

**M A S A R Y K O V A
U N I V E R Z I T A**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Adaptace buněk chronické lymfocytární leukémie na cílenou léčbu

Diplomová práce

KRYŠTOF HLAVÁČ

Vedoucí práce: doc. MUDr. Mgr. Marek Mráz, Ph.D.

Ústav experimentální biologie
obor Molekulární biologie a genetika

Brno 2023

MUNI
SCI

Bibliografický záznam

Autor: Kryštof Hlaváč
Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita
Ústav experimentální biologie

Název práce: Adaptace buněk chronické lymfocytární leukémie na cílenou léčbu

Studijní program: Experimentální biologie

Obor: Molekulární biologie a genetika

Vedoucí práce: doc. MUDr. Mgr. Marek Mráz, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Laura Ondrišová

Rok: 2023

Počet stran: 95

Klíčová slova: Chronická lymfocytární leukémie, CLL, mikroprostředí, cílená léčba, BTK inhibitory, PI3K inhibitory, BCL2 inhibitory, rezistence

Bibliographic record

Author: Kryštof Hlaváč
Faculty of Science
Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: Adaptation of chronic lymphocytic leukemia cells to targeted therapy

Degree Programme: Experimental Biology

Field of Study: Molecular Biology and Genetics

Supervisor: doc. MUDr. Mgr. Marek Mráz, Ph.D.

Consultant: Mgr. Laura Ondrišová

Year: 2023

Number of Pages: 95

Keywords: Chronic lymphocytic leukemia, CLL, microenvironment, targeted therapy, BTK inhibitors, PI3K inhibitors, BCL2 inhibitors, resistance

Abstrakt

Diplomová práce se zaměřuje na aktuální problematiku schopnosti adaptace buněk chronické lymfocytární leukémie (CLL) na léčbu nízkomolekulárními inhibitory signálních drah. Léčba inhibitory dosáhla v posledních letech velkých pokroků a postupně dokázala nahradit chemoterapii jakožto standardní přístup v léčbě CLL. Ibrutinib (inhibitor dráhy B-buněčného receptoru) a venetoclax (inhibitor antiapoptického proteinu BCL2) jsou nejčastěji využívanými inhibitory v klinické praxi, jak pro léčbu v první linii, tak i pro refrakterní formu nemoci. Ačkoli drtivá většina pacientů na tuto léčbu odpoví, především vlivem mutací, mikroprostředí nebo deregulace signálních drah je část populace buněk CLL schopná léčbě unikat. Tyto buňky se tak na léčbu postupně adaptují a při dlouhodobé léčbě vzniká riziko manifestace rezistence, která je zapříčiněna genetickými mutacemi a negenetickými mechanismy plynoucími z pozměněné signalizace. Konečnému stavu rezistence předchází již zmíněný proces adaptace na léčbu, který je v buňkách zahájen okamžitě po započetí léčby inhibitory. V tomto procesu jsou zapojeny především změny v signalizaci, které je možné sledovat a při vhodné kombinaci inhibitorů jim dokonce zamezit. Tato diplomová práce se zabývá rolí transkripčního faktoru FoxO1 v souvislosti s adaptačními změnami při léčbě inhibitory dráhy B-buněčného receptoru ibrutinibem a BCL-2 inhibitory venetoclaxem.

Abstract

This diploma thesis is focused on the current topic of adaptation of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells to targeted therapy with small-molecule inhibitors. Treatment with the inhibitors has made great progress in recent years and has gradually replaced chemotherapy as the standard approach in the treatment of CLL. Ibrutinib (an inhibitor of the B-cell receptor pathway) and venetoclax (an inhibitor of the anti-apoptotic protein BCL-2) are the most frequently used inhibitors in clinical practice, both for first-line treatment and for treatment of refractory form of the disease. Although the vast majority of patients respond to this therapy, a part of the CLL cell population is able to escape it, mainly due to the influence of the microenvironment and deregulation of signaling pathways. Thus, these cells gradually adapt to the treatment, increasing a risk of resistance manifestation caused by genetic mutations and non-genetic mechanisms of resistance caused by altered signaling. The final state of resistance is preceded by the process of adaptation to the treatment, which begins in the cells immediately after the initiation of treatment with inhibitors. Main mechanisms involved in the adaptation are changes in cell signaling, that can be observed and possibly prevented with a suitable combination of inhibitors. This thesis describes the role of transcription factor FoxO1 in connection with adaptive changes during treatment with the B-cell receptor pathway inhibitor ibrutinib and the BCL-2 inhibitor venetoclax.

MUNI
SCI

MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KOTLÁŘSKÁ 2, 602 00 BRNO
IČ: 00216224
DIČ: CZ00216224

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2022/2023

Ústav:	Přírodovědecká fakulta
Student:	Bc. Kryštof Hlaváč
Program:	Molekulární biologie a genetika
Specializace:	Molekulární biologie a genetika

Ředitel ústavu PpF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce:	Adaptace buněk chronické lymfocytární leukémie na cílenou léčbu
Název práce anglicky:	Adaptation of chronic lymphocytic leukemia cells to targeted therapy
Jazyk závěrečné práce:	čeština

Oficiální zadání:

Cílem diplomové práce je analýza odpovědi buněk chronické lymfocytární leukémie na léčbu inhibitory signální dráhy B-buněčného receptoru (BCR) a venetoclaxem - inhibitorem proapoptického BCL2. Student se zaměří především na analýzu transkripčního faktoru FoxO1 a jeho cílů, které by mohly mít vliv na odpověď leukemických buněk na zmíněné terapie. V práci budou použity mimo jiné metody westernového přenosu, real time PCR, průtokové cytometrie, transfekce a analýza NGS dat. Výsledky práce mohou přispět k poznání mechanismů působení FoxO1 v buňkách chronické lymfocytární leukémie a k objasnění jeho role v odpovědi na cílenou léčbu.

Vedoucí práce:	doc. MUDr. Mgr. Marek Mráz, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Laura Ondříšová
Datum zadání práce:	22. 9. 2021
V Brně dne:	9. 5. 2023

Zadání bylo schváleno prostřednictvím IS MU.

Bc. Kryštof Hlaváč, 4. 10. 2022
doc. MUDr. Mgr. Marek Mráz, Ph.D., 4. 10. 2022
RNDr. Pavel Lízal, Ph.D., 4. 10. 2022

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Brně 11. května 2023

.....
Kryštof Hlaváč

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému vedoucímu doc. MUDr. Mgr. Marku Mrázovi, Ph.D. za věnovaný čas, přátelský přístup a cenné rady, které výrazně přispěly k tomu, aby vypracování této práce bylo příjemnou záležitostí. Své konzultantce Mgr. Lauře Ondrišové patří ohromné díky za ochotu předat mi maximum ze svých zkušeností, a především za trpělivost a laskavost, se kterou k mému učení přistupovala. Stejně tak bych chtěl poděkovat všem ostatním kolegům z Výzkumné skupiny Marka Mráze za jejich pomoc při řešení nejrůznějších problémů v laboratoři i mimo ni. Největší dík si pak zaslouží moje rodina, která moje studium vždy velice podporovala.

Tato diplomová práce vznikla s přispěním Grantové agentury Masarykovy Univerzity v rámci Programu podpory studentského výzkumu – Podpora vynikajících diplomových prací, číslo projektu MUNI/C/0086/2022) a projektu Národního ústavu pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID:LX22NP05102) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

Obsah

1	Úvod a problematika	14
1.1	Chronická lymfocytární leukémie	15
1.1.1	Genetická stránka nemoci	16
1.1.2	Mikroprostředí CLL.....	18
1.2	BCR dráha a využití v terapii CLL.....	21
1.2.1	Signální dráha B-buněčného receptoru.....	21
1.2.2	BTK inhibitory	23
1.2.3	PI3K inhibitory	24
1.3	Rodina BCL2 v signalizaci apoptózy	26
1.3.1	Venetoclax	28
1.4	Mechanismy rezistence na cílenou léčbu v CLL.....	29
1.4.1	Geneticky podmíněná rezistence	29
1.4.2	Negenetické mechanismy rezistence	31
1.5	Transkripční faktor FoxO1 v kontextu B-lymfocytů a B-malignit.....	35
2	Cíle diplomové práce	41
3	Materiál a metody	42
3.1	Primární buňky pacientů.....	42
3.2	Buněčná linie MEC1.....	42
3.3	Buněčná linie HS5	42
3.4	Genetická modifikace HS5	43
3.5	CFSE proliferační assay	43
3.6	Příprava FoxO1 knock-out linie MEC1.....	44
3.7	Kompetitivní růstová assay.....	44
3.8	Kultivace linie MEC1 s inhibitory.....	44
3.9	Měření viability	45
3.10	Příprava proteinových lyzátů	45
3.11	Western blot.....	46
3.12	Analýza DNA interakcí transkripčního faktoru FoxO1 – CUT&RUN.....	47
3.13	Statistické vyhodnocení.....	47
4	Výsledky.....	48
4.1	FoxO1 vykazuje zvýšenou DNA-vazebnou aktivitu při léčbě ibrutinibem u MEC1 buněk.....	48
4.2	Inhibice FoxO1 snižuje viabilitu v <i>in vitro</i> kokultivačním modelu.....	50

4.3	Inhibice FoxO1 zabraňuje proliferaci v přítomnosti T-lymfocytárních faktorů v kokultivaci s HS5 ^{CD40L,IL21,IL4}	52
4.4	Validace <i>FoxO1</i> knock-out linie MEC1	53
4.5	<i>FoxO1</i> knock-out MEC1 linie je oproti wild-type linii v podmínkách ibrutinibu znevýhodněna	54
4.6	Analýza interakce FoxO1 s DNA metodou CUT&RUN odhalila cíle uvnitř BCL2 rodiny	55
4.7	<i>FoxO1</i> knock-out linie MEC1 vykazuje zvýšenou odolnost vůči BCL2 inhibici venetoclaxem	56
4.8	<i>FoxO1</i> knock-out linie má významně pozměněné proteinové hladiny některých členů rodiny BCL2	57
5	Diskuse	59
6	Souhrn.....	65
7	Summary	66
	Literatura	67

Seznam pojmů a zkratek

AKT/PKB	– serin/threonin kináza, také protein kináza B
APRIL	– proliferaci indukující ligand
ATM	– <i>Ataxia Telangiectasia</i> mutated protein
BAD	– BCL2-associated death promoter
BAFF	– B-buněčný aktivační faktor
BAFF-R	– receptor pro B-buněčný aktivační faktor
BAK	– BCL2 homologous antagonist/killer
BAX	– BCL2-asociovaný X protein
BCL2	– B-cell lymphoma 2 protein
BCL-W	– také označovaný jako BCL2L2 – BCL2-like 2 protein
BCL-X _L	– B-cell lymphoma extra large protein
BCMA	– B-cell maturation antigen
BCR	– B-cell receptor, B-buněčný receptor
BFL1	– také označovaný jako BCL2A1 – BCL2-related A1 protein
BID	– BH3 interacting-domain death agonist
BIK	– BCL2-interacting killer
BIM	– také označovaný jako BCL2L11 – BCL2-like 11 protein
<i>BIRC3</i>	– baculoviral IAP repeat containing 3 gen
BLNK	– B-cell linker
BMF	– BCL2-modifikující faktor
BOK	– BCL2 related ovarian killer
BTK	– Bruton's tyrosine kinase
CCL/R; CXCL/R	– označení tříd chemokinových ligandů/receptorů
CD-	– cluster of differentiation – označení povrchový molekul
<i>CHD2</i>	– chromodomain helicase DNA binding 2 gen
CLL	– chronická lymfocytární leukémie
DAG	– diacylglycerol
<i>DLEU1</i> a 2	– deleted in lymphocytic leukemia 1 a 2
ERK	– extracellular-signal-regulated kinase

FcγR-	– Fc gamma receptor
FISH	– fluorescenční <i>in situ</i> hybridace
FOXO1	– forkhead box protein O1
FOXP1	– forkhead box protein 1
GAB1	– GRB2-associated-binding protein 1
HRK	– harakiri protein
Ig	– imunoglobulin, předpona „s-“ znamená „surface“, tedy povrchový Ig, přípony „-A“, „-D“, „-E“, „-G“, „-M“ pak značí třídu,
<i>IgHV</i>	– gen pro variabilní oblast těžkého imunoglobulinového řetězce, immunoglobulin heavy chain variable
IL	– označení cytokinů interleukinů
IP3	– inozitol-3,4,5-trisfosfát
ITAM	– konzervovaná sekvence aminokyselin obsahující tyrozinová rezidua nutná ke spuštění aktivační dráhy, immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	– konzervovaná sekvence aminokyselin obsahující tyrozinová rezidua nutná ke spuštění inhibiční dráhy, immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
JAK	– Janusovy tyrozinkinázy
JNK	– c-Jun NH2-terminal kinase
LYN	– Lck/Yes novel tyrosine kinase
MAPK	– mitogenem aktivované protein kinázy
MBL	– monoklonální B-lymfocytóza
MCL1	– myeloid cell leukemia 1 protein
<i>MIR15A/MIR16-1</i>	– genový klast kódující geny pro mikroRNA 15A a 16-1
miRNA	– mikroRNA
mTORC1/2	– mammalian target of rapamycin complex 1/2
MYD88	– myeloid differentiation primary response 88
NFAT	– nuclear factor of activated T-cells
NF-κB	– nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NK buňky	– natural killer buňky, přirození zabíječi
NLC	– nurse-like cells
PKD1	– 3-fosfoinozimid-dependentní kináza 1

PI3K/PI3K δ	– fosfoinozitolid 3-kináza/delta izoforma
PIP2	– fosfatidyloinozitol-4,5-bisfosfát
PIP3	– fosfatidyloinozitol-3,4,5-trisfosfát
PKC β	– protein kináza C beta
PLC γ 2	– fosfolipáza C gamma 2
<i>POT1</i>	– protection of telomeres 1
ppITAMs	– dvakrát fosforylované tyroziny v ITAM sekvenci
PTEN	– phosphatase and tensin homolog
PUMA	– p53 upregulated modulator of apoptosis
R/R CLL	– relabovaná (progrese po remisi) či refrakterní (bez reakce na zvolenou léčbu) CLL
SDF1	– stromal cell-derived factor 1
<i>SF3B1</i>	– splicing factor 3B subunit 1
SH2 doména	– Src-homology 2 doména
SHIP1	– SH2-domain-containing inositol 5'-phosphatase 1
SHP1	– SH2-domain-containing 5'-phosphatase 1
STAT3, 5 a 6	– signal transducer and activator of transcription 3, 5 a 6
SYK	– slezinná tyrozinkináza, spleen tyrosine kinase
TACI	– transmembrane activator and CAML-interactor
TNF-R	– tumor necrosis factor receptor
<i>TP53/p53</i>	– tumor protein 53
TRAIL	– TNF-related apoptosis-inducing ligand
VCAM1	– vascular cell adhesion molecule 1
VLA4	– very late antigen 4
XPO1	– exportin 1
ZAP70	– zeta-chain-associated protein 70

1 Úvod a problematika

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nejčastější leukémií dospělých v Evropě a Severní Americe s incidencí ~5/100 000 obyvatel ročně. Jedná se o malignitu vyššího věku, medián věku při diagnóze je ~70 let, postihující častěji muže (Pulte *et al.*, 2015). Vzhledem k vysoké biologické variabilitě nemoci se setkáváme s různě agresivními formami od zcela asymptomatických až po vysoce rizikové, podobně se pak liší doba přežití od desítek let po několik měsíců (Döhner *et al.*, 2000).

V posledních několika letech léčba této nemoci pokročila významně kupředu, klasická chemoimunoterapie byla téměř výhradně nahrazena protokoly, jejichž součástí je cílená léčba tzv. nízkomolekulárními inhibitory (Hallek *et al.*, 2018). Nespornou výhodou inhibitorů jsou oproti chemoterapeutikům méně závažné vedlejší účinky, a tedy možnost využití u pacientů ve špatné kondici. Léčba inhibitory je také schopná pokrýt celé prognostické spektrum a cílit i na pacienty, jejichž forma nemoci činila z chemoterapie nevhodný postup (např. mutace *TP53*) (Ahn *et al.*, 2018; O'Brien *et al.*, 2016; Fischer *et al.*, 2019).

Principem fungování inhibitorů je cílené zablokování klíčových signálních molekul, které umožňují maligním B-lymfocytům přežít. Mezi hlavní cíle patří kinázy dráhy B-buněčného receptoru (BCR, z ang. B-cell receptor) a antiapoptotický protein BCL2 (B-cell lymphoma 2 protein). V současnosti jsou využívány nové generace prvotních inhibitorů, popřípadě jsou zkoumány mnohé další potenciální signální molekuly, jejichž inhibitory se nacházejí v různých stupních výzkumu a testování.

Velice aktuálním problémem spojeným s léčbou inhibitory je častý výskyt rezistentní formy nemoci, jehož riziko se závisle s délkou léčby zvyšuje (Hallek a Al-Sawaf, 2021). V dnešní době je možné takto relabující nemoc vyřešit nasazením jiného typu inhibitoru, který je k léčbě schválen, nicméně tento přístup je pouze dočasným řešením problému rezistence. Manifestace rezistence plyne z postupně budovaných adaptačních mechanismů uvnitř maligních buněk, které ve výsledku vyústí v úplnou rezistenci, popř. se jedná o získanou, geneticky podmíněnou rezistenci. Velmi slibným přístupem by v budoucnu mohla být kombinovaná terapie inhibitory, která by dokázala adaptačním mechanismům zabránit. Proto je v současnosti kladen velký důraz na objasnění těchto procesů, na jejichž základě by mohla být sestavena potenciálně kurativní léčba CLL. Tato diplomová práce se zabývá schopností buněk CLL adaptovat se na cílenou léčbu inhibitory ibrutinibem (BCR inhibitor) a venetoclaxem (BCL2 inhibitor), a to v kontextu působení transkripčního faktoru FoxO1.

1.1 Chronická lymfocytární leukémie

Chronická lymfocytární leukémie je charakterizována klonální expanzí zralých B-lymfocytů se specifickým imunofenotypem (CD5⁺, CD19⁺, CD23⁺, CD20^{dim}, sIg^{dim}), které se hromadí v kostní dřeni a sekundárních lymfatických orgánech. Diagnóza CLL je nejčastěji stanovena na základě přítomnosti monoklonální B-lymfocytózy (MBL), tedy stavu, kdy leukemické buňky s imunofenotypem CLL překročí počet 5×10^9 buněk na litr krve. Diagnóza CLL je podmíněna leukemickým imunofenotypem. Samotný stav MBL neznámí onemocnění CLL, nicméně přibližně u 1 % pacientů s MBL se ročně leukémie rozvine. V případech, kdy je nemoc zachycena v pozdějších fázích, se připojují diagnostické příznaky jako je lymfadenopatie či hepatosplenomegalie (Hallek *et al.*, 2018). Ačkoliv se většina pacientů během života nesetká s výraznou progresí nemoci, u 0,5 – 1 % pacientů ročně dochází k transformaci CLL do difúzního velkobuněčného B-lymfomu (DLBCL, z ang. diffuse large B-cell lymphoma) označovanou jako Richterův syndrom s velice nepříznivou prognózou, riziko transformace se u CLL pohybuje mezi 2 a 10 % (Parikh *et al.*, 2013).

Prognostická stratifikace CLL pacientů je určována na základě několika parametrů, podle nichž je sestaven tzv. Mezinárodní prognostický index CLL (CLL-IPI) zavedený v roce 2016. Hodnotí se celkem pět kritérií: věk, klinická fáze podle Bineta a Raie (Binet *et al.*, 1981; Rai *et al.*, 1975), hladina sérového β 2-mikroglobulinu, mutační stav genu variabilní oblasti těžkého řetězce (*IGHV*) a stav genu *TP53*. Vzhledem s vysoké biologické variabilitě nemoci, která je spojena s různou dobou přežití, se u CLL používají i dalších prognostické markery, příkladem hladiny vybraných proteinů ZAP-70 (zeta-chain associated protein 70), CD49d nebo CD38 (Bulian *et al.*, 2014; Damle *et al.*, 1999; Rassenti *et al.*, 2004) nebo některých prognosticky významných miRNA (např. miR-150 a miR-155; Mráz *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2014).

Z hlediska CLL-IPI jsou nejvýznamnějšími markery mutační stavy genů *IGHV* a *TP53*. Na základě přítomnosti mutací genu *IGHV* jsou CLL pacienti typicky rozdělováni do skupin „mutated CLL“ (M-CLL; <98% shoda s původním řetězcem) a „unmutated CLL“ (U-CLL; >98% shoda s původním řetězcem), toto dělení se výrazně odráží v celkovém chování nemoci, kdy u M-CLL pacientů pozorujeme indolentní formu nemoci, obráceně pak U-CLL pacienti nesou prognosticky horší, agresivnější variantu této leukémie (Hamblin *et al.*, 1999).

Mutace v *TP53*, popř. delece 17p představovaly do nedávné doby velice významný marker omezující možnosti léčby, tedy vyřazovaly chemoterapii ze seznamu použitelných léčiv

(Zenz *et al.*, 2012). Dnes, v době nízkomolekulárních inhibitorů, je toto omezení překonáno a mnohé klinické studie potvrdily účinnost tohoto typu léčiv i v přítomnosti defektu *TP53*. (výběrem např. studie Seymour *et al.*, 2018; Sharman *et al.*, 2020). Přestože nejsou mutace v *TP53* takovou komplikací v léčbě inhibitory, z hlediska prognózy však neztratily na významu.

1.1.1 Genetická stránka nemoci

CLL, narozdíl od mnoha dalších malignit, je charakteristická tím, že u této nemoci nenalezneme typickou „driver“ mutaci, která by stála za jejím rozvojem. U pacientů s CLL se setkáváme se spektrem genomových a genových aberací, které se vyskytují s různou, však relativně nízkou četností. Tato skutečnost napovídá, že rozvoj CLL je velkou měrou závislý na procesech souvisejících s fyziologií a biochemií uvnitř B-lymfocytů, či jejich okolím (Quesada *et al.*, 2013).

Chromozomové aberace se týkají cca 80 % pacientů s CLL, na základě cytogenetické FISH analýzy bylo zjištěno, že nejčastějšími jsou v době diagnózy delece 13q14 (55 %), delece 11q (18 %), trisomie 12 (16 %) a delece 17p (7 %) (Döhner *et al.*, 2000). K těmto genomovým aberacím byly následně připojeny geny, na něž mají tyto události dopad.

Nejčastější aberace 13q14 zasahuje region pro nekódující miR-15a a miR-16-1 (geny *DLEU1* a 2 – deleted in lymphocytic leukemia 1 a 2). Funkcí těchto miRNA je posttranskripční inhibice mRNA pro již zmíněný antiapoptický protein BCL2. V případě absence těchto miRNA je BCL2 přítomen ve vysokých koncentracích, čímž je narušena řádná signalizace apoptózy (Cimmino *et al.*, 2005).

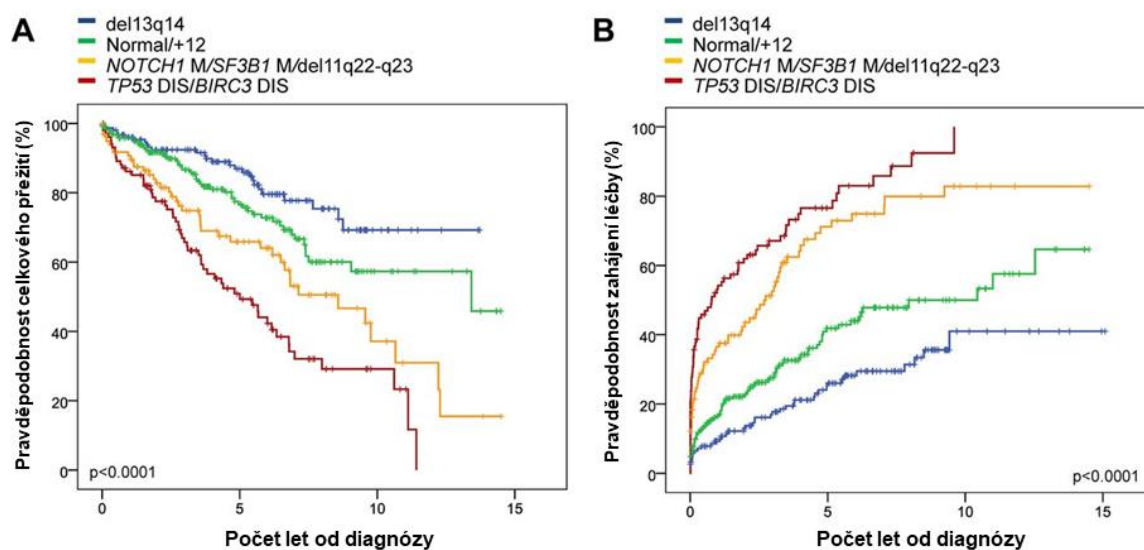
Delece 11q má za následek ztrátu alely genu pro tumor supresorový protein ATM (*Ataxia Telangiectasia* mutated), jehož role spočívá v regulaci oprav poškozené DNA. Společně s genem *ATM* je také zasažen lokus genu *BIRC3* (baculoviral IAP repeat containing 3), který kóduje regulátor významné dráhy transkripčního faktoru NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) (Rossi *et al.*, 2012).

Trisomie 12 představuje středně závažný prognostický marker. Efekt zvýšené genové dávky byl popsán u několika konkrétních genů a proteinů, jež se na patofyziologii CLL mohou podílet. Jedná se například o pozitivní regulátor buněčného cyklu cyklin-dependentní kinázu CDK4 (Kienle *et al.*, 2005) nebo ubiquitin ligázu MDM2 (mouse double minute 2 homolog), která negativně reguluje protein p53 (Winkler *et al.*, 2005). V souvislosti s trisomií 12 byla také

popsána zvýšená migrační schopnost CLL buněk, jejíž příčinou je navýšená hladina povrchové adhezní molekuly CD38 (Riches *et al.*, 2014).

Nejhorší prognózu nesou pacienti s delecí 17p, která zasahuje gen *TP53*, kódující nejznámější tumor supresorový protein. Ačkoliv se tato aberace v době diagnózy vyskytuje s relativně nízkou četností, v průběhu léčby se pak jedná o jednu z nejčastějších získaných aberací. V době chemoterapie se u relabujících pacientů nacházela tato mutace ve 30 % případů (Wawrzyniak *et al.*, 2014), u Richterova syndromu je mutace přítomna dokonce až u poloviny pacientů (Rossi *et al.*, 2011). Z hlediska léčby inhibitory signálních drah tato aberace již nepředstavuje tak významnou komplikaci jako v případě chemoterapie, nicméně prognosticky se stále jedná o velice rizikový faktor.

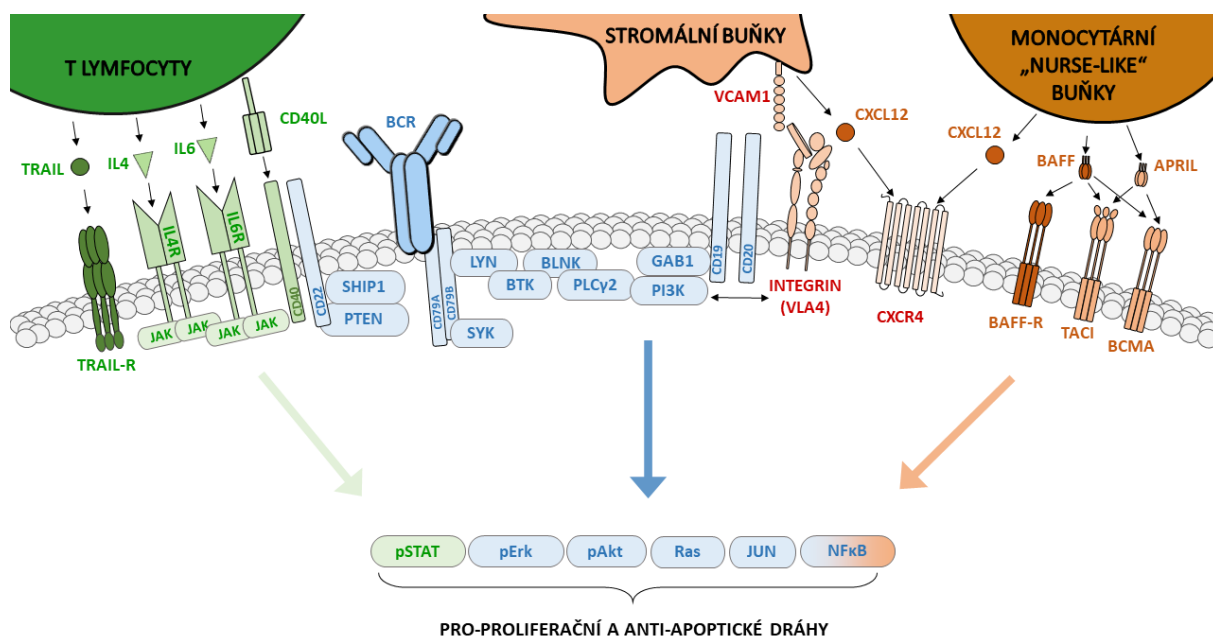
S rozšířením metod celogenomového sekvenování došlo také k rozšíření seznamu mutací, jež lze s patogenezi CLL spojit a již nesouvisí s konkrétními genomovými aberacemi. Mutace nejčastěji ovlivňují geny podílející se na buněčné odpovědi při poškození DNA (již zmíněné *TP53* a *ATM*), dále geny účinkující v úpravách mRNA (např. *SF3B1* – splicing factor 3B subunit 1), mutovány jsou geny odpovědné za přestavbu chromatinu nebo rozvolnění DNA (např. *CHD2* – chromodomain helicase DNA binding 2), v neposlední řadě jsou ovlivněny i geny pro údržbu telomer (*POT1* – protection of telomeres 1). Dalšími, prognosticky významnými jsou např. mutace genu *NOTCH1* – receptorové molekuly s významnou rolí v mikroprostředí CLL, nebo mutace adaptorového proteinu MYD88 (myeloid differentiation primary response 88), který zprostředkovává signalizaci přes Toll-like receptory. Celkově se hovoří o přibližně 40 potenciálních „driver“ mutacích, jež stojí za rozvojem onemocnění CLL (Landau *et al.*, 2015) (Obr. 1 znázorňuje nejčastější aberace v souvislosti s některými klinicky významnými parametry). V nedávné době došlo k rozšíření toho seznamu alterací, pozornost byla zaměřena i na epigenetické aberace či expresní profil, společně tyto výsledky ukazují na obrovskou heterogenitu tohoto onemocnění (Knisbacher *et al.*, 2022).



Obr. 1: Kaplan Meierovy křivky celkového přežití (A) a doby do zahájení léčby (B) u nejčastějších aberací u CLL (Rossi *et al.*, 2012, upraveno).

1.1.2 Mikroprostředí CLL

V tkáni lymfatických orgánů u pacientů s CLL nacházíme specifické struktury, tzv. pseudofolikuly, které jsou osídleny maligními lymfocyty (Stein *et al.*, 1980). Leukemické buňky jsou uvnitř pseudofolikulů vystaveny řadě podnětů, což má za následek stimulaci mnoha signálních drah výhodných pro přežití (Obr. 2). Mikroprostředí má z hlediska léčby CLL obrovský význam, poněvadž interakce uvnitř této specifické niky umožňují maligním buňkám odolávat léčbě, a to jak chemoterapeutické, tak i cílené (Mráz *et al.*, 2011; Jayappa *et al.*, 2017). Buněčnými typy, jež se těchto interakcí účastní, jsou především stromální buňky a T-lymfocyty, jejichž přítomnost umožňuje CLL buňkám přežít (Lagneaux *et al.*, 1998), respektive proliferovat (Ghia *et al.*, 2002). Dále se mezibuněčné komunikace účastní specifické „nurse-like“ buňky odvozené od monocytů, dendritické buňky či buňky endotelu. Mimo to, CLL lymfocyty jsou zároveň schopny potlačovat aktivitu NK buněk a cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytů a unikat tak imunitnímu dohledu (Veullen *et al.*, 2012; Motta *et al.*, 2005).



Obr. 2: Vybrané interakce CLL buněk s mikroprostředím lymfatických orgánů (Ondrišová a Mráz, 2020, upraveno).

Proces infiltrace lymfatických orgánů se odvíjí od chemokinové komunikace s nejprve endotelovými a následně stromálními buňkami. Endotelové buňky sekretují chemokiny CCL19 a 21, které lymfocyty přivádějí do blízkosti orgánu (Till *et al.*, 2002), zde dochází k chemotaxi CLL buněk směrem k stromálním buňkám sekretujícím SDF1 (stromal-derived factor 1), jehož receptor CXCR4 je přítomen na povrchu CLL buněk (Burger *et al.*, 1999). Adhezi lymfocytů ke stromálním buňkám pak zajišťuje interakce molekul VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1) a VLA4 (very late antigen 4) (Hartmann *et al.*, 2009). Chemotaktická aktivita směrem ke stromálním buňkám je zesílena v případě přítomnosti molekuly CD38 (Vaisitti *et al.*, 2010). Hladiny molekul VLA4 a CD38 u pacientů s CLL silně korelují a jejich zvýšené hladiny jsou pak významným negativním znakem asociovaným se zhoršenou prognózou (Abdelrahman *et al.*, 2018).

Uvnitř pseudofolikulu jsou leukemické buňky obklopeny především pomocnými CD4⁺ T-lymfocyty a „nurse-like“ buňkami. Faktory, jež jsou poskytovány T-lymfocyty, jsou interleukiny IL6 a IL4, a molekula CD40L. V odpovědi na interleukiny je zapojena dráha transkripčního faktoru STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6), která vede ke zvýšené expresi povrchového IgM a tím aktivaci BCR signalizace, to pak ústí ve zvýšenou rezistenci k apoptóze (Aguilar-Hernandez *et al.*, 2016). Povrchový protein CD40L při vazbě na svůj receptor na B-lymfocytech spouští dráhy kinázy PI3K (fosfoinozimid 3-kináza)

a transkripčního faktoru NF- κ B, jež vedou nejen k rezistenci, ale také proliferaci leukemických buněk (Kitada *et al.*, 1999). Signalizace skrze CD40 také zahajuje sekreci chemokinů CCL17 a 22, což má za následek imigraci dalších T-lymfocytů do pseudofolikulu (Ghia *et al.*, 2002).

„Nurse-like“ buňky (NLC) jsou specifickým buněčným typem monocytárního původu, který lze nalézt pouze v přítomnosti CLL lymfocytů. NLC, podobně jako stromální buňky, sekretují vysoké hladiny SDF1, čímž stimulují receptor CXCR4 a následné MAPK (mitogen activated protein kinase) a PI3K dráhy (Burger *et al.*, 2000). Důležitou je také dvojice cytokinů BAFF (B-cell activation factor) a APRIL (a proliferation inducing ligand), jež v B-lymfocytech aktivují nekanonickou signalizaci NF- κ B, to může mít za následek zvýšenou rezistenci k léčbě (Nishio *et al.*, 2005).

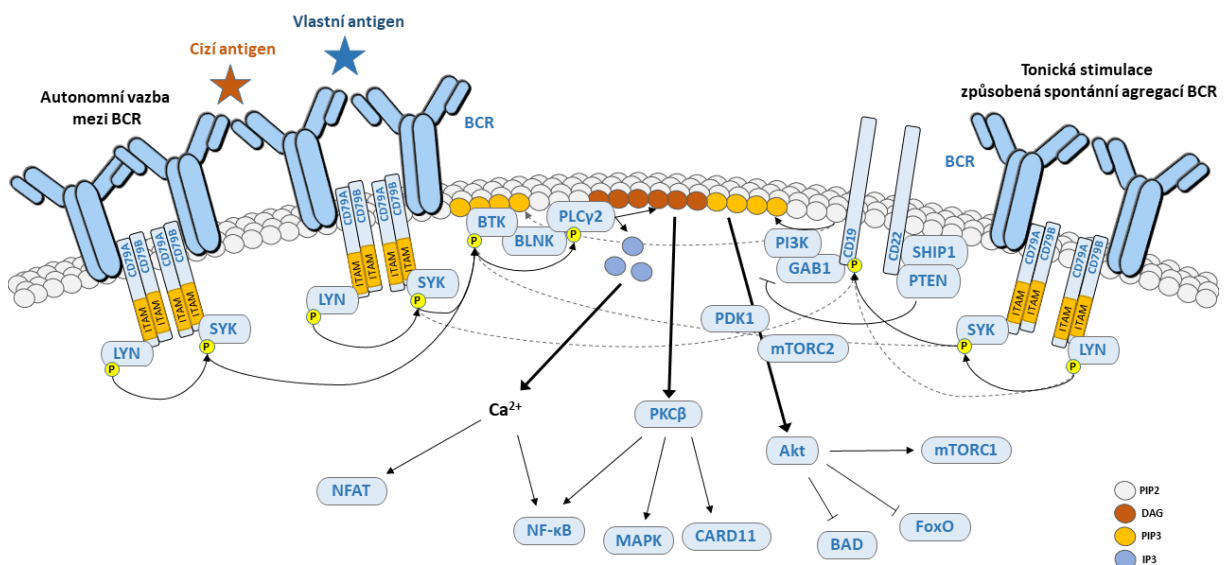
Charakteristickou vlastností CLL je buněk je schopnost cirkulovat mezi periferní krví a lymfatickými orgány. Ústřední roli v tomto procesu hraje již zmíněný receptor CXCR4. Vazba ligandu má za následek internalizaci receptoru a aktivace drah pak vede ke snížení exprese (Guinamard *et al.*, 1999). Po dobu osídlení pseudofolikulu je hladina této molekuly snížena na takovou úroveň, až lymfocyty vycestovávají z lymfatických orgánů do periferní krve. V periferní krvi pak dochází k obnově hladin CXCR4, a tedy obnově schopnosti infiltrovat lymfatické orgány. Na základě exprese tohoto receptoru pak lze v periferní krvi rozlišovat populace CLL buněk, které směřují do lymfatických orgánů (CXCR4^{bright}CD5^{dim}) a buněk, které z orgánů právě vycestovaly (CXCR4^{dim}CD5^{bright}) (Calissano *et al.*, 2011).

1.2 BCR dráha a využití v terapii CLL

Jak již bylo zmíněno, CLL buňky jsou ve vysoké míře závislé na interakcích uvnitř mikroprostředí, které mají za následek spuštění řady signálních drah. Studium této problematiky je už dlouhou dobu jedním z hlavních směrů výzkumu CLL, a to především v souvislosti s cílenou léčbou či rezistencí na ni. Největší přísun signálů důležitých pro přežití získávají B-lymfocyty nepochybně skrze dráhu B-buněčného receptoru. Tato dráha má obecně ve fyziologii lymfocytů nezastupitelnou roli. Důkazem je skutečnost, že delece povrchového receptoru je pro B-lymfocyty letální (Lam *et al.*, 1997).

1.2.1 Signální dráha B-buněčného receptoru

B-buněčný receptor zastává ve fyziologii B-lymfocytů velmi významnou pozici. Za normálních podmínek slouží tento komplex a jeho signální dráha jako kontrolní bod vývoje, stavba receptoru je selekčním markerem, stimulace vede k proliferaci a tvorbě protilátek, nadměrná stimulace naopak vede k eliminaci auto-reaktivních klonů. V případě několika typů lymfomů se setkáváme s konkrétními mutacemi uvnitř BCR dráhy, které zajišťují zvýšenou aktivitu této signalizace, jedná se například o difúzní velkobuněčný lymfom nebo lymfom žaludku. U buněk CLL se však podobné mutace nevyskytují a k aktivaci dráhy dochází, podobně jako u normálních B-lymfocytů, uvnitř mikroprostředí skrze vazbu antigenu, v periferní krvi je pak dráha stimulována tzv. tonickou, na ligandu nezávislou, aktivací receptoru (Lam *et al.*, 1997).



Obr. 3: Signální kaskáda dráhy B-buněčného receptoru.

Signální kaskáda BCR (Obr. 3) je zahájena konformační změnou heterodimeru CD79A a CD79B, čímž dojde k odhalení tyrozinových motivů ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Konformační změna umožňuje aktivaci kináz LYN (Lnk/Yes novel tyrosine kinase) a SYK (spleen tyrosine kinase). Jednou fosforylovaná kináza SYK dále zprostředkovává dvojitou fosforylaci ITAM motivů a následně vlastní autofosforylaci, čímž zvýší svou aktivitu. Takto aktivovaná SYK kináza fosforyluje BTK (Bruton tyrosine kinase) a adaptorový protein BLNK (B-cell linker protein). Tyto proteiny společně s fosfolipázou PLC γ 2 (phospholipase C γ 2) tvoří komplex, BTK poté autofosforyluje a přenáší fosfát na PLC γ 2. Fosfolipáza přeměňuje membránový fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2) na diacylglycerol (DAG) a inositol-3,4,5-trisfosfát (IP3), které slouží jako sekundární poslové. V případě DAG dochází k aktivaci kinázy PKC β (protein kinase C β), ta spouští dráhy MAP kináz či NF- κ B (Shinohara *et al.*, 2005; Sutherland *et al.*, 1996). Molekula IP3 má vliv na hladiny vápenatých iontů. Na tyto změny reagují dráhy transkripčních faktorů NFAT (nuclear factor of activated T-cells) a NF- κ B (Antony *et al.*, 2004).

Kinázy LYN a SYK aktivují i paralelní dráhu kinázy PI3K, a to skrze fosforylaci koreceptorové molekuly CD19. PI3K fosforyluje PIP2 na PIP3, to umožňuje několika dalším proteinům přiblížení k membráně skrze jejich PH doménu (pleckstrin homology), konkrétně BTK, Akt nebo GAB1 (Gbr2-associated binding protein 1). Translokace k membráně předchází plné aktivaci BTK (Saito *et al.*, 2001), protein GAB1 má adaptorovou funkci, přivádí k membráně další molekuly PI3K a zvyšuje tak aktivitu dráhy (Ingham *et al.*, 2001; Mráz *et al.*, 2014). V případě kinázy Akt dochází k nejprve k translokaci k membráně a následně k dvojitě fosforylaci nejprve komplexem mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2), posléze pak kinázou PDK1 (PIP3 dependent kinase 1) (Sarbasov *et al.*, 2005). Kináza Akt ovlivňuje široké spektrum procesů uvnitř buňky a její aberantní aktivita je popsána u mnoha malignit, na molekulární úrovni jsou to pak výběrem inhibice pro-apoptického proteinu BAD (BCL2-associated death promoter) nebo deaktivace rodiny transkripčních faktorů FoxO (forkhead-box protein O), opačně pak Akt umožňuje sestavení komplexu mTORC1, významného aktivátoru translace, nepřímo je také schopna aktivace drah NFAT a NF κ B.

Negativní regulace dráhy BCR se odvíjí především od aktivity fosfatáz PTEN (phosphatase and tensin homolog), SHIP1 (SH2-domain-containing inositol 5'-phosphatase 1) a SHP1 (SH2-domain-containing 5'-phosphatase 1), které antagonisticky proti PI3K defosforylují PIP3. Tyto enzymy jsou aktivovány pomocí kinázy LYN přes fosforylaci molekul CD22 a Fc γ RIIB s inhibičními tyrozinovými motivy ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif),

kam se zmíněné fosfatázy posléze naváží a aktivují (Chan *et al.*, 1998). Zpětnovazebnou smyčku zajišťuje také PKC β , která inhibičně fosforyluje BTK (Kang, 2001). Samostatnou úroveň regulace představují miRNA, které jsou zapojeny jak v pozitivní, tak negativní regulaci (např. Černá *et al.*, 2019; Psathas *et al.*, 2013).

Ústřední kinázy BCR dráhy, tedy BTK a PI3K, jsou také zapojeny v drahách, které jsou na stimulaci BCR nezávislé a vycházejí ze signálů uvnitř mikroprostředí. Konkrétně se jedná o nekanonickou dráhu NF- κ B, která je spuštěna vazbou ligandu BAFF na svůj receptor. Stimulace receptoru rekrutuje kinázu LYN, která spouští kaskádu vedoucí k aktivaci transkripčního faktoru (Patke *et al.*, 2006). Druhým příkladem aktivace BTK a PI3K skrze chemokinové receptory CXCR4 a 5. Cytoplazmatická část receptorů váže G-protein, po stimulaci G-protein disociuje a jeho podjednotka G $\beta\gamma$ aktivuje obě zmíněné kinázy (de Gorter *et al.*, 2007).

1.2.2 BTK inhibitory

Z předchozího textu jasně vyplývá význam signální dráhy B-buněčného receptoru a její široký příspěvek k přežívání leukemických buněk. Důkazem toho jsou mutace v povrchovém imunoglobulinu, které determinují agresivní či indolentní onemocnění, a tedy prognózu CLL (*IGHV* status – „mutated“ vs. „unmutated“ CLL). Struktura BCR je pro leukemické buňky natolik významná, že až u 30 % pacientů nalezneme tzv. stereotypní BCR. Leukemické buňky téměř třetiny pacientů exprimují na svém povrchu BCR receptory, jejichž variabilní vazebné oblasti jsou totožné (Stamatopoulos *et al.*, 2007). To ukazuje na skutečnost, že pro CLL buňky je výhodné nést BCR specifické struktury. V návaznosti na objevy, které potvrzovaly důležitost BCR signalizace u B-buněčných malignit, probíhá posledních cca 15 let také intenzivní výzkum molekul, jež mají schopnost kaskádu narušit, a vykazují tedy i potenciál pro použití v léčbě.

Prvním schváleným a v současné době nejpoužívanějším inhibitorem v léčbě CLL je ibrutinib (Imbruvica, PCI-32765), inhibitor kinázy BTK. Molekulárně inhibice spočívá v ireverzibilní kovalentní vazbě na cystein C481 na BTK, kdy vazba brání autofosforylaci a následné aktivaci fosfolipázy PLC γ 2 (Pan *et al.*, 2007). Tato inhibice má konkrétně za následek zastavení proliferace CLL buněk uvnitř lymfatických orgánů v důsledku blokace drah PI3K a NF- κ B (Herman *et al.*, 2014). Z hlediska přežívání buněk má však tato blokace minoritní dopad. Hlavním mechanismem obecně BTK inhibitorů je znemožnění nejprve adhezní a posléze migrační signalizace mezi leukemickými buňkami a mikroprostředím. Příčinou je blokace adheze mezi integrinem α 4 β 1, fibronektinem a VCAM1, a migrační kapacity směrem

k chemokinům SDF1 a CXCL13 (de Rooij *et al.*, 2012). To má za následek nucenou retenci maligních buněk v periferní krvi, přechodný stav lymfocytózy a postupné vymírání CLL buněk (Byrd *et al.*, 2013).

Jelikož byl ibrutinib prvním inhibítorem pro léčbu CLL schváleným v roce 2013, do dnešní doby již došlo k vývoji dalších generací BTK inhibitorů, u nichž pozorujeme z důvodu vyšší specifity především lepší cytotoxické vlastnosti, než má jejich předchůdce. Výzkum dalších generací se stal také relevantním z pohledu získané genetické rezistence vůči ibrutinibu, která bude předmětem dalších kapitol. V rámci léčby CLL jsou momentálně agenturou FDA schváleny k použití krom ibrutinibu také acalabrutinib a zanubrutinib, které fungují na stejném principu jako ibrutinib. Při širším pohledu se lze setkat s tirabrutinibem a orelabrutinibem, jež získaly v roce 2020 osvědčení pro léčbu B-buněčných malignit v Japonsku, respektive v Číně, a jejich testování probíhá také pro Spojené státy a Evropu. Záležitostí ledna 2023 je schválení pirtobrutinibu, nekovalentního BTK inhibitoru třetí generace, pro léčbu refrakterního/relabujícího lymfomu z pláštěvých buněk ve Spojených státech, který by zároveň mohl být příhodným řešením pro geneticky podmíněnou rezistenci vůči kovalentním inhibitorům u CLL.

1.2.3 PI3K inhibitory

Druhou třídu klinicky využívaných BCR inhibitorů představují inhibitory kinázy PI3K, která stojí na počátku osy PI3K-Akt signalizace. Základním mechanismem účinku je inhibice katalytické podjednotky p110, která zajišťuje tvorbu sekundárního posla PIP3, jenž je dokovacím místem pro velké množství dalších molekul. Výsledkem této inhibice je pak primárně snížená hladina fosforylované kinázy Akt (Lannutti *et al.*, 2011).

Klinicky schválenými inhibitory této kategorie jsou idelalisib a duvelisib. Idelalisib cílí δ izoformu p110, která je specificky exprimovaná pouze u leukocytů, CLL buňky ji pak exprimují v ještě vyšší míře než buňky zdravé. Inhibice této izoformy vede u leukemických buněk k narušení integrace anti-apoptických signálů z mikroprostředí (především CD40 a BAFF-R signalizace), zároveň dochází k přerušování adherentní interakce přes fibronectin (Herman *et al.*, 2010). Druhým schváleným inhibítorem je duvelisib, který krom δ izoformy inhibuje také izoformu γ . Dopady na signalizaci jsou u podobné jako u idelalisibu, u duvelisibu se přidává navíc blokáda migrační signalizace vedoucí přes IL4 (Ali *et al.*, 2018).

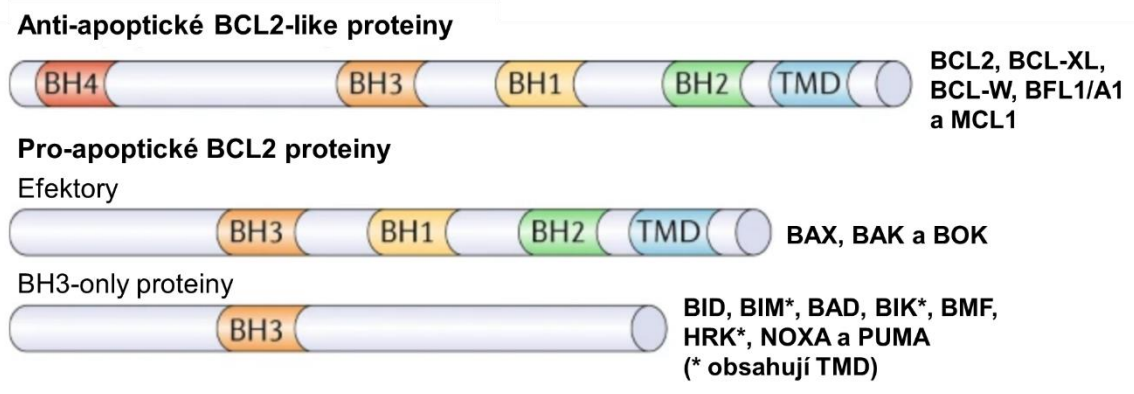
Z hlediska použití v léčbě v ČR je součástí doporučení pouze idelalisib, a to pro případy relapsu či při výskytu komorbidit. Nicméně praktické použití PI3K inhibitorů ustupuje novým

generacím BTK inhibitorů a venetoclaxu, ve srovnání s těmito odlišnými typy inhibitorů je PI3K inhibice významně toxičtější a vysoká toxicita je hlavním případem ukončení léčby těmito inhibitory (Bird *et al.*, 2020). Příčinou toxicity je především inhibice PI3K u ostatních typů leukocytů, v nejvyšší míře se jedná o T-lymfocyty, což může vést až ke vzniku vážných autoimunitních poruch (Chellappa *et al.*, 2019). V současné době je v různých fázích klinických studií poměrně velké množství druhé generace PI3K inhibitorů, jež si kladou za cíl především snížení toxicity.

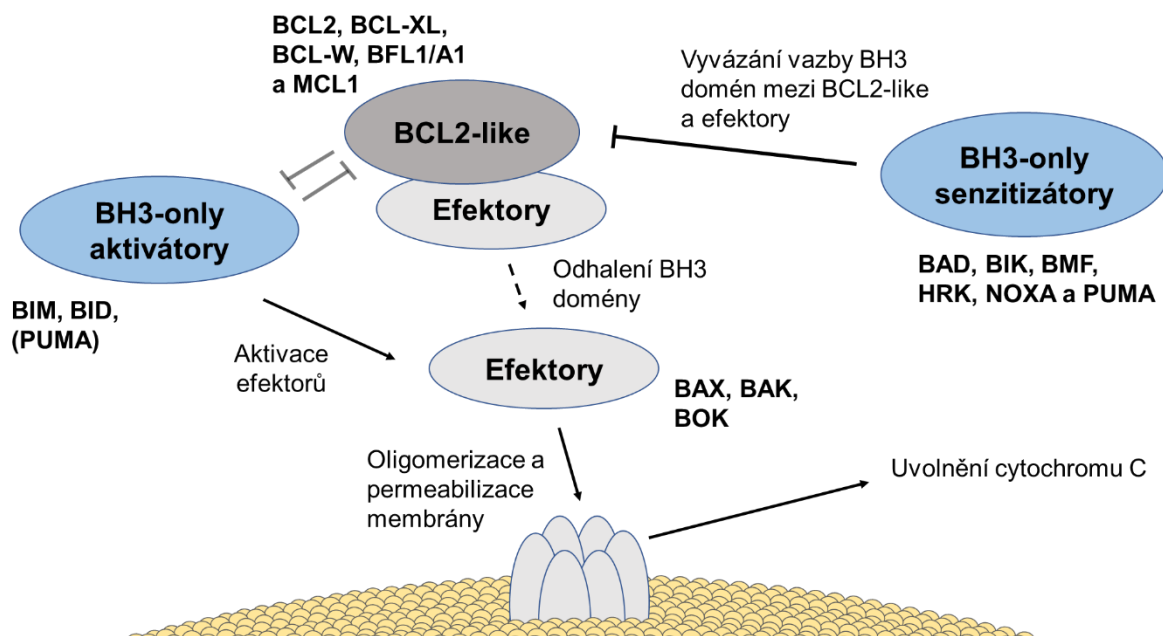
1.3 Rodina BCL2 v signalizaci apoptózy

V souvislosti s cílenou léčbou je nezbytně nutné zmínit vnitřní, mitochondriální dráhu apoptózy, která je řízena proteinovou rodinou BCL2. Právě tato dráha je z hlediska CLL velice atraktivním cílem inhibice pomocí tzv. BH3 mimetik, kam patří také venetoclax, klinicky využívaný BCL2 inhibitor, jenž se od svého zavedení v roce 2016 stává v mnoha indikacích lékem č. 1 pro léčbu CLL. Nejčastější genetickou aberací onemocnění CLL je delece 13q14. Tato aberace zasahuje lokusy *DLEU-1* a 2, které nesou miR-15a a miR-16-1, negativní regulátory anti-apoptického proteinu BCL2. V důsledku této delece pak sledujeme u leukemických buněk nadměrné hladiny toho anti-apoptického proteinu, a tedy významně narušenou signalizaci buněčné smrti (Cimmino *et al.*, 2005). Tento aspekt tedy činí z CLL příhodnou pro cílenou léčbu tohoto typu.

Signalizace vnitřní cesty apoptózy stojí na velice komplexních interakcích uvnitř rodiny BCL2. Do této rodiny je dnes zařazeno cca 30 různých proteinů, jejichž společným znakem je přítomnost alespoň jedné ze čtyř tzv. BH domén (BCL2-homology). Právě na základě zastoupení jednotlivých domén lze BCL2 rodinu rozdělit do tří skupin – BCL2-like, BH3-only a BCL2 efekty (Obr. 4). Funkčně dělíme proteiny rodiny BCL2 do celkově čtyř skupin, které odrážejí především důsledky jejich případné interakce s ostatními funkčními skupinami. Jedná se o inhibitory, senzitivátory, aktivátory a efekty apoptózy (Obr. 5).



Obr. 4: Strukturní dělení rodiny BCL2 za základě přítomnosti BCL2 homology domén; TMD – transmembránová doména (Bock a Tait, 2020; upraveno).



Obr. 5: Funkční rozdělení členů BCL2 rodiny.

Spuštění apoptózy se může odvíjet jak od vnějších (např. stimulace TNF-R – tumor necrosis factor receptor), tak vnitřních signálů (např. poškození DNA), které v konečném důsledku vyústí do permeabilizace vnější mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c do cytosolu buňky. Samotná permeabilizace je aktivovaná změnou konformace a následnou oligomerizací efektorových proteinů BAX (BCL2-associated X protein) a BAK (BCL2 homologous/antagonist killer), která vede k vytvoření makropórů v mitochondriální membráně. V případě normálních, přežití prospěšných podmínek spolu heterodimerizují BH3 domény efektorových a anti-apoptických BCL2-like proteinů. Funkce BCL2-like proteinů je abundantní, nicméně různé buněčné typy exprimují různé hladiny těchto anti-apoptických proteinů a jsou na jejich přítomnosti různě závislé. Pokud je osud buňky nasměrován do apoptózy, dochází k aktivaci BH3-only proteinů a současně ke dvěma jevům. Jednak je nutné uvolnit BH3 doménu efektorových proteinů z vazby s anti-apoptickými BCL2-like. Tuto úlohu zprostředkovávají tzv. BH3-only senzitivátory. Tyto proteiny využijí vlastní BH3 doménu k vytvoření vazby s BCL2-like proteiny, čímž je vyblokuje a zamezí inhibiční vazbě na efektory. Druhou skupinou, která reaguje na apoptický signál, jsou BH3-only aktivátory. Jejich vazba na BH3 doménu efektorových proteinů umožňuje aktivaci a konformační změnu efektorů, jež vyústí v tvorbu oligomerů a permeabilizaci mitochondriální membrány (Letai *et al.*, 2002).

1.3.1 Venetoclax

Inhibitor anti-apoptického proteinu BCL2 venetoclax je vedle BTK inhibitorů dalším nejpoužívanějším inhibitorem v léčbě CLL. Venetoclax spadá svou strukturou do skupiny tzv. BH3 mimetik, tedy látek, které více či méně selektivně váží BH3 domény anti-apoptických členů rodiny BCL2, jimž je tímto zabráněno tvořit heterodimer s efektorovými proteiny. Výzkum a vývoj venetoclaxu podobných molekul probíhá již řadu let a mnoho z nich postoupilo do klinického testování, nicméně prozatím pouze venetoclax úspěšně prošel všemi fázemi a je nyní prakticky využíván. Tento lék byl pro léčbu CLL schválen ve zrychleném řízení v roce 2016 a od té doby se dostal do doporučených léčebných postupů u všech prognostických podskupin CLL, a to jak samostatně, tak v kombinaci s léčbou anti-CD20 monoklonálními protilátkami (rituximab, obinutuzumab).

Velkou výhodou venetoclaxu je jeho vysoká selektivita vůči proteinu BCL2, na kterém jsou leukemické buňky vysoce závislé, a schopnost účinku na apoptózu buněk v horizontu 24 hodin (Souers *et al.*, 2013). Tento akutní účinek je však u pacientů nežádoucí a vyvolává syndrom nádorového rozpadu, v praxi se tedy inhibitor aplikuje v postupně se zvyšujících dávkách (Seymour *et al.*, 2014). Oproti jiným BH3 mimetikům disponuje venetoclax již zmíněnou vysokou selektivitou vůči BCL2. Současná inhibice BCL2 a BCL-XL (B-cell lymphoma extra large), pozorovaná u předchůdce navitoclaxu, totiž vede k toxicitě vůči krevním destičkám a závažnou trombocytopenii (Roberts *et al.*, 2012).

Léčba venetoclaxem je kromě CLL schválena i pro akutní myeloidní leukémii, klinické testování probíhá pro několik dalších typů hematologických malignit. Klinické testování bylo také zahájeno u inhibitoru lisaftoclaxu, selektivnímu inhibitoru BCL2 nové generace. V preklinickém výzkumu tento nový inhibitor vykazoval podobný terapeutický potenciál jako jeho předchůdce, byla také popsána jeho účinnost u buněk geneticky rezistentních na venetoclax (Deng *et al.*, 2022; Zhai *et al.*, 2023).

1.4 Mechanismy rezistence na cílenou léčbu v CLL

Léčba nízkomolekulárními inhibitory zaznamenala od svého zavedení mnoho úspěchů a do dnešní doby téměř bezvýhradně nahradila chemoterapii jako primární léčebný přístup u pacientů s CLL. Jejimi hlavními výhodami je nižší cytotoxicita a možnost použití u všech prognostických skupin. Přes všechny tyto klady, u významné části pacientů léčených inhibitory pozorujeme s různě dlouhým časovým odstupem od zahájení léčby relaps onemocnění, jenž je projevem plné manifestace rezistence. K dosažení žádané klinické odpovědi je nutná dlouhodobá expozice maligních buněk vůči inhibiční léčbě, a to zejména v případě BCR inhibitorů. Tato expozice vytváří na buňky velký selekční tlak, v důsledku čehož si nemoc postupem času vybuduje rezistentní fenotyp. Získaná rezistence je následkem jak genetických mutací, nejčastěji v inhibovaných proteinech, tak i negeneticky podmíněných změn v aktivitě signálních drah maligních buněk, kdy je možné u pacientů pozorovat oba tyto mechanismy současně. Vzhledem k zaměření experimentální části této práce jsou v následujících kapitolách popisovány především mechanismy rezistence k inhibitorům kinázy BTK a venetoclaxu, inhibitoru anti-apoptického BCL2 proteinu.

1.4.1 Geneticky podmíněná rezistence

Jak již bylo řečeno, genetické příčiny rezistence k léčbě inhibitory vyplývají nejčastěji z mutací přímo v blokových proteinech, jež zabraňují vazbě inhibitoru, popřípadě tuto vazbu oslabují. Existují však i jiné cíle mutací, přispívajících k zisku rezistence, které budou v této kapitole také zmíněny.

Z hlediska tohoto typu rezistence je nejlépe prozkoumaným lékem ibrutinib, u něhož je geneticky podmíněná rezistence zapříčiněna nejčastěji mutacemi v genech pro kinázu BTK a fosfolipázu PLC γ 2 (Woyach *et al.*, 2014; Quinquenel *et al.*, 2019). V případě mutací v genu *BTK* je nejčastěji zasažena katalytická doména, konkrétně cysteinové reziduum v pozici 481. Důsledkem je pak oslabená vazba inhibitoru na molekulu kinázy, kdy zbytková aktivita enzymu umožňuje spuštění následných drah (Woyach *et al.*, 2014). U fosfolipázy PLC γ 2 jsou popisovány mutace, jež zvyšují afinitu k BTK a vedou k možné aktivaci inhibovanou či neaktivní BTK (Wist *et al.*, 2020). U relabovaných pacientů jsou také popsány mutace v PLC γ 2, které zcela mění afinitu tohoto enzymu. Takto mutovaná fosfolipáza je pak aktivována kinázami SYK a LYN i bez aktivní BTK (Liu *et al.*, 2015). V případě mutací v kináze BTK jsou potenciální alternativou nekovalentní inhibitory BTK, jako je příkladem

pirtobrutinib. U pacientů s relapsem v důsledku mutací v PLC γ 2 se pak nabízí pouze změna léčby na jiný typ inhibitorů, zde se jeví jako vhodné použití inhibitorů kináz LYN a SYK (Liu *et al.*, 2015). Retrospektivní studie ukazují i na prognostický potenciál těchto mutací. U kohorty pozorovaných pacientů se mutace v BTK objevují nejpozději 3 měsíce před relapsem, existuje tedy možnost změnit léčbu ještě před klinickým relapsem a zabránit komplikacím s ním spojeným (Woyach *et al.*, 2017).

Krom mutací pozorovaných přímo v BTK či PLC γ 2 se setkáváme s aberacemi, které, ačkoliv nezasahují přímo dráhu BCR, tak vedou k manifestaci rezistence. Jedná se o delecii 8p, jež zasahuje gen pro TRAIL-R (TNF-related apoptosis inducing ligand receptor), CLL buňky jsou v důsledku aberace necitlivé k TRAIL-indukované apoptóze (Burger *et al.*, 2016). Druhou aberací je zisk genetického materiálu v oblasti 2p, který vede k nadměrné expresi proteinu XPO1 (exportin 1). Tento protein pak zajišťuje zvýšený export některých tumor supresorových transkripčních faktorů z jádra do cytoplazmy, příkladem p53, čímž zajišťuje rezistenci nejen k BTK inhibitorům, ale i chemoterapeutikům či PI3K inhibitorům (Cosson *et al.*, 2017).

V dnešní době jsou již k léčbě schváleny kovalentní BTK inhibitory další generace, kam patří acalabrutinib a zanubrutinib. Mechanismus účinku těchto inhibitorů je totožný s ibrutinibem. U pacientů s genetickou rezistencí k acalabrutinibu jsou pozorovány stejné mutace v *BTK* a *PLCG2* jako u rezistence k ibrutinibu (Woyach *et al.*, 2019). Co se týče zanubrutinibu, jež byl k léčbě schválen v lednu 2023, lze předpokládat stejné mechanismy geneticky podmíněné rezistence, nicméně klinická data, která by tyto předpoklady potvrdila, prozatím nejsou k dispozici. Částečným otazníkem je dnes také genetická rezistence k nekovalentním inhibitorům BTK. Výsledky analýz z klinických studií pirtobrutinibu u pacientů, kteří během studie progradovali, ukazují na mutace v katalytické doméně BTK, př. L528W (Wang *et al.*, 2022).

V kontextu genetické rezistence k venetoclaxu se u relabovaných pacientů nejčastěji vyskytují mutace G101V, v menší míře pak D103Y. Tyto mutace nezasahují přímo místo vazby venetoclaxu, ale jejich přítomnost vede ke konformační změně vazebného místa na reziduu E152, čímž je posléze znemožněna vazba venetoclaxu na BCL2 (Blombery *et al.*, 2019; Birkinshaw *et al.*, 2019). Aktuálně lze řešit tento typ rezistence změnou na léčbu BTK inhibitory, určitý potenciál představuje BCL2 inhibitor lisaftoclax, u něž byla v preklinických studiích pozorována účinnost u buněk s klinicky významnými mutacemi spojených s rezistencí k venetoclaxu (Zhai *et al.*, 2023).

Na úrovni genomu a genetických aberací se kromě mutací v genu *BCL2* setkáváme také s rekurentními aberacemi v dalších proteinech dráhy BCL2, popř. v up-stream signálních drahách, které typicky přesouvají roli hlavního regulátoru apoptózy na další anti-apoptické proteiny dráhy BCL2. Buňky tedy ztrácejí svou původní závislost na hladinách BCL2 a rozhodujícími se stávají hladiny MCL1 (myeloid cell leukemia 1) či BCL-XL. Příkladem lze uvést mutace v *SMARCA4*, který je součástí komplexu SWI-SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable). Ten účastní remodelace chromatinu a nepřímo vede ke zvýšení hladin BCL-XL (Agarwal *et al.*, 2019). Studiemi rezistence k venetoclaxu *in vitro* byla popsána role trisomie 12, která se vyskytuje u 16 % pacientů s CLL. Ačkoliv klinická data neukazují na významný pokles účinnosti venetoclaxu u pacientů s trisomií 12, předpokládá se, že trisomie vede ke zvýšení hladin MCL1 skrze absenci IRF4 (interferon regulatory factor 4), regulátoru dráhy NOTCH, která v konečném důsledku aktivuje expresi MCL1 (Fiorcari *et al.*, 2022). U případů relapsu na venetoclaxu byl také popsán výskyt amplifikací lokusu 1q21 s genem *MCL1*, či různých zásahů v genech pro další členy BCL2 rodiny (Thijssen *et al.*, 2022). Obecně lze říct, že genetické pozadí rezistence k venetoclaxu je mezi pacienty mimořádně heterogenní, podobně se liší také studie zabývající se touto problematikou.

1.4.2 Negenetické mechanismy rezistence

Vznik mutací, vedoucích k rezistenci k inhibitorům, lze obecně označit za náhodný a následná selekce specificky mutovaných buněk je dlouhodobý proces. Naproti tomu, adaptační změny signálních drah, z nichž negenetická rezistence vychází, mohou započít ihned po nasazení léčby a buňka může cíleně reagovat na výpadek konkrétní signální dráhy. Výzkum možných cest budování negenetické rezistence získal do dnešní doby velký význam, především z hlediska kombinované léčby. Z tohoto pohledu má velký potenciál léčba takovou kombinací inhibitorů, jež by dokázala společně s inhibicí hlavních drah pro přežití také blokovat signální dráhy, které buňka využívá ke zmírnění účinků prvotní inhibice a potenciálně k vybudování rezistence.

Až 20 % pacientů rezistentních k ibrutinibu nenese žádnou z dříve popsaných mutací či aberací spojených s rezistencí (Ahn *et al.*, 2017). Několik studií u primárních CLL buněk i buněčných linií potvrdilo zvýšenou aktivitu dráhy PI3K-Akt, součásti BCR signální dráhy, v souvislosti s rezistentním fenotypem vůči ibrutinibu. Při dlouhodobé inhibici BTK pomocí ibrutinibu dochází iniciálně k aktivaci negativních regulátorů PI3K dráhy, konkrétně FoxO3A (forkhead box protein O3A) a PTEN, následně však maligní buňky snižují expresi těchto regulátorů, což jim umožňuje obnovit životu prospěšnou dráhu PI3K-Akt (Kapoor *et al.*, 2019).

Léčba ibrutinibem vede u pacientů k postupnému zvyšování povrchového IgM, čímž dochází ke zvýšení intenzity down-stream BCR signalizace. V konečném důsledku je BCR natolik aktivní, že převyšuje účinky inhibice kinázy BTK (Chiodin *et al.*, 2019).

Jak bylo zmíněno v kapitole o mechanismech působení inhibitorů, ibrutinib významně omezuje migrační a adhezní kapacitu. Interakce tohoto typu uvnitř mikroprostředí poskytují CLL buňkám velké množství prospěšných signálů. Během léčby ibrutinibem byla pozorována adaptace směrem k obnovení těchto signálních drah. Vlivem adaptační aktivity PI3K dochází k navýšení hladin CD49d, podjednotky integrinu VLA4, a alternativnímu spuštění integrinové signalizace. Právě vysoké hladiny CD49d předpovídají sníženou efektivitu ibrutinibu, a tedy horší prognózu (Tissino *et al.*, 2018).

Obnovení migrační aktivity skrze PI3K-Akt dráhu se také účastní adaptorový protein GAB1, jež umožňuje kináze PI3K nasednutí k plazmatické membráně. Během léčby ibrutinibem dochází v důsledku počátečního snížení aktivity Akt k navýšení exprese proteinu GAB1. Mediátorem této adaptační smyčky je transkripční faktor FoxO1 (forkhead box protein O1), který je dráhou PI3K-Akt negativně regulován a při její inhibici aktivuje transkripci GAB1. Výsledkem signalizace FoxO1-GAB1-PI3K je pak obnovení hladin aktivní kinázy Akt a posílení migrace CLL buněk směrem k chemoatraktantům mikroprostředí, jako jsou SDF1 nebo CXCL13 (Šeda *et al.*, 2021).

Mechanismy stojící za negenetickou rezistencí k venetoclaxu obecně plynou ze zvýšených hladin dalších anti-apoptických BCL2-like proteinů, především MCL1 a BCL-XL. Avšak, signální dráhy, jež vedou k těmto změnám, jsou napříč rezistentními pacienty velice heterogenní. Hledání příčin změn v hladinách BCL2 proteinů je z praktického hlediska důležité. Jako řešení pro tyto případy rezistence se nabízí kombinovaná inhibice vícero anti-apoptických členů rodiny BCL2, jak však ukázaly experimenty s navitoclaxem, duálním inhibitorem BCL2 a BCL-XL, tato kombinovaná inhibice může být pro zdravé buňky významně toxická (Roberts *et al.*, 2012). Při výhledu použití kombinované léčby inhibitorů v budoucnu je tedy nutné cílit na příčiny těchto změn v expresi MCL1 či BCL-XL.

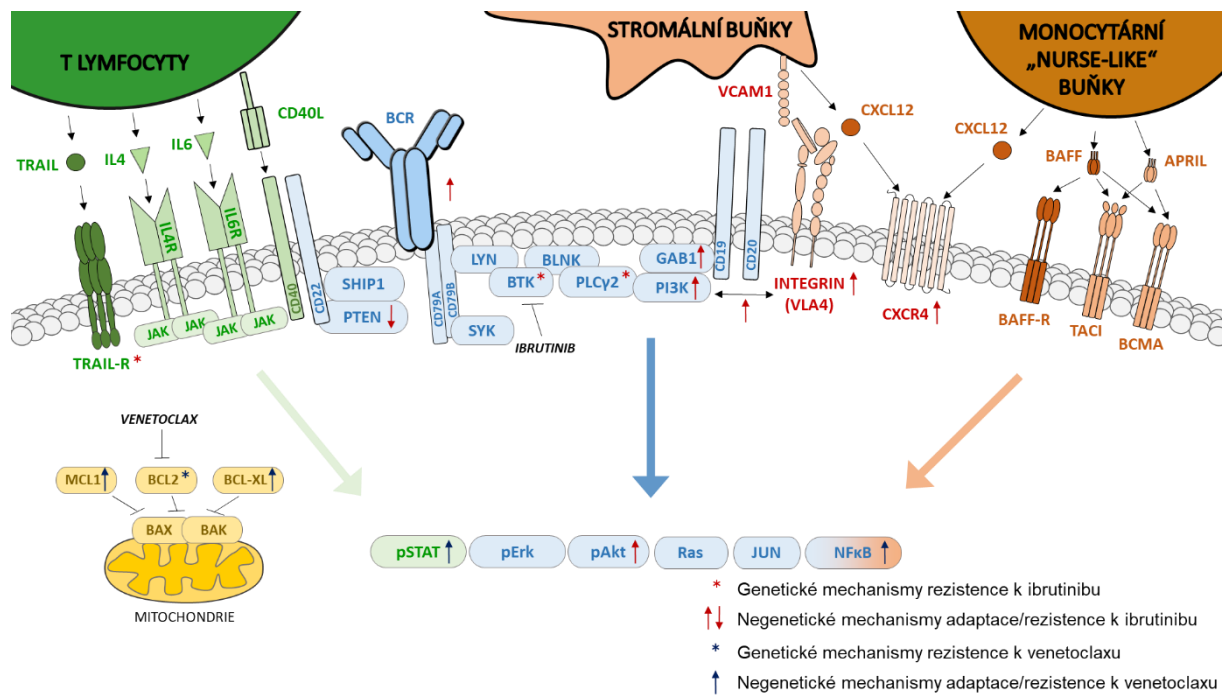
Významným modulátorem rezistence k venetoclaxu je mikroprostředí CLL. V rámci interakcí uvnitř mikroprostředí byly popsány dráhy, jež vedou ke zvýšení hladin jak MCL1, tak BCL-XL (Pedersen *et al.*, 2002; Cuni *et al.*, 2004). V kokultivačních modelech CLL buněk se stromálními buňkami, které modelují mikroprostředí, byla potvrzena mnohonásobně (v řádech tisíců) vyšší odolnost CLL buněk vůči venetoclaxu, jedním z hlavních induktorů této rezistence je signalizace receptoru CD40 a jeho ligandu, který je poskytovaný T-lymfocyty

(Haselager *et al.*, 2020). Podobného efektu bylo dosaženo v systémech se stimulem IL4, kdy v CLL buňkách dochází k indukci transkripčních faktorů STAT3 a 6, jejich aktivita pak vede k expresi proteinů MCL1 a BCL-XL (Steele *et al.*, 2010).

Současné studie opakovaně ukazují na roli transkripčního faktoru NF- κ B v rezistenci k venetoclaxu. Indukce NF- κ B v průběhu léčby venetoclaxem v důsledku aktivace CLL buněk v mikroprostředí vede k expresi BCL-XL, popř. BFL-1/A1 (BCL2 related protein A1), dalšího anti-apoptického člena rodiny BCL2, jež je však v CLL buňkách zastoupen pouze minoritně (Haselager *et al.*, 2023). Nicméně aktivita NF- κ B byla pozorována také u subpopulace CLL buněk CXCR4^{bright}CD5^{dim}, jež představuje neaktivovanou část buněk, které se vyskytují v chudém prostředí periferní krve delší dobu a směřují do lymfatických uzlin. U této populace vede aktivita NF- κ B k expresi MCL1, přičemž se jedná o první popsany případ regulace transkripce *MCL1* skrze NF- κ B. To, jaká signalizace umožňuje buňkám aktivovat NF- κ B v periferní krvi není známo, ale výsledky studie naznačují, že právě léčba venetoclaxem je onen faktor, který udržuje fenotyp aktivního NF- κ B (Thijssen *et al.*, 2022).

S účinky venetoclaxu a spuštěním apoptózy také souvisí stav mitochondrií v leukemických buňkách. Bylo zjištěno, že příčiny rezistence k venetoclaxu mohou vycházet jak z vysokého počtu mitochondrií, tak také z vysoké míry oxidativní fosforylace (Guièze *et al.*, 2019).

Problematika rezistence k venetoclaxu získává v poslední době stále větší význam, jednak z toho důvodu, že venetoclax je z hlediska CLL velice efektivní terapie a začíná být upřednostňován jakožto nejučinnější inhibitor v léčbě této malignity. Druhým důvodem je jeho schválení pro léčbu akutní myeloidní leukémie. Ačkoliv se jedná o odlišné onemocnění, problém rezistence je neméně důležitým, proto je nutné mechanismy jak geneticky, tak negeneticky podmíněné rezistence studovat.

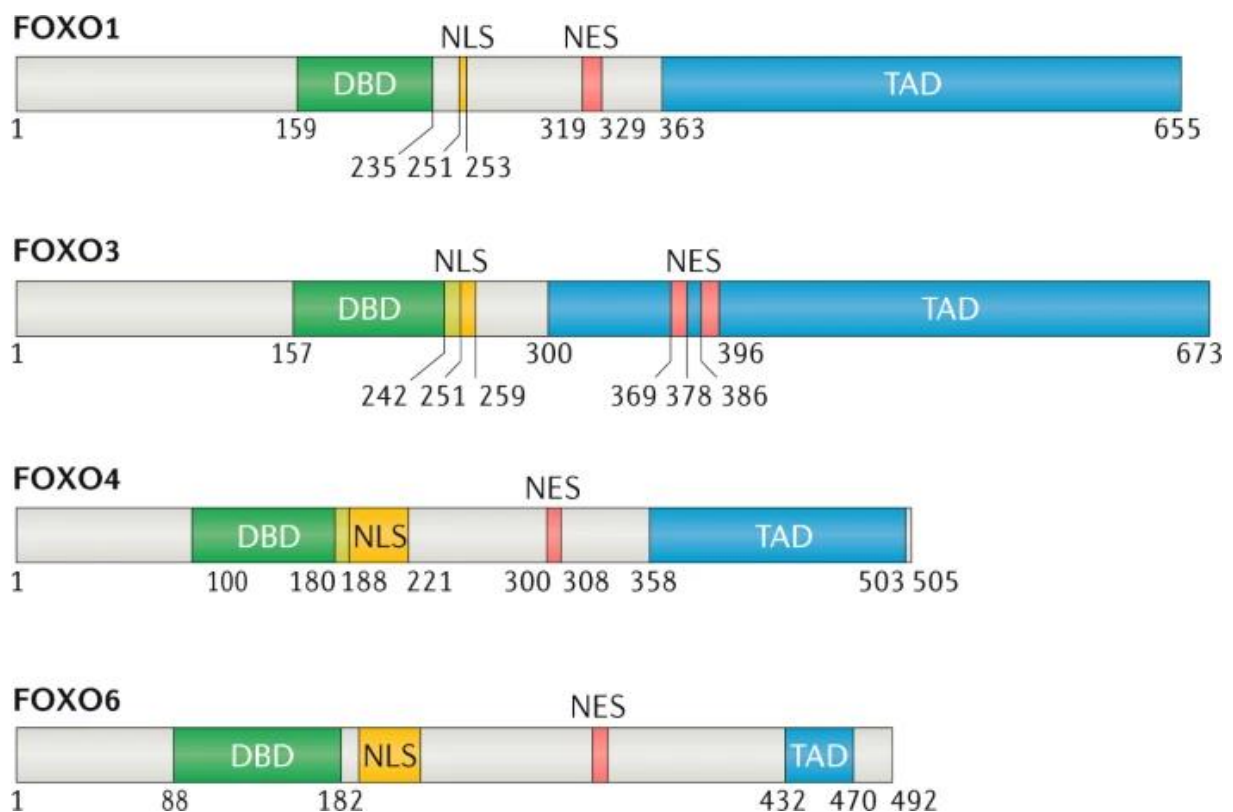


Obr. 6: Mechanismy adaptace a rezistence k ibrutinibu a venetoclaxu (Ondrišová a Mráz, 2020; upraveno).

1.5 Transkripční faktor FoxO1 v kontextu B-lymfocytů a B-malignit

Rodina transkripčních faktorů Forkhead box (Fox) je velice rozsáhnou skupinou proteinů, jejíž zástupce lze nalézt ve všech lidských buňkách a tkáních. Tato rodina je rozdělena na 19 podrodin označených písmeny A-S s celkovým počtem 44 zástupců u člověka. Rozdělení do podrodin je na základě ~100 AMK dlouhé sekvence DNA-vazebné domény (DBD) souhrnně označovanou jako forkhead doména (Golson a Kaestner, 2016).

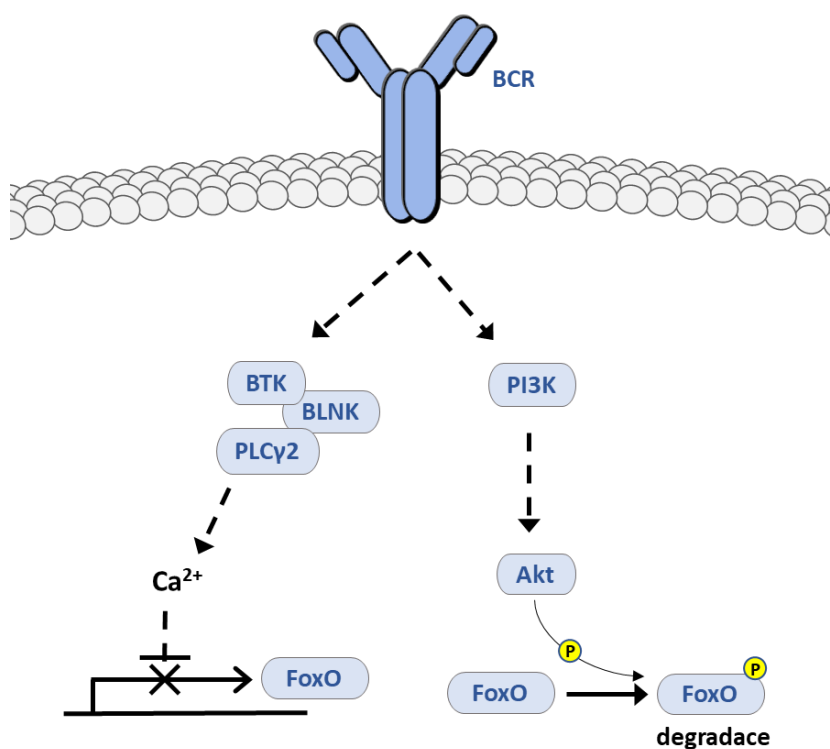
Proteiny třídy FoxO se od ostatních tříd odlišují 5 AMK dlouhou inzercí uvnitř DBD. Jejich DBD rozeznává sekvence 5'-GTAAACAA-3', známou jako vazebný element členů rodiny DAF-16, a 5'-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3', tedy inzulin-responzivní element (Psenakova *et al.*, 2019). U savců nalezneme celkem čtyři zástupce této třídy, a to FoxO1, FoxO3A, FoxO4 a FoxO6 (Obr. 7) (Wang *et al.*, 2008).



Obr. 7: Schéma domén FoxO proteinů se znázorněním jejich DNA-vazebných (DBD) a transaktivačních (TAD) domén, společně se sekvencemi pro jadernou lokalizaci (NLS) a export (NES) (Calissi *et al.*, 2021; upraveno).

U buněčného typu B-lymfocytů jsou v největší míře exprimovány FoxO1 a FoxO3A, kdy oba zástupci se významně podílejí na celém procesu vývoje a zrání buněk. Největší vliv mají tyto faktory na zástavu buněčného cyklu a metabolismu, nicméně se účastní také velice specifických procesů spojených s fyziologií B-lymfocytů.

Regulace těchto faktorů je v B-lymfocytech zprostředkována v největší míře dráhou BCR, konkrétně na dvou úrovních. V prvním případě regulace transkripce je zapojena hladina vápenatých iontů a indukce kalcineurinu, který zabraňuje transkripci. Na úrovni druhé je aktivita FoxO regulována post-translační fosforylací, zejména kinázou Akt, která zapříčiňuje export z jádra a následnou degradaci v cytosolu (Obr. 8). Jsou ale popsány i aktivační modifikace např. kinázami JNK (c-Jun NH2-terminal kinase).



Obr. 8: Schéma regulace FoxO na transkripční a post-translační úrovni dráhou BCR.

FoxO3A hraje klíčovou roli v úvodních fázích diferenciaci hematopoetických kmenových buněk (HSC). Jeho inhibice umožňuje aktivaci buněčného cyklu klidových HSC, je také významným mediátorem přežití spojeným s přítomností růstových faktorů a expresí proteinu BIM, podílí se také na reakci na výskyt reaktivních kyslíkových radikálů a oprav DNA ve spojení s proteinem ATM (Miyamoto *et al.*, 2008; Herold *et al.*, 2013; Yalcin *et al.*, 2008). Obecně FoxO3A reguluje správnou aktivaci hematopoézy.

Determinace diferenciační dráhy směrem k B-lymfocytům se již ve vyšší míře účastní FoxO1. Součinnost tohoto faktoru s proteiny E2A, HEB, EBF, a PAX5 zajišťuje spuštění exprese příslušných genů asociovaných B-buněčnou linií (Welinder *et al.*, 2011). FoxO3 však v těchto procesech také hraje určitou roli, jelikož delece jeho genu vede ke snížení počtů pre-B-buněk a zralých B-buněk v organismu (Hinman *et al.*, 2009).

Kritickou roli má FoxO1 v utváření funkčního BCR receptoru na povrchu B-lymfocytů, je totiž transkripčním aktivátorem genů pro nukleázy RAG1 a RAG2 (recombination-activating gene), které zajišťují V(D)J rekombinaci imunoglobulinových řetězců. Tak jako aktivita těchto nukleáz, tak i aktivita FoxO1 v těchto procesech kolísá. Prvotně se FoxO1 účastní tvorby produktivní kombinace pre-BCR imunoglobulinu. Úspěšné sestavení pre-BCR vede k aktivaci dráhy PI3K-Akt a inhibici FoxO1, tedy i RAG nukleáz (Amin a Schlissel, 2008). Druhá vlna aktivity FoxO1 nastává při detekci auto-reaktivních BCR u nezralých B-lymfocytů. Takové receptory jsou internalizovány, ztráta signálu pak vede k aktivaci FoxO1 a následně RAG1 a RAG2 ve snaze změnit specifitu imunoglobulinu (Kuo a Schlissel, 2009). V případě neúspěchu je do procesu opět zapojen FoxO3A, jež je aktivován v důsledku opakované internalizace BCR. Tentokrát se FoxO3A účastní procesu klonální delece, ačkoliv jeho přesné zapojení v celém procesu není zcela objasněno (Ottens *et al.*, 2018).

V pozdějších fázích vývoje je signalizace skrze BCR esenciální pro přežití B-lymfocytů. Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, slabá tzv. „tonická“ signalizace udržuje B-buňky v klidovém stavu během cirkulace v periferní krvi, silný stimul v podobě antigenu pak přes BCR dráhu buňky aktivuje k intenzivní proliferaci a dalšímu vývoji. Právě inhibice transkripčních faktorů FoxO1 a FoxO3A umožňuje tyto procesy. Intenzita tonické signalizace je dostatečně vysoká, aby byla zachována aktivita faktorů FoxO v negativní regulaci buněčného cyklu a metabolismus B-buněk, ale zároveň dostatečně nízká, aby aktivita FoxO nepřesáhla limit, jež by buňky nasměroval k apoptóze. Rozsáhlá aktivace po stimulaci antigenem pak zcela inhibuje činnost FoxO proteinů a B-lymfocyty mohou vstoupit do procesu klonální expanze (Srinivasan *et al.*, 2009; Yusuf *et al.*, 2004).

Škála procesů v B-lymfocytech, kterých se transkripční faktory FoxO účastní, je velká a tyto proteiny jsou bezesporu velice důležitými regulátory správného vývoje směrem k funkčním buňkám imunitního systému. Vzhledem k tomu, jaké procesy v B-lymfocytech FoxO proteiny realizují, není překvapením, že FoxO mají svůj význam i v B-buněčných malignitách. Předchozí text ukazuje na spíše tumor supresorový charakter těchto transkripčních faktorů, kterému budou odpovídat i deregulace v některých malignitách, nicméně v kontextu aktivity

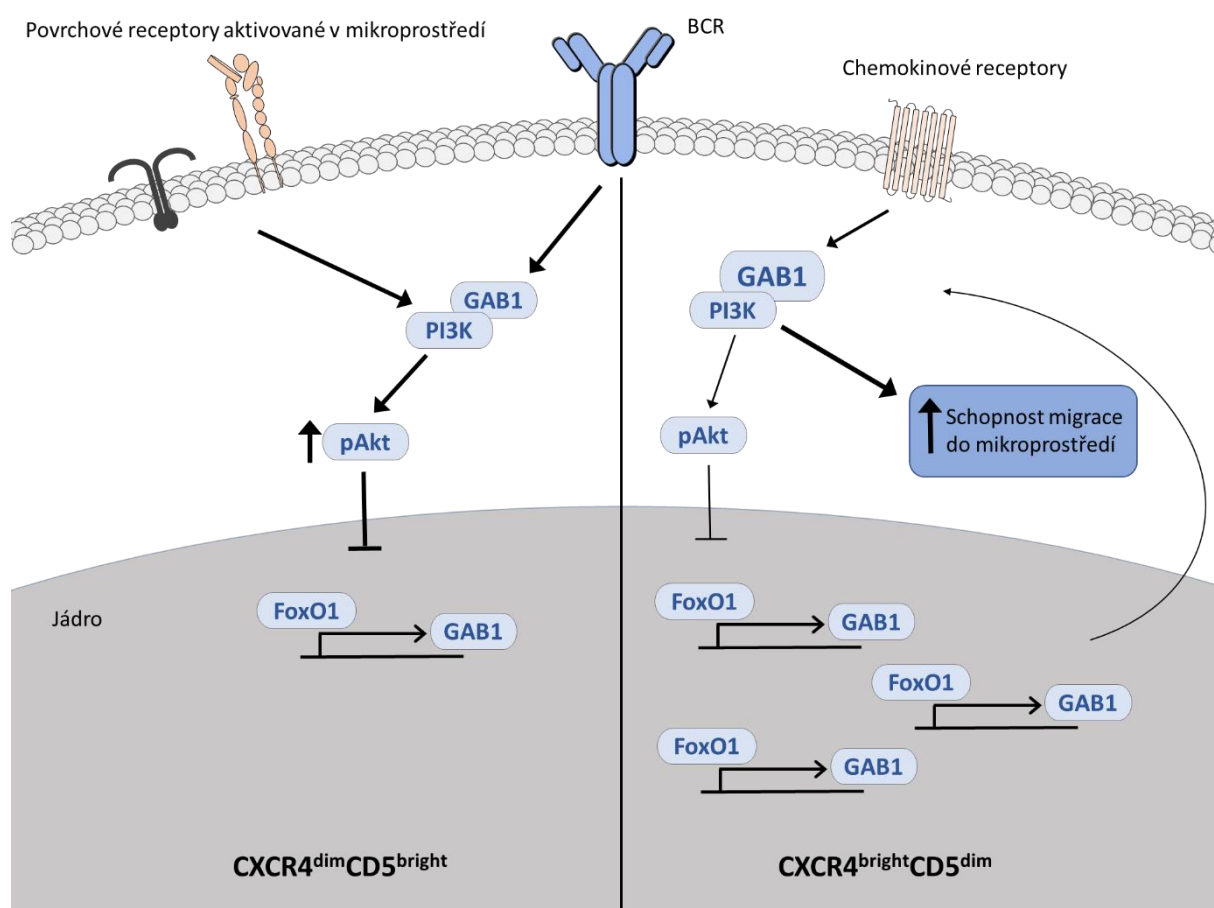
konkrétně proteinu FoxO1 to není zcela jednoznačný popis. V rámci několika B-buněčných malignit se setkáváme s aberacemi, jež zasahují gen pro FoxO1, nicméně dopady těchto aberací mají rozdílné důsledky na maligní buňky, a tedy průběh samotného onemocnění.

V případě Hodgkinova lymfomu (HL) je tumor supresorová role FoxO1 podpořena skutečností, že u 11 % pacientů nacházíme delecí oblasti 13q14, která mimo jiné zasahuje také gen *FOXO1*. Dalším typickým znakem HL je vysoká míra exprese miR-96, miR-182 a miR-183, jejichž kombinace vede ve spojení s aktivní BCR dráhou k efektivnímu zastavení veškeré aktivity FoxO1 (Xie *et al.*, 2012). Podobných poznatků bylo dosaženo u difúzního velkobuněčného lymfomu (DLBCL). Delece *FOXO1* byla prokázána u 20 % pacientů a je asociována s horší prognózou onemocnění (Szydłowski *et al.*, 2016). Paradoxně však u pacientů, u nichž byl identifikován mutovaný FoxO1, byly nalezeny i mutace s aktivačním potenciálem, konkrétně se jedná o mutace zamezující exportu FoxO1 z jádra, př. na zbytku T24 (Trinh *et al.*, 2013).

Zcela opačný charakter mají mutace *FOXO1* u folikulárního lymfomu (FL). Mutace se u pacientů s FL vyskytují v 5 % případů, jejich přítomnost je součástí klinického skórovacího systému a značí horší prognózu (Pastore *et al.*, 2015). U agresivního transformovaného FL se mutace vyskytují již v 15 % a nejčastěji způsobují právě navýšení aktivity tohoto transkripčního faktoru (Pasqualucci *et al.*, 2014). Předpokládá se, že důsledky těchto mutací vedou k expresi proteinu BCL6, jenž stimuluje proliferaci a potlačuje aktivitu p53 (Bouska *et al.*, 2017). Velice podobná situace nastává také u Burkittova lymfomu (BL). U této malignity se setkáváme s mutacemi, které zamezují inhibiční fosforylaci kinázou Akt, nejčastěji na reziduu S22. Zde výzkum pokročil k experimentálnímu testování inhibitorů FoxO1 a výsledky studií ukazují na potenciál toho přístupu v terapii BL (Gehring *et al.*, 2019).

Při pohledu na CLL nejsou aktivační ani inhibiční mutace ve *FOXO1* popisovány. Studie role FoxO1 v patogenezi CLL se svými výsledky liší. Některé ukazují, že právě indukovaná aktivita FoxO1 v důsledku přímé inhibice Akt zprostředkovává cytotoxický účinek Akt inhibitoru na maligní lymfocyty, totožná hypotéza byla tak představena v případě cytotoxického účinku BCR inhibitorů (ibrutinib a idelalisib) (Cosimo *et al.*, 2019). Výsledky naší výzkumné skupiny však představují FoxO1 v roli důležitého modulátoru přežití maligních buněk v podmínkách mimo terapii a mediátoru adaptačního mechanismu k léčbě ibrutinibem. Naše experimenty ukázaly, že v subpopulaci CLL buněk dlouho kolujících v periferní krvi (CXCR4^{bright}CD5^{dim}), u nichž je intenzita BCR signalizace nízká, aktivita FoxO1 umožňuje těmto buňkám migrovat směrem do lymfatických orgánů a výhodných podmínek

mikroprostředí. Děje se tomu skrze spuštění exprese adaptorového proteinu GAB1, jenž integruje odpověď na chemoatraktanty SDF1 a CXCL13. Stejný proces byl pak popsán během inhibice BCR dráhy a narušení adheze a migrace CLL buněk ibrutinibem. Zvýšení hladin GAB1 pak v konečném důsledku vede také ke zvýšené aktivitě kinázy Akt a lepšímu přežívání leukemických buněk. Jedná se tak o důkaz onkogenního potenciálu tohoto transkripčního faktoru v souvislosti s biologií CLL (Obr. 9) (Šeda *et al.*, 2021).



Obr. 9: Porovnání aktivity osy FoxO1/GAB1/Akt mezi subpopulacemi $CXCR4^{dim}CD5^{bright}$ (vlevo) a $CXCR4^{bright}CD5^{dim}$ (vpravo) buněk CLL. V aktivované subpopulaci $CXCR4^{dim}CD5^{bright}$ buněk, které recentně opustily mikroprostředí, je exprese GAB1 snížena v důsledku inhibované aktivity FoxO1. Během přeměny aktivované subpopulace na klidovou $CXCR4^{bright}CD5^{dim}$ se postupně snižuje aktivita signálních drah a zůstávají pouze tonicky udržované hladiny aktivního Akt (pAkt). Následkem nízkých hladin pAkt je obnovena aktivita FoxO1, poté zahájena exprese GAB1, což v konečném důsledku navyšuje tonickou aktivitu pAkt a podporuje migrační schopnost CLL buněk směrem do mikroprostředí uzlin (Šeda *et al.*, 2021; upraveno).

FoxO1 se tedy zdá, že hraje dvojí roli v biologii CLL, nicméně aktuálně dostupná data nepopisují konkrétní funkci tohoto transkripčního faktoru. Neexistují publikovaná data, která by přímo testovala, jakým způsobem a do jaké míry jsou maligní buňky závislé na aktivitě FoxO1, jak v kontextu léčby inhibitory, tak i z celkového pohledu na patogenezi tohoto onemocnění.

2 Cíle diplomové práce

Cílem práce je analyzovat odpověď buněk chronické lymfocytární leukémie na cílenou léčbu inhibitory ibrutinibem a venetoclaxem v kontextu aktivity transkripčního faktoru FoxO1, především pak:

- 1) Potvrdit význam transkripčního faktoru FoxO1 v adaptaci na ibrutinib
- 2) Popsat roli transkripčního faktoru FoxO1 v odpovědi na venetoclax

3 Materiál a metody

3.1 Primární buňky pacientů

Primární buňky pacientů s diagnózou chronické lymfocytární leukémie (C91.1) byly získány z Interní hematologické a onkologické kliniky Fakultní nemocnice Brno s písemným informovaným souhlasem pacientů, výzkum byl schválen Etickou komisí Fakultní nemocnice Brno. Primární buňky byly izolovány z periferní krve pacientů pomocí kitu RosetteSep™ Human B Cell Enrichment/CD 3 Depletion Cocktail (StemCell Technologies, Kanada) a následně separovány pomocí centrifugace na médiu Ficoll-Paque™ (GE Healthcare, USA). Takto izolované buňky byly uchovávány v FBS (fetální bovinní sérum, GE Healthcare, USA) s přídavkem 10% DMSO v tekutém dusíku. Pro potřeby experimentů byly buňky kultivovány v médiu RPMI-1640 (Biosera, Velká Británie) s přídavkem 10% FBS a 100 U·ml⁻¹ penicilinu / 100 µg·ml⁻¹ streptomycinu (Sigma Aldrich, USA) při 37 °C, 5 % CO₂ a vlhkosti cca 95 %.

3.2 Buněčná linie MEC1

Buněčná linie MEC1 je standardně používaným buněčným modelem CLL. Tato linie byla vytvořena v roce 1993 z periferní krve 61letého pacienta. MEC1 buňky jsou EBV-pozitivní, oválné, částečně adherentní, rostoucí jednotlivě či v malých agregátech. Buňky nesou delecii genu *TP53* a exprimují vysoké hladiny proteinů BCL2, BCL-X_L a BAX (Stacchini *et al.*, 1999). Linie byla získána ze sbírek DSMZ (Německo). Linie MEC1 byla kultivována v médiu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Biosera, Velká Británie) s přídavkem 10% FBS a výše uvedených koncentrací antibiotik. Pasáž buněk probíhala třikrát týdně, koncentrace byla udržována mezi 0,5 až 2×10⁶ buněk·ml⁻¹.

3.3 Buněčná linie HS5

Buněčná linie HS5 je immortalizovaná linie lidských stromálních buněk kostní dřeně. Buňky linie HS5 byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biosera, Velká Británie) obohaceném glukózou (4,5 g·l⁻¹) s 10 % FBS a přídavkem antibiotika (*viz* výše). Pasážování probíhalo dvakrát až třikrát týdně po dosažení přibližně 90 % konfluence. Při pasážování byly buňky po oplachu fosfátovým pufrům (PBS, phosphate-buffered saline,

pH 7,4) odlepeny od podkladu směsí 50% trypsinu / 0,7mM EDTA (Sigma Aldrich, USA). Trypsin byl následně inaktivován přidáním plného média a pro další kultivaci byla odebrána přibližně ¼ buněk. Kultivace HS5 probíhala v lahvi T75 (TPP, Švýcarsko) v 15 ml média v inkubátoru při 37 °C, 5 % CO₂ a vlhkosti ~95 %.

3.4 Genetická modifikace HS5

V laboratoři byla linie HS5 modifikována k expresi molekul CD40L, IL21, IL4. Kódující sekvence (CDS) lidského IL4 a genu pro rezistenci k puromycinu byly klonovány do lentivirového vektoru pAIP (katalog. č. #74169, Addgene, USA). CDS lidského CD40L a genu pro rezistenci k blasticidinu byly klonovány do lentivirového vektoru pEZ-Lv197 (katalog. č. #EX-G0117-Lv197, Genecopoeia, USA). CDS lidského IL21 klonovaná do retrovirového vektoru pBMN-IRES-LyT2 byla darována dr. D. Hodsonem (University of Cambridge, Velká Británie), vektor byl následně pomnožen v kmenu Stbl3 *E. coli* (Invitrogen, USA). Na transdukcii linie byly využity virové zabalovací plazmidy δ R8.91 nebo gag/pol (lentivirální respektive retrovirální), VSV-G a L-GFP (darem od dr. M. Šmídy, CEITEC MU, Česká republika), a to následovně: 3538 ng δ R8.91 nebo gag/pol, 462 ng VSV-G (kapsida), 400 ng L-GFP (marker transfekce) a 2 μ g zájmového genového konstruktů bylo smícháno s 50 μ l Opti-MEM média (Gibco, USA), 7 μ l DharmaFect (Dharmacon, USA) a 2 ml DMEM a použito na transfekci buněk HEK-293T vysetých na 6 cm² Petriho misky. Po 24 hodinách byly buňky promyty čerstvým DMEM. Virový supernatant byl sbírán po 24, 36, 48 a 60 h, poté přefiltrován skrze 0,45 μ m filtr s 10 μ g·ml⁻¹ polybrenu (Sigma Aldrich, USA) a přímo nanesen na buňky HS5 vysetých na dvou 6 cm² Petriho miskách. Další den bylo médium vyměněno za čerstvé. Jeden až dva dny po výměně média byla zahájena selekce 10 μ g·ml⁻¹ puromycinem (Sigma Aldrich, USA) nebo blasticidinem (Gibco, USA), která pokračovala dalších 7 dní. Buňky byly kultivovány v DMEM s přidavkem 10% FBS bez ATB v inkubátoru při 37 °C, 5 % CO₂ a vlhkosti ~95 %.

3.5 CFSE proliferační assay

Purifikované CLL buňky byly obarveny pomocí CFSE barviva (Invitrogen, USA) podle protokolu Quah *et al.*, 2007. 5×10⁷ CLL buněk bylo resuspendováno ve 400 μ l PBS v 1,5ml zkumavce. Do vršku zkumavky bylo přidáno 80 μ l PBS, kam bylo následně přidáno 0,5 μ l 5mM

CFSE barvy. Tento roztok byl poté ihned smíchám s buněčnou suspenzí a ponechám 5 minut inkubovat při pokojové teplotě. Poté byly buňky dvakrát promyty v PBS s přidavkem 5% FBS. Promyté buňky byly nasazeny na γ -ozářené HS5^{wt} nebo HS5^{CD40L, IL21, IL4} v poměru 20:1 (CLL:HS5) a takto kultivovány s DMSO či inhibitory. Analýza proliferace byla provedena po 5 a 10 dnech kokultivace pomocí průtokové cytometrie. Míra proliferace byla vyhodnocena pomocí FlowJo v10 softwaru.

3.6 Příprava FoxO1 knock-out linie MEC1

Linie MEC1 byla pomocí systému CRISPR/Cas9 modifikována do podoby viabilní FoxO1 knock-out linie. gRNA sekvence cílící na gen *FoxO1* byly navrženy v online nástroji Benchling (Biology Software, 2019). Sekvence 5'-CACCGGGGCTGTGCGGGGACTTCCA-3' pro FoxO1-gRNA byla klonována do pSpCas9(BB)-2A-GFP vektoru (#48138, Addgene). Pro získání mutantní varianty byla wild-type linie MEC1 elektroporací transfekována s připravenými plazmidy. Pro elektroporaci byl využit protokol Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific, USA) a příslušný kit. Parametry elektroporace byly 1500 V, 20 ms, 2 pulzy. Po 48 hodinách byly selektovány živé GFP-pozitivní buňky, ty byly následně pomnoženy, rozděleny pomocí single-cell sortingu a opět pomnoženy na jednotlivé FoxO1 knock-out klony. Tyto klony byly finálně validovány pomocí western blotu pro nepřítomnost proteinu FoxO1 (viz kapitola *Výsledky*).

3.7 Kompetitivní růstová assay

Buněčné linie MEC1-wt a MEC1-*FoxO1*-KO byly označeny plazmidy kódujícími GFP a Azurit (transdukce vektory #36083, respektive #36086, Addgene). Buňky byly smíchány v poměru 1:1 (ověřeno průtokovou cytometrií) a kultivovány v přítomnosti 2 μ M ibrutinibu, DMSO sloužilo jako negativní kontrola. Čerstvé médium s přidavkem ibrutinibu, popř. DMSO, bylo přidáváno třikrát týdně. Změny v poměru buněk byly měřeny průtokovou cytometrií po 1-4 týdnech kultivace.

3.8 Kultivace linie MEC1 s inhibitory

Pro experimenty na buněčných liniích byly využity inhibitory ibrutinib (Selleckchem, USA) a venetoclax (Selleckchem, USA), jež jsou využívány pro cílenou léčbu CLL, a inhibitor FoxO1

AS184285 (iFoxO1, Selleckchem, USA). Médium s přidavkem dimethylsulfoxidu (DMSO) v objemu přidaného inhibitoru sloužilo jako negativní kontrola. Standardně používaná koncentrace pro ibrutinib byla 2 μM a pro iFoxO1 0,5 μM . Tyto koncentrace byly zvoleny jakožto nejnižší koncentrace, při nichž bylo na proteinové úrovni možné sledovat účinek inhibitoru.

Za účelem přípravy proteinových lyzátů byly vzorky sbírány po 24, 48 a 72 hodinách, kdy byla v příslušných časových bodech také změřena viabilita buněk. Koncentrace takto kultivovaných buněk byla $1,5 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$.

Při analýze účinků venetoclaxu byla připravena koncentrační řada 0,3-20 μM . Buňky byly nasazeny na 96-jamkovou desku do finální koncentrace $2,5 \times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ s příslušnou koncentrací venetoclaxu. Po 24, 48 a 72 hodinách byla následně změřena viabilita těchto buněk.

3.9 Měření viability

Viabilita buněk byla stanovena metodou průtokové cytometrie pomocí dvojitého barvení DiOC₆ (z ang. 3,3'-dihexyloxacarboyanine iodide, Invitrogen, USA), jež barví mitochondrie živých buněk, a propidium jodidem (PI, Sigma Aldrich, USA), který barví DNA mrtvých buněk. Barviva byla ředěna v PBS do finální koncentrace 80nM pro DiOC₆ a 500 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ pro PI, roztok byl připraven vždy čerstvý. Ekvivalentní objem barvicího roztoku byl přidán k buněčné suspenzi, která byla následně 15 minut inkubována ve tmě při 37 °C. Vzorky byly změřeny na průtokovém cytometru BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, USA). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru FlowJo v10 (FlowJo, USA).

3.10 Příprava proteinových lyzátů

Buňky pro proteinovou analýzu byly sesbírány a stočeny při 4 °C na 400 RCF 3-10 minut, dle objemu suspenze. Po jednom promytí chlazeným PBS byl pelet rozsuspendován v lyzačním pufru (1% SDS, 10% glycerol, 100mM TRIS-HCl, pH 7,4) obohaceném o inhibitory proteáz a fosfatáz (Sigma Aldrich, USA) v poměru 100:1:1 – pufr:inhibitor proteáz:inhibitor fosfatáz. Vzorky byly sonikovány (2×5 s, amplituda 60 %; Hielscher, Německo) a koncentrace proteinů ve vzorku byla stanovena pomocí DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, USA). Ke vzorkům byl přidán nanášecí pufr obsahující β -merkaptoethanol (1 % v/v) a bromfenolovou modř

(0,02 % v/v). Vzorky byly denaturovány 5 minut při 98 °C. Všechny lyzáty a připravené vzorky byly dlouhodobě uchovávány při teplotě -80 °C.

3.11 Western blot

Proteiny (30 µg z totálního lyzátu) byly rozděleny pomocí elektroforézy na 10% denaturačním polyakrylamidovém gelu při 60-110 V po dobu přibližně 2,5 hodiny v elektroforetickém pufru (25mM TRIS, 250mM glycin, 1% SDS, pH 7,2). Metodou wet-blot za použití blot pufru (25 obj. % methanol, 25 mM TRIS, 192mM glycin, 0,1% SDS) byly gely přeneseny na PVDF membránu (z ang. polyvinylidene difluoride, Millipore, Německo) při 250 mA po dobu 75 minut. Elektroforéza i přenos probíhaly na zařízení Mini Trans-Blot® Cell and Criterion™ Blotter (BioRad, USA). Po dokončení přenosu byly membrány 1 hodinu blokovány v 5% BSA (bovinní sérový albumin, BioSera, Velká Británie) a inkubovány přes noc při 4 °C v primárních protilátkách (Tab 1.) řaděných podle doporučení výrobce. Druhý den byly membrány promyty v promývacím pufru (200mM NaCl, 20mM TRIS-pH 7,4, 0,1% Tween20) třikrát po dobu 10 minut. Po promytí byly membrány inkubovány v příslušné sekundární protilátce kongujované s křenovou peroxidázou (Cell Signaling, USA). Po inkubaci byly membrány opět třikrát promyty po 10 minutách. Vyvolávání probíhalo pomocí elektrochemiluminiscenčního kitu (BioRad, USA). Detekce byla provedena pomocí přístroje UVITEC Alliance 4.7 a kvantifikace pomocí příslušného softwaru UVITEC Alliance (UVITEC Cambridge, Velká Británie).

Detekovaný protein	Velikost [kDa]	Katalog. číslo	Původ	Výrobce
FoxO1	78-82	2880	králík	Cell Signaling, USA
BCL2	28	2872	králík	Cell Signaling, USA
BCL-XL	30	2764	králík	Cell Signaling, USA
MCL1	40	4572	králík	Cell Signaling, USA
BIM (EL, L, S)	23/15/12	2819	králík	Cell Signaling, USA
BAX	20	2772	králík	Cell Signaling, USA
PUMA	23	4976	králík	Cell Signaling, USA
GAPDH	37	2118	králík	Cell Signaling, USA

Tab. 1: Seznam protilátek použitých pro metodu western blot

3.12 Analýza DNA interakcí transkripčního faktoru FoxO1 – CUT&RUN

Tato analýza DNA-protein interakcí byla provedena podle protokolu s použitím fúzního proteinu A/G protein-mikrokokální nukleáza (pA/G-MNáza, Addgene, ID: 123461) a Triton X-100 jaderné extrakce (Janssens, 2019).

3.13 Statistické vyhodnocení

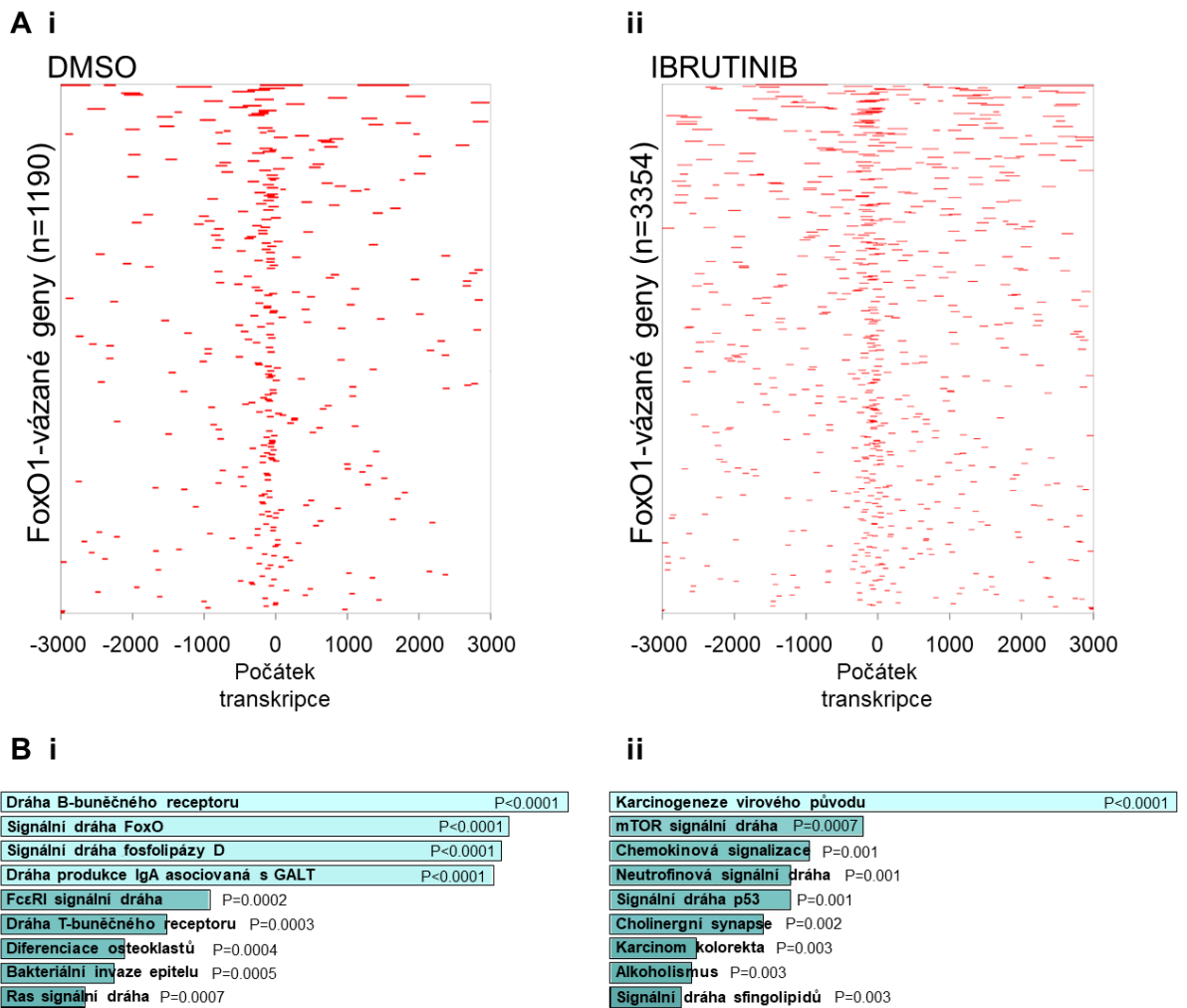
Statistické vyhodnocení a tvorba grafů probíhaly s použitím softwaru GraphPad Prism 8.0.

4 Výsledky

4.1 FoxO1 vykazuje zvýšenou DNA-vazebnou aktivitu při léčbě ibrutinibem u MEC1 buněk

Transkripční faktor FoxO1 má ve fyziologickém vývoji B-lymfocytů roli významného regulátoru apoptózy a buněčného cyklu, což ukazuje na spíše tumor supresorový charakter tohoto transkripčního faktoru. Publikované experimenty naší laboratoře ukazují na paradoxně onkogenní úlohu FoxO1 u CLL, kdy aktivita FoxO1 byla spojená s indukcí transkripce adaptorového proteinu GAB1, jež pozitivně reguloval migrační kapacitu CXCR4^{bright}CD5^{dim} subpopulace CLL buněk směrem do lymfatických orgánů. Zároveň jsme popsali, že k indukcí GAB1 skrze FoxO1 dochází také při léčbě ibrutinibem, kdy tento jev vede k posílení down-stream signalizace PI3K a zvýšené fosforylaci kinázy Akt (Šeda *et al.*, 2021). Výsledky CUT&RUN analýzy DNA-proteinových interakcí na linii MEC1 ukazují na zvýšenou DNA-vazebnou aktivitu FoxO1 při působení ibrutinibu. Počet FoxO1-vázaných genů byl vyšší u buněk ošetřených 1 μ M ibrutinibem (n=3354) oproti DMSO kontrole (n=1190; Obr. 10A).

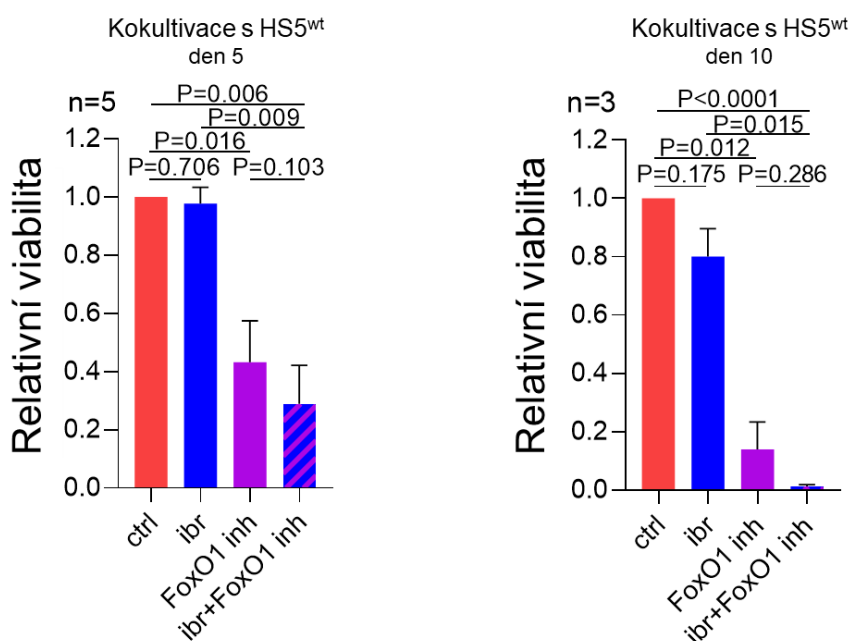
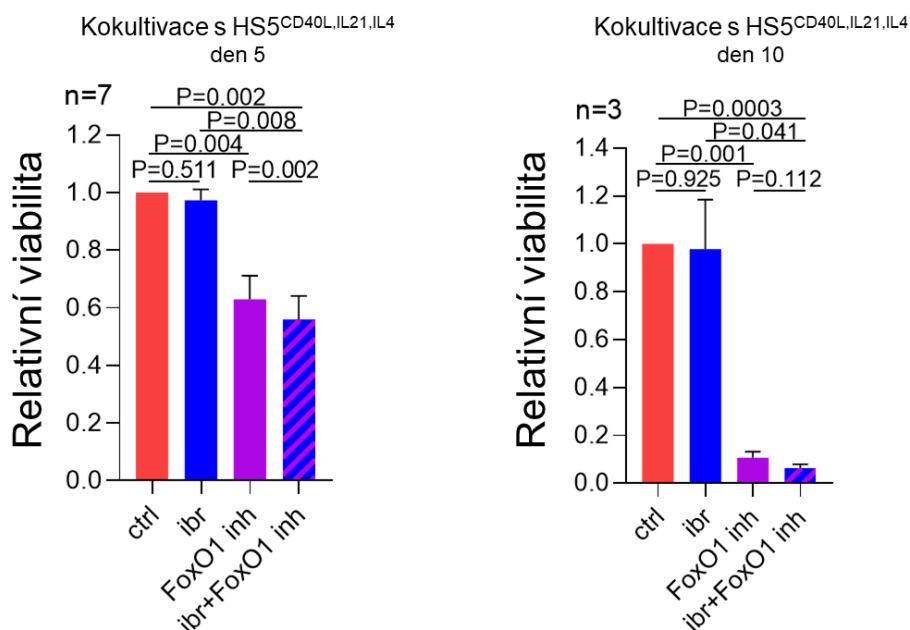
Dále jsme na základě výstupů z CUT&RUN provedli analýzu signálních drah pomocí webové aplikace Enrichr, kdy jsme seznam FoxO1-vázaných genů porovnali s databází signálních a metabolických drah KEGG. Společné výsledky pro obě testované podmínky ukazují na zapojení transkripčního faktoru FoxO1 v regulaci genů dráhy B-buněčného receptoru nebo také na transkripční regulaci dráhy fosfolipázy D, která se účastní aktivace MAPK a mTOR dráhy. Z této analýzy také vyplynulo, že signální dráhy, jejichž geny FoxO1 reguluje specificky při léčbě ibrutinibem, mají svůj význam v mTOR signální dráze, popř. souvisí s aktivitou chemokinové signalizace, a mohou tedy přímo souviset s přežíváním leukemických buněk během této cílené léčby (Obr. 10B).



Obr. 10: (A) Analýza DNA-vazebné aktivity transkripčního faktoru FoxO1 u linie MEC1 pomocí CUT&RUN. Grafy zobrazují DNA regiony v oblasti počátku transkripce genů, u kterých byla pozorována vazba transkripčního faktoru FoxO1 na jeho DNA-vazebný motiv. [i] DNA-vazebná aktivita FoxO1 u buněk MEC1 s DMSO. [ii] DNA-vazebná aktivita FoxO1 u buněk MEC1 v přítomnosti 1 μM ibrutinibu. (B) Výstup analýzy signálních drah pomocí aplikace Enrichr na základě dat z CUT&RUN. [i] Signální dráhy pro FoxO1-vázané geny společné jak u negativní kontroly (DMSO), tak u buněk ošetřených ibrutinibem (1 μM). [ii] Signální dráhy genů FoxO1-vázaných specificky u MEC1 buněk ošetřených ibrutinibem (1 μM).

4.2 Inhibice FoxO1 snižuje viabilitu v *in vitro* kokultivačním modelu

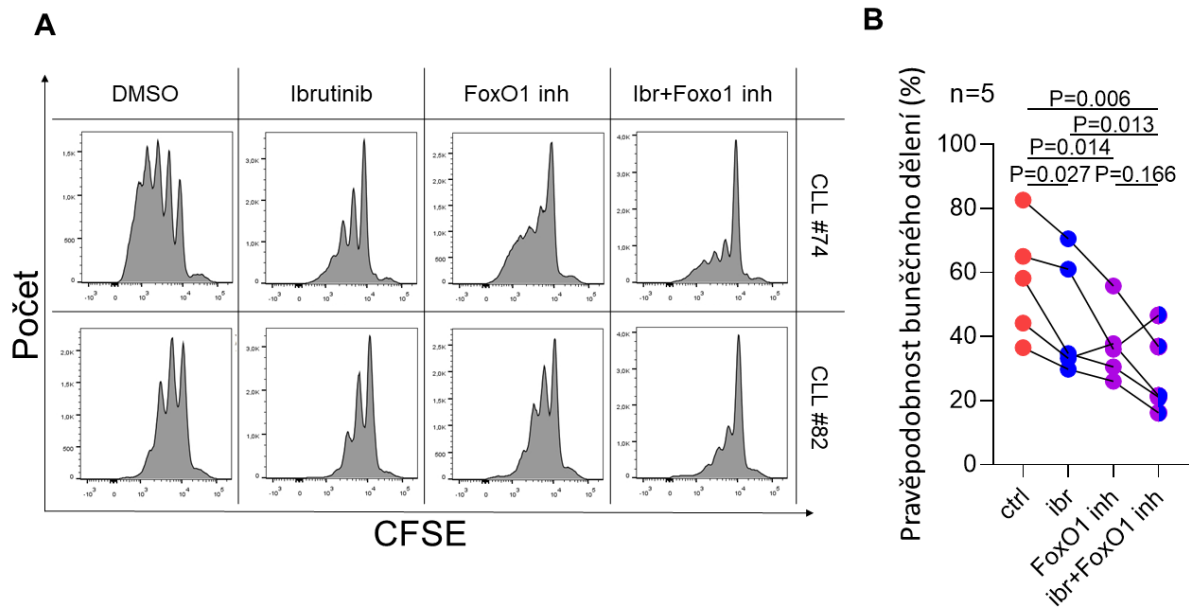
Výsledky předchozí analýzy jednoznačně ukazují na potenciální roli transkripčního faktoru FoxO1 v adaptaci na léčbu ibrutinibem, proto jsme pro další experimenty otestovali inhibici tohoto proteinu u primárních CLL buněk. Primární CLL buňky však v podmínkách *in vitro* snadno podléhají apoptóze, proto jsme pro další experimenty využili model mikroprostředí, kokultivaci se stromálními HS5 buňkami. Takto je možno CLL buňky držet déle v kultuře a provádět časově náročnější experimenty. Tento způsob kultivace je také relevantní z pohledu cílené léčby, kdy lze obecně říct, že přítomnost mikroprostředí účinnost léčby snižuje (Haselager *et al.*, 2020; Mráz *et al.*, 2011). Analýza CLL buněk v kokultivaci překvapivě ukazuje, že samostatná chemická inhibice FoxO1 pomocí AS184285 (FoxO1 inh., 0,5 μM) v porovnání s kontrolou významně snižuje viabilitu CLL buněk ($P=0,016$ po 5 dnech kokultivace, $n=5$). Účinek inhibice na viabilitu CLL buněk byl prohlouben při využití kombinace ibrutinibu a FoxO1 inh. (1 μM , resp. 0,5 μM ; $P=0,006$ po 5 dnech, $n=5$). Ačkoliv je při použití ibrutinibu samostatně pozorován pouze minoritní pokles viability, tak i tyto výsledky odpovídají klinickým pozorováním (Obr. 11A). Obdobných výsledků bylo dosaženo také při kokultivaci s geneticky modifikovanými HS5 buňkami, které exprimovaly další faktory mikroprostředí: CD40L, IL21 a IL4, jež u CLL buněk stimulují proliferaci (Obr. 11B). Výsledky tohoto experimentu dokazují, že inhibice FoxO1 je pro buňky toxická, kdy tato toxicita přetrvává i v podmínkách kokultivace s podpůrnými buňkami.

A**B**

Obr. 11: (A) Relativní viabilita CLL buněk v kokultivaci s HS5^{wt}. Viabilita byla posouzena na základě procenta DiOC₆⁺/PI⁻ buněk a vztažena k viabilitě DMSO negativní kontroly (ctrl). Koncentrace pro ibrutinib (ibr) byla 1 μM, pro AS184285 0,5 μM (FoxO1 inh). Tyto koncentrace byly zachovány i v kombinaci inhibitorů. (B) Relativní viabilita CLL buněk v kokultivaci s HS5^{CD40L,IL21,IL4}. Vyhodnocení a podmínky kultivace viz výše. Pro statistické vyhodnocení byl použit párový t-test.

4.3 Inhibice FoxO1 zabraňuje proliferaci v přítomnosti T-lymfocytárních faktorů v kokultivaci s HS5^{CD40L,IL21,IL4}

Dále jsme se rozhodli otestovat i důsledky inhibice FoxO1 na schopnost proliferace CLL buněk. Pro potřeby simulace takového prostředí jsme využili geneticky upravené linie HS5^{CD40L,IL21,IL4}, kdy přítomnost těchto faktorů vede k proliferaci CLL buněk *in vitro*. V tomto případě byla inhibice FoxO1 schopná narušit tyto proliferační podmínky, kdy došlo ke snížení míry proliferace ve všech testovaných případech ($P=0,014$, $n=5$). Efekt byl umocněn při kombinaci s ibrutinibem (Obr. 12). Tyto výsledky prokazují terapeutický potenciál v inhibici transkripčního faktoru FoxO1 a podporují význam našeho dalšího výzkumu.

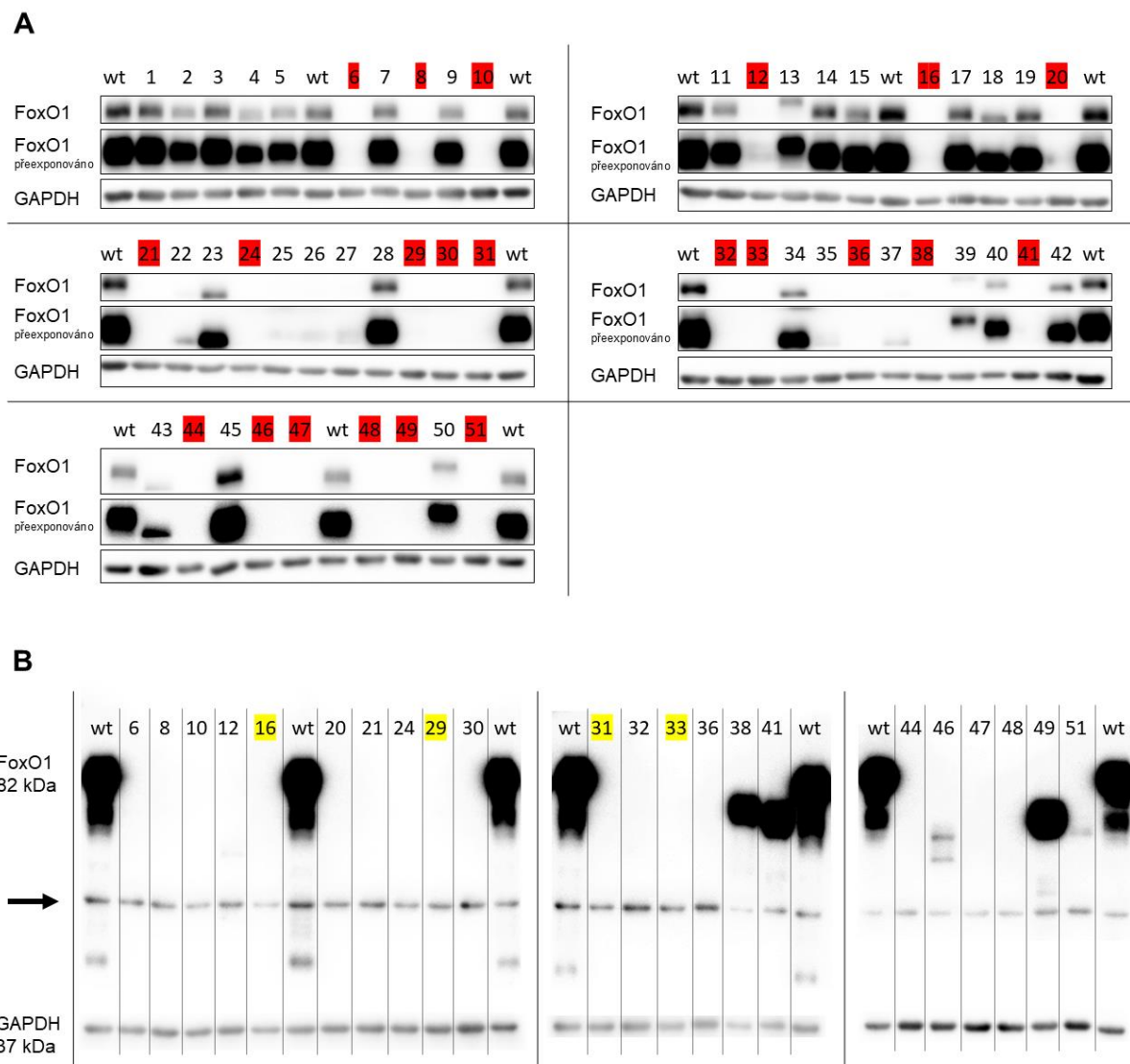


Obr. 12: CFSE proliferační assay CLL buněk v kokultivaci s HS5^{CD40L,IL21,IL4}.

(A) Reprezentativní histogramy intenzity CFSE u populace CLL buněk. Míra proliferace je měřena na základě ředění barvy CFSE. (B) Schopnost proliferace vyjádřená pomocí pravděpodobnosti buněčného dělení v podmínkách 1 μ M ibrutinibu (ibr), 0,5 μ M AS184285 (FoxO1 inh), či jejich kombinace. Buňky byly inkubovány v těchto podmínkách 5 dnů. DMSO sloužil jako negativní kontrola (ctrl). Výpočet je součástí proliferační platformy softwaru FlowJo v10. Pro statistické vyhodnocení byl použit párový t-test.

4.4 Validace *FoxO1* knock-out linie MEC1

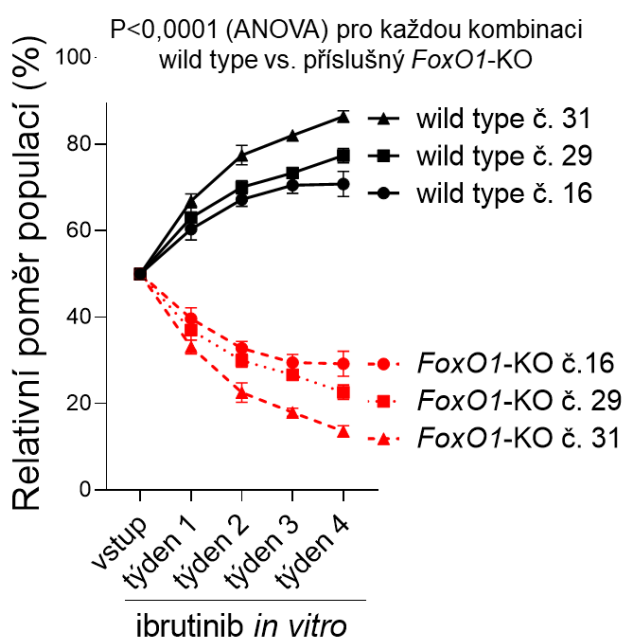
Pro další experimenty jsme využili možnosti genového inženýrství a metodou CRISPR/Cas9 jsme připravili single-cell klony stabilní *FoxO1* knock-out linie MEC1. Následující ukázky validačních imunoblotů potvrzují vytvoření úspěšného knock-outu (KO; Obr. 13). Pro potřeby dalších experimentů byly zvoleny KO klony č. 16, 29, 31 a 33.



Obr. 13: (A) První kolo validace pomocí western blotu. Červeně podbarvené klony byly vybrány do druhého kola validací. (B) Druhé kolo validace pomocí western blotu. Žlutě podbarvené klony byly vybrány pro další experimenty. U klonů č. 12, 38, 41, 46, 49 a 51 vedla mutagenese pomocí CRISPR/Cas9 pouze k vytvoření předčasného stop kodonu. Šipka označuje nespecifický band.

4.5 *FoxO1* knock-out MEC1 linie je oproti wild-type linií v podmínkách ibrutinibu znevýhodněna

Posledním experimentem této části byla kompetitivní růstová assay, která měla doposud dosažené výsledky uzavřít a potvrdit především roli *FoxO1* v adaptaci na léčbu ibrutinibem. Opačné barevné kombinace geneticky upravených *FoxO1*-KO a wild-type buněk (wt) (GFP vs. Azurit) byly smíchány v poměru 1:1 a po dobu 4 týdnů ošetřeny 2 μ M ibrutinibu nebo DMSO. Následně byl pomocí průtokové cytometrie hodnocen poměr jednotlivých populací v rámci kultury. Z výsledků tohoto experimentu vyplývá, že absence transkripčního faktoru významně znevýhodňuje leukemické buňky v přítomnosti ibrutinibu (Obr. 14).

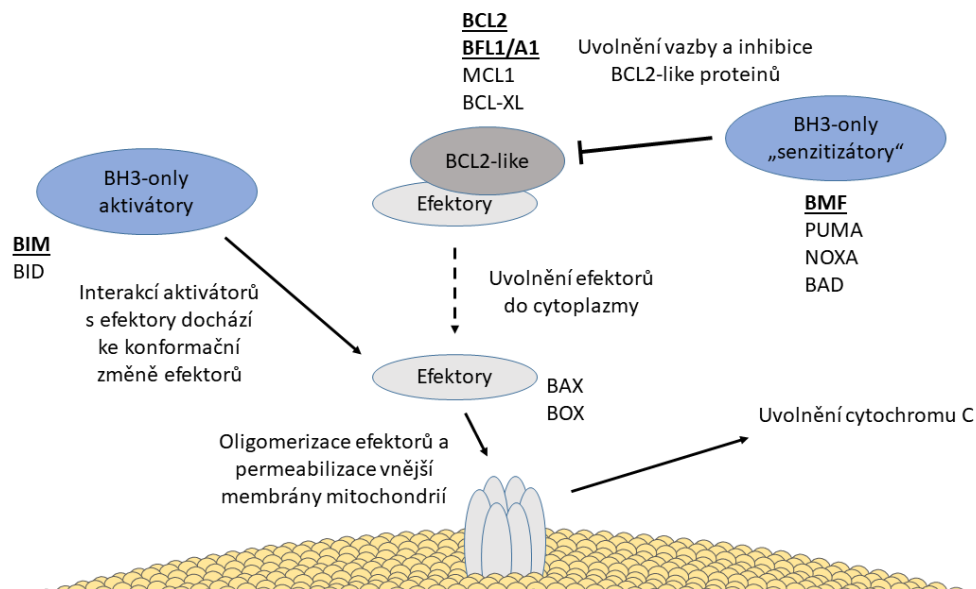


Obr. 14: Kompetitivní růstová assay MEC1 wt vs. *FoxO1*-KO v přítomnosti ibrutinibu (2 μ M, 4 týdny) hodnocená jako relativní poměr populací ve srovnání s příslušnou DMSO negativní kontrolou. Wt a KO buňky byly označeny GFP a Azuritem (a opačně pro vyloučení vlivu barevného značení) a smíchány v poměru 1:1 (n=4 repetice pro každou kombinaci wt vs. KO). Ibrutinib (popř. DMSO) byl přidáván do média třikrát za týden. Pro statistické vyhodnocení byla použita analýza rozptylu.

4.6 Analýza interakce FoxO1 s DNA metodou CUT&RUN odhalila cíle uvnitř BCL2 rodiny

Vzhledem k uvedeným cílům práce jsme transkripční faktor FoxO1 hodnotili i z pohledu možné role v odpovědi leukemických buněk na BCL2 inhibitor venetoclax. Nejprve jsme se rozhodli analyzovat data získaná metodou CUT&RUN na linii MEC1. Obr. 15 znázorňuje signální kaskádu rodiny BCL2. Ve schématu jsou vyznačeni členové BCL2 rodiny, u nichž byla zachycena vazba transkripčního faktoru FoxO1 na jejich DNA. Jedná se o anti-apoptické BCL2 a BFL1/A1, a pro-apoptické BMF (BCL2 modifying factor) a BIM.

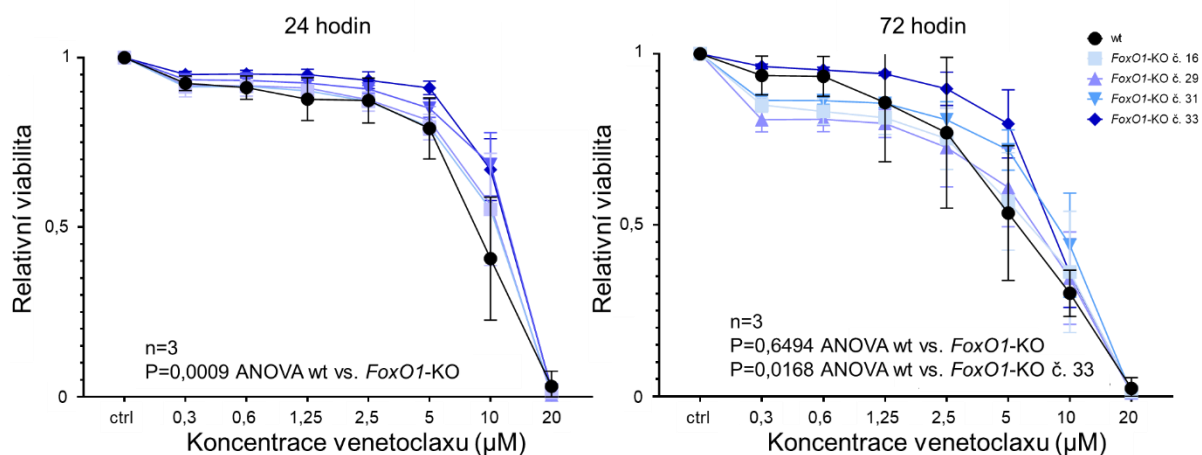
Toto pozorování nám poskytlo solidní podklad pro následující sérii experimentů.



Obr. 15: Schéma interakcí uvnitř BCL2 rodiny s vyznačenými cíli transkripčního faktoru FoxO1 identifikovanými metodou CUT&RUN na linii MEC1 (ve schématu tučně, podtrženě). Geny byly vybrány za základě zachycení vazby FoxO1 na jeho známý DNA-vazebný motiv. (Jolma *et al.*, 2013).

4.7 *FoxO1* knock-out linie MEC1 vykazuje zvýšenou odolnost vůči BCL2 inhibici venetoclaxem

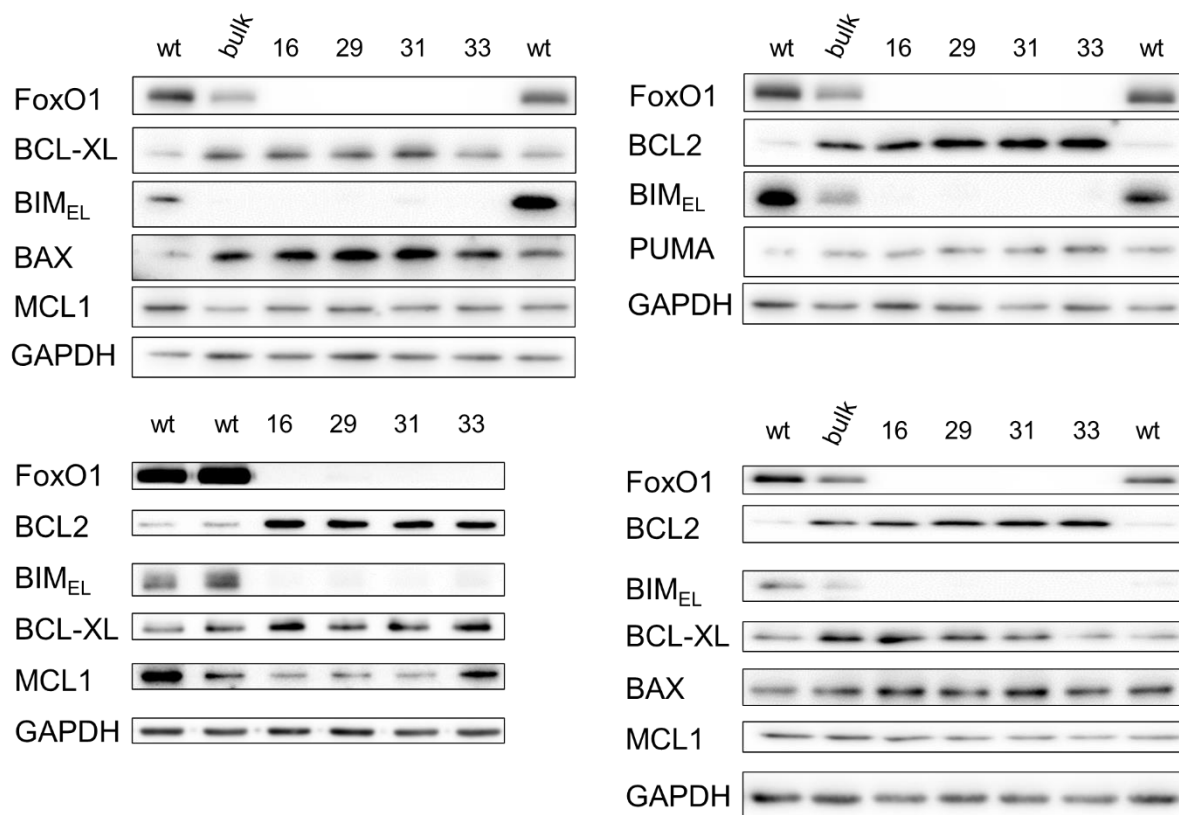
Vzhledem k identifikaci několika *FoxO1* transkripčních cílů uvnitř BCL2 rodiny jsme se rozhodli na naší *FoxO1*-KO linii otestovat účinnost venetoclaxu. KO buňky jsme vystavili koncentrační řadě venetoclaxu (0,3-20 μM , $n=3$) a po 24, 48 a 72 hodinách byla naměřena viabilita buněk. Po 24 hodinách jsme pozorovali statisticky významný rozdíl v relativní viabilitě ($P=0,0009$) mezi *FoxO1*-KO klony a wild-type linií. Po 72 hodinách již tento celkový rozdíl mezi liniemi pozorován nebyl, nicméně jednotlivě u koncentrací venetoclaxu 5 a 10 μM lze trend zvýšené odolnosti pozorovat (Obr. 16). Podle analýzy rozptylu jednotlivých klonů vůči wild-type vyšel statisticky významně pouze klon č. 33 ($P=0,0168$).



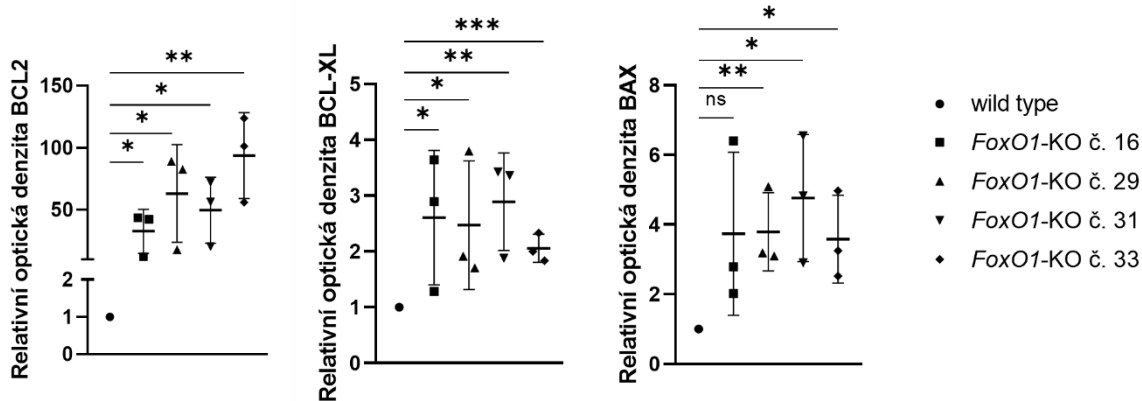
Obr. 16: Koncentrační řada venetoclaxu na MEC1 *FoxO1*-KO linii pro 24 (vlevo) a 72 hodin (vpravo) ($n=3$). Relativní viabilita je vztažena k viabilitě negativní kontroly (DMSO). Po 48 hodinách byl do média přidán čerstvý venetoclax v příslušné koncentraci. Pro statistické vyhodnocení byla použita analýza rozptylu.

4.8 *FoxO1* knock-out linie má významně pozměněné proteinové hladiny některých členů rodiny BCL2

Pozorovaný trend v odolnosti vůči venetoclaxu u *FoxO1*-KO klonů ve spojení s výsledky z CUT&RUN analýzy nás vedl k hledání molekulárních mechanismů této odolnosti spojených především s rozdílnou expresí proteinů rodiny BCL2. Analýza pomocí metody western blot s využitím dostupných protilátek ukázala komplexní fenotyp KO linie na úrovni proteinů. Výsledky imunoblotů na první pohled ukazují významně pozměněné hladiny proteinů BCL2 a BIM, u kterých byl pozorovaný fenotyp konzistentní napříč všemi opakováními, což podporuje hypotézu transkripční regulace těchto proteinů skrze *FoxO1*. Proteiny, u nichž nebyla pozorována významná změna, byly anti-apoptický MCL1 nebo pro-apoptický PUMA (Obr. 17). Pro vybrané proteiny byla také provedena kvantifikace na základě optické denzity. Touto analýzou jsme kromě BCL2 také ukázali významně zvýšené hladiny u anti-apoptického BCL-XL, překvapivě došlo v důsledku knock-outu ke zvýšení hladiny pro-apoptického efektoru BAX (Obr. 18).



Obr. 17: Reprezentativní imunobloty vybraných *FoxO1*-KO klonů. Bulk označuje transfekované buňky MEC1 před single-cell sortingem.



Obr. 18: Relativní optická denzita vybraných proteinů BCL2 rodiny u *FoxO1*-KO klonů (n=3 nezávislé sběry příslušných linií) pomocí western blotu. Optická denzita je normalizována nejprve k hodnotám endogenní kontroly (GAPDH) a poté relativizována k průměrné hodnotě optické denzity pro wild-type linii. Pro statistické vyhodnocení byl použit nepárový t-test.

5 Diskuse

Příchod nízkomolekulárních inhibitorů do klinické praxe zásadně změnil léčbu CLL a inhibitory se velice rychle staly primárně využívaným způsobem terapie. Přestože inhibitory zaznamenávají nevídané klinické úspěchy a většina pacientů na léčbu odpovídá, CLL je stále nevléčitelným onemocněním. Významným faktorem, jež limituje léčbu inhibitory, je často pozorovaná získaná rezistence vůči těmto terapeutikům. Vznik rezistence plyne jak z geneticky podmíněných, tak negenetických mechanismů, jež se u pacientů budují během léčby, přičemž riziko jejich manifestace se s dobou léčby zvyšuje. V současnosti je kladen velký důraz na objasnění těchto mechanismů a dochází k popisu mnoha dílčích adaptačních procesů, které různou měrou mohou k celkové rezistenci přispívat. Nejčastějšími inhibitory, s nimiž se setkáme v klinické praxi, jsou BTK inhibitor ibrutinib a BCL2 inhibitor venetoclax, schválenými v roce 2013, resp. 2016. Tyto inhibitory blokují klíčové signální dráhy v maligních lymfocytech, které jim umožňují přežívání a proliferaci.

V případě ibrutinibu je cíleno na dráhu B-buněčného receptoru, jež je z hlediska fyziologie esenciální pro správný vývoj a přežívání B-lymfocytů (Lam *et al.*, 1997). Během preklinického testování ibrutinibu na *in vitro* a myších modelech byla dokázána účinná indukce apoptózy u leukemických buněk (Ponader *et al.*, 2012), nicméně tento efekt není pozorován u CLL pacientů *in vivo*. Ačkoliv je u pacientů míra odpovědi na ibrutinib velice vysoká, až 90 % po třech letech (Coutre *et al.*, 2017), apoptóza probíhá u maligních lymfocytů velice pomalu. Výsledkem léčby ibrutinibem je totiž spíše zastavení proliferace CLL buněk a narušení interakcí v mikroprostředí. To pak vede k přechodné lymfocytóze způsobené emigrací CLL buněk z lymfatických orgánů do periferní krve. Přestože jsou signály z mikroprostředí považovány za životně důležité, maligní lymfocyty kolují v periferní krvi a v tomto na živiny a signály chudém prostředí přežívají po dobu mnoha měsíců, než začnou podléhat apoptóze (Burger *et al.*, 2017; Byrd *et al.*, 2015). Z tohoto hlediska je tedy dlouhodobá léčba nezbytná pro dosažení dostatečné klinické odpovědi. Bohužel však právě jedním z aspektů dlouhodobé léčby inhibitory je již zmíněné riziko vzniku rezistence.

Skutečnost, že jsou maligní buňky schopné během léčby přežít v periferní krvi, ukazuje na přítomnost adaptačních procesů, kterými buňky kompenzují absenci stimulů mikroprostředí v důsledku inhibice kinázy BTK. Objasnění těchto procesů se stalo jedním z hlavních směrů výzkumu CLL v souvislosti s BTK inhibitory. Nově popisované mechanismy adaptace s sebou

přinášejí velké množství potenciálních cílů terapie, protože právě kombinovaná léčba inhibitory představuje velice slibný přístup, jak adaptačním mechanismům zabránit.

Výsledky naší laboratoře ukazují na zapojení transkripčního faktoru FoxO1 v adaptaci na léčbu ibrutinibem, konkrétně jsme popsali proces indukce adaptorového proteinu GAB1 prostřednictvím FoxO1, v jejímž důsledku dochází ke zvýšené aktivační fosforylaci kinázy Akt (Šeda *et al.*, 2021). Právě obnova aktivity dráhy kinázy Akt byla jedním z prvotně popsaných mechanismů negenetické rezistence na léčbu ibrutinibem (Kapoor *et al.*, 2019). U jiných B-buněčných malignit, Burkittova a transformovaného folikulárního lymfomu, se setkáváme s případy, kdy aberantní aktivita FoxO1 zapříčiněná mutacemi souvisí s patogenezí daného onemocnění (Kabrani *et al.*, 2018; Pastore *et al.*, 2015). Zajímavým aspektem z tohoto pohledu je fakt, že Burkittův i transformovaný folikulární lymfom jsou vysoce maligní a proliferativní malignity. Je důležité podotknout, že s podobnými mutacemi se u CLL vůbec nesetkáváme (Knisbacher *et al.*, 2022). Studie na CLL spíše ukazují na opačný fenomén, tedy že právě indukce FoxO1 v důsledku inaktivace dráhy BCR a osy PI3K-Akt při léčbě inhibitory zprostředkovává cytotoxický efekt inhibitorů (Cosimo *et al.*, 2019). Prozatím však neexistují žádná data, která by cílila na otázku, jakým způsobem a do jaké míry jsou CLL buňky závislé či nezávislé na aktivitě tohoto proteinu.

Pro zodpovězení otázky role FoxO1 u CLL jsme provedli analýzu DNA-vazebných interakcí FoxO1 metodou CUT&RUN. Zvýšená aktivita FoxO1 v podmínkách ibrutinibu vyplývající z celkového počtu vázaných genů souhlasí s účinkem inhibice BTK na down-stream signalizaci BCR dráhy, tedy zvýšení aktivity FoxO1 v důsledku snížené fosforylace kinázy Akt a inhibice BTK (Hinman *et al.*, 2007). Tato zvýšená aktivita FoxO1 nicméně neukazuje na jeho roli v adaptaci na tuto léčbu, pouze vyplývá z účinků inhibice BCR dráhy. Při pohledu na zařazení vázaných genů do signálních drah však lze nalézt převážně dráhy související s přežíváním či aktivací buněk, a to jak u buněk ošetřených ibrutinibem, tak buněk neošetřených. Tímto experimentem jsme ukázali na zapojení FoxO1 v několika významných drahách, jež zajišťují přežívání buněk, a tím i na potenciál tohoto transkripčního faktoru v adaptaci na ibrutinib, zda se jedná o pozitivní či negativní regulaci těchto drah však zůstalo neobjasněno. Odpověď přinesl experiment s inhibicí FoxO1. Samotná inhibice FoxO1 v primárních buňkách vedla k významnému snížení viability, které bylo navíc prohloubeno v kombinaci s ibrutinibem. Stejně negativní účinky měla inhibice FoxO1 také na proliferaci buněk při kultivaci s podpůrnými buňkami. Pokud na tomto místě společně zhodnotíme výsledky analýzy signálních drah a negativní vliv inhibice FoxO1 na leukemické buňky, tak je možné usoudit,

že podstata regulace těchto výhodných signálních drah transkripčním faktorem FoxO1 bude mít u CLL buněk spíše pozitivní charakter. Z tohoto pohledu již je možné uvažovat FoxO1 jako potenciální mediátor adaptace. Pro konkrétnější závěry je však za potřebí hlubší analýzy zapojení FoxO1 v daných drahách, touto problematikou se naše výzkumná skupina blíže zabývá a byl na ni recentně vypracován manuskript. Pochopitelně je nutné i ověření na primárních buňkách pacientů zopakováním metody CUT&RUN. Potvrzením významu FoxO1 v adaptaci na ibrutinib byla kompetitivní růstová assay, konkrétně šlo o porovnání wild-type linie MEC1 s *FoxO1*-KO klony vytvořených modifikací této linie, a to za přítomnosti ibrutinibu. V těchto podmínkách kultivace byl *FoxO1* knock-out ve významné růstové nevýhodě, výsledek je tedy v souladu s naší celkovou hypotézou. Souhrnem lze FoxO1 označit za významný faktor v adaptaci na ibrutinib, inhibice či absence tohoto transkripčního faktoru výrazně znevýhodňuje leukemické buňky v přítomnosti ibrutinibu. Z praktického hlediska pak inhibice FoxO1 představuje potenciálně vhodného partnera pro kombinovanou léčbu s BTK inhibitory, pokračování výzkumu tímto směrem pak jednoznačně vyžaduje další experimenty, především se zvířecími modely.

Argumentem, který podporuje relevanci testování FoxO1 inhibitoru, je skutečnost, že inhibice FoxO1 získala terapeutický potenciál v léčbě Burkittova lymfomu, u něhož se setkáváme s aktivačními mutacemi tohoto transkripčního faktoru (Gehring *et al.*, 2019). Podobný závěr má také recentní studie FoxO1 inhibice u lymfomu z plášťových buněk, další malignity s vysokou proliferační aktivitou, kde bylo pozorováno zásadní postavení transkripčního faktoru FoxO1 z hlediska podílení se na přežití a proliferaci maligních buněk, a negativní dopad inhibice FoxO1 na přežití buněk lymfomu (Jang *et al.*, 2022). Pokud je tedy možné najít spojení mezi aktivitou FoxO1 a proliferační kapacitou maligních buněk, nabízí se v této situaci také protiargument vyplývající z biologie CLL. CLL buňky jsou schopné dlouhodobě přežívat a proliferovat pouze v podmínkách mikroprostředí (Herishanu *et al.*, 2011). Z podstaty těchto procesů víme, že dochází k aktivaci kinázy Akt, čímž by také mělo dojít k inaktivaci faktoru FoxO1 skrze Akt zprostředkovanou fosforylací, export z jádra a degradaci FoxO1. Hypoteticky by se tedy FoxO1 neměl účastnit procesů, které v mikroprostředí CLL aktivují proliferaci. Jak se ale ukázalo, aktivita Akt a jaderná lokalizace FoxO1 se vzájemně nevylučují (Šeda *et al.*, 2021; Kabrani *et al.*, 2018). Transkripční aktivita FoxO1 by tedy mohla mít také svůj dopad na proliferační kapacitu CLL buněk v mikroprostředí, na což také ukazuje výsledek analýzy proliferace primárních buněk v podmínkách inhibice FoxO1 v našem zjednodušeném modelu mikroprostředí s buňkami

HS5. Pokud tedy shrneme poznatky, že FoxO1 se účastní obnovení migrační aktivity během léčby ibrutinibem (Šeda *et al.*, 2021), kdy by v důsledku návratu do mikroprostředí mohla být zahájena proliferace buněk, již se z našich výsledků FoxO1 také účastní, tak by kombinovaná terapeutická inhibice ibrutinibem s inhibítozem FoxO1 mohla mít zásadní dopad na celkovou úspěšnost léčby CLL. Všeobecnou důležitost aktivity FoxO1 v odpovědi na léčbu ibrutinibem, a tedy i relevanci z hlediska kombinované léčby pak dokumentuje výsledek kompetitivní růstové eseje, kdy byla *FoxO1* knock-out linie ve významné růstové nevýhodě oproti svému wild-type protějšku v přítomnosti ibrutinibu.

Dalším nejčastěji využívaným inhibítozem v léčbě CLL je venetoclax, BH3 mimetikum, které je schopno blokace anti-apoptické aktivity proteinu BCL2. Tento inhibítoz byl zaveden v roce 2016 pro pacienty s mutací v genu *TP53*, nicméně velice rychle poté se začal používat u všech pacientů bez ohledu na prognostické markery či kondici.

Nejčastějším důvodem přerušení léčby venetoclastem je progresse onemocnění, která se projevuje až u 50 % pacientů léčených tímto inhibítozem (Mato *et al.*, 2020). Příčinou této progresse mohou být mutace přímo v genu pro BCL2, které zabraňují vazbě venetoclastu. Četnost výskytu těchto mutací při progresi na venetoclastu se mezi různými studiemi liší, pohybuje se mezi 10 až 50 % sledovaných případů (Thijssen *et al.*, 2022; Blombery *et al.*, 2019; Kuang *et al.*, 2022). Řešením tohoto typu rezistence je pouze změna na jiný typ inhibítozů, především BCR inhibítozy, nicméně tato varianta může být neúčinná u pacientů, u nichž v minulosti proběhla progresse i na tomto typu léčby. Další z příčin relapsu je zvýšení hladin ostatních anti-apoptických BCL2 proteinů, nejčastěji se pak jedná o BCL-XL a MCL1 (Haselager *et al.*, 2020). Zvýšení exprese BCL-XL bylo spojeno především se stimuly z mikroprostředí. Uvnitř lymfatických orgánů dochází ke stimulaci dráhy NF-κB, po níž pozorujeme navýšení hladin BCL-XL, který je popsáným cílem transkripčního faktoru NF-κB (Haselager *et al.*, 2021). Zapojení této dráhy bylo recentně popsáno i ve zvýšení hladin MCL1, a to dokonce mimo lymfatické orgány (Thijssen *et al.*, 2022). Manifestaci tohoto typu rezistence by bylo možné předcházet právě kombinovanou inhibiční léčbou. Pro první zmíněný mechanismus se nabízí kombinovaná léčba s BCR inhibítozy, které jsou schopné narušit vazby mikroprostředí. U druhého mechanismu se lze setkat se studiemi účinné kombinace inhibítozů BCL2 a MCL1 u akutní myeloidní leukémie (Ramsey *et al.*, 2018).

Studium adaptačních změn u CLL vedoucích k manifestaci rezistence a relapsu při léčbě venetoclastem se od studia adaptace na BCR inhibítozy významně liší. Na rozdíl od drah cílených BCR inhibítozy, kde inhibované molekuly regulují rozsáhlou down-stream signalizaci

vedoucí ke změně transkripce, inhibice BCL2 vede k okamžitému spuštění apoptózy, kdy buňky mají minimální čas ke spuštění hypotetických kompenzačních drah a změně exprese směrem k rezistentnímu fenotypu. Spíše než o adaptaci, můžeme u venetoclaxu hovořit o intenzivní selekci preexistujícího fenotypu, který se může u CLL buněk v určité subklonální populaci vyskytovat. Toto tvrzení je také podpořeno přítomností rozsáhlé heterogenity CLL buněk u rezistentních pacientů, kdy je tato heterogenita pozorována i mezi jednotlivými CLL buňkami jednoho pacienta (Thijssen *et al.*, 2022).

Význam transkripčního faktoru FoxO1 v adaptaci na ibrutinib jsme potvrdili, a proto se nabízel otázka, zda může transkripční faktor FoxO1 nějakým způsobem modulovat senzitivitu k venetoclaxu, dalšímu klinicky relevantnímu inhibitoru. Z literatury vyplývá, že FoxO1 zastává během vývoje B-lymfocytů významnou pozici a bylo ukázáno, že se tento transkripční faktor může podílet na signalizaci apoptózy (Modur *et al.*, 2002; Gilley *et al.*, 2003). Naše výsledky CUT&RUN ukazují na přímou regulaci několika členů BCL2 rodiny, včetně venetoclaxem inhibovaného BCL2 proteinu. Kromě genu pro BCL2 analýza odhalila vazbu FoxO1 na gen anti-apoptického BFL1/A1, a geny pro-apoptických BIM a BMF. Z tohoto hlediska se tedy studium FoxO1 v souvislosti s venetoclaxem jeví jako relevantní. Zajímavou je z tohoto pohledu zvýšená exprese BCL2 a snížená exprese BIM u *FoxO1*-KO linie MEC1 z výsledků western blotu. Oba proteiny lze považovat z hlediska CLL za velice významné. Expresi BCL2 lze označit za jednu z kanonicky deregulovaných u CLL, kdy jsou pozorovány až 25krát vyšší hladiny u maligních B-lymfocytů než u zdravých protějšků (Hanada *et al.*, 1993). V případě molekuly BIM zde máme přímou návaznost na inhibiční léčbu. Účinek BH3 mimetik je totiž závislý na přítomnosti tohoto apoptického aktivátoru (Del Gaizo Moore *et al.*, 2007). Logicky jsme na této linii otestovali koncentrační řadu venetoclaxu, z výsledků viability vychází, že *FoxO1* knock-out linie vykazuje také zvýšenou odolnost vůči inhibici BCL2, což by odpovídalo výše zmíněným zjištěním Del Gaizo Moorové z roku 2007.

Problematika aktivity FoxO1 v souvislosti s citlivostí na venetoclax má svůj přesah také v kontextu kombinované inhibiční léčby BTK inhibitory s venetoclaxem, která je aktuálně předmětem několika klinických studií. Výsledky zvýšené aktivity FoxO1 při léčbě ibrutinibem, jež byly předmětem diskuze v předchozí části, v této souvislosti přinášejí zajímavou otázku. Mezi BTK inhibitory a venetoclaxem je pozorována významná synergie, jak v preklinickém výzkumu, tak klinických testováních (Jain *et al.*, 2019; Kater *et al.*, 2021). Při léčbě ibrutinibem sledujeme zvýšení aktivity FoxO1, v případě *FoxO1*-KO pak zvýšenou odolnost k venetoclaxu, nabízí se tedy hypotéza, zda není transkripční faktor FoxO1 modulátorem

pozorované synergie mezi BTK inhibitory a venetoclaxem. Molekulární příčina synergie BTK a BCL2 inhibice se předpokládá z již popsaných účinků jednotlivých inhibitorů na signální dráhy, to, zda může FoxO1 také modulovat tuto synergii však popsáno nebylo. Odpověď by mohly představovat experimenty s konstitutivně aktivním FoxO1, popř. overexprese tohoto proteinu.

6 Souhrn

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nejčastější leukémií dospělých v Západním světě. Jedná se o nevléčitelné onemocnění, které se vyznačuje hromaděním maligních B-lymfocytů se specifickým imunofenotypem v krvi, lymfatických orgánech a kostní dřeni. Jednou z charakteristik tohoto onemocnění je závislost maligních B-lymfocytů na signálech mikroprostředí, v největší míře pak na aktivitě dráhy B-buněčného receptoru (BCR). Velice úspěšným terapeutickým přístupem je léčba tzv. nízkomolekulárními inhibitory, které blokují signální dráhy potřebné k přežití leukemických buněk a v současnosti představují primární volbu v léčbě CLL. Bohužel, jedním z aspektů této léčby je manifestace rezistence, jež pramení jak z genetických, tak negeneticky podmíněných mechanismů. Právě studium negenetických mechanismů, které spočívají v různých způsobech adaptace aktivity signálních drah k inhibiční léčbě, je velice atraktivním směrem výzkumu a klade si za cíl nalezení takových kombinací inhibitorů signálních drah, které by dokázaly společně s hlavní signální dráhou také blokovat kompenzační signalizaci v maligních B-lymfocytech. Tato diplomová práce testuje roli transkripčního faktoru FoxO1 v odpovědi na nejčastěji využívané inhibitory signálních drah v klinické praxi – inhibitor BCR signalizace ibrutinib a inhibitor anti-apoptického proteinu BCL2 venetoclax.

V souvislosti s léčbou ibrutinibem naše laboratoř popsala adaptační mechanismus, který je zprostředkován právě transkripčním faktorem FoxO1 (Šeda *et al.*, 2021). Jedná se o důkaz onkogenní aktivity toho transkripčního faktoru, která doposud nebyla u FoxO1 v případě CLL popsána. Práce potvrzuje, že během léčby ibrutinibem jsou leukemické buňky významně závislé na aktivitě FoxO1, která se právě příčinou léčby zvyšuje. Inhibice FoxO1 vede k apoptóze CLL buněk, a to i za přítomnosti protektivních signálů z mikroprostředí. Snížena je i schopnost proliferace maligních buněk. Indukce apoptózy i snížení proliferace jsou dále posíleny kombinací FoxO1 inhibitoru s ibrutinibem. Z toho hlediska se jeví kombinovaná inhibice BCR dráhy společně s FoxO1 inhibicí jako perspektivní terapeutický přístup.

Absence FoxO1 naopak vedla k vyšší odolnosti k léčbě venetoclaxem u naší *FoxO1* knock-out linie. Knock-out FoxO1 vedl ke zvýšení hladin anti-apoptického BCL2, a naopak ke snížení hladiny pro-apoptického BIM. Tato pozorování ukazují na možné zapojení FoxO1 v odpovědi na léčbu venetoclaxem. Pochopení role FoxO1 v souvislosti s účinkem venetoclaxu má význam pro studium sledované synergie mezi ibrutinibem a venetoclaxem, kdy právě FoxO1 může být jedním z mediátorů tohoto synergického vztahu mezi inhibitory.

7 Summary

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia in the Western world. It is an incurable disease, that is characterized by an accumulation of malignant B-lymphocytes with specific immunophenotype in peripheral blood, lymphatic organs, and bone marrow. A typical feature of this malignancy is its dependency on stimuli from microenvironment and pathway signaling, especially on activity of B-cell receptor (BCR) pathway. A very successful therapeutic approach is a treatment with “small molecule” inhibitors that effectively block these pro-survival pathways, and currently represent the primary choice in the therapy of CLL. Unfortunately, manifestation of resistance resulting from genetic or non-genetic mechanisms of compensatory signaling can occur during the treatment. Studying non-genetic mechanisms of adaptation to the inhibition therapy, is a very attractive topic of research, and aims to find such inhibitory combinations that, together with the main signaling pathway, could also block the adaptive compensatory signaling in malignant B-cells. This thesis tests the role of the FoxO1 transcription factor in the response to the most frequently used inhibitors in clinical practice – BCR inhibitor ibrutinib and an inhibitor of anti-apoptotic BCL2, venetoclax.

In context of ibrutinib treatment, our laboratory described an adaptation mechanism that is mediated by the transcription factor FoxO1 (Šeda *et al.*, 2021). This is the first evidence of oncogenic activity of FoxO1 not yet described in CLL. The thesis confirms that during ibrutinib therapy, leukemic cells are greatly dependent on the activity of FoxO1, which is increased due to the therapy. Inhibition of FoxO1 leads to apoptosis of CLL cells, even in the presence of pro-survival microenvironmental stimuli. We also observed a decreased proliferation upon FoxO1 inhibition. Both, apoptosis induction and proliferation decrease, were deepened in combination of FoxO1 inhibitor and ibrutinib. The combined inhibition of the BCR pathway together with FoxO1 inhibition thus appears as a promising therapeutic approach.

On the contrary, absence of FoxO1 enhanced resistance to venetoclax therapy in our *FoxO1* knock-out cell line. The knock-out led to upregulation of anti-apoptotic BCL2 and downregulation of pro-apoptotic BIM. These discoveries suggest FoxO1 involvement in the response to venetoclax therapy. Furthermore, our findings might be relevant for the study of observed synergy between ibrutinib and venetoclax, where FoxO1 could mediate this synergistic effect, as well as for understanding the global role of FoxO1 in CLL.

Literatura

- Abdelrahman, A., Ibrahim, M., Hamza, M., Eid, O., Hassan, E., Kamel, S., Eid, M., Shahin, R., Sallam, M., 2018. Relevance of CD49d and CD38 expressions as predictors of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *The Egyptian Journal of Haematology*. **43**(2), 88. https://doi.org/10.4103/ejh.ejh_51_17
- Agarwal, R., Chan, Y.-C., Tam, C.S., Hunter, T., Vassiliadis, D., Teh, C.E., Thijssen, R., Yeh, P., Wong, S.Q., Ftouni, S., Lam, E.Y.N., Anderson, M.A., Pott, C., Gilan, O., Bell, C.C., Knezevic, K., Blombery, P., Rayeroux, K., Zordan, A., Li, J., Huang, D.C.S., Wall, M., Seymour, J.F., Gray, D.H.D., Roberts, A.W., Dawson, M.A., Dawson, S.-J., 2019. Dynamic molecular monitoring reveals that SWI–SNF mutations mediate resistance to ibrutinib plus venetoclax in mantle cell lymphoma. *Nature Medicine*. **25**(1), 119–129. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0243-z>
- Aguilar-Hernandez, M.M., Blunt, M.D., Dobson, R., Yeomans, A., Thirdborough, S., Larrayoz, M., Smith, L.D., Linley, A., Strefford, J.C., Davies, A., Johnson, P.M.W., Savelyeva, N., Cragg, M.S., Forconi, F., Packham, G., Stevenson, F.K., Steele, A.J., 2016. IL-4 enhances expression and function of surface IgM in CLL cells. *Blood*. **127**(24), 3015–3025. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-682906>
- Ahn, I.E., Farooqui, M.Z.H., Tian, X., Valdez, J., Sun, C., Soto, S., Lotter, J., Housel, S., Stetler-Stevenson, M., Yuan, C.M., Maric, I., Calvo, K.R., Nierman, P., Hughes, T.E., Saba, N.S., Marti, G.E., Pittaluga, S., Herman, S.E.M., Niemann, C.U., Pedersen, L.B., Geisler, C.H., Childs, R., Aue, G., Wiestner, A., 2018. Depth and durability of response to ibrutinib in CLL: 5-year follow-up of a phase 2 study. *Blood*. **131**(21), 2357–2366. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-820910>
- Ahn, I.E., Underbayev, C., Albitar, A., Herman, S.E.M., Tian, X., Maric, I., Arthur, D.C., Wake, L., Pittaluga, S., Yuan, C.M., Stetler-Stevenson, M., Soto, S., Valdez, J., Nierman, P., Lotter, J., Xi, L., Raffeld, M., Farooqui, M., Albitar, M., Wiestner, A., 2017. Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **129**(11), 1469–1479. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-719294>

- Ali, A.Y., Wu, X., Eissa, N., Hou, S., Ghia, J.-E., Murooka, T.T., Banerji, V., Johnston, J.B., Lin, F., Gibson, S.B., Marshall, A.J.**, 2018. Distinct roles for phosphoinositide 3-kinases γ and δ in malignant B cell migration. *Leukemia*. **32**(9), 1958–1969. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0012-5>
- Amin, R.H., Schlissel, M.S.**, 2008. Foxo1 directly regulates the transcription of recombination-activating genes during B cell development. *Nature Immunology*. **9**(6), 613–622. <https://doi.org/10.1038/ni.1612>
- Antony, P., Petro, J.B., Carlesso, G., Shinnars, N.P., Lowe, J., Khan, W.N.**, 2004. B-cell antigen receptor activates transcription factors NFAT (nuclear factor of activated T-cells) and NF-kappaB (nuclear factor kappaB) via a mechanism that involves diacylglycerol. *Biochemical Society Transactions*. **32**(Pt 1), 113–115. <https://doi.org/10.1042/bst0320113>
- Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M.T., Monconduit, M., Belabbes, S., Gremy, F.**, 1981. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. **48**(1), 198–206. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19810701\)48:1<198::AID-CNCR2820480131>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19810701)48:1<198::AID-CNCR2820480131>3.0.CO;2-V)
- Bird, S.T., Tian, F., Flowers, N., Przepiorka, D., Wang, R., Jung, T.-H., Kessler, Z., Woods, C., Kim, B., Miller, B.W., Wernecke, M., Kim, C., McKean, S., Gelperin, K., MaCurdy, T.E., Kelman, J.A., Graham, D.J.**, 2020. Idelalisib for Treatment of Relapsed Follicular Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia: A Comparison of Treatment Outcomes in Clinical Trial Participants vs Medicare Beneficiaries. *JAMA Oncology*. **6**(2), 248. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.3994>
- Birkinshaw, R.W., Gong, J., Luo, C.S., Lio, D., White, C.A., Anderson, M.A., Blombery, P., Lessene, G., Majewski, I.J., Thijssen, R., Roberts, A.W., Huang, D.C.S., Colman, P.M., Czabotar, P.E.**, 2019. Structures of BCL-2 in complex with venetoclax reveal the molecular basis of resistance mutations. *Nature Communications*. **10**(1), 2385. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10363-1>

- Blombery, P., Anderson, M.A., Gong, J., Thijssen, R., Birkinshaw, R.W., Thompson, E.R., Teh, C.E., Nguyen, T., Xu, Z., Flensburg, C., Lew, T.E., Majewski, I.J., Gray, D.H.D., Westerman, D.A., Tam, C.S., Seymour, J.F., Czabotar, P.E., Huang, D.C.S., Roberts, A.W.**, 2019. Acquisition of the Recurrent Gly101Val Mutation in BCL2 Confers Resistance to Venetoclax in Patients with Progressive Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Discovery*. **9**(3), 342–353. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1119>
- Bock, F.J., Tait, S.W.G.**, 2020. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **21**(2), 85–100. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>
- Bouska, A., Zhang, W., Gong, Q., Iqbal, J., Scuto, A., Vose, J., Ludvigsen, M., Fu, K., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Gascoyne, R.D., Rosenwald, A., Ott, G., Campo, E., Rimsza, L.M., Delabie, J., Jaffe, E.S., Braziel, R.M., Connors, J.M., Wu, C.-I., Staudt, L.M., D'Amore, F., McKeithan, T.W., Chan, W.C.**, 2017. Combined copy number and mutation analysis identifies oncogenic pathways associated with transformation of follicular lymphoma. *Leukemia*. **31**(1), 83–91. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.175>
- Bulian, P., Shanafelt, T.D., Fegan, C., Zucchetto, A., Cro, L., Nüchel, H., Baldini, L., Kurtova, A.V., Ferrajoli, A., Burger, J.A., Gaidano, G., Del Poeta, G., Pepper, C., Rossi, D., Gattei, V.**, 2014. CD49d Is the Strongest Flow Cytometry–Based Predictor of Overall Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. **32**(9), 897–904. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.8515>
- Burger, J.A., Burger, M., Kipps, T.J.**, 1999. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*. **94**(11), 3658–3667.

- Burger, J.A., Landau, D.A., Taylor-Weiner, A., Bozic, I., Zhang, H., Sarosiek, K., Wang, L., Stewart, C., Fan, J., Hoellenriegel, J., Sivina, M., Dubuc, A.M., Fraser, C., Han, Y., Li, S., Livak, K.J., Zou, L., Wan, Y., Konoplev, S., Sougnez, C., Brown, J.R., Abruzzo, L.V., Carter, S.L., Keating, M.J., Davids, M.S., Wierda, W.G., Cibulskis, K., Zenz, T., Werner, L., Cin, P.D., Kharchenko, P., Neuberg, D., Kantarjian, H., Lander, E., Gabriel, S., O'Brien, S., Letai, A., Weitz, D.A., Nowak, M.A., Getz, G., Wu, C.J., 2016.** Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nature Communications*. **7**(1), 11589. <https://doi.org/10.1038/ncomms11589>
- Burger, J.A., Li, K.W., Keating, M.J., Sivina, M., Amer, A.M., Garg, N., Ferrajoli, A., Huang, X., Kantarjian, H., Wierda, W.G., O'Brien, S., Hellerstein, M.K., Turner, S.M., Emson, C.L., Chen, S.-S., Yan, X.-J., Wodarz, D., Chiorazzi, N., 2017.** Leukemia cell proliferation and death in chronic lymphocytic leukemia patients on therapy with the BTK inhibitor ibrutinib. *JCI Insight*. **2**(2). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89904>
- Burger, J.A., Tsukada, N., Burger, M., Zvaifler, N.J., Dell'Aquila, M., Kipps, T.J., 2000.** Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. **96**(8), 2655–2663.
- Byrd, J.C., Furman, R.R., Coutre, S.E., Burger, J.A., Blum, K.A., Coleman, M., Wierda, W.G., Jones, J.A., Zhao, W., Heerema, N.A., Johnson, A.J., Shaw, Y., Bilotti, E., Zhou, C., James, D.F., O'Brien, S., 2015.** Three-year follow-up of treatment-naïve and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood*. **125**(16), 2497–2506. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-10-606038>
- Byrd, J.C., Furman, R.R., Coutre, S.E., Flinn, I.W., Burger, J.A., Blum, K.A., Grant, B., Sharman, J.P., Coleman, M., Wierda, W.G., Jones, J.A., Zhao, W., Heerema, N.A., Johnson, A.J., Sukbuntherng, J., Chang, B.Y., Clow, F., Hedrick, E., Buggy, J.J., James, D.F., O'Brien, S., 2013.** Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*. **369**(1), 32–42. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215637>

- Calissano, C., Damle, R.N., Marsilio, S., Yan, X.-J., Yancopoulos, S., Hayes, G., Emson, C., Murphy, E.J., Hellerstein, M.K., Sison, C., Kaufman, M.S., Kolitz, J.E., Allen, S.L., Rai, K.R., Ivanovic, I., Dozmorov, I.M., Roa, S., Scharff, M.D., Li, W., Chiorazzi, N., 2011.** Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*. **17**(11–12), 1374–1382. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00360>
- Calissi, G., Lam, E.W.-F., Link, W., 2021.** Therapeutic strategies targeting FOXO transcription factors. *Nature Reviews Drug Discovery*. **20**(1), 21–38. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0088-2>
- Cerna, K., Oppelt, J., Chochola, V., Musilova, K., Šeda, V., Pavlasova, G., Radova, L., Arigoni, M., Calogero, R.A., Benes, V., Trbusek, M., Brychtova, Y., Doubek, M., Mayer, J., Pospisilova, S., Mráz, M., 2019.** MicroRNA miR-34a downregulates FOXP1 during DNA damage response to limit BCR signalling in chronic lymphocytic leukaemia B cells. *Leukemia*. **33**(2), 403–414. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0230-x>
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C., Kipps, T.J., Negrini, M., Croce, C.M., 2005.** *miR-15* and *miR-16* induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **102**(39), 13944–13949. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506654102>
- Cosimo, E., Tarafdar, A., Moles, M.W., Holroyd, A.K., Malik, N., Catherwood, M.A., Hay, J., Dunn, K.M., Macdonald, A.M., Guichard, S.M., O'Rourke, D., Leach, M.T., Sansom, O.J., Cosulich, S.C., McCaig, A.M., Michie, A.M., 2019.** AKT/mTORC2 Inhibition Activates FOXO1 Function in CLL Cells Reducing B-Cell Receptor-Mediated Survival. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. **25**(5), 1574–1587. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2036>

- Cosson, A., Chapiro, E., Bougacha, N., Lambert, J., Herbi, L., Cung, H.-A., Algrin, C., Keren, B., Damm, F., Gabillaud, C., Brunelle-Navas, M.-N., Davi, F., Merle-Béral, H., Le Garff-Tavernier, M., Roos-Weil, D., Choquet, S., Uzunov, M., Morel, V., Leblond, V., Maloum, K., Lepretre, S., Feugier, P., Lesty, C., Lejeune, J., Sutton, L., Landesman, Y., Susin, S.A., Nguyen-Khac, F., 2017.** Gain in the short arm of chromosome 2 (2p+) induces gene overexpression and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: analysis of the central role of XPO1. *Leukemia*. **31(7)**, 1625–1629. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.100>
- Coutré, S.E., Furman, R.R., Flinn, I.W., Burger, J.A., Blum, K., Sharman, J., Jones, J., Wierda, W., Zhao, W., Heerema, N.A., Johnson, A.J., Tran, A., Zhou, C., Bilotti, E., James, D.F., Byrd, J.C., O'Brien, S., 2017.** Extended Treatment with Single-Agent Ibrutinib at the 420 mg Dose Leads to Durable Responses in Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma. *Clinical Cancer Research*. **23(5)**, 1149–1155. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1431>
- Cui, B., Chen, L., Zhang, S., Mráz, M., Fecteau, J.-F., Yu, J., Ghia, E.M., Zhang, L., Bao, L., Rassenti, L.Z., Messer, K., Calin, G.A., Croce, C.M., Kipps, T.J., 2014.** MicroRNA-155 influences B-cell receptor signaling and associates with aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **124(4)**, 546–554. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-559690>
- Cuní, S., Pérez-Aciego, P., Pérez-Chacón, G., Vargas, J.A., Sánchez, A., Martín-Saavedra, F.M., Ballester, S., García-Marco, J., Jordá, J., Durántez, A., 2004.** A sustained activation of PI3K/NF-κB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. **18(8)**, 1391–1400. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403398>
- Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S.M., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K.R., Ferrarini, M., Chiorazzi, N., 1999.** Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **94(6)**, 1840–1847.

- de Gorter, D.J.J., Beuling, E.A., Kersseboom, R., Middendorp, S., van Gils, J.M., Hendriks, R.W., Pals, S.T., Spaargaren, M., 2007.** Bruton's Tyrosine Kinase and Phospholipase C γ 2 Mediate Chemokine-Controlled B Cell Migration and Homing. *Immunity*. **26**(1), 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.11.012>
- Del Gaizo Moore, V., Brown, J.R., Certo, M., Love, T.M., Novina, C.D., Letai, A., 2007.** Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *Journal of Clinical Investigation*. **117**(1), 112–121. <https://doi.org/10.1172/JCI28281>
- Deng, J., Paulus, A., Fang, D.D., Manna, A., Wang, G., Wang, H., Zhu, S., Chen, J., Min, P., Yin, Y., Dutta, N., Halder, N., Ciccio, G., Copland, J.A., Miller, J., Han, B., Bai, L., Liu, L., Wang, M., McEachern, D., Przybranowski, S., Yang, C.-Y., Stuckey, J.A., Wu, D., Li, C., Ryan, J., Letai, A., Ailawadhi, S., Yang, D., Wang, S., Chanan-Khan, A., Zhai, Y., 2022.** Lisoftoclax (APG-2575) Is a Novel BCL-2 Inhibitor with Robust Antitumor Activity in Preclinical Models of Hematologic Malignancy. *Clinical Cancer Research*. **28**(24), 5455–5468. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-4037>
- de Rooij, M.F.M., Kuil, A., Geest, C.R., Eldering, E., Chang, B.Y., Buggy, J.J., Pals, S.T., Spaargaren, M., 2012.** The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor– and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **119**(11), 2590–2594. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-390989>
- Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M., Lichter, P., 2000.** Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. **343**(26), 1910–1916. <https://doi.org/10.1056/NEJM200012283432602>
- Fiorcari, S., Maffei, R., Atene, C.G., Mesini, N., Maccaferri, M., Leonardi, G., Martinelli, S., Paolini, A., Nasillo, V., Debbia, G., Potenza, L., Luppi, M., Marasca, R., 2022.** Notch2 Increases the Resistance to Venetoclax-Induced Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells by Inducing Mcl-1. *Frontiers in Oncology*. **11**, 777587. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.777587>

- Fischer, K., Al-Sawaf, O., Bahlo, J., Fink, A.-M., Tandon, M., Dixon, M., Robrecht, S., Warburton, S., Humphrey, K., Samoylova, O., Liberati, A.M., Pinilla-Ibarz, J., Opat, S., Sivcheva, L., Le Dû, K., Fogliatto, L.M., Niemann, C.U., Weinkove, R., Robinson, S., Kipps, T.J., Boettcher, S., Tausch, E., Humerickhouse, R., Eichhorst, B., Wendtner, C.-M., Langerak, A.W., Kreuzer, K.-A., Ritgen, M., Goede, V., Stilgenbauer, S., Mobasher, M., Hallek, M., 2019.** Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *New England Journal of Medicine*. **380**(23), 2225–2236. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1815281>
- Gehring, F., Weissinger, S., Swier, L., Möller, P., Wirth, T., Ushmorov, A., 2019.** FOXO1 Confers Maintenance of the Dark Zone Proliferation and Survival Program and Can Be Pharmacologically Targeted in Burkitt Lymphoma. *Cancers*. **11**(10), 1427. <https://doi.org/10.3390/cancers11101427>
- Ghia, P., Strola, G., Granziero, L., Geuna, M., Guida, G., Sallusto, F., Ruffing, N., Montagna, L., Piccoli, P., Chilosì, M., Caligaris-Cappio, F., 2002.** Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *European Journal of Immunology*. **32**(5), 1403. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200205\)32:5<1403::AID-IMMU1403>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200205)32:5<1403::AID-IMMU1403>3.0.CO;2-Y)
- Gilley, J., Coffey, P.J., Ham, J., 2003.** FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *Journal of Cell Biology*. **162**(4), 613–622. <https://doi.org/10.1083/jcb.200303026>
- Golson, M.L., Kaestner, K.H., 2016.** Fox transcription factors: from development to disease. *Development (Cambridge, England)*. **143**(24), 4558–4570. <https://doi.org/10.1242/dev.112672>

Guièze, R., Liu, V.M., Rosebrock, D., Jourdain, A.A., Hernández-Sánchez, M., Martínez Zurita, A., Sun, J., Ten Hacken, E., Baranowski, K., Thompson, P.A., Heo, J.-M., Cartun, Z., Aygün, O., Iorgulescu, J.B., Zhang, W., Notarangelo, G., Livitz, D., Li, S., Davids, M.S., Biran, A., Fernandes, S.M., Brown, J.R., Lako, A., Ciantra, Z.B., Lawlor, M.A., Keskin, D.B., Udeshi, N.D., Wierda, W.G., Livak, K.J., Letai, A.G., Neuberg, D., Harper, J.W., Carr, S.A., Piccioni, F., Ott, C.J., Leshchiner, I., Johannessen, C.M., Doench, J., Mootha, V.K., Getz, G., Wu, C.J., 2019. Mitochondrial Reprogramming Underlies Resistance to BCL-2 Inhibition in Lymphoid Malignancies. *Cancer Cell*. **36(4)**, 369-384.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.08.005>

Guinamard, R., Signoret, N., Ishiai, M., Marsh, M., Kurosaki, T., Ravetch, J.V., 1999. B cell antigen receptor engagement inhibits stromal cell-derived factor (SDF)-1alpha chemotaxis and promotes protein kinase C (PKC)-induced internalization of CXCR4. *The Journal of Experimental Medicine*. **189(9)**, 1461–1466. <https://doi.org/10.1084/jem.189.9.1461>

Hallek, M., Al-Sawaf, O., 2021. Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *American Journal of Hematology*. **96(12)**, 1679–1705. <https://doi.org/10.1002/ajh.26367>

Hallek, M., Cheson, B.D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M., Montserrat, E., Chiorazzi, N., Stilgenbauer, S., Rai, K.R., Byrd, J.C., Eichhorst, B., O'Brien, S., Robak, T., Seymour, J.F., Kipps, T.J., 2018. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. **131(25)**, 2745–2760. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-806398>

Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G., Stevenson, F.K., 1999. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **94(6)**, 1848–1854.

Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E., Reed, J.C., 1993. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **82(6)**, 1820–1828.

- Hartmann, T.N., Grabovsky, V., Wang, W., Desch, P., Rubenzer, G., Wollner, S., Binsky, I., Vallon-Eberhard, A., Sapoznikov, A., Burger, M., Shachar, I., Haran, M., Honczarenko, M., Greil, R., Alon, R., 2009.** Circulating B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Display Impaired Migration to Lymph Nodes and Bone Marrow. *Cancer Research*. **69**(7), 3121–3130. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4136>
- Haselager, M., Thijssen, R., West, C., Young, L., Van Kampen, R., Willmore, E., Mackay, S., Kater, A., Eldering, E., 2021.** Regulation of Bcl-XL by non-canonical NF- κ B in the context of CD40-induced drug resistance in CLL. *Cell Death & Differentiation*. **28**(5), 1658–1668. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00692-w>
- Haselager, M.V., Kielbassa, K., ter Burg, J., Bax, D.J.C., Fernandes, S.M., Borst, J., Tam, C., Forconi, F., Chiodin, G., Brown, J.R., Dubois, J., Kater, A.P., Eldering, E., 2020.** Changes in Bcl-2 members after ibrutinib or venetoclax uncover functional hierarchy in determining resistance to venetoclax in CLL. *Blood*. **136**(25), 2918–2926. <https://doi.org/10.1182/blood.2019004326>
- Haselager, M.V., Thijssen, R., Bax, D., Both, D., De Boer, F., Mackay, S., Dubois, J., Mellink, C., Kater, A.P., Eldering, E., 2023.** JAK–STAT signalling shapes the NF- κ B response in CLL towards venetoclax sensitivity or resistance via BCL-XL. *Molecular Oncology*. 1878–0261.13364. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13364>
- Herishanu, Y., Pérez-Galán, P., Liu, D., Biancotto, A., Pittaluga, S., Vire, B., Gibellini, F., Njuguna, N., Lee, E., Stennett, L., Raghavachari, N., Liu, P., McCoy, J.P., Raffeld, M., Stetler-Stevenson, M., Yuan, C., Sherry, R., Arthur, D.C., Maric, I., White, T., Marti, G.E., Munson, P., Wilson, W.H., Wiestner, A., 2011.** The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- κ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **117**(2), 563–574. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-284984>

- Herman, S.E.M., Gordon, A.L., Wagner, A.J., Heerema, N.A., Zhao, W., Flynn, J.M., Jones, J., Andritsos, L., Puri, K.D., Lannutti, B.J., Giese, N.A., Zhang, X., Wei, L., Byrd, J.C., Johnson, A.J.**, 2010. Phosphatidylinositol 3-kinase- δ inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood*. **116**(12), 2078–2088. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-271171>
- Herman, S.E.M., Mustafa, R.Z., Gyamfi, J.A., Pittaluga, S., Chang, S., Chang, B., Farooqui, M., Wiestner, A.**, 2014. Ibrutinib inhibits BCR and NF- κ B signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL. *Blood*. **123**(21), 3286–3295. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-548610>
- Herold, M.J., Rohrbeck, L., Lang, M.J., Grumont, R., Gerondakis, S., Tai, L., Bouillet, P., Kaufmann, T., Strasser, A.**, 2013. Foxo-mediated *Bim* transcription is dispensable for the apoptosis of hematopoietic cells that is mediated by this BH3-only protein. *EMBO reports*. **14**(11), 992–998. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.152>
- Hinman, R.M., Bushanam, J.N., Nichols, W.A., Satterthwaite, A.B.**, 2007. B cell receptor signaling down-regulates forkhead box transcription factor class O 1 mRNA expression via phosphatidylinositol 3-kinase and Bruton's tyrosine kinase. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. **178**(2), 740–747. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.2.740>
- Hinman, R.M., Nichols, W.A., Diaz, T.M., Gallardo, T.D., Castrillon, D.H., Satterthwaite, A.B.**, 2009. Foxo3^{-/-} mice demonstrate reduced numbers of pre-B and recirculating B cells but normal splenic B cell sub-population distribution. *International Immunology*. **21**(7), 831–842. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp049>
- Chan, V.W.F., Lowell, C.A., DeFranco, A.L.**, 1998. Defective negative regulation of antigen receptor signaling in Lyn-deficient B lymphocytes. *Current Biology*. **8**(10), 545–553. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70223-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70223-4)

- Chellappa, S., Kushekhar, K., Munthe, L.A., Tjønnfjord, G.E., Aandahl, E.M., Okkenhaug, K., Taskén, K., 2019.** The PI3K p110 δ Isoform Inhibitor Idelalisib Preferentially Inhibits Human Regulatory T Cell Function. *The Journal of Immunology*. **202**(5), 1397–1405. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701703>
- Chiodin, G., Dutton, D., Martino, E.A., Drennan, S., Tracy, I., Ondrišová, L., Henderson, I., D'Avola, A., Pitsillidou, C., Mráz, M., Johnson, P., Duncombe, A., Packham, G., Steele, A.J., Parker, H., Bonfiglio, S., Scarfo, L., Sutton, L.-A., Ghia, P., Rose-Zerilli, M.J.J., Strefford, J.C., Stevenson, F.K., Forconi, F., 2019.** High Surface IgM Levels Associate with Shorter Response Duration and Bypass of the BTK Blockade during Ibrutinib Therapy in CLL Patients. *Blood*. **134**(Supplement_1), 1752–1752. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-128899>
- Ingham, R.J., Santos, L., Dang-Lawson, M., Holgado-Madruga, M., Dudek, P., Maroun, C.R., Wong, A.J., Matsuuchi, L., Gold, M.R., 2001.** The Gab1 Docking Protein Links the B Cell Antigen Receptor to the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway and to the SHP2 Tyrosine Phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*. **276**(15), 12257–12265. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010590200>
- Jain, N., Keating, M., Thompson, P., Ferrajoli, A., Burger, J., Borthakur, G., Takahashi, K., Estrov, Z., Fowler, N., Kadia, T., Konopleva, M., Alvarado, Y., Yilmaz, M., DiNardo, C., Bose, P., Ohanian, M., Pemmaraju, N., Jabbour, E., Sasaki, K., Kanagal-Shamanna, R., Patel, K., Jorgensen, J., Garg, N., Wang, X., Sondermann, K., Cruz, N., Wei, C., Ayala, A., Plunkett, W., Kantarjian, H., Gandhi, V., Wierda, W., 2019.** Ibrutinib and Venetoclax for First-Line Treatment of CLL. *New England Journal of Medicine*. **380**(22), 2095–2103. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1900574>
- Jang, J.-Y., Hwang, I., Pan, H., Yao, J., Alinari, L., Imada, E., Zanettini, C., Kluk, M.J., Wang, Y., Lee, Y., Lin, H.V., Huang, X., Di Liberto, M., Chen, Z., Ballman, K.V., Cantley, L.C., Marchionni, L., Inghirami, G., Elemento, O., Baiocchi, R.A., Chen-Kiang, S., Belvedere, S., Zheng, H., Paik, J., 2022.** A FOXO1-dependent transcription network is a targetable vulnerability of mantle cell lymphomas. *Journal of Clinical Investigation*. **132**(24), e160767. <https://doi.org/10.1172/JCI160767>

- Janssens, D.**, 2019. *CUT&RUN: Targeted in situ genome-wide profiling with high efficiency for low cell numbers v3*. preprint. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.zcpf2vn>
- Jayappa, K.D., Portell, C.A., Gordon, V.L., Capaldo, B.J., Bekiranov, S., Axelrod, M.J., Brett, L.K., Wulfschlegel, J.D., Gallagher, R.I., Petricoin, E.F., Bender, T.P., Williams, M.E., Weber, M.J.**, 2017. Microenvironmental agonists generate de novo phenotypic resistance to combined ibrutinib plus venetoclax in CLL and MCL. *Blood Advances*. **1**(14), 933–946. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016004176>
- Jolma, A., Yan, J., Whittington, T., Toivonen, J., Nitta, K.R., Rastas, P., Morgunova, E., Enge, M., Taipale, M., Wei, G., Palin, K., Vaquerizas, J.M., Vincentelli, R., Luscombe, N.M., Hughes, T.R., Lemaire, P., Ukkonen, E., Kivioja, T., Taipale, J.**, 2013. DNA-binding specificities of human transcription factors. *Cell*. **152**(1–2), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.009>
- Kabrani, E., Chu, V.T., Tasouri, E., Sommermann, T., Baßler, K., Ulas, T., Zenz, T., Bullinger, L., Schultze, J.L., Rajewsky, K., Sander, S.**, 2018a. Nuclear FOXO1 promotes lymphomagenesis in germinal center B cells. *Blood*. **132**(25), 2670–2683. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-856203>
- Kang, S.W.**, 2001. PKCbeta modulates antigen receptor signaling via regulation of Btk membrane localization. *The EMBO Journal*. **20**(20), 5692–5702. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.20.5692>
- Kapoor, I., Li, Y., Sharma, A., Zhu, H., Bodo, J., Xu, W., Hsi, E.D., Hill, B.T., Almasan, A.**, 2019. Resistance to BTK inhibition by ibrutinib can be overcome by preventing FOXO3a nuclear export and PI3K/AKT activation in B-cell lymphoid malignancies. *Cell Death & Disease*. **10**(12), 924. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2158-0>
- Kater, A.P., Slinger, E., Cretenet, G., Martens, A.W., Balasubramanian, S., Levenson, J.D., Eldering, E.**, 2021. Combined ibrutinib and venetoclax treatment vs single agents in the *TCL1* mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood Advances*. **5**(23), 5410–5414. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004861>

- Kienle, D.L., Korz, C., Hosch, B., Benner, A., Mertens, D., Habermann, A., Kröber, A., Jäger, U., Lichter, P., Döhner, H., Stilgenbauer, S., 2005.** Evidence for Distinct Pathomechanisms in Genetic Subgroups of Chronic Lymphocytic Leukemia Revealed by Quantitative Expression Analysis of Cell Cycle, Activation, and Apoptosis-Associated Genes. *Journal of Clinical Oncology*. **23**(16), 3780–3792. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.568>
- Kitada, S., Zapata, J.M., Andreeff, M., Reed, J.C., 1999.** Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*. **106**(4), 995–1004. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01642.x>
- Knisbacher, B.A., Lin, Z., Hahn, C.K., Nadeu, F., Duran-Ferrer, M., Stevenson, K.E., Tausch, E., Delgado, J., Barbera-Mourelle, A., Taylor-Weiner, A., Bousquets-Muñoz, P., Diaz-Navarro, A., Dunford, A., Anand, S., Kretzmer, H., Gutierrez-Abril, J., López-Tamargo, S., Fernandes, S.M., Sun, C., Sivina, M., Rassenti, L.Z., Schneider, C., Li, S., Parida, L., Meissner, A., Aguet, F., Burger, J.A., Wiestner, A., Kipps, T.J., Brown, J.R., Hallek, M., Stewart, C., Neuberg, D.S., Martín-Subero, J.I., Puente, X.S., Stilgenbauer, S., Wu, C.J., Campo, E., Getz, G., 2022.** Molecular map of chronic lymphocytic leukemia and its impact on outcome. *Nature Genetics*. **54**(11), 1664–1674. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01140-w>
- Kuang, Y., Fernandes, S.M., Fardoun, R., Vasquez, K., Mogili, A., Paweletz, C.P., Brown, J.R., 2022.** Abstract 3960: BCL-2 G101V mutations develop in one-third of patients on continuous venetoclax. *Cancer Research*. **82**(12_Supplement), 3960–3960. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2022-3960>
- Kuo, T.C., Schlissel, M.S., 2009.** Mechanisms controlling expression of the RAG locus during lymphocyte development. *Current Opinion in Immunology*. **21**(2), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.03.008>
- Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., De Bruyn, C., Stryckmans, P., 1998.** Chronic Lymphocytic Leukemic B Cells But Not Normal B Cells Are Rescued From Apoptosis by Contact With Normal Bone Marrow Stromal Cells. *Blood*. **91**(7), 2387–2396. <https://doi.org/10.1182/blood.V91.7.2387>

- Lam, K.-P., Kühn, R., Rajewsky, K.,** 1997. In Vivo Ablation of Surface Immunoglobulin on Mature B Cells by Inducible Gene Targeting Results in Rapid Cell Death. *Cell*. **90**(6), 1073–1083. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80373-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80373-6)
- Landau, D.A., Tausch, E., Taylor-Weiner, A.N., Stewart, C., Reiter, J.G., Bahlo, J., Kluth, S., Bozic, I., Lawrence, M., Böttcher, S., Carter, S.L., Cibulskis, K., Mertens, D., Sougnez, C.L., Rosenberg, M., Hess, J.M., Edelman, J., Kless, S., Kneba, M., Ritgen, M., Fink, A., Fischer, K., Gabriel, S., Lander, E.S., Nowak, M.A., Döhner, H., Hallek, M., Neuberg, D., Getz, G., Stilgenbauer, S., Wu, C.J.,** 2015. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. **526**(7574), 525–530. <https://doi.org/10.1038/nature15395>
- Lannutti, B.J., Meadows, S.A., Herman, S.E.M., Kashishian, A., Steiner, B., Johnson, A.J., Byrd, J.C., Tyner, J.W., Loriaux, M.M., Deininger, M., Druker, B.J., Puri, K.D., Ulrich, R.G., Giese, N.A.,** 2011. CAL-101, a p110 δ selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood*. **117**(2), 591–594. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-275305>
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., Korsmeyer, S.J.,** 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*. **2**(3), 183–192. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00127-7](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00127-7)
- Liu, T.-M., Woyach, J.A., Zhong, Y., Lozanski, A., Lozanski, G., Dong, S., Strattan, E., Lehman, A., Zhang, X., Jones, J.A., Flynn, J., Andritsos, L.A., Maddocks, K., Jaglowski, S.M., Blum, K.A., Byrd, J.C., Dubovsky, J.A., Johnson, A.J.,** 2015. Hypermorphic mutation of phospholipase C, γ 2 acquired in ibrutinib-resistant CLL confers BTK independency upon B-cell receptor activation. *Blood*. **126**(1), 61–68. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-626846>

- Mato, A.R., Roeker, L.E., Jacobs, R., Hill, B.T., Lamanna, N., Brander, D., Shadman, M., Ujjani, C.S., Yazdy, M.S., Perini, G.F., Pinilla-Ibarz, J.A., Barrientos, J., Skarbnik, A.P., Torcka, P., Pu, J.J., Pagel, J.M., Gohil, S., Fakhri, B., Choi, M., Coombs, C.C., Rhodes, J., Barr, P.M., Portell, C.A., Parry, H., Garcia, C.A., Whitaker, K.J., Winter, A.M., Sitlinger, A., Khajavian, S., Grajales-Cruz, A.F., Isaac, K.M., Shah, P., Akhtar, O.S., Pocock, R., Lam, K., Voorhees, T.J., Schuster, S.J., Rodgers, T.D., Fox, C.P., Martinez-Calle, N., Munir, T., Bhavsar, E.B., Bailey, N., Lee, J.C., Weissbrot, H.B., Nabhan, C., Goodfriend, J.M., King, A.C., Zelenetz, A.D., Dorsey, C., Bigelow, K., Cheson, B.D., Allan, J.N., Eyre, T.A., 2020.** Assessment of the Efficacy of Therapies Following Venetoclax Discontinuation in CLL Reveals BTK Inhibition as an Effective Strategy. *Clinical Cancer Research*. **26**(14), 3589–3596. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-3815>
- Miyamoto, K., Miyamoto, T., Kato, R., Yoshimura, A., Motoyama, N., Suda, T., 2008.** FoxO3a regulates hematopoietic homeostasis through a negative feedback pathway in conditions of stress or aging. *Blood*. **112**(12), 4485–4493. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-159848>
- Modur, V., Nagarajan, R., Evers, B.M., Milbrandt, J., 2002.** FOXO Proteins Regulate Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis Inducing Ligand Expression. *Journal of Biological Chemistry*. **277**(49), 47928–47937. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207509200>
- Motta, M., Rassenti, L., Shelvin, B.J., Lerner, S., Kipps, T.J., Keating, M.J., Wierda, W.G., 2005.** Increased expression of CD152 (CTLA-4) by normal T lymphocytes in untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. **19**(10), 1788–1793. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403907>
- Mráz, M., Chen, L., Rassenti, L.Z., Ghia, E.M., Li, H., Jepsen, K., Smith, E.N., Messer, K., Frazer, K.A., Kipps, T.J., 2014.** miR-150 influences B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia by regulating expression of GAB1 and FOXP1. *Blood*. **124**(1), 84–95. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-527234>

- Mráz, M., Zent, C.S., Church, A.K., Jelinek, D.F., Wu, X., Pospisilova, S., Ansell, S.M., Novak, A.J., Kay, N.E., Witzig, T.E., Nowakowski, G.S.,** 2011. Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin α -4- β -1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *British Journal of Haematology*. **155**(1), 53–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08794.x>
- Nishio, M., Endo, T., Tsukada, N., Ohata, J., Kitada, S., Reed, J.C., Zvaifler, N.J., Kipps, T.J.,** 2005. Nurse-like cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 α . *Blood*. **106**(3), 1012–1020. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0889>
- O'Brien, S.M., Furman, R.R., Coutre, S.E., Flinn, I.W., Burger, J., Blum, K., Sharman, J., Wierda, W.G., Jones, J., Zhao, W., Heerema, N.A., Johnson, A.J., Luan, Y., James, D.F., Chu, A.D., Byrd, J.C.,** 2016. Five-Year Experience with Single-Agent Ibrutinib in Patients with Previously Untreated and Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Leukemia. *Blood*. **128**(22), 233–233. <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.233.233>
- Ondrišová, L., Mráz, M.,** 2020. Genetic and Non-Genetic Mechanisms of Resistance to BCR Signaling Inhibitors in B Cell Malignancies. *Frontiers in Oncology*. **10**, 591577. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.591577>
- Ottens, K., Hinman, R.M., Barrios, E., Skaug, B., Davis, L.S., Li, Q.-Z., Castrillon, D.H., Satterthwaite, A.B.,** 2018. Foxo3 Promotes Apoptosis of B Cell Receptor–Stimulated Immature B Cells, Thus Limiting the Window for Receptor Editing. *The Journal of Immunology*. **201**(3), 940–949. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701070>
- Pan, Z., Scheerens, H., Li, S.-J., Schultz, B.E., Sprengeler, P.A., Burrill, L.C., Mendonca, R.V., Sweeney, M.D., Scott, K.C.K., Grothaus, P.G., Jeffery, D.A., Spoerke, J.M., Honigberg, L.A., Young, P.R., Dalrymple, S.A., Palmer, J.T.,** 2007. Discovery of Selective Irreversible Inhibitors for Bruton's Tyrosine Kinase. *ChemMedChem*. **2**(1), 58–61. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200600221>

- Parikh, S.A., Rabe, K.G., Call, T.G., Zent, C.S., Habermann, T.M., Ding, W., Leis, J.F., Schwager, S.M., Hanson, C.A., Macon, W.R., Kay, N.E., Slager, S.L., Shanafelt, T.D.,** 2013. Diffuse large B-cell lymphoma (Richter syndrome) in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a cohort study of newly diagnosed patients. *British Journal of Haematology*. **162**(6), 774–782. <https://doi.org/10.1111/bjh.12458>
- Pasqualucci, L., Khiabani, H., Fangazio, M., Vasishtha, M., Messina, M., Holmes, A.B., Ouillette, P., Trifonov, V., Rossi, D., Tabbò, F., Ponzoni, M., Chadburn, A., Murty, V.V., Bhagat, G., Gaidano, G., Inghirami, G., Malek, S.N., Rabadan, R., Dalla-Favera, R.,** 2014. Genetics of Follicular Lymphoma Transformation. *Cell Reports*. **6**(1), 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.027>
- Pastore, A., Jurinovic, V., Kridel, R., Hoster, E., Staiger, A.M., Szczepanowski, M., Pott, C., Kopp, N., Murakami, M., Horn, H., Leich, E., Moccia, A.A., Mottok, A., Sunkavalli, A., Van Hummelen, P., Ducar, M., Ennishi, D., Shulha, H.P., Hother, C., Connors, J.M., Sehn, L.H., Dreyling, M., Neuberg, D., Möller, P., Feller, A.C., Hansmann, M.L., Stein, H., Rosenwald, A., Ott, G., Klapper, W., Unterhalt, M., Hiddemann, W., Gascoyne, R.D., Weinstock, D.M., Weigert, O.,** 2015. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *The Lancet Oncology*. **16**(9), 1111–1122. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00169-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00169-2)
- Patke, A., Mecklenbräuker, I., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Tarakhovsky, A.,** 2006. BAFF controls B cell metabolic fitness through a PKC β - and Akt-dependent mechanism. *Journal of Experimental Medicine*. **203**(11), 2551–2562. <https://doi.org/10.1084/jem.20060990>
- Pedersen, I.M., Kitada, S., Leoni, L.M., Zapata, J.M., Karras, J.G., Tsukada, N., Kipps, T.J., Choi, Y.S., Bennett, F., Reed, J.C.,** 2002. Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood*. **100**(5), 1795–1801. https://doi.org/10.1182/blood.V100.5.1795.h81702001795_1795_1801

- Ponader, S., Chen, S.-S., Buggy, J.J., Balakrishnan, K., Gandhi, V., Wierda, W.G., Keating, M.J., O'Brien, S., Chiorazzi, N., Burger, J.A.,** 2012. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood*. **119**(5), 1182–1189. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-386417>
- Psathas, J.N., Doonan, P.J., Raman, P., Freedman, B.D., Minn, A.J., Thomas-Tikhonenko, A.,** 2013. The Myc-miR-17-92 axis amplifies B-cell receptor signaling via inhibition of ITIM proteins: a novel lymphomagenic feed-forward loop. *Blood*. **122**(26), 4220–4229. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-473090>
- Psenakova, K., Kohoutova, K., Obsilova, V., Ausserlechner, M., Veverka, V., Obsil, T.,** 2019. Forkhead Domains of FOXO Transcription Factors Differ in both Overall Conformation and Dynamics. *Cells*. **8**(9), 966. <https://doi.org/10.3390/cells8090966>
- Pulte, D., Redaniel, M.T., Bird, J., Jeffreys, M.,** 2015. Survival for patients with chronic leukemias in the US and Britain: Age-related disparities and changes in the early 21st century. *European Journal of Haematology*. **94**(6), 540–545. <https://doi.org/10.1111/ejh.12468>
- Quah, B.J.C., Warren, H.S., Parish, C.R.,** 2007. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols*. **2**(9), 2049–2056. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.296>
- Quesada, V., Ramsay, A.J., Rodríguez, D., Puente, X.S., Campo, E., López-Otín, C.,** 2013. The genomic landscape of chronic lymphocytic leukemia: clinical implications. *BMC Medicine*. **11**(1), 124. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-124>
- Quinquenel, A., Fornecker, L.-M., Letestu, R., Ysebaert, L., Fleury, C., Lazarian, G., Dilhuydy, M.-S., Nollet, D., Guieze, R., Feugier, P., Roos-Weil, D., Willems, L., Michallet, A.-S., Delmer, A., Hormigos, K., Levy, V., Cymbalista, F., Baran-Marszak, F.,** 2019. Prevalence of BTK and PLCG2 mutations in a real-life CLL cohort still on ibrutinib after 3 years: a FILO group study. *Blood*. **134**(7), 641–644. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000854>

- Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N., Pasternack, B.S.,** 1975. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **46**(2), 219–234.
- Ramsey, H.E., Fischer, M.A., Lee, T., Gorska, A.E., Arrate, M.P., Fuller, L., Boyd, K.L., Strickland, S.A., Sensintaffar, J., Hogdal, L.J., Ayers, G.D., Olejniczak, E.T., Fesik, S.W., Savona, M.R.,** 2018. A Novel MCL1 Inhibitor Combined with Venetoclax Rescues Venetoclax-Resistant Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discovery*. **8**(12), 1566–1581. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0140>
- Rassenti, L.Z., Huynh, L., Toy, T.L., Chen, L., Keating, M.J., Gribben, J.G., Neuberg, D.S., Flinn, I.W., Rai, K.R., Byrd, J.C., Kay, N.E., Greaves, A., Weiss, A., Kipps, T.J.,** 2004. ZAP-70 Compared with Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Mutation Status as a Predictor of Disease Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. **351**(9), 893–901. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040857>
- Riches, J.C., O'Donovan, C.J., Kingdon, S.J., McClanahan, F., Clear, A.J., Neuberg, D.S., Werner, L., Croce, C.M., Ramsay, A.G., Rassenti, L.Z., Kipps, T.J., Gribben, J.G.,** 2014. Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells exhibit upregulation of integrin signaling that is modulated by NOTCH1 mutations. *Blood*. **123**(26), 4101–4110. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-552307>
- Roberts, A.W., Seymour, J.F., Brown, J.R., Wierda, W.G., Kipps, T.J., Khaw, S.L., Carney, D.A., He, S.Z., Huang, D.C.S., Xiong, H., Cui, Y., Busman, T.A., McKeegan, E.M., Krivoshik, A.P., Enschede, S.H., Humerickhouse, R.,** 2012. Substantial Susceptibility of Chronic Lymphocytic Leukemia to BCL2 Inhibition: Results of a Phase I Study of Navitoclax in Patients With Relapsed or Refractory Disease. *Journal of Clinical Oncology*. **30**(5), 488–496. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.34.7898>

- Rossi, D., Fangazio, M., Rasi, S., Vaisitti, T., Monti, S., Cresta, S., Chiaretti, S., Del Giudice, I., Fabbri, G., Bruscatto, A., Spina, V., Deambrogi, C., Marinelli, M., Famà, R., Greco, M., Daniele, G., Forconi, F., Gattei, V., Bertoni, F., Deaglio, S., Pasqualucci, L., Guarini, A., Dalla-Favera, R., Foà, R., Gaidano, G., 2012. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **119**(12), 2854–2862. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-395673>
- Rossi, D., Spina, V., Deambrogi, C., Rasi, S., Laurenti, L., Stamatopoulos, K., Arcaini, L., Lucioni, M., Rocque, G.B., Xu-Monette, Z.Y., Visco, C., Chang, J., Chigrinova, E., Forconi, F., Marasca, R., Besson, C., Papadaki, T., Paulli, M., Larocca, L.M., Pileri, S.A., Gattei, V., Bertoni, F., Foà, R., Young, K.H., Gaidano, G., 2011. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood*. **117**(12), 3391–3401. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-302174>
- Saito, K., Scharenberg, A.M., Kinet, J.-P., 2001. Interaction between the Btk PH Domain and Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate Directly Regulates Btk. *Journal of Biological Chemistry*. **276**(19), 16201–16206. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100873200>
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M., 2005. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science*. **307**(5712), 1098–1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>
- Šeda, V., Vojackova, E., Ondrišová, L., Kostalova, L., Sharma, S., Loja, T., Mladonicka Pavlasova, G., Zicha, D., Kudlickova Peskova, M., Krivanek, J., Liskova, K., Kren, L., Benes, V., Musilova Litzmanova, K., Borsky, M., Oppelt, J., Verner, J., Pospisilova, S., Brychtova, Y., Panovska, A., Tan, Z., Zhang, S., Doubek, M., Amruz Cerna, K., Mayer, J., Mráz, M., 2021. FoxO1-GAB1 axis regulates homing capacity and tonic AKT activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **138**(9), 758–772. <https://doi.org/10.1182/blood.2020008101>

- Seymour, J.F., Davids, M.S., Pagel, J.M., Kahl, B.S., Wierda, W.G., Puvvada, S., Gerecitano, J.F., Kipps, T.J., Anderson, M.A., Huang, D.C.S., Rudersdorf, N., Gressick, L.A., Montalvo, N.P., Yang, J., Zhu, M., Dunbar, M., Cerri, E., Enschede, S.H., Humerickhouse, R., Roberts, A.W., 2014.** ABT-199 (GDC-0199) in relapsed/refractory (R/R) chronic lymphocytic leukemia (CLL) and small lymphocytic lymphoma (SLL): High complete- response rate and durable disease control. *Journal of Clinical Oncology*. **32**(15_suppl), 7015–7015. https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.7015
- Seymour, J.F., Kipps, T.J., Eichhorst, B., Hillmen, P., D’Rozario, J., Assouline, S., Owen, C., Gerecitano, J., Robak, T., De la Serna, J., Jaeger, U., Cartron, G., Montillo, M., Humerickhouse, R., Punnoose, E.A., Li, Y., Boyer, M., Humphrey, K., Mobasher, M., Kater, A.P., 2018.** Venetoclax–Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. **378**(12), 1107–1120. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1713976>
- Sharman, J.P., Egyed, M., Jurczak, W., Skarbnik, A., Pagel, J.M., Flinn, I.W., Kamdar, M., Munir, T., Walewska, R., Corbett, G., Fogliatto, L.M., Herishanu, Y., Banerji, V., Coutre, S., Follows, G., Walker, P., Karlsson, K., Ghia, P., Janssens, A., Cymbalista, F., Woyach, J.A., Salles, G., Wierda, W.G., Izumi, R., Munugalavadla, V., Patel, P., Wang, M.H., Wong, S., Byrd, J.C., 2020.** Acalabrutinib with or without obinutuzumab versus chlorambucil and obinutuzumab for treatment-naive chronic lymphocytic leukaemia (ELEVATE-TN): a randomised, controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. **395**(10232), 1278–1291. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30262-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30262-2)
- Shinohara, H., Yasuda, T., Aiba, Y., Sanjo, H., Hamadate, M., Watarai, H., Sakurai, H., Kurosaki, T., 2005.** PKC beta regulates BCR-mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1. *The Journal of Experimental Medicine*. **202**(10), 1423–1431. <https://doi.org/10.1084/jem.20051591>

- Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., Huang, D.C.S., Hymowitz, S.G., Jin, S., Khaw, S.L., Kovar, P.J., Lam, L.T., Lee, J., Maecker, H.L., Marsh, K.C., Mason, K.D., Mitten, M.J., Nimmer, P.M., Oleksijew, A., Park, C.H., Park, C.-M., Phillips, D.C., Roberts, A.W., Sampath, D., Seymour, J.F., Smith, M.L., Sullivan, G.M., Tahir, S.K., Tse, C., Wendt, M.D., Xiao, Y., Xue, J.C., Zhang, H., Humerickhouse, R.A., Rosenberg, S.H., Elmore, S.W., 2013.** ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine*. **19**(2), 202–208. <https://doi.org/10.1038/nm.3048>
- Srinivasan, L., Sasaki, Y., Calado, D.P., Zhang, B., Paik, J.H., DePinho, R.A., Kutok, J.L., Kearney, J.F., Otipoby, K.L., Rajewsky, K., 2009.** PI3 Kinase Signals BCR-Dependent Mature B Cell Survival. *Cell*. **139**(3), 573–586. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.041>
- Stamatopoulos, K., Belessi, C., Moreno, C., Boudjograh, M., Guida, G., Smilevska, T., Belhoul, L., Stella, S., Stavroyianni, N., Crespo, M., Hadzidimitriou, A., Sutton, L., Bosch, F., Laoutaris, N., Anagnostopoulos, A., Montserrat, E., Fassas, A., Dighiero, G., Caligaris-Cappio, F., Merle-Béral, H., Ghia, P., Davi, F., 2007.** Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*. **109**(1), 259–270. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-012948>
- Steele, A.J., Prentice, A.G., Cwynarski, K., Hoffbrand, A.V., Hart, S.M., Lowdell, M.W., Samuel, E.R., Wickremasinghe, R.G., 2010.** The JAK3-selective inhibitor PF-956980 reverses the resistance to cytotoxic agents induced by interleukin-4 treatment of chronic lymphocytic leukemia cells: potential for reversal of cytoprotection by the microenvironment. *Blood*. **116**(22), 4569–4577. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-245811>

- Stein, H., Bonk, A., Tolksdorf, G., Lennert, K., Rodt, H., Gerdes, J., 1980.** Immunohistologic analysis of the organization of normal lymphoid tissue and non-Hodgkin's lymphomas. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. **28**(8), 746–760. <https://doi.org/10.1177/28.8.7003001>
- Sutherland, C.L., Heath, A.W., Pelech, S.L., Young, P.R., Gold, M.R., 1996.** Differential activation of the ERK, JNK, and p38 mitogen-activated protein kinases by CD40 and the B cell antigen receptor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. **157**(8), 3381–3390.
- Szydłowski, M., Kiliszek, P., Sewastianik, T., Jabłonska, E., Białopiotrowicz, E., Gorniak, P., Polak, A., Markowicz, S., Nowak, E., Grygorowicz, M.A., Prochorec-Sobieszek, M., Szumera-Cieckiewicz, A., Malenda, A., Lech-Maranda, E., Warzocha, K., Juszczyński, P., 2016.** FOXO1 activation is an effector of SYK and AKT inhibition in tonic BCR signal-dependent diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. **127**(6), 739–748. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-06-654111>
- Thijssen, R., Tian, L., Anderson, M.A., Flensburg, C., Jarratt, A., Garnham, A.L., Jabbari, J.S., Peng, H., Lew, T.E., Teh, C.E., Gouil, Q., Georgiou, A., Tan, T., Djajawi, T.M., Tam, C.S., Seymour, J.F., Blombery, P., Gray, D.H.D., Majewski, I.J., Ritchie, M.E., Roberts, A.W., Huang, D.C.S., 2022.** Single-cell multiomics reveal the scale of multilayered adaptations enabling CLL relapse during venetoclax therapy. *Blood*. **140**(20), 2127–2141. <https://doi.org/10.1182/blood.2022016040>
- Till, K.J., Lin, K., Zuzel, M., Cawley, J.C., 2002.** The chemokine receptor CCR7 and $\alpha 4$ integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood*. **99**(8), 2977–2984. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.8.2977>

- Tissino, E., Benedetti, D., Herman, S.E.M., ten Hacken, E., Ahn, I.E., Chaffee, K.G., Rossi, F.M., Dal Bo, M., Bulian, P., Bomben, R., Bayer, E., Härzschel, A., Gutjahr, J.C., Postorino, M., Santinelli, E., Ayed, A., Zaja, F., Chiarenza, A., Pozzato, G., Chigaev, A., Sklar, L.A., Burger, J.A., Ferrajoli, A., Shanafelt, T.D., Wiestner, A., Del Poeta, G., Hartmann, T.N., Gattei, V., Zucchetto, A., 2018.** Functional and clinical relevance of VLA-4 (CD49d/CD29) in ibrutinib-treated chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Experimental Medicine*. **215**(2), 681–697. <https://doi.org/10.1084/jem.20171288>
- Trinh, D.L., Scott, D.W., Morin, R.D., Mendez-Lago, M., An, J., Jones, S.J.M., Mungall, A.J., Zhao, Y., Schein, J., Steidl, C., Connors, J.M., Gascoyne, R.D., Marra, M.A., 2013.** Analysis of FOXO1 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. **121**(18), 3666–3674. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-479865>
- Vaisitti, T., Aydin, S., Rossi, D., Cottino, F., Bergui, L., D’Arena, G., Bonello, L., Horenstein, A.L., Brennan, P., Pepper, C., Gaidano, G., Malavasi, F., Deaglio, S., 2010.** CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. **24**(5), 958–969. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.36>
- Veullen, C., Aurran-Schleinitz, T., Castellano, R., Rey, J., Mallet, F., Orlanducci, F., Pouyet, L., Just-Landi, S., Coso, D., Ivanov, V., Carcopino, X., Bouabdallah, R., Collette, Y., Fauriat, C., Olive, D., 2012.** Primary B-CLL Resistance to NK Cell Cytotoxicity can be Overcome In Vitro and In Vivo by Priming NK Cells and Monoclonal Antibody Therapy. *Journal of Clinical Immunology*. **32**(3), 632–646. <https://doi.org/10.1007/s10875-011-9624-5>
- Wang, E., Mi, X., Thompson, M.C., Montoya, S., Notti, R.Q., Afaghani, J., Durham, B.H., Penson, A., Witkowski, M.T., Lu, S.X., Bourcier, J., Hogg, S.J., Erickson, C., Cui, D., Cho, H., Singer, M., Totiger, T.M., Chaudhry, S., Geyer, M., Alencar, A., Linley, A.J., Palomba, M.L., Coombs, C.C., Park, J.H., Zelenetz, A., Roeker, L., Rosendahl, M., Tsai, D.E., Ebata, K., Brandhuber, B., Hyman, D.M., Aifantis, I., Mato, A., Taylor, J., Abdel-Wahab, O., 2022.** Mechanisms of Resistance to Noncovalent Bruton’s Tyrosine Kinase Inhibitors. *New England Journal of Medicine*. **386**(8), 735–743. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2114110>

- Wang, F., Marshall, C.B., Yamamoto, K., Li, G.-Y., Plevin, M.J., You, H., Mak, T.W., Ikura, M.**, 2008. Biochemical and Structural Characterization of an Intramolecular Interaction in FOXO3a and Its Binding with p53. *Journal of Molecular Biology*. **384**(3), 590–603. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.025>
- Wawrzyniak, E., Kotkowska, A., Blonski, J.Z., Siemieniuk-Rys, M., Ziolkowska, E., Giannopoulos, K., Robak, T., Korycka-Wolowiec, A.**, 2014. Clonal evolution in CLL patients as detected by FISH versus chromosome banding analysis, and its clinical significance. *European Journal of Haematology*. **92**(2), 91–101. <https://doi.org/10.1111/ejh.12215>
- Welinder, E., Mansson, R., Mercer, E.M., Bryder, D., Sigvardsson, M., Murre, C.**, 2011. The transcription factors E2A and HEB act in concert to induce the expression of FOXO1 in the common lymphoid progenitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **108**(42), 17402–17407. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111766108>
- Winkler, D., Schneider, C., Kröber, A., Pasqualucci, L., Lichter, P., Döhner, H., Stilgenbauer, S.**, 2005. Protein expression analysis of chromosome 12 candidate genes in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia*. **19**(7), 1211–1215. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403778>
- Wist, M., Meier, L., Gutman, O., Haas, J., Endres, S., Zhou, Y., Rösler, R., Wiese, S., Stilgenbauer, S., Hobeika, E., Henis, Y.I., Gierschik, P., Walliser, C.**, 2020. Noncatalytic Bruton's tyrosine kinase activates PLC γ 2 variants mediating ibrutinib resistance in human chronic lymphocytic leukemia cells. *Journal of Biological Chemistry*. **295**(17), 5717–5736. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011946>
- Woyach, J., Huang, Y., Rogers, K., Bhat, S.A., Grever, M.R., Lozanski, A., Doong, T.-J., Blachly, J.S., Lozanski, G., Jones, D., Byrd, J.C.**, 2019. Resistance to Acalabrutinib in CLL Is Mediated Primarily By BTK Mutations. *Blood*. **134**(Supplement_1), 504–504. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-127674>

- Woyach, J.A., Furman, R.R., Liu, T.-M., Ozer, H.G., Zapatka, M., Ruppert, A.S., Xue, L., Li, D.H.-H., Steggerda, S.M., Versele, M., Dave, S.S., Zhang, J., Yilmaz, A.S., Jaglowski, S.M., Blum, K.A., Lozanski, A., Lozanski, G., James, D.F., Barrientos, J.C., Lichter, P., Stilgenbauer, S., Buggy, J.J., Chang, B.Y., Johnson, A.J., Byrd, J.C.,** 2014. Resistance Mechanisms for the Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib. *New England Journal of Medicine*. **370**(24), 2286–2294. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1400029>
- Woyach, J.A., Ruppert, A.S., Guinn, D., Lehman, A., Blachly, J.S., Lozanski, A., Heerema, N.A., Zhao, W., Coleman, J., Jones, D., Abruzzo, L., Gordon, A., Mantel, R., Smith, L.L., McWhorter, S., Davis, M., Doong, T.-J., Ny, F., Lucas, M., Chase, W., Jones, J.A., Flynn, J.M., Maddocks, K., Rogers, K., Jaglowski, S., Andritsos, L.A., Awan, F.T., Blum, K.A., Grever, M.R., Lozanski, G., Johnson, A.J., Byrd, J.C.,** 2017. *BTK*^{C481S}-Mediated Resistance to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. **35**(13), 1437–1443. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.2282>
- Xie, L., Ushmorov, A., Leithäuser, F., Guan, H., Steidl, C., Färbinger, J., Pelzer, C., Vogel, M.J., Maier, H.J., Gascoyne, R.D., Möller, P., Wirth, T.,** 2012. FOXO1 is a tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. **119**(15), 3503–3511. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-381905>
- Yalcin, S., Zhang, X., Luciano, J.P., Mungamuri, S.K., Marinkovic, D., Vercherat, C., Sarkar, A., Grisotto, M., Taneja, R., Ghaffari, S.,** 2008. Foxo3 Is Essential for the Regulation of Ataxia Telangiectasia Mutated and Oxidative Stress-mediated Homeostasis of Hematopoietic Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry*. **283**(37), 25692–25705. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800517200>
- Yusuf, I., Zhu, X., Kharas, M.G., Chen, J., Fruman, D.A.,** 2004. Optimal B-cell proliferation requires phosphoinositide 3-kinase-dependent inactivation of FOXO transcription factors. *Blood*. **104**(3), 784–787. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3071>
- Zenz, T., Gribben, J.G., Hallek, M., Döhner, H., Keating, M.J., Stilgenbauer, S.,** 2012. Risk categories and refractory CLL in the era of chemoimmunotherapy. *Blood*. **119**(18), 4101–4107. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-312421>

Zhai, Y., Tang, Q., Fang, D.D., Deng, J., Zhang, K., Wang, Q., Yin, Y., Fu, C., Xue, S.-L., Li, N., Zhou, F., Yang, D., 2023. Lisafoclax in Combination with Alrizomadlin Overcomes Venetoclax Resistance in Acute Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia: Preclinical Studies. *Clinical Cancer Research*. **29**(1), 183–196. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-0978>