¹⁹⁸, aunque en el año 2013, Kirkwood y colaboradores¹⁹⁹ expusieron el uso de la metodología SEC acoplada a MS/MS con un enfoque similar al desarrollado en este estudio. Este sentido, el empleo de la tecnología SEC-MAP nos ha permitido analizar el proteoma a través de la reducción de la complejidad del mismo¹⁰⁸, tanto a nivel de localización subcelular como de fracción de PM de las proteínas nativas, e identificarlas mediante ensayos masivos de afinidad (micromatrices). Confirmando a dicha metodología, una gran sensibilidad de detección y determinación de forma simultánea y rápida de un gran número de proteínas/isoformas concretas^{107,108,119}.

La integración SEC-MAP ha permitido detectar proteínas dentro de su fracción de peso molecular y localización subcelular esperada (por ejemplo, PAK1|P1, CCNB1 o CASP entre otras); así como su correlación a nivel de expresión génica y proteica. También, reveló la existencia de un grupo de proteínas con la localización en su compartimento celular y que se encontraban formando complejos o interactuando con otras proteínas, como se ha observado con BLC-2, RELA, MAPK1, MDM2, TP53, BLNK, SYK, CD19, LYN, ZAP70 y PLCG2. De forma que la metodología SEC-MAP puede ser idónea para llevar a cabo el estudio de redes de interacción proteica y/o evaluar la dinámica de la señalización intracelular; tal y como se determina en este mismo estudio con respecto a las rutas de señalización de supervivencia y muerte celular, senescencia, vigilancia tumoral e inmunoterapia oncológica^{164,195,200,201}, todas ellas implicadas en procesos tumorales.

Por otro lado, la detección de isoformas/PTMs con la estrategia SEC-MAP, como por ejemplo, la forma fosforilada en los residuos Thr37 y 46 de la proteína 4E-BP1, hace de esta estrategia una herramienta que podría ser muy útil en el descubrimiento/determinación de nuevas interacciones proteicas presentes en las diferentes rutas de señalización implicadas en el desarrollo de linfomas/cánceres, como por ejemplo, las relacionadas con los patrones moleculares asociados a daño celular, que resultan de gran utilidad para el diseño y desarrollo de nuevas inmunoterapias, tanto en linfomas como en leucemias, debido a su relación directa con la muerte celular inmunogénica.

Finalmente, la metodología SEC-MAP permitiría, de una forma similar a lo descrito por Díez y colaboradores¹⁵², la monitorización de la localización subcelular de las proteínas y su correlación multi-ómica (relación de los niveles de expresión génica y proteica), identificando modulaciones características de los linfomas/cánceres en las diferentes vías de señalización intracelular.

Caracterización proteómica de la Leucemia Linfocítica Crónica.

Durante las últimas décadas, se ha ido mejorando la comprensión biológica de la CLL mediante la realización de estudios genómicos y transcriptómicos/epigenómicos^{121,138}. Aunque aún no ha conseguido descifrar la base molecular de la enfermedad, debido a su alta heterogeneidad¹³⁸. Por dichos motivos, el estudio proteómico es una herramienta prometedora para el entendimiento de los mecanismos biológicos subyacentes de la CLL^{121,138}, ya que esta enfermedad es un modelo ideal, debido a la facilidad de obtención de las muestras y la gran cantidad de B-CLL presentes en las mismas¹¹⁴.

Asimismo, durante los últimos años, el pronóstico y el tratamiento de los pacientes con CLL ha mejorado significativamente. Siendo la principal causa de muerte las comorbilidades e infecciones y no la propia enfermedad. Debido a la profunda desregulación del sistema inmunitario, tanto a nivel innato como adaptativo, aumentando el riesgo de infección, incluso cuando se padece el estadio previo de la enfermedad (MBL); donde se ha descrito una mayor susceptibles de infección que en la población general^{99,100,102}.

Según evoluciona la enfermedad se va disminuyendo el número de células B no clonales y aumenta el número de B-CLLs, desencadenando una disminución en la producción de Abs²⁰², y en consecuencia que estos pacientes presenten hipogammaglobulinemia, la cual se va acentuando con la progresión de la enfermedad y con las características pronósticas de alto riesgo (como por ejemplo la presencia de U-IGHV)^{99,101,102}. Siendo únicamente un porcentaje muy pequeño de dichos pacientes (~15 %) los que siguen conservando valores normales para los niveles séricos de Ig²⁰³.

De acuerdo a la desregulación de la respuesta inmunitaria, se han llevado a cabo estudios sobre el papel de los LT (Th1, Th2, Tregs), células nodriza, CD o células estromales de la MO en la vigilancia inmune tumoral y la patogénesis^{172,204}, donde se destaca su importancia en el proceso de la vigilancia inmune y su correlación con el inicio, evolución y respuesta terapéutica de la CLL^{9,101}. Además, el microambiente tiene importancia en la inmunosupresión y el desarrollo de la CLL⁸⁹, donde las B-CLL adquieren capacidad de evasión de la respuesta inmune^{88,89,205-207}:

- i) Aumentando la expresión de proteínas inhibitoras como PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, CD47, etc. Las cuales son responsables de modular la actividad de los LT y NK (jugando un papel negativo en su activación) y de la inhibición de la fagocitosis por parte de los MØ (rompiendo la homeostasis inmune).
- ii) Reduciendo la expresión en su superficie de moléculas HLA, debilitando su inmunogenicidad y su papel como APC.

Por dichos motivos, el presente estudio determinó el perfil serológico de las Igs, así como la evaluación de la respuesta humoral frente a aAgs y mAgs, los perfiles de los factores inmunológicos solubles implicados en el microambiente tumoral de las B-CLL y la caracterización del perfil proteico intracelular de las B-CLL.

Evaluación del perfil serológico de las inmunoglobulinas en la cohorte de estudio.

La determinación cuantitativa del perfil serológico de los niveles de Igs para la cohorte de estudio, revela la presencia de valores reducidos para todos los isotipos de Igs estudiados. Situándose por debajo de los límites inferiores establecidos para todas ellas en la población general ¹⁸⁹ (véase la **Figura 40**). Asimismo, también se observa la presencia de niveles de concentración parecidos para los isotipos Ig G e Ig M, contrastando con lo descrito para los niveles normales de abundancia relativa de las Igs en suero humano, donde la mayor concentración la muestran el isotipo Ig G, seguido de la Ig A e Ig M y por último, la Ig E ^{208,209}. Lo cual podría concordar con el aumento del número de B-CLLs que se encuentran activadas y que no producen respuesta eficaz (aumenta la producción y liberación de Ig M), ya que la Ig M es la primera Ig que se expresa durante el desarrollo del LB y tras su activación, con la finalidad de proporcionar una respuesta antigénica rápida y controlar la homeostasis tisular ^{208,210-214}.

Por otro lado, cuando se evaluó la respuesta humoral frente a aAgs en la cohorte de estudio, se observó que los aAgs más frecuentes eran, para la Ig M, las proteínas mutagénicas localizadas en Cyt. y Ves. (ALDOA, ANXA1, THYG, BGLR o LAMP-2) y para la Ig G, las proteínas no mutagénicas (PD-L1, NP1L3, NP1L4, MMP-2, Ox40L, GBU4-5/TDRD-12). Hechos que concuerdan con lo descrito en enfermedades autoinmunes, donde los aAgs más comunes son moléculas intracelulares a las que los LB y Abs no tienen acceso en condiciones normales ²¹⁵ y presentan cierta inmunogenicidad (característica intrínseca debida a sus propiedades bioquímicas y estructurales) ²¹⁶.

Así mismo, los aAgs pueden proceder tanto de las células tumorales como de su contrapartida normal. Aunque, sus niveles de expresión en sangre y otros fluidos corporales pueden verse aumentados cuando existe un proceso tumoral (como, por ejemplo, Ags de superficie celular, enzimas, hormonas, Ags oncofetales, receptores u oncogenes entre otros). Por lo cual, resultan de utilidad en el diagnóstico oncológico para evaluar la situación diagnóstica y pronóstica del paciente; permitiendo asociar sus niveles en suero con el estadio del tumor ²¹⁷⁻²¹⁹. En este sentido, se ha observado en la cohorte de estudio como marcadores tumorales recurrentes CA 15-3 (forma soluble de la proteína MUC1), CD274 (sPD-L1), CA 72-4 (glucoproteína 72 asociada a tumor) y SCCA (sSerpínB3). Sugiriendo que CA 72-4 aumenta sus niveles según transcurre la enfermedad (producción de aAbs Ig M), mientras que CA 15-3 y CD274 presentan ciertos niveles antes de que la enfermedad se desarrolle (producción de aAbs Ig G). En contraste con lo que ocurre con CA 15-3 en otros tumores sólidos (como por ejemplo, cáncer de mama) y con la baja expresión de PD-L1 de las propias B-CLL ^{62,220,221}. Por otro lado, el 50 % de los pacientes estudiados presentan aAbs Ig G en suero *versus* 39 % que tienen ambos isotipos de Ig frente a SCCA, proteína localizada en Cyt. y Nuc. celular, expresada en ciertos órganos (como el esófago o los órganos reproductores femeninos) en condiciones fisiológicas normales ²²². Por lo que dicho aAg, antes de que se desarrolle la enfermedad, ya parece presentar niveles detectables que desencadenan la producción de aAbs Ig G, aunque su carácter mutagénico aparentemente hace necesaria la producción *de novo* de más Abs (producción de aAbs Ig M) frente a nuevos epítomos de la proteína. Esto es debido a que la Ig M es una Ig de baja afinidad y polirreactivo que se secreta tras la activación de los LB y cuya afinidad (interacción del sitio de unión del Ab con uno de los epítomos del Ag) se ve aumentada cuando forman polímeros (estructura pentamérica – forma secretada-) ^{208,213}. Por su parte, la Ig G es una Ig de alta afinidad secretado

por los LB de memoria y las células plasmáticas ²²³ y cuya producción frente a aAgs se ve aumentada con la edad, generando uno de los mecanismo de tolerancia inmune ²¹⁶.

Cuando estas mismas observaciones se llevan a cabo respecto a la respuesta humoral frente a mAgs, se observa que aquellos patógenos con capacidad de infectar el tracto respiratorio son los más recurrentes en la cohorte de estudio. En CLL, se han asociado deficiencias en los niveles de Ig A e Ig G4 con un aumento de la frecuencia de infecciones del tracto respiratorio ²²⁴. Confirmando lo observado en nuestra cohorte de estudio, donde los niveles de Ig para estos pacientes son muy bajos y los principales microorganismos infecciosos aquellos que desarrollan su acción en el tracto respiratorio.

Asimismo, se ha descrito en este tipo de pacientes una amplia gama de infecciones producidas por bacterias (como, por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli*), reactivación de virus (Varicela-Zoster, Herpes simple, Citomegalovirus y Epstein-Barr), infecciones oportunistas (*Listeria*, *Aspergillus*, *Candida* y *Cryptococcus*), parásitos y micobacterias entre muchos otros ^{99,103,226,227}. Estableciéndose ciertas asociaciones entre los bajos niveles de Ig G con mayor frecuencia y severidad de infecciones bacterianas, entre las que se encuentran *S. pneumoniae* y *H. influenzae* o en el caso de deficiencias en los niveles Ig G3, con un papel protector contra infecciones por herpes virus ²²⁴. Lo cual, constata lo observado en este estudio, donde los mAg más recurrentes en la cohorte son el hongo *C. albicans* (con Abs Ig M), el virus del sarampión (con Abs Ig G), Citomegalovirus (con Abs Ig G) y la bacteria *Streptococcus pneumoniae* (con ambos isotipos de Igs). Siendo *C. albicans* una infección oportunista con una gran capacidad invasiva, la cual reside en el tracto gastrointestinal de los humanos ²²⁸. El virus del sarampión frente al que la población se encuentra vacunada desde los primeros meses de vida, ya que causa enfermedades graves y es altamente contagiosa ²²⁹. Por su parte, Citomegalovirus es un herpes virus que establece latencia y persiste de por vida en los individuos infectados, presentando en adultos pertenecientes a países desarrollados una respuesta humoral específica al mismo en el 60 % de los casos ²³⁰.

Evaluación del perfil serológico de las inmunoglobulinas y factores inmunológicos de acuerdo al grupo clínico.

El análisis por grupos clínicos (de acuerdo a criterios diagnósticos, pronósticos, de evolución y respuesta a tratamiento) reveló que los aAgs más recurrentes frente a los que se tienen aAbs, independientemente del grupo, son mayoritariamente proteínas no mutagénicas vesiculares frente a las que se tienen aAbs Ig M (MMP-2 – a excepción de CLL-TFT -), aAbs Ig G (AGTR1 y LAMP-2) y ambos isotipos de aAbs (ENOB).

MMP-2 es una proteína localizada en Ves. implicada en procesos metabólicos y enzimáticos, responsable de la degradación de la matriz extracelular, debido a su acción enzimática sobre el colágeno tipo IV. Sus niveles aumentan a medida que progresa el tumor, provocando una disminución local del pH que desencadena la activación de procesos enzimáticos proteolíticos (degradación del colágeno tipo IV), facilitando la separación de las células tumorales del tejido y promoviendo su expansión ^{231,232}. Por lo tanto, la presencia de Ig M, independientemente del grupo clínico, parece indicar un aumento en la actividad enzimática de la degradación de la matriz extracelular, pudiéndose relacionar con una mayor movilidad de las células tumorales.

Por otro lado, AGTR1, componente del sistema renina-angiotensina (encargado del mantenimiento de la homeostasis), se encuentra expresado en condiciones fisiológicas normales en sistema nervioso central, glándulas suprarrenales, tiroides, sistema digestivo o sistema urinario, controlando así la remodelación vascular, dado que su activación conduce al aumento del grosor de la pared y su vasoconstricción²³³. Por lo cual, la presencia de aAb Ig G frente a AGTR1, podría contribuir en dichos pacientes a mejorar el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular, pudiendo llegar a favorecer la diseminación de las B-CLLs.

Por su parte, la presencia de aAbs Ig G frente a la proteína LAMP-2 podría desestabilizar la membrana lisosomal y disminuir la adhesión de las B-CLLs a la matriz extracelular, ya que la proteína LAMP-2 se encarga de estabilizar la estructura del lisosoma (orgánulo catabólico ácido localizado en todos los tipos celulares de mamíferos, excepto en los eritrocitos maduros), formando parte de su membrana, y de la realización de funciones dentro del tráfico lisosomal, exocitosis, autofagia mediada por chaperonas y en la fusión y transporte del colesterol²³⁴. Aunque dicha inhibición de su función, contrasta con lo que se ha observado en otros tumores sólidos como el cáncer de mama, donde hay un aumento de la expresión de LAMP-2 en ausencia de vascularización y metabolismo glucolítico, desembocando en la acidificación del medio y aumento de la progresión debido a la adhesión de las células tumorales a la matriz extracelular²³⁵.

Asimismo, la presencia de ambos aAbs frente a ENOB parece indicar que este aAg presenta ciertos niveles constitutivos antes del desarrollo de la enfermedad (ya que es una proteína implicada en el catabolismo y anabolismo de la glucosa)²³⁶, que se ven aumentados con el progreso de la misma, tal y como habían demostrado anteriormente Griggi et. al²³⁷ en un estudio realizado en pacientes con CLL y que se corrobora en este estudio con la presencia de aAbs Ig G e Ig M frente a dicho aAg.

En consecuencia, estas observaciones podrían indicar la presencia de un medio acidificado por el aumento de expresión de MMP-2, junto al bloqueo del metabolismo glucolítico por la acción de los aAbs frente a ENBO, lo cual aumenta de la expresión de LAMP-2 y, en consecuencia, la producción de aAbs Ig G frente a dicha proteína se dispararía, permitiendo desestabilizar/cambiar las funciones lisosomales y disminuir la adhesión de las B-CLLs a la matriz, mejorando así su movimiento y diseminación. Esta última, además, se vería favorecida por el aumento de la permeabilidad vascular y la vasodilatación de los capilares presentes en el microambiente, debido a la interacción de los aAbs Ig G con su diana (AGTR1).

Por su parte, la evaluación de la respuesta humoral frente a mAgs, ha revelado la presencia de forma recurrente de Echovirus, Parvovirus y Metapneumovirus humano tipo 16, independientemente del grupo clínico al que pertenezcan los pacientes (a excepción del grupo CLL-TFT). Esto puede ser debido a que tanto Echovirus como Parvovirus son dos virus frente a los que la población infantil es especialmente vulnerable, sobre todo durante los primeros meses de vida, asociándose a un amplio espectro de enfermedades con diferentes grados de severidad^{238,239}, mientras que las infecciones por Metapneumovirus humano en población sana adulta se encuentra entre el 3 – 6 % de los casos y cuya incidencia aumenta en adultos de ≥ 65 años con afecciones médicas crónicas hasta el 16 – 25 %²⁴⁰. Por tanto, la detección en este estudio de Abs Ig G (de memoria) frente a Echovirus y Parvovirus y de Ig M (*de novo*) frente a Metapneumovirus humano tipo 16, parece exponer la tendencia evolutiva de la respuesta humoral frente a dichos virus (existencia de memoria para aquellos a los que se es

especialmente vulnerable durante los primeros meses de vida y respuesta *de novo* frente a los que se es vulnerable tras superar la edad adulta).

Perfil serológico según diagnóstico.

La evaluación de los perfiles de factores solubles ha evidenciado, según el grupo diagnóstico (MBL vs. CLL), variaciones a nivel cuantitativo de las proteínas sCD47/sIAP, sTIMD-4, sCD27, sIL-2R y sULBP-1. Todas ellas encargadas de modular las funciones de los MØ y regular la actividad y proliferación de los LT.

Se sabe que CD47 es una proteína que participa en la fagocitosis y en la proliferación, migración y apoptosis celular, regulando la homeostasis inmune; además de ser la encargada de la activación del eje SIRP α /CD47 impidiendo la fagocitosis. Por lo que un aumento de su expresión en células malignas, conlleva el escape tumoral ^{62,89,96,206}.

En el caso de la proteína TIMD-4, quien presenta una expresión selectiva en APCs, células NK y tumorales, es un ligando natural de TIM-1, cuya unión se encarga de modular la proliferación de los LT. Así mismo, la expresión de TIMD-4 inhibe la expresión de otras proteínas (como CD80, CD86, HLA-II o TNF- α) impidiendo/imposibilitando la acción de los MØ. Observándose una correlación directa entre el grado de enfermedad y sus niveles solubles en pacientes con espondilitis anquilosante o accidentes cerebrovasculares ²⁴¹.

Por otro lado, CD27 es considerada una proteína activadora de LB, encargada de proporcionar la 2ª señal de activación a los LT durante el proceso de presentación antigénica. Hecho que regula su activación y mejora la producción de Igs por parte de los LB ^{89,242,243}. Se ha descrito que un aumento en los niveles de expresión de CD27, IL-2R, CD23, CD30, TNF, TNFR2, BCA, VEGFR e IL-10 aumenta el riesgo de desarrollar linfoma de célula B ²⁴⁴ y que aquellos LB autorreactivos CD27⁺ o B-CLL con reordenamiento IGHV1-69 son capaces de producir Ig M, implicada en el proceso de homeostasis inmune (favoreciendo la eliminación de los cuerpos apoptóticos, proteínas mal plegadas, ...) ²⁹.

Igualmente, el aumento de la expresión de IL-2R, como se acaba de comentar, incrementa el riesgo de desarrollar linfomas de célula B; correlacionando su concentración con el número de linfocitos y asociándose con el grado de severidad ^{9,245}. Se expresa en LT, Treg y APCs y forma parte de la vía de señalización IL-2/IL-2R, involucrada en el mantenimiento de la autotolerancia inmune. Su forma soluble (escisión proteolítica de la cadena α , unida a Mem.) es capaz de acoplarse a IL-2 favoreciendo la tolerancia, ya que disminuye su disponibilidad, permitiendo que los Tregs (quienes presentan expresión constitutiva de IL-2R) se expandan, mientras que cuando la disponibilidad de IL-2 es alta, tanto Tregs como LT y NK son capaces de proliferar al unirse IL-2 a su receptor (IL-2R) ²⁴⁵.

Por último, ULBP-1 al unirse a su receptor induce la citotoxicidad tanto de células NK como de LT citotóxicos, mejorando así la respuesta inmune antitumoral ^{30,246}. En pacientes con cáncer de páncreas, el aumento de la expresión de ULBP-1 en membrana se ha asociado con una buena SG, al igual que con una clínica favorable en otros tipos de cánceres (como glioblastoma, cáncer de mama, ...) ²⁴⁶.

Por tanto, de acuerdo al perfil proteico observado según el diagnóstico, se propone un panel que permitiría estratificar a los pacientes según el grado de inhibición del proceso de fagocitosis por parte de los MØ (aumento de los niveles de sCD47/sIAP en CLL), modulación de la

proliferación de los LT y expansión de los Tregs (aumento de las concentraciones séricas de sTIMD-4 y sIL-2R en CLL), disminución de la función de los LT y NK (disminución de ULBP-1 en CLL), junto con la activación de las B-CLL y debilitación de su inmunogenicidad (aumento de los niveles de sCD27 y disminución de la expresión de la molécula HLA-II por acción de sTIMD-4 en CLL).

Perfil serológico según el factor pronóstico.

El factor pronóstico más determinante para llevar a cabo la clasificación de los pacientes y la propuesta de terapia es el estado mutacional de la IGHV, ya que su estado de SHM es independiente del estadio clínico o de otros biomarcadores ^{8,20,34,47}.

En este estudio, se ha observado que para el grupo de mal pronóstico (U-IGHV) los niveles séricos de Ig A disminuyen significativamente, mientras que el grupo de buen pronóstico (M-IGHV) presenta un aumento de los niveles de Ig G2. En general, la Ig A es una Ig que se encuentra de forma polimérica en las mucosas y formando dímeros cuando es secretada ^{210,247}. Esta Ig presenta un papel fundamental en la protección de la superficie mucosa frente a patógenos (como virus, toxinas o bacterias) e importante papel en la prevención de infecciones, desarrollando una función antimicrobiana, neutralizante y protectora, además de promover la simbiosis bacteriana ^{208,210,212,247}. Por otro lado, el isotipo Ig G2 reconoce citocinas solubles, polisacáridos de las cápsulas bacterianas e inhibe la interacción receptor-ligando ^{209,210}. Se ha observado que niveles bajos de Ig A se asocian con progresión y desarrollo de la enfermedad ^{100,101} y que aquellos pacientes que presentan U-IGHV tienen niveles menores de Ig A en suero que los que presentan M-IGHV; pudiéndose de este modo asociar los niveles de Ig A con la agresividad de la enfermedad ¹⁰⁰. Esto contrasta con los resultados observados por Peppas et al. ²¹², donde los tumores sólidos presentan un aumento de los niveles séricos de Ig A. Por otro lado, en el estudio publicado por Lacombe y colaboradores ²⁴⁸ se informó de una reducción de los niveles séricos de todos los isotipos de Ig G salvo para la Ig G2, contrastando con los resultados observados años después por Vitale y colaboradores ¹⁰¹. En este estudio se confirma la correlación directa entre la disminución de los niveles en suero de Ig A con un mal pronóstico de la enfermedad y el aumento de los niveles de Ig G2 en pacientes de buen pronóstico, como consecuencia de un efecto neutralizante frente al aumento que dichos pacientes presentan para la gran mayoría de los factores solubles estudiados (salvo sCD47/sIAP, sTIMD-4 y s Arginasa-1, de las que hablaremos más adelante).

La evaluación de la respuesta humoral frente a mAgs en dicho grupo pronóstico, reveló como virus recurrente en pacientes con U-IGHV a Citomegalovirus (con presencia de Abs Ig G). Se sabe que dicho virus produce infecciones oportunistas asociadas con los niveles de Ig A, provocando una mayor incidencia de infecciones del tracto respiratorio superior en aquellos pacientes que presentan deficiencias de dicha Ig ^{11,103}. Asimismo, Citomegalovirus causa infecciones graves en pacientes con VIH, personas sometidas a terapias inmunosupresoras o receptores de trasplantes ²⁴⁹. Dicho virus tras una infección primaria se establece en reservorios quedando latente, provocando en dichos individuos reactivaciones o pudiendo ser objeto de nuevas reinfecciones por otras cepas. Su mecanismo de infección induce la expansión de los LT y modula su distribución y diferenciación, además de la liberación de IL-15 permitiendo aumentar la capacidad de unión de células NK a las proteínas ULBP, favoreciendo su actividad. Uno de los problemas que presentan los pacientes con CLL es el agotamiento del repertorio de LT y que es independiente del estado serológico de la infección; aunque contribuye a su vez a la expansión vírica ^{38,250}. Por lo que la presencia de Ig G frente a dicho virus muestra que dichos pacientes

han sido infectados y han generado inmunidad antes de que se desarrollara la enfermedad, la cual parece aumentar la probabilidad de reactivación/reinfección por dicho mAg cuando el pronóstico es malo.

Por su parte, la bacteria *S. typhi* fue detectada en ambos estados mutacionales como uno de los mAgs más recurrentes. Aunque la respuesta humoral que presentaban los pacientes era diferente, ya que aquellos con buen pronóstico tenían Abs Ig M frente a la proteína hemolítica y en los casos de mal pronóstico Abs Ig G frente a la proteína de la membrana externa. Esta bacteria es un patógeno intracelular zoonótico que se propaga por la ingesta de alimentos y aguas contaminadas a nivel mundial, provocando unas 200000 muertes al año. Es por tanto un patógeno obligado restringido a humanos que lesiona las células M del intestino (enterocitos – tipo de célula epitelial-), eliminando la barrera biológica e infectando a MØ y ganglios mesentéricos ²⁵¹. Se ha observado que existen pocos factores virulentos únicos para dicha especie al compararla con otras bacterias de su género (*Salmonella* entérica); siendo uno de los factores específicos que afectan a la interacción con las células del huésped la toxina tipo AB (toxina tifoidea), la cual únicamente es producida en el interior de las células de mamíferos y posteriormente transportada al ambiente extracelular mediante Ves. ²⁵². Pudiéndose así confirmar las diferencias en cuanto a la respuesta humoral frente a dicha bacteria, ya que, aunque el género *Salmonella* es muy prevalente en la población mundial, parece que aquellos pacientes con M-IGHV son más propensos a desarrollar la infección por *S. typhi* que los que presentan U-IGHV.

Asimismo, la evaluación de los factores inmunológicos solubles para dicho grupo pronóstico muestra una tendencia a la baja para aquellos pacientes que tienen U-IGHV, salvo para sArginasa-1 (aumenta sus niveles en suero), sCD47 y sTIMD-4 (ambas con concentraciones similares para ambos estados mutacionales).

La Arginasa-1 es una proteína liberada al microambiente por las células mieloides, encargada de contribuir a la supresión de las funciones de los LT e inhibir la proliferación de las células NK. Se ha observado que las células tumorales aumentan el catabolismo de la arginasa, suprimiendo la acción de los LT CD8, estabilizando a los Treg e influyendo en la proliferación del tumor ^{253,254}.

Por tanto, los pacientes con CLL, independientemente del estado mutacional de la IGHV, parecen tener una presentación antigénica deficiente al inhibir la expresión de las moléculas HLA-II ²⁴¹ debido a la actividad de sTIMD-4 y un bloqueo de la fagocitosis por parte de los MØ, por acción de sCD47 ^{89,96}. A lo cual, en el caso de pacientes con U-IGHV, se le sumaría el aumento de las concentraciones de sArginasa-1. Esto último, facilitaría la estabilización de los Tregs, generando protección a las B-CLL, y suprimiría la acción citotóxica de los LT CD8 y NK ²⁵³, desencadenando en un peor pronóstico.

Por ello, para poder estratificar a dichos pacientes en base a su pronóstico, se propone un panel de 4 proteínas solubles relacionadas con la actividad de los LT, células NK y Treg. Las cuales son CXCL10, sCD134/sOX40, sULBP-1 y sLAG-3.

CXCL10 es una quimiocina secretada por células tumorales, monocitos, células endoteliales y fibroblastos, en respuesta a INF- γ , encargada de atraer a los linfocitos T Treg hacia el microambiente tumoral ²⁵⁵. Se ha correlacionado sus niveles de expresión con el tiempo hasta tratamiento en CLL ¹⁴⁵ y también, ha sido detectada en el sobrenadante de co-cultivos de células madre mesenquimales y B-CLLs ¹⁰. Además de ser una quimiocina cuyos niveles de expresión se

ven aumentados en ambientes tisulares inflamados y con gran relevancia en las enfermedades autoinmunes ²⁵⁶.

Respecto a CD134/OX40 (receptor activador de LT), se ha observado que se encuentra regulado al alza en LT CD4 y CD8 tras su activación para promover la diferenciación, expansión y supervivencia de los mismos, inhibiendo la acción de los Tregs y estimulando la inmunidad antitumoral ^{257,258}. Además, se ha descrito que altos niveles de sCD134/sOX40 se encuentran relacionados con SG reducida en pacientes con cáncer de colon avanzado, debido al bloqueo del ligando presente en las APC por la forma soluble del receptor ²⁵⁸.

Por otro lado, sLAG-3 es una proteína expresada principalmente por CD y LB y por Tregs, LT y NK activadas ^{92,259}. Dicha proteína interactúa con la molécula HLA-II y CD3, inhibiendo la proliferación y liberación de citocinas por parte de los LT y favoreciendo el escape tumoral y el agotamiento de ambos tipos celulares ^{89,92,256}. Asociándose la expresión de LAG-3 con características genéticas y citogenéticas adversas en CLL, cuya mayor expresión se correlaciona con peores resultados clínicos y periodos más cortos de recaída tras tratamiento ^{38,89,92}.

Por tanto, el panel propuesto, con capacidad para clasificar ambos estados mutacionales de la IGHV (con valor pronóstico), demuestra la importancia de los LT en la progresión y el equilibrio establecido en el propio microambiente tumoral, ya que la disminución de las concentraciones en suero de CXCL10, sCD134/sOX40, sULBP-1 y sLAG-3 implican que pacientes con U-IGHV presentan un microambiente menos inflamado, menor activación de los LT y células NK y, en consecuencia, hay una reducción de la eficacia de la respuesta inmune antitumoral, junto con una estabilización de los Tregs (debido al aumento de las concentraciones de sArginasa-1), promoviendo la inmunosupresión. Además del envío de señales que impiden la fagocitosis de las B-CLL (presencia de sCD47/sIAP) y la modulación negativa de la fagocitosis por parte de los MØ (presencia de sTIMD-4).

Perfil serológico según la evolución de la enfermedad.

El análisis de la respuesta humoral de los pacientes según va evolución de la enfermedad, ha revelado un aumento en cuanto al número de Abs *de novo* a medida que la CLL avanza. Esto puede ser debido a procesos de mimetismo molecular, por los cuales se reconocen ciertos epítopos de proteínas propias como agentes extraños, ya que la Ig M, anticuerpo de naturaleza polirreactiva, reconoce epítopos que presentan una longitud variable de entre 4 a 12 aminoácidos ²⁶⁰. Por lo que las probabilidades de similitud entre la composición peptídica de los Ags y moléculas propias es muy alta, desencadenando el proceso de reactividad cruzada por parte de los Abs ^{216,261}.

Por su parte, la evaluación de la respuesta humoral frente a mAgs ha desvelado que independientemente del subgrupo al que pertenezcan, todos ellos parecen ser proclives a padecer infecciones epiteliales/sanguíneas (como Epstein-Barr) y bacterianas (como, por ejemplo, *S. pneumoniae* y *Leptospira biflexa*). También, se ha observado que pacientes con MBL son más propensos a padecer reactivación/reinfección por ciertos agentes infecciosos a los que habían sido expuestos durante los primeros años de vida (como el Parvovirus y/o el virus Varicela-Zoster) ²²², mientras que aquellos con enfermedad estable (c-CLL) y progresión (p-CLL) son más susceptibles a padecer infecciones debidas a virus del tracto respiratorio (como Sarampión y SARS-CoV2) e infecciones gastrointestinales (como Norovirus o *S. typhi*) ²³⁸, ya que

ambas estructuras son las principales puertas de incorporación de nuevos agentes extraños, a través de la respiración e ingesta y hábitos alimenticios.

Por otro lado, el análisis cuantitativo de los perfiles de las proteínas séricas PD-L1, LAG-3 e INF- γ presentan los niveles más bajos cuando la enfermedad permanece estable, mientras que los niveles de IL-4 se ven aumentados drásticamente con la progresión de la enfermedad.

PD-L1 es una molécula co-inhibidora que actúa sobre los LT inhibiendo su activación⁸⁹. Se encuentra sobreexpresada en células tumorales conduciendo el escape tumoral, apoptosis y agotamiento de los LT y a su vez, potencia la supresión inmunitaria por la acción de los Tregs^{96,262,263}. Así mismo, se ha observado tanto *in vitro* como *in vivo* la acción moduladora del INF- γ sobre la secreción y expresión en superficie de PD-L1, correlacionando de forma directa el aumento de los niveles de sPD-L1 con un mal pronóstico en melanoma y linfoma de célula B^{89,255,263-265}. Por su parte, el INF- γ es producido por los LT Th1 (antitumorales), células NK activadas y B-CLLs (vía autocrina), estimulando la liberación de ciertas interleucinas como la IL-4 y regulando la expresión de moléculas HLA y CD48, entre otras muchas funciones^{9,253,266-268}. Es una citocina pleiotrópica con efecto citotóxico o estimulante de mecanismos inmunosupresores según las condiciones de la célula y el microambiente. Se ha observado que infusiones bajas de INF- γ inducen metástasis, mientras que cuando son altas provocan la regresión del tumor. Por lo que INF- γ puede crear un nicho metastásico que induce la migración e invasión por parte de las células clonales²⁶⁸.

La liberación de IL-4 induce la diferenciación de los LT y M ϕ hacia Th2 y M2 (formas celulares pro-tumorales), quienes van a retroalimentarse positivamente inhibiendo la muerte celular programada de LB y LT, prolongando su supervivencia^{9,172,204,254}. A su vez, se encuentra asociada a progresión en CLL al aumentar la señalización intracelular del BCR, proteger a las B-CLL de la apoptosis espontánea (vía autocrina) y reducir la respuesta antitumoral, encontrándose una relación inversamente proporcional entre los niveles de IL-4 e INF- γ ^{9,51,172,204}. Así mismo, la producción de Arginasa-1 y la expresión de CD48 se ven reguladas por IL-4, apoyando de este modo el equilibrio dinámico entre efecto de las células Th2 y la citotoxicidad de los LT y células NK^{267,269,270}.

CD48 por su parte, es una proteína expresada constitutivamente en células hematopoyéticas (granulocitos, LT, monocitos/M ϕ , CD y células NK). Participa en la adhesión y activación de dichas células por medio de la unión a sus ligando 2B4 (alta afinidad) y CD2 (baja afinidad), permitiendo el reconocimiento y la eliminación de las células tumorales por parte de los LT y células NK y de la activación de APCs y granulocitos, respectivamente^{267,269,271}. Se ha descrito que dicha proteína se suele encontrar regulada negativamente en varios tipos de leucemias (como la leucemia mielogénica aguda y crónica), promoviendo el escape tumoral de las células clonales de las células NK²⁶⁷. Esto contrasta con lo observado en otros cánceres, donde los niveles de sCD48 se ven aumentados (linfoma cutáneo de célula T o mieloma múltiple)^{269,271}. Considerándose así la forma soluble de la proteína como un señuelo, el cual captura sus ligandos y disminuye su disponibilidad, ejerciendo un efecto estimulador cuando hay baja disponibilidad de su ligando y un efecto inhibitor cuando hay alta disponibilidad de los mismos; regulando la actividad inmune según el contexto²⁷¹.

Por tanto, el panel que se propone para estratificar a los pacientes según la evolución de la enfermedad (sCD27, sCD48/sBLAST-1, sArginasa-1, sLAG-3, IL-4 y sIL-2R), pone de manifiesto el equilibrio activador e inmunosupresor que se produce en el microambiente tumoral. Haciendo

que la ruptura de dicho equilibrio (aumento de los niveles de sLAG-3 y sArginasa-1, junto con INF- γ y PD-L1, quienes presentan los niveles séricos más bajos durante la etapa estable), cause la progresión de la enfermedad, debido a la disminución/obstaculización de la activación de LT por la reducida disposición de las moléculas HAL-II presentes en las APC (sLAG-3)^{89,92}, diferenciación de los LT y M \emptyset hacia sus formas pro-tumorales (Th2 y M2 – IL-4 –)^{9,103,172} y estabilización y crecimiento de los Tregs (sLAG-3, sArginasa-1, sIL-2R y sCD27)^{38,92,245,253}. Generando un microambiente inmunosuprimido en el que las B-CLLs se encuentran activadas (sCD27)²⁴³ y con capacidad de sobrevivir y expandirse (IL-4)^{51,204} en un microambiente altamente inflamado (sIL-2R)²⁴⁵ y con presencia de LT de fenotipo agotado (sLAG-3, sPD-L1)^{256,262}, donde se mantiene un equilibrio entre la activación de los mismos y disminución de las capacidades citotóxicas de los LT y células NK (sCD48, IL-4, INF- γ y PD-L1)^{9,89,204,206,263,267-269,271}.

Perfil serológico según la respuesta a tratamiento.

Como se ha comentado anteriormente, la mayoría de las infecciones que padecen los pacientes con CLL se producen principalmente en el tracto respiratorio, a lo que se le suman los efectos del tratamiento. La aplicación intensiva de terapias citotóxicas conduce a la mielosupresión, promoviendo un aumento en la frecuencia de infecciones respiratorias graves. Además, el uso de agentes alquilantes (Clorambucil) los hace más propensos a sufrir infecciones bacterianas asociadas a *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* o bacterias entéricas Gram negativas. Por su parte, el tratamiento con Fludarabina (un análogo de la purina), hace a estos pacientes no sólo más vulnerables ante las infecciones anteriormente mencionadas, sino también a infecciones oportunistas (*Listeria*, *Mycobacteria* o *Pneumocystis*) y víricas (Varicela-Zoster y Virus del herpes). Sin embargo, el uso de terapias dirigidas no está exento del riesgo de infección. De hecho, el tratamiento con Alemtuzumab se relaciona con reactivación de infecciones por Citomegalovirus, mientras que las terapias con Ibrutinib o Venetoclax aumentan la probabilidad de que los sujetos sufran neumonía grave. Asimismo, el tratamiento con Ibrutinib, además, contribuye a la aparición de infecciones en las vías respiratorias y urinarias, infecciones oportunistas por *Pneumocystis jirovecii* y un mayor riesgo durante los primeros 6 meses de tratamiento de infecciones fúngicas (*Aspergillus* y *Cryptococcus*). En cambio, la terapia con Venetoclax les hace más susceptibles a infecciones respiratorias y oportunistas por *Aspergillus*, *P. jirovecii*, Varicela-Zoster o *C. albicans*, entre otras, y aumenta la probabilidad de infecciones por Virus del herpes²⁷²⁻²⁷⁴.

Resulta conocido que las infecciones fúngicas y/o víricas en pacientes con CLL están directamente relacionadas con el número de tratamientos y los niveles séricos de Igs, dado que se ha descrito que las terapias dirigidas aumentan las probabilidades de infecciones fúngicas^{221,233} y que los niveles bajos de Ig A se asocian con mayor incidencia de infecciones del tracto respiratorio⁶².

En este estudio, se ha observado que los pacientes tras tratamiento (CLL-TFT) presentan una restauración parcial de los niveles de Ig A e Ig M (niveles séricos superiores a los presentes en pacientes pre-tratamiento -CLL-PFT-). Esto pone de manifiesto el tipo de terapia recibida (terapia con Ibrutinib) y corrobora lo observado por Sun y colaboradores para la Ig A²⁷⁵ y por Forconi *et al.* para la Ig M²⁹. Debido a que durante el tratamiento, las B-CLL de los pacientes tratados con Ibrutinib se ven privadas de los estímulos presentes en el microambiente, haciendo que estos clones aumenten su expresión de Ig M en superficie y disminuyan la expresión del resto de isotipos²⁹.

Cabe destacar que el grupo CLL-TFT es el único grupo en el cual no se han detectado Abs Ig M frente a Metapneumovirus humano tipo 16 y el aAg MMP-2 e Ig G frente a Echovirus y Parvovirus. Lo cual puede indicar que la acción del Ibrutinib, aunque restablece muy discretamente la respuesta humoral, implica la muerte de las B-CLLs y células B no clonales y, en consecuencia, aumenta la probabilidad de padecer infecciones (mayoritariamente víricas gastrointestinales -Rotavirus, Astrovirus, Norovirus, etc.-) e incrementa el pH del microambiente, impidiendo que MMP-2 degrade la matriz extracelular evitando la expansión del tumor.

Finalmente, el panel propuesto para diferenciar el tipo de respuesta a tratamiento se basa en 7 proteínas relacionadas con la función y proliferación de los LT, células NK y Tregs (sCD48, sLAG-3, sPD-L1, sIL-2R, sTIMD-4), junto con la regulación de la polarización de los MØ y los LT y la migración (INF- γ y sSiglec-9).

Siglec-9 es una proteína expresada en granulocitos, monocitos/MØ, CD y células NK. Cuyos ligandos se encuentra en células tumorales, así como en bacterias. De forma que permite discriminar entre lo propio y lo ajeno, regulando el sistema inmune innato y el adaptativo. Dicha unión con su ligando regula la polarización de los MØ hacia M2, así como la inhibición de la función de los granulocitos. Además, puede unirse a la proteína de adhesión vascular VCAM-1, presente en las células endoteliales, modulando la migración de los granulocitos hacia lugares inflamados ^{87,266,276}.

En consecuencia, en este estudio se observa que la respuesta a terapia (con Ibrutinib) disminuye los niveles cuantitativos en suero de la mayor parte de los factores solubles, salvo los niveles cuantitativos de sCD48, que siguen aumentando a pesar de la terapia, y de sLAG-3 y sPD-L1, que se mantienen. Por tanto, los posibles marcadores de respuesta a tratamiento muestran un restablecimiento parcial de las funciones de los LT y su expansión (disminución de sTIMD-4 y sIL-2R y aumento de los niveles de sCD48) ^{241,245,269,271}. Aunque se sigue manteniendo una expresión sostenida de marcadores fenotípicos asociados a agotamiento (mantenimiento de los niveles séricos de sLAG-3 y sPD-L1) ^{256,262}, sin restablecimiento del equilibrio entre Th1 (antitumoral) y Th2 (pro-tumoral) (debido a la disminución de los niveles de INF- γ) ²⁶⁸. Así como una disminución de la polarización de los MØ hacia su forma pro-tumoral y de la migración de los granulocitos hacia los centros de proliferación, conllevando una reactivación de sus funciones (disminución de sSiglec-9) ^{87,266,276}.

Evaluación del perfil proteico intracelular de las células B clonales.

El estudio proteómico de las B-CLL a partir de las 2897 proteínas identificadas y cuantificadas, ha revelado cambios significativos en la expresión de RAB32, SETDB1 y AKT1 a medida que la enfermedad evoluciona, sobreexpresión de RAB10 y TOLLIP cuando los pacientes progresan y variaciones en la expresión de las proteínas BLNK, DOK2, RB1, DNMT1, SYK y FERMT3 según la respuesta a tratamiento (las tres primeras subexpresadas y las tres últimas sobreexpresadas). Poniendo de manifiesto los cambios producidos entre los niveles de expresión de las proteínas involucradas en la viabilidad y proliferación del tumor a medida que la CLL evoluciona.

En el caso de RAB32, SETDB1 y AKT1, los picos más altos de expresión proteica se dan cuando los pacientes presentan el estadio previo de la enfermedad (MBL) y bajan al desarrollarla (CLL).

RAB32 es una proteína miembro de la familia de oncogenes RAS, la cual codifica una proteína A quinasa de anclaje relacionada con orgánulos metabólicos (como retículo endoplasmático o mitocondria), apoya la autofagia bajo condiciones basales ricas en nutrientes y permite la transmisión de la señal dentro y fuera de las células ²⁷⁷⁻²⁷⁹. También, interacciona con la molécula mTOR promoviendo su asociación a los lisosomas, así como un aumento en la proliferación, viabilidad y tamaño de las células ^{277,278}.

Por otro lado, la proteína SETDB1 es una histona metiltransferasa de la histona 3, encargada de regular epigenéticamente la heterocromatina y el silenciamiento de los genes presentes en la eucromatina por medio de mono/di/tri metilaciones en el residuo Lys 9 ²⁸⁰⁻²⁸². Dicha proteína tiene un papel fundamental en la diferenciación y cambio fenotípico de las células inmunitarias (como LB y LT), influye en la producción de citocinas y en la activación de genes relacionados con inmunidad innata. Además, es importante en el proceso de maduración de los LB, desde células pro-B a pre-B (LB maduro), en los procesos de recombinación somática (segmentos VDJ) y en la regulación negativa de las moléculas HLA-I ²⁸². Asimismo, puede interactuar con AKT, promoviendo la señalización de dicha vía y reprimiendo directamente la transcripción de genes pro-apoptóticos ²⁸⁰.

AKT1 es una proteína reguladora de procesos metabólicos, de proliferación, supervivencia y crecimiento celular ²⁸³. Forma parte de la familia de las AKT, a la cual también pertenece AKT2, proteína normalmente sobreexpresada en diferentes tumores ²⁸⁴. Esta familia es capaz de interactuar con mTOR, cuando se encuentran activadas, apoyando así la síntesis de proteínas de supervivencia celular (por ejemplo, Bcl-XL o Bcl-2) y migración e inhibir la expresión de proteínas pro-apoptóticas (como BAD) ²⁸⁵.

Por tanto, el hecho de que dichas proteínas tengan una alta expresión en MBL y disminuyan al desarrollarse la enfermedad, puede indicar que una alta expresión de RAB32 conduce a un mayor reclutamiento de mTOR y comunicación célula-célula. Esto propiciaría un aumento en el metabolismo celular, así como de supervivencia de las B-CLLs y modulación de la expresión génica. Lo cual desencadenaría la activación de la ruta de señalización de AKT, al interactuar SETDB1 con AKT1, y disminuiría la expresión de HLA-I en la superficie de las B-CLLs. Ocasionando, el progreso y evolución de la enfermedad (paso de MBL a CLL).

En el caso de RAB10, se observa un aumento de su expresión cuando se produce la progresión de la enfermedad al compararla con MBL. RAB10 es una proteína RAS GTPasa implicada en la biogénesis y secreción de pequeñas vesículas extracelulares (desde su formación hasta su fusión con las membranas) ²⁸⁶. Se ha encontrado sobreexpresada en las B-CLLs ²⁸⁷ y su expresión parece ser regulada por miARNs, ya que en el caso de la Leucemia Mieloide Aguda se asocia con el miARN-203 y en Glioma con el miARN-432-5p ²⁸⁸. En los últimos años, se han considerado a las pequeñas vesículas extracelulares un componente esencial en la progresión del tumor, ya que este tipo de vesículas forman parte de la comunicación célula a célula, permitiendo alterar la composición y función de las células presentes en el microambiente tumoral. Su composición y carga suele ser variable, pudiendo transportar ácidos nucleicos (como ADN, ARNm, miARNs, etc.), proteínas (tetraspaninas, proteínas de choque térmico, factores inmunomoduladores, ...), lípidos (como por ejemplo colesterol, esfingomielina, ceramida) y ligandos Fas entre otras muchas moléculas ^{39,287}. Se ha observado que, en tumores sólidos, estas pequeñas vesículas extracelulares, en su mayor parte exosomas, inhiben de forma sistemática la respuesta inmune antitumoral a través de los factores inmunológicos como PD-L1. Sin embargo, en el caso de leucemias o linfomas, como por ejemplo la CLL, las células tumorales son capaces de secretar

este tipo de vesículas (con fenotipo CD63⁺, CD81⁺, CD9⁺ y SDC1), con el objetivo de educar a las células circundantes y mejorar la proliferación del tumor y su escapa de la respuesta inmunitaria ^{39,286}.

Por consiguiente, el hecho de que RAB10 se sobreexpresa en pacientes con progresión de la enfermedad, podría ser considerado un factor de riesgo. Debido a que altos niveles de RAB10 permitirían mejorar la biogénesis y secreción de pequeñas vesículas extracelulares capaces de modular el microambiente tumoral. Esto último, disminuiría las funciones de los linfocitos, suprimiendo la respuesta inmune antitumoral y estabilizando y activando a los Treg, propiciando así la progresión de la CLL.

Por su parte, el aumento de la expresión de forma significativa de la proteína TOLLIP cuando los pacientes forman parte del grupo CLL-PFT, en comparación al estadio estable de la enfermedad (c-CLL), indicaría que dicha proteína presenta un efecto oncogénico, ya que en carcinoma hepático, la sobreexpresión de TOLLIP promueve la proliferación, migración y metástasis de las células tumorales y además, activa la vía de señalización de PI3K/AKT como demostraron Huang y colaboradores en el 2022 ²⁸⁹. A esto se le suma los resultados obtenidos por Muzio et al., quienes observaron una expresión constitutiva de TOLLIP en todas las B-CLLs evaluadas ²⁹⁰. Posteriormente, Kanduri y colaboradores ²⁹¹, al realizar el análisis de los perfiles de metilación del ADN, observaron que aquellos pacientes con mal pronóstico pertenecientes al subgrupo #1 (IGHV estereotipada codificada por los genes IGHV1-5-7, IGHD6-19 e IGHJ4) presentaban un enriquecimiento en 4 genes responsables de las rutas de señalización TLR, entre los que se encontraba TOLLIP. Además, Mohr et al., en el 2018, informaron que los linfocitos B reguladores procedentes de pacientes con CLL sobreexpresaban dicha proteína, inhibiendo la señalización a través del TLR9, controlando de esta forma la respuesta inmunitaria antitumoral a largo plazo. Contrastando con los resultados obtenidos por Tsanousa et al. en el 2015 ²⁹², donde la expresión de TOLLIP fue baja o indetectable en pacientes con CLL.

Por tanto, se podría decir que la sobreexpresión de TOLLIP en pacientes del grupo CLL-PFT sería un factor de riesgo, ya que un aumento en dicha proteína conlleva un peor pronóstico de la enfermedad.

Por último, las observaciones realizadas en la cohorte de estudio en base a la situación terapéutica, revelan que el tratamiento con Ibrutinib disminuye los niveles de expresión proteica para BLNK, DOK2 y RB1, mientras que aumenta los de DNMT1, SYK y FERMT3.

Ibrutinib es un inhibidor de BTK capaz de reducir la proliferación y supervivencia de las B-CLL, así como la fosforilación de AKT y ERK mediada por la ruta de señalización del BCR. Además, bloquea la expresión de los receptores de quimiocinas C-X-C en las B-CLL y la liberación de sus ligandos, impidiendo la migración de las mismas hacia los centros de proliferación, privando así del estímulo pro-tumoral del microambiente ²⁹³. De este modo, la inhibición de la función de la proteína BTK (componente clave en la ruta de señalización del BCR) conlleva una disminución de la expresión proteica de BLNK, como ocurre en la cohorte de estudio. BLNK es una proteína nodal de la ruta de señalización del BCR, la cual forma parte del complejo PLCγ2, desencadenando la activación de la vía MAPK y AKT ²⁹⁴. BLNK es activada por la acción de BTK y SYK ²⁹⁵⁻²⁹⁷. Dicha activación estimula la vía RAS-MAPK/AKT, quien a su vez es regulada negativamente por la proteína DOK2. Esta última es la encargada de reclutar a RAS e impedir la activación de MAPK y AKT, desencadenando la inhibición de la proliferación celular y migración ²⁹⁸⁻³⁰⁰.

Por todo ello, una desregulación en las vías de señalización RAS-MAPK/AKT implica modificaciones a nivel genómico. Se ha visto que una pérdida de la función de la proteína RB1 (codificada por el gen situado en el brazo largo del cromosoma 13), provoca un estrés replicativo que resulta en la producción de daño al ADN. Esto aumenta el riesgo de aparición de mutaciones, ya que promueve la replicación del ADN e incrementa los niveles REDOX de la célula, así como el metabolismo de la glutamina³⁰¹⁻³⁰³. Por ello, la proteína RB1 presenta una función supresora de tumores que protege contra el daño al ADN y cuya pérdida impulsa de forma irreversible a la ruptura del control del ciclo celular^{301,301,303}. Aunque no ejerce su acción sola, ya que forma parte de un complejo regulador de procesos de metilación, transcripción y replicación del ADN, conformado por las proteínas RB1-DNMT1-E2F³⁰⁴. DNMT1 es una ADN metiltransferasa encargada de mantener los patrones de metilación tras el proceso de replicación celular sobre los dinucleótidos CpG^{305,306}. De este modo, dicha proteína coopera con RB, reprimiendo la transcripción de los promotores que contienen sitios de unión a E2F (factor de transcripción), inhibiendo así la proliferación celular^{303,304}. En CLL, se ha visto que los niveles de expresión de DNMT1 son bajos y que una pérdida de la funcionalidad de RB1 o alteraciones en su gen (debido a que la del-13q- es altamente frecuente en CLL) son firmas identificativas de la enfermedad^{302,305-307}.

Esto sugiere, que el tratamiento con Ibrutinib, disminuye la expresión de DOK2, lo que predispondría a la B-CLL a una mejora en cuanto a la transmisión de señales vía RAS-MAPK/AKT. Además de aumentar la expresión de la proteína DNMT1, con el objetivo de restablecer el complejo regulador RB1-DNMT1-E2F y así, restaurar el control del ciclo celular. Aunque uno de los mayores problemas para conseguirlo, sería el hecho de la pérdida irreversible de expresión de la proteína RB1 y, por consiguiente, la imposibilidad de recuperar la regulación del ciclo celular. Lo que podría desencadenar en posteriores recaídas por parte de los pacientes en los que se sigue manteniendo residualmente el clon.

Otra de las características comunes en las B-CLL, son los altos niveles de fosforilación basal de las proteínas tirosina quinasa asociadas a la ruta de señalización del BCR, como es el caso de SYK³⁰⁸. SYK es una proteína acoplada al BCR activado, encargada de propagar la señal de dicho receptor de forma eficiente³⁰⁹. Se ha observado que el tratamiento con Ibrutinib, al bloquear la acción de BTK, desemboca en una disminución del reconocimiento antigénico por parte del BCR, inhibiendo su señal. Aunque este bloqueo, no reduce la activación de la proteína SYK³⁰⁸. Maffei y colaboradores identificaron que niveles bajos de IRF4 (factor de transcripción) refuerzan la señalización del BCR, ya que este induce la expresión de SYK, permitiendo la acumulación de dicha proteína en el citoplasma de la B-CLL, independientemente del estado de activación del BCR³⁰⁹. Esto concuerda con los resultados obtenidos en la cohorte de estudio, en el que la expresión proteica de la proteína SYK se ve aumentada, aunque dichos pacientes hayan sido sometidos a tratamiento con Ibrutinib.

Finalmente, otro de los cambios observados tras la terapia con Ibrutinib, es la reducción de los niveles de expresión de la proteína FERMT3. FERMT3 es una proteína de membrana involucrada en la adhesión de las células hematopoyéticas¹⁰⁶. Fue identificada por primera vez en B-CLLs por Boyd et al en el 2003³¹⁰ y se ha relacionado con alteraciones en la activación de vías de señalización involucradas en apoptosis celular³¹¹. Su expresión parece ser regulada por miARNs y sus niveles parecen depender del tumor analizado, ya que se ha asociado la sobreexpresión de FERMT3 como factor pronóstico en Leucemia Mieloide Aguda, mientras que en el caso de Melanoma lo es su subexpresión³¹¹. Por lo que el tratamiento con Ibrutinib, parece presentar un efecto en la expresión proteica de dicha proteína, ya que como se ha comentado

anteriormente, Ibrutinib inhibe la migración de las B-CLLs e impediría su unión a otros tipos celulares presentes en el microambiente tumoral.

Conclusiones

1. La integración multi-ómica aporta información acerca de la presencia/ausencia de las proteínas, cuantificación transcriptómica y proteómica, localización subcelular, formación de complejos/interacciones, modificaciones postraduccionales e identificación de isoformas.
2. El análisis sistemático de los factores inmunológicos solubles proporciona nuevas perspectivas para comprender el microambiente tumoral de las B-CLL; sugiriendo que los LT son fundamentales durante la supresión y disfunción inmune, debido a que la mayor parte de los factores inmunológicos solubles con diferencias significativas están relacionados con:
 - Reconocimiento antigénico, coestimulación, diferenciación y proliferación de LT y selección de monocitos circulantes asociados a tumor.
 - Ruptura de la homeostasis celular por aumento de formas pro-tumorales de LT y Macrófagos (Th2, Tregs y M2) y presencia de un microambiente tumoral inflamado, conduciendo al escape tumoral.
3. El perfil sérico de las inmunoglobulinas revela niveles cuantitativos en la cohorte de estudio por debajo de los límites inferiores establecidos como normales, además de la disminución progresiva de sus concentraciones séricas a medida que la enfermedad avanza.
4. El perfil autoantigénico ha revelado la presencia de un mayor número de autoanticuerpos *de novo* a medida que la enfermedad progresa. Siendo los autoantígenos más frecuentes proteínas mutagénicas localizadas en vesícula.
5. El perfil antigénico ha confirmado que la cohorte de estudio es más propensa a sufrir infecciones recurrentes por virus del tracto respiratorio, resultando en un aumento de la producción de Ig M frente a los mismos. Esto parece indicar que los perfiles diferenciales de isotipos de inmunoglobulinas frente a dichos patógenos proporcionan información relevante sobre el tipo de tratamiento más óptimo.
6. La evaluación del proteoma de la B-CLL ha revelado una desregulación mayoritariamente de proteínas involucradas en la activación de la vía de señalización RAS-MAPK/AKT, independientemente del estadio de la enfermedad, y desvela que el tratamiento con Ibrutinib posibilita el restablecimiento de ciertos componentes implicados en la regulación del ciclo celular.
7. El uso de estrategias proteómicas funcionales son herramientas muy útiles en cuanto a la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad y permitiría estratificar a los pacientes.

Bibliografía

1. Maura, F. *et al.* Relevance of Stereotyped B-Cell Receptors in the Context of the Molecular, Cytogenetic and Clinical Features of Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLOS ONE* **6**, e24313 (2011).
2. Delgado, J., Nadeu, F., Colomer, D. & Campo, E. Chronic lymphocytic leukemia: from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Haematologica* **105**, 2205–2217 (2020).
3. Shankland, K. R., Armitage, J. O. & Hancock, B. W. Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet* **380**, 848–857 (2012).
4. Ansell, S. M. Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings* **90**, 1152–1163 (2015).
5. Bowzyk Al-Naeeb, A., Ajithkumar, T., Behan, S. & Hodson, D. J. Non-Hodgkin lymphoma. *BMJ* **362**, k3204 (2018).
6. Solomon, J. P. & Arcila, M. E. Molecular Diagnostics of Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer J* **26**, 186–194 (2020).
7. Purdue, M. P. *et al.* Prediagnostic serum sCD27 and sCD30 in serial samples and risks of non-Hodgkin lymphoma subtypes. *Int J Cancer* **146**, 3312–3319 (2020).
8. Alaggio, R. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* **36**, 1720–1748 (2022).
9. Allegra, A. *et al.* Clinico-Biological Implications of Modified Levels of Cytokines in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Possible Therapeutic Role. *Cancers (Basel)* **12**, 524 (2020).

10. Dubois, N. *et al.* Importance of Crosstalk Between Chronic Lymphocytic Leukemia Cells and the Stromal Microenvironment: Direct Contact, Soluble Factors, and Extracellular Vesicles. *Front Oncol* **10**, 1422 (2020).
11. Hallek, M. & Al-Sawaf, O. Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *American Journal of Hematology* **96**, 1679–1705 (2021).
12. Yao, Y., Lin, X., Li, F., Jin, J. & Wang, H. The global burden and attributable risk factors of chronic lymphocytic leukemia in 204 countries and territories from 1990 to 2019: analysis based on the global burden of disease study 2019. *BioMedical Engineering OnLine* **21**, 4 (2022).
13. Vos, T. *et al.* Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* **396**, 1204–1222 (2020).
14. Ou, Y. *et al.* Trends in Disease Burden of Chronic Lymphocytic Leukemia at the Global, Regional, and National Levels From 1990 to 2019, and Projections Until 2030: A Population-Based Epidemiologic Study. *Front Oncol* **12**, 840616 (2022).
15. Redaelli, A., Laskin, B. I., Stephens, J. M., Botteman, M. F. & Pashos, C. I. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *European Journal of Cancer Care* **13**, 279–287 (2004).
16. Du, M. *et al.* The Global Burden of Leukemia and Its Attributable Factors in 204 Countries and Territories: Findings from the Global Burden of Disease 2019 Study and Projections to 2030. *J Oncol* **2022**, 1612702 (2022).
17. GBD Compare. *Institute for Health Metrics and Evaluation*
<http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>.

18. Nieto, W. G. *et al.* Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia–like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood* **114**, 33–37 (2009).
19. Hallek, M. *et al.* iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* **131**, 2745–2760 (2018).
20. Lee, J. & Wang, Y. L. Prognostic and Predictive Molecular Biomarkers in Chronic Lymphocytic Leukemia. *The Journal of Molecular Diagnostics* **22**, 1114–1125 (2020).
21. Yun, X., Zhang, Y. & Wang, X. Recent progress of prognostic biomarkers and risk scoring systems in chronic lymphocytic leukemia. *Biomarker Research* **8**, 40 (2020).
22. Eichhorst, B. *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **32**, 23–33 (2021).
23. Maitre, E. & Troussard, X. Monoclonal B-cell lymphocytosis. *Best Practice & Research Clinical Haematology* **32**, 229–238 (2019).
24. Galigalidou, C. *et al.* Understanding Monoclonal B Cell Lymphocytosis: An Interplay of Genetic and Microenvironmental Factors. *Frontiers in Oncology* **11**, (2021).
25. Strati, P. & Shanafelt, T. D. Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification. *Blood* **126**, 454–462 (2015).
26. Ryder, C. B., Oduro, K. A. & Moore, E. M. Monoclonal B-cell lymphocytosis in the bone marrow: revisiting the criteria for chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Human Pathology* **125**, 108–116 (2022).

27. Chiorazzi, N., Allen, S. L. & Ferrarini, M. Clinical and Laboratory Parameters That Define Clinically Relevant B-CLL Subgroups. in *Chronic Lymphocytic Leukemia* 109–133 (Springer, 2005). doi:10.1007/3-540-29933-5_7.
28. Manouchehri-Doulabi, E. *et al.* Evaluating the mechanism underlying antitumor effect of interleukin 27 on B cells of chronic lymphocytic leukemia patients. *Journal of Cellular Physiology* **235**, 9424–9431 (2020).
29. Forconi, F., Lanham, S. A. & Chiodin, G. Biological and Clinical Insight from Analysis of the Tumor B-Cell Receptor Structure and Function in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers* **14**, 663 (2022).
30. Nüchel, H. *et al.* The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **24**, 1152–1159 (2010).
31. Amaya-Chanaga, C. I. & Rassenti, L. Z. Biomarkers in chronic lymphocytic leukemia: Clinical applications and prognostic markers. *Best Pract Res Clin Haematol* **29**, 79–89 (2016).
32. Purroy, N. & Wu, C. J. Coevolution of Leukemia and Host Immune Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**, a026740 (2017).
33. Kay, N. E. & Shanafelt, T. D. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* **2**, 49–55 (2007).
34. International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* **17**, 779–790 (2016).
35. Kwok, M. & Wu, C. J. Clonal Evolution of High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia: A Contemporary Perspective. *Frontiers in Oncology* **11**, 790004 (2021).

36. Binet, J. L. *et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* **48**, 198–206 (1981).
37. Rai, K. *et al.* Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **46**, 219–234 (1975).
38. Griggio, V. *et al.* Immune Dysfunctions and Immune-Based Therapeutic Interventions in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Frontiers in Immunology* **11**, 594556 (2020).
39. Nisticò, N. *et al.* Role of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)-Derived Exosomes in Tumor Progression and Survival. *Pharmaceuticals (Basel)* **13**, 244 (2020).
40. Lin, K., Rockcliffe, N., Johnson, G. G., Sherrington, P. D. & Pettitt, A. R. Hsp90 inhibition has opposing effects on wild-type and mutant p53 and induces p21 expression and cytotoxicity irrespective of p53/ATM status in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Oncogene* **27**, 2445–2455 (2008).
41. Puiggros, A., Blanco, G. & Espinet, B. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *Biomed Res Int* **2014**, 435983 (2014).
42. Puente, X. S. *et al.* Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* **526**, 519–524 (2015).
43. Díez, P. *et al.* Multipronged functional proteomics approaches for global identification of altered cell signalling pathways in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Proteomics* **16**, 1193–1203 (2016).
44. Kaban, K. *et al.* Immunoprofiling of 4-1BB Expression Predicts Outcome in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Diagnostics (Basel)* **11**, 2041 (2021).

45. Damle, R. N. *et al.* Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* **94**, 1840–1847 (1999).
46. Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G. & Stevenson, F. K. Unmutated Ig VH Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* **94**, 1848–1854 (1999).
47. Davi, F. *et al.* Immunoglobulin gene analysis in chronic lymphocytic leukemia in the era of next generation sequencing. *Leukemia* **34**, 2545–2551 (2020).
48. Landau, D. A. *et al.* Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* **152**, 714–726 (2013).
49. Knisbacher, B. A. *et al.* Molecular map of chronic lymphocytic leukemia and its impact on outcome. *Nat Genet* **54**, 1664–1674 (2022).
50. Landau, D. *et al.* The evolutionary landscape of chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib targeted therapy. *Nature Communications* **8**, 2185 (2017).
51. De Falco, F. *et al.* IL-4-dependent Jagged1 expression/processing is associated with survival of chronic lymphocytic leukemia cells but not with Notch activation. *Cell Death Dis* **9**, 1–17 (2018).
52. Wang, Y. *et al.* A crowdsourcing open platform for literature curation in UniProt. *PLOS Biology* **19**, e3001464 (2021).
53. Landau, D. A. *et al.* Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* **526**, 525–530 (2015).

54. ten Hacken, E., Gounari, M., Ghia, P. & Burger, J. A. The importance of B cell receptor isotypes and stereotypes in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **33**, 287–298 (2019).
55. Meier-Abt, F. *et al.* The protein landscape of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **138**, 2514–2525 (2021).
56. Herbst, S. A. *et al.* Proteogenomics refines the molecular classification of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun* **13**, 6226 (2022).
57. Hallek, M. *et al.* Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* **22**, 439–447 (1996).
58. Delgado, J. *et al.* Beta2-microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia if adjusted according to glomerular filtration rate. *British Journal of Haematology* **145**, 801–805 (2009).
59. Rassenti, L. Z. *et al.* Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **112**, 1923–1930 (2008).
60. Cohen, J. A. *et al.* An Updated Perspective on Current Prognostic and Predictive Biomarkers in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Context of Chemoimmunotherapy and Novel Targeted Therapy. *Cancers (Basel)* **12**, 894 (2020).
61. Stevenson, F. K., Forconi, F. & Kipps, T. J. Exploring the pathways to chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **138**, 827–835 (2021).

62. Svanberg, R., Janum, S., Patten, P. E. M., Ramsay, A. G. & Niemann, C. U. Targeting the tumor microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **106**, 2312–2324 (2021).
63. Eibel, H., Kraus, H., Sic, H., Kienzler, A.-K. & Rizzi, M. B cell Biology: An Overview. *Curr Allergy Asthma Rep* **14**, 434 (2014).
64. Akkaya, M., Kwak, K. & Pierce, S. K. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nat Rev Immunol* **20**, 229–238 (2020).
65. Díez, P. *et al.* Dynamic Intracellular Metabolic Cell Signaling Profiles During Ag-Dependent B-Cell Differentiation. *Front Immunol* **12**, 637832 (2021).
66. Downs-Canner, S. M., Meier, J., Vincent, B. G. & Serody, J. S. B Cell Function in the Tumor Microenvironment. *Annual Review of Immunology* **40**, 169–193 (2022).
67. LeBien, T. W. & Tedder, T. F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* **112**, 1570–1580 (2008).
68. Hwang, J. K., Alt, F. W. & Yeap, L.-S. Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. in *Mobile DNA III* 325–348 (John Wiley & Sons, Ltd, 2015). doi:10.1128/9781555819217.ch15.
69. Roth, D. B. V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity. in *Mobile DNA III* 311–324 (John Wiley & Sons, Ltd, 2015). doi:10.1128/9781555819217.ch14.
70. Ferapontov, A. *et al.* Antigen footprint governs activation of the B cell receptor. *Nat Commun* **14**, 976 (2023).
71. Darwiche, W., Gubler, B., Marolleau, J.-P. & Ghamlouch, H. Chronic Lymphocytic Leukemia B-Cell Normal Cellular Counterpart: Clues From a Functional Perspective. *Frontiers in Immunology* **9**, 683 (2018).

72. Agathangelidis, A. *et al.* Higher-order connections between stereotyped subsets: implications for improved patient classification in CLL. *Blood* **137**, 1365–1376 (2021).
73. Gerousi, M., Laidou, S., Gemenetzi, K., Stamatopoulos, K. & Chatzidimitriou, A. Distinctive Signaling Profiles With Distinct Biological and Clinical Implications in Aggressive CLL Subsets With Stereotyped B-Cell Receptor Immunoglobulin. *Front Oncol* **11**, 771454 (2021).
74. Greaves, M. & Maley, C. C. Clonal evolution in cancer. *Nature* **481**, 306–313 (2012).
75. Koczkodaj, D., Popek-Marciniak, S., Zmorzyński, S., Wąsik-Szczepanek, E. & Filip, A. A. Examination of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol* **36**, 79 (2019).
76. Zapatka, M. *et al.* Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia is scant in relapsed but accelerated in refractory cases after chemo(immune) therapy. *Haematologica* **107**, 604–614 (2022).
77. Ziegler, C. G. K. *et al.* Constitutive Activation of the B Cell Receptor Underlies Dysfunctional Signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cell Rep* **28**, 923-937.e3 (2019).
78. Zhang, S. & Kipps, T. J. The Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **9**, 103–118 (2014).
79. Ferrer, G. & Montserrat, E. Critical molecular pathways in CLL therapy. *Molecular Medicine* **24**, 9 (2018).

80. Haselager, M. V., Kater, A. P. & Eldering, E. Proliferative Signals in Chronic Lymphocytic Leukemia; What Are We Missing? *Frontiers in Oncology* **10**, 592205 (2020).
81. Muggen, A. F., Singh, S. P., Hendriks, R. W. & Langerak, A. W. Targeting Signaling Pathways in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Cancer Drug Targets* **16**, 669–688 (2016).
82. Cyster, J. G. & Allen, C. D. C. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell* **177**, 524–540 (2019).
83. Tan, C., Noviski, M., Huizar, J. & Zikherman, J. Self-reactivity on a spectrum: A sliding scale of peripheral B cell tolerance. *Immunological reviews* **292**, (2019).
84. Ecker, V. *et al.* Targeted PI3K/AKT-hyperactivation induces cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun* **12**, 3526 (2021).
85. Chiorazzi, N., Chen, S.-S. & Rai, K. R. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* **11**, a035220 (2021).
86. Best, O. G. & Mulligan, S. P. Heat shock protein-90 inhibitor, NVP-AUY922, is effective in combination with fludarabine against chronic lymphocytic leukemia cells cultured on CD40L-stromal layer and inhibits their activated/proliferative phenotype. *Leuk Lymphoma* **53**, 2314–2320 (2012).
87. Liu, Y.-C., Yu, M.-M., Chai, Y.-F. & Shou, S.-T. Sialic Acids in the Immune Response during Sepsis. *Frontiers in Immunology* **8**, (2017).
88. Quan, L. *et al.* BTLA marks a less cytotoxic T-cell subset in diffuse large B-cell lymphoma with high expression of checkpoints. *Exp Hematol* **60**, 47-56.e1 (2018).

89. Joshi, M. & Ansell, S. M. Activating the Antitumor Immune Response in Non-Hodgkin Lymphoma Using Immune Checkpoint Inhibitors. *J Immunol Res* **2020**, 8820377 (2020).
90. Hertlein, E. *et al.* 17-DMAG targets the nuclear factor-kappaB family of proteins to induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia: clinical implications of HSP90 inhibition. *Blood* **116**, 45–53 (2010).
91. Johnson, A. J. *et al.* The novel cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (SCH727965) promotes apoptosis and abrogates microenvironmental cytokine protection in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* **26**, 2554–2557 (2012).
92. Sordo-Bahamonde, C. *et al.* LAG-3 Blockade with Relatlimab (BMS-986016) Restores Anti-Leukemic Responses in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers (Basel)* **13**, 2112 (2021).
93. Burger, J. A. Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **383**, 460–473 (2020).
94. Fiorcari, S. *et al.* Nurse-Like Cells and Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells: A Mutualistic Crosstalk inside Tissue Microenvironments. *Cells* **10**, 217 (2021).
95. Heyman, B. M., Tzachanis, D. & Kipps, T. J. Recent Advances in CAR T-Cell Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers* **14**, 1715 (2022).
96. Li, Y. *et al.* Immune Cycle-Based Strategies for Cancer Immunotherapy. *Adv. Funct. Mater* **31**, 1–27 (2021).
97. Hampel, P. J. & Parikh, S. A. Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm 2022. *Blood Cancer J.* **12**, 1–10 (2022).

98. Kwon, Y. W. *et al.* Application of Proteomics in Cancer: Recent Trends and Approaches for Biomarkers Discovery. *Frontiers in Medicine* **8**, (2021).
99. Freeman, J. A. *et al.* Immunoglobulin G subclass deficiency and infection risk in 150 patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* **54**, 99–104 (2013).
100. Ishdorj, G. *et al.* IgA levels at diagnosis predict for infections, time to treatment, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Adv* **3**, 2188–2198 (2019).
101. Vitale, C. *et al.* Impact of Immune Parameters and Immune Dysfunctions on the Prognosis of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers (Basel)* **13**, 3856 (2021).
102. Visentin, A. *et al.* Clinical profile associated with infections in patients with chronic lymphocytic leukemia. Protective role of immunoglobulin replacement therapy. *Haematologica* **100**, e515–e518 (2015).
103. Grywalska, E. *et al.* Chronic Lymphocytic Leukemia-Induced Humoral Immunosuppression: A Systematic Review. *Cells* **9**, E2398 (2020).
104. Williams, A. M. *et al.* Analysis of the risk of infection in patients with chronic lymphocytic leukemia in the era of novel therapies. *Leukemia & Lymphoma* **59**, 625–632 (2018).
105. Teh, B. W., Tam, C. S., Handunnetti, S., Worth, L. J. & Slavin, M. A. Infections in patients with chronic lymphocytic leukaemia: Mitigating risk in the era of targeted therapies. *Blood Reviews* **32**, 499–507 (2018).
106. Alsagaby, S. A. & Alhumaydhi, F. A. Proteomics insights into the pathology and prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Saudi Med J* **40**, 317–327 (2019).

107. Griffen, T. L. *et al.* Proteomic profiling based classification of CLL provides prognostication for modern therapy and identifies novel therapeutic targets. *Blood Cancer J.* **12**, 1–14 (2022).
108. Melby, J. A. *et al.* Novel Strategies to Address the Challenges in Top-Down Proteomics. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **32**, 1278–1294 (2021).
109. Thongboonkerd, V. Complex systems analysis by integrative omics. *Blood* **138**, 2448–2450 (2021).
110. McCarthy, B. A. *et al.* Surface Expression of Bcl-2 in Chronic Lymphocytic Leukemia and Other B-cell Leukemias and Lymphomas without a Breakpoint t(14;18). *Mol Med* **14**, 618–627 (2008).
111. Nüchel, H. *et al.* High CD49d protein and mRNA expression predicts poor outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Immunology* **131**, 472–480 (2009).
112. Decker, S. *et al.* PIM Kinases Are Essential for Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Survival (PIM2/3) and CXCR4-Mediated Microenvironmental Interactions (PIM1). *Molecular Cancer Therapeutics* **13**, 1231–1245 (2014).
113. Hixson, K. K., Lopez-Ferrer, D., Robinson, E. W. & Paša-Tolić, L. Proteomics. in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)* (eds. Lindon, J. C., Tranter, G. E. & Koppenaal, D. W.) 766–773 (Academic Press, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-803224-4.00061-3.
114. Thurgood, L. A., Chataway, T. K., Lower, K. M. & Kuss, B. J. From genome to proteome: Looking beyond DNA and RNA in chronic lymphocytic leukemia. *J Proteomics* **155**, 73–84 (2017).

115. Alsagaby, S. A. *et al.* Proteomics-based identification of cancer-associated proteins in chronic lymphocytic leukaemia. *Electronic Journal of Biotechnology* **52**, 1–12 (2021).
116. Omenn, G. S. *et al.* The 2022 Report on the Human Proteome from the HUPO Human Proteome Project. *J. Proteome Res.* **22**, 1024–1042 (2023).
117. Aebersold, R. & Mann, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* **537**, 347–355 (2016).
118. Suna, G. & Mayr, M. Proteomics. in *Encyclopedia of Cardiovascular Research and Medicine* (eds. Vasan, R. S. & Sawyer, D. B.) 166–180 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-809657-4.99573-5.
119. Deutsch, E. W. *et al.* Advances and Utility of the Human Plasma Proteome. *J. Proteome Res.* **20**, 5241–5263 (2021).
120. Yu, L.-R., Stewart, N. A. & Veenstra, T. D. Chapter 8 - Proteomics: The Deciphering of the Functional Genome. in *Essentials of Genomic and Personalized Medicine* (eds. Ginsburg, G. S. & Willard, H. F.) 89–96 (Academic Press, 2010). doi:10.1016/B978-0-12-374934-5.00008-8.
121. Bagacean, C. *et al.* Identification of altered cell signaling pathways using proteomic profiling in stable and progressive chronic lymphocytic leukemia. *J Leukoc Biol* **111**, 313–325 (2022).
122. Xie, S., Moya, C., Bilgin, B., Jayaraman, A. & Walton, S. P. Emerging affinity-based techniques in proteomics. *Expert Review of Proteomics* **6**, 573–583 (2009).
123. Geiger, T., Wehner, A., Schaab, C., Cox, J. & Mann, M. Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins. *Mol Cell Proteomics* **11**, M111.014050 (2012).

124. Thurgood, L. A., Dwyer, E. S., Lower, K. M., Chataway, T. K. & Kuss, B. J. Altered expression of metabolic pathways in CLL detected by unlabelled quantitative mass spectrometry analysis. *British Journal of Haematology* **185**, 65–78 (2019).
125. Eagle, G. L. *et al.* Total proteome analysis identifies migration defects as a major pathogenetic factor in immunoglobulin heavy chain variable region (IGHV)-unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cell Proteomics* **14**, 933–945 (2015).
126. Dalchau, R., Kirkley, J. & Fabre, J. W. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. *European Journal of Immunology* **10**, 737–744 (1980).
127. Willard-Gallo, K. E. Analysis of Normal Subset-specific and Disease-specific Human Leukocyte Proteins by Cell Sorting and Two-dimensional Electrophoresis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **428**, 201–222 (1984).
128. Willard-Gallo, K., Humblet, Y. & Symann, M. Leukocyte membrane proteins in chronic lymphocytic leukemia, as studied by two-dimensional gel electrophoresis. *Clinical chemistry* **30**, 2069–77 (1985).
129. Johnston, H. E. *et al.* Proteomics Profiling of CLL Versus Healthy B-cells Identifies Putative Therapeutic Targets and a Subtype-independent Signature of Spliceosome Dysregulation. *Mol Cell Proteomics* **17**, 776–791 (2018).
130. Mayer, R. L. *et al.* Proteomics and metabolomics identify molecular mechanisms of aging potentially predisposing for chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cell Proteomics* **17**, 290–303 (2018).
131. Cochran, D. A. E. *et al.* Proteomic analysis of chronic lymphocytic leukemia subtypes with mutated or unmutated Ig V(H) genes. *Mol Cell Proteomics* **2**, 1331–1341 (2003).

132. Barnidge, D. R., Jelinek, D. F., Muddiman, D. C. & Kay, N. E. Quantitative Protein Expression Analysis Of CLL B Cells from Mutated and Unmutated IgVH Subgroups Using Acid-Cleavable Isotope-Coded Affinity Tag Reagents. *J Proteome Res* **4**, 1310–1317 (2005).
133. Boelens, J. *et al.* Baseline Nucleophosmin Status in Mutated(M) Versus Unmutated (U) Immunoglobulin B-CLL Is a Nuclear Reflection of Different Signal Transduction Physiology. *Blood* **106**, 5005–5005 (2005).
134. Scielzo, C. *et al.* HS1 protein is differentially expressed in chronic lymphocytic leukemia patient subsets with good or poor prognoses. *J Clin Invest* **115**, 1644–1650 (2005).
135. Rees-Unwin, K. S. *et al.* Ribosome-associated nucleophosmin 1: increased expression and shuttling activity distinguishes prognostic subtypes in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* **148**, 534–543 (2010).
136. Perrot, A. *et al.* A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **118**, e1–e15 (2011).
137. Alsagaby, S. A. *et al.* Proteomics-Based Strategies To Identify Proteins Relevant to Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Proteome Res.* **13**, 5051–5062 (2014).
138. Eagle, G. L. *et al.* Assessing technical and biological variation in SWATH-MS-based proteomic analysis of chronic lymphocytic leukaemia cells. *Sci Rep* **11**, 2932 (2021).
139. Belov, L., de la Vega, O., dos Remedios, C. G., Mulligan, S. P. & Christopherson, R. I. Immunophenotyping of Leukemias Using a Cluster of Differentiation Antibody Microarray1. *Cancer Research* **61**, 4483–4489 (2001).

140. Huang, P. Y. *et al.* Cell surface phenotype profiles distinguish stable and progressive chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* **55**, 2085–2092 (2014).
141. Yu, Z. *et al.* Protein expression profiling of cytokines and cytokine receptors on purified chronic lymphocytic leukemia cells from patients with favourable prognostic indicators. *Leuk Lymphoma* **49**, 751–756 (2008).
142. Burgess, M. *et al.* CCL2 and CXCL2 enhance survival of primary chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Leuk. Lymphoma* **53**, 1988–1998 (2012).
143. Schröder, C. *et al.* Plasma protein analysis of patients with different B-cell lymphomas using high-content antibody microarrays. *Proteomics Clin Appl* **7**, 802–812 (2013).
144. Edlefsen, K. L. *et al.* Cytokines in serum in relation to future non-Hodgkin lymphoma risk: evidence for associations by histologic subtype. *Int J Cancer* **135**, 913–922 (2014).
145. Niemann, C. U. *et al.* Disruption of in vivo Chronic Lymphocytic Leukemia Tumor–Microenvironment Interactions by Ibrutinib – Findings from an Investigator-Initiated Phase II Study. *Clinical Cancer Research* **22**, 1572–1582 (2016).
146. Landeira-Viñuela, A. *et al.* Deepening into Intracellular Signaling Landscape through Integrative Spatial Proteomics and Transcriptomics in a Lymphoma Model. *Biomolecules* **11**, 1776 (2021).
147. Dong, M. P. *et al.* Clinical significance of circulating soluble immune checkpoint proteins in sorafenib-treated patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* **10**, 3392 (2020).
148. Juanes-Velasco, P., Landeira-Viñuela, A., Hernandez, A.-P. & Fuentes, M. Systematic and Rational Design of Protein Arrays Protein arrays in Noncontact

- Printers: Pipeline and Critical Aspects. in *Protein Microarrays for Disease Analysis: Methods and Protocols* (eds. Barderas, R., LaBaer, J. & Srivastava, S.) 9–29 (Springer US, 2021). doi:10.1007/978-1-0716-1562-1_2.
149. González-González, M. *et al.* Evaluation of homo- and hetero-functionally activated glass surfaces for optimized antibody arrays. *Anal Biochem* **450**, 37–45 (2014).
150. Häggmark, A. *et al.* Antibody-based profiling of cerebrospinal fluid within multiple sclerosis. *Proteomics* **13**, 2256–2267 (2013).
151. Sierra-Sánchez, Á. *et al.* Screening and Validation of Novel Biomarkers in Osteoarticular Pathologies by Comprehensive Combination of Protein Array Technologies. *J. Proteome Res.* **16**, 1890–1899 (2017).
152. Díez, P. *et al.* Integration of Proteomics and Transcriptomics Data Sets for the Analysis of a Lymphoma B-Cell Line in the Context of the Chromosome-Centric Human Proteome Project. *J. Proteome Res.* **14**, 3530–3540 (2015).
153. Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J. V. & Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* **1**, 2856–2860 (2006).
154. Rappsilber, J., Mann, M. & Ishihama, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* **2**, 1896–1906 (2007).
155. Olsen, J. V. *et al.* Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics* **4**, 2010–2021 (2005).
156. Eng, J. K., Jahan, T. A. & Hoopmann, M. R. Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool. *Proteomics* **13**, 22–24 (2013).

157. Vaudel, M., Barsnes, H., Berven, F. S., Sickmann, A. & Martens, L. SearchGUI: An open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X!Tandem searches. *Proteomics* **11**, 996–999 (2011).
158. Vaudel, M. *et al.* PeptideShaker enables reanalysis of MS-derived proteomics data sets. *Nat Biotechnol* **33**, 22–24 (2015).
159. Cox, J. *et al.* Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* **13**, 2513–2526 (2014).
160. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* **26**, 1367–1372 (2008).
161. Durinck, S., Spellman, P. T., Birney, E. & Huber, W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc* **4**, 1184–1191 (2009).
162. Vizcaíno, J. A. *et al.* ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nat Biotechnol* **32**, 223–226 (2014).
163. Martens, L. *et al.* PRIDE: the proteomics identifications database. *Proteomics* **5**, 3537–3545 (2005).
164. Díez, P. *et al.* A systematic approach for peptide characterization of B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncotarget* **8**, 42836–42846 (2017).
165. Meier, F. *et al.* Online Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF) with a Novel Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer. *Mol Cell Proteomics* **17**, 2534–2545 (2018).

166. Tyanova, S., Temu, T. & Cox, J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc* **11**, 2301–2319 (2016).
167. Schmitz, R. *et al.* Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* **490**, 116–120 (2012).
168. Leinonen, R., Sugawara, H., Shumway, M., & International Nucleotide Sequence Database Collaboration. The sequence read archive. *Nucleic Acids Res* **39**, D19-21 (2011).
169. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120 (2014).
170. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
171. Krysko, D. V. *et al.* Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 860–875 (2012).
172. Haseeb, M., Anwar, M. A. & Choi, S. Molecular Interactions Between Innate and Adaptive Immune Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia and Their Therapeutic Implications. *Front Immunol* **9**, 2720 (2018).
173. Roh, J. S. & Sohn, D. H. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw* **18**, (2018).
174. Berger, G., Marloye, M. & Lawler, S. E. Pharmacological Modulation of the STING Pathway for Cancer Immunotherapy. *Trends in Molecular Medicine* **25**, 412–427 (2019).

175. Szklarczyk, D. *et al.* STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **47**, D607–D613 (2019).
176. Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27–30 (2000).
177. Jassal, B. *et al.* The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **48**, D498–D503 (2020).
178. Ritchie, M. E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research* **43**, e47 (2015).
179. Ding, C. & Peng, H. Minimum redundancy feature selection from microarray gene expression data. *J Bioinform Comput Biol* **3**, 185–205 (2005).
180. Peng, H., Long, F. & Ding, C. Feature selection based on mutual information criteria of max-dependency, max-relevance, and min-redundancy. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* **27**, 1226–1238 (2005).
181. Kotsiantis, S. B. Decision trees: a recent overview. *Artif Intell Rev* **39**, 261–283 (2013).
182. Costa, V. G. & Pedreira, C. E. Recent Advances in Decision Trees: An Updated Survey. *Artif Intell Rev* (2022).
183. Stone, M. Cross-Validatory Choice and Assessment of Statistical Predictions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **36**, 111–147 (1974).
184. Fabregat, A. *et al.* Reactome graph database: Efficient access to complex pathway data. *PLOS Computational Biology* **14**, e1005968 (2018).

185. Zahn-Zabal, M. *et al.* The neXtProt knowledgebase in 2020: data, tools and usability improvements. *Nucleic Acids Res* **48**, D328–D334 (2020).
186. Gillespie, M. *et al.* The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucleic Acids Res* **50**, D687–D692 (2022).
187. Uhlen, M. *et al.* A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science* **357**, eaan2507 (2017).
188. Uhlén, M. *et al.* Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419 (2015).
189. Shvidel, L. *et al.* Serum immunoglobulin levels at diagnosis have no prognostic significance in stage A chronic lymphocytic leukemia: a study of 1113 cases from the Israeli CLL Study Group. *European Journal of Haematology* **93**, 29–33 (2014).
190. Dietrich, S. *et al.* Drug-perturbation-based stratification of blood cancer. *J Clin Invest* **128**, 427–445 (2018).
191. Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M. & Rasool, M. H. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci* **55**, 182–196 (2017).
192. Comandante-Lou, N. & Fallahi-Sichani, M. Models of Cancer Drug Discovery and Response to Therapy. in *Systems Medicine* (ed. Wolkenhauer, O.) 269–276 (Academic Press, 2021). doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.11356-X.
193. Nussinov, R., Jang, H., Tsai, C.-J. & Cheng, F. Precision medicine review: rare driver mutations and their biophysical classification. *Biophys Rev* **11**, 5–19 (2019).
194. Smith, O. E. P., Waters, L. J., Small, W. & Mellor, S. CMC determination using isothermal titration calorimetry for five industrially significant non-ionic surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **211**, 112320 (2022).

195. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
196. Florinskaya, A. V. *et al.* The analysis of participation of individual proteins in the protein interactome formation. *Biomed Khim* **64**, 169–174 (2018).
197. Piazza, I. *et al.* A Map of Protein-Metabolite Interactions Reveals Principles of Chemical Communication. *Cell* **172**, 358-372.e23 (2018).
198. Heusel, M. *et al.* Complex-centric proteome profiling by SEC-SWATH-MS. *Mol. Syst. Biol.* **15**, e8438 (2019).
199. Kirkwood, K. J., Ahmad, Y., Larance, M. & Lamond, A. I. Characterization of native protein complexes and protein isoform variation using size-fractionation-based quantitative proteomics. *Mol. Cell Proteomics* **12**, 3851–3873 (2013).
200. Kim, T. R., Jeong, H.-H. & Sohn, K.-A. Topological integration of RPPA proteomic data with multi-omics data for survival prediction in breast cancer via pathway activity inference. *BMC Med Genomics* **12**, 94 (2019).
201. Peng, W., Zhu, R., Zhou, S., Mirzaei, P. & Mechref, Y. Integrated Transcriptomics, Proteomics, and Glycomics Reveals the Association between Up-regulation of Sialylated N-glycans/Integrin and Breast Cancer Brain Metastasis. *Sci Rep* **9**, 17361 (2019).
202. Warrender, A. K. & Kelton, W. Beyond Allotypes: The Influence of Allelic Diversity in Antibody Constant Domains. *Frontiers in Immunology* **11**, 2016 (2020).
203. Hamblin, T. J. 7 Chronic lymphocytic leukaemia. *Baillière's Clinical Haematology* **1**, 449–491 (1987).

204. Bojarska-Junak, A. *et al.* Intracellular IL-4 and IFN- γ expression in iNKT cells from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Lett* **15**, 1580–1590 (2018).
205. Cao, Y. *et al.* Immune checkpoint molecules in natural killer cells as potential targets for cancer immunotherapy. *Signal Transduct Target Ther* **5**, 250 (2020).
206. Li, Z. *et al.* The role of CD47-SIRP α immune checkpoint in tumor immune evasion and innate immunotherapy. *Life Sci* **273**, 119150 (2021).
207. Wang, Y. *et al.* Recent Advances of Tumor Therapy Based on the CD47-SIRP α Axis. *Mol. Pharmaceutics* **19**, 1273–1293 (2022).
208. Schroeder, H. W. & Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* **125**, S41-52 (2010).
209. Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispens, T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology* **5**, 520 (2014).
210. Kretschmer, A., Schwanbeck, R., Valerius, T. & Rösner, T. Antibody Isotypes for Tumor Immunotherapy. *TMH* **44**, 320–326 (2017).
211. Jones, K., Savulescu, A. F., Brombacher, F. & Hadebe, S. Immunoglobulin M in Health and Diseases: How Far Have We Come and What Next? *Frontiers in Immunology* **11**, 595535 (2020).
212. Peppas, I. *et al.* Association of Serum Immunoglobulin Levels with Solid Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **29**, 527–538 (2020).
213. Li, Y. *et al.* Structural insights into immunoglobulin M. *Science* **367**, 1014–1017 (2020).

214. Khan, S. R. *et al.* Determinants of Serum Immunoglobulin Levels: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Immunology* **12**, 664526 (2021).
215. Suurmond, J. & Diamond, B. Autoantibodies in systemic autoimmune diseases: specificity and pathogenicity. *J Clin Invest* **125**, 2194–2202 (2015).
216. Shome, M. *et al.* Serum autoantibodyome reveals that healthy individuals share common autoantibodies. *Cell Reports* **39**, (2022).
217. Wu, J., Fu, Z., Yan, F. & Ju, H. Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **26**, 679–688 (2007).
218. Sharma, S. Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian J Med Paediatr Oncol* **30**, 1–8 (2009).
219. Dasgupta, A. & Wahed, A. Chapter 13 - Tumor Markers. in *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control* (eds. Dasgupta, A. & Wahed, A.) 229–247 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-407821-5.00013-9.
220. Duffy, M. J., Evoy, D. & McDermott, E. W. CA 15-3: Uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clinica Chimica Acta* **411**, 1869–1874 (2010).
221. Xu, Y., Zhang, P., Zhang, K. & Huang, C. The application of CA72-4 in the diagnosis, prognosis, and treatment of gastric cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1876**, 188634 (2021).
222. Lauko, A. *et al.* SerpinB3 drives cancer stem cell survival in glioblastoma. *Cell Reports* **40**, 111348 (2022).
223. Bournazos, S., Wang, T. T., Dahan, R., Maamary, J. & Ravetch, J. V. Signaling by Antibodies: Recent Progress. *Annual Review of Immunology* **35**, 285–311 (2017).

224. Tadmor, T., Welslau, M. & Hus, I. A review of the infection pathogenesis and prophylaxis recommendations in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Expert Review of Hematology* **11**, 57–70 (2018).
225. Landeira-Viñuela, A. *et al.* Unravelling soluble immune checkpoints in chronic lymphocytic leukemia: Physiological immunomodulators or immune dysfunction. *Frontiers in Immunology* **13**, 965905 (2022).
226. Kipps, T. J. *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 16096 (2017).
227. Awan, F. T. & Byrd, J. C. 99 - Chronic Lymphocytic Leukemia. in *Abeloff's Clinical Oncology (Sixth Edition)* (eds. Niederhuber, J. E., Armitage, J. O., Kastan, M. B., Doroshow, J. H. & Tepper, J. E.) 1850-1871.e5 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-323-47674-4.00099-2.
228. Sprague, J. L., Kasper, L. & Hube, B. From intestinal colonization to systemic infections: *Candida albicans* translocation and dissemination. *Gut Microbes* **14**, 2154548 (2022).
229. Wilder-Smith, A. B. & Qureshi, K. Resurgence of Measles in Europe: A Systematic Review on Parental Attitudes and Beliefs of Measles Vaccine. *Journal of Epidemiology and Global Health* **10**, 46 (2020).
230. Griffiths, P. & Reeves, M. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. *Nat Rev Microbiol* **19**, 759–773 (2021).
231. Pittayapruek, P., Meephansan, J., Prapapan, O., Komine, M. & Ohtsuki, M. Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci* **17**, E868 (2016).

232. Chang, Y.-C., Yang, Y.-C., Tien, C.-P., Yang, C.-J. & Hsiao, M. Roles of Aldolase Family Genes in Human Cancers and Diseases. *Trends Endocrinol Metab* **29**, 549–559 (2018).
233. Perini, M. V., Dmello, R. S., Nero, T. L. & Chand, A. L. Evaluating the benefits of renin-angiotensin system inhibitors as cancer treatments. *Pharmacology & Therapeutics* **211**, 107527 (2020).
234. Kallunki, T., Olsen, O. D. & Jäättelä, M. Cancer-associated lysosomal changes: friends or foes? *Oncogene* **32**, 1995–2004 (2013).
235. Liu, S. *et al.* LAMP2 as a Biomarker Related to Prognosis and Immune Infiltration in Esophageal Cancer and Other Cancers: A Comprehensive Pan-Cancer Analysis. *Frontiers in Oncology* **12**, (2022).
236. Rizwani, W. Enolase. in *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Mechanistic Aspects* (eds. Chakraborti, S., Ray, B. K. & Roychoudhury, S.) 2473–2491 (Springer Nature, 2022). doi:10.1007/978-981-15-9411-3_171.
237. Griggio, V. *et al.* Humoral immune responses toward tumor-derived antigens in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* **8**, 3274–3288 (2017).
238. Lareau, C. A. *et al.* Latent human herpesvirus 6 is reactivated in chimeric antigen receptor T cells. 2022.08.12.503683 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2022.08.12.503683> (2022).
239. Wu, C. *et al.* Echovirus induces autophagy to promote viral replication via regulating mTOR/ULK1 signaling pathway. *Frontiers in Immunology* **14**, (2023).
240. Chen, L., Han, X., Bai, L. & Zhang, J. Clinical characteristics and outcomes in adult patients hospitalized with influenza, respiratory syncytial virus and human

- metapneumovirus infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **19**, 787–796 (2021).
241. Liu, W. *et al.* Tim-4 in Health and Disease: Friend or Foe? *Front Immunol* **11**, 537 (2020).
242. Hosnijeh, F. S. *et al.* Soluble B-cell activation marker of sCD27 and sCD30 and future risk of B-cell lymphomas: A nested case-control study and meta-analyses. *Int J Cancer* **138**, 2357–2367 (2016).
243. Saberi Hosnijeh, F. *et al.* Mediating effect of soluble B-cell activation immune markers on the association between anthropometric and lifestyle factors and lymphoma development. *Sci Rep* **10**, 13814 (2020).
244. Vermeulen, R. *et al.* Pre-diagnostic blood immune markers, incidence and progression of B-cell lymphoma and multiple myeloma: Univariate and functionally informed multivariate analyses. *Int J Cancer* **143**, 1335–1347 (2018).
245. Damoiseaux, J. The IL-2 - IL-2 receptor pathway in health and disease: The role of the soluble IL-2 receptor. *Clin Immunol* **218**, 108515 (2020).
246. Maccalli, C. *et al.* Soluble NKG2D ligands are biomarkers associated with the clinical outcome to immune checkpoint blockade therapy of metastatic melanoma patients. *Oncoimmunology* **6**, e1323618 (2017).
247. Kumar, N., Arthur, C. P., Ciferri, C. & Matsumoto, M. L. Structure of the secretory immunoglobulin A core. *Science* **367**, 1008–1014 (2020).
248. Lacombe, C., Gombert, J., Dreyfus, B., Brizard, A. & Preud'Homme, J. L. Heterogeneity of serum IgG subclass deficiencies in B chronic lymphocytic leukemia. *Clin Immunol* **90**, 128–132 (1999).

249. Kenneson, A. & Cannon, M. J. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* **17**, 253–276 (2007).
250. Kubin, M. *et al.* ULBP1, 2, 3: novel MHC class I-related molecules that bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL16, activate NK cells. *Eur J Immunol* **31**, 1428–1437 (2001).
251. Arshad, R. *et al.* A review of the nanomaterials use for the diagnosis and therapy of salmonella typhi. *Journal of Molecular Structure* **1230**, 129928 (2021).
252. Song, J., Gao, X. & Galán, J. E. Structure and function of the Salmonella Typhi chimaeric A2B5 typhoid toxin. *Nature* **499**, 350–354 (2013).
253. Lemos, H., Huang, L., Prendergast, G. C. & Mellor, A. L. Immune control by amino acid catabolism during tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer* **19**, 162–175 (2019).
254. Grzywa, T. M. *et al.* Myeloid Cell-Derived Arginase in Cancer Immune Response. *Front Immunol* **11**, 938 (2020).
255. Workenhe, S. T., Pol, J. & Kroemer, G. Tumor-intrinsic determinants of immunogenic cell death modalities. *Oncoimmunology* **10**, 1893466 (2021).
256. Marcovecchio, P. M., Thomas, G. & Salek-Ardakani, S. CXCL9-expressing tumor-associated macrophages: new players in the fight against cancer. *J Immunother Cancer* **9**, e002045 (2021).
257. Nuebling, T. *et al.* The Immune Checkpoint Modulator OX40 and Its Ligand OX40L in NK-Cell Immunosurveillance and Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Immunol Res* **6**, 209–221 (2018).

258. Sawada, R. *et al.* High blood levels of soluble OX40 (CD134), an immune costimulatory molecule, indicate reduced survival in patients with advanced colorectal cancer. *Oncol Rep* **42**, 2057–2064 (2019).
259. Machiraju, D. *et al.* Soluble immune checkpoints and T-cell subsets in blood as biomarkers for resistance to immunotherapy in melanoma patients. *Oncoimmunology* **10**, 1926762 (2021).
260. Buus, S. *et al.* High-resolution Mapping of Linear Antibody Epitopes Using Ultrahigh-density Peptide Microarrays *. *Molecular & Cellular Proteomics* **11**, 1790–1800 (2012).
261. Fujinami, R. S., Oldstone, M. B., Wroblewska, Z., Frankel, M. E. & Koprowski, H. Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 2346–2350 (1983).
262. Yoshimoto, T. *et al.* Potential clinical application of interleukin-27 as an antitumor agent. *Cancer Sci* **106**, 1103–1110 (2015).
263. Chakrabarti, R., Kapse, B. & Mukherjee, G. Soluble immune checkpoint molecules: Serum markers for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Rep (Hoboken)* **2**, 1160 (2019).
264. Nakamura, Y. Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitor-Mediated Tumor Response and Adverse Events. *Front Med (Lausanne)* **6**, 119 (2019).
265. Guo, L., Chen, Y., Wang, J. & Chen, C. Down-regulation of UL16-binding protein 3 mediated by interferon-gamma impairs immune killing in nasopharyngeal carcinoma. *Am J Transl Res* **12**, 6509–6523 (2020).

266. Daly, J., Carlsten, M. & O'Dwyer, M. Sugar Free: Novel Immunotherapeutic Approaches Targeting Siglecs and Sialic Acids to Enhance Natural Killer Cell Cytotoxicity Against Cancer. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
267. Huang, C.-H. *et al.* TGF- β regulated leukemia cell susceptibility against NK targeting through the down-regulation of the CD48 expression. *Immunobiology* **224**, 649–658 (2019).
268. Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L. & Zhang, Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res* **8**, 49 (2020).
269. Pahima, H., Puzzovio, P. G. & Levi-Schaffer, F. 2B4 and CD48: A powerful couple of the immune system. *Clin Immunol* **204**, 64–68 (2019).
270. Rébé, C. & Ghiringhelli, F. Interleukin-1 β and Cancer. *Cancers (Basel)* **12**, 1791 (2020).
271. McArdel, S. L., Terhorst, C. & Sharpe, A. H. Roles of CD48 in regulating immunity and tolerance. *Clin Immunol* **164**, 10–20 (2016).
272. Morrison, V. A. Infectious complications in patients with chronic lymphocytic leukemia: pathogenesis, spectrum of infection, and approaches to prophylaxis. *Clin Lymphoma Myeloma* **9**, 365–370 (2009).
273. Nosari, A. Infectious complications in chronic lymphocytic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* **4**, e2012070 (2012).
274. Rivera, D. & Ferrajoli, A. Managing the Risk of Infection in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Era of New Therapies. *Curr Oncol Rep* **24**, 1003–1014 (2022).

275. Sun, C. *et al.* Partial reconstitution of humoral immunity and fewer infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib. *Blood* **126**, 2213–2219 (2015).
276. Ono, E. & Uede, T. Implication of Soluble Forms of Cell Adhesion Molecules in Infectious Disease and Tumor: Insights from Transgenic Animal Models. *Int J Mol Sci* **19**, E239 (2018).
277. Drizyte-Miller, K., Chen, J., Cao, H., Schott, M. B. & McNiven, M. A. The small GTPase Rab32 resides on lysosomes to regulate mTORC1 signaling. *Journal of Cell Science* **133**, jcs236661 (2020).
278. Cai, Z., Tang, B., Chen, L. & Lei, W. Mast cell marker gene signature in head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* **22**, 577 (2022).
279. Huang, L. *et al.* High Expression of RAB32 Predicts Adverse Outcomes: A Potential Therapeutic Target for Glioblastom. Preprint at <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2916201/v1> (2023).
280. Torrano, J., Al Emran, A., Hammerlindl, H. & Schaidler, H. Emerging roles of H3K9me3, SETDB1 and SETDB2 in therapy-induced cellular reprogramming. *Clin Epigenet* **11**, 43 (2019).
281. Ropa, J. *et al.* SETDB1 mediated histone H3 lysine 9 methylation suppresses MLL-fusion target expression and leukemic transformation. *Haematologica* **105**, 2273–2285 (2019).
282. Johnson, E., Salari, K. & Yang, S. SETDB1: A perspective into immune cell function and cancer immunotherapy. *Immunology* **169**, 3–12 (2023).

283. Barragán, M. *et al.* Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C β . *Journal of Leukocyte Biology* **80**, 1473–1479 (2006).
284. Cheng, J. Q., Lindsley, C. W., Cheng, G. Z., Yang, H. & Nicosia, S. V. The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene* **24**, 7482–7492 (2005).
285. Muntjewerff, E. M., Meesters, L. D., Bogaart, G. van den & Revelo, N. H. Reverse Signaling by MHC-I Molecules in Immune and Non-Immune Cell Types. *Frontiers in Immunology* **11**, (2020).
286. Zhong, W. & Guo, W. Immunosuppressive Extracellular Vesicles in CLL. *Blood Cancer Discov* **4**, 5–7 (2023).
287. Gargiulo, E. *et al.* Extracellular Vesicle Secretion by Leukemia Cells In Vivo Promotes CLL Progression by Hampering Antitumor T-cell Responses. *Blood Cancer Discovery* **4**, 54–77 (2023).
288. Zhou, X., Zhan, L., Huang, K. & Wang, X. The functions and clinical significance of circRNAs in hematological malignancies. *J Hematol Oncol* **13**, 138 (2020).
289. Huang, L. *et al.* Tollip promotes hepatocellular carcinoma progression via PI3K/AKT pathway. *Open Medicine* **17**, 626–637 (2022).
290. Muzio, M. *et al.* Expression and function of toll like receptors in chronic lymphocytic leukaemia cells. *British Journal of Haematology* **144**, 507–516 (2009).
291. Kanduri, M. *et al.* Distinct transcriptional control in major immunogenetic subsets of chronic lymphocytic leukemia exhibiting subset-biased global DNA methylation profiles. *Epigenetics* **7**, 1435–1442 (2012).

292. Tsanousa, A., Ntoufa, S., Papakonstantinou, N., Stamatopoulos, K. & Angelis, L. Discovering Causal Patterns with Structural Equation Modeling: Application to Toll-Like Receptor Signaling Pathway in Chronic Lymphocytic Leukemia. in *Pattern Recognition in Computational Molecular Biology* 555–584 (John Wiley & Sons, Ltd, 2015). doi:10.1002/9781119078845.ch28.
293. Zhou, J. *et al.* Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers. *J Cell Mol Med* **23**, 4854–4865 (2019).
294. Rozovski, U. *et al.* Constitutive Phosphorylation of STAT3 by the CK2-BLNK-CD5 Complex. *Mol Cancer Res* **15**, 610–618 (2017).
295. Kurosaki, T. & Tsukada, S. BLNK: Connecting Syk and Btk to Calcium Signals. *Immunity* **12**, 1–5 (2000).
296. Zenz, T., Mertens, D., Küppers, R., Döhner, H. & Stilgenbauer, S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* **10**, 37–50 (2010).
297. Wist, M. *et al.* Noncatalytic Bruton’s tyrosine kinase activates PLC γ 2 variants mediating ibrutinib resistance in human chronic lymphocytic leukemia cells. *Journal of Biological Chemistry* **295**, 5717–5736 (2020).
298. Niki, M. *et al.* Role of Dok-1 and Dok-2 in Leukemia Suppression. *J Exp Med* **200**, 1689–1695 (2004).
299. Sun, P. *et al.* Introduction to DOK2 and its Potential Role in Cancer. *Physiol Res* **70**, 671–685 (2021).
300. Xu, J., Dong, X., Wang, R. & Chen, B. DOK2 Has Prognostic and Immunologic Significance in Adults With Acute Myeloid Leukemia: A Novel Immune-Related Therapeutic Target. *Front Med (Lausanne)* **9**, 842383 (2022).

301. Stilgenbauer, S., Bullinger, L., Lichter, P. & Döhner, H. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and VH gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* **16**, 993–1007 (2002).
302. Nava-Rodríguez, M. P. *et al.* Genomic instability in a chronic lymphocytic leukemia patient with mono-allelic deletion of the DLEU and RB1 genes. *Molecular Cytogenetics* **12**, 2 (2019).
303. Yao, Y., Gu, X., Xu, X., Ge, S. & Jia, R. Novel insights into RB1 mutation. *Cancer Lett* **547**, 215870 (2022).
304. Robertson, K. D. *et al.* DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* **25**, 338–342 (2000).
305. Fabris, S. *et al.* Biological and clinical relevance of quantitative global methylation of repetitive DNA sequences in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics* **6**, 188–194 (2011).
306. Galasso, M. *et al.* The rs1001179 SNP and CpG methylation regulate catalase expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cell. Mol. Life Sci.* **79**, 521 (2022).
307. Ring, A. & Zenz, T. Genetics of “high-risk” chronic lymphocytic leukemia in the times of chemoimmunotherapy. *Haematologica* **105**, 1180–1182 (2020).
308. Drennan, S. *et al.* Ibrutinib Therapy Releases Leukemic Surface IgM from Antigen Drive in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. *Clinical Cancer Research* **25**, 2503–2512 (2019).
309. Maffei, R. *et al.* IRF4 modulates the response to BCR activation in chronic lymphocytic leukemia regulating IKAROS and SYK. *Leukemia* **35**, 1330–1343 (2021).

310. Boyd, R. S. *et al.* Proteomic analysis of the cell-surface membrane in chronic lymphocytic leukemia: identification of two novel proteins, BCNP1 and MIG2B. *Leukemia* **17**, 1605–1612 (2003).
311. Chowdhury, D. *et al.* Pan-cancer Analysis Predicts Kindlin-associated Global Mechanochemical Perturbation. 2022.10.31.514453 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2022.10.31.514453> (2022).

Anexos

Anexo I: Listado Figuras Suplementarias.

Figura Suplementaria 1: Resultados de la cromatografía por exclusión de tamaño para la evaluación de la capacidad de resolución de la técnica, rendimiento del marcaje proteico y del proceso de extracción de proteínas.

Figura Suplementaria 2: Control de calidad de los protocolos de etiquetado proteico. A) Control de calidad para el protocolo A. B) Control de calidad para el protocolo B.

Figura Suplementaria 3: Gráficos de interacción funcional para los grupos obtenidos tras el análisis cuantitativo transcriptómico (FPKM) y proteómico (LFQ). A) Proteínas de citoplasma relacionadas con el transporte mediado por vesículas (valores bajos de LFQ y relación progresiva de FPKM). B) Proteínas de orgánulo relacionadas con la biogénesis celular (valores altos de LFQ y FPKM). C) Proteínas relacionadas con la homeostasis y organización de la matriz extracelular (valores atípicos - alto LFQ y promedio FPKM). D) Proteínas relacionadas con la homeostasis (valores atípicos – alto LFQ y FPKM). E) Proteínas de citoplasma (valores bajos de LFQ y relación progresiva de FPKM). F) Proteínas de membrana (valores bajos de LFQ y relación progresiva de FPKM). G) Proteínas de Orgánulo (valores bajos de LFQ y relación progresiva de FPKM). H) Proteínas localizadas en orgánulo y núcleo (valores bajos de LFQ y relación progresiva de FPKM). I) Proteínas localizadas en citoplasma y núcleo (valores bajos de LFQ y relación progresiva de FPKM). J) Proteínas localizadas en citoplasma y orgánulo (valores bajos de LFQ y relación progresiva de FPKM).

Figura Suplementaria 4: Matriz de correlación de Spearman para las proteínas solubles evaluadas. A) Grupo diagnóstico. B) Grupo diagnóstico y evolución. C) Grupo diagnóstico, evolución y tratamiento. D) Estado mutacional de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. (Las x hacen referencia a la no correlación).

Figura Suplementaria 5: Matriz de confusión de las proteínas solubles que conforman los árboles de decisión. A) Grupo diagnóstico. B) Grupo diagnóstico y evolución. C) Grupo diagnóstico, evolución y tratamiento. D) Estado mutacional de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

Figura Suplementaria 6: Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras para el conjunto de datos obtenidos mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS). A) Distribución de los datos tras la adquisición por LC-MS/MS. B) Distribución de los datos tras la corrección del efecto de lote. C) Distribución de los datos tras la imputación de los valores omitidos (NA). D) Evaluación de la corrección de los datos.

Figura Suplementaria 7: Análisis cuantitativo del número de proteínas detectadas con la micromatriz SEC-MAP (cromatografía de exclusión de tamaño & microarrays de proteínas) en base al rango de peso molecular según el método de extracción.

Figura Suplementaria 8: Perfil cuantitativo de las proteínas solubles para el grupo diagnóstico y evolución de la enfermedad. A) Perfil cuantitativo decreciente del conjunto 1. B) Perfil cuantitativo creciente del conjunto 1. C) Perfil cuantitativo invariable/similar del conjunto 1. D) Perfil cuantitativo decreciente del conjunto 1 para el grupo de linfocitosis B monoclonal vs. evolución de la enfermedad. E) Perfil cuantitativo disminuido del conjunto 1 para el grupo de Leucemia Linfocítica Crónica estable/constante. F) Perfil cuantitativo aumentado del conjunto 1

respecto a la progresión de la enfermedad. G) Perfil cuantitativo disminuido del conjunto 1 respecto a la progresión de la enfermedad. H) Perfil cuantitativo aumentado del conjunto 2 respecto a la progresión de la enfermedad. I) Perfil cuantitativo creciente del conjunto 2. J) Perfil cuantitativo disminuido del conjunto 3 para el grupo de Leucemia Linfocítica Crónica estable/constante. K) Perfil cuantitativo creciente del conjunto 3. L) Perfil cuantitativo invariable/similar del conjunto 3. M) Perfil cuantitativo combinado para el conjunto 3.

Figura Suplementaria 9: Perfil cuantitativo de las proteínas solubles para el grupo diagnóstico y respuesta a terapia. A) Perfil cuantitativo creciente para c-CLL y CLL-PFT y decreciente para CLL-TFT para los tres conjuntos de datos. B) Perfil cuantitativo decreciente para c-CLL, creciente para CLL-PFT y similar para CLL-TFT de los conjuntos 1 y 2. C) Perfil cuantitativo creciente para c-CLL, similar para CLL-PFT y decreciente para CLL-TFT de los conjuntos 1 y 2. D) Perfil cuantitativo creciente para c-CLL y CLL-PFT y parecido para CLL-TFT del conjunto 1 y 2. E) Perfil cuantitativo decreciente para c-CLL y CLL-PFT y creciente para CLL-TFT del conjunto 1 y 3. F) Perfil cuantitativo decreciente para c-CLL y similar para CLL-PFT y CLL-TFT del conjunto 1 y 3. G) Perfil cuantitativo decreciente para c-CLL y creciente para CLL-PFT y CLL-TFT del conjunto 1 y 3. H) Perfil cuantitativo similar para c-CLL y CLL-PFT y decreciente para CLL-TFT del conjunto 1 y 3. I) Perfil cuantitativo similar para c-CLL, creciente para CLL-PFT y decreciente para CLL-TFT del conjunto 1 y 3. J) Perfil cuantitativo decreciente para c-CLL, creciente para CLL-PFT y decreciente para CLL-TFT del conjunto 2 y 3. K) Perfil cuantitativo de varias tendencias únicas para el conjunto 2. L) Perfil cuantitativo de varias tendencias únicas para el conjunto 3. M) Perfil cuantitativo de varias tendencias únicas para el conjunto 1.

Figura Suplementaria 10: Perfil cuantitativo de las proteínas solubles de acuerdo al estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las Inmunoglobulinas. A) Perfil cuantitativo decreciente para el conjunto 1. B) Perfil cuantitativo creciente para el conjunto 1. C) Perfil cuantitativo similar para el conjunto 1. D) Perfil cuantitativo decreciente para el conjunto 2. E) Perfil cuantitativo similar para el conjunto 2. F) Perfil cuantitativo decreciente para el conjunto 3. G) Perfil cuantitativo creciente para el conjunto 3.

Figura Suplementaria 11: Distribución de la concentración de inmunoglobulinas en suero. A) Grupo diagnóstico. B) Evolución de la enfermedad. C) Respuesta a tratamiento. D) Estado mutacional de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

Figura Suplementaria 12: Análisis estadístico de los niveles de inmunoglobulinas en suero. A) Grupo diagnóstico. B) Evolución de la enfermedad. C) Respuesta a tratamiento. D) Estado mutacional de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

Figura Suplementaria 13: Distribución de los isotipos de autoanticuerpos detectados para cada uno de los antígenos tumorales de estudio.

Figura Suplementaria 14: Resultados obtenidos tras el análisis de los antígenos microbianos detectados a una concentración de $1 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{L}$. A) Distribución de los antígenos microbianos (mAgs) a nivel global. B) Distribución de los mAgs para el isotipo Ig M. C) Distribución de los mAgs para el isotipo Ig G. D) Distribución de los mAgs detectados con ambos isotipos.

Figura Suplementaria 15: Distribución de los isotipos de inmunoglobulinas frente a los antígenos microbianos de estudio.

Figura Suplementaria 16: Perfil proteómico del linfocito B clonal (B-CLL). A) Características clínicas de las muestras. B) Distribución del Z score para los conjuntos de proteínas con mayor diferencia significativa en cuanto a la abundancia de las proteínas entre los agrupamientos clínicos C1 y C4 (p valor para Wilcoxon $< 0,0001$). C) Correlación entre los Z score promedios obtenidos para las proteínas contenidas en cada conjunto de proteínas (eje x) y su superposición con los grupos funcionales de proteínas propuestos por Griffen et al. (eje y).

Figura Suplementaria 17: Correlación transcriptómica y proteómica para las proteínas con abundancia diferencial en la enfermedad. A) Muestras de Leucemia Linfocítica Crónica (CLL) y Linfocitosis B Monoclonal (MBL). B) Presencia o ausencia de del(17p). C) Presencia o ausencia de Trisomía 12. D) Según el estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGHV). E) Análisis correlacional de las medias de los Z score de las muestras de CLL capaces de diferenciar los conjuntos de proteínas (PS) identificados por espectrometría de masas (LC-MS/MS).

Figura Suplementaria 18: Solapamiento de grupos funcionales de proteínas (PFG) y conjuntos de proteínas (PS). A) Superposición de las proteínas estudiadas por Griffen et al., 2022 y el proteoma del linfocito B clonal (B-CLL). B) Superposición de las proteínas identificadas por espectrometría de masas en base a las 27 firmas moleculares (MSig) diferenciales para los conjuntos PS4-7 y los 40 PFG propuestos por Griffen et al., 2022. C) Proteínas comunes entre los grupos PFG y MSig.

Figura Suplementaria 19: Correlación de los conjuntos de proteínas (PS) obtenidos tras el análisis de espectrometría de masas y los términos funcionales (GOBP) seleccionados.

Figura Suplementaria 20: Correlación de los términos funcionales (GOBP) seleccionados con las firmas moleculares (MSig) diferenciales y los grupos funcionales de proteínas (PFG). A) Correlación de las proteínas identificadas por espectrometría de masas entre los GOBP seleccionados y las 27 MSig. B) Proteínas comunes entre los grupos GOBP y MSig. C) Correlación de los términos GOBP seleccionados y los 40 PFG propuestos por Griffen et al., 2022.

Figura Suplementaria 21: Perfiles de las firmas moleculares (MSig) de las proteínas desreguladas en todos los contrastes entre grupos clínicos. Recuadrado se encuentran el resumen de las proporciones de proteínas consideradas dianas terapéuticas según la base de datos *DrugBank* (mayo del 2022).

Figura Suplementaria 22: Perfiles de los procesos biológicos (GOBP) de las proteínas desreguladas en todos los contrastes entre grupos clínicos. A) Comparativas según el estadio de la enfermedad. B) Comparativa según el estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGHV). C) Comparativa según las mutaciones citogenéticas.

Anexo II: Listado Tablas Suplementarias.

[Tabla Suplementaria 1](#): Información detallada de la cohorte de estudio.

[Tabla Suplementaria 2](#): Factores inmunológicos solubles evaluadas.

[Tabla Suplementaria 3](#): Anticuerpos unidos a la superficie de la micromatriz para el estudio por cromatografía de exclusión de tamaño & microarrays de proteínas (SEC-MAP).

[Tabla Suplementaria 4](#): Autoantígenos unidos a la superficie de la micromatriz de autoantígenos (aAg array).

[Tabla Suplementaria 5](#): Antígenos microbianos unidos a la superficie de la micromatriz de estimulación antigénica persistente (SPA array).

[Tabla Suplementaria 6](#): Tabla de frecuencias obtenida tras los ensayos SEC-MAP para la evaluación de la eficacia en la conjugación de biotina y detección antigénica.

[Tabla Suplementaria 7](#): Estudio comparativo de los valores Z score de los protocolos de etiquetado proteico a nivel global y por fracciones de rango de peso molecular.

[Tabla Suplementaria 8](#): Integración ortogonal multi-ómica para cada protocolo de extracción proteica.

[Tabla Suplementaria 9](#): Resultados obtenidos por inmunoensayo de cromatografía de exclusión de tamaño & microarrays de proteínas (SEC-MAP) para cada protocolo de extracción proteica.

[Tabla Suplementaria 10](#): Estadística descriptiva del inmunoensayo de cromatografía de exclusión de tamaño & microarrays de proteínas (SEC-MAP), espectrometría de masas y transcriptómica.

[Tabla Suplementaria 11](#): Estudio comparativo de los valores Z score de los protocolos de extracción proteico, por localización subcelular y fracción de rango de peso molecular (PM).

[Tabla Suplementaria 12](#): Análisis de las interacciones proteína-proteína detectadas por inmunoensayo de cromatografía de exclusión de tamaño & microarrays de proteínas (SEC-MAP) para las 10 rutas de señalización seleccionadas.

[Tabla Suplementaria 13](#): Resumen de las proteínas detectadas con modificaciones postraduccionales y/o diferentes isoformas tras el inmunoensayo de cromatografía de exclusión de tamaño & microarrays de proteínas (SEC-MAP).

[Tabla Suplementaria 14](#): Resumen de las proteínas identificadas tras la integración ortogonal multi-ómica y grupo al que pertenecen según su evidencia a nivel proteico.

[Tabla Suplementaria 15](#): Enriquecimiento funcional (Reactome) y de procesos biológicos (KEGG), obtenidos tras el análisis y visualización con Infinicyt, de los valores cuantitativos obtenidos a nivel proteómico y transcriptómico.

[Tabla Suplementaria 16](#): Resultados obtenidos tras el análisis estadístico convencional para las 105 proteínas solubles evaluadas.

Tabla Suplementaria 17: Correlación de Spearman para las proteínas solubles evaluadas.

Tabla Suplementaria 18: Resultados obtenidos tras el modelo lineal con limma para las proteínas solubles evaluadas.

Tabla Suplementaria 19: Resultados obtenidos tras el análisis de mínima redundancia y máxima relevancia (mRMR) de las 105 proteínas solubles evaluadas.

Tabla Suplementaria 20: Enriquecimiento funcional según la tendencia de los factores solubles de acuerdo a la evolución de la enfermedad.

Tabla Suplementaria 21: Enriquecimiento funcional de las proteínas con diferencias significativas de acuerdo a la evolución de la enfermedad.

Tabla Suplementaria 22: Enriquecimiento funcional según la tendencia de las proteínas con diferencias significativas de acuerdo a la situación terapéutica.

Tabla Suplementaria 23: Enriquecimiento funcional según la tendencia de los factores solubles en base al diagnóstico y respuesta a tratamiento.

Tabla Suplementaria 24: Enriquecimiento funcional de las proteínas con diferencias significativas para los grupos diagnóstico y respuesta a tratamiento.

Tabla Suplementaria 25: Enriquecimiento funcional según la tendencia de los factores solubles en base al estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

Tabla Suplementaria 26: Enriquecimiento funcional de las proteínas con diferencias significativas para el estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

Tabla Suplementaria 27: Resultados obtenidos tras el análisis estadístico convencional para los isotipos Ig M, Ig A, Ig E y las 4 clases de Ig G.

Tabla Suplementaria 28: Tabla de frecuencias y ratio de cada uno de los autoantígenos para cada una de las muestras, a nivel general y por grupo de estudio.

Tabla Suplementaria 29: Tabla de frecuencias para cada uno de los antígenos microbianos según la dilución de trabajo a nivel general y por grupo de estudio.

Tabla Suplementaria 30: Tabla de frecuencias y ratio para cada uno de los antígenos microbianos, a una dilución $1 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, para cada una de las muestras, a nivel general y por grupo de estudio.

Tabla Suplementaria 31: Tabla de frecuencias para los antígenos microbianos detectados.

Tabla Suplementaria 32: Porcentajes obtenidos tras el análisis de correlaciones dos a dos para las proteínas detectadas por transcriptómica y proteómica.

Tabla Suplementaria 33: Tabla resumen de las proteínas solubles con diferencias significativas en la cohorte de estudio.

Tabla Suplementaria 34: Tabla resumen de los 10 antígenos tumorales más relevantes en la cohorte de estudio para los isotipos Ig M e Ig G.

Tabla Suplementaria 35: Tabla resumen de los 5 antígenos tumorales más relevantes según el grupo de estudio para los isotipos Ig M e Ig G.

Tabla Suplementaria 36: Tabla resumen de los 10 antígenos microbianos más relevantes en la cohorte de estudio para los isotipos Ig M e Ig G.

Tabla Suplementaria 37: Tabla resumen de los 5 antígenos microbianos más relevantes según el grupo de estudio para los isotipos Ig M e Ig G.

Tabla Suplementaria 38: Listado de los términos funcionales seleccionados.

Anexo III: Listado de Archivos.

Archivo I: Conjunto de datos para todas las interacciones proteína-proteína, estudio de isoformas y modificaciones postraduccionales con el inmunoensayo de de cromatografía de exclusión de tamaño & microarrays de proteínas (SEC-MAP).

Archivo II: Conjunto de datos y análisis realizado con el software Infinicyt™ v. 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España) para el inmunoensayo de cromatografía de exclusión de tamaño & microarrays de proteínas (SEC-MAP).

Archivo III: Análisis del perfil antigénico para la dilución de 0,08 µg/µL con el software Infinicyt™ v. 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España).

Archivo IV: Análisis del perfil antigénico para la dilución de 0,01 µg/µL con el software Infinicyt™ v. 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España).

Archivo V: Análisis del perfil antigénico para la dilución de $1 \cdot 10^{-3}$ µg/µL con el software Infinicyt™ v. 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España).

Archivo VI: Análisis del perfil antigénico para la dilución de $1 \cdot 10^{-4}$ µg/µL con el software Infinicyt™ v. 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España).

Archivo VII: Análisis del perfil antigénico para la dilución de $1 \cdot 10^{-5}$ µg/µL con el software Infinicyt™ v. 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España).

Anexo IV: Landeira Viñuela et al. 2021.



biomolecules



Article

Deepening into Intracellular Signaling Landscape through Integrative Spatial Proteomics and Transcriptomics in a Lymphoma Model

Alicia Landeira-Viñuela ¹, Paula Díez ^{1,2}, Pablo Juanes-Velasco ¹, Quentin Lécresse ¹, Alberto Orfao ¹, Javier De Las Rivas ³ and Manuel Fuentes ^{1,2,*}

¹ Department of Medicine and General Cytometry Service-Nucleus, USAL/IBSAL, 37000 Salamanca, Spain; alavi29@usal.es (A.L.-V.); pauladg@usal.es (P.D.); pablojuanvelasco@usal.es (P.J.-V.); quentin@usal.es (Q.L.); orfao@usal.es (A.O.)

² Proteomics Unit, Cancer Research Centre (IBMCC/CSIC/USAL/IBSAL), 37007 Salamanca, Spain

³ Bioinformatics and Functional Genomics, Cancer Research Centre (IBMCC/CSIC/USAL/IBSAL), 37007 Salamanca, Spain; jrvivas@usal.es

* Correspondence: mfuentes@usal.es; Tel: +34-923-29-48-11



Citation: Landeira-Viñuela, A.; Díez, P.; Juanes-Velasco, P.; Lécresse, Q.; Orfao, A.; De Las Rivas, J.; Fuentes, M. Deepening into Intracellular Signaling Landscape through Integrative Spatial Proteomics and Transcriptomics in a Lymphoma Model. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1776. <https://doi.org/10.3390/biom11121776>

Academic Editor: William Cho

Received: 21 October 2021

Accepted: 23 November 2021

Published: 26 November 2021

Abstract Human Proteome Project (HPP) presents a systematic characterization of the protein landscape under different conditions using several complementary-omic techniques (LC-MS/MS proteomics, affinity proteomics, transcriptomics, etc.). In the present study, using a B-cell lymphoma cell line as a model, comprehensive integration of RNA-Seq transcriptomics, MS/MS, and antibody-based affinity proteomics (combined with size-exclusion chromatography) (SEC-MAP) were performed to uncover correlations that could provide insights into protein dynamics at the intracellular level. Here, 5672 unique proteins were systematically identified by MS/MS analysis and subcellular protein extraction strategies (neXtProt release 2020-21, MS/MS data are available via ProteomeXchange with identifier PXD003939). Moreover, RNA deep sequencing analysis of this lymphoma B-cell line identified 19,518 expressed genes and 5707 protein coding genes (mapped to neXtProt). Among these data sets, 162 relevant proteins (targeted by 206 antibodies) were systematically analyzed by the SEC-MAP approach, providing information about PTMs, isoforms, protein complexes, and subcellular localization. Finally, a bioinformatic pipeline has been designed and developed for orthogonal integration of these high-content proteomics and transcriptomics datasets, which might be useful for comprehensive and global characterization of intracellular protein profiles.

Keywords: affinity-based proteomics; human proteome project; LC-MS/MS; transcriptomics; size-exclusion-chromatography (SEC)

Article

Deepening into Intracellular Signaling Landscape through Integrative Spatial Proteomics and Transcriptomics in a Lymphoma Model

Alicia Landeira-Viñuela ¹, Paula Díez ^{1,2} , Pablo Juanes-Velasco ¹ , Quentin Lécresse ¹, Alberto Orfao ¹ , Javier De Las Rivas ³  and Manuel Fuentes ^{1,2,*} 

¹ Department of Medicine and General Cytometry Service-Nucleus, USAL/IBSAL, 37000 Salamanca, Spain; alavi29@usal.es (A.L.-V.); pauladg@usal.es (P.D.); pablojuanvelasco@usal.es (P.J.-V.); quentin@usal.es (Q.L.); orfao@usal.es (A.O.)

² Proteomics Unit, Cancer Research Centre (IBMCC/CSIC/USAL/IBSAL), 37007 Salamanca, Spain

³ Bioinformatics and Functional Genomics, Cancer Research Centre (IBMCC/CSIC/USAL/IBSAL), 37007 Salamanca, Spain; jrivas@usal.es

* Correspondence: mfuentes@usal.es; Tel.: +34-923-29-48-11

Abstract: Human Proteome Project (HPP) presents a systematic characterization of the protein landscape under different conditions using several complementary-omic techniques (LC-MS/MS proteomics, affinity proteomics, transcriptomics, etc.). In the present study, using a B-cell lymphoma cell line as a model, comprehensive integration of RNA-Seq transcriptomics, MS/MS, and antibody-based affinity proteomics (combined with size-exclusion chromatography) (SEC-MAP) were performed to uncover correlations that could provide insights into protein dynamics at the intracellular level. Here, 5672 unique proteins were systematically identified by MS/MS analysis and subcellular protein extraction strategies (neXtProt release 2020-21, MS/MS data are available via ProteomeXchange with identifier PXD003939). Moreover, RNA deep sequencing analysis of this lymphoma B-cell line identified 19,518 expressed genes and 5707 protein coding genes (mapped to neXtProt). Among these data sets, 162 relevant proteins (targeted by 206 antibodies) were systematically analyzed by the SEC-MAP approach, providing information about PTMs, isoforms, protein complexes, and subcellular localization. Finally, a bioinformatic pipeline has been designed and developed for orthogonal integration of these high-content proteomics and transcriptomics datasets, which might be useful for comprehensive and global characterization of intracellular protein profiles.

Keywords: affinity-based proteomics; human proteome project; LC-MS/MS; transcriptomics; size-exclusion-chromatography (SEC)



Citation: Landeira-Viñuela, A.; Díez, P.; Juanes-Velasco, P.; Lécresse, Q.; Orfao, A.; De Las Rivas, J.; Fuentes, M. Deepening into Intracellular Signaling Landscape through Integrative Spatial Proteomics and Transcriptomics in a Lymphoma Model. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1776. <https://doi.org/10.3390/biom11121776>

Academic Editor: William Cho

Received: 21 October 2021

Accepted: 23 November 2021

Published: 26 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Increased understanding of the events taking place during intracellular signaling has revealed a highly dynamic protein landscape for eukaryotic cells, especially in pathological settings (such as cancer, neurodegenerative, auto-immune diseases, etc.) [1–3]. Most of the subcellular signaling pathways are led by protein complexes, which are constantly being formed and resolved. Furthermore, proteins are shuttling between different subcellular localizations to execute the expected and/or programmed biological processes according to the needs and requirements of the cell. These fluctuations could produce re-wiring of signaling networks for enabling phenotypic changes required for the adaptation to microenvironmental or external perturbations and/or stimuli [4–6]. Given these temporal and spatial variabilities, high-throughput biochemical methods are required to deepen the knowledge on the interacting biomolecules across subcellular localizations during the response to external stimulus, drug administration, and drug resistance mechanisms, etc., [1,2,4,6,7].

Bearing this in mind, the recent advances in next-generation sequencing (NGS) and high-resolution mass spectrometry (MS/MS) have opened up strategies methodologically which provide novel insights useful for understanding the complexity of intracellular processes [8,9]. Among other parameters in protein functionality, subcellular localization is one of the main determinants for a particular protein's intracellular dynamics and the final function; however, a global view of subcellular proteome organization remains relatively unknown, and it is currently studied by multipronged proteomics approaches. Despite some multiple integrations that have been recently performed (based on MS/MS and RNA-Seq, among others), there remains a huge interest in revealing the presence of proteoforms, multiprotein complexes, changes in transcript-protein, etc., [10–13]. Historically, subcellular localization of proteins has been determined by conventional biochemical approaches (mostly by targeting individual proteins); e.g., cell fractionation coupled with Western blot. Although additional development of large-scale GFP fusion protein-based [14], antibody-based assays [15,16], protein-metabolite interactions [17], Sequential Window Acquisition of All Theoretical Mass Spectra (SWATH-MS) characterization [18] has increased our knowledge of protein subcellular localization, these methods are labor-intensive, making them highly challenging and difficult to implement for high-content characterization in large cohort studies.

The development of mass spectrometry (MS/MS)-based proteomics coupled with protein extraction at subcellular level [19] as well as the high-throughput immunoassays coupled with size-exclusion chromatography (SEC) [20] have opened up new possibilities to query the spatial intracellular organization of the proteome on a larger scale [21]. More recently, the Aebersold group [22] has developed a strategy combining mass-spectrometry and SEC. Other similar attempts involve machine learning algorithms to assign subcellular localization based on protein quantification across multiple subcellular fractions by MS/MS. However, all these studies provide proteome-wide information but lack the multiple combinations between several proteomics characterizations and comprehensive integration with transcriptomics.

This study has two main purposes: i. Evaluation of protein extraction or complementary characterization with MS/MS-based proteomics and affinity proteomics (SEC-MAP), which may be useful for bioinformatic orthogonal integration with deep transcriptomics characterization; ii. generation of systematic pipeline for comprehensive orthogonal integration of protein subcellular localization, affinity proteomics (SEC-MAP), MS/MS data sets, and RNA-seq information in human lymphoma cell line, like a model for mapping cancer protein interactions. Moreover, the combination of these methodologies helps to deepen the knowledge about the architecture of the cells and the complexity of the spatial organization of the proteome, which can be a tool for interpreting a multiscale map of protein systems—which is relevant for deciphering cell signaling pathways linked to genetic perturbations/alterations, therapeutic interventions, or another external stimulus.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Cultures

Human Ramos cell line (Burkitt's lymphoma, European Collection of Authenticated Cell Cultures—ECACC-Cat. no: 85030802) was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with L-glutamine (Gibco, Waltham, MA, USA), 10% (*v/v*) fetal bovine serum (Gibco, Waltham, MA, USA) and 1% (*v/v*) penicillin/streptavidin (Gibco, Waltham, MA, USA). The growth was monitored daily and cells were incubated at 37 °C/5% CO₂ with media renewal every 2–3 days.

2.2. Protein Extraction and Quantification

For protein extraction, 40×10^6 Ramos cells were pelleted by centrifugation and washed three times with PBS, and further centrifuged for 5 min (min.) at 1200 rpm. All the different protein extraction buffers were supplemented with phosphatase and protease inhibitors: tris [2-carboxyethyl]phosphine] (TCEP—Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA)

1 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF—Sigma-Aldrich, USA) 1 mM, sodium fluoride (NaF—Sigma-Aldrich, USA) 1 mM, sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich, USA) 1 mM, β -glycerophosphate (Sigma-Aldrich, USA) 1 mM and sodium pyrophosphate tetra-basic decahydrate (Sigma-Aldrich, USA) 1 mM. All centrifugation and incubation steps were carried out at 4 °C. The extracted proteins from each strategy were stored at -20 °C until further use.

Protein quantification was performed by Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Cat. no: 23236, USA) and Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Cat. no: 23225, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's instructions. Each sample (20 μ g) was separated in 12% SDS-PAGE gel under reducing conditions. Subsequently, SDS-PAGE gels were stained with 0.1% (*w/v*) Coomassie brilliant blue and silver stains solutions according to standard laboratory procedure [23–25].

The different protein extraction procedures, which are evaluated herein, are described below and summarized in Table 1.

2.2.1. Protocol #1

Total of 375 μ L of lysis buffer (140 mM NaCl, 50 mM EDTA, 10% (*v/v*) glycerol, 1% octylphenoxy poly(ethyleneoxy)ethanol—IGEPAL-, 20 mM Tris-HCl pH = 7 supplemented with proteases and phosphates inhibitors) per 1×10^7 cells was added, and cells were incubated on ice for 15 min. After that, the sample was centrifuged for 15 min at $15,000 \times g$ and the supernatant containing the protein content was stored at -20 °C until further analysis.

2.2.2. Protocol #2

As protocol #1, 1×10^7 cells were incubated with 375 μ L of lysis buffer (20 mM HEPES pH = 8 and 9 M urea). Cell lysis was performed by sonication on ice (3 times 5 s bursts and 1 min break). Afterward, it was centrifuged for 15 min at $15,000 \times g$ and the supernatant containing the total protein content was stored at -20 °C until further analysis.

2.2.3. Protocol #3

Similar procedure as protocol #2 with a lysis buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, and 30 mM Tris-HCl pH = 8.5. The sample was then centrifuged for 15 min at $12,000 \times g$ and the supernatant was stored at -20 °C until further analysis.

2.2.4. Protocol #4

The same procedure as protocol #3 but with a different lysis buffer: 5 mM HEPES pH 8, 10 mM $MgCl_2$, 140 mM NaCl and 0.01% Tween 20.

2.2.5. Protocol #5

Total of 1×10^7 cells were incubated with 375 μ L of hypotonic buffer (30 mM HEPES pH = 8, 15 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA and 20% glycerol) supplemented with 10% (*v/v*) laurylmaltoside (n-Dodecyl- β -D-maltoside) for 30 min in rotation at 4 °C. Afterward centrifugation at $16,000 \times g$ for 5 min was carried out and the supernatant containing the proteins was collected.

2.2.6. Protocol #6

Similar to protocol #5 with a difference that the lysis buffer was supplemented with 1.5% (*v/v*) Triton X-100 instead of laurylmaltoside.

2.2.7. Protocol #7

In this case, 1×10^7 cells were incubated with 375 μ L of buffer (5 mM HEPES pH 8, 10 mM $MgCl_2$, 140 mM NaCl and 0.01% Tween 20) and it was centrifuged for 15 min at $13,000 \times g$. After centrifugation, the supernatant enrichment in cytoplasmic (Cyt) proteins was collected and the pellet was re-suspended in 375 μ L of buffer supplemented with 38% (*v/v*) octyl- β -D-glucopyranoside. The sample was sonicated on ice (3 times 3 s bursts and

1 min break). After sonication, it was incubated for 30 min on ice and subsequently, it was centrifuged for 15 min at $13,000\times g$. Finally, the supernatant enriched in membrane proteins (Mem) was collected [26].

2.2.8. Protocol #8

Ramos cell pellets were re-suspended at a volume equal to 5 times that of the cell pellet in hypotonic buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors and 0.015% digitonin following the methodology published by Díez P. et al., 2015 [19].

Then, it was incubated on a rotatory shaker for 30 min and then it was centrifuged for 5 min at $500\times g$. After centrifugation, cytoplasmic (Cyt) proteins were found in the resulting supernatant 1. The pellet 1 was washed $3\times$ with hypotonic buffer and it was centrifuged for 5 min at $500\times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The following fractions were processed similarly in a stepwise manner. For the supernatant 2 containing organelle (Org) proteins, a hypotonic buffer was supplemented with 0.5% Tween 20; for the supernatant 3 containing nuclear (Nuc) proteins, a hypotonic buffer supplemented with 14 mM NaCl was used; for the supernatant 4 containing membrane (Mem) proteins, a hypotonic buffer supplemented with 1% laurylmaltoside was used.

2.2.9. Protocol #9

Similar procedure as protocol #8 for cytoplasmic and organelle subcellular fractions. The membrane fraction was extracted with a hypotonic buffer supplemented with 0.5% octylphenoxy poly(ethyleneoxy)ethanol (IGEPAL) and centrifuged for 5 min at $3000\times g$. A hypotonic buffer supplemented with 1% laurylmaltoside was used for the extraction of the nuclear fraction.

2.3. Proteomics Analysis

2.3.1. Protein Digestion and LC-MS/MS Analysis

Each lane in SDS-PAGE gel (loaded with $15\text{ }\mu\text{g}$ protein extract) was cut into five equal fragments and digested using the method described by Olsen et al. with slight modifications (each piece was destained with 15 mM potassium ferrocyanide and for reduction and 50 mM sodium thiosulfate was used for the alkylation process) and incubated with 10 mM DTT at $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 45 min and then 55 mM iodoacetamide (IAA) was added and incubated at room temperature (RT) for 30 min, respectively. Trypsin (6.25 ng/mL) at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 18 h was used for protein digestion, and the peptide solution was acidified with formic acid (FA) and desalted using C18-Stage-Tips columns [19,27]. Samples were partially dried and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analyzed by LC-MS/MS.

A nanoUPLC system (nanoAcquity, Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled to an LTQ-Velos-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) via a nanoelectrospray ion source (NanoSpray flex, Proxeon, Thermo) was used to study with LC-MS/MS. Peptides dissolution was carried out using 0.5% FA/3% acetonitrile (ACN). A trapping column (nanoACQUITY UPLC 2G-V/M Trap Symmetry $5\text{ }\mu\text{m}$ particle size, $180\text{ }\mu\text{m}\times 20\text{ mm}$ C18 column, Waters Corp., Milford, MA, USA) was used to load. Separation was made with a linear gradient from 7% to 35% solvent B (ACN/0.1% FA) at a flow rate of 250 nL/min over 120 min in a nanoACQUITY UPLC BEH $1.7\text{ }\mu\text{m}$, $130\text{ }\text{Å}$, $75\text{ }\mu\text{m}\times 250\text{ mm}$ C18 column (Waters Corp., Milford, MA, USA) [19,26,27]. Tandem mass spectra (MS/MS) acquisition and survey MS scan were applied to a data-dependent automatic switch using the positive ion mode of the nUPLC-LTQ-Orbitrap Velos. Acquisition scan was made with lock mass option enabled for the 445.120025 ion and mass range of m/z 400 to 1600. In the ion trap for fragmentation by collision-induced dissociation with 35% normalized energy, 10 ms activation time, $q = 0.25$, $\pm 2\text{ }m/z$ precursor isolation width and wideband activation, we selected the 20 peaks with the most intensity and with ≥ 2 charge state and above the 500 intensity threshold. Automatic gain control was 1×10^6 for MS and 5×10^3 for MS/MS scans and dynamic exclusion was enabled for 90 s [19,26,27].

Table 1. Summary of protein extraction procedures.

			Protocols										
Buffer elements			#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9		
Step 1	Phosphatase Inhibitor (mM)	TCEP	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
		PMSF	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
		NaF	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
		Sodium orthovanadate	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
		β -glycerophosphate	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
		Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	Salt (mM)	NaCl	140	-	-	140	-	-	140	-	-		
		KCl	-	-	-	-	15	15	-	15	15		
	Nuclear envelope protector (mM)	MgCl ₂	-	-	-	10	2	2	10	2	2		
	Metalloproteinase inhibitor (mM)	EDTA	50	-	-	-	1	1	-	1	1		
	Chaotropic agent (M)	Urea	-	9	7	-	-	-	-	-	-		
		Thiourea	-	-	2	-	-	-	-	-	-		
	Buffer solution (mM)	Tris/HCl	20	-	30	-	-	-	-	-	-		
		HEPES	-	20	-	5	30	30	5	30	30		
	Thickening agent (%-v/v-)	Glycerol	10	-	-	-	20	20	-	20	20		
		IGEPAL	1	-	-	-	-	-	-	-	-		
Non ionic detergent (%-v/v-)	Tween 20	-	-	-	0.1	-	-	0.1	-	-			
	Laurylmaltoside	-	-	-	-	10	-	-	-	-			
	Triton X-100	-	-	-	-	-	1.5	-	-	-			
			Protocols										
Buffer elements			#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9		
Step 1	Non ionic detergent (%-v/v-)	Digitonin	-	-	-	-	-	-	-	0.015	0.015		
		Octyl- β -D-glucopiranoside	-	-	-	-	-	-	38	-	-		
Step 2	Non ionic detergent (%-v/v-)	Tween 20	-	-	-	-	-	-	-	5	5		
Step 3	Salt (mM)	NaCl	-	-	-	-	-	-	-	14	-		
Step 4	Non ionic detergent (%-v/v-)	IGEPAL	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5		
		Laurylmaltoside	-	-	-	-	-	-	-	1	1		
Centrifugation			Time (min)	15	15	15	15	5	5	15	5	5	
			$10^3 \times g$	15	15	12	12	16	16	15	0.5	0.5	3/15
Legend													
	Phosphatase Inhibitor		Salt		Nuclear envelope protector		Metalloproteinase inhibitor						
	Chaotropic agent		Buffer solution		Thickening agent		Non ionic detergent						
Centrifugation													

2.3.2. Database Search

Raw data were converted into Mascot general file (.mgf) and target-decoy strategy was used to search in the neXtProt database (release 2016-02). Comet version (v.) 2015.01 rev.2 [28] was used to identify the peak list (.mgf file) obtained from MS/MS spectra and SearchGUI v. 1.30.1 [29] was used.

Concatenated target/decoy [30] version of the human complement of neXtProt release 2016-02 (41,992 sequences) was used for protein identification. SearchGUI v. 1.30.1 was used to design decoy sequences (the reverse target sequences) [29]. The process for the identification of the settings was as follows: trypsin with a maximum of two missed cleavages; 10.0 ppm as MS1 and 0.5 Da as MS2 tolerances; fixed modifications: carbamidomethylation of cysteine (+57.021464 Da). The variable modifications were acetylation of protein n-terminus (+42.010565 Da) and oxidation of methionine (+15.994915 Da) [19,26–30].

PeptideShaker v. 0.41.1 [31] was used to infer peptides and proteins from the identified spectra. A method, as the one published by our group in 2015, was used for the validation of decoy hit distribution (at a 1.0% False Discovery Rate—FDR—for Peptide Spectrum Matches –PSMs-, peptides and proteins) [19]. It is obtained at protein/peptide/PSM levels, the FDR (%), true positives, and false positives values for each replicated (1, 2, 3): Cyt 1 (0.99, 2899, 29/0.98, 10474, 104/1.0, 17627, 178); Cyt 2 (1.0, 3183, 32/1.0, 12897, 130/1.0, 20147, 203); Cyt 3 (0.99, 2802, 28/0.99, 10857, 109/1.0, 5666, 57); Mem 1 (0.93, 1166, 11/0.97, 2651, 26/0.99, 1303, 13); Mem 2 (0.97, 1122, 11/0.97, 1937, 19/0.99, 1607, 16); Mem 3 (1.0, 893, 9/0.98, 1523, 15/1.0, 1291, 13); Org 1 (0.97, 2543, 25/0.99, 7503, 75/0.99, 10305, 103); Org 2 (0.99, 2294, 23/0.99, 6919, 69/0.98, 4933, 49); Org 3 (0.96, 2465, 24/0.98, 7045, 70/1.0, 10507, 106); Nuc 1 (0.99, 2498, 25/0.98, 7145, 71/0.97, 915, 9); Nuc 2 (0.96, 2577, 25/1.0, 8938, 90/1.0, 4469, 45); Nuc 3 (1.0, 2872, 29/0.99, 10937, 109/0.99, 4585, 46). The protein-level FDR is an estimate and not all proteins that exceeded the threshold were “confidently identified”.

The mass spectrometry data and the identification results have been deposited to the ProteomeXchange Consortium [32] via the PRIDE partner repository [33] with the dataset identifier PXD003939 and 10.6019/PXD003939. The data can be accessed with the following credentials upon login to the PRIDE website (<http://www.ebi.ac.uk/pride/archive/login>, accessed on 30 March 2021): Username: reviewer85106@ebi.ac.uk, Password: 0fVloZfQ.

2.3.3. Quantitative Analysis of MS/MS Datasets

Raw data were analyzed as reported by Paula et al. in 2021 [34]: i. For expression level measuring, the Label-Free Quantification method MaxLFQ [35] with the MaxQuant Suite v. 1.5.3.30 was used [36]. ii. PTXQC package v. 0.80.1 [37] in R v. 3.2.4 [38] was utilized for quality control analysis. iii. Perseus framework v. 1.5.3.2 was performed for ulterior analysis. Additionally, for each subcellular fraction (Mem, Cyt, Org and Nuc) total proteins and exclusive proteins were determined.

2.3.4. RNA-Sequencing Transcriptomics

RNA-Seq data from Ramos B-cell line was obtained with Illumina Genome Analyzer Ix with paired layout (experiment SRX105534: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX105534>, accessed on 30 March 2019 taken from the study SRP00931 (<http://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/?study=SRP009316>, accessed on 30 March 2019) [39] from SRA (Sequence Read Archive) database. Gene expression analysis consisted of calculated values of FPKM (fragment per kilobase of exon per million fragments mapped) on base for each gene on the following steps [19]: i. Use of SRA tools [40] to obtain the SRR387395 dataset from SRA database [40] and the subsequent conversion of the SRA file to paired-end fastq files; ii. trimming of the data with Trimmomatic [41]; iii. use the program STAR [42] to align the reads to ENSEMBL GRCh37 genome; iv. generation of a binary sequence alignment map (BAM) with SAMtools [43]; v. calculating the FPKM value for each gene with CuffLinks from the BAM files [44]; vi.-Use of the neXtProt ID mapping table to map ENSG_IDs within the neXtProt database v. 2016-02 (ftp://ftp.nextprot.org/pub/current_release/mapping/,

accessed on 30 March 2019). Finally, a total of 19,518 neXtProt IDs could be mapped within the RNA-Seq dataset, out of this 9523 neXtProt IDs had FPKM > 1.

2.4. Biotin Protein Labeling

Protein extracts obtained from protocols #1, #4, #5, #6, #7, #8, and #9 were biotin-labelled following the procedure described by Häggmark A. et al. 2013 [45]. All the cell lysates were incubated with two different concentrations (10 µg/µL—protocol A—and 1 µg/µL—protocol B-) of NHS-PEG₄-biotin (Thermo Scientific, no: 21363, USA) for 2 h at 4 °C. Biotin-labeling reactions were stopped with 4.5 µL for protocol A and 50% of the volume of the biotin-labeling solution for concentration for protocol B of 0.5 M Tris-HCl pH = 8.

After that, Amicon[®] Ultra-0.5 centrifugal filter 3K (Millipore-Merk, Darmstadt, Germany) was used for removing the excess of biotin until a final volume of 110 µL (maximum volume of injection in column HPLC). In both approaches, 75 µg of protein was conjugated with biotin.

2.5. Size Exclusion Chromatography (SEC): Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Equipment HPLC 1100 series (Agilent) and column Superdex[®] 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare, Illinois, Sigma-Aldrich, USA) was used for protein fractionation based on molecular weight (MW). As MW standards, a mix of five purified proteins (Ferritin—440 kDa, aldolase—158 kDa, conalbumin—75 kDa, ovalbumin—43 kDa and ribonuclease A—13.7 kDa) was used. Each sample was fractionated and collected in 24 aliquots at 0.5 mL/min. (flow rate) and PBS 1X Na²⁺/K⁺- tween 20 0.5% (v/v) as running buffer.

Then, all 24 collected fractions were merged in 8 fractions within defined MW ranges (fraction 1—166–473 kDa, fraction 2—121–142 kDa, fraction 3—74–103 kDa, fraction 4—54–63 kDa, fraction 5—33–46 kDa, fraction 6—24–28 kDa, fraction 7—17–21 kDa and fraction 8—11–15 kDa) by using Amicon[®] Ultra-0.5 centrifugal filter 3K (Millipore-Merk, Germany) until a final volume of 100 µL. All steps were performed at 4 °C. Each collected fraction was stored at −20 °C until incubation for protein microarray.

2.6. Protein Microarrays

Microarray preparation and performance evaluation were done following the procedures previously described by Sierra-Sánchez et al., 2017 [46]. The glass slide surface was activated by incubation with 2% (v/v) 3-(2-Aminoethylamino) propyldimethoxymethyl (MANAE) silane in acetone for 30 min and slight shaking at RT [47]. Then, activated glass slides were washed with acetone and Milli-Q water and dried with compressed filtered air. For antibody array printing, a non-contact inkjet printing technology (Arrayjet Inc., Edinburg, UK) was employed with a slide-out of 7 similar subarrays and 5 replicates per sample. The array content is described in Table S1 where 205 antibodies targeting 162 proteins, among positive and negative controls, were included (Table S2). All the samples were prepared at 1:1 (v/v) dilution with JetStar[™] (Arrayjet Inc., Edinburg, UK) printing buffer C.

2.7. Evaluation of Array Performance at Different MW Fractions

Protein microarrays were blocked with blocking solution PBS and 1% blocker BSA—10X, (Thermo Fisher Scientific, USA) for 1 h at RT with mild stirring. Then, blocked protein microarrays were thoroughly washed with distilled water. Regarding sample handling, 50% volume of each 24 collected fractions was processed with epitope retrieval treatment (30 min at 56 °C and 1 min at 20 °C) and at last, the remaining 50% samples were combined in one single solution. After that, 100 µL per subarray of each mix were incubated at 4 °C, with mild stirring. After overnight incubation, 100 µL of Cy3- Streptavidin (1:200 -v/v-) was added to each subarray, and it was incubated for 1 h in darkness in a humidified chamber at RT. Finally, the protein microarrays were washed and dried for further acquisition of array images. All steps were performed at RT unless otherwise specified.

2.8. Image Analysis and Data Acquisition

TIFF images obtained at different exposition times to achieve optimal images with SensoSpot® Fluorescence Microarray (Sensovation GmbH, Radolfzell, Germany) were analyzed using GenePix Pro v. 6.0 software. Parameters were set to quantify light intensity values at Cy3 ($\lambda = 532$ nm) emission wavelength.

2.9. Protein Microarray Data Processing

Signal intensity values were processed by performing background subtraction, filtering, and housekeeping processes.

Normalization

To remove the background, the following was used:

$$\tau_{iMM_n} = (\tilde{\delta} - k) - 2\sigma k$$

where:

τ_{iMM_n} : signal intensity value spot i containing MasterMix (MM_n).

$\tilde{\delta}$: median intensity value per spot.

k : constant of subarray background intensity.

$2\sigma k$: variance of signal intensity background per subarray.

To remove the background effect of the mastermix (MM), as the same MM for each antibody was used, the following equation was used:

$$S_i = \tau_{iMM_n} - (\tilde{\delta}_{MM_{n_{max}}} + \tilde{\delta}_{MM_{n_{max}}} \cdot 0.05)$$

where:

S_i : signal intensity value of spot i without background.

$\tilde{\delta}_{MM_{n_{max}}}$: maximum value of median intensity MM.

After background subtraction, the signal was normalized against a positive control (biotin). For further analysis, only the proteins detected with >50% of spotted antibodies displaying a normalized signal > 0 were included.

2.10. SEC-MAP Database

To combine the SEC-MAP data sets with transcriptomics and other proteomics characterization (LC-MS/MS), a database was designed and developed containing: i. Protein ratio at SEC-MAP for each MW fraction and protein extraction procedure; ii. Antibody info: type (monoclonal/polyclonal), supplier, and developed; iii. Protein ID, NextProt ID, Uniprot ID, MW (expected/observed/theoretical, etc.), subcellular localization; iv. Detection by LC-MS/MS previously reported in the cell type of interest [19].

2.11. Integration of Transcriptomics, Proteomics, and SEC-MAP Datasets

A database called “complete protein mapping” was designed and developed from reported LC-MS/MS characterization of Ramos cell line in our previously reported studies [19]. Total of 5672 proteins were detected by unique tryptic peptides in three technical replicates and the subcellular localization (Cyt, Mem, Org, Nuc) was included (Table S3). The genes coding for each of the detected proteins were mapped to chromosomes with the R-package BiomaRt [48]. neXtProt IDs are used to merge the different datasets (RNA-Seq, LC-MS/MS, and SEC-MAP). In the case of proteins with more than one gene IDs, the gene ID with the highest FPKM value was selected, Table S4. In this study, a protein was considered to be fully observed if: i. Number of peptides ≥ 1 ; ii. FPKM ≥ 1 ; or iii. QAS value ≥ 1 . Biological function analysis of observed proteins is based on DAVID and GeneTerm-Linker tools [49,50], which were used for functional enrichment analysis (FEA). Databases selected to find genes with annotated enriched terms were: (i) Gene Ontology (GO) using GO_BP, GO_CC and GO_MF; (ii) KEGG_PATHWAY; and (iii) the INTERPRO protein structural domain databases were used for generation of functional enrichment analysis (FEA). Moreover, a platform STING v. 11.0 [51] for the protein interactions obtained from SEC-MAP was used. For signaling pathways observed from the integration

of proteomics and transcriptomics datasets, KEGG v. 93.0 [52] and Reactome v. 71 were used [53].

2.12. Visualization of Transcriptomics, Proteomics, and SEC-MAP Datasets

In this study, the software called Infinicyt™ 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, Spain) has been employed for the visualization of multidimensional and multiparametric data sets. For that, a classification of each immunoassay was based on expected and theoretical subcellular localization and its correlation with the observed subcellular localization by the LC-MS/MS characterization. Hence, proteins were classified—according to subcellular localization—by positive selection in the following order: Nuc, Cyt, Mem, Org, Nuc-Org, Nuc-Cyt, Nuc-Mem, Org-Cyt, Org-Mem, Cyt-Mem, Nuc-Org-Cyt, Nuc-Org-Mem, Nuc-Cyt-Mem, Org-Cyt-Mem, and Nuc- Org-Cyt-Mem. Additionally, for each classified group, proteomics and transcriptomics integration were represented by APS, t-SNE plot, population burst, 2D (file number—*y*-axis- and each subcellular localization—*x*-axis-, and LFQ logarithmic—*y*-axis- and FPKM logarithmic—*x*-axis-). All these graphs (including 3D, tables, etc.) are reported in Supplementary Materials Dataset I.

After that, a second classification was established according to proteomics values vs. transcriptomics values, represented by Log LFQ vs. Log FPKM, depicted in a 2D plot which allowed for classifying (according to proteomics vs. transcriptomics) five additional groups named: average population, average population, low Log LFQ vs. progressive Log FPKM, high Log LFQ vs. low Log FPKM, high Log LFQ vs. Log FPKM, and a group of outliers. Then, each group of proteins according to the subcellular localization was re-classified on these additional groups.

3. Results

In Figure 1, an overall representation of the experimental workflow performed for the systematic and multipronged multi-omics characterization and the multi-dimensional bioinformatics integration is shown.

3.1. Protein Extraction Strategies for Multi-Pronged Proteomics Characterization

Knowing and exploring the different cell lysis strategies is fundamental to know the compatibility of the different proteomics methodologies and the feasibility to perform an integration of multi-pronged proteomic strategies (LC-MS/MS and SEC-MAP, for example) (Figure 1). For that reason, this study compares nine different protein extraction methods (as described in materials and methods section -M&M-) on a cell line of interest (Ramos cell line, Burkitt's lymphoma, RA1—ATTC: CRL-1596-). Each method is different regarding the chemical composition (Table 1); therefore, to allow a better understanding and comparison between them, they are named from #1–#9. In addition, protocols #7–#9 allow protein separation at different subcellular localizations. Then, all the protein extraction strategies—and subsequent chemical biotin labeling—are evaluated for SEC-MAP performance, according to: i. Efficiency of protein extraction: direct correlation with protein abundance (Figure S1) and expected subcellular localization. ii. Compatibility with protein labeling: biotin is commonly used in protein microarrays; however, several chemical components of the lysate buffers can cause interferences in the biotin conjugation protocol and array performance must be evaluated under these conditions (Figure S2). iii. SEC: to correctly analyze multi-protein complexes, the array performance is evaluated at several MW fractions to confirm that protein abundance is not affected by protein size (MW) and subcellular localization.

Performance of SEC-MAP: Effect of Protein Extraction Procedures and Biotin Conjugation

The total amount of protein extracted with each of the strategies show wide variability. For the protein total extraction protocols, the amount of protein obtained ranged between 34 and 61 µg/protein total per 10⁶ cells obtained, protocol #2 and #4, respectively. In the case of subcellular enrichment, the amount with membrane extraction protocol ranged from 169 to 270 µg/protein total per 10⁶ cells with protocol #5 and #6; and subcellular

fraction protocols (#9 & #7), the range is between 82 and 166 $\mu\text{g}/\text{protein}$ total per 10^6 cells, respectively. These results confirm that the properties of chemical reagents—presented in the extraction buffers—are critical for the relative and/or absolute determination of protein abundance; but, it seems that protein distribution is not influenced as they remain comparable among all the protocols (Figure S1B).

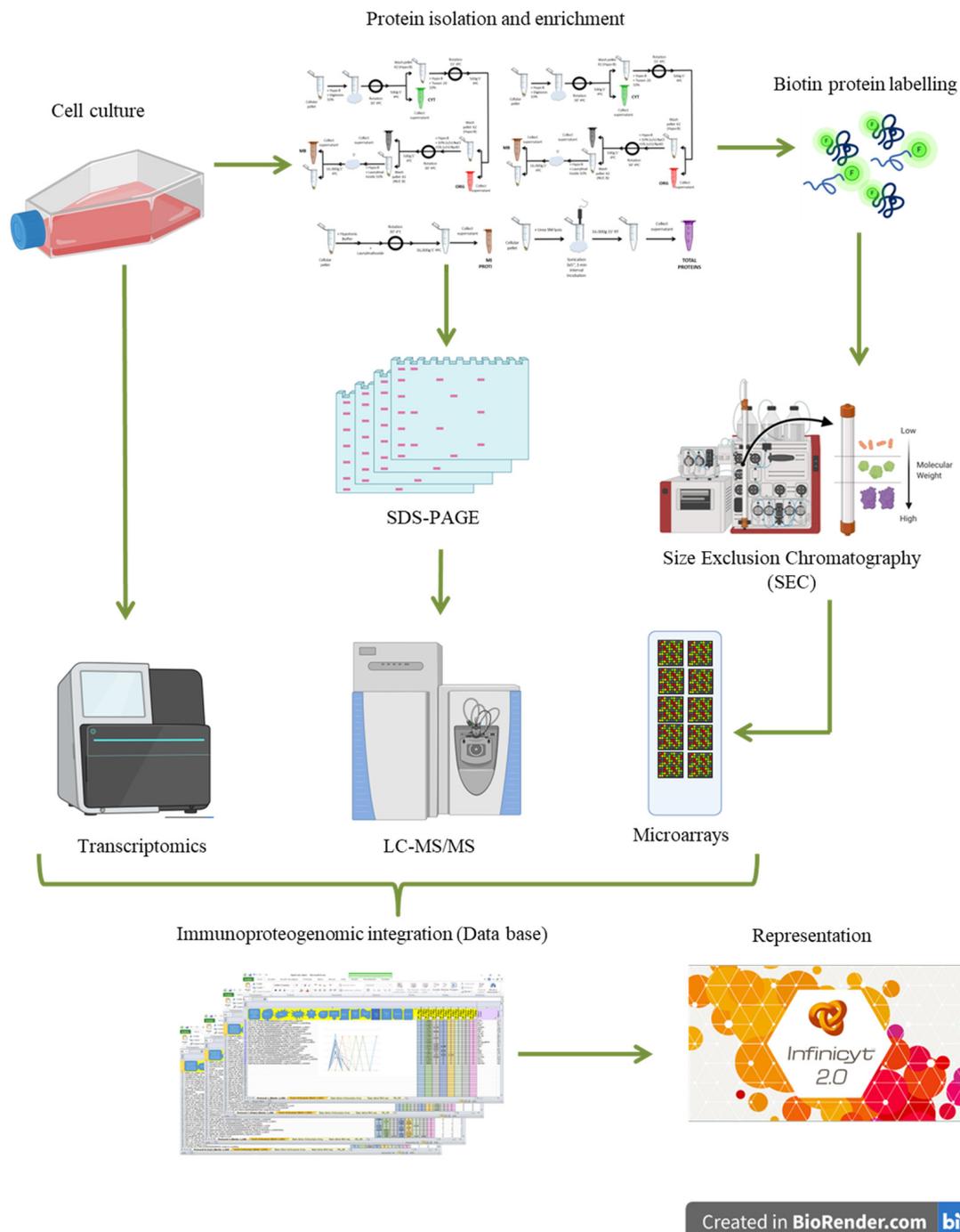


Figure 1. Schematic Representation of Experimental Design. Description of experimental steps involved for multi-omics integration.

About biotin conjugation, it does not show differences in all the analyzed MW by SEC (fraction 1—142–437 kDa –, fraction 2—74–121 kDa –, fraction 3—46–63 kDa –, fraction 4—26–39 kDa –, fraction 5—11–24 kDa). However, for antibody array performance, biotin-conjugated proteins present differences after SEC analysis (Figure S3). These are

directly related to the effect on epitope recognition caused by chemical modification during biotin labeling. For SEC-MAP performance, it is also relevant that optimal conditions for SEC which were studied in all protein extractions in eight pre-defined MW ranges in the same antibody microarray. First, the number of identified proteins different is considered a parameter for comparison across the studied protein extraction strategies (Table S5). In this case, protocol #1 presents the highest number of identified total proteins, and protocol #6 the lowest. It is due to different detergent compositions in each protein extraction buffer (Figure S4A).

Moreover, a comparison of the observed subcellular localization of the proteins is made for each extraction procedure. A higher number of identified proteins are reached by protocol #1 and the lowest one by protocol #4. When the comparison is focused only on membrane proteins, protocol #5 displayed a higher number of identified proteins than protocol #6 (Table S6, Figure S4A). Likewise, protocols #8 and #9 for subcellular protein extractions (Cyt, Mem, Nuc, Org) gave similar numbers of identified proteins in all studied subcellular localizations (Table S6, Figure S4). As proof of concept, the SEC-MAP analysis focuses on BID, CASP 7, CASP 8, LYN, SYK, BTK, CDKN1B, DNAJB1, HSPD1, HSP90AA1, HIST1H4A, BAX, BAK1, PAK1 | 1, and CCNB1. Moreover, in the known subcellular localization are detected all of them (Table S7). Additionally, SEC-MAP has also detected proteins with more than one localization; for example, in 4 subcellular localizations (Cyt, Mem, Org, Nuc), BCL-2 is detected by protocol #8 and 3 subcellular localizations (Cyt, Org, Nuc) by protocol #9 (Table S7).

Furthermore, analysis of subcellular protein localization by SEC-MAP has evaluated the effect of different protein extraction procedures. One example is RELA, which is detected in Cyt by protocol #7 and in the 4 subcellular fractions by protocol #8 (corroborating the reported subcellular localization and observed in the LC-MS/MS datasets). Another illustrative example is MAPK1, which is detected in the Cyt by protocols #7 and 8; however, protocol #9 detects it in Nuc localization. The observed subcellular localizations also correlate with LC-MS/MS datasets. (Table S7).

These results show: i. Protein extractions strategies are critical in the identified protein number by SEC-MAP. ii. Extraction strategy may be critical in the orthogonal integration with other omics datasets.

3.2. Deciphering Differential Protein Profiles by SEC-MAP

3.2.1. Analysis of Intracellular Signaling Pathways by SEC-MAP

This study integrates multiplex antibody microarray detections (MAP) with subcellular protein localization by SEC analysis. At first glance, a normal distribution of identified proteins (in all the studied protein extracts) is observed in the analyzed MW range (437-11 kDa) (Table S5 and Figure S5), where proteins are also detected in MW fractions that correspond with large protein sizes (Figure 2).

SEC-MAP approach allows the analysis of intracellular signaling pathways by simultaneous detection of multiple proteins. For this reason, several well-characterized signaling pathways are explored in the Ramos cell line: i. apoptosis regulation, ii. apoptosis inhibition, iii. BCR signaling pathway, iv. cell cycle control, v. STING pathway, vi. Damage-associated molecular patterns (DAMPs), vii. MAPK signaling, viii. senescence signaling [54–57]. In fact, SEC-MAP approach simultaneously detects heat shock proteins (HSP), Histones (3, 4), BCL-2, BAX, BAK1, BID, CASP7-8-9, IFN- γ , IL10, IL6, TNF- β , NF- κ B1, TP53, RELA, MAP2K1, MAPK1, FOS, among others. Figure 3A shows the summary of SEC-MAP analysis of these proteins at the expected molecular weight (MW and/or expected SEC—fraction), as well as the detection of several proteins in other MWs than the reported one (Table S7). Moreover, the SEC-MAP approach allows us to analyze the signaling pathways based on protein localization (≥ 1 subcellular localization in one step by extraction protocols #7, #8, #9). Figure 3B shows a similar overall distribution for all SEC-MAP assays performed (Table S8).

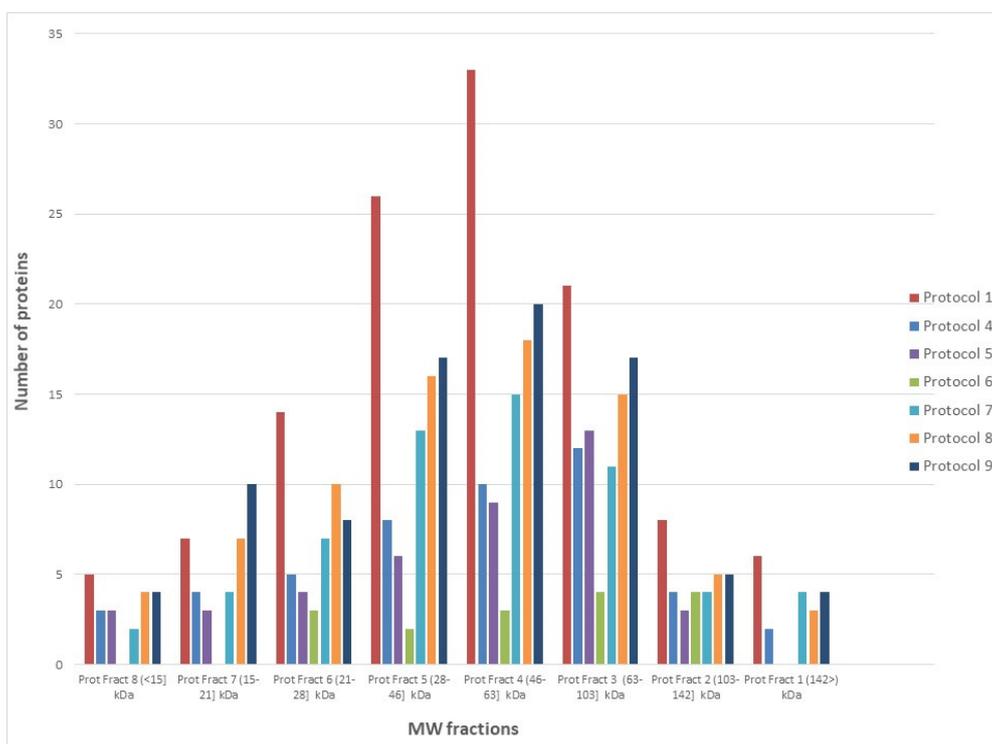


Figure 2. Effect of protein extraction protocols on protein identification by SEC-MAP approach.

3.2.2. Multi-Protein Complex Analysis by SEC-MAP

Nowadays, the inhibition of multi-protein complexes is one of the chemotherapeutical strategies in Burkitt's lymphoma, such as Venetoclax, Nutlin-3, Ibrutinib work by inhibiting the formation of multi-protein complexes (Figure 4) [57–59]. In this study, several multi-protein complexes are analyzed by SEC-MAP. These include BCL-2, BCL2L11, BID, BAD, BAK1, CASP3, and CASP8, which have been detected as multi-protein complexes (Figure 4A and Supplementary Materials Dataset II).

Moreover, the feasibility of SEC-MAP for the analysis of multi-protein complexes in only one intracellular signaling pathway. In Figure 4B, the BCR signaling pathway is analyzed by SEC-MAP, which reports protein complexes for PLCG2, SYK, CD19, ZAP70, LYN, BLNK, and BTK (Supplementary Materials Dataset II). Additionally, SEC-MAP analysis seems feasible to study protein complexes with discrimination at subcellular localization. A few illustrative examples are depicted in Figure 5A for apoptosis, Figure 5B for STING signaling and in Figure 5C for Ibrutinib targets (BTK, LYN, BLNK, ZAP70) at multiple subcellular localizations. Among these, SEC-MAP analysis also might be feasible to determine interacting partners, such as MDM2-TP53 (Figure 4C) and/or decipher novel protein complexes by the SEC-MAP analysis (Figure S6).

3.2.3. Analysis of Specific Protein Isoforms and/or Variants by SEC-MAP

In the content of protein microarray, there are spotted antibodies targeting specific motifs/amino acid residues with post-translational modifications (PTMs) of the same proteins (see M&M sections and Supplementary Materials Dataset II). Moreover, several antibodies target the same protein (i.e., monoclonal -mAb-, polyclonal -pAb-). Hence, whether SEC-MAP analysis could use to evaluate the specificity and/or selectivity of antibodies against a particular protein, as well as to evaluate protein states (such as monomer, complexed, degraded) or to provide info about isoforms/variants of a particular protein (Table S9). Here, FOS protein could be a representative example, which is detected by one antibody in two subcellular localizations (Protocol #8: Org, Cyt), and in three subcellular localizations (Protocol #9: Mem, Org, Nuc) by a different antibody (Table S9). As proof of concept, a few

protein isoforms are highlighted (in all cases, all antibodies used are in the M&M section):
 i. 4E-BP1 (clone 53H11) Rabbit mAb (as described in the M&M) and phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (clon 236B4) Rabbit mAb. The rabbit mAb (clone 4E-BP1) allowed the protein identification in protocols #1, #4, #5, #7 (Cyt), #8 (Mem, Org and Cyt) and #9 (Mem, Org, Cyt and Nuc), while phospho-4E-BP1 (Thr37/46) is detecting the isoform only by protocol #1. ii.-STAT3 phospho-protein isoforms are detected SEC-MAP analysis by both antibodies (pAb-clone C-20-to STAT3 and p-STAT3 mAb-clone B-7-) with all the protein extraction protocols (#1 to #9). iii.-p38 isoforms: Several antibodies against phospho-isoforms of p38 (Phospho-p38 MAPK—Thr180/Tyr182-, (Rabbit mAb clone D3F9) the native form (Rabbit mAb clone 9212) detect the phosphorylated isoforms by SEC-MAP, allowing the determination of the relative abundance.

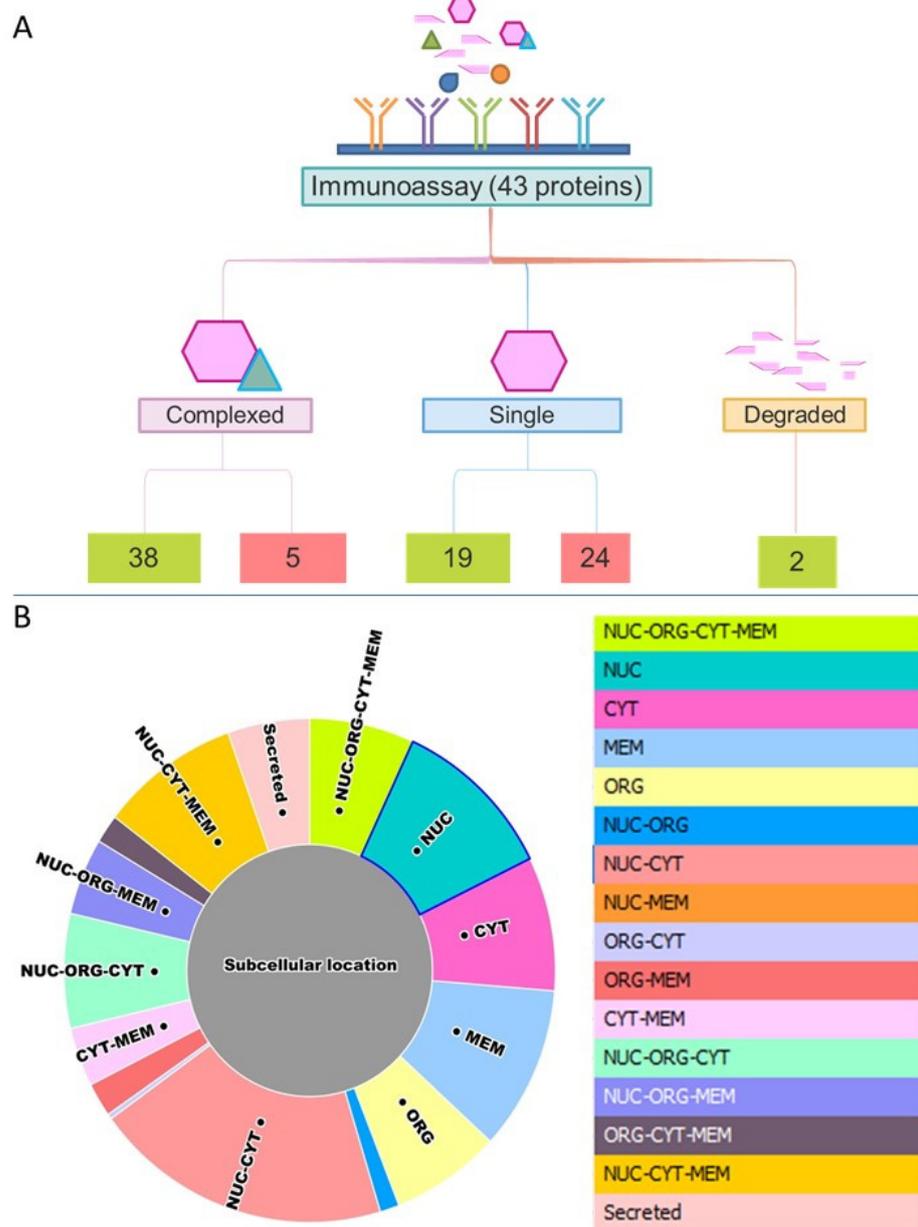


Figure 3. Summary of interest proteins selected for integration of SEC-MAP in the analysis of intracellular signaling pathways. **(A):** Schematic representation of proteins globally observed at different molecular isoforms (monomer, complexed, degraded). In green, the number of proteins detected, and in red, the number of non-detected proteins. **(B):** Summary pie chart of theoretical subcellular localization of proteins globally detected by all protein extraction protocols.

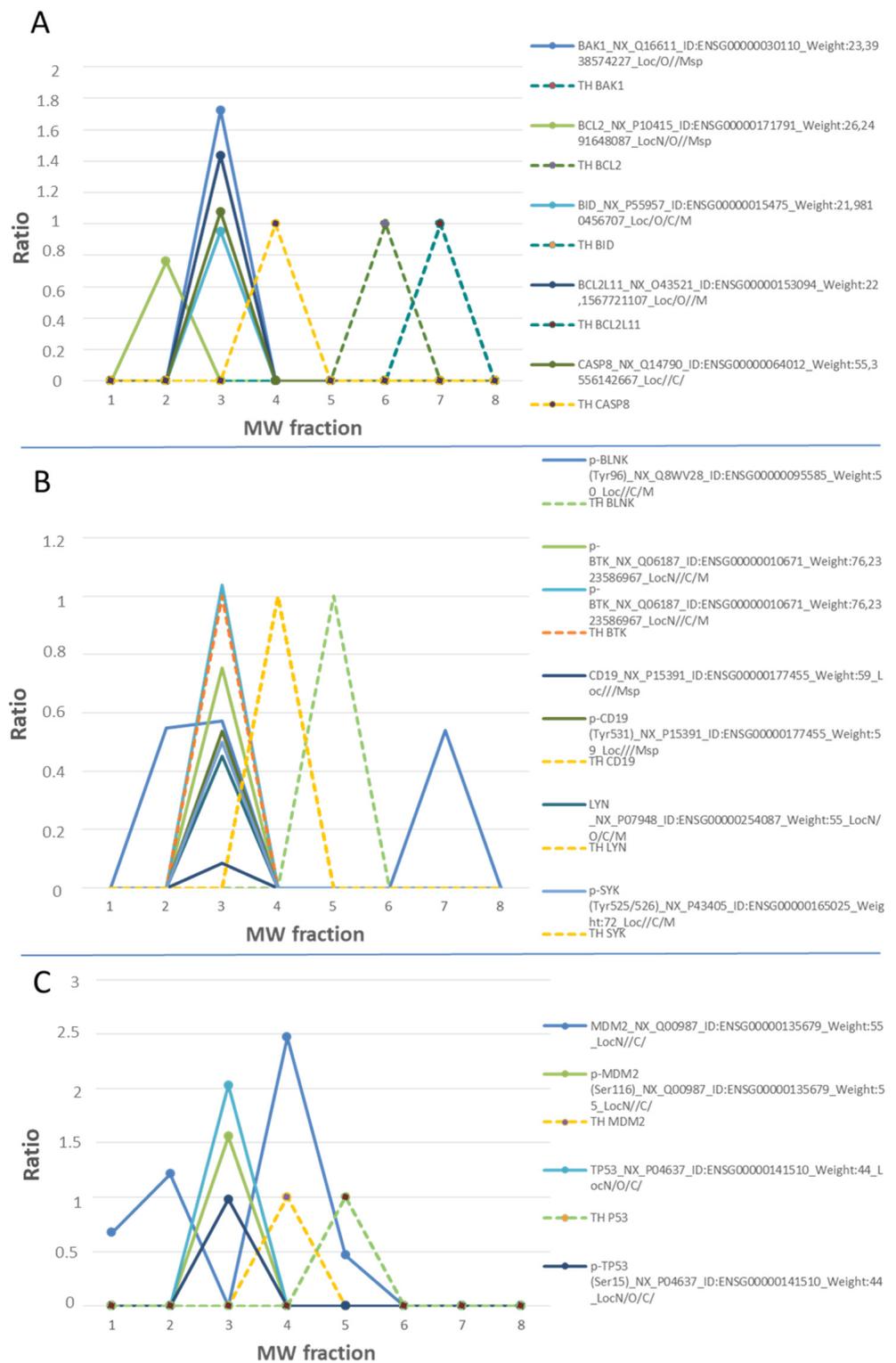


Figure 4. Multicomplex protein analysis by the SEC-MAP approach. Multiprotein complexes were detected at different protein extraction procedures. Peaks located at the same molecular weight (MW) fraction, and not found in their theoretical (TH) MW fraction, represent complexes formed by proteins when they are at a fraction above the expected one. When it is found in fractions below those expected, we speak of protein being hydrolyzed. If it is detected in theoretical fraction (dotted line), protein is found alone. (A). Proteins related to the BCL-2-BCL2L11 interaction signaling pathway. (B). Proteins related to the BTK pathway. (C). MDM2-TP53 interaction.

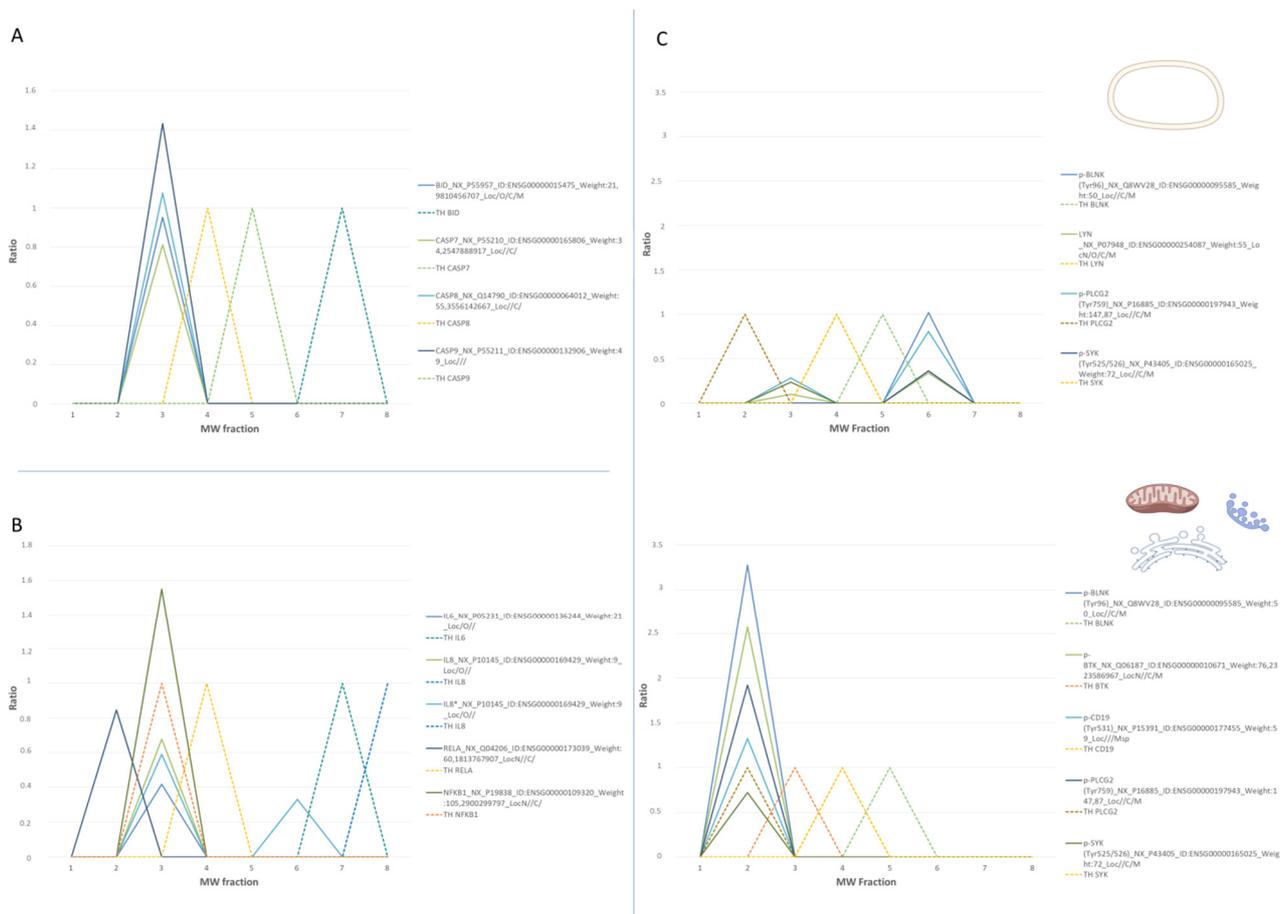


Figure 5. Multiprotein complex by SEC-MAP approach. Analysis of chosen multicomplexes involved in several cell signaling processes. (A): Proteins related to apoptosis inhibition. (B): Protein related to STING signaling. (C): Proteins related to B-cell receptor signaling in membrane and organelle subcellular localizations.

3.2.4. Orthogonal Integration of SEC-MAP with Multi-Omics Datasets (RNA-Seq & LC-MS/MS)

Regarding the results of SEC-MAP integration with RNA-seq and LC-MS/MS datasets for Ramos cell line, a pipeline for orthogonal integration of datasets has been designed (Figure 6). First, a systematic database containing the global information from SEC-MAP analysis (global proteome, multi-protein complexes, specific protein isoforms/state, etc.) (Table S5) was required. Subsequently, correlations between the protein array content, RNA-seq and LC-MS/MS data were explored. Accordingly, 162 proteins are studied by SEC-MAP, RNA-seq, and LC-MS/MS, showing a strong inter-relationship between the proteins detected by these three omics strategies. Taking into account the orthogonal integration, first as the starting point, two-by-two correlations could be reported: i. 55.90% matching proteins between SEC-MAP and LC-MS/MS characterization; ii. 50.93% matching proteins between SEC-MAP and RNA-Seq information. iii. 99.59% matching proteins characterization between RNA-Seq and LC-MS/MS (see Table S10). Furthermore, according to neXtProt release 2020.01-17, 518 identified proteins belong to PE1, 6 to PE2, and 6 to PE5 of MS/MS information only and, 5121 belongs to PE1, 3 to PE2, and 3 to PE5 corresponding to the integration of MS/MS and RNA-Seq data (Table S11).

In this study, aiming to provide an approach suitable for globally graphical visualization of the orthogonal integration of multi-omics datasets (SEC-MAP, RNA-seq, LC-MS/MS), a bioinformatics tool—named Infinicyt (<https://www.cytognos.com/infinicyt/2.0>, accessed on 30 March 2019; Cytognos SL, Salamanca, Spain)—has been successfully imple-

mented. This software tool also allowed to study a quantitative correlation between these datasets (i.e., FPKM and LFQ, for RNA-seq and LC-MS/MS respective) (Figure 7).

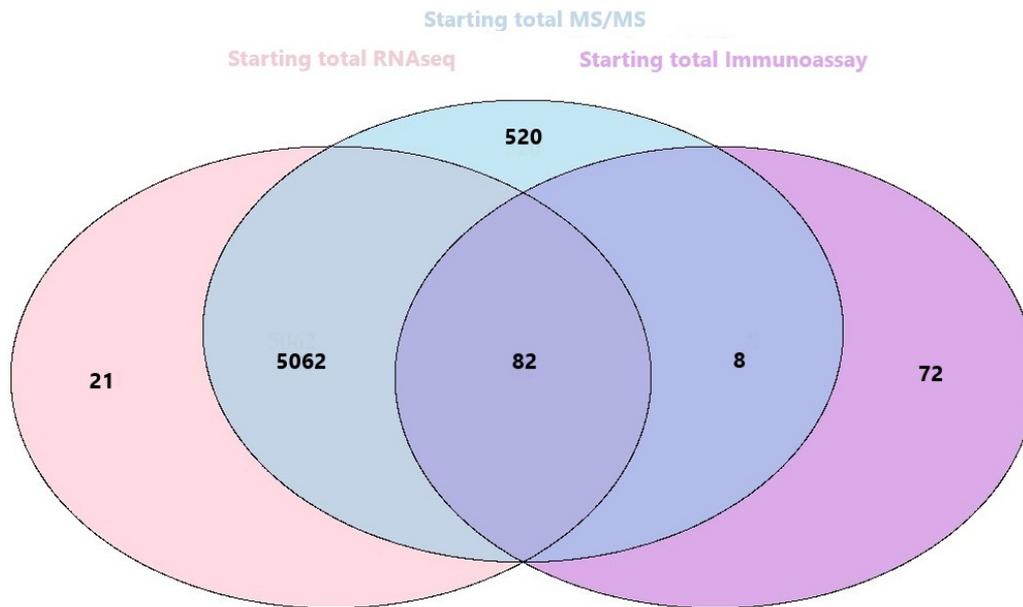


Figure 6. Venn diagram for orthogonal integration among all the datasets from SEC-MAP, LC-MS/MS, RNA-Seq (Number of proteins detected in each dataset).

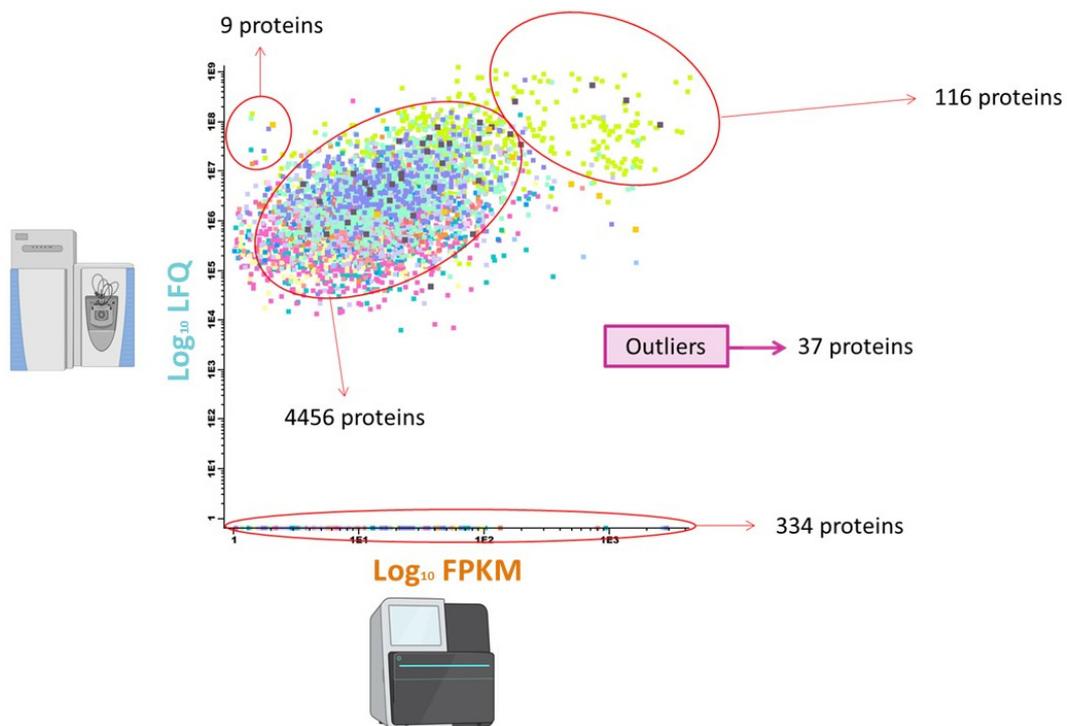


Figure 7. Dot-plot by Infinicyt 2.0 software displaying quantitative datasets for transcriptomics and LC-MS/MS characterization. Proteins/peptides are grouped according to different correlations between transcriptomics and proteomics datasets.

According to STRING and Reactome databases, it is observed that pathways related to the immune system and metabolism are significantly represented in 5 protein clusters. Metabolism of proteins and RNA pathways, cellular responses to external stimuli, transcription and DNA repair and cell cycle are represented in 4 proteins groups according to

different high/low value log [LFQ] vs. high/low values of log [FPKM]. Finally, development biology and chromatin organization have been represented in three proteins groups according to log [LFQ] and log [FPKM] values (Table S12).

Bearing in mind similar patterns in the correlation between log[LFQ] and log[FPKM], the t-SNE plots provide insights from the functional point of view (within group of proteins): i. vesicle-mediated transport display high values on both parameters (Figure S7A), ii. organelle biogenesis and maintenance pathway displays high values in both parameters (Figure S7B); iii. hemostasis, DNA replication and programmed cell death for population averages appear as outliers on the correlation (Figure S7C,D). Deepening in this analysis by adding subcellular localization, several groups are observed on t-SNE plots according to the subcellular localization (Figure S7E–I, Table S12). For example, at Cyt localization, proteins related to cell–cell communication, programmed cell death, and hemostasis displayed low log[LFQ] and progressive log[FPKM] values. About proteins with ubiquitous localization in several subcellular localizations (Cyt + Mem + Nuc + Org) is observed as a homogeneous group at the t-SNE plot (with both high values, log[LFQ] & log [FPKM]) (Table S12).

4. Discussion

The synergistic integration of multi-omics datasets is highly dependent on multiple methodological aspects, which are also critical in the design and development of an algorithm for deepening the biological knowledge of intracellular signaling pathways. In this study, a simple approach has been designed and developed for the orthogonal integration of SEC-MAP, LC-MS/MS, and RNA-seq datasets corresponding to a Ramos cell line as a model. This orthogonal integration allowed—in a particular cellular situation—to decipher protein expression, isoforms, quantification at peptide and transcript levels, protein localization, protein interactions which also could be done at multiple cellular differentiation stages and/or physiological situations; thus, it could help uncover novel insights about the cellular dynamics and response to external stimulus.

Initially, sample preparation, as protein extraction procedures, has been revealed which is critical for orthogonal integration of multi-omics because of the expected influence in relative protein abundance, protein chemistry, protein stability, protein structure, tryptic digestion, protein solubility, and PTMs. It has been shown that protein extraction procedures have to be optimized for multi-omics integration because it could be an advantage/disadvantage in multi-pronged proteomics characterization (such as LC-MS/MS and SEC-MAP). Additionally, the specificity and selectivity of immunoassays are also affected by chemical labeling for detecting antigen-antibody interaction, which may hinder the epitopes and/or alter protein structure. Therefore, it is another critical factor for immunoassay validation of findings from RNA-seq and LC-MS/MS.

Overall, the importance of protein extraction procedures for further integration of proteomics with other omics datasets has been revealed. For example, protocols #2 and #3 have urea in the lysis buffer, which decreases the efficiency of biotin labeling and subsequent SEC-MAP analysis [60]. Another consideration is the chemical formulation of lysis buffers, such as the effect of non-ionic detergents (protocols #1, #5 and #6). Here, the role of critical micelle concentration (CMC) for each detergent is important in the protein extraction efficiency obtained for protocols #5 and #6. With this, it is shown that the detergent used in protocol #1 achieves a higher yield on protein extraction in comparison with other procedures. In this regard, among all protocols studied, protocol #1 is the one that gives us the best results; while protocol #6 produces the poorest results. Regarding subcellular localization, protocol #5 seems to be optimized for membrane protein extraction; meanwhile, for subcellular localizations, protocols #8 & #9 reported similar performance and effectiveness, with slight differences in membrane subcellular localization and organelle subcellular localization; which confirms the previously reported results by our group [19].

Regarding Human Proteome Project, it is a huge effort to detect “missing proteins”; which are classified into five groups (1–5) according to protein evidence (PE) [61]; then,

protein enrichment is aligning a useful strategy to identify and detect “missing proteins” as it is shown in this study because a few proteins (reported as “missing proteins”) have been detected (mainly on group PE2 and PE5).

Recently, several studies employing SEC (in *Escherichia coli*, HEK293, osteosarcoma cells, liver human tissue and others) focused mainly on analysis of protein interactions (protein-protein, protein-metabolite, protein-small molecules), the difference between transcriptomics-proteomics levels or in combination with spatial proteomics [17,18,21,26]. In this study, SEC is combined with multiplex protein arrays (MAP) such that, not only it can identify single proteins, but also detect isoforms and protein complexes. Such use of SEC-MAP has also been reported by Kirtwodd et al., in 2013 [62]. In this study, it is observed that proteins are identified in a wide MW range by SEC-MAP; where protocol #1 seems to yield the best performance in most of the MW range studied; however, few other protocols give a better identification only for a few of the MW fractions, which might be related with the subcellular localization, presence of protein complexes, and inherent chemical properties of the proteins.

Regarding the SEC-MAP integration, many proteins (i.e., PAK1 | P1, CCNB1, CASP, among others) are successfully detected at the expected MW and the subcellular localization as their confirmed existence by transcriptomics and MS/MS datasets. There is another group of proteins that are detected at the reported subcellular localization but at different MW, such as, BLC-2, RELA, MAPK1, MDM2, TP53, BLNK, SYK, CD19, LYN, ZAP70, PLCG2, suggesting the existence of protein-protein interactions and protein complexes. Thus, this approach is amenable for studying protein interaction networks and/or intracellular signaling dynamic as confirmed previously by our group in this study by correctly identifying the protein players in the previously reported pathways in this B lymphocyte cell line (such as senescence, evading growth suppressors, survival and death pathways, immune system evasion and immunoediting) [26,63–65]. This also opens the possibility to decipher interactions on newly reported pathways such as DAMPs (damage-associated molecular patterns), which might be useful for immunotherapies on lymphoma and leukemia because of their direct relation with the immunogenic cell death (ICD). Finally, similar to previously described by Díez P. et al. [19], it has been feasible to discriminate between protein groups in particular cell signaling pathways (such as immune system, metabolism, vesicle-mediated transport, organelle biogenesis and maintenance, homeostasis, etc.), monitoring subcellular localization and multi-omics correlation.

5. Conclusions

Multi-pronged proteomics characterization is highly dependent on protein extraction procedures, being a key step for functional outcomes from detection of proteins/multi-protein complexes in samples. Furthermore, it also reveals critical orthogonal integration of multi-omics data sets (such as SEC-MAP, LC-MS/MS, RNA-seq) and also provides complementary info such as multi-protein complexes and subcellular localization. Moreover, the reported pipeline for multi-omics integration is useful for the HPP, as it systematically explores the compatibility of multi-omics data sets. Currently, the RNA-Seq technique provides us with information on the presence-absence of a particular protein of interest; meanwhile, MS/MS and SEC-MAP add data on protein localization, isoforms, and also, protein complexation status (complex-monomer-degraded). Consequently, SEC-MAP analysis seems to be a useful tool for orthogonal multi-omics integration, as it provides detailed complementary information about MW, subcellular localization, isoforms, PTMs, and protein complexes. Furthermore, SEC-MAP analysis seems feasible for determining predicted or unknown protein complexes and/or protein interactions in any sample (either from cell culture or clinical specimens).

With multi-omics orthogonal integration, it seems feasible to identify if a drug could target a protein complex of interest. It might help in the selection of drugs for a particular pathology.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom11121776/s1>. Figure S1: Comparison of efficiencies according to the extraction protein processing used. Panel A: Amount protein obtained. Panel B: SDS-PAGE 12% Coomassie blue and silver staining. Figure S2: Comparison of efficiencies in differing concentrations of biotin. Panel A: Number of spots detected for the fraction. Panel B: Number of spots not detected for fraction. Figure S3: Graphic of molecular weight markers used after performing fast protein liquid chromatography (FPLC) technique. Figure S4: Descriptive analysis of behavior for each extraction protocol. Panel A: Global number of spots detected. Panel B: Number of spots detected for each subcellular fraction by four fraction protocol. Figure S5: Test of normality for protein extraction protocols. Panel A: Protocol 1. Panel B: Protocol 4. Panel C: Protocol 5. Panel D: Protocol 6. Panel E: Protocol 7. Panel F: Protocol 8. Panel G: Protocol 9. Figure S6: Multicomplex analysis for peaks by protocol 1. Panel A: Interaction detected in Fraction 2. Panel B: Interaction detected in Fraction 3. Panel C: Interaction detected in Fraction 2 and 4. Figure S7: Functional interaction (Reactome) and t-SNE plots (TS) of Infinicyt for groups obtained after analyses by values quantitative LFQ and FPKM. Panel A: Low LFQ and Progressive FPKM in Cyt for vesicle-mediated transport. Panel B: High LFQ and FPKM in Org for Organelle biogenesis and maintenance. Panel C: Outlier with High LFQ and Medium FPKM value (Hemostasis and Extracellular matrix organization). Panel D: Outlier with High LFQ and High FPKM value (Hemostasis). Panel E: Low LFQ and Progressive FPKM in Cyt. Panel F: Low LFQ and Progressive FPKM in Mem. Panel G: Low LFQ and Progressive FPKM in Org. Panel H: Low LFQ and Progressive FPKM in Nuc & Org. Panel I: Low LFQ and Progressive FPKM in Nuc & Cyt. Panel J: Low LFQ and Progressive FPKM in Org & Cyt. Table S1: Designer of subarray printing (Antibodies and controls—green: positive controls; and yellow: negative controls-). Table S2: List of protein target included in protein microarray. Table S3: Mapping of proteins with unique peptide. Table S4: Mapping of proteins with unique peptide and the highest FPKM value. Table S5: Descriptive statistic and summary information about protein extraction protocols by immunoassay and integration with RNA-Seq and MS/MS. Table S6: Z values results of comparisons between protein extraction protocols, both globally and by molecular weight fraction. Table S7: Deep analysis about state of protein, theoretical and assay subcellular localization (MS/MS and microarray) and RNA-Seq information of selection proteins according to relevance and interesting reported in literature. Table S8: Number of proteins detected in each subcellular localization and possible combinations. Table S9: Proteins detected with different antibodies and post-translational modification (PTM) detection. Table S10: Percentage two to two relationship for MS/MS, RNA-Seq and immunoassay techniques, Table S11: Orthogonal integration and missing proteins detected. Table S12: Functional interaction (Reactome) and biological enrichment processes (KEGG) present in groups obtained after analyses and visualization in Infinicyt by values quantitative LFQ and FPKM. Supplementary Materials Dataset I: Visualization of integration information from transcriptomic, proteomic and immunoassay. Supplementary Materials Dataset II: Dataset Immunoassay, proteomic and transcriptomic data integration.

Author Contributions: Conceptualization, P.D. and M.F.; methodology, A.L.-V., J.D.L.R. and P.D.; software, Q.L. and A.O.; validation, J.D.L.R., P.J.-V. and Q.L.; formal analysis, A.L.-V., J.D.L.R., P.D. and M.F.; investigation, A.L.-V., P.D. and M.F.; data curation, A.L.-V., P.J.-V., J.D.L.R. and P.D.; writing—original draft preparation, A.L.-V.; writing—review and editing, A.L.-V. and M.F.; visualization, A.L.-V. and Q.L.; supervision, M.F.; project administration, A.O., J.D.L.R. and M.F.; funding acquisition, M.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: We are financial support from the Spanish Health Institute Carlos III (ISCIII) for the grants: FIS PI14/01538, FIS PI17/01930 and CB16/12/00400.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: MS/MS data are available via ProteomeXchange with identifier PXD003939 at EBI-EMBL.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge Fondos FEDER (EU) and Junta Castilla-León (grant SA198A12-2 and COVID-19 grant COV20EDU/00187). Fundación Solórzano FS/38-2017. The Proteomics Unit belongs to ProteoRed, PRB3-ISCIII, supported by grant PT17/0019/0023, of the PE I + D + I 2017-2020, funded by ISCIII and FEDER. A. Landeira-Viñuela is supported by VIII

Centenario-USAL PhD Program, P. Juanes-Velasco is supported by the JCYL PhD Program “JCYL Nos Impulsa” and scholarship JCYL-EDU/601/2020. P.D. is supported by JCYL-EDU/346/2013 Ph.D. scholarship.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lundberg, E.; Borner, G.H.H. Spatial proteomics: A powerful discovery tool for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 285–302. [[CrossRef](#)]
2. Wang, Z.; Deisboeck, T.S. Dynamic Targeting in Cancer Treatment. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Koplev, S.; Longden, J.; Ferkinghoff-Borg, J.; Blicher Bjerregård, M.; Cox, T.R.; Erler, J.T.; Pedersen, J.T.; Voellmy, F.; Sommer, M.O.A.; Linding, R. Dynamic Rearrangement of Cell States Detected by Systematic Screening of Sequential Anticancer Treatments. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 2784–2791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Comandante-Lou, N.; Fallahi-Sichani, M. Models of Cancer Drug Discovery and Response to Therapy. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 269–276.
5. Nussinov, R.; Jang, H.; Tsai, C.-J.; Cheng, F. Precision medicine review: Rare driver mutations and their biophysical classification. *Biophys. Rev.* **2019**, *11*, 5–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Aslam, B.; Basit, M.; Nisar, M.A.; Khurshid, M.; Rasool, M.H. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J. Chromatogr. Sci.* **2017**, *55*, 182–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Park, S.-M.; Hwang, C.Y.; Choi, J.; Joung, C.Y.; Cho, K.-H. Feedback analysis identifies a combination target for overcoming adaptive resistance to targeted cancer therapy. *Oncogene* **2020**, *39*, 3803–3820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Bhat, A.R.; Gupta, M.K.; Krithivasan, P.; Dhas, K.; Nair, J.; Reddy, R.B.; Sudheendra, H.V.; Chavan, S.; Vardhan, H.; Darsi, S.; et al. Sample preparation method considerations for integrated transcriptomic and proteomic analysis of tumors. *Proteom. Clin. Appl.* **2017**, *11*, 1600100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Buescher, J.M.; Driggers, E.M. Integration of omics: More than the sum of its parts. *Cancer Metab.* **2016**, *4*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Dimitrakopoulos, L.; Prassas, I.; Diamandis, E.P.; Charames, G.S. Onco-proteogenomics: Multi-omics level data integration for accurate phenotype prediction. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2017**, *54*, 414–432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Eicher, T.; Patt, A.; Kautto, E.; Machiraju, R.; Mathé, E.; Zhang, Y. Challenges in proteogenomics: A comparison of analysis methods with the case study of the DREAM proteogenomics sub-challenge. *BMC Bioinform.* **2019**, *20*, 669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ruggles, K.V.; Krug, K.; Wang, X.; Clauser, K.R.; Wang, J.; Payne, S.H.; Fenyö, D.; Zhang, B.; Mani, D.R. Methods, Tools and Current Perspectives in Proteogenomics. *Mol. Cell Proteom. MCP* **2017**, *16*, 959–981. [[CrossRef](#)]
13. Subbannayya, Y.; Pinto, S.M.; Gowda, H.; Prasad, T.S.K. Proteogenomics for understanding oncology: Recent advances and future prospects. *Expert Rev. Proteom.* **2016**, *13*, 297–308. [[CrossRef](#)]
14. Huh, W.-K.; Falvo, J.V.; Gerke, L.C.; Carroll, A.S.; Howson, R.W.; Weissman, J.S.; O’Shea, E.K. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **2003**, *425*, 686–691. [[CrossRef](#)]
15. Sikorski, K.; Mehta, A.; Inngjerdigen, M.; Thakor, F.; Kling, S.; Kalina, T.; Nyman, T.A.; Stensland, M.E.; Zhou, W.; de Souza, G.A.; et al. A high-throughput pipeline for validation of antibodies. *Nat. Methods* **2018**, *15*, 909–912. [[CrossRef](#)]
16. Thul, P.J.; Åkesson, L.; Wiking, M.; Mahdessian, D.; Geladaki, A.; Ait Blal, H.; Alm, T.; Asplund, A.; Björk, L.; Breckels, L.M.; et al. A subcellular map of the human proteome. *Science* **2017**, *356*, eaal3321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Piazza, I.; Kochanowski, K.; Cappelletti, V.; Fuhrer, T.; Noor, E.; Sauer, U.; Picotti, P. A Map of Protein-Metabolite Interactions Reveals Principles of Chemical Communication. *Cell* **2018**, *172*, 358–372.e23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Heusel, M.; Bludau, I.; Rosenberger, G.; Hafen, R.; Frank, M.; Banaei-Esfahani, A.; van Drogen, A.; Collins, B.C.; Gstaiger, M.; Aebersold, R. Complex-centric proteome profiling by SEC-SWATH-MS. *Mol. Syst. Biol.* **2019**, *15*, e8438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Díez, P.; Droste, C.; Décano, R.M.; González-Muñoz, M.; Ibarrola, N.; Pérez-Andrés, M.; Garin-Muga, A.; Segura, V.; Marko-Varga, G.; LaBaer, J.; et al. Integration of Proteomics and Transcriptomics Data Sets for the Analysis of a Lymphoma B-Cell Line in the Context of the Chromosome-Centric Human Proteome Project. *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 3530–3540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Wu, W.; Slåstad, H.; de la Rosa Carrillo, D.; Frey, T.; Tjønnfjord, G.; Boretti, E.; Aasheim, H.-C.; Horejsi, V.; Lund-Johansen, F. Antibody array analysis with label-based detection and resolution of protein size. *Mol. Cell. Proteom. MCP* **2009**, *8*, 245–257. [[CrossRef](#)]
21. Florinskaya, A.V.; Ershov, P.V.; Mezentsev, Y.V.; Kaluzhskiy, L.A.; Yablokov, E.O.; Buneeva, O.A.; Zgodina, V.G.; Medvedev, A.E.; Ivanov, A.S. The Analysis of Participation of Individual Proteins in the Protein Interactome Formation. *Biochem. Mosc. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* **2018**, *12*, 241–246. [[CrossRef](#)]
22. Rosenberger, G.; Heusel, M.; Bludau, I.; Collins, B.C.; Martelli, C.; Williams, E.G.; Xue, P.; Liu, Y.; Aebersold, R.; Califano, A. SECAT: Quantifying Protein Complex Dynamics across Cell States by Network-Centric Analysis of SEC-SWATH-MS Profiles. *Cell Syst.* **2020**, *11*, 589–607.e8. [[CrossRef](#)]
23. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. [[CrossRef](#)]
24. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]

25. Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85. [[CrossRef](#)]
26. Díez, P.; Ibarrola, N.; Dégano, R.M.; Lécresse, Q.; Rodríguez-Caballero, A.; Criado, I.; Nieto, W.G.; Góngora, R.; González, M.; Almeida, J.; et al. A systematic approach for peptide characterization of B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 42836–42846. [[CrossRef](#)]
27. Olsen, J.V.; de Godoy, L.M.F.; Li, G.; Macek, B.; Mortensen, P.; Pesch, R.; Makarov, A.; Lange, O.; Horning, S.; Mann, M. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol. Cell. Proteom. MCP* **2005**, *4*, 2010–2021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Eng, J.K.; Jahan, T.A.; Hoopmann, M.R. Comet: An open-source MS/MS sequence database search tool. *Proteomics* **2013**, *13*, 22–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Vaudel, M.; Barsnes, H.; Berven, F.S.; Sickmann, A.; Martens, L. SearchGUI: An open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X!Tandem searches. *Proteomics* **2011**, *11*, 996–999. [[CrossRef](#)]
30. Gaudet, P.; Michel, P.-A.; Zahn-Zabal, M.; Cusin, I.; Duek, P.D.; Evalet, O.; Gateau, A.; Gleizes, A.; Pereira, M.; Teixeira, D.; et al. The neXtProt knowledgebase on human proteins: Current status. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D764–D770. [[CrossRef](#)]
31. Vaudel, M.; Burkhardt, J.M.; Zahedi, R.P.; Oveland, E.; Berven, F.S.; Sickmann, A.; Martens, L.; Barsnes, H. PeptideShaker enables reanalysis of MS-derived proteomics data sets. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 22–24. [[CrossRef](#)]
32. Vizcaíno, J.A.; Deutsch, E.W.; Wang, R.; Csordas, A.; Reisinger, F.; Ríos, D.; Dianes, J.A.; Sun, Z.; Farrah, T.; Bandeira, N.; et al. ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 223–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Martens, L.; Hermjakob, H.; Jones, P.; Adamski, M.; Taylor, C.; States, D.; Gevaert, K.; Vandekerckhove, J.; Apweiler, R. PRIDE: The proteomics identifications database. *Proteomics* **2005**, *5*, 3537–3545. [[CrossRef](#)]
34. Díez, P.; Pérez-Andrés, M.; Bøgsted, M.; Azkargorta, M.; García-Valiente, R.; Dégano, R.M.; Blanco, E.; Mateos-Gomez, S.; Bárcena, P.; Santa Cruz, S.; et al. Dynamic Intracellular Metabolic Cell Signaling Profiles During Ag-Dependent B-Cell Differentiation. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 637832. [[CrossRef](#)]
35. Cox, J.; Hein, M.Y.; Lubner, C.A.; Paron, I.; Nagaraj, N.; Mann, M. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteom. MCP* **2014**, *13*, 2513–2526. [[CrossRef](#)]
36. Cox, J.; Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1367–1372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Bielow, C.; Mastrobuoni, G.; Kempa, S. Proteomics Quality Control: Quality Control Software for MaxQuant Results. *J. Proteome Res.* **2016**, *15*, 777–787. [[CrossRef](#)]
38. RStudio Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R. RStudio, PBC: Boston, MA, USA, 2011.
39. Schmitz, R.; Young, R.M.; Ceribelli, M.; Jhavar, S.; Xiao, W.; Zhang, M.; Wright, G.; Shaffer, A.L.; Hodson, D.J.; Buras, E.; et al. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* **2012**, *490*, 116–120. [[CrossRef](#)]
40. Leinonen, R.; Sugawara, H.; Shumway, M. International Nucleotide Sequence Database Collaboration The sequence read archive. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D19–D21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120. [[CrossRef](#)]
42. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21. [[CrossRef](#)]
43. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079. [[CrossRef](#)]
44. Trapnell, C.; Williams, B.A.; Pertea, G.; Mortazavi, A.; Kwan, G.; van Baren, M.J.; Salzberg, S.L.; Wold, B.J.; Pachter, L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 511–515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Häggmark, A.; Byström, S.; Ayoglu, B.; Qundos, U.; Uhlén, M.; Khademi, M.; Olsson, T.; Schwenk, J.M.; Nilsson, P. Antibody-based profiling of cerebrospinal fluid within multiple sclerosis. *Proteomics* **2013**, *13*, 2256–2267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Sierra-Sánchez, Á.; Garrido-Martín, D.; Lourido, L.; González-González, M.; Díez, P.; Ruiz-Romero, C.; Sjöber, R.; Droste, C.; De Las Rivas, J.; Nilsson, P.; et al. Screening and Validation of Novel Biomarkers in Osteoarticular Pathologies by Comprehensive Combination of Protein Array Technologies. *J. Proteome Res.* **2017**, *16*, 1890–1899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. González-González, M.; Bartolome, R.; Jara-Acevedo, R.; Casado-Vela, J.; Dasilva, N.; Matarraz, S.; García, J.; Alcazar, J.A.; Sayagues, J.M.; Orfao, A.; et al. Evaluation of homo- and hetero-functionally activated glass surfaces for optimized antibody arrays. *Anal. Biochem.* **2014**, *450*, 37–45. [[CrossRef](#)]
48. Durinck, S.; Spellman, P.T.; Birney, E.; Huber, W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1184–1191. [[CrossRef](#)]
49. Dennis, G.; Sherman, B.T.; Hosack, D.A.; Yang, J.; Gao, W.; Lane, H.C.; Lempicki, R.A. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* **2003**, *4*, P3. [[CrossRef](#)]
50. Fontanillo, C.; Nogales-Cadenas, R.; Pascual-Montano, A.; De las Rivas, J. Functional analysis beyond enrichment: Non-redundant reciprocal linkage of genes and biological terms. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e24289. [[CrossRef](#)]

51. Szklarczyk, D.; Gable, A.L.; Lyon, D.; Junge, A.; Wyder, S.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Doncheva, N.T.; Morris, J.H.; Bork, P.; et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D607–D613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Kanehisa, M.; Goto, S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 27–30. [[CrossRef](#)]
53. Jassal, B.; Matthews, L.; Viteri, G.; Gong, C.; Lorente, P.; Fabregat, A.; Sidiropoulos, K.; Cook, J.; Gillespie, M.; Haw, R.; et al. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D498–D503. [[CrossRef](#)]
54. Krysko, D.V.; Garg, A.D.; Kaczmarek, A.; Krysko, O.; Agostinis, P.; Vandenabeele, P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 860–875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Roh, J.S.; Sohn, D.H. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw.* **2018**, *18*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Berger, G.; Marloye, M.; Lawler, S.E. Pharmacological Modulation of the STING Pathway for Cancer Immunotherapy. *Trends Mol. Med.* **2019**, *25*, 412–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Haseeb, M.; Anwar, M.A.; Choi, S. Molecular Interactions Between Innate and Adaptive Immune Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia and Their Therapeutic Implications. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Kipps, T.J.; Stevenson, F.K.; Wu, C.J.; Croce, C.M.; Packham, G.; Wierda, W.G.; O'Brien, S.; Gribben, J.; Rai, K. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 16096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Roberts, A.W.; Davids, M.S.; Pagel, J.M.; Kahl, B.S.; Puvvada, S.D.; Gerecitano, J.F.; Kipps, T.J.; Anderson, M.A.; Brown, J.R.; Gressick, L.; et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 311–322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Hermanson, G.T. Chapter 11—(Strept)avidin–Biotin Systems. In *Bioconjugate Techniques*, 3rd ed.; Hermanson, G.T., Ed.; Academic Press: Boston, MA, USA, 2013; pp. 465–505.
61. Adhikari, S.; Nice, E.C.; Deutsch, E.W.; Lane, L.; Omenn, G.S.; Pennington, S.R.; Paik, Y.-K.; Overall, C.M.; Corrales, F.J.; Cristea, I.M.; et al. A high-stringency blueprint of the human proteome. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5301. [[CrossRef](#)]
62. Kirkwood, K.J.; Ahmad, Y.; Larance, M.; Lamond, A.I. Characterization of native protein complexes and protein isoform variation using size-fractionation-based quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteom. MCP* **2013**, *12*, 3851–3873. [[CrossRef](#)]
63. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)]
64. Kim, T.R.; Jeong, H.-H.; Sohn, K.-A. Topological integration of RPPA proteomic data with multi-omics data for survival prediction in breast cancer via pathway activity inference. *BMC Med. Genom.* **2019**, *12* (Suppl. 5), 94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Peng, W.; Zhu, R.; Zhou, S.; Mirzaei, P.; Mechref, Y. Integrated Transcriptomics, Proteomics, and Glycomics Reveals the Association between Up-regulation of Sialylated N-glycans/Integrin and Breast Cancer Brain Metastasis. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 17361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Anexo V: Landeira Viñuela et al. 2022.



OPEN ACCESS

EDITED BY
 Antonio Riva,
 Foundation for Liver Research,
 United Kingdom

REVIEWED BY
 Gianluca Gaidano,
 Università degli Studi del Piemonte
 Orientale, Italy
 Stefano Mangiola,
 The University of Melbourne, Australia

*CORRESPONDENCE
 Manuel Fuentes
 mfuentes@usal.es

SPECIALTY SECTION
 This article was submitted to
 Immunological Tolerance
 and Regulation,
 a section of the journal
 Frontiers in Immunology

RECEIVED 10 June 2022
 ACCEPTED 24 August 2022
 PUBLISHED 28 September 2022

CITATION
 Landeira-Viñuela A, Arias-Hidalgo C,
 Juanes-Velasco P, Alcoceba M,
 Navarro-Bailón A, Pedreira CE,
 Lecrevisse O, Díaz-Muñoz L,
 Sánchez-Santos JM, Hernández Á-P,
 García-Vaquero ML, Góngora R,
 De Las Rivas J, González M, Orfao A
 and Fuentes M (2022) Unravelling
 soluble immune checkpoints in
 chronic lymphocytic leukemia:
 Physiological immunomodulators or
 immune dysfunction.
Front. Immunol. 13:965905.
 doi: 10.3389/fimmu.2022.965905

COPYRIGHT
 © 2022 Landeira-Viñuela, Arias-Hidalgo,
 Juanes-Velasco, Alcoceba,
 Navarro-Bailón, Pedreira, Lecrevisse,
 Díaz-Muñoz, Sánchez-Santos,
 Hernández, García-Vaquero, Góngora,
 De Las Rivas, González, Orfao and
 Fuentes. This is an open-access article
 distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License
 \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
 reproduction in other forums is
 permitted, provided the original
 author(s) and the copyright owner(s)
 are credited and that the original
 publication in this journal is cited, in
 accordance with accepted academic
 practice. No use, distribution or
 reproduction is permitted which does
 not comply with these terms.

Unravelling soluble immune checkpoints in chronic lymphocytic leukemia: Physiological immunomodulators or immune dysfunction

Alicia Landeira-Viñuela¹, Carlota Arias-Hidalgo¹,
 Pablo Juanes-Velasco¹, Miguel Alcoceba²,
 Almudena Navarro-Bailón², Carlos Eduardo Pedreira³,
 Quentin Lecrevisse¹, Laura Díaz-Muñoz¹,
 José Manuel Sánchez-Santos⁴, Ángela-Patricia Hernández^{1,5},
 Marina L. García-Vaquero¹, Rafael Góngora¹,
 Javier De Las Rivas⁶, Marcos González²,
 Alberto Orfao¹ and Manuel Fuentes^{1,7*}

¹Department of Medicine and General Service of Cytometry, Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer (CIBERONC)- CB16/12/00400, Cancer Research Centre-Instituto Universitario de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Universidad de Salamanca (CSIC-USAL), Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain, ²Department of Hematology, University Hospital of Salamanca, Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer (CIBERONC)- CB16/12/00233, Center Research-Centre Instituto Universitario de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC) Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Universidad de Salamanca, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (CSIC-USAL, IBSAL), Salamanca, Spain, ³Systems and Computing Department Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia-Programa de Engenharia de Sistemas e Computação (COPPE-PESC), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil, ⁴Statistics Department, University of Salamanca, Salamanca, Spain, ⁵Department of Pharmaceutical Sciences, Organic Chemistry Section, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain, ⁶Bioinformatics and Functional Genomics Group, Cancer Research Center Instituto Universitario de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad de Salamanca (CIC-IBMCC, CSIC/USAL), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and University of Salamanca (USAL), Salamanca, Spain, ⁷Proteomics Unit, Cancer Research Centre-IBMCC, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), University of Salamanca-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Salamanca, Spain

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a lymphoid neoplasm characterized by the accumulation of mature B cells. The diagnosis is established by the detection of monoclonal B lymphocytes in peripheral blood, even in early stages [monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL^{hi})], and its clinical course is highly heterogeneous. In fact, there are well-characterized multiple prognostic factors that are also related to the observed genetic heterogeneity, such as immunoglobulin heavy chain variable region (IGHV) mutational status, del17p, and TP53 mutations, among others. Moreover, a dysregulation of the immune system (innate and adaptive immunity) has been observed in CLL patients, with



OPEN ACCESS

EDITED BY

Antonio Riva,
Foundation for Liver Research,
United Kingdom

REVIEWED BY

Gianluca Gaidano,
Università degli Studi del Piemonte
Orientale, Italy
Stefano Mangiola,
The University of Melbourne, Australia

*CORRESPONDENCE

Manuel Fuentes
mfuentes@usal.es

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Immunological Tolerance
and Regulation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 10 June 2022

ACCEPTED 24 August 2022

PUBLISHED 28 September 2022

CITATION

Landeira-Viñuela A, Arias-Hidalgo C,
Juanes-Velasco P, Alcoceba M,
Navarro-Bailón A, Pedreira CE,
Lecrevisse Q, Díaz-Muñoz L,
Sánchez-Santos JM, Hernández Á-P,
García-Vaquero ML, Góngora R,
De Las Rivas J, González M, Orfao A
and Fuentes M (2022) Unravelling
soluble immune checkpoints in
chronic lymphocytic leukemia:
Physiological immunomodulators or
immune dysfunction.
Front. Immunol. 13:965905.
doi: 10.3389/fimmu.2022.965905

COPYRIGHT

© 2022 Landeira-Viñuela, Arias-Hidalgo,
Juanes-Velasco, Alcoceba,
Navarro-Bailón, Pedreira, Lecrevisse,
Díaz-Muñoz, Sánchez-Santos,
Hernández, García-Vaquero, Góngora,
De Las Rivas, González, Orfao and
Fuentes. This is an open-access article
distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

Unravelling soluble immune checkpoints in chronic lymphocytic leukemia: Physiological immunomodulators or immune dysfunction

Alicia Landeira-Viñuela¹, Carlota Arias-Hidalgo¹,
Pablo Juanes-Velasco¹, Miguel Alcoceba²,
Almudena Navarro-Bailón², Carlos Eduardo Pedreira³,
Quentin Lecrevisse¹, Laura Díaz-Muñoz¹,
José Manuel Sánchez-Santos⁴, Ángela-Patricia Hernández^{1,5},
Marina L. García-Vaquero¹, Rafael Góngora¹,
Javier De Las Rivas⁶, Marcos González²,
Alberto Orfao¹ and Manuel Fuentes^{1,7*}

¹Department of Medicine and General Service of Cytometry, Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer (CIBERONC)- CB16/12/00400, Cancer Research Centre-Instituto Universitario de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Universidad de Salamanca (CSIC-USAL), Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain, ²Department of Hematology, University Hospital of Salamanca, Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer (CIBERONC)- CB16/12/00233, Center Research-Centre Instituto Universitario de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC) Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad de Salamanca, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (CSIC-USAL, IBSAL), Salamanca, Spain, ³Systems and Computing Department Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia-Programa de Engenharia de Sistemas e Computação (COPPE-PESC), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil, ⁴Statistics Department, University of Salamanca, Salamanca, Spain, ⁵Department of Pharmaceutical Sciences, Organic Chemistry Section, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain, ⁶Bioinformatics and Functional Genomics Group, Cancer Research Center Instituto Universitario de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad de Salamanca (CIC-IBMCC, CSIC/USAL), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and University of Salamanca (USAL), Salamanca, Spain, ⁷Proteomics Unit, Cancer Research Centre-IBMCC, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), University of Salamanca-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Salamanca, Spain

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a lymphoid neoplasm characterized by the accumulation of mature B cells. The diagnosis is established by the detection of monoclonal B lymphocytes in peripheral blood, even in early stages [monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL^{hi})], and its clinical course is highly heterogeneous. In fact, there are well-characterized multiple prognostic factors that are also related to the observed genetic heterogeneity, such as immunoglobulin heavy chain variable region (IGHV) mutational status, del17p, and *TP53* mutations, among others. Moreover, a dysregulation of the immune system (innate and adaptive immunity) has been observed in CLL patients, with

strong impact on immune surveillance and consequently on the onset, evolution, and therapy response. In addition, the tumor microenvironment is highly complex and heterogeneous (i.e., matrix, fibroblast, endothelial cells, and immune cells), playing a critical role in the evolution of CLL. In this study, a quantitative profile of 103 proteins (cytokines, chemokines, growth/regulatory factors, immune checkpoints, and soluble receptors) in 67 serum samples (57 CLL and 10 MBL^{hi}) has been systematically evaluated. Also, differential profiles of soluble immune factors that discriminate between MBL^{hi} and CLL (sCD47, sCD27, sTIMD-4, sIL-2R, and sULBP-1), disease progression (sCD48, sCD27, sArginase-1, sLAG-3, IL-4, and sIL-2R), or among profiles correlated with other prognostic factors, such as IGHV mutational status (CXCL11/I-TAC, CXCL10/IP-10, sHEVM, and sLAG-3), were deciphered. These results pave the way to explore the role of soluble immune checkpoints as a promising source of biomarkers in CLL, to provide novel insights into the immune suppression process and/or dysfunction, mostly on T cells, in combination with cellular balance disruption and microenvironment polarization leading to tumor escape.

KEYWORDS

soluble immune checkpoints, cytokines profiles, cellular microenvironment, chronic lymphocytic leukaemia (CLL), immune dysfunction

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is one of the most common leukemias in Western countries in adulthood (1). It is characterized by a progressive accumulation of mature B cells of the following phenotypes: CD5⁺, CD19⁺, and CD23⁺. These cells show low levels of surface immunoglobulins (Ig M and Ig D) and clonal expansion in peripheral and secondary lymphoid organs and bone marrow, which are immunologically incompetent (1–3).

Diagnosis of the disease is established by the detection of monoclonal B lymphocytes (B cells) in peripheral blood ($\geq 5 \times 10^9/L$), where there is a precursor stage, termed monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL^{hi}), in which there is a detection of $< 5 \times 10^9/L$ clonal B cells with CLL phenotype and absence of CLL-related signs or symptoms (4). The clinical course of CLL is highly heterogeneous; in fact, some patients have stable disease without any treatment, while other patients are suffering from an aggressive form, with relapses or transformations (Richter transformation—a type of non-Hodgkin lymphoma called fast-growing diffuse large B-cell lymphoma), and who need early treatment (5, 6). Relevant prognostic biomarkers for CLL include age, immunoglobulin heavy chain variable region mutational status (IGHV—mutated or unmutated), cytogenetic profiles (del17p, del11q, trisomy 12, or del13q) and gene mutations (*TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *ATM*, and *MYD88*, among others). Among all of them, the following biomarkers are associated with good prognosis: age (<65 years), mutated

IGHV, del13q, and mutated MYD88. On the other hand, the following are associated with poor prognosis: unmutated IGHV, del17p, del11q, mutations on *NOTCH1*, *SF3B1*, *TP53*, and *ATM*. Currently, the therapeutic algorithm used to establish the type of treatment is based on IGHV mutational status, *TP53* mutations, and del17p as key prognostic biomarkers (7, 8).

CLL is characterized by a strong correlation with an intense alteration of the immune system (innate and adaptive response) with a strong impact on immune surveillance, which is interconnected and highly relevant in onset, evolution and therapeutic response it has been reported altered immunological functions (1, 9). In this regard, multiple studies have analysed the role of T-cells (Th1, Th2 and Tregs), nurse-like cells, dendritic cells, or bone marrow stromal cells in tumor immune surveillance and tumor pathogenesis (2, 10).

Many alterations in the balance of immunomodulators and soluble immune factors could support the growth of the leukemic clone. Some biomolecules (i.e., cytokines, chemokines, and immune checkpoints) have been reported to affect the life of B-CLL cells *in vivo*, by both stimulation of growth and defense against programmed cell death (1, 10, 11).

Also, the importance of the tumor microenvironment (TME) in the immune suppression and CLL development is becoming more relevant (12). It has been observed that B-CLL cells when cultured *in vivo*, without the presence of other cell types, exhibit spontaneous death; this action is inhibited when cytokines and accessory cells are presented. This confirms the

complexity of the intercellular and intermolecular interactions to which these tumor cells are exposed (1, 4, 7). These include microenvironmental compartments (lymph nodes and bone marrow) where B-CLL cells receive proliferative and survival signals. In these niches, B-CLL cells establish close and intimate interactions with the matrix and multiple cell types (i.e., fibroblasts, immune response cells, and endothelial cells), generating a bidirectional network that ensures contact through effector molecules that can be expressed or secreted (adhesion molecules, cell surface ligands, chemokines, cytokines, and receptors, among others). This leads to the manipulation and alteration of cytokine balance of the microenvironment by B-CLL cells, enabling disease development and progression, as well as drug resistance (2, 4, 5, 7, 10, 13).

Moreover, B-CLL cells acquire the capacity to evade the immune response, taking advantage of immune checkpoint pathways due to increased levels of inhibitory proteins such as PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, and CD47, and are responsible for modulating the activity of T and NK cells by playing a negative role in their activation. In addition, the B-CLL cells themselves act as antigen-presenting cells, but in this case, they reduce the surface expression of HLA molecules, which allows them to be weakly immunogenic (12, 14, 15). Also, several studies report that B-CLL cells express signals to inhibit phagocytosis capacity of the macrophages. In fact, high levels of antiphagocytic molecules like PD-L1, major histocompatibility complex I (MHC-I), CD24, and CD47 allow the inhibition of macrophage action and the breaking of immune homeostasis, which leads to the persistence of tumoral cells (16, 17).

Currently, it is well-known that immune checkpoints have non-redundant functions, although the same checkpoint is susceptible to several ligands. Hence, depending on the type of binding, it can have positive or negative regulation on the lymphocytes (15, 18). In addition to immune checkpoints, it is important to consider the co-existence with cytokines, which can have a pleiotropic effect and redundancy of functions (15, 19). Bearing this in mind, in this study, 103 proteins' soluble isoforms (cytokines, chemokines, growth/regulatory factors, immune checkpoints, and soluble receptors) in plasma from CLL patients were simultaneously analyzed at different stages of the disease and at the pre-stage (MBL^{hi}) to decipher profiles related to TME, immune dysfunction, and disease prognosis.

Materials and methods

Patients

Sixty-seven plasma samples from 57 CLL diagnostic adults and 10 MBL^{hi} diagnostic adults were collected between May 2018 and October 2020 (29 women and 38 men, median age of 70 years, ranging from 36 to 91 years) (Table 1 and Supplementary Table 1). The diagnosis was made according to

the National CLL Guidelines of the Spanish CLL Group (GELLC) based on the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (iwCLL) (20). Staging was performed according to Binet and Rai criteria (21, 22). Informed consent was given by each individual before entering the study, and approved by the local ethics committee of the University Hospital of Salamanca (HUS, Salamanca, Spain). In all cases, peripheral blood (PB) samples (10 ml/case) were obtained in EDTA-coated tubes. Immediately after collection, PB samples were centrifuged to 800 g for 10 min at RT, and the plasma was stored at -80°C until analysis.

Sample processing

One milliliter of each plasma sample was defrosted on ice and centrifuged for 5 min to 2000 g. One hundred microliters of each sample was aliquoted into 96-well polypropylene PCR microplates (Axygen, EE.UU.). Aliquots in 96-well plates were stored at -80°C until use.

Immune monitoring

In this study, all serum samples have been analyzed by use of Luminex technology. All Luminex kits (Luminex Inc, EE.UU.) used for this study are described in detail in Table 2.

The Luminex system used microspheres or a bead set marker with different ratios of two different fluorophores, conjugated with monoclonal antibodies specific for different cytokines, chemokines, immune checkpoints, growth/regulatory factors, and soluble receptors. In the assay, once the protein of interest is bound, it is incubated with a secondary detection antibody specific for the molecule of interest. The color-coded beads are read on a MAGPIX[®] system (Luminex Corporation, EE.UU.), which has two lasers, one that can identify the bead, and thus the protein of interest, and one that can detect the quantity of the detection agent on the bead, and thus the quantity of the soluble protein of interest (i.e., cytokine, chemokine, and soluble immune checkpoints). In all the analysis, the MAGPIX[®] reproducibility has been evaluated by calibration and verification reagents as described by the manufactures (MPXIVD-CAL-K25 and MPXIVD-PVER-K25, respectively). In addition, a standard curve has been added to the plate in duplicate for each experiment. Following the generation of a five-parameter logistic curve, the standard recovery was calculated using the following equation: (observed concentration/expected concentration) \times 100. A recovery range between 70% and 130% is recommended by the manufacturer. Any sample that fell on an area of the curve that was outside these ranges was not considered accurate. A positive sample is considered if it was above the limits of detection as determined by the manufacturer descriptions.

TABLE 1 Clinical and biological characteristics of patient cohort.

Clinical Information		Frequency (n)	Percentage (%)
Gender	Female	29	43.3
	Male	38	56.7
Age	≤65	24	35.8
	>65	43	64.2
Diagnosis	MBL ^{hi}	10	14.9
	CLL	57	85.1
CLL status	Stable/constant	42	73.7
	Progression	15	26.3
Binet stage	A	54	80.6
	B	6	9
	C	7	10.4
Rai stage	0	45	67.2
	I	5	7.5
	II	10	14.9
	III	1	1.5
	IV	6	9
Treatment status	Previously to 1st line	9	60
	Time from 1st line	5	33.3
IGHV gene status	Mutated	45	67.2
	Unmutated	22	32.8
Cytogenetic	Normal	24	35.8
	Abnormal	43	64.2
Total		67	100

Cytokines, chemokines, and growth factor profiles in serum

Here, the Luminex kit used is “Human Monitoring 65-plex” ProcartaPlex Panel for MAGPIX[®] (EPX650-16500-091). All the serum samples were incubated in a 96-well Solid Polystyrene Microplate (Corning[®], EE.UU.), and during the washing process, a magnetic 96-well separator (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) was used following the manufacturer’s instructions. The acquisition was performed on MAGPIX[®] Instrument and xMAP[®] component software v. 4.2. All experiments were performed by the same operator according to the manufacturer’s instructions.

Soluble immune checkpoint profiles in serum

These studies were performed with the following Luminex kits according to the manufacturer’s instructions: Human Immuno-Oncology Checkpoint marker Panel 1 (EPX14A-15803-901), Human Immuno-Oncology Checkpoint marker Panel 2 (EPX140-15815-901), and Human Immuno-Oncology Checkpoint marker Panel 3 (EPX-100-1582-901). All the serum samples were incubated in a 96-well Solid Polystyrene Microplate (Corning[®], EE.UU.), and during the washing process, a magnetic 96-well separator (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) was used following the manufacturer’s instructions. The acquisition was performed on MAGPIX[®] Instrument and xMAP[®] component

software v. 4.2. All experiments were performed by the same operator according to the manufacturer’s instructions.

Quantitative analysis

For each protein (contained in Table 2), the concentration (pg/ml) was determined by a five-parameter logistic (5PL) curve-fitting algorithm, which was used for concentration data and whose equation is as follows:

$$y = a + \frac{b - a}{\left(1 + \left(\frac{x}{c}\right)^d\right)^f}$$

where a , b , c , d , and f are constant coefficients, y is the net median fluorescence intensity, and x is the concentration in pg/ml. In all cases, xPONENT[®] software for Luminex instrumentation was used for data analysis.

Data and biostatistical analysis

For values lower than the limit of detection, the same methodology as Dong et al. (23) was used. Values below the limit of detection were substituted by the 10% of the minimum value for each analyte. All concentration values (pg/ml) were converted to log₁₀ for further analysis.

TABLE 2 List of soluble immune factors in the study.

Group	Target	Assay	UniProt ID	Gene	Symbol protein
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P09919	CSF3	G-CSF
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P04141	CSF2	GM-CSF
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P09341	CXCL1	CXCL1/Gro α
1	Growth/regulatory factor	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P14210	HGF	HGF
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P48551	IFNAR2	IFN α
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P01579	IFNG	IFN γ
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P01583	IL1A	IL-1 α
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P01584	IL1B	IL-1 β
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P60568	IL2	IL-2
1	Soluble receptor	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P31785	IL2RG	sIL-2R
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P08700	IL3	IL-3
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P05112	IL4	IL-4
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P05113	IL5	IL-5
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P05231	IL6	IL-6
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P13232	IL7	IL-7
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P10145	CXCL8	IL-8
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P15248	IL9	IL-9
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P22301	IL10	IL-10
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P29460/P29459	IL12 β /IL12 α	IL-12p70
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P35225	IL13	IL-13
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P40933	IL15	IL-15
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	Q14005	IL16	IL-16
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	Q16552	IL17A	IL-17A
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	Q14116	IL18	IL-18
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	Q9NYY1	IL20	IL-20
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	Q9HBE4	IL21	IL-21
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	Q9GZX6	IL22	IL-22
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	Q9NPF7	IL23A	IL-23
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	Q8NEV9	IL27	IL-27
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	Q6EBC2	IL31	IL-31
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P02778	CXCL10	CXCL10/IP-10
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	O14625	CXCL11	CXCL11/I-TAC
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P15018	LIF	LIF
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P13500	CCL2	CCL2/MCP-1
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P80075	CCL8	CCL8/MCP-2
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P80098	CCL7	CCL7/MCP-3
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P09603	CSF1	M-CSF
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	O00626	CCL22	CCL22/MDC
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P14174	MIF	MIF
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	Q07325	CXCL9	CXCL9/MIG
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P10147	CCL3	CCL3/MIP-1 α
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P13236	CCL4	CCL4/MIP-1 β
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P78556	CCL20	CCL20/MIP-3 α
1	Growth/regulatory factor	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P03956	MMP1	MMP-1
1	Growth/regulatory factor	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P21583	KITLG	SCF
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P48061	CXCL12	CXCL12/SDF-1 α
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P01375	TNF	TNF- α
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P01374	LTA	TNF- β

(Continued)

TABLE 2 Continued

Group	Target	Assay	UniProt ID	Gene	Symbol protein
1	Soluble receptor	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P20333	TNFRSF1B	sTNF-R2
1	Soluble receptor	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	O14798	TNFRSF10C	sTRAIL
1	Cytokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	Q969D9	TSLP	TSLP
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	O43927	CXCL13	CXCL13/BLC
1	Growth/regulatory factor	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P01138	NGF	β -NGF
1	Soluble receptor	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P28908	TNFRSF8	sCD30
1	Soluble receptor	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P29965	CD40LG	sCD40L
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P42830	CXCL5	CXCL5/ENA-78
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P51671	CCL11	CCL11/Eotaxin
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	O00175	CCL24	CCL24/Eotaxin-2
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	Q9Y258	CCL26	CCL26/Eotaxin-3
1	Growth/regulatory factor	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P09038	FGF2	FGF-2
1	Chemokine	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P78423	CX3CL1	CX3CL1/Fractalkine
1	Growth/regulatory factor	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	P15692	VEGFA	VEGF-A
1	Soluble receptor	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	O75888	TNFSF13	sAPRIL
1	Soluble receptor	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	Q9Y275	TNFSF13B	sBAFF/sBLYS
1	Soluble receptor	Human Immune Monitoring 65-plex ProcartaPlex Panel for MAGPIX	O43508	TNFSF12	sTWEAK
2	I.Check LT	Human Immuno-Oncology Checkpoint Marker Panel	Q9Y5U5	TNFRSF18	sGITR
2	I.Check LT	Human Immuno-Oncology Checkpoint Marker Panel	O43557	TNFSF14	sHVEM
2	I.Check LT	Human Immuno-Oncology Checkpoint Marker Panel	P10747	CD28	sCD28
2	I.Check LT	Human Immuno-Oncology Checkpoint Marker Panel	P33681	CD80	sCD80/sB7-1
2	I.Check LT	Human Immuno-Oncology Checkpoint Marker Panel	Q07011	TNFRSF9	s4-1BB/sCD137
2	I.Check LT	Human Immuno-Oncology Checkpoint Marker Panel	P26842	CD27	sCD27
2	I.Check LT	Human Immuno-Oncology Checkpoint Marker Panel	P16410	CTLA4	sCD152/sCTLA4
2	I.Check LT	Human Immuno-Oncology Checkpoint Marker Panel	Q15116	PDCD1	sPD1
2	I.Check LT	Human Immuno-Oncology Checkpoint Marker Panel	Q9NZQ7	CD274	sPD-L1
2	I.Check LT	Human Immuno-Oncology Checkpoint Marker Panel	Q9BQ51	PDCD1LG2	sPD-L2
2	I.Check LT	Human Immuno-Oncology Checkpoint Marker Panel	P14902	IDO1	sIDO
2	I.Check LT	Human Immuno-Oncology Checkpoint Marker Panel	Q7Z6A9	BTLA	sBTLA
2	I.Check LT	Human Immuno-Oncology Checkpoint Marker Panel	P18627	LAG-3	sLAG-3
2	I.Check LT	Human Immuno-Oncology Checkpoint Marker Panel	Q8TDQ0	HAVCR2	sTIM-3
2	I.Check LT	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 3	P23510	TNFSF4	sCD134/sOX40
2	I.Check LT	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 3	Q5ZPR3	CD276	sCD276/sB7-H3
2	I.Check LT	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 3	Q08722	CD47	sCD47/sIAP
2	I.Check LT	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 3	P09326	CD48	sCD48/sBLAST-1
2	I.Check LT	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 3	O00182	LGALS9	sGalectin-9
2	I.Check LT	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 3	O75144	ICOSLG	sICOS Ligand/sB7-H2
2	I.Check LT	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 3	Q96H15	TIMD4	sTIMD-4
2	I.Check LT	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 3	Q9H7M9	VSIR	sVISTA/sB7-H5
3	I.Check NK	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 2	Q29983	MICA	sMICA
3	I.Check NK	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 2	Q29980	MICB	sMICB
3	I.Check NK	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 2	Q9BZM6	ULBP1	sULBP-1
3	I.Check NK	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 2	Q9BZM4	ULBP3	sULBP-3
3	I.Check NK	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 2	Q8TD07	RAET1E	sULBP-4
3	I.Check NK	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 2	P40200	CD96	sCD96/sTactile
3	I.Check NK	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 2	P15151	PVR	sCD155/sPVR
3	I.Check NK	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 2	Q92692	NECTIN2	sCD112/sNectin-2
3	I.Check NK	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 2	P21589	NT5E	sCD73/sNT5E

(Continued)

TABLE 2 Continued

Group	Target	Assay	UniProt ID	Gene	Symbol protein
3	I.Check NK	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 2	P05089	ARG1	sArginase-1
3	I.Check NK	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 2	Q9Y286	SIGLEC7	sSiglec-7
3	I.Check NK	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 2	Q9Y336	SIGLEC9	sSiglec-9
3	I.Check NK	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 2	P14222	PRF1	sPerforin
3	I.Check NK	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 2	P12830	CDH1	sE-Cadherin
3	I.Check NK	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 3	Q68D85	NCR3LG1	sB7-H6
3	I.Check NK	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 3	P05109	S100A8	sS100A8
3	I.Check NK	ProcartaPlex Human Immuno-Oncology Checkpoint Panel 3	P06702	S100A9	sS100A9

I.Check is immune checkpoint.

For statistical analysis, the samples were pooled according to the clinical characteristics of the patients (Figure 1).

The conventional statistical analyses were made with the software R v. 4.1 under RStudio v. 2022.02.0. The normality of the data was studied with the Shapiro–Wilk normality test. Due to the absence of normality of some variables, the correlation between the proteins was carried out using Spearman's correlation. The homoscedasticity between categories of factor variables was verified with the Fligner–Killeen test and the Bartlett test. According to whether the variables were normal, heteroscedastic, or their possible combinations, the search for significant differences between categories was done with the *t*-test or Wilcoxon–Mann–Whitney test (for two categories) and ANOVA or Kruskal–Wallis (for more than two categories). The *post-hoc* tests used were Tukey, *t*-test, or Wilcoxon depending on the corresponding global test of significant differences. A significance level of 5% was used in all statistical tests (Supplementary Figure 1).

In addition, a linear model (based on the limma statistical framework) including the six major covariates (diagnosis, disease status, treatment, IGHV mutational status, age, and sex) was generated to analyze significant differences in protein abundance between the 67 analyzed samples (design matrix: ~ 0 + groups + IGHV mutational status+ age + sex, soluble protein) (24). Pairwise comparisons (MBL vs. CLL; c-CLL vs. p-CLL; c-CLL vs. CLL-PFT; c-CLL vs. CLL-TFT) returned 88, 84, and 64 proteins with significant differences at least in contrast [adjusted *p*-values < 0.1, 0.05, and 0.01, Benjamini–Hochberg (BH) correction for multiple testing].

Representation groups were made with GraphPad Prism Software v. 8.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, EE.UU.) and Infinicyt™ 2.0.5 (Cytognos SL, Salamanca, Spain). Pathways and functional enrichment were made using Reactome (<https://reactome.org>) (25).

A quantitative methodology, based on the maximum relevance minimum redundancy (mRMR) scheme (26, 27), was used to rank the proteins by relevance. To make the results more robust, we repeated the mRMR procedure with 1,000 different sets each consisting of a subset with 80% of the available patients selected at random. Subsequently, for each protein, we counted

the number of times the proteins belong to the top 5 or top 20, and ranked them using a score based on this information.

Several decision tree models (28, 29) were used to classify (i) monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL^{hi}) and chronic lymphocytic leukemia stable/constant (c-CLL) or progression (p-CLL), and depending on the treatment line, (ii) the CLL group prior to first-line treatment (CLL-PFT) and another group after first-line treatment (CLL-TFT), and (iii) IGHV mutational status (mutated and unmutated). These decision tree models were carried out based on (i) the top 5 soluble immune factors considered with the mRMR analysis, (ii) proteins with significant differences after conventional statistical analysis, and (iii) the coincident ones obtained with significant differences with the linear model. These results were expressed as confusion matrices for each run, where the out-of-sample error was estimated using k-fold cross-validation (30).

Results

Profiling immune soluble factors according to diagnostics stage (MBL^{hi} vs. CLL vs. Stable/constant CLL vs. CLL in progression)

In Table 1, the clinical–biological information of the cohort analyzed is described (MBL^{hi} vs. CLL—stable/constant and/or progression). In order to decipher differential protein profiles in all the samples, three groups of soluble proteins were established: (a) group 1: cytokines, chemokines, growth/factors, regulators, and soluble receptors; (b) group 2: soluble immune checkpoints related to T cells; and (c) group 3: soluble immune checkpoints related to NK cells.

Initially, variations in the quantitative values of these soluble immune factors (groups 1, 2, and 3) in serum have been assessed. When analyzing the deviation of the average concentrations for each protein in relation to the average from each group (group 1, 2, or 3) based on diagnostic (MBL^{hi} vs. CLL—stable/constant and/or progression), it has been observed that:

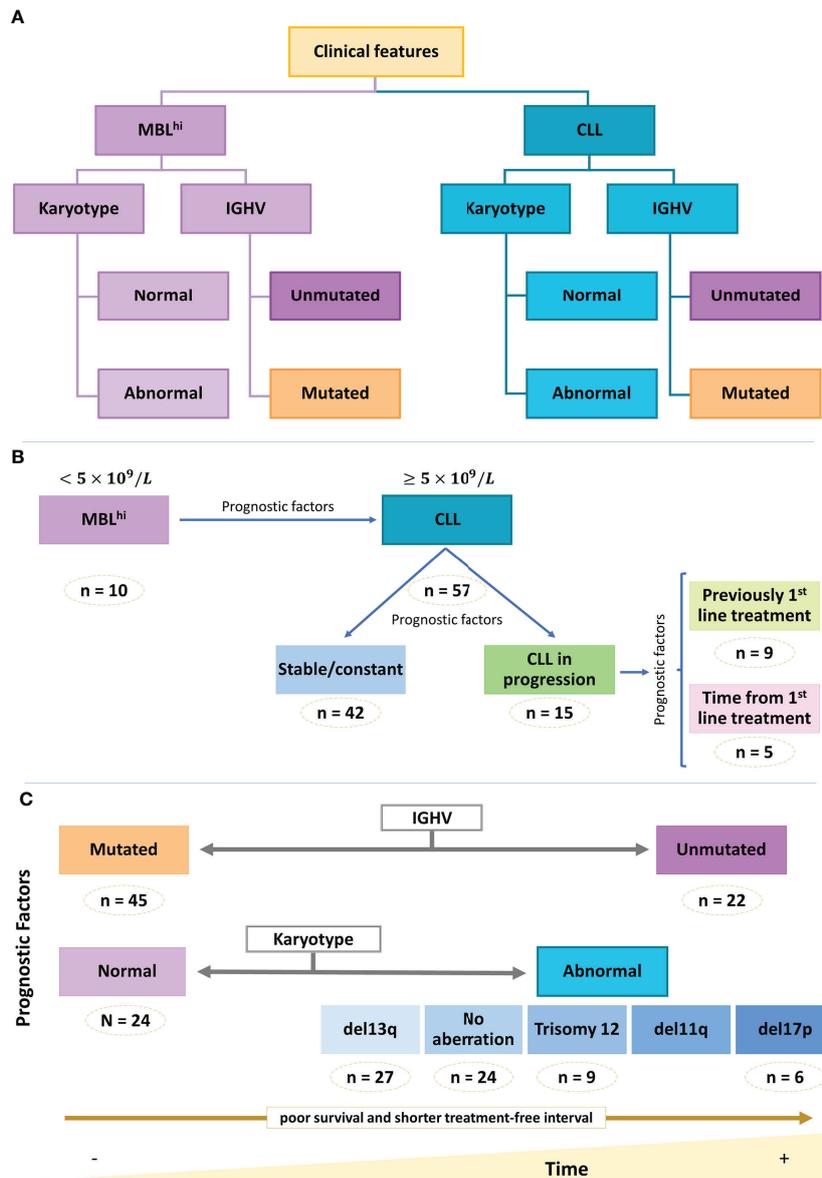


FIGURE 1 Clinical and biological info of the cohort. Schematic representation of cohort main features. (A) Diagnosis. (B) Distribution of diagnosis group. (C) Main prognostic factors.

- 33.85% (22/65) of cytokines in group 1 show a deviation from their average concentration with respect to the average levels within this group for the MBL^{hi} and CLL cohort. Of these, 18.46% (12/65) have a higher average distribution compared to all cytokines assessed in the case of MBL^{hi} and 15.38% (10/65) for CLL; in addition, several of these proteins are common to both cases (MBL^{hi} and CLL): IL-16, CXCL5, CXCL13, CCL22/MDC, CCL24/Eotaxin-2, CXCL12/SDF-1 α , sIL-2R, sTWEAK, sCD30, sAPRIL, and sTRAIL. On the other side, there is a set of soluble proteins that have lower

values compared to the average concentration of soluble proteins studied in both CLL and MBL^{hi} [13.84% (9/65) and 7.69% (5/65), respectively], such as IL-13, IL-1 β , IL-7, and IL-8 (Supplementary Figure 2A).

- In the case of soluble immune checkpoints assessed in groups 2 and 3, 21.05% (8/38) show a quantitative increase in relation to the average concentration of proteins studied for both groups in the study cohort (MBL^{hi} and CLL) (sTIM3, sCD27, sPD-L2, sBTLA, and sCD276/sB7-H3 or accessory molecules such as sPerforin, sE-Cadherine, and sCD155/sPVR, which are

involved in the immunological synapsis). On the other hand, 18.42% (7/38) of soluble immune checkpoints of these groups have a decrease of concentration with respect to the quantitative average for all these molecules of the study (sCD134/sOX40, sPD-L1, sCD47/IAP, sCD48/sBLAST-1, sMICA, sMICB, and sArginase-1) (Supplementary Figures 2B, C).

Considering the panel of soluble immune factors detected with significant differences and according to diagnosis, it was further evaluated if there was a trend during the disease progression (comparison of c-CLL and p-CLL). Changes between MBL^{hi}, c-CLL, and p-CLL have been observed for the studied protein profile (Supplementary Figure 3; Supplementary Table 2).

After conventional statistics (Student's *t*-test or Wilcoxon–Mann–Whitney test for two categories, and ANOVA or Kruskal–Wallis for more than two categories), significant differences were detected for certain proteins such as sTIMD-4, sIDO, sGalectin-9, IL-4, sBTLA, sLAG-3, IFN- γ , and CXCL13 (Supplementary Figure 4; Supplementary Table 3). Certain proteins presented a significant increase with the progression of the disease (i.e., sGalectin-9, s4-1BB, and sOX40), most of which are involved in cell recruitment (pro-inflammatory response), cell death regulation, cell cycle regulation, and cell chemotaxis (Supplementary Figure 5; Supplementary Table 4), while other proteins have a significant reduction of concentration (i.e., sCD30, INF- γ , and sIDO) according to disease progression, from MBL^{hi} through c-CLL to p-CLL. These are related to interferon signaling, CD28 co-stimulation, tryptophan catabolism, and immunological synapse (T and B cells) (Supplementary Figure 6; Supplementary Table 5).

Furthermore, 30.4% (7/23) of the soluble immune factors have significant differences between p-CLL and c-CLL. These are related to cell recruitment and cell death regulation (Supplementary Figure 7; Supplementary Table 4). In this case, a few of them are highlighted (IL-4, sTIM-3, IL-18, and CXCL9), which directly target T and B cells.

Regarding alterations in IL-4 levels, the detection of differences in p-CLL may be relevant (Figure 2). This is because IL-4 production is regulated by immune factors such as CD40L, IL-9, CD28 family, IL-1 family, and IL-13. In addition, it has an important role in TME, as it could be released, for example, by granulocytes (basophils, eosinophils, or mast cells) and T cells. It also has an important role in virus infections and negative regulation of the PI3K/AKT intracellular signaling pathway.

Then, a panel of potential soluble immune factors that are useful in discriminating between diagnosis stage and disease evolution is deciphered and has been obtained from the correlation analysis (Supplementary Figures 8A,B; Supplementary Table 6), the top five soluble immune factors were obtained by mRMR analysis (Supplementary Table 7), and

significant proteins from conventional statistics analysis (Supplementary Table 3) and proteins with significant differences were detected using the linear model (Supplementary Table 8). The set of soluble immune factors that constitute this panel has 71% (CLL) and 90% (MBL^{hi}) success in discerning the stage of the disease (Supplementary Figure 9A) and 79% (p-CLL), 76% (c-CLL), and 90% (MBL^{hi}) regarding the discrimination of the groups according to the disease evolution (Supplementary Figure 9B). These consist of the following:

- For *disease stage*: A panel of five soluble immune factors is obtained, which is feasible to discriminate between MBL^{hi} and CLL: sCD47 (cutoff values <16.62 pg/ml to select the sCD27 branch and \geq 16.62 pg/ml to select the sTIMD-4 branch), sTIMD-4 (values <1,716.48 pg/ml for CLL and \geq 1,716.48 pg/ml for MBL^{hi}), sCD27 (\geq 2,317.44 pg/ml for CLL), sIL-2R (<619.99 pg/ml for CLL), and sULBP-1 (<1,975.5 pg/ml for MBL^{hi} and \geq 1,975.5 pg/ml for CLL) (Figure 3 and Table 3).
- For *disease evolution*: A panel of six soluble immune factors is obtained, which is feasible to distinguish between MBL^{hi} and c-CLL, and between MBL^{hi} and p-CLL: sCD48 (<14.56 pg/ml to select the sArginase-1 branch and \geq 14.56 pg/ml to select the sLAG-3 branch), sCD27 (<618.73 pg/ml for MBL^{hi} and \geq 618.73 pg/ml for c-CLL or \geq 2,579 pg/ml for p-CLL), sArginase-1 (\geq 39.05 pg/ml for c-CLL, \geq 443.65 pg/ml for MBL^{hi}, <14.14 pg/ml for p-CLL, and \geq 14.14 pg/ml for c-CLL), sLAG-3 (<468.22 pg/ml for p-CLL and \geq 468.22 pg/ml for MBL^{hi}), IL-4 (\geq 134.61 pg/ml for p-CLL), and sIL-2R (<619.98 pg/ml for c-CLL and \geq 619.98 pg/ml for MBL^{hi}) to discriminate disease evolution (Figure 4 and Table 3).

Profiling immune soluble factors according to response to therapy

The therapeutic algorithm used in CLL includes several targeted oncotherapies according to multiple prognostic factors and treatment resistances. In this study, potential biomarkers are explored to determine the differences in profiles of soluble immune factors before/after treatment at the different disease stages and during disease evolution.

At first glance, approximately 20% (13/65) of the soluble immune factors in group 1 show a deviation with respect to the average of global group 1. Of these, 18.46% (12/65) of soluble immune factors have higher average concentrations (IL-16, CXCL13, CCL22/MDC, CCL24/Eotaxin-2, CXCL5, CXCL12/SDF-1 α , sIL-2R, sTRAIL, sCD30, sTWEAK, sAPRIL, and CCL2/MCP-1), while 16.92% (11/65) of soluble immune factors have lower average concentrations (IL-10, IL-1 β , IL-7,

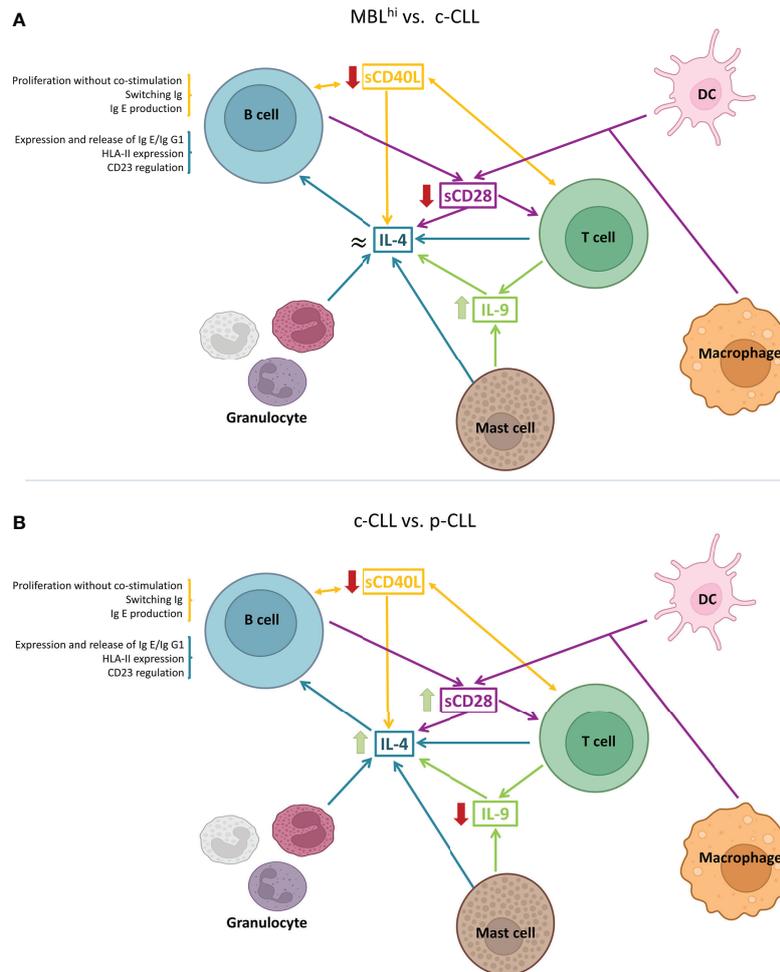


FIGURE 2

Schematic representation of IL-4-associated differential profiles in TME. (A) Cytokine profile observed between MBL^{hi} and c-CLL. (B) Cytokine profile between c-CLL and p-CLL. (Created in [Biorender.com](https://www.biorender.com))

IL-8, IL-13, TNF- α , IL-1 α , IL-15, CX3CL1/Fractalkine, β -NGF, and sCD40L) (Supplementary Figure 10A).

Regarding soluble immune checkpoints (groups 2 and 3), 23.68% (9/38) of them show an increase in regard to the average concentration for each group [sPerforin, sCD276/sB7-H3 and SPD-L2, several receptors (sCD27, sBTLA, sTIM3, and s4-1BB/sCD137), and adhesion proteins (sE-Cadherin and sCD155/sPVR)], while on the other hand, 21.05% (8/38) of soluble immune checkpoints have downward deviations from average concentrations for all these groups (sCD134/sOX40, SPD-L1, sCD48/sBLAST-1, sCD47/sIAP, sULBP-3, sArginase-1, and, related to antigen presentation, sMICA and sMICB) (Supplementary Figures 10B,C).

To establish a pattern of soluble immune factors useful to discriminate between diagnostic stage and response to treatment (before/after therapy), firstly, the profile tendency of the soluble immune factors is studied. An increase in them is observed in

CLL-PFT (Supplementary Figure 11), where this profile is related to cellular senescence, post-translational protein phosphorylation, PI3K/AKT intracellular signaling, and virus infection, among others. However, from the correlation analysis with disease progression, a profile with indirect correlation is observed, since the quantitative levels are lower after treatment. When performing a functional analysis, it is observed that among the cell signaling pathways involved are TLR signaling cascade, response to infection, regulation of gene expression by hypoxia-inducible factor, apoptotic cleavage of cell adhesion proteins, extracellular matrix organization, cell-cell communication, signaling transduction, and transcription regulation of pluripotent stem cells (Supplementary Table 9).

Some of the significant soluble immune factors are sIL-2R, CXCL9/MIG, sTIMD-4 for MBL^{hi} vs. CLL-PFT, sIDO, IL-18 and sCD30 for c-CLL vs. CLL-PFT or sLAG-3, and IFN- γ for c-CLL vs. CLL-TFT. All significant soluble immune factors for

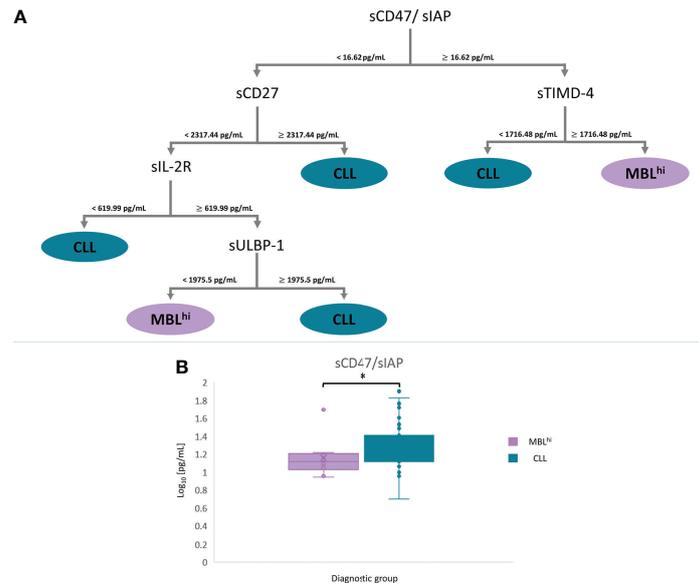
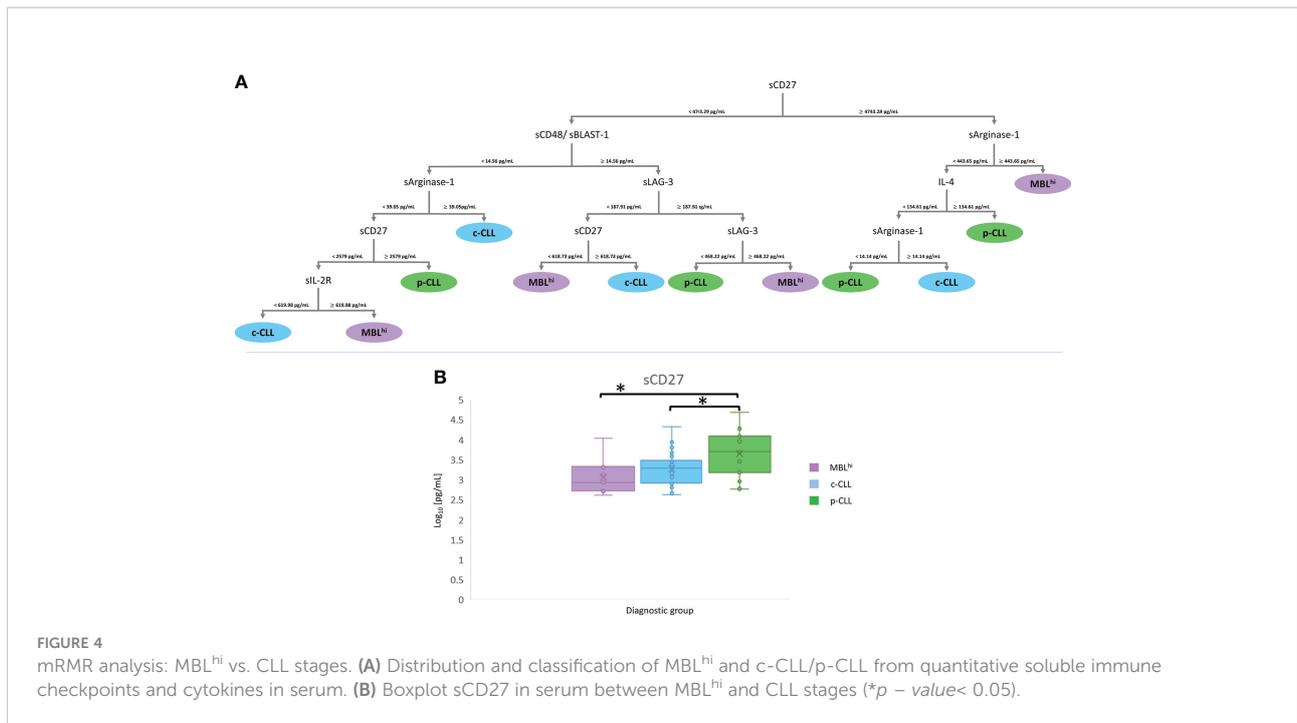


FIGURE 3 mRMR analysis: MBL^{hi} vs. CLL. **(A)** Distribution and classification of MBL^{hi} and CLL patients from quantitative soluble immune checkpoints and cytokines in serum. **(B)** Boxplot sCD47 in serum between MBL^{hi} and CLL (**p* – value < 0.05).

TABLE 3 List of relevant soluble immune factors according to stage and evolution disease.

Comparison	Protein	UniProt ID	Target	Statistical analysis
MBL ^{hi} vs. CLL	sCD47/sIAP	Q08722	Immune Checkpoint LT	mRMR/conventional statistics/limma-package
	sCD27	P26842	Immune Checkpoint LT	mRMR/conventional statistics/limma-package
	TIMD-4	Q96H15	Immune Checkpoint LT	mRMR/conventional statistics/-
	sIL-2R	P31785	Soluble receptor	mRMR/conventional statistics/limma-package
	sULBP1	Q9BZM6	Immune Checkpoint NK	mRMR/-/limma-package
MBL ^{hi} vs. c-CLL vs. p-CLL	sCD48/sBLAST-1	P09326	Immune Checkpoint LT	mRMR/-/-
	sCD27	P26842	Immune Checkpoint LT	-/conventional statistics/-
	sArginase-1	P05089	Immune Checkpoint NK	mRMR/-/-
	sLAG-3	P18627	Immune Checkpoint LT	mRMR/conventional statistics/-
	IL-4	P05112	Cytokine	mRMR/conventional statistics/limma-package
MBL ^{hi} vs. C-CLL vs. CLL-PFT vs. CLL-TFT	sIL-2R	P31785	Soluble receptor	-/conventional statistics/limma-package
	sIL-2R	P31785	Soluble receptor	mRMR/conventional statistics/limma-package
	sTIMD-4	Q96H15	Immune Checkpoint LT	mRMR/conventional statistics/-
	sSiglec-9	Q9Y336	Immune Checkpoint NK	mRMR/-/limma-package
	INF-γ	P01579	Cytokine	mRMR/conventional statistics/-
Mutated IGHV vs. Unmutated IGHV	sPD-L1	Q9NZQ7	Immune Checkpoint LT	mRMR/-/limma-package
	sCD48/sBLAST-1	P09326	Immune Checkpoint LT	mRMR/-/-
	sLAG-3	P18627	Immune Checkpoint LT	mRMR/conventional statistics/limma-package
	CXCL10/IP-10	P02778	Chemokine	-/conventional statistics/-
	sCD134/sOX40	P23510	Immune Checkpoint LT	mRMR/-/-
	sULBP1	Q9BZM6	Immune Checkpoint NK	mRMR/-/-
	sLAG-3	P18627	Immune Checkpoint LT	mRMR/conventional statistics/-

mRMR, maximum relevance minimum redundancy.



these comparisons are reported in [Supplementary Table 2](#), and their trend is shown in [Supplementary Figure 12](#). After functional enrichment, most of the soluble immune factors reveal signaling pathways related to co-stimulation mediated by the CD28 family in the immune system and immune-related signaling. For the comparison of c-CLL vs. CLL-PFT, differential signaling pathways are related to metabolism of amino acids and the programmed cell death ([Supplementary Table 10](#)).

As described above on the IL-4 quantitative levels, this increases with the evolution of the disease, but it is decreased in CLL-PFT. Considering a detailed study of soluble immune factors involved in the regulation of IL-4 production, these show that a decrease in sCD40L and sCD28 is associated with an increase in disease progression ([Figure 5](#)).

Similarly, from the correlation analysis ([Supplementary Figure 8C](#); [Supplementary Tables 3, 6–8](#)), it is feasible to establish a pattern of soluble immune factor to successfully discriminate between groups according to treatment response, which yields the following rates: 48% (c-CLL), 93% (MBL^{hi}), 95% (CLL-PFT), and 100% (CLL-TFT) ([Supplementary Figure 9C](#)). Thus, a panel containing sIL-2R (<3,923.23 pg/ml to select the sTIMD-4 branch and ≥3,923.23 pg/ml to select the sSiglec-9 branch), sTIMD-4 (<92.28 pg/ml for MBL^{hi} or <251.38 pg/ml for MBL^{hi} and ≥251.38 pg/ml for CLL-PFT), sSiglec-9 (<330.32 pg/ml for CLL-TFT and ≥330.32 pg/ml for MBL^{hi} or <352.41 pg/ml for MBL^{hi} and ≥352.41 pg/ml for c-CLL), INF-γ (<2.27 pg/ml to select the sCD48 branch and ≥2.27 pg/ml to select the sSiglec-9 branch), sPD-L1 (<3.39 pg/ml for CLL-TFT and ≥3.39 pg/ml for CLL-PFT or ≥12.73 pg/ml for CLL-TFT), sCD48 (≥14.56 pg/ml for c-CLL), and sLAG-3 (<348.13 pg/ml

for c-CLL and ≥348.13 pg/ml for MBL^{hi}) could distinguish between diagnostic stage and therapeutic response ([Figure 6](#) and [Table 3](#)).

Profiling soluble immune factors according to immunoglobulin heavy chain variable mutational status

In this study, the profiles of soluble immune factors based on immunoglobulin heavy chain variable (IGHV) mutational status are also analyzed due to the critical role as a prognostic factor in CLL.

In [Supplementary Figure 13](#), the general distribution of soluble immune factors for both IGHV mutational status (unmutated vs. mutated) is depicted. In group 1 of soluble immune factors, 16.90% (11/65) show higher levels with respect to the global average (IL-16, CXCL5, CCL24/Eotaxin-2, CXCL12/SDF-1α, sIL-2R, sTWEAK, sCD30, and sAPRIL), while 15.38% (10/65) of soluble immune factors show decreased levels (IL-1α, IL-7, IL-13, IL-15, IL-10, TNF-α, IL-1β, IL-8, CXC3CL1/fractalkine, and β-NGF) ([Supplementary Figure 13A](#)).

With regard to soluble immune checkpoints (T cells or NK cells), 18.42% (7/38) of them, included in both groups, have an increased average concentration concerning the total average for each group (sBTLA, sCD276/sB7-H3, sTIM-3, sCD27, sPerforin, sE-Cadherin, and sCD155/sPVR). Likewise, a reduction in quantitative levels is also observed for 15.79% (6/38) of the soluble immune checkpoints included in these groups (sPD-L1,

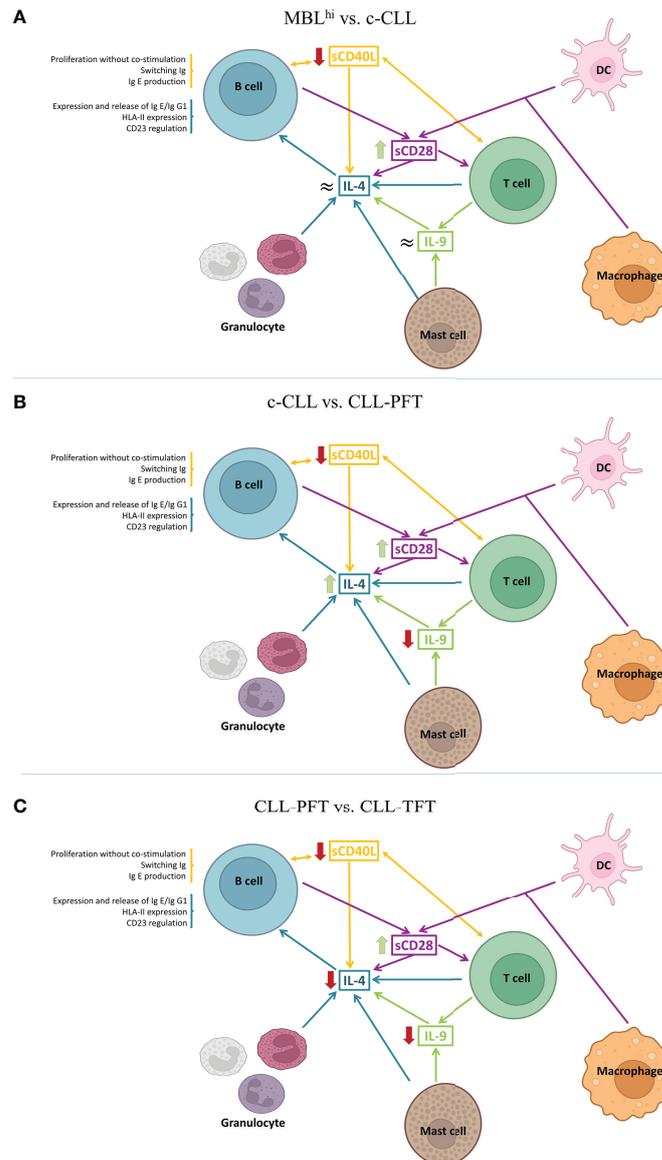


FIGURE 5

Schematic models of the TME from the role of the observed differential serum profiles. (A) MBL^{hi} vs. c-CLL (stable and progression). (B) c-CLL vs. CLL-PFT. (C) CLL-PFT vs. CLL-TFT. (Created in [Biorender.com](https://www.biorender.com))

sCD47/sIAP, sCD134/sOX40, sMICA, and sMICB) ([Supplementary Figures 13B, C](#)).

Most of the studied soluble immune factors [83.5% (86/103)] show higher levels for unmutated IGHV patients than mutated IGHV patients. These results are to be expected due to the poor clinical prognosis of unmutated IGHV patients ([Supplementary Figure 14](#)). From the functional point of view, these soluble immune factors are related to CD28 co-stimulation, regulation of TLR by endogenous ligand, infectious disease, constitutive signaling by aberrant PI3K, adherens junction interactions, cellular response to stress, regulated necrosis, and pyroptosis

([Supplementary Table 11](#)). Although only 9.7% (10/103) of soluble immune factors are significantly increased ([Supplementary Figure 13](#)). The last mentioned factors are related to VEGF signaling, immunoregulatory interactions between lymphoid and non-lymphoid cells, and transcriptional regulation, among others ([Supplementary Table 11](#)).

In this comparison, CXCL11/I-TAC, CXCL10/IP-10, sHVEM, and sLAG-3 are found to have a significant profile for IGHV mutational status ([Supplementary Table 3](#)), which is related to antigen presentation and cytokine signaling cascades (i.e., IL-10 signaling, TNFR2

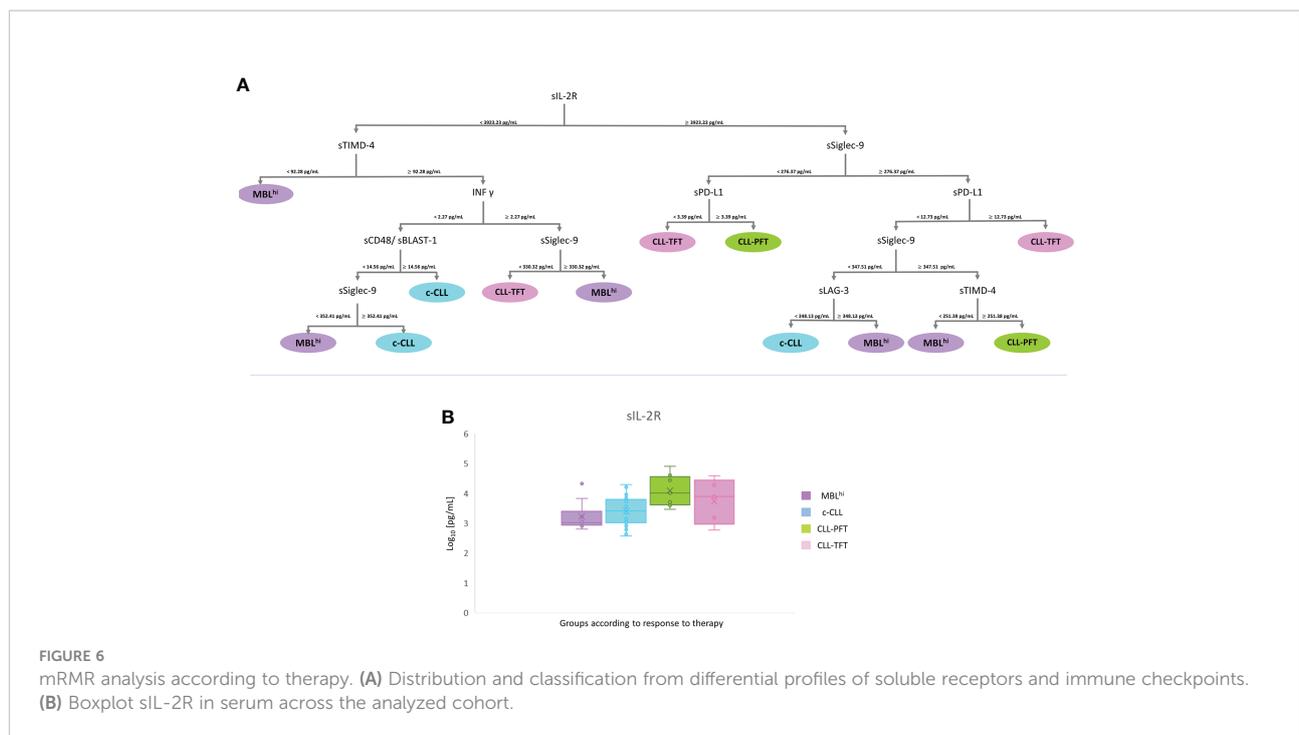


FIGURE 6
mRMR analysis according to therapy. **(A)** Distribution and classification from differential profiles of soluble receptors and immune checkpoints. **(B)** Boxplot sIL-2R in serum across the analyzed cohort.

non-canonical NF- κ B pathway, and interferon signaling) (Supplementary Table 12).

Bearing in mind the prognostic value of the IGHV mutational status in CLL, it is very interesting to identify a profile of soluble immune checkpoints with a strong correlation. In this way, a panel of four proteins is feasible to discriminate IGHV mutational status: CXCL10/IP-10 (<math><9.05 \text{ pg/ml}</math> for mutated IGHV), sCD134/sOX40 (<math><17.87 \text{ pg/ml}</math> for unmutated IGHV), sULBP-1 (<math><1,105.11 \text{ pg/ml}</math> for mutated IGHV), and sLAG-3 (<math><147.24 \text{ pg/ml}</math> for mutated IGHV and $\geq 147.24 \text{ pg/ml}</math> for unmutated IGHV) (Figure 7 and Table 3). This panel has a high discrimination capacity between groups (70% for mutated IGHV and 77% for unmutated IGHV) (Supplementary Figure 8D, Supplementary Figure 9D, and Supplementary Tables 3, 6–8), and all of them are involved in interactions with T cells and the mechanism of antigen presentation.$

Discussion

In this study, serum quantitative levels of 103 soluble immune factors have been analyzed in MBL^{hi}/CLL patients. The characterization of significant profiles of soluble immune factors reveals patterns and trends that might be useful as potential biomarkers to distinguish between diagnostic stage, disease evolution, and prognostic factors (such as IGHV mutational status). Briefly, it has been observed that soluble immune factors show an increment according to diagnostic stage (MBL^{hi} vs. CLL), disease evolution (c-CLL and p-CLL),

and therapy response (c-CLL and p-CLL) (CLL-PFT vs. CLL-TFT). On the other hand, after treatment, a common reduction in soluble immune factors is observed. Despite these patterns, an exception has been determined as sLAG-3, SPD-L1, and INF- γ have reduced levels at the early stage of the disease. As regards prognostic factors, unmutated IGHV patients display lower levels of soluble immune factors in comparison with mutated IGHV, except for sCD47/sIAP and sTIMD-4, which maintain their levels, and sArginase-1, which shows increased levels.

The significant profiles of soluble immune factors are directly related to the microenvironment where T cells, NK cells, macrophages, and granulocytes are involved (Figure 8). As a proof, IL-4 is increased according to disease evolution. IL-4 is a cytokine that polarizes T-lymphocyte differentiation towards Th2 cells (1) and macrophages towards pro-tumoral (M2) phenotypes, leading to tumor escape caused by an unbalanced immune response. Previously, it has been reported that IL-4 is produced by B-CLL cell (2) and in T-cell cultures isolated from CLL patients (31). This general immunosuppression increased the survival of B-CLL cells and the modulation of the therapeutic response of CLL patients (1, 10, 32). This is compatible with the current study, since the maintenance or increment in IL-4 serum concentrations could be driven by the polarization of the microenvironment, skewing the action of the immune system towards a pro-tumor microenvironment, which would be restored after targeted therapy.

Bearing in mind the polarization of Th2 cells in the microenvironment and the increased presence of M2 macrophages (releasing IL-4 into the microenvironment),

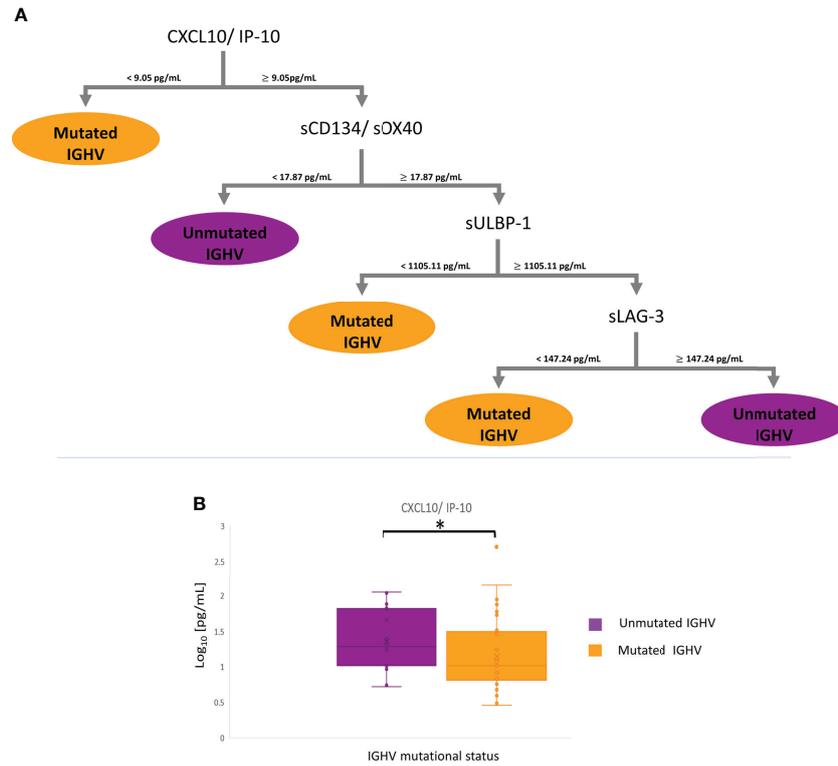


FIGURE 7 mRMR analysis according to IGHV status. **(A)** Distribution and classification from differential profiles of soluble immune checkpoints correlated with IGHV mutational status. **(B)** Boxplot CXCL10/IP-10 in serum between groups (**p* – value < 0.05).

Arginase-1 is also expected to be involved. Arginase-1 production is stimulated by IL-4 production, thus supporting the effect of Th2 cells (33). In addition, Arginase-1 could also be released into the microenvironment by myeloid cells; thus, it

contributes to the suppression of T-cell functions and inhibits NK proliferation. Alterations in arginase metabolism have also been observed in tumors, which might affect cell proliferation. On the other hand, tumor cells have been shown to exhibit an

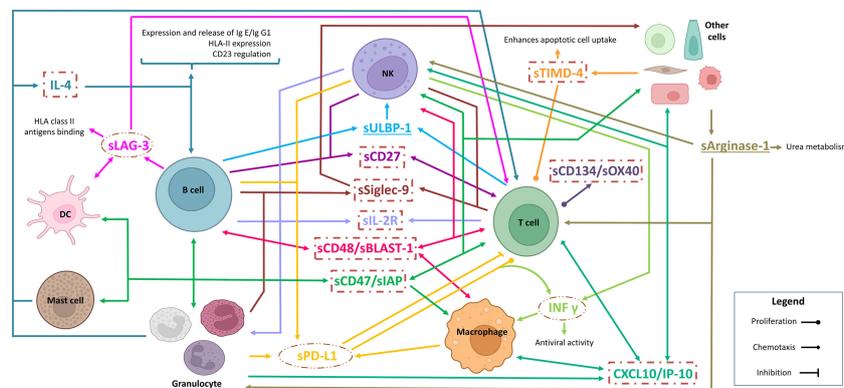


FIGURE 8 Model of the role of soluble immune checkpoints in the TME in the studied cohort. Inside circles, protein profiling decreased levels according to disease evolution. Inside squares, protein profile correlated with mutated IGHV. Underline, protein profiles with fluctuations over disease evolution and IGHV mutational status. (Created in [Biorender.com](https://www.biorender.com))

increase in arginase catabolism that leads to the suppression of CD8⁺ T cells and stabilizes Treg T cells (34, 35). In this study, it is observed that sArginase-1 increases its concentration according to disease progression. In particular, CLL-PFT patients display a lower level compared to patients with c-CLL and show an increase when compared with CLL-TFT. This suggests that the catabolism of Arginase-1 is increased in B-CLL cells, generating a protective environment for these leukemic cells that allows their further proliferation and, consequently, treatment resistance.

Also, the current study reveals the critical role of T cells in disease progression and evolution. Significant alterations in soluble immune factors related to T-cell functions are as follows: (i) sULBP-1 is relevant in the inhibition of cytokine release, co-stimulation, and cytotoxicity of T cells (6, 36). (ii) sSiglec-9, which could bind to its ligands, promotes the block of antitumoral activity of NK and T cells (37). (iii) sLAG-3 inhibits the co-receptor of HLA-II that downregulates the activation of T and NK cells to alert the exhaustion status of T and NK cells (12, 38, 39). Sordo-Bahamonde et al. in 2021 (11) observed that LAG-3 has a negative impact on the clinical outcomes of CLL patients, affecting T-cell proliferation, cytokine production, and cytolytic activity, while promoting immunosuppression by Tregs' T-cell action. Moreover, LAG-3 dysregulation in CLL patients correlates with disease progression. (iv) PD-L1 binding to its receptor PD-1 inhibits T cells (40); increased soluble levels in plasma are associated with poor prognosis, shorter survival, and resistance to immunotherapy in different several cancers (41). In summary, a dysfunctional immune response is expected because of the reduction in antigen presentation by tumor cells and the decrease in the number of T and NK cells, which result in disease progression and no change in the serum levels of sLAG-3 and sPD-L1 after treatment, thus generating treatment resistance.

Interestingly, the sCD48 profile is correlated to the progressive increment with disease progression and evolution. CD48 is a membrane protein that stimulates the cytotoxic activity of CD8⁺ T cells and NK cells (42). This might be related to the response of CLL patients when they are exposed to recurrent viral and bacterial infections. Previously, it has been reported that infected patients show high CD48 expression (43), which is in contrast with what is observed in other hematological malignancies, where downregulation of CD48 has been determined (44). In addition, the presence of elevated levels of sCD48 may be involved with an overstimulation of NK and CD8⁺ T cells, which could block the activity of these cells due to depletion (42). Similarly, it is expected for sCD47. CD47 is a transmembrane protein that plays an important role in migration, phagocytosis, apoptosis, and immune homeostasis because it is responsible for the immune escape control. In normal tissues, there is a constant balance between inhibition/activation of phagocytosis that is disproportionate in malignant cells, mainly because of the upregulation of CD47. In addition,

CD47 interacts with signal regulatory protein α (SIRP α) expressed in myeloid cells (monocytes, macrophages, and DCs), blocking the migration and phagocytosis process of these cell types (12, 16, 17, 40).

Finally, from the analysis of soluble immune checkpoint according to the IGHV mutational status, it is revealed that patients with unmutated IGHV are characterized by (i) the proliferation of compromised T cells [sLAG-3 (11, 12), INF- γ (44), sOX40/sCD134 (45), and sCD27 (46)]; (ii) inefficient antigen presentation by APCs [downregulation of HLA-II molecule expression by B-CLL cells, blockade of the HLA-II molecule by sLAG-3 (11, 12), upregulation of IL-4 (1, 10), and blocking of antigenic presentation by DCs by sTIMD-4 (47)]; (iii) the inhibition of CD8⁺ T cells that co-exists with the recruitment and activation of NK [CXCL10 (19), sULBP-1 (6, 36), and sCD48/sBLAST-1 (44)]; and (iv) the inhibition of phagocytosis in macrophages by the binding of sCD47 to SIRP α (12, 16, 17, 40), which, in combination with inefficient antigenic presentation, promotes B-CLL cell survival. Regarding sArginase-1, mutated IGHV patients display higher values than unmutated IGHV patients, which is in contrast with the previously reported level of sArginase-1 in TME, as it is involved in the stabilization of Treg T cells, generating protection for B-CLL cells and suppressing CD8⁺ T cells (34).

Conclusions

In conclusion, the systematic analysis of soluble immune factors provides a new perspective on the understanding of the TME of B-CLL cells, suggesting that T cells have an important role in this process of immune suppression and dysfunction. This is because most of the soluble immune checkpoints and immune factors that presented significant differences are related to the following:

- Antigenic recognition by T lymphocytes, and co-stimulation, differentiation, proliferation, and selection of circulating tumor-associated monocytes.
- Breakdown of the cellular balance due to the increase in Th2 CD4⁺ T cells, Treg lymphocytes, and type 2 macrophages (M2), which is related to the polarization of the microenvironment. Consequently, an inhibition of the immune system and the presence of an inflamed TME leading to tumor escape are observed.

In this study, four different quantitative profiles of soluble immune factors are proposed. Furthermore, this study paves the way for soluble immune factors as potential and useful biomarkers for this pathology, which could influence disease progression.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/[Supplementary Material](#).

Ethics statement

Informed consent was given by each individual before entering the study and approved by the local ethics committee of the University Hospital of Salamanca (HUS, Salamanca, Spain).

Author contributions

Conceptualization: AL-V, MA, AN-B, MG, MF. Sample acquisition and informed consents: AN-B, MG, MA. Statistical Data: AL-V, LD-M, JS-S. Bioinformatic analysis: AL-V, CP, QL, MF. Bioinformatic resources: CP, QL, JDLR. Resources: CA-H, PJ-V, Á-PH, MG-V, AO. Writing-original draft preparation: AL-V, MF. Supervision: MF, MG, AO, CP, QL, JS-S, RG, JD. Funding acquisition: MF. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

We gratefully acknowledge Fondos FEDER (EU) and Junta Castilla-León (grant SA198A12-2 and COVID-19 grant COV20EDU/00187), Fundación Solórzano FS/38-2017. The Proteomics Unit belongs to ProteoRed, PRB3-ISCI, supported by grant PT17/0019/0023, of the PE I + D + I 2017-2020, funded by ISCI and FEDER. AL-V is supported by VIII Centenario-USAL PhD Program, and PJ-V is supported by the JCYL PhD Program “JCYL Nos Impulsa” and scholarship JCYL-EDU/601/2020. This research work was performed in the framework of the

References

- Allegra A, Musolino C, Tonacci A, Pioggia G, Casciaro M, Gangemi S. Clinico-biological implications of modified levels of cytokines in chronic lymphocytic leukemia: A possible therapeutic role. *Cancers (Basel)* (2020) 12:524. doi: 10.3390/cancers12020524
- Haseeb M, Anwar MA, Choi S. Molecular interactions between innate and adaptive immune cells in chronic lymphocytic leukemia and their therapeutic implications. *Front Immunol* (2018) 9:2720. doi: 10.3389/fimmu.2018.02720
- Manouchehri-Doulabi E, Abbaspour S, Rostami S, Faranoush M, Ghahramanfarid F, Pak F, et al. Evaluating the mechanism underlying antitumor effect of interleukin 27 on b cells of chronic lymphocytic leukemia patients. *J Cell Physiol* (2020) 235:9424–31. doi: 10.1002/jcp.29747
- Fiorcari S, Maffei R, Atene CG, Potenza L, Luppi M, Marasca R. Nurse-like cells and chronic lymphocytic leukemia b cells: A mutualistic crosstalk inside tissue microenvironments. *Cells* (2021) 10:217. doi: 10.3390/cells10020217
- Awan FT, Byrd JC. 99 - chronic lymphocytic leukemia. In: JE Niederhuber, JO Armitage, MB Kastan, JH Doroshow, JE Tepper, editors. *Abeloff's clinical oncology, Sixth Edition*. Philadelphia: Elsevier (2020). p. 1850–1871.e5. doi: 10.1016/B978-0-323-47674-4.00099-2
- Nüchel H, Switala M, Sellmann L, Horn PA, Dürig J, Dührsen U, et al. The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in b-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* (2010) 24:1152–9. doi: 10.1038/leu.2010.74
- Dubois N, Crompot E, Meuleman N, Bron D, Lagneaux L, Stamatopoulos B. Importance of crosstalk between chronic lymphocytic leukemia cells and the stromal microenvironment: Direct contact, soluble factors, and extracellular vesicles. *Front Oncol* (2020) 10:1422. doi: 10.3389/fonc.2020.01422
- Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers* (2017) 3:16096. doi: 10.1038/nrdp.2016.96

Nanomedicine CSIC HUB (ref. 202180E048). AL-V, CA-H, PJ-V, MG-V, Á-PH, and MF are part of the CSIC's Global Health Platform (PTI SaludGlobal). CA-H is supported by Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca, IBSAL (Programa Puente Contratos Predoctorales-2021).

Acknowledgments

We thank the financial support from the Spanish Health Institute Carlos III (ISCIII) (grants FIS PI21/01545, FIS PI17/01930, and CB16/12/00400).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.965905/full#supplementary-material>

9. Vitale C, Boccellato E, Comba L, Jones R, Perutelli F, Griggio V, et al. Impact of immune parameters and immune dysfunctions on the prognosis of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancers (Basel)* (2021) 13:3856. doi: 10.3390/cancers13153856
10. Bojarska-Junak A, Waldowska M, Woś J, Chocholska S, Hus I, Tomczak W, et al. Intracellular IL-4 and IFN- γ expression in iNKT cells from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Lett* (2018) 15:1580–90. doi: 10.3892/ol.2017.7484
11. Sordo-Bahamonde C, Lorenzo-Herrero S, González-Rodríguez AP, Payer ÁR, González-García E, López-Soto A, et al. LAG-3 blockade with relatlimab (BMS-986016) restores anti-leukemic responses in chronic lymphocytic leukemia. *Cancers (Basel)* (2021) 13:2112. doi: 10.3390/cancers13092112
12. Joshi M, Ansell SM. Activating the antitumor immune response in non-Hodgkin lymphoma using immune checkpoint inhibitors. *J Immunol Res* (2020) 2020:8820377. doi: 10.1155/2020/8820377
13. Pascutti MF, Jak M, Tromp JM, Derks IAM, Remmerswaal EBM, Thijssen R, et al. IL-21 and CD40L signals from autologous T cells can induce antigen-independent proliferation of CLL cells. *Blood* (2013) 122:3010–9. doi: 10.1182/blood-2012-11-467670
14. Quan L, Lan X, Meng Y, Guo X, Guo Y, Zhao L, et al. BTLA marks a less cytotoxic T-cell subset in diffuse large b-cell lymphoma with high expression of checkpoints. *Exp Hematol* (2018) 60:47–56.e1. doi: 10.1016/j.exphem.2018.01.003
15. Cao Y, Wang X, Jin T, Tian Y, Dai C, Widarma C, et al. Immune checkpoint molecules in natural killer cells as potential targets for cancer immunotherapy. *Signal Transduct Target Ther* (2020) 5:250. doi: 10.1038/s41392-020-00348-8
16. Li Z, Li Y, Gao J, Fu Y, Hua P, Jing Y, et al. The role of CD47-SIRP α immune checkpoint in tumor immune evasion and innate immunotherapy. *Life Sci* (2021) 273:119150. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119150
17. Wang Y, Zhao C, Liu Y, Wang C, Jiang H, Hu Y, et al. Recent advances of tumor therapy based on the CD47-SIRP α axis. *Mol Pharm* (2022) 19:1273–93. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.2c00073
18. Dyck L, Mills KHG. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol* (2017) 47:765–79. doi: 10.1002/eji.201646875
19. Neo SY, Lundqvist A. The multifaceted roles of CXCL9 within the tumor microenvironment. *Adv Exp Med Biol* (2020) 1231:45–51. doi: 10.1007/978-3-030-36667-4_5
20. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligiaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* (2018) 131:2745–60. doi: 10.1182/blood-2017-09-806398
21. Rai K, Sawitsky A, Cronkite E, Chanana A, Levy R, Pasternack B. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* (1975) 46:219–34. doi: 10.1182/blood.V46.2.219.219
22. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguat H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* (1981) 48:198–206. doi: 10.1002/1097-0142(19810701)48:1<198:aid-cnrc2820480131>3.0.co;2-v
23. Dong MP, Enomoto M, Thuy LTT, Hai H, Hieu VN, Hoang DV, et al. Clinical significance of circulating soluble immune checkpoint proteins in sorafenib-treated patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* (2020) 10:3392. doi: 10.1038/s41598-020-60440-5
24. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* (2015) 43:e47. doi: 10.1093/nar/gkv007
25. Fabregat A, Korninger F, Viteri G, Sidropoulos K, Marin-García P, Ping P, et al. Reactome graph database: Efficient access to complex pathway data. *PLoS Comput Biol* (2018) 14:e1005968. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005968
26. Peng H, Long F, Ding C. Feature selection based on mutual information criteria of max-dependency, max-relevance, and min-redundancy. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* (2005) 27:1226–38. doi: 10.1109/TPAMI.2005.159
27. Ding C, Peng H. Minimum redundancy feature selection from microarray gene expression data. *J Bioinform Comput Biol* (2005) 3:185–205. doi: 10.1142/s0219720005001004
28. Costa VG, Pedreira CE. Recent advances in decision trees: An updated survey. *Artif Intell Rev* (2022).
29. Kotsiantis SB. Decision trees: A recent overview. *Artif Intell Rev* (2013) 39:261–83. doi: 10.1007/s10462-011-9272-4
30. Stone M. Cross-validated choice and assessment of statistical predictions. *J R Stat Soc Ser B (Methodol)* (1974) 36:111–47.
31. Krause G, Hassenrück F, Hallek M. Relevant cytokines in the b cell lymphoma micro-environment. *Cancers (Basel)* (2020) 12:E2525. doi: 10.3390/cancers12092525
32. De Falco F, Del Papa B, Baldoni S, Sabatini R, Falzetti F, Di Ianni M, et al. IL-4-dependent Jagged1 expression/processing is associated with survival of chronic lymphocytic leukemia cells but not with notch activation. *Cell Death Dis* (2018) 9:1–17. doi: 10.1038/s41419-018-1185-6
33. Rébé C, Ghiringhelli F. Interleukin-1 β and cancer. *Cancers (Basel)* (2020) 12:1791. doi: 10.3390/cancers12071791
34. Lemos H, Huang L, Prendergast GC, Mellor AL. Immune control by amino acid catabolism during tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer* (2019) 19:162–75. doi: 10.1038/s41568-019-0106-z
35. Grzywa TM, Sosnowska A, Matryba P, Rydzynska Z, Jasinski M, Nowis D, et al. Myeloid cell-derived arginase in cancer immune response. *Front Immunol* (2020) 11:938. doi: 10.3389/fimmu.2020.00938
36. Kubin M, Cassiano L, Chalupny J, Chin W, Cosman D, Fanslow W, et al. ULBP1, 2, 3: Novel MHC class I-related molecules that bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL16, activate NK cells. *Eur J Immunol* (2001) 31:1428–37. doi: 10.1002/1521-4141(200105)31:5<1428:AID-IMMU1428>3.0.CO;2-4
37. Ono E, Uede T. Implication of soluble forms of cell adhesion molecules in infectious disease and tumor: Insights from transgenic animal models. *Int J Mol Sci* (2018) 19:E239. doi: 10.3390/ijms19010239
38. Marcovecchio PM, Thomas G, Salek-Ardakani S. CXCL9-expressing tumor-associated macrophages: New players in the fight against cancer. *J Immunother Cancer* (2021) 9:e002045. doi: 10.1136/jitc-2020-002045
39. Yoshimoto T, Chiba Y, Furusawa J-I, Xu M, Tsunoda R, Higuchi K, et al. Potential clinical application of interleukin-27 as an antitumor agent. *Cancer Sci* (2015) 106:1103–10. doi: 10.1111/cas.12731
40. Li Y, Liu X, Zhang X, Pan W, Li N, Tang B. Immune cycle-based strategies for cancer immunotherapy. *Adv Funct Mater* (2021) 31:1–27. doi: 10.1002/adfm.202107540
41. Nakamura Y. Biomarkers for immune checkpoint inhibitor-mediated tumor response and adverse events. *Front Med (Lausanne)* (2019) 6:119. doi: 10.3389/fmed.2019.00119
42. Pahima H, Puzzovio PG, Levi-Schaffer F. 2B4 and CD48: A powerful couple of the immune system. *Clin Immunol* (2019) 204:64–8. doi: 10.1016/j.clim.2018.10.014
43. McArdel SL, Terhorst C, Sharpe AH. Roles of CD48 in regulating immunity and tolerance. *Clin Immunol* (2016) 164:10–20. doi: 10.1016/j.clim.2016.01.008
44. Huang C-H, Liao Y-J, Chiou T-J, Huang H-T, Lin Y-H, Twu Y-C. TGF- β regulated leukemia cell susceptibility against NK targeting through the down-regulation of the CD48 expression. *Immunobiology* (2019) 224:649–58. doi: 10.1016/j.imbio.2019.07.002
45. Nuebling T, Schumacher CE, Hofmann M, Hagelstein I, Schmiedel BJ, Maurer S, et al. The immune checkpoint modulator OX40 and its ligand OX40L in NK-cell immunosurveillance and acute myeloid leukemia. *Cancer Immunol Res* (2018) 6:209–21. doi: 10.1158/2326-6066.CCR-17-0212
46. Hosnijeh FS, Portengen L, Späth F, Bergdahl IA, Melin B, Mattiello A, et al. Soluble b-cell activation marker of sCD27 and sCD30 and future risk of b-cell lymphomas: A nested case-control study and meta-analyses. *Int J Cancer* (2016) 138:2357–67. doi: 10.1002/ijc.29969
47. Liu W, Xu L, Liang X, Liu X, Zhao Y, Ma C, et al. Tim-4 in health and disease: Friend or foe? *Front Immunol* (2020) 11:537. doi: 10.3389/fimmu.2020.00537

Anexo VI: Landeira Viñuela et al. 2023.



Article

Systematic Evaluation of Antigenic Stimulation in Chronic Lymphocytic Leukemia: Humoral Immunity as Biomarkers for Disease Evolution

Alicia Landeira-Viñuela ¹, Miguel Alcoceba-Sanchez ², Almudena Navarro-Bailón ², Carlota Arias-Hidalgo ¹, Pablo Juanes-Velasco ¹, José Manuel Sánchez-Santos ³, Quentin Lecrevisse ¹, Carlos Eduardo Pedreira ⁴, Marina L. García-Vaquero ¹, Ángela-Patricia Hernández ^{1,5}, Enrique Montalvillo ¹, Rafael Góngora ¹, Javier De las Rivas ⁶, Marcos González-Díaz ², Alberto Orfao ¹ and Manuel Fuentes ^{1,7,*}

¹ Department of Medicine and General Service of Cytometry, CIBERONC-CB16/12/00400, Cancer Research Centre-IBMCC, CSIC-USAL, IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, University of Salamanca-CSIC, 37008 Salamanca, Spain

² Department of Hematology, Center Research-Centre IBMCC (CSIC-USAL, IBSAL), University Hospital of Salamanca, CIBERONC-CB16/12/00233, 37007 Salamanca, Spain

³ Statistics Department, University of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain

⁴ Systems and Computing Department (COPPE-PESC), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro 21941-914, Brazil

⁵ Organic Chemistry Section, Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37008 Salamanca, Spain

⁶ Bioinformatics and Functional Genomics Group, Cancer Research Center (CIC-IBMCC, CSIC/USAL), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and University of Salamanca (USAL), 37008 Salamanca, Spain

⁷ Proteomics Unit, Cancer Research Centre-IBMCC, IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, University of Salamanca-CSIC, 37008 Salamanca, Spain

* Correspondence: mfuentes@usal.es



Citation: Landeira-Viñuela, A.; Alcoceba-Sanchez, M.; Navarro-Bailón, A.; Arias-Hidalgo, C.; Juanes-Velasco, P.; Sánchez-Santos, J.M.; Lecrevisse, Q.; Pedreira, C.E.; García-Vaquero, M.L.; Hernández, Á.-P.; et al. Systematic Evaluation of Antigenic Stimulation in Chronic Lymphocytic Leukemia: Humoral Immunity as Biomarkers for Disease Evolution. *Cancers* **2023**, *15*, 891. <https://doi.org/10.3390/cancers15030891>

Academic Editors: Richard Rosenquist Brandell and Carlos S. Moreno

Received: 10 November 2022

Revised: 12 January 2023

Accepted: 25 January 2023

Published: 31 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Clonal B cell expansion in chronic lymphocytic leukemia may be triggered by persistent antigenic stimulation. Therefore, studying the dynamics of the humoral response of these patients provide information about serological immunoglobulin levels and identifies which antigens compromise the immune response. Hence, this study is a new point of view that could provide additional information useful in patient stratification and also selection of targeted therapy.

Abstract: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia in the Western world. Studies of CLL antibody reactivity have shown differential targets to autoantigens and antimicrobial molecular motifs that support the current hypothesis of CLL pathogenesis. **Methods:** In this study, we conducted a quantitative serum analysis of 7 immunoglobulins in CLL and monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) patients (bead-suspension protein arrays) and a serological profile (IgG and IgM) study of autoantibodies and antimicrobial antigens (protein microarrays). **Results:** Significant differences in the IgA levels were observed according to disease progression and evolution as well as significant alterations in IgG1 according to IGHV mutational status. More representative IgG autoantibodies in the cohort were against nonmutagenic proteins and IgM autoantibodies were against vesicle proteins. Antimicrobial IgG and IgM were detected against microbes associated with respiratory tract infections. **Conclusions:** Quantitative differences in immunoglobulin serum levels could be potential biomarkers for disease progression. In the top 5 tumoral antigens, we detected autoantibodies (IgM and IgG) against proteins related to cell homeostasis and metabolism in the studied cohort. The top 5 microbial antigens were associated with respiratory and gastrointestinal infections; moreover, the subsets with better prognostics were characterized by a reactivation of Cytomegalovirus. The viral humoral response could be a potential prognosis biomarker for disease progression.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia; antimicrobial antibodies; autoantibodies; protein microarrays

Article

Systematic Evaluation of Antigenic Stimulation in Chronic Lymphocytic Leukemia: Humoral Immunity as Biomarkers for Disease Evolution

Alicia Landeira-Viñuela ¹, Miguel Alcoceba-Sanchez ², Almudena Navarro-Bailón ², Carlota Arias-Hidalgo ¹, Pablo Juanes-Velasco ¹, José Manuel Sánchez-Santos ³, Quentin Lecrevisse ¹, Carlos Eduardo Pedreira ⁴, Marina L. García-Vaquero ¹, Ángela-Patricia Hernández ^{1,5}, Enrique Montalvillo ¹, Rafael Góngora ¹, Javier De las Rivas ⁶, Marcos González-Díaz ², Alberto Orfao ¹ and Manuel Fuentes ^{1,7,*}

- ¹ Department of Medicine and General Service of Cytometry, CIBERONC-CB16/12/00400, Cancer Research Centre-IBMCC, CSIC-USAL, IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, University of Salamanca-CSIC, 37008 Salamanca, Spain
 - ² Department of Hematology, Center Research-Centre IBMCC (CSIC-USAL, IBSAL), University Hospital of Salamanca, CIBERONC-CB16/12/00233, 37007 Salamanca, Spain
 - ³ Statistics Department, University of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain
 - ⁴ Systems and Computing Department (COPPE-PESC), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro 21941-914, Brazil
 - ⁵ Organic Chemistry Section, Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37008 Salamanca, Spain
 - ⁶ Bioinformatics and Functional Genomics Group, Cancer Research Center (CiC-IBMCC, CSIC/USAL), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and University of Salamanca (USAL), 37008 Salamanca, Spain
 - ⁷ Proteomics Unit, Cancer Research Centre-IBMCC, IBSAL, Campus Miguel de Unamuno s/n, University of Salamanca-CSIC, 37008 Salamanca, Spain
- * Correspondence: mfuentes@usal.es



Citation: Landeira-Viñuela, A.; Alcoceba-Sanchez, M.; Navarro-Bailón, A.; Arias-Hidalgo, C.; Juanes-Velasco, P.; Sánchez-Santos, J.M.; Lecrevisse, Q.; Pedreira, C.E.; García-Vaquero, M.L.; Hernández, Á.-P.; et al. Systematic Evaluation of Antigenic Stimulation in Chronic Lymphocytic Leukemia: Humoral Immunity as Biomarkers for Disease Evolution. *Cancers* **2023**, *15*, 891. <https://doi.org/10.3390/cancers15030891>

Academic Editors: Richard Rosenquist Brandell and Carlos S. Moreno

Received: 10 November 2022

Revised: 12 January 2023

Accepted: 25 January 2023

Published: 31 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Clonal B cell expansion in chronic lymphocytic leukemia may be triggered by persistent antigenic stimulation. Therefore, studying the dynamics of the humoral response of these patients provide information about serological immunoglobulin levels and identifies which antigens compromise the immune response. Hence, this study is a new point of view that could provide additional information useful in patient stratification and also selection of targeted therapy.

Abstract: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia in the Western world. Studies of CLL antibody reactivity have shown differential targets to autoantigens and antimicrobial molecular motifs that support the current hypothesis of CLL pathogenesis. **Methods:** In this study, we conducted a quantitative serum analysis of 7 immunoglobulins in CLL and monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) patients (bead-suspension protein arrays) and a serological profile (IgG and IgM) study of autoantibodies and antimicrobial antigens (protein microarrays). **Results:** Significant differences in the IgA levels were observed according to disease progression and evolution as well as significant alterations in IgG1 according to IGHV mutational status. More representative IgG autoantibodies in the cohort were against nonmutagenic proteins and IgM autoantibodies were against vesicle proteins. Antimicrobial IgG and IgM were detected against microbes associated with respiratory tract infections. **Conclusions:** Quantitative differences in immunoglobulin serum levels could be potential biomarkers for disease progression. In the top 5 tumoral antigens, we detected autoantibodies (IgM and IgG) against proteins related to cell homeostasis and metabolism in the studied cohort. The top 5 microbial antigens were associated with respiratory and gastrointestinal infections; moreover, the subsets with better prognostics were characterized by a reactivation of Cytomegalovirus. The viral humoral response could be a potential prognosis biomarker for disease progression.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia; antimicrobial antibodies; autoantibodies; protein microarrays

1. Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is one of the most common leukemias present in the Western adult population. The clinical manifestation of this disease is an accumulation of clonal B lymphocytes (B-CLLs) in peripheral blood (PB), bone marrow, and lymphoid organs. These B-CLLs are CD5⁺, CD19⁺, CD23⁺; there are also low levels of CD21, CD22, CD79, and FcRIIb and high levels of CD23, CD25, CD69, CD71, and the surface immunoglobulins (Ig) IgM and IgD that are accompanied by genetic mutations throughout disease development and progression [1–5]. There is a previous stage called monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL), which is characterized by the presence of B-CLLs in PB and the absence of clinical manifestations [6,7]. In general, CLL is a highly heterogeneous disease from clinical and biological points of view. At the clinical level, there are asymptomatic patients whose disease could remain stable for years without any therapeutically intervention; in other cases, they present an aggressive form of the disease that requires early treatment and presents a short survival. From the biological point of view, there are the cytogenetics alterations (del (13q), del (11q), trisomy 12, and del (17p)), abnormalities at the protein and/or mRNA expression levels, single-nucleotide polymorphisms (SNPs), and point mutations (presence/absence) in the genes of the variable region of the immunoglobulin heavy chain (IGHV) [3,6–10].

Another characteristic of the CLL is the alteration of the immune system in terms of both the innate and adaptive immune responses. These alterations affect immune surveillance, which allows tumor progression and therefore affects the course of the disease [5,11,12]. This is due to the interconnection and intercommunication of the B-CLLs with other cells of the immune system. The importance of the tumor microenvironment (TME) is well known in terms of the cellular recruitment and alteration of nontumor cells (such as the expansion of T lymphocytes and exhausted NK cells) and/or the decrease in circulating normal B cells; thus, the TME increases a patient's susceptibility to infections, autoimmune phenomena, and/or the development of secondary malignancies [7,12–14].

B cells are responsible for the humoral response (because they produce antibodies—Abs-) and also act as antigen-presenting cells (APCs). The selection, development, proliferation, and survival of B cells are determined by the activation of BCR signaling pathways in response to antigen stimulation. BCR is a membrane Ig that is capable of detecting microbial antigens (mAgs) and also autoantigens (aAgs), which are directly involved in triggering processes related to B-CLL survival and proliferation (whether pathological or not) [3,15].

Currently, the IGHV mutational status is one of the biomarkers that allows the stratification of CLL patients and is stable from the onset and development of the disease. It is well known that when IGHV is mutated (M-IGHV), patients present an indolent disease with an anergic and antiapoptotic response, while those CLL patients without IGHV mutations (U-IGHV) have an active and proliferative response that leads to a rapid evolution of the disease and consequently a short survival [15,16].

Therefore, an uncontrolled proliferation of B-CLLs facilitates the acquisition of genetic mutations over time; however, the inherent somatic hypermutation (Ig heavy chain or light chain) of B cells should also be noted. In fact, somatic hypermutation is responsible for producing isotype changes in the BCR. This process can only occur in germinal centers on activated naïve B cells and memory B lymphocytes before their differentiation to plasma cells (antibody (Ab)-secreting cells) [5,17]. A stereotyped BCR is presented in 30% of CLL patients that is based on the structural similarity of the complementary determining regions, thus forming a restricted set of Ig genes (IGHV1-69, IGHV3-7, IGHV3-21, and IGHV4-34 as the more featured stereotypes) [18]. In addition, these B-CLLs commonly present IgM in their membranes (Ig reactive to a wide variety of antigen epitopes); however, the autoimmunity developed by these CLL patients seems to be restricted to aAgs mostly expressed by blood cells (erythrocytes, platelets, and granulocytes) and mediated by IgG autoantibodies (aAbs) [5,19].

At the time of diagnosis in CLL patients, hypogammaglobulinemia is known, which mostly affects the levels of IgG, IgM, and IgA in the serum. This fact increases the risk of infections; therefore, the morbidity and mortality of CLL patients are also increased [7,20,21]. In addition to this fact, the disease stage and therapies are directly correlated with the risk of infection. Hence, studies have reported a wide range of infections in these patients that included from bacterial respiratory tract infections to erythema (such as those caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Escherichia coli*), viral reactivation (varicella-zoster, herpes simplex virus (HSV), cytomegalovirus (CMV), and Epstein–Barr), opportunistic infections (*Listeria*, *Aspergillus*, *Candida*, and *Cryptococcus*), parasites, and mycobacteria among many others [20,22–24].

Bearing all of this in mind, in this study, we quantitatively analyzed the Ig serum levels (IgM, IgA and IgG and their subclasses) at different disease stages (diagnosis and evolution). In addition, this CLL cohort was screened against a targeted panel of aAbs and antimicrobial Abs (mAbs) to decipher any relevant antigen (Ag) pattern in the disease progression and/or evolution.

2. Materials and Methods

2.1. Patient Cohort

A total of 67 PB samples (10 mL/case) were obtained in EDTA-coated tubes from 57 CLL diagnostic adults and 10 MBL diagnostic adults between May 2018 and October 2020 (29 females and 38 males; median age of 70 years ranging from 36 to 91 years) (Table 1). The diagnosis was made according to the National CLL Guidelines of the Spanish CLL Group (GELLC) based on the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (iwCLL) [25], and the staging was performed according to Binet and Rai criteria [26,27]. Each individual signed an informed consent before participating in the study, which was approved by the local ethics committee of the University Hospital of Salamanca (HUS; Salamanca, Spain).

Table 1. Clinical characteristics of patient cohort.

Clinical Information		Frequency (n)	Percentage (%)
Gender	Female	29	43.3
	Male	38	56.7
Age	≤65	24	35.8
	>65	43	64.2
Diagnosis	MBL	10	14.9
	CLL	57	85.1
CLL status	Stable/constant	42	73.7
	Progression	15	26.3
Binet stage	A	54	80.6
	B	6	9
	C	7	10.4
Rai stage	0	45	67.2
	I	5	7.5
	II	10	14.9
	III	1	1.5
Treatment status	IV	6	9
	Previous to first-line	9	60
IGHV gene status	Time from first-line	5	33.3
	Mutated	45	67.2
Cytogenetic	Unmutated	22	32.8
	Normality	24	35.8
Abnormality	Abnormality	43	64.2
	Total	67	100

2.2. Serum Sample

Regarding the CLL samples, the PB samples (10 mL/case) were centrifuged immediately after collection at $800 \times g$ for 10 min (min) at room temperature (RT), and the plasma was stored in aliquots at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further use.

Then, 1 mL of plasma from each patient was defrosted on ice, centrifuged for 5 min at $200 \times g$, aliquoted at $100\text{ }\mu\text{L}$ /sample in 96-well polypropylene PCR microplates (Axygen, Somerville, MA, USA), and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further analysis.

For the reference serum sample (Ref.), we employed a standardized plasma from the National Institute of Standards and Technology (909c Frozen Human Serum, NIST, Gaithersburg, MD, USA). It was a pool of plasma from healthy individuals (age range: 25–80 years). This serum was diluted in PBS $1 \times \text{Na}^+/\text{K}^+$. Aliquots of $30\text{ }\mu\text{L}$ were made and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further analysis.

2.3. Evaluation of Immunoglobulin Quantitative Levels

For all samples, we conducted a study of 7 isotypes of Ig (IgM, IgA, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4).

2.3.1. Immunoglobulin Profiling

In this study, the 7 isotypes were simultaneously determined via Luminex technology (Luminex Inc, Brooklyn, NY, USA) in all serum samples. This determination was conducted using a Procarta Plex Human antibody isotyping kit (Invitrogen, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The MAGPIX[®] reproducibility was evaluated with calibration and verification kits according to the manufacturer's instructions (MPXIVD-CAL-K25 and MPXIVD-PVER-K25, respectively). The standard curve for each isotype was added in duplicate for each experiment. After acquisition, a five-parameter logistic (5PL) curve was obtained, and the standard recovery was calculated using the following equation:

$$\frac{[\text{Observed concentration}]}{[\text{Expected concentration}]} \times 100$$

Values for samples above the recovery range (70% to 130%) were considered accurate as recommended by the manufacturer.

2.3.2. Data Analysis of Immunoglobulin Profiles

The xPONENT[®] software (version 4.2) for the Luminex instrument was used for data analysis. Data concentration was conducted using a 5PL curve-fitting algorithm, the equation for which was as follows:

$$y = a + \frac{b - a}{\left(1 + \left(\frac{x}{c}\right)^d\right)^f}$$

where a , b , c , d , and f are coefficients; y is the net median fluorescence intensity; and x is the concentration in pg/mL.

2.4. Evaluation of Autoantibody Serum Profiles

2.4.1. Autoantibodies to Known Tumoral and Neoplasm Antigen Proteins

For the analysis of aAbs, we employed a commercial protein array containing 122 proteins (Supplementary Table S1) provided by GeneCopoeia[™] (Rockville, MD, USA). The serum screening was performed following the manufacturer's instructions.

In this assay, the final working dilution (1:10 v/v) of serum samples was supplemented with DNase I (DNase I and associated buffer (cat. nos. M0303S and B0303S, respectively; New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA), 0.1 M DTT, and nuclease-free water. Mix buffer was used as a negative control. All diluted serum samples and the control were incubated for 30 min with mild stirring at RT.

All the arrays were incubated with blocking buffer (PBST, 5% *p/v* BSA) (100 μL /well) for 30 min with shaking at RT. Washings (2 \times) were conducted with PBST (PBS 1 \times Na²⁺K⁺, 0.05% *v/v* Tween 20) for 5 min with shaking at RT.

The working dilutions of serum samples and the control were diluted 1:10 (*v/v*) in PBST (100 μL /well) and incubated for 1 h with mild stirring at RT. After that, arrays were washed (3 \times) at RT with mild stirring. The first and last washing were conducted with 100 μL /well of PBST. A second washing was conducted with 100 μL /well of blocking buffer.

Secondary Ab incubation was performed with 100 μL /subarray of a solution containing a cocktail of secondary Abs (Cy3-AffiniPure Donkey Anti-Human IgG, Cat. no. 709-165-149, Jackson ImmunoResearch, Ely, UK and Alexa Fluor 647-AffiniPure Goat Anti-Human IgM, cat. no. 109-605-043, Jackson ImmunoResearch, Ely, UK) at a final dilution 1:1000 (*v/v*) and incubated for 1 h with mild stirring at RT.

At least seven washings were performed with mild stirring for 5 min at RT. The first three washes were with 100 μL /well of PBST, the next two washes were with 45 mL/array of PBS 1 \times Na²⁺K⁺, and the last two washes were with 45 mL/array of nuclease-free water. Finally, the arrays were dried and scanned as described in Section 2.4.3.

2.4.2. Profiling Antimicrobial Antibodies via Stimulation Persistent Antigenic Array

A stimulation-persistent antigenic array (SPA array) was designed and developed that contained 37 mAgS (Supplementary Table S2) among 10 array controls (positive and negative). The total array content was deposited via noncontact printer (Arrayjet Printer Marathon 1.4) using a 1:1 (*v/v*) dilution in Arrayjet printing buffer C and PBS 1 \times Na²⁺/K⁺.

The SPA array was designed with a slideout of 7 subarrays with 4788 total spots. Each subarray contained 5 serial dilutions of each mAg and IgG (range: 0.08 to 1 \cdot 10⁻⁵ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) among each Ab, and dye as controls (at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were also deposited. All of the 188 probes and controls were printed in triplicate on a chemically activated glass surface prepared according to a previously study by M. González-González et. al. in 2014 [28]. The microarrays were incubated in the dark; first for 2 days at RT and subsequently for 10 days at 37 °C. These dried arrays were packed and placed in dark storage at RT until further use.

All of the arrays were incubated with Blocker™ BSA 1X (cat. no. 37525, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) for 1 h with shaking and RT. Washings (3 \times) were conducted with distilled water for 5 min at RT with shaking.

Serum samples and the negative control (PBS 1 \times Na²⁺/K⁺) were diluted (1:10 *v/v*) in Blocker™ BSA 1 \times . Subsequently, 100 μL /subarray of this dilution was incubated overnight at 4 °C in an orbital shaker. After that, washings (3 \times) were conducted with PBST for 5 min at RT with mild stirring.

Secondary Ab incubation was conducted with 100 μL /well of cocktail of secondary Abs (Cy3-AffiniPure Donkey Anti-Human IgG; cat. no. 709-165-149, Jackson ImmunoResearch, Ely, UK; and Alexa Fluor 647-AffiniPure Goat Anti-Human IgM, cat. no. 109-605-043, Jackson ImmunoResearch, Ely, UK) at a final dilution 1:1000 (*v/v*) and incubated for 1 h with mild stirring at RT.

Seven washings were conducted with shaking for 5 min at RT. The first three washes were with 100 μL /well of PBST, the next two washes were with 45 mL/array of PBS 1 \times Na²⁺/K⁺, and the last two washes were with 45 mL/array of distilled water. Finally, the arrays were dried and scanned as described below.

2.4.3. Image Acquisition

The scanning was conducted with a GenePix® 4000B Microarray Scanner (Axon, Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The parameters were set to quantify signal-intensity values for Cy3 ($\lambda = 532$ nm) and Alexa Fluor 647 ($\lambda = 635$ nm). The TIFF images obtained via the array scanning were analyzed using GenePix Pro 6.0 software (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

2.5. Data Analyses

For all analyses, the samples were classified according to the clinical characteristics of the patients (diagnosis: MBL and CLL; disease evolution: CLL stable/constant (c-CLL) and progression (p-CLL); line of treatment/therapy response: CLL group previous to first-line treatment (CLL-PFT)- and another group subsequent to first-line treatment (CLL-TFT); and IGHV mutational status: M-IGHV and U-IGHV) (Supplementary Table S3).

2.5.1. Quantitative Determination of Immunoglobulin Level Profiles

Values under the detection limit were substituted with 10% of the lowest value for each analyte [29]. All of the results were reported in pg/mL and Log_{10} transformed for further analysis.

First, conventional statistics analyses were conducted using the software R v. 4.1 under RStudio v. 2022.02.0. The normality of the data was studied using the Shapiro–Wilk normality test. The homoscedasticity between categories of the factor variables was verified using the Fligner–Killeen test and Bartlett’s test. According to whether the variables were normal and homoscedastic/heteroscedastic, the search for significant differences between categories conducted using ANOVA (for more than two categories) and the t -test (two-by-two categories), respectively. When variables were non-normal and homoscedastic/heteroscedastic, the search for significant differences between categories was conducting using a Kruskal–Wallis test (for more than two categories) and the Wilcoxon–Mann–Whitney test (two-by-two categories), respectively. The post hoc tests used were Tukey’s, a t -test, or a Wilcoxon depending on the corresponding global test of significant differences. A significance level of 5% was set for all of the statistical tests.

Graphical representations and visualizations were achieved using spreadsheets, Infinicyt™ 2.0.5 (Cytognos SL, Salamanca, Spain), and GraphPad Prism Software v. 8.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

2.5.2. Data Preprocessing and Dataset Analyses

The fluorescence signal retrieved from processed images was corrected by subtracting the background signal and transformed into a Z-score [30]. For each spot, the fluorescence signal was obtained according to following steps:

- (i) Signal normalization (S):

$$S = \frac{\widetilde{F}_\lambda - \widetilde{B}_\lambda}{B\sigma_\lambda}$$

where \widetilde{F}_λ is the median signal intensity of the feature pixels, \widetilde{B}_λ is the median signal intensity of the background pixels, and $B\sigma_\lambda$ is the standard deviation for the background pixels at a selected wavelength ($\lambda = 532 \text{ nm}$ or 635 nm) [31].

- (ii) Negative control (S_{neg}) signal intensity:

$$S_{neg} = \frac{\sum S_p}{N}$$

where S_p is the normalized signal for a selected spot (incubated with the negative control) and N is the number of subarrays (belonging to the same incubation).

- (iii) Spot signal intensity (I):

$$I = S_y - S_{neg}$$

where S_y is the normalized signal for the spot and S_{neg} is the normalized signal for the corresponding negative control spot.

- (iv) Ag average signal intensity (\bar{I}_m):

$$\bar{I}_m = \frac{\sum I_y}{Z}$$

where I_y is the signal intensity at a selected spot and Z is the number of replicas.

- (v) Spot selection with respect to the Ref.:
- Only Ags with a signal intensity > 0 were considered.
 - Selection of Ag-positive signals above compared to Ref.:

$$\bar{I}_m^s > \bar{I}_m^r + I_m^r \sigma$$

where \bar{I}_m^s and \bar{I}_m^r are the average signal intensity of the Ag for the sample and the Ref., respectively; and $I_m^r \sigma$ is the standard deviation signal intensity of the Ag for the Ref.

- (vi) Ag Z-score:

$$Z \text{ score} = \frac{\bar{I}_m^s}{\bar{I}_m^r + I_m^r \sigma}$$

- (vii) Number ($n\#$) of Ag hits for each Ab isotype or clinical groups (hits).

In the case of the study of mAbs, the selection of the optimal concentration was performed using Infinicyt™ 2.0.5 software (Cytognos SL, Salamanca, Spain). The analysis of each concentration was conducted according to the hits number for IgM, IgG, and the match between both isotypes. After this grouping, only the top 5 mAbs were visualized for each isotype. This top 5 list was grouped according to the detected Ab isotype and the analysis described above (IgM, IgG, or both Abs for the same Ag).

For the generation of the databases and graphical representations, we used spreadsheets and Infinicyt™ 2.0.5 (Cytognos SL, Salamanca, Spain) based on information from the neXtProt [32], String 11.5 [33], Reactome [34], and Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org, accessed on 19 June 2022) [35–37] databases.

3. Results

3.1. Quantitative Immunoglobulin Levels

Statistical analysis of the Ig concentration displayed a non-normal distribution independently of the compared subsets (diagnosis (MBL/CLL), disease evolution (c-CLL/p-CLL), therapy response (CLL-PFT/CLL-TFT), or IGHV mutational status (M-IGHV/U-IGHV)) except for IgG2 (Supplementary Figure S1).

We observed significant variations in the IgA levels according to disease evolution (c-CLL vs. p-CLL) and for IgG1 according to IGHV mutational status (M-IGHV vs. U-IGHV) (Supplementary Figure S2).

In a further analysis according the clinical/diagnosis groups, several patterns were observed: (i) IgG3 and IgA decreased according to disease evolution (c-CLL to p-CLL) (Supplementary Figure S2B); (ii) the Ig serum levels were constant in the MBL and c-CLL subsets, but a reduction in the Ig concentration was observed in the CLL-PFT subset, and slight increase in the Ig serum levels was observed in the CLL-TFT subset (Supplementary Figure S2C); and (iii) the mutational status was also reflected in reduced IgG1 serum levels when U-IGHV and M-IGHV were compared (Supplementary Figure S2D).

According to the disease evolution and progression, we observed the expected distribution across high-abundance Ig in the serum. A deep view within the IgG subclasses also revealed differences according the disease evolution and progression (Figure 1). For example, IgG1 was higher and IgG4 was lower when comparing MBL (Figure 1A), p-CLL (Figure 1B), and CLL-PFT (Figure 1C). Nevertheless, the IgG2 serum levels for the CLL (Figure 1A), c-CLL (Figure 1B), CLL-TFT (Figure 1C), and U-IGHV (Figure 1D) subsets were similar to those of IgG1; and for M-IGHV (Figure 1D), their serum levels were higher than for IgG1.

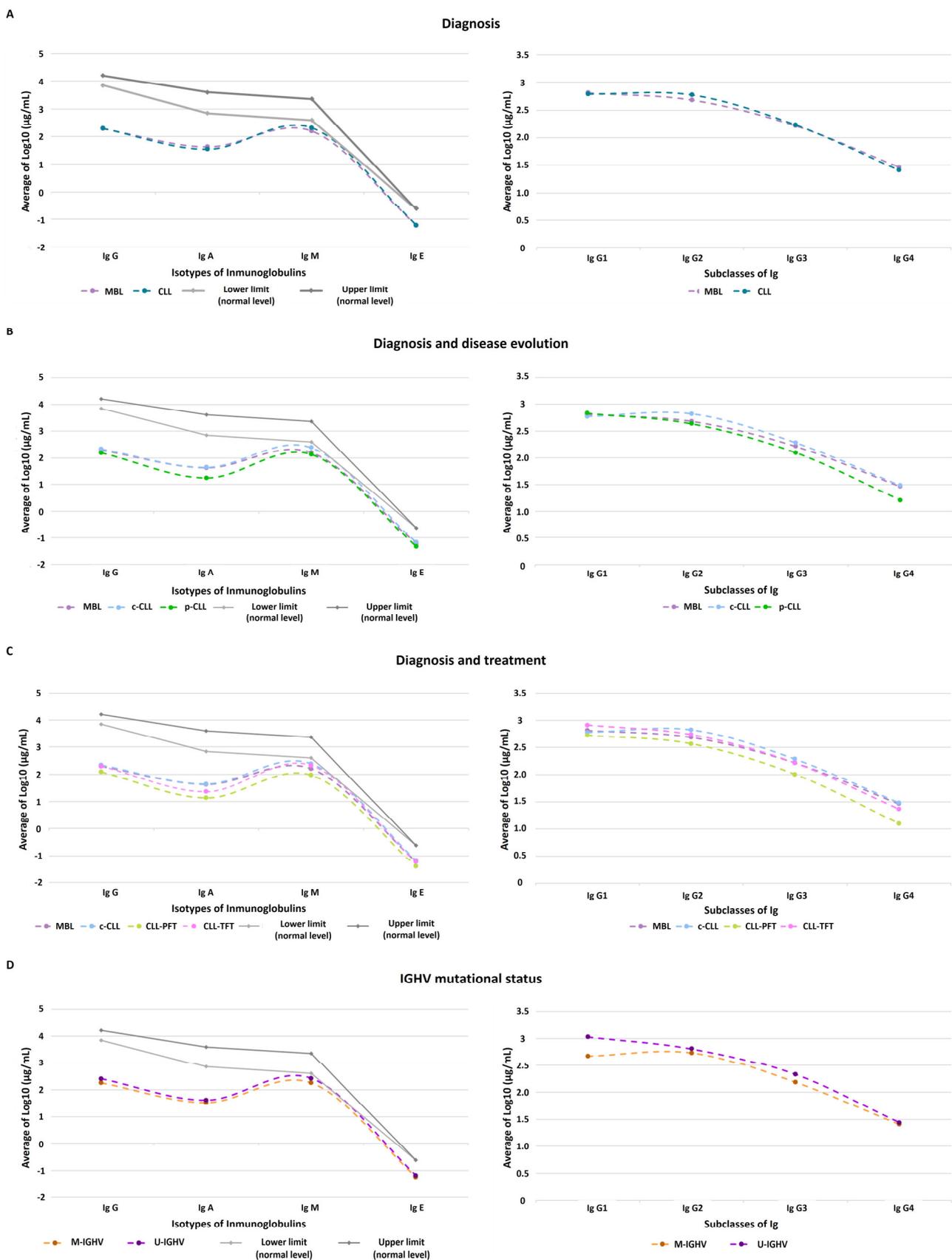


Figure 1. Quantitative immunoglobulin profiles according to clinical/diagnosis subsets: (A) MBL and CLL groups; (B) MBL, c-CLL, and p-CLL groups; (C) MBL, c-CLL, and treatment (CLL-PFT and CLL-TFT) groups; (D) IGHV mutational status (M-IGHV or U-IGHV).

3.2. Autoantibodies to Known Tumoral and Neoplasm Antigen Proteins

The serological profile of aAb against tumor antigens (TAs) showed a high homogeneous distribution for IgG compared to IgM (Supplementary Figure S3). Overall, the IgM profile displayed a normalized signal intensity that was 0.3 to 15 fold higher than the Ref.; meanwhile, the intensity was 0.2 to 42 fold higher than the Ref. for IgG (Supplementary Table S4).

In the top 10, the TAs observed for IgM were mostly against mutagenic proteins (ALDOA, ANXA1, THYG, BGLR, or LAMP-2), the most frequent subcellular localization of which was the cytoplasm (Cyt.) and vesicles (Ves.). In addition, IgM against CMV, protein E4 of human papillomavirus type 11 (HPV-11 E4), and CA72-4 was identified (Figure 2A and Supplementary Table S5). On the other hand, the 10 most frequent TAs detected by IgG were CA15-3 and CD274 (both are well-known tumoral biomarkers), the E6 protein HPV-11 (HPV-11 E6), and nonmutagenic proteins (PD-L1, NP1L3/NP1L4, MMP-2, Ox40L, and GBU4-5/TDRD-12), among others. Regarding subcellular localization for all of the detected TAs, a particular subcellular location was not observed (membrane (Mem.), Cyt., Ves., secreted (Secr.), and nucleus (Nuc.)) (Figure 2B and Supplementary Table S5).

Among these observations of the top 10 TAs, it is relevant to highlight that there were both isotypes against the E4 protein of HPV type 6a (HPV-6a E4) in 52% of the studied samples and 38% against SCCA (Figure 2C).

According to the disease progression and IGHV mutational status, the majority of the TAs in the top 5 list were proteins located on Ves. (AGTR1, LAMP-2, IL-6, MMP-2, Ox40L, CAP7, APOB, and TWEAK). Independently of the studied subset, LAMP-2 and AGTR1 were detected by IgG aAbs, while MMP-2 was detected by IgM aAbs except for CLL-TFT (Supplementary Table S6). In addition, ENOB was a TA observed by both isotypes and in all subsets. In this analyzed cohort, most of the detected TAs were nonmutagenic proteins and located in Ves. (AGTR1, MMP-2, Ox40L, and TWEAK).

3.3. Profile of Antimicrobial Antibodies according to Stimulation Persistent Antigenic Array (SPA Array)

Firstly, the SPA array displayed the best performance in the serum screening at 0.0001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ [mAg] (Table 2).

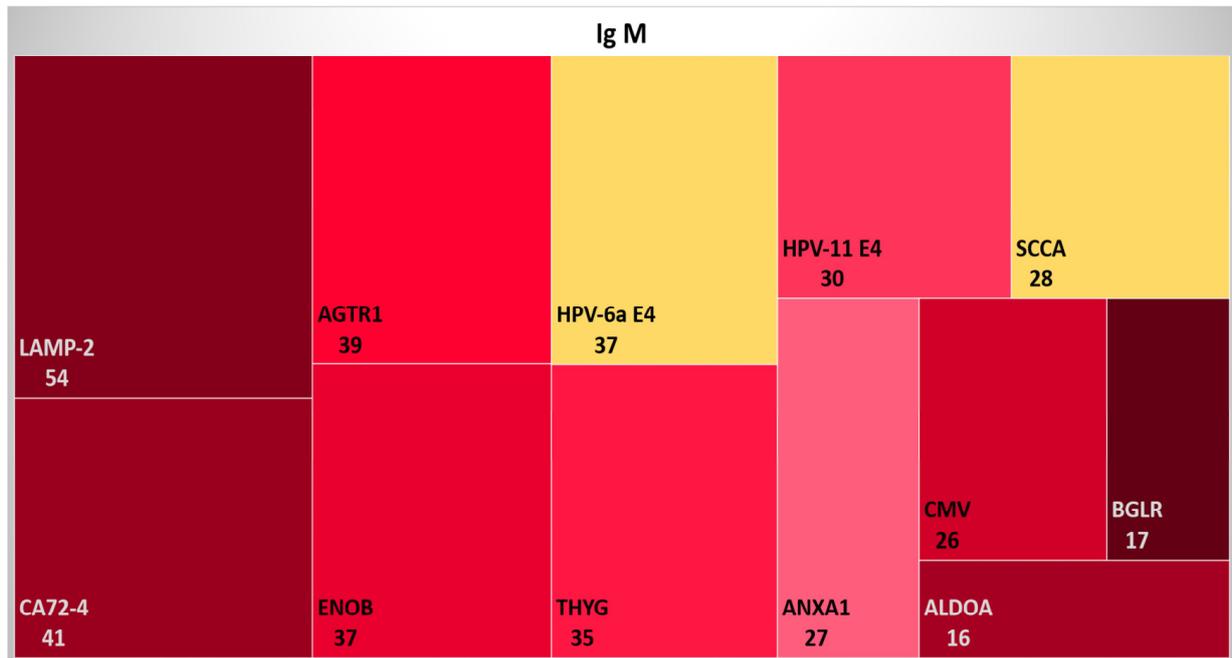
Table 2. Global number of microbial antigens (mAgs) detected in this screening after analysis of 37 different mAgs.

Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	S < Ref. n# of mAgs	mAgs					
		Ref. > S			Ref. < S		
		IgM	IgG	IgM and IgG	IgM	IgG	IgM and IgG
0.08 and 0.06	11	11	7	8	3	0	3
0.01	3	26	1	7	7	0	3
0.001	8	16	1	12	4	0	5
0.0001	12	10	3	12	1	0	5
0.00001	5	12	1	19	5	0	5
		mAgs (n#)			Top 5 mAgs (n#)		

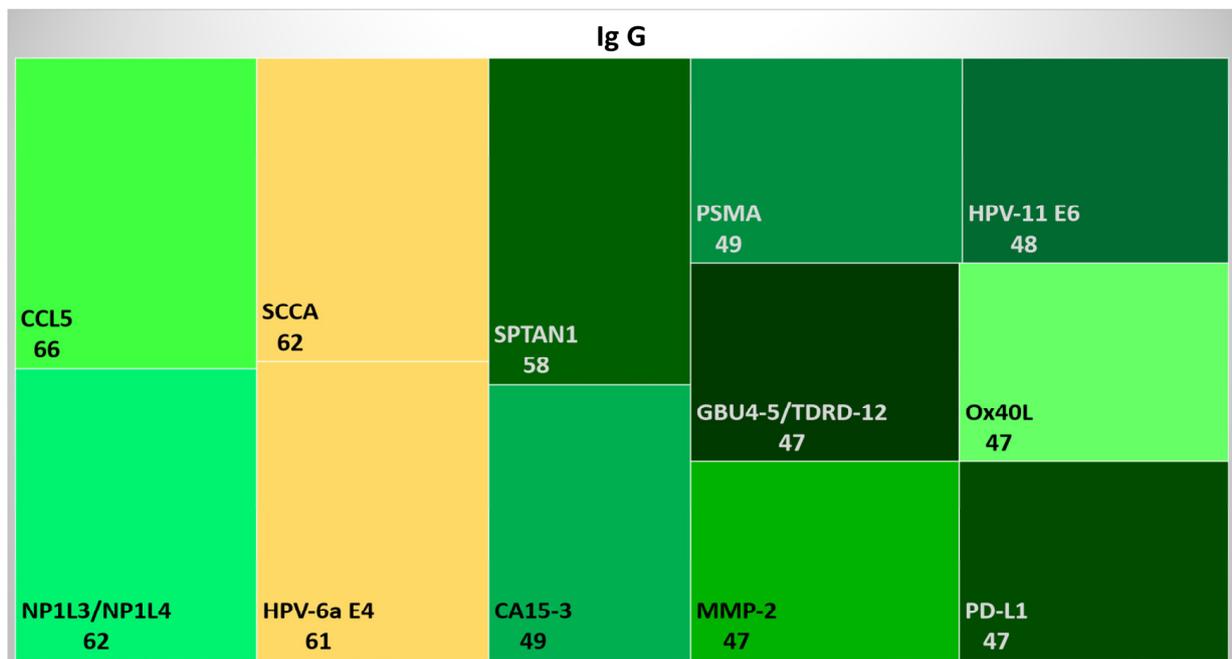
Note: mAgs, microbial antigens; n#, number; S, normalized signal intensity; Ref.: NIST standard.

At 0.0001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ [mAg], the majority of mAgs with a higher normalized signal intensity than the Ref. (NIST standard) were detected by both Ig isotypes followed by IgM and IgG. Most of them were viruses that affected the respiratory and gastrointestinal tracts (Supplementary Figure S4A).

A



B



C

TAg	n# of hits			hits relative percentage (%)		
	Ig G	Ig M	Ig M & Ig G	Ig G	Ig M	Ig M & Ig G
HPV-6a E4	26	2	35	38.81	2.99	52.24
SCCA	36	2	26	53.73	2.99	38.81

Figure 2. Quantitative summary of top 10 tumoral antigens (TAs) detected in this study: (A) TAs detected by IgG autoantibodies (aAbs) in the studied cohort; (B) TAs detected by IgM aAbs in the studied cohort; (C) number (*n#*) and percentage (%) of samples for each detected aAb with respect to the total studied cohort.

mAgs detected by IgM corresponded to bacteria and viruses responsible for infections of the respiratory and gastrointestinal tracts, mucosa, blood, and erythema (Supplementary Figure S4B); while mAgs detected by IgG corresponded to gastrointestinal viruses (Supplementary Figure S4C). The presence of both isotypes in the serum was detected against viruses, bacteria, and fungi related to respiratory, gastrointestinal, hepatic, mucosa, erythematous, and salivary gland infections (Supplementary Figure S4D).

The serological profile of mAbs against mAgs showed a high homogeneous distribution for IgM compared to IgG (Supplementary Figure S5). Overall, the normalized signal intensity was 0.5 to 4 fold higher than the Ref. for IgM; meanwhile, it was 0.3 to 1 fold higher to the Ref. for IgG (Supplementary Table S7).

The 10 most frequent mAgs in the studied cohort are displayed in Supplementary Table S8. We observed that most of the IgM was against viruses and bacteria from respiratory tract infections (influenza A (FLU.Ohio), human metapneumovirus (hMPV.16 and hMPV.9), respiratory syncytial virus B (RSV.B), SARS-CoV-2 and *Streptococcus pneumoniae* (SPN)), and a fungus from a mucosal infection (*Candida albicans* (CAV)) (Figure 3A); while it mostly detected IgG Abs against respiratory tract infection virus (FLU.Ohio, Measles (MV), RSV.B, and SARS-CoV-2) and bacteria (*Leptospira biflexa* (LB.Patoc1) and SPN) (Figure 3B). Only between 1.5% and 4.5% of patients in the cohort had both serum isotypes present against SPN, CMV, Echovirus (EV), Flu.Ohio, and RSV. B (Figure 3C).

According to the disease progression/treatment and IGHV mutational status, among the five most frequent mAgs there was the presence of IgM against hMPV.16 and IgG against EV and parvovirus (PV) regardless of the analyzed subset (except for the CLL-TFT group, in which hMPV.16 and EV were not detected) (Supplementary Table S9).

The majority of the top 5 mAgs were related to viral gastrointestinal infections (CMV, hepatitis C virus (HCV), hMPV.16, herpes simplex viruses 1 and 2 (HSV.1 and HSV.2), mumps virus (MuV), MV, rubella virus (RV), SARS-CoV-2, EV, PV, norovirus GI.1 and GII.4 (NoVGi.1 and NovGii.4), rotavirus (RV), astrovirus (HastV.1), and enterovirus (EV.COXB3)), a fungus (CAV), and a bacteria (*Salmonella typhi* (STY)). Among these observations, it is relevant to highlight those gastrointestinal viruses regardless of the subset in which they are detected due to the presence of IgG mAbs in the serum. For the CLL, c-CLL, and M-IGHV subsets, there was the presence of IgM mAbs against the hemolysin E protein of STY; while for p-CLL, CLL-TFT, and U-IGHV there was the presence of IgG mAbs against the outer membrane protein of STY.

A

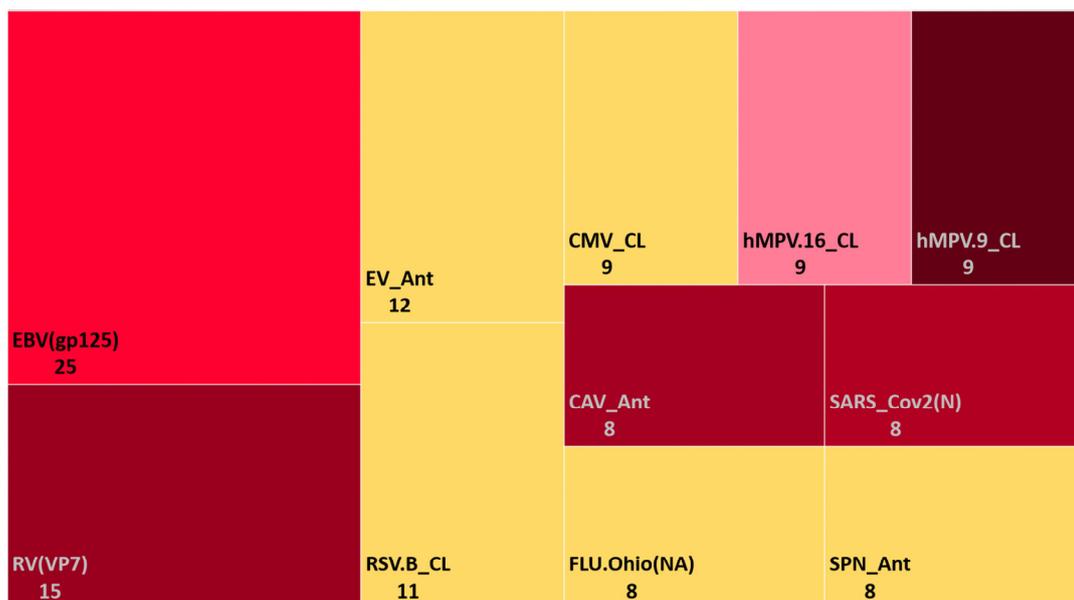


Figure 3. Cont.

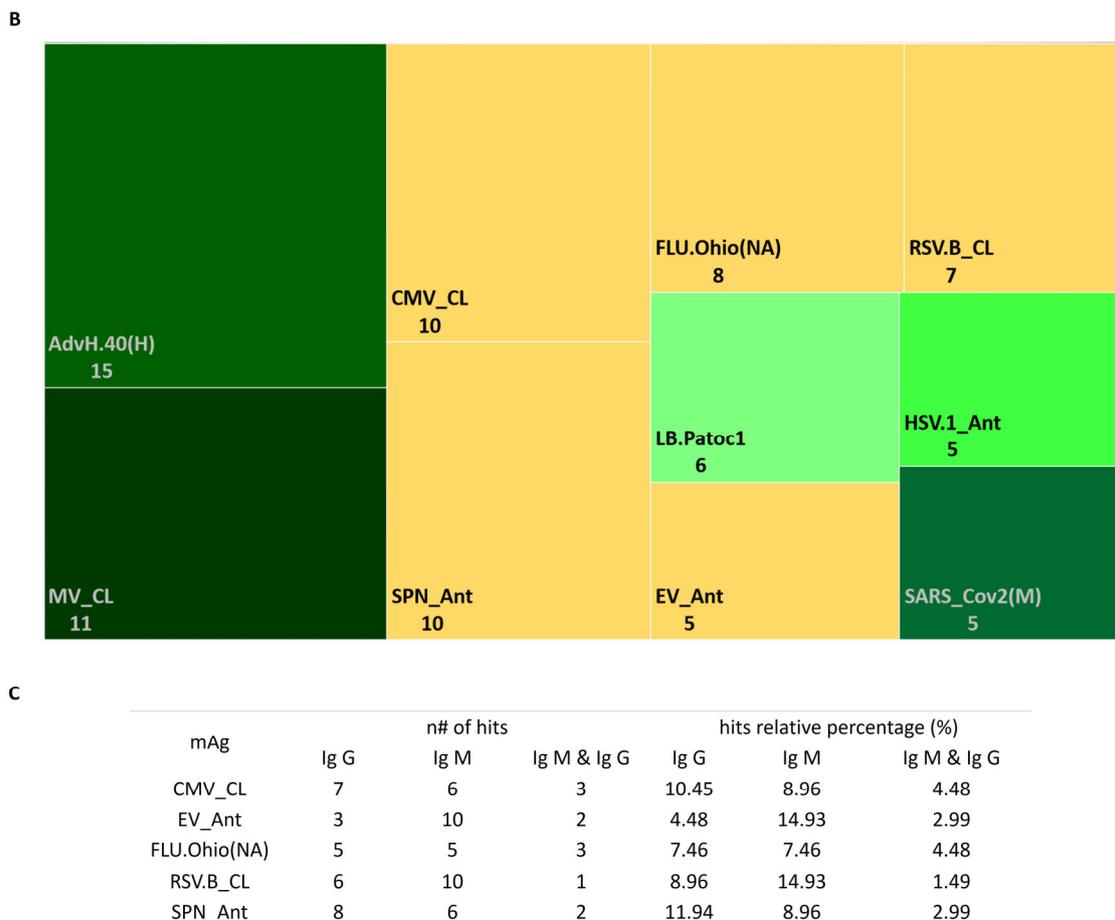


Figure 3. Quantitative summary of top 10 microbial antigens (mAg) detected in this study: (A) mAg detected by IgG antibodies (Abs) in the studied cohort; (B) mAg detected by IgM Abs in the studied cohort; (C) number (*n*%) and percentage (%) of samples for each detected mAg with respect to the total studied cohort.

4. Discussion

Over the years, the prognosis and therapies of CLL patients have been significantly improved. The leading causes of death in CLL patients are mainly due to comorbidities and infections because CLL patients have a dysregulation of the immune system that is both innate and adaptive, which increases the risk of infection. Moreover, MBL patients are much more susceptible to infection than the general population [20,21,38]. In the disease progression for most CLL patients, the number of nonclonal B cells is decreased and the number of B-CLLs is increased. This leads to a reduced level of Abs in the PB, thereby triggering hypogammaglobulinemia [11,20,21]. Hypogammaglobulinemia is found in most CLL patients upon diagnosis, while a minority (15%) continue to show normal blood Ig levels [39]. For all these reasons, we systematically evaluated the serum Ig levels in CLL and a profile of aAbs and mAbs that these patients present at several stages of the disease (from the early stage to the most advanced one).

In this studied cohort, we observed that the IgG and IgM showed similar serum levels regardless of the disease stage and IGHV mutational status. In the general population, the relative abundance of Ig isotypes in the serum was higher for IgG and IgA and lower for IgM and IgE [40,41]. IgM, which is the first isotype that is expressed during the development of B cells, is responsible for providing a rapid response (primary humoral immune response) and regulatory tissue homeostasis. IgM recognizes a wide variety of pathogenic molecules (i.e., nucleic acids, lipids, and proteins) that are phylogenetically conserved and have normal levels in serum of between $10^{2.5}$ – 10^4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [40,42–47]. On the

other hand, the IgG isotype is an Ab that has a high affinity for its Ag because it occurs—like the rest of Ig isotypes other than IgM—during the evolution of Ab repertoires in response to antigenic stimulation and cytokine regulation. The normal serum levels that have been described were between $10^3 - 10^4$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ [40,42,43,47,48]. In CLL, it is well characterized that there are a high number of anergic and active lymphocytes that trigger an ineffective response, thereby increasing the production and release of IgM [18] and equalizing their serum concentrations with respect to the IgG isotype. On the other hand, the fact that IgM average levels were increased in the samples of CLL-TFT ([IgM] $> 10^2$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) with respect to CLL-PFT ([IgM] $< 10^2$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) and MBL ([IgM] $> 10^2$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) was due to the type of therapy received (treatment with ibrutinib). As indicated by Forconi et al., during the period of time that patients are treated with ibrutinib, their B-CLLs are deprived of the stimuli present in the TME. This induces in the B-CLLs an increment in IgM on the surface and decreases the expression of the rest of the Ig isotypes [5].

Regarding the IgA levels, we observed a significant reduction according to the disease progression (c-CLL and p-CLL) and even when patients were receiving treatment (10^2 – 10^1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As Ishdorj et al. [38] and Vitale et al. [11] previously reported, the decrease in IgA levels was correlated with disease progression and development because its levels were not restored when the patients were in targeted therapy (ibrutinib) (IgA normal range is $10^{2.5}$ – 10^4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Likewise, IgA serum levels were low in U-IGHV ([IgA] $> 10^{1.5}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$), which was associated with a poor prognosis [38]. This contrasted with the results observed by Peppas et al. [45] that several solid tumors exhibited increased IgA serum levels. Another relevant observation was that the average levels of IgM ([IgM] = $10^{2.3}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$), IgG1 ([IgG1] = $10^{2.9}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$), and IgG2 ([IgG2] = $10^{2.7}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) were increased in CLL-TFT with respect to the average levels in MBL ([IgM] = $10^{2.2}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, [IgG1] = $10^{2.8}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, and [IgG2] = $10^{2.6}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$), although the levels before the disease development could not be restored (IgM and IgA: $10^{2.5}$ – 10^4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [20,42].

Concerning the IgG subclasses in CLL, there are still many unknown aspects regarding the relative quantitative variations in serum. In this study, we detected higher levels of IgG2 in comparison with those of the IgG3 and IgG4 subclasses for the studied cohort, which was in accordance with previous studies by Copson et al. [49] and Lacombe et al. [50] but in contrast with one by Freeman et al. [20]. However, when the variations in the serum levels were determined for disease groups (MBL, p-CLL, and treatment), the known pattern of relative abundance in the serum was maintained [40,41,48]. These patterns are important and are related to the function of each IgG subclass: IgG1 mainly recognizes viruses and soluble and membrane protein Ags [41]; IgG2 recognizes soluble cytokines and bacterial polysaccharides and inhibits receptor–ligand interaction [41,43]; IgG3 recognizes viruses and Ags present on the membranes of blood cells [41]; and IgG4 is produced by repeated and long-term exposure to Ags in noninfectious environments (decreasing Ab-dependent cellular cytotoxicity and complement-dependent cytotoxicity prevents the binding of other isotypes of Ig to C1q) and recognizes helminths and parasites [17,41]. Therefore, imbalance levels in IgG subclasses could generate susceptibility and/or the severity associated with the disease [41,48]. This bias was observed for the CLL, c-CLL, CLL-TFT, and U-IGHV groups for IgG1 and IgG2, which had similar serum quantitative levels. Therefore, CLL, c-CLL, CLL-TFT, and U-IGHV presented reductions in the immune response against viruses, cell recruitment (monocytes, neutrophils, eosinophils, dendritic cells, and macrophages) and isotype changes. In the case of M-IGHV, this bias occurred for IgG2, so this group will not trigger a cytotoxic response via complement activation, it had low cell recruitment and as consequence, it could be more susceptible to infections by viruses, helminths, and parasites due to reduced levels of the rest of the IgG subclasses.

As is known, the immunogenicity of any biomolecule is due to its intrinsic properties (i.e., biochemical and structural properties), subcellular and cellular locations, mutations, and cross-reactive Abs (because the length of the epitope recognized by the Ab varies between 4 and 12 amino acids), among other characteristics [51–53]. In autoimmune diseases, aAgs are common intracellular molecules that B cells (via BCR recognition) and

Abs cannot access under normal conditions [54]. In this study, the cohort presented mostly IgM Abs against aAgs located in Cyt. and Ves. When this same observation was made with respect to the diagnosis, disease evolution, treatment, and IGHV mutational status, there was an increased presence of IgM Abs against aAgs located in Ves. This was consistent with the expected and reported results for autoimmune diseases. In addition, as the disease became more aggressive (p-CLL, CLL-PFT, CLL-TFT, or U-IGHV), more de novo aAgs were detected.

In general, TAs are cellular products that occur in both tumoral and normal cells; however, the levels of these products in blood and other body fluids are increased when a tumor develops. They include a wide variety of biomolecules (Ags on the surface of cells, Cyt. proteins, enzymes, hormones, oncofetal Ags, and oncogenes, among others) that are routinely used in clinical cancer diagnoses to evaluate the diagnostic and prognostic situation of the patient, thereby allowing an association of the serum levels with the stage of the tumor [55–57].

In this analyzed cohort, there was the presence of IgG against the tumoral markers CA 15-3 (soluble MUC1) and CD274 (soluble PD-L1); while for CA 72-4 (TAG-72), there was the presence in the serum of the IgM isotype. This might suggest that CA 72-4 is one of TAs related to disease evolution; meanwhile, CA 15-3 and CD274 were already present at constant levels prior at diagnosis. This contrasted with what was observed for CA 15-3 in other types of cancers such as breast cancer as well as a low expression of PD-L1 in the B-CLLs [58–60]. On the other hand, SCCA is a protein located in the Cyt. and Nuc. that is widely expressed in certain organs (such as the esophagus or female reproductive organs) under normal physiological conditions [61]. For these reasons and based on the results obtained from the studied cohort, it is feasible that 50% of the patients had only IgG. Moreover, the presence of both isotypes in 39% of the cases could be due to de novo Abs production against other protein epitopes because SCCA is a mutagenic protein. However, when the analysis was carried out in relation to the patient subsets, we observed that for the MBL patients, most of them displayed IgM against these TAs, which may have been indicative of cross-reactivity and consequently of de novo production of Abs.

It seems relevant to highlight that the list of top 5 TAs included IgM against MMP-2 and IgG against AGTR1 and LAMP-2, both of which were isotypes against ENOB regardless of the analyzed subset.

MMP-2, a protein involved in metabolic and enzymatic processes located in the Ves., is responsible for the degradation of the extracellular matrix due to its enzymatic action on type IV collagen. Its levels increase as a tumor develops; which causes a local decrease in pH in the microenvironment that triggers the activation of proteolytic enzymatic processes (the degradation of type IV collagen), thereby helping in the separation of tumor cells from the tissue and promoting their expansion [62,63]. Therefore, the presence of the IgM isotype in clinical subsets indicates an increase in the enzymatic activity of the degradation of the extracellular matrix (which allows the dissemination of tumor cells).

On the other hand, AGTR1, which is a component of the renin–angiotensin system (which is responsible for the maintenance of homeostasis), has highly detectable expression levels in the central nervous system, adrenal glands, thyroid, digestive system, or urinary system, among others, under normal physiological conditions [64]. Likewise, LAMP-2 is responsible for stabilizing the structure of the lysosome (an acid catabolic organelle located in all mammalian cell types except mature erythrocytes) by forming part of the lysosome membrane and functioning within lysosomal trafficking, exocytosis, chaperone-mediated autophagy, and cholesterol fusion and transport [65]. Therefore, the presence of IgG aAb and not IgM aAb for both TAs may have been due to the degradation/inhibition of the activity of these proteins in the TME. All of this contrasted with the observations in other cancers such as colon (for LAMP-2) or breast (for AGTR1), which presented an increase in expression levels and consequently a decrease in MMP-2 levels [64,65].

Likewise, in the current study, the presence of both isotypes of Ig against ENOB indicated that this might be a constitutive level in the early stages of disease because it is

a protein involved in the catabolism and anabolism of glucose [66] and is increased with disease progression and evolution; this was demonstrated by Griggi et al. [67] in a study conducted in CLL patients. Apart from this, ENOB acts as a plasminogen receptor that facilitates pathogen intrusion due to the degradation of the extracellular matrix (as was observed with *S. pneumoniae* infections, which was one of most prevalent mAgs in the studied cohort) [66].

Bearing in mind that IgM commonly are polyclonal, polyreactive, and low-affinity Abs, it seems that TAs recognized by IgM are correlated with tumoral progression and disease evolution as Ags increase their relative abundance (independently of mutagenesis and alterations). Therefore, it is expected that these aAbs will be generated de novo because IgM is the first Ig produced after the activation of B cells [46]. Likewise, the IgG isotype is an Ab secreted by memory B lymphocytes and plasma cells [48]. It is known that in aging, IgG aAbs increase, thereby revealing one of the immune tolerance mechanisms [51]. In autoimmune diseases, IgG and IgM increase, which is associated with disease pathogenesis [44]. Therefore, IgG aAbs might be generated in early stages of the disease and produced during progression due to the activation and differentiation of memory B lymphocytes into the plasma.

Dysregulation of the immune system is a key feature in the early stages of CLL and in disease progression due to an impaired humoral response and a weakened cellular response [12]. As discussed above, hypogammaglobulinemia is related to a functional deficiency in T lymphocytes and non-clonal B cells. It is correlated with the duration and the disease stage and also is associated with a susceptibility to infections [68,69]. It was previously observed that CLL patients with hypogammaglobulinemia were more prone to recurrent bacterial infections. In particular, low levels of IgG were associated with infections by *Streptococcus* and *Haemophilus*. They also had a delayed hypersensitivity to *C. albicans*, diphtheria toxin, and the Paramyxoviridae family [69,70]. In this cohort, we observed that 12% of the patients presented IgG Abs against *S. pneumoniae* vs. 9% of patients who presented IgM. In the case of *C. albicans*, ~12% of the patients presented IgG. When the comparison was performed for disease progression, among the five most recurrent mAgs, we observed in all subsets the presence of both isotypes of Ig against *C. albicans* except for CLL-PFT (IgM) and CLL-TFT (IgG). This was expected due to the hypersensitivity of these patients to fungal infections caused by *C. albicans* and recurrent reinfections due to *S. pneumoniae*.

Another aspect to consider was the intrinsic characteristics of the disease evolution and therapies received. The more advanced stage of tumor development and more lines of treatment that have been received; more prone a patient is to suffering infections. Therefore, in the clinic it is necessary to identify the mAg (bacteria, virus, or fungus) and the severity of the infection (mild, moderate, or severe) [21,24,25,68]. Likewise, monitoring via serological tests of certain viral infections is recommended before starting any treatment (such as the hepatitis B and C viruses, CMV, human immunodeficiency virus (HIV), HSV, or varicella-zoster, among others) [25].

It was previously observed that patients treated with chlorambucil (an alkylating agent) were more likely to present bacterial infections associated with *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, or Gram-enteric bacteria. In these patients, the focus of the infection is mostly on the respiratory tract and mucous membranes. In the treatment with fludarabine (a purine analogue), patients are not only more likely to suffer from the aforementioned infections, but also from opportunistic (*Listeria*, *Mycobacteria* or *Pneumocystis*) and viral (varicella-zoster and HSV) infections. The use of novel therapies is not exempted from the infection risk. Treatment with ibrutinib or venetoclax makes subjects more likely to suffer from severe pneumonia. On the other hand, therapy with ibrutinib also contributes to infections that originate in the respiratory and urinary tracts, opportunistic infections by *Pneumocystis jirovecii*, and an increased risk during the first 6 months of treatment of fungal infections (*Aspergillus* and *Cryptococcus*); while therapy with venetoclax makes them more susceptible to respiratory and opportunistic infections due to *Aspergillus*, *P. jirovecii*,

varicella-zoster or *C. albicans*, among others. Apart from making patients more prone to opportunistic and HSV infections, treatment with alemtuzumab also produces a CMV reactivation [68–70].

In the studied cohort, most of the 10 most common mAbs were respiratory tract viruses. This cohort presented both isotypes of Ig against HPV-6a E4 (which is responsible for amplifying the genome, suppressing cell differentiation, and allowing virion release). This highlighted the ability of this virus to reinfect such patients. When this observation was made on the five most frequent mAbs according to the biological group, most were gastrointestinal viruses. In all groups, there was the presence of IgG Abs against EV and PV, which suggested that these types of virus generated immunity before the development of the disease, while infection by hMV.16 occurred after its development.

Finally, it should be added that in the study cohort, the presence of both isotypes of Ig against CMV occurred in similar proportions (~11% for IgG and ~9% for IgM). When observed according to biological groups, patients belonging to groups with a worse prognosis (p-CLL and CLL-TFT) presented Ig G, while the stages of a better prognosis (MBL and c-CLL) presented Ig M. It should be noted that for the IGHV mutational status with a poor prognosis (U-IGHV), both isotypes of Ig were present compared to M-IGHV (in which the Ig M isotype was detected); therefore suggesting that this subset of patients had a high probability of virus reactivation.

5. Conclusions

The characterization of Ig serum levels (such as Ig A) in CLL is relevant to the diagnosis and the disease evolution and/or progression. In CLL, it was generally observed that Ig serum levels were reduced as the disease progressed. On the other hand, this study confirmed that CLL patients had recurrent infections by respiratory tract viruses and that Ig M levels were increased against these TAs, which suggested a stochastic state between de novo aAbs and immune tolerance (aAbs related to metabolism intracellular pathways). In addition, differential profiles in Ig isotypes seemed to provide relevant information about the most optimal therapeutical treatment. In summary, the dynamics of Ig quantitative levels and Ag profiling could be highly useful in patient stratification and prognostic factors for disease evolution.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers15030891/s1>, Figure S1: Distributions of the immunoglobulins' quantitative levels according to clinical/diagnosis subsets: (A) MBL and CLL groups; (B) MBL, c-CLL, and p-CLL groups; (C) MBL, c-CLL, and treatment (CLL-PFT and CLL-TFT) groups; (D) IGHV mutational status (M-IGHV or U-IGHV) groups; Figure S2: Quantitative distribution profiles for each immunoglobulin according to patient subsets: (A) diagnosis groups; (B) diagnosis and disease evolution groups; (C) diagnosis and treatment groups; (D) IGHV mutational status groups; Figure S3: Distribution of tumoral antigens (TAs) detected in this study according to presence of Ig G or Ig M autoantibodies; Figure S4: Summary of antimicrobial antibodies (Ig G and Ig M) detected at 0.0001 µg/µL [antigen]: (A) distribution according to immunoglobulin isotype detected in the studied cohort; (B) distribution of antimicrobial Ig M; (C) distribution of antimicrobial Ig G; (D) distribution of antimicrobial Ig M and Ig G; Figure S5: Quantitative summary of microbial antigens detected in this study. Table S1: List of 122 tumoral antigens for evaluation of autoantibody profiles; Table S2: List of 37 microbial antigens for evaluation of antimicrobial antibody profiles; Table S3: Cohort clinical data; Table S4: Signal-intensity ratio for the tumoral antigens under study. Table S5: List of Ig G and Ig M autoantibodies against the top 10 autoantigens in the studied cohort; Table S6: List of Ig G, Ig M, or both autoantibodies against the top 5 autoantigens for the studied subsets; Table S7: Signal-intensity ratio for the microbial antigens under study; Table S8: List of Ig G and Ig M antibodies against the top 10 microbial antigens in the studied cohort; Table S9 List of Ig G, Ig M, or both antibodies against the top 5 microbial antigens for the studied subsets.

Author Contributions: Conceptualization, M.F. and A.L.-V.; methodology, A.L.-V., C.A.-H. and P.J.-V.; software, Q.L. and C.E.P.; validation, M.F. and C.A.-H.; formal analysis, A.L.-V.; investigation: A.L.-V., C.A.-H. and P.J.-V.; resources, M.A.-S., A.N.-B., M.G.-D., A.O. and M.F.; data curation, A.L.-V. and J.M.S.-S.; writing—original draft preparation, A.L.-V.; writing—review and editing, M.F., R.G., M.G.-D., M.A.-S., A.N.-B., E.M., J.D.I.R., C.A.-H., P.J.-V., M.L.G.-V. and Á.-P.H.; visualization, A.L.-V., Q.L., C.E.P. and M.F.; supervision, M.F. and R.G.; project administration, M.F.; funding acquisition, M.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: We gratefully acknowledge Fondos FEDER (EU) and Junta Castilla-León (COVID-19 grant COV20EDU/00187). The Proteomics Unit belongs to ProteoRed (PRB3-ISCI), which was supported by grant no. PT17/0019/0023 of the PE I + D + I 2017-2020 funded by ISCI and FEDER. A.L.-V. was supported by the VIII Centenario USAL PhD Program, and P.J.-V. was supported by the JCYL PhD Program “JCYL Nos Impulsa” and scholarship JCYL-EDU/601/2020. This research work was performed in the framework of the Nanomedicine CSIC HUB (ref. 202180E048). A.L.-V., C.A.-H., P.J.-V., M.L.G.-V., Á.-P.H. and M.F. are part of the CSIC’s Global Health Platform (PTI SaludGlobal). C.A.-H. was supported by the Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca, IBSAL (Programa Puente Contratos Predoctorales-2021) and Junta Castilla-León PhD Program “Nos Impulsa” (JCYL-EDU/842/2022).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the local ethics committee of the University Hospital of Salamanca under code reference CEIm PI 2021 02 694 (HUS, Salamanca, Spain).

Data Availability Statement: Data sets are available at BIODATA Repository USAL (<https://biodata.usal.es/share.cgi?ssid=ad631b3d918e4031bd129589a11bc2f5>) upon request to corresponding author.

Acknowledgments: We are grateful for the financial support from the Carlos III Health Institute (ISCI) (grants FIS PI21/01545, and CB16/12/00400).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Haseeb, M.; Anwar, M.A.; Choi, S. Molecular Interactions Between Innate and Adaptive Immune Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia and Their Therapeutic Implications. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Allegra, A.; Musolino, C.; Tonacci, A.; Pioggia, G.; Casciaro, M.; Gangemi, S. Clinico-Biological Implications of Modified Levels of Cytokines in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Possible Therapeutic Role. *Cancers* **2020**, *12*, 524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Dubois, N.; Crompton, E.; Meuleman, N.; Bron, D.; Lagneaux, L.; Stamatopoulos, B. Importance of Crosstalk Between Chronic Lymphocytic Leukemia Cells and the Stromal Microenvironment: Direct Contact, Soluble Factors, and Extracellular Vesicles. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 1422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Manouchehri-Doulabi, E.; Abbaspour, S.; Rostami, S.; Faranoush, M.; Ghahramanfar, F.; Pak, F.; Barati, M.; Kokhaei, P.; Momtazi-Borojeni, A.A. Evaluating the Mechanism Underlying Antitumor Effect of Interleukin 27 on B Cells of Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235*, 9424–9431. [[CrossRef](#)]
5. Forconi, F.; Lanham, S.A.; Chiodin, G. Biological and Clinical Insight from Analysis of the Tumor B-Cell Receptor Structure and Function in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers* **2022**, *14*, 663. [[CrossRef](#)]
6. Purroy, N.; Wu, C.J. Coevolution of Leukemia and Host Immune Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2017**, *7*, a026740. [[CrossRef](#)]
7. Griggio, V.; Perutelli, F.; Salvetti, C.; Boccellato, E.; Boccadoro, M.; Vitale, C.; Coscia, M. Immune Dysfunctions and Immune-Based Therapeutic Interventions in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 594556. [[CrossRef](#)]
8. Lin, K.; Rockliffe, N.; Johnson, G.G.; Sherrington, P.D.; Pettitt, A.R. Hsp90 Inhibition Has Opposing Effects on Wild-Type and Mutant P53 and Induces P21 Expression and Cytotoxicity Irrespective of P53/ATM Status in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Oncogene* **2008**, *27*, 2445–2455. [[CrossRef](#)]
9. Nüchel, H.; Switala, M.; Sellmann, L.; Horn, P.A.; Dürig, J.; Dührsen, U.; Küppers, R.; Grosse-Wilde, H.; Rebmann, V. The Prognostic Significance of Soluble NKG2D Ligands in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia* **2010**, *24*, 1152–1159. [[CrossRef](#)]
10. Nisticò, N.; Maisano, D.; Iaccino, E.; Vecchio, E.; Fiume, G.; Rotundo, S.; Quinto, I.; Mimmi, S. Role of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)-Derived Exosomes in Tumor Progression and Survival. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 244. [[CrossRef](#)]
11. Vitale, C.; Boccellato, E.; Comba, L.; Jones, R.; Perutelli, F.; Griggio, V.; Coscia, M. Impact of Immune Parameters and Immune Dysfunctions on the Prognosis of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers* **2021**, *13*, 3856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Landeira-Viñuela, A.; Arias-Hidalgo, C.; Juanes-Velasco, P.; Alcoceba, M.; Navarro-Bailón, A.; Pedreira, C.E.; Lecrevisse, Q.; Díaz-Muñoz, L.; Sánchez-Santos, J.M.; Hernández, Á.-P.; et al. Unravelling Soluble Immune Checkpoints in Chronic Lymphocytic Leukemia: Physiological Immunomodulators or Immune Dysfunction. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 965905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Bojarska-Junak, A.; Waldowska, M.; Woś, J.; Chocholska, S.; Hus, I.; Tomczak, W.; Dzik, M.; Hus, M.; Roliński, J. Intracellular IL-4 and IFN- γ Expression in INKT Cells from Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 1580–1590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sordo-Bahamonde, C.; Lorenzo-Herrero, S.; González-Rodríguez, A.P.; Payer, Á.R.; González-García, E.; López-Soto, A.; Gonzalez, S. LAG-3 Blockade with Relatlimab (BMS-986016) Restores Anti-Leukemic Responses in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers* **2021**, *13*, 2112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Pascutti, M.F.; Jak, M.; Tromp, J.M.; Derks, I.A.M.; Remmerswaal, E.B.M.; Thijssen, R.; van Attekum, M.H.A.; van Bochove, G.G.; Luijckx, D.M.; Pals, S.T.; et al. IL-21 and CD40L Signals from Autologous T Cells Can Induce Antigen-Independent Proliferation of CLL Cells. *Blood* **2013**, *122*, 3010–3019. [[CrossRef](#)]
16. Davi, F.; Langerak, A.W.; de Septenville, A.L.; Koliijn, P.M.; Hengeveld, P.J.; Chatzidimitriou, A.; Bonfiglio, S.; Sutton, L.-A.; Rosenquist, R.; Ghia, P.; et al. Immunoglobulin Gene Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Era of next Generation Sequencing. *Leukemia* **2020**, *34*, 2545–2551. [[CrossRef](#)]
17. Higgins, B.W.; McHeyzer-Williams, L.J.; McHeyzer-Williams, M.G. Programming Isotype-Specific Plasma Cell Function. *Trends Immunol.* **2019**, *40*, 345–357. [[CrossRef](#)]
18. Darwiche, W.; Gubler, B.; Marolleau, J.-P.; Ghamlouch, H. Chronic Lymphocytic Leukemia B-Cell Normal Cellular Counterpart: Clues from a Functional Perspective. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 683. [[CrossRef](#)]
19. Stahl, D.; Lacroix-Desmazes, S.; Sibrowski, W.; Kazatchkine, M.D.; Kaveri, S.V. Broad Alterations of Self-Reactive Antibody-Repertoires of Plasma IgM and IgG in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL) and B-CLL Related Target-Restricted Autoimmunity. *Leuk. Lymphoma* **2001**, *42*, 163–176. [[CrossRef](#)]
20. Freeman, J.A.; Crassini, K.R.; Best, O.G.; Forsyth, C.J.; Mackinlay, N.J.; Han, P.; Stevenson, W.; Mulligan, S.P. Immunoglobulin G Subclass Deficiency and Infection Risk in 150 Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leuk. Lymphoma* **2013**, *54*, 99–104. [[CrossRef](#)]
21. Visentin, A.; Compagno, N.; Cinetto, F.; Imbergamo, S.; Zambello, R.; Piazza, F.; Semenzato, G.; Trentin, L.; Agostini, C. Clinical Profile Associated with Infections in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. Protective Role of Immunoglobulin Replacement Therapy. *Haematologica* **2015**, *100*, e515–e518. [[CrossRef](#)]
22. Kipps, T.J.; Stevenson, F.K.; Wu, C.J.; Croce, C.M.; Packham, G.; Wierda, W.G.; O'Brien, S.; Gribben, J.; Rai, K. Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2017**, *3*, 16096. [[CrossRef](#)]
23. Awan, F.T.; Byrd, J.C. 99-Chronic Lymphocytic Leukemia. In *Abeloff's Clinical Oncology*, 6th ed.; Niederhuber, J.E., Armitage, J.O., Kastan, M.B., Doroshow, J.H., Tepper, J.E., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; pp. 1850–1871.e5, ISBN 978-0-323-47674-4.
24. Grywalska, E.; Zaborek, M.; Lyczba, J.; Hryniewicz, R.; Bębnowska, D.; Becht, R.; Sosnowska-Pasiarska, B.; Smok-Kalwat, J.; Pasiarski, M.; Gózdź, S.; et al. Chronic Lymphocytic Leukemia-Induced Humoral Immunosuppression: A Systematic Review. *Cells* **2020**, *9*, 2398. [[CrossRef](#)]
25. Hallek, M.; Cheson, B.D.; Catovsky, D.; Caligaris-Cappio, F.; Dighiero, G.; Döhner, H.; Hillmen, P.; Keating, M.; Montserrat, E.; Chiorazzi, N.; et al. iwCLL Guidelines for Diagnosis, Indications for Treatment, Response Assessment, and Supportive Management of CLL. *Blood* **2018**, *131*, 2745–2760. [[CrossRef](#)]
26. Rai, K.; Sawitsky, A.; Cronkite, E.; Chanana, A.; Levy, R.; Pasternack, B. Clinical Staging of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* **1975**, *46*, 219–234. [[CrossRef](#)]
27. Binet, J.L.; Auquier, A.; Dighiero, G.; Chastang, C.; Piguat, H.; Goasguen, J.; Vaugier, G.; Potron, G.; Colona, P.; Oberling, F.; et al. A New Prognostic Classification of Chronic Lymphocytic Leukemia Derived from a Multivariate Survival Analysis. *Cancer* **1981**, *48*, 198–206. [[CrossRef](#)]
28. González-González, M.; Bartolome, R.; Jara-Acevedo, R.; Casado-Vela, J.; Dasilva, N.; Matarraz, S.; García, J.; Alcazar, J.A.; Sayagues, J.M.; Orfao, A.; et al. Evaluation of Homo- and Hetero-Functionally Activated Glass Surfaces for Optimized Antibody Arrays. *Anal. Biochem.* **2014**, *450*, 37–45. [[CrossRef](#)]
29. Dong, M.P.; Enomoto, M.; Thuy, L.T.T.; Hai, H.; Hieu, V.N.; Hoang, D.V.; Iida-Ueno, A.; Odagiri, N.; Amano-Teranishi, Y.; Hagihara, A.; et al. Clinical Significance of Circulating Soluble Immune Checkpoint Proteins in Sorafenib-Treated Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3392. [[CrossRef](#)]
30. Landeira-Viñuela, A.; Díez, P.; Juanes-Velasco, P.; Lécrevisse, Q.; Orfao, A.; De Las Rivas, J.; Fuentes, M. Deepening into Intracellular Signaling Landscape through Integrative Spatial Proteomics and Transcriptomics in a Lymphoma Model. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1776. [[CrossRef](#)]
31. Axon Instruments GenePix[®] Pro 6.0 Microarray Acquisition and Analysis Software for GenePix Microarray Scanners. User's Guide & Tutorial. 2005. Available online: <https://support.moleculardevices.com/s/article/GenePix-Pro-Software-Manual-Download-Page> (accessed on 10 July 2022).
32. Zahn-Zabal, M.; Michel, P.-A.; Gateau, A.; Nikitin, F.; Schaeffer, M.; Audot, E.; Gaudet, P.; Duek, P.D.; Teixeira, D.; Rech de Laval, V.; et al. The NeXtProt Knowledgebase in 2020: Data, Tools and Usability Improvements. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D328–D334. [[CrossRef](#)]
33. Szklarczyk, D.; Gable, A.L.; Lyon, D.; Junge, A.; Wyder, S.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Doncheva, N.T.; Morris, J.H.; Bork, P.; et al. STRING V11: Protein-Protein Association Networks with Increased Coverage, Supporting Functional Discovery in Genome-Wide Experimental Datasets. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D607–D613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Gillespie, M.; Jassal, B.; Stephan, R.; Milacic, M.; Rothfels, K.; Senff-Ribeiro, A.; Griss, J.; Sevilla, C.; Matthews, L.; Gong, C.; et al. The Reactome Pathway Knowledgebase 2022. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D687–D692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Uhlén, M.; Fagerberg, L.; Hallström, B.M.; Lindskog, C.; Oksvold, P.; Mardinoglu, A.; Sivertsson, Å.; Kampf, C.; Sjöstedt, E.; Asplund, A.; et al. Tissue-Based Map of the Human Proteome. *Science* **2015**, *347*, 1260419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Thul, P.J.; Åkesson, L.; Wiking, M.; Mahdessian, D.; Geladaki, A.; Ait Blal, H.; Alm, T.; Asplund, A.; Björk, L.; Breckels, L.M.; et al. A Subcellular Map of the Human Proteome. *Science* **2017**, *356*, aal3321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Uhlen, M.; Zhang, C.; Lee, S.; Sjöstedt, E.; Fagerberg, L.; Bidkhor, G.; Benfeitas, R.; Arif, M.; Liu, Z.; Edfors, F.; et al. A Pathology Atlas of the Human Cancer Transcriptome. *Science* **2017**, *357*, eaan2507. [[CrossRef](#)]
38. Ishdorj, G.; Streu, E.; Lambert, P.; Dhaliwal, H.S.; Mahmud, S.M.; Gibson, S.B.; Banerji, V.; Marshall, A.J.; Johnston, J.B. IgA Levels at Diagnosis Predict for Infections, Time to Treatment, and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood Adv.* **2019**, *3*, 2188–2198. [[CrossRef](#)]
39. Hamblin, T.J. 7 Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Baillière's Clin. Haematol.* **1987**, *1*, 449–491. [[CrossRef](#)]
40. Schroeder, H.W.; Cavacini, L. Structure and Function of Immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, S41–S52. [[CrossRef](#)]
41. Vidarsson, G.; Dekkers, G.; Rispen, T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 520. [[CrossRef](#)]
42. Shvidel, L.; Tadmor, T.; Braester, A.; Bairey, O.; Rahimi-Levene, N.; Herishanu, Y.; Klepfish, A.; Ruchlemer, R.; Berrebi, A.; Polliack, A.; et al. Serum Immunoglobulin Levels at Diagnosis Have No Prognostic Significance in Stage A Chronic Lymphocytic Leukemia: A Study of 1113 Cases from the Israeli CLL Study Group. *Eur. J. Haematol.* **2014**, *93*, 29–33. [[CrossRef](#)]
43. Kretschmer, A.; Schwanbeck, R.; Valerius, T.; Rösner, T. Antibody Isotypes for Tumor Immunotherapy. *Transfus. Med. Hemother.* **2017**, *44*, 320–326. [[CrossRef](#)]
44. Jones, K.; Savulescu, A.F.; Brombacher, F.; Hadebe, S. Immunoglobulin M in Health and Diseases: How Far Have We Come and What Next? *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 595535. [[CrossRef](#)]
45. Peppas, I.; George, G.; Sollie, S.; Josephs, D.H.; Hammar, N.; Walldius, G.; Karagiannis, S.N.; Van Hemelrijck, M. Association of Serum Immunoglobulin Levels with Solid Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2020**, *29*, 527–538. [[CrossRef](#)]
46. Li, Y.; Wang, G.; Li, N.; Wang, Y.; Zhu, Q.; Chu, H.; Wu, W.; Tan, Y.; Yu, F.; Su, X.-D.; et al. Structural Insights into Immunoglobulin M. *Science* **2020**, *367*, 1014–1017. [[CrossRef](#)]
47. Khan, S.R.; van der Burgh, A.C.; Peeters, R.P.; van Hagen, P.M.; Dalm, V.A.S.H.; Chaker, L. Determinants of Serum Immunoglobulin Levels: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 664526. [[CrossRef](#)]
48. Bournazos, S.; Wang, T.T.; Dahan, R.; Maamary, J.; Ravetch, J.V. Signaling by Antibodies: Recent Progress. *Annu. Rev. Immunol.* **2017**, *35*, 285–311. [[CrossRef](#)]
49. Copson, E.R.; Ellis, B.A.; Westwood, N.B.; Majumdar, G. IgG Subclass Levels in Patients with B Cell Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Leuk. Lymphoma* **1994**, *14*, 471–473. [[CrossRef](#)]
50. Lacombe, C.; Gombert, J.; Dreyfus, B.; Brizard, A.; Preud'Homme, J.L. Heterogeneity of Serum IgG Subclass Deficiencies in B Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin. Immunol.* **1999**, *90*, 128–132. [[CrossRef](#)]
51. Shome, M.; Chung, Y.; Chavan, R.; Park, J.G.; Qiu, J.; LaBaer, J. Serum Autoantibodyome Reveals That Healthy Individuals Share Common Autoantibodies. *Cell Rep.* **2022**, *39*, 110873. [[CrossRef](#)]
52. Buus, S.; Rockberg, J.; Forsström, B.; Nilsson, P.; Uhlen, M.; Schafer-Nielsen, C. High-Resolution Mapping of Linear Antibody Epitopes Using Ultrahigh-Density Peptide Microarrays. *Mol. Cell. Proteom.* **2012**, *11*, 1790–1800. [[CrossRef](#)]
53. Fujinami, R.S.; Oldstone, M.B.; Wroblewska, Z.; Frankel, M.E.; Koprowski, H. Molecular Mimicry in Virus Infection: Crossreaction of Measles Virus Phosphoprotein or of Herpes Simplex Virus Protein with Human Intermediate Filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 2346–2350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Suurmond, J.; Diamond, B. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases: Specificity and Pathogenicity. *J. Clin. Investig.* **2015**, *125*, 2194–2202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Wu, J.; Fu, Z.; Yan, F.; Ju, H. Biomedical and Clinical Applications of Immunoassays and Immunosensors for Tumor Markers. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 679–688. [[CrossRef](#)]
56. Sharma, S. Tumor Markers in Clinical Practice: General Principles and Guidelines. *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.* **2009**, *30*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Dasgupta, A.; Wahed, A. Chapter 13-Tumor Markers. In *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control*; Dasgupta, A., Wahed, A., Eds.; Elsevier: San Diego, CA, USA, 2014; pp. 229–247. ISBN 978-0-12-407821-5.
58. Duffy, M.J.; Evoy, D.; McDermott, E.W. CA 15-3: Uses and Limitation as a Biomarker for Breast Cancer. *Clin. Chim. Acta* **2010**, *411*, 1869–1874. [[CrossRef](#)]
59. Xu, Y.; Zhang, P.; Zhang, K.; Huang, C. The Application of CA72-4 in the Diagnosis, Prognosis, and Treatment of Gastric Cancer. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2021**, *1876*, 188634. [[CrossRef](#)]
60. Svanberg, R.; Janum, S.; Patten, P.E.M.; Ramsay, A.G.; Niemann, C.U. Targeting the Tumor Microenvironment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Haematologica* **2021**, *106*, 2312–2324. [[CrossRef](#)]
61. Lauko, A.; Volovetz, J.; Turaga, S.M.; Bayik, D.; Silver, D.J.; Mitchell, K.; Mulkearns-Hubert, E.E.; Watson, D.C.; Desai, K.; Midha, M.; et al. SerpinB3 Drives Cancer Stem Cell Survival in Glioblastoma. *Cell Rep.* **2022**, *40*, 111348. [[CrossRef](#)]

62. Pittayapruek, P.; Meehansan, J.; Prapapan, O.; Komine, M.; Ohtsuki, M. Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 868. [[CrossRef](#)]
63. Chang, Y.-C.; Yang, Y.-C.; Tien, C.-P.; Yang, C.-J.; Hsiao, M. Roles of Aldolase Family Genes in Human Cancers and Diseases. *Trends Endocrinol. Metab.* **2018**, *29*, 549–559. [[CrossRef](#)]
64. Perini, M.V.; Dmello, R.S.; Nero, T.L.; Chand, A.L. Evaluating the Benefits of Renin-Angiotensin System Inhibitors as Cancer Treatments. *Pharmacol. Ther.* **2020**, *211*, 107527. [[CrossRef](#)]
65. Kallunki, T.; Olsen, O.D.; Jäättelä, M. Cancer-Associated Lysosomal Changes: Friends or Foes? *Oncogene* **2013**, *32*, 1995–2004. [[CrossRef](#)]
66. Rizwani, W. Enolase. In *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Mechanistic Aspects*; Chakraborti, S., Ray, B.K., Roychoudhury, S., Eds.; Springer Nature: Singapore, 2022; pp. 2473–2491, ISBN 9789811594113.
67. Griggio, V.; Mandili, G.; Vitale, C.; Capello, M.; Macor, P.; Serra, S.; Castella, B.; Peola, S.; Foglietta, M.; Drandi, D.; et al. Humoral Immune Responses toward Tumor-Derived Antigens in Previously Untreated Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oncotarget* **2017**, *8*, 3274–3288. [[CrossRef](#)]
68. Morrison, V.A. Infectious Complications in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia: Pathogenesis, Spectrum of Infection, and Approaches to Prophylaxis. *Clin. Lymphoma Myeloma* **2009**, *9*, 365–370. [[CrossRef](#)]
69. Nosari, A. Infectious Complications in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Mediterr. J. Hematol. Infect Dis.* **2012**, *4*, e2012070. [[CrossRef](#)]
70. Rivera, D.; Ferrajoli, A. Managing the Risk of Infection in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Era of New Therapies. *Curr. Oncol. Rep.* **2022**, *24*, 1003–1014. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

