

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Tesis Doctoral

**Análisis de la heterogeneidad molecular y la  
evolución clonal en la leucemia linfática crónica  
mediante la combinación de tecnologías  
genómicas y transcriptómicas de alto  
rendimiento**

Resumen en castellano

Supervisores:

Prof. Dr. Jesús María Hernández Rivas  
Dra. Ana Eugenia Rodríguez-Vicente  
Dra. M<sup>a</sup> Rocío Benito Sánchez

**María Hernández Sánchez**

**2017**





D. **Jesús María Hernández Rivas**, Doctor en Medicina, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, Médico Adjunto del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca e Investigador del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca,

D.<sup>a</sup> **Ana Eugenia Rodríguez Vicente**, Doctora por la Universidad de Salamanca e investigadora del Centro de Investigación del Cáncer e Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca,

D.<sup>a</sup> **María del Rocío Benito Sánchez**, Doctora por la Universidad de Salamanca e investigadora del Centro de Investigación del Cáncer e Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca,

#### **CERTIFICAN:**

Que D.<sup>a</sup> **María Hernández Sánchez**, licenciada en Biotecnología por la Universidad de Salamanca, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral titulado "*Analysis of the molecular heterogeneity and disease evolution in chronic lymphocytic leukemia by combining high-throughput genomic and transcriptomic technologies*", y que éste reúne, a nuestro juicio, las condiciones de originalidad y calidad científica requeridas para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor, con mención "Doctor Internacional", por la Universidad de Salamanca.

La tesis doctoral ha sido escrita en inglés y, de acuerdo con la normativa de la Universidad de Salamanca para la obtención del título de Doctor, la doctoranda presenta un resumen significativo en castellano de la misma.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Salamanca, a 28 de febrero de 2017.

Fdo.:

Prof. Dr. Jesús M. Hernández Rivas

Dra. Ana E. Rodríguez Vicente

Dra. M. Rocío Benito Sánchez



# Índice

<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<b>Resultados</b>	<b>7</b>
<b>Capítulo 1:</b> MiRNA expression profile of chronic lymphocytic leukemia patients with 13q deletion	9
<b>Capítulo 2:</b> A low frequency of losses in 11q chromosome is associated with better outcome and lower rate of genomic mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia	13
<b>Capítulo 3:</b> <i>TET2</i> overexpression in chronic lymphocytic leukemia is unrelated to the presence of <i>TET2</i> variations	19
<b>Capítulo 4:</b> Analysis of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia from diagnosis to symptomatic disease using whole-exome sequencing	23
<b>Conclusiones</b>	<b>25</b>
<b>Referencias</b>	<b>29</b>



# Introducción





La leucemia linfática crónica (LLC) es un tipo de síndrome linfoproliferativo crónico que se caracteriza por la presencia de  $\geq 5 \times 10^9/L$  linfocitos B clonales en sangre periférica durante al menos más de tres meses. Es una enfermedad heterogénea con gran variabilidad clínica. El curso de los pacientes puede ser desde muy indolente con una esperanza de vida cercana a la normal hasta una enfermedad que progresa rápidamente dirigiendo a una muerte temprana.<sup>1-5</sup> Los análisis de secuenciación masiva a gran escala (NGS) han revelado una clara evidencia de la heterogeneidad genética entre pacientes que puede conducir el curso clínico variable de la enfermedad.<sup>6,7</sup> En este sentido, el uso de técnicas moleculares de alto rendimiento puede contribuir a un mejor conocimiento de las bases moleculares que subyacen tras la heterogeneidad clínica en la LLC.

En los últimos años se han realizado grandes avances que han permitido la identificación de nuevos factores pronósticos de aplicación en la práctica clínica para el manejo de los pacientes.<sup>8</sup> Entre los marcadores biológicos destacan las alteraciones citogenéticas que tienen un papel importante en la predicción del curso clínico permitiendo estratificar los enfermos con LLC en diferentes subgrupos con diferente pronóstico atendiendo a la alteración citogenética que presenten evaluada mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH).<sup>9</sup> Las alteraciones más frecuentes corresponden a la pérdida de 13q14, seguidas de la pérdida de 11q22-23, las trisomías del cromosoma 12 y la pérdida de 17p13. Sin embargo, existen diferencias clínicas incluso dentro de estos subgrupos citogenéticos bien definidos. En particular, varios estudios han demostrado que la delección de 13q (13q-), tradicionalmente asociada con un pronóstico favorable, representa un grupo heterogéneo de pacientes con diferente pronóstico dependiendo del porcentaje de células con esta alteración cromosómica.<sup>10-14</sup> Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen tras esta heterogeneidad clínica no se conocen completamente. Como la región delecionada en 13q incluye microRNAs (miRNAs),<sup>15</sup> la evaluación del perfil de expresión de miRNAs podría mostrar nuevas evidencias biológicas que expliquen la variabilidad clínica observada en este subgrupo de LLCs. Además, teniendo en cuenta que la cuantificación del número de células con una alteración genética tiene valor pronóstico,<sup>10-14,16-19</sup> sería interesante evaluar el impacto pronóstico del porcentaje de células con otras alteraciones citogenéticas como la delección en 11q (11q-) para mejorar el pronóstico de los pacientes con LLC. La delección de 11q normalmente implica la pérdida del gen *ATM*<sup>20</sup> que está implicado en la reparación del daño al DNA y su deficiencia causa inestabilidad genómica.<sup>21</sup> Por ello, la heterogeneidad clínica

observada en este subgrupo de enfermos con LLC podría ser un reflejo de su heterogeneidad genética.

La aparición de las técnicas de NGS ha transformado el conocimiento de las bases moleculares de las neoplasias hematológicas con el descubrimiento de nuevos genes mutados, algunos de ellos afectando comúnmente a diferentes enfermedades.<sup>22</sup> Además, se desconoce la influencia que tienen las mutaciones genéticas en la expresión génica. Por tanto, un análisis integrativo de los mecanismos transcriptómicos así como del estado mutacional de los genes podría ser de gran utilidad para el estudio de la LLC, especialmente en genes con un papel importante en otras enfermedades hematológicas.

Las técnicas de NGS han descrito también grandes cambios clonales a nivel genético durante el curso de la enfermedad.<sup>6,23</sup> De hecho, se considera que la evolución clonal, definida por adquisición o selección de clones tumorales, es un proceso clave durante la progresión y recaída de la LLC.<sup>6,24-26</sup> La aparición de mutaciones *drivers* acompañadas de cambios genéticos *passengers* es esencial para entender la transformación desde el diagnóstico de una enfermedad estable hasta estados posteriores clínicamente más agresivos. Sin embargo, no se conocen completamente los eventos genéticos que pueden guiar la evolución clonal durante la progresión clínica previa a cualquier terapia.

Por todo ello, la combinación de las diferentes tecnologías moleculares de alto rendimiento a nivel transcriptómico y genómico como los *arrays* de expresión y la NGS nos permitirá conocer mejor la desregulación de la expresión de miRNAs y el estado mutacional de los enfermos en cada subgrupo. La integración de estos estudios moleculares permitirá explicar mejor los mecanismos biológicos que subyacen tras la heterogeneidad clínica y la evolución en los pacientes diagnosticados de LLC.

# Resultados



## MiRNA expression profile of chronic lymphocytic leukemia patients with 13q deletion

María Hernández-Sánchez<sup>1</sup>, Ana E. Rodríguez-Vicente<sup>1</sup>, José-Ángel Hernández<sup>2</sup>, Eva Lumbreras<sup>1</sup>, María-Eugenia Sarasquete<sup>1</sup>, Ana-África Martín<sup>1</sup>, Rocío Benito<sup>1</sup>, Carlos Vicente-Gutiérrez<sup>1</sup>, Cristina Robledo<sup>1</sup>, Natalia de las Heras<sup>3</sup>, Juan-Nicolás Rodríguez<sup>4</sup>, Miguel Alcoceba<sup>1</sup>, Alfonso García de Coca<sup>5</sup>, Carlos Aguilar<sup>6</sup>, Marcos González<sup>1</sup>, Jesús-María Hernández-Rivas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hematology Department, Centro de Investigación del Cáncer, IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

<sup>2</sup>Hematology Department, Hospital Universitario Infanta Leonor, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Hematology Department, Hospital Virgen Blanca, León, Spain

<sup>4</sup>Hematology Department, Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, Spain

<sup>5</sup>Hematology Department, Hospital Clínico Universitario, Valladolid, Spain

<sup>6</sup>Hematology Department, Hospital Santa Bárbara, Soria, Spain

*Leuk Res.* 2016 Jul;46:30-6. doi: [10.1016/j.leukres.2016.04.008](https://doi.org/10.1016/j.leukres.2016.04.008)

PubMed PMID: 27111859





## Introducción

Los pacientes con LLC que presentan un porcentaje alto de células 13q- ( $\geq 80\%$ , 13q-A) tienen un pronóstico peor que los casos con pocas pérdidas 13q ( $< 80\%$ , 13q-B). Aunque se ha descrito un perfil de expresión génica característico en los pacientes 13q-A, el perfil de expresión de miRNAs no ha sido analizado.

## Objetivos

Analizar el perfil de expresión de miRNAs en los linfocitos B de enfermos con LLC y 13q- según el porcentaje de células 13q- mediante microarrays de miRNAs y caracterizar los mecanismos biológicos responsables de la heterogeneidad clínica observada en este subgrupo de pacientes de LLC.

## Pacientes y métodos

Se analizó el perfil de expresión de miRNAs de los linfocitos B de 38 pacientes con LLC al diagnóstico (14 eran 13q-A; 13 eran 13q-B; 11 eran FISH normal) y 6 donantes sanos con el *array* GeneChip Micro 3.0 (Affymetrix). Los resultados se confirmaron mediante TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems). Los miRNAs más desregulados se validaron en una serie independiente de 18 pacientes de LLC (10 eran 13q-A y 8 eran 13q-L). El análisis funcional *in silico* mediante la herramienta bioinformática Ingenuity Pathway Analysis (IPA Ingenuity Systems) permitió identificar los genes dianas de los miRNAs. Se validaron las dianas génicas mediante PCR-semicuantitativa (SYBRgreen PCR).

## Resultados

1. El análisis de la expresión de los miRNAs de los linfocitos B clonales de los enfermos con LLC y 13q- reveló un perfil de expresión de 76 miRNAs diferencialmente expresados: 41 infra y 38 sobreexpresados. El análisis bioinformático funcional *in silico* identificó que 18 de estos 76 miRNAs tenían dianas experimentalmente validadas. En total, 344 genes estarían regulados por miRNAs.
2. En los pacientes 13q-A destacaba la infraexpresión de miR-143 (segundo miRNA más infraexpresado después de miR-181) y la sobreexpresión de miR-155 (miRNA con más dianas validadas). La desregulación de ambos afecta a importantes genes que podrían condicionar una disminución de la apoptosis (*BCL2*, *MDM2*, *TP53INP1*) y mayor proliferación celular (*KRAS*, señalización de PI3K-AKT) en los 13q-A.

3. Los miRNAs localizados en 13q14, miR-15a y miR-16-1, estaban significativamente infraexpresados en las LLC con pérdidas bialélicas de 13q respecto a las LLCs con pérdidas monoalélicas. Además, la infraexpresión fue notablemente mayor en los casos que tenían >80% de células 13q- con pérdidas bialélicas.

4. Se observó un total de 381 miRNAs diferencialmente expresados en LLC *versus* controles sanos. Destacaba la sobreexpresión de miR-155 en LLCs, que a su vez, mostraba un nivel de expresión mayor en los 13q-A que en los 13q-B, y que en LLCs con FISH normal ( $P<0.001$ ). La sobreexpresión de este miRNA está relacionada con un peor pronóstico en LLC.

### **Conclusiones**

Los enfermos con un porcentaje alto de células 13q- presentan un perfil de expresión de miRNAs característico. Destacan la infraexpresión de miR-143 y la sobreexpresión de miR-155 relacionados con menor apoptosis y mayor proliferación celular en las LLC con 13q-A. Este estudio aporta nuevas evidencias biológicas que ayudan a entender las diferencias clínicas descritas entre los dos subgrupos de LLC y 13q-.



## A low frequency of losses in 11q chromosome is associated with better outcome and lower rate of genomic mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia

José Ángel Hernández\*<sup>1</sup>, María Hernández-Sánchez\*<sup>2</sup>, Ana Eugenia Rodríguez-Vicente<sup>2</sup>, Vera Grossmann<sup>3</sup>, Rosa Collado<sup>4</sup>, Cecilia Heras<sup>1</sup>, Anna Puiggros<sup>5</sup>, Ana África Martín<sup>6</sup>, Noemí Puig<sup>6</sup>, Rocío Benito<sup>2</sup>, Cristina Robledo<sup>2</sup>, Julio Delgado<sup>7</sup>, Teresa González<sup>8</sup>, José Antonio Queizán<sup>9</sup>, Josefina Galende<sup>10</sup>, Ignacio de la Fuente<sup>11</sup>, Guillermo Martín-Núñez<sup>12</sup>, José María Alonso<sup>13</sup>, Pau Abrisqueta<sup>14</sup>, Elisa Luño<sup>15</sup>, Isabel Marugán<sup>16</sup>, Isabel González-Gascón<sup>1</sup>, Francesc Bosch<sup>14</sup>, Alexander Kohlmann<sup>3,17</sup>, Marcos González<sup>2,6</sup>, Blanca Espinet<sup>5</sup>, Jesús María Hernández-Rivas<sup>2,6,18</sup>, Grupo Cooperativo EspaHematológica (GCECGH) and Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC)

<sup>1</sup>Hematology Department, Hospital Universitario Infanta Leonor, Universidad Complutense de Madrid, Spain; <sup>2</sup>IBSAL, IBMCC, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca, CSIC, Hospital Universitario de Salamanca, Spain; <sup>3</sup>MLL Munich, Germany; <sup>4</sup>Hematology Department, Hospital General, Valencia, León, Spain; <sup>5</sup>Pathology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Hematology Department, Hospital Universitario, Salamanca, Spain; <sup>7</sup>Hematology Department, Hospital Clinic I Provincial, Barcelona, Spain; <sup>8</sup>Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Santiago de Compostela, Spain; <sup>9</sup>Hematology Department, Hospital General, Segovia, Spain; <sup>10</sup>Hematology Department, Hospital del Bierzo, Ponferrada, Spain; <sup>11</sup>Hematology Department, Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid, Spain; <sup>12</sup>Hematology Department, Hospital Virgen del Puerto, Plasencia, Cáceres, Spain; <sup>13</sup>Hematology Department, Hospital Río Carrión, Palencia, Spain; <sup>14</sup>Hematology Department, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; <sup>15</sup>Hematology Department, Hospital Central de Asturias, Oviedo, Spain; <sup>16</sup>Hematology Department, Hospital Clínico, Valencia, Spain; <sup>17</sup>AstraZeneca, Personalized Healthcare and Biomarkers, Innovative Medicines, Macclesfield, United Kingdom; <sup>18</sup>Department of Medicine, Universidad de Salamanca, Spain

\*These authors contributed equally to this work



## Introducción

Las alteraciones citogenéticas detectadas mediante FISH permiten definir grupos citogenéticos con diferente pronóstico. Entre ellas, la pérdida en 11q se asocia con un curso de la enfermedad desfavorable. Sin embargo, la presencia de una alteración citogenética no determina por sí sola el pronóstico de los enfermos de LLC. Por otra parte, la delección en 11q implica la pérdida del gen *ATM*, implicado en la reparación de daño de ADN y cuya deficiencia causa inestabilidad genética.

## Objetivos

1. Analizar si el porcentaje de células con 11q- en pacientes con LLC influye en la supervivencia global (SG) y en el tiempo hasta el primer tratamiento (TPT).
2. Caracterizar el estado mutacional de *ATM*, *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *MYD88*, *FBXW7*, *XPO1* y *BIRC3* en pacientes con LLC y 11q- mediante NGS para profundizar en los mecanismos genéticos responsables de la variabilidad clínica observada en este subgrupo de pacientes de LLC

## Pacientes y métodos

Se analizaron 2493 pacientes registrados en la Base de Datos de los Grupos Españoles de Citogenética (GCECGH) y de LLC (GELLC). Se disponía de información de FISH de las sondas 13q14, 12p11.1-q11, 11q22/ATM y 17p13/P53 (Vysis/AbbottCo, Abbott Park). Se analizó el estado mutacional de un panel de genes (*ATM*, *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *MYD88*, *FBXW7*, *XPO1* y *BIRC3*) mediante NGS de amplicones (454, Roche Applied Science) en 25 pacientes con LLC 11q-.

## Resultados

1. Un total de 242 pacientes (9,7%) presentaban 11q- de los que se analizaron 197 casos (151 hombres, mediana de edad: 65 años). El 61% estaban en estadio Binet A. La mediana de TPT de pacientes con 11q- fue de 25 meses y la SG de 106 meses. En los enfermos con un porcentaje de pérdidas de 11q <40% (55 casos, 26%) (11q-B), el TPT fue significativamente mayor que los pacientes con un alto porcentaje de células 11q- (44 meses *versus* 19 meses,  $P<0,0001$ ). Otras variables asociadas con un mayor TPT fueron estadio Binet A ( $P=0,024$ ), ausencia de linfadenopatía (<2 áreas,  $P<0,0001$ ), ausencia de esplenomegalia ( $P=0,045$ ), bajos niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) ( $P=0,045$ ) y beta-2 microglobulina

( $\beta 2M$ ) ( $P=0,019$ ), bajos niveles de expresión de CD38 ( $P=0,023$ ) y ZAP70 ( $P=0,025$ ), mutaciones somáticas de la cadena pesada de inmunoglobulinas (*IGHV*) ( $P<0,0001$ ). En el análisis multivariante, sólo el porcentaje de células con 11q- ( $P=0,001$ ), *IGHV* mutado ( $P=0,005$ ), estadio Binet A ( $P=0,023$ ) y ausencia de linfadenopatía ( $P=0,016$ ) mantenían la significancia. La SG en los enfermos con un porcentaje de pérdidas de 11q  $<40\%$  fue significativamente mayor que en los casos con un alto número de pérdidas de 11q (mediana no alcanzada *versus* 90 meses,  $P=0,006$ ). Otras variables asociadas con mayor SG fueron Binet A ( $P=0,001$ ), enfermedad asintomática ( $P=0,034$ ), ausencia de hepatomegalia ( $P=0,025$ ) o esplenomegalia ( $P<0,0001$ ), linfocitos  $<20 \times 10^9/L$  ( $P=0,032$ ), bajos niveles de LDH ( $P<0,0001$ ) o  $\beta 2M$  ( $P<0,0001$ ).

2. Los análisis de NGS mostraron que el 32% (8/25) de los pacientes con 11q- tenían mutaciones de *ATM*. Estas mutaciones se distribuyeron desde el exón 3 al 60 afectando a los dominios FAT y PI3K. La carga mutacional fue de 14,3% (2,0-92,5%). De las 14 mutaciones, 8 tenían una carga mutacional menor al 15%, por lo que no habrían sido detectadas mediante Sanger. No se observaron diferencias en cuanto a TPT y OS entre pacientes 11q- con o sin mutaciones de *ATM*. En cuanto al resto de genes (*TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *MYD88*, *FBXW7*, *XPO1* y *BIRC3*), se detectaron un total de 20 mutaciones: 8 pacientes con mutaciones de *SF3B1* (32%), 5 con *NOTCH1* mutado (20%), cuatro con *TP53* mutado (16%), 2 con *XPO1* mutado (8%) y sólo un paciente con mutación de *BIRC3* (4%). La carga mutacional fue de 27% (3,0-81%). Se observaron diferencias significativas sólo en TPT en pacientes con o sin mutaciones de *NOTCH1* (5 *versus* 36 meses,  $P=0,031$ ) y en SG en pacientes con o sin mutaciones de *TP53* (1 *versus* 197 meses,  $P=0,003$ ).

3. Mientras que la incidencia de mutaciones de *ATM* fue similar en ambos subgrupos de LLC con 11q- atendiendo al porcentaje de células alteradas, al considerar las mutaciones en todos los genes analizados, se observó que un menor número de pacientes del subgrupo de 11q-B tenían mutaciones genéticas en comparación con el subgrupo de enfermos 11q-A. De manera interesante, las mutaciones de *TP53* asociadas con mal pronóstico sólo se detectaron en el subgrupo de enfermos con un alto porcentaje de células 11q-.

## Conclusiones

El porcentaje de células con 11q- puede ayudar a definir mejor el pronóstico de este subgrupo citogenético de enfermos con LLC. Un menor número de pérdidas de 11q

se asocia con mayores TPT y SG. La presencia de un número más bajo de mutaciones genéticas se asocia con un menor porcentaje de células con delección en 11q, lo que sugiere una menor inestabilidad genética en este subgrupo de pacientes con LLC.



## **TET2 overexpression in chronic lymphocytic leukemia is unrelated to the presence of TET2 variations**

# 3

María Hernández-Sánchez<sup>1</sup>, Ana Eugenia Rodríguez<sup>1</sup>,  
AlexanderKohlmann<sup>2</sup>, Rocío Benito<sup>1</sup>, Juan Luis García<sup>3</sup>, Alberto  
Risueño<sup>4,5</sup>, Encarna Fermiñán<sup>6</sup>, Javier de las Rivas<sup>5</sup>, Marcos  
González<sup>1,7</sup>, Jesús-María Hernández-Rivas<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup>IBSAL, IBMCC, Centro de Investigación del Cáncer, IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca, Spain

<sup>2</sup>Department of Molecular Genetics, MLL Munich Leukemia Laboratory, Munich, Germany

<sup>3</sup>Instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León (IESCSCYL) and Hospital Clínico Universitario de Salamanca (HUSAL), Salamanca, Spain

<sup>4</sup>Celgene Institute for Translational Research Europe (CITRE), Sevilla, Spain

<sup>5</sup>Unidad de Bioinformática y Genómica Funcional, IBMCC, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca, Spain

<sup>6</sup>Unidad de Genómica, IBMCC, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca, Spain

<sup>7</sup>Servicio de Hematología y Departamento de Medicina, Hospital Clínico Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

*Biomed Res Int.* 2014;2014:814294. doi: [10.1155/2014/814294](https://doi.org/10.1155/2014/814294)

PubMed PMID: 246935





## Introducción

La presencia de mutaciones en el gen *TET2* es un hallazgo frecuente en neoplasias mieloides. Además, se ha descrito que *TET2* tiene su mayor expresión en granulocitos y en los granulocitos de los síndromes mielodisplásicos (SMD) está infraexpresado respecto a controles sanos, independientemente de la presencia de mutaciones de *TET2*. Sin embargo, las alteraciones en *TET2* se han estudiado menos en procesos linfoides. Por ello, nuestro estudio tiene como objetivo analizar la expresión y las mutaciones de *TET2* en la LLC.

## Objetivo

Evaluar el papel de *TET2* en la LLC analizando su expresión génica y la presencia de variaciones mediante la combinación de *microarrays* de expresión y NGS en linfocitos B clonales de pacientes de LLC.

## Pacientes y Métodos

Se analizaron 48 muestras de LLC y 6 controles sanos. Se separaron los linfocitos B con bolas magnéticas anti-CD19 (Miltenyi Biotec). Se analizó el perfil de expresión génica mediante el microarray Human Exon 1.0 (Affymetrix). Los resultados se confirmaron mediante PCR cuantitativa. El análisis mutacional se realizó mediante secuenciación masiva con dos metodologías: 1) NimbleGen Sequence Capture para enriquecer el ADN en secuencias específicas del gen *TET2* en 8 LLCs; 2) Secuenciación por amplicones de la región codificante de *TET2* en 24 LLCs. En ambas estrategias se aplicó la plataforma de Roche GS FLX Titanium. Como método de validación se utilizó la secuenciación Sanger.

## Resultados

1. El análisis del perfil de expresión génica reveló una sobreexpresión de *TET2* en las células B de las LLCs respecto de los linfocitos B de donantes sanos ( $P=0,004$ ). Los resultados se confirmaron con PCR cuantitativa ( $P=0,033$ ). La expresión de *TET2* en la fracción tumoral (células CD19+) y la fracción no tumoral (CD19-) demostró que, en donantes sanos, las células CD19- presentaban mayor expresión de *TET2* que las células CD19+. Por el contrario, en LLCs se observó más expresión de *TET2* en células CD19+ que en la fracción CD19- ( $P=0,002$ ).

2. Para determinar si la expresión de *TET2* podría estar relacionada con la presencia de variaciones genéticas, se realizaron estudios de secuenciación masiva. No se observó ninguna mutación no descrita en *TET2* en LLC. Además, los estudios de secuenciación masiva confirmaron que *TET2* es un gen muy polimórfico. La mayoría de polimorfismos se localizan en los exones 3 y 11. No se observó correlación entre la presencia de variaciones y la expresión de *TET2*.

## **Conclusiones**

*TET2* se sobreexpresa en los linfocitos B clonales de los enfermos con LLCs respecto a las células B de donantes sanos. Los niveles de expresión de *TET2* son diferentes dependiendo del tipo celular. En las LLC, *TET2* se sobreexpresa en la fracción tumoral respecto de la fracción no tumoral. La sobreexpresión de *TET2* no está relacionada con la presencia de variaciones de este gen.

*Resumen del capítulo 4*

## **Analysis of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia from diagnosis to symptomatic disease using whole-exome sequencing**

# 4

María Hernández-Sánchez<sup>1</sup>, Ana E Rodríguez<sup>1</sup>, María Abáigar<sup>1</sup>, David Tamborero<sup>2</sup>, Rocío Benito<sup>1</sup>, Miguel Quijada<sup>1</sup>, Ana-África Martín, Alfonso García de Coca<sup>3</sup>, Nuria López-Bigas<sup>2</sup>, Jesús-María Hernández-Rivas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hematology Department, IBSAL, IBMCC-Cancer Research Center, Hospital Universitario Salamanca, University of Salamanca, Salamanca, Spain

<sup>2</sup>Research Program on Biomedical Informatics, IMIM Hospital del Mar Medical Research Institute and Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Hematology Department, Hospital Clínico Universitario of Valladolid, Valladolid, Spain

*Manuscrito en preparación*



## **Conclusiones**



1. Los pacientes con LLC que tienen delección de 13q como única alteración citogenética mostraron un perfil de expresión de miRNA diferente atendiendo al número de células con 13q-. Así, los linfocitos B clonales de los pacientes con LLC y un alto número de pérdidas de 13q mostraron una infraexpresión del miR-143 y sobreexpresión del miR-155, lo que puede conducir a una menor apoptosis y mayor proliferación. Estos resultados aportan nuevos conocimientos sobre los mecanismos transcriptómicos que subyacen a la variabilidad en el curso clínico entre los pacientes con LLC y 13q- y mejoran nuestro entendimiento sobre el curso clínico desfavorable de los pacientes con LLC y alta carga de células 13q-.
2. Los pacientes con delección en 11q representan un grupo heterogéneo y el número de células con esta alteración está relacionado con su pronóstico. Los pacientes con un bajo número de pérdidas en 11q (<40%) se caracterizan por mostrar una supervivencia global y un tiempo hasta el primer tratamiento mayor que los casos con un alto porcentaje de células 11q-.
3. Un número menor de pacientes con bajo porcentaje de células con pérdidas en 11q mostraron mutaciones genéticas comparado con el subgrupo de enfermos con un alto número de células 11q-. Diferencias clínicas observadas en este subgrupo de LLCs con 11q- podrían deberse a la heterogeneidad genética relacionada con el estado mutacional.
4. Un análisis integrativo de *arrays* de expresión génica y secuenciación masiva reveló sobreexpresión del gen *TET2* en linfocitos B clonales en pacientes con LLC pero no se observaron mutaciones somáticas en las regiones codificantes de este gen, sugiriendo que el gen *TET2* podría ser un nuevo candidato involucrado en la LLC. Estos datos sugieren que sería interesante profundizar en el conocimiento de la desregulación de *TET2* en la LLC.
5. La secuenciación del exoma completo de muestras de LLC pareadas antes de recibir tratamiento mostraron una mayor heterogeneidad intratumoral en los pacientes con LLC con una enfermedad progresiva que los casos con una LLC clínicamente estable. La evolución de la enfermedad está acompañada de la aparición o selección de mutaciones *drivers* como las mutaciones de *TP53*, *BIRC3* y *CARD11*, confirmando que la evolución clonal es un evento clave en la progresión de la LLC.





## Referencias



- 1 Chiorazzi, N., Rai, K. R. & Ferrarini, M. Chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* **352**, 804-815, doi:10.1056/NEJMra041720 (2005).
- 2 Hallek, M. *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* **111**, 5446-5456, doi:10.1182/blood-2007-06-093906 (2008).
- 3 Kipps, T. J. *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews. Disease primers* **3**, 17008, doi:10.1038/nrdp.2017.8 (2017).
- 4 Rozman, C. & Montserrat, E. Chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* **333**, 1052-1057, doi:10.1056/NEJM199510193331606 (1995).
- 5 Swerdlow, S. H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375-2390, doi:10.1182/blood-2016-01-643569 (2016).
- 6 Landau, D. A. *et al.* Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* **526**, 525-530, doi:10.1038/nature15395 (2015).
- 7 Puente, X. S. *et al.* Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, doi:10.1038/nature14666 (2015).
- 8 Rai, K. R. & Jain, P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. *American journal of hematology* **91**, 330-340, doi:10.1002/ajh.24282 (2016).
- 9 Dohner, H. *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* **343**, 1910-1916, doi:10.1056/NEJM200012283432602 (2000).
- 10 Dal Bo, M. *et al.* 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes, chromosomes & cancer* **50**, 633-643, doi:10.1002/gcc.20885 (2011).
- 11 Hernandez, J. A. *et al.* A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica* **94**, 364-371, doi:10.3324/haematol.13862 (2009).
- 12 Puiggros, A. *et al.* Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion. *British journal of haematology* **163**, 47-54, doi:10.1111/bjh.12479 (2013).
- 13 Van Dyke, D. L. *et al.* A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology* **148**, 544-550, doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07982.x (2010).
- 14 Van Dyke, D. L. *et al.* The Dohner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. *British journal of haematology*, doi:10.1111/bjh.13933 (2016).
- 15 Calin, G. A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 15524-15529, doi:10.1073/pnas.242606799 (2002).
- 16 Gonzalez-Gascon, Y. M. I. *et al.* A high proportion of cells carrying trisomy 12 is associated with a worse outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Hematological oncology*, doi:10.1002/hon.2196 (2015).
- 17 Jain, P. *et al.* High FISH percentage of deletion 11q in patients with chronic lymphocytic leukemia is an independent predictor of adverse outcome. *American journal of hematology*, doi:10.1002/ajh.23978 (2015).
- 18 Marasca, R. *et al.* Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone. *Hematological oncology* **31**, 88-95, doi:10.1002/hon.2028 (2013).
- 19 Tam, C. S. *et al.* De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood* **114**, 957-964, doi:10.1182/blood-2009-03-210591 (2009).
- 20 Austen, B. *et al.* Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood* **106**, 3175-3182, doi:10.1182/blood-2004-11-4516 (2005).
- 21 Stankovic, T. & Skowronska, A. The role of ATM mutations and 11q deletions in disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma* **55**, 1227-1239, doi:10.3109/10428194.2013.829919 (2014).

- 22 Goodwin, S., McPherson, J. D. & McCombie, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature reviews. Genetics* **17**, 333-351, doi:10.1038/nrg.2016.49 (2016).
- 23 Schuh, A. *et al.* Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood* **120**, 4191-4196, doi:10.1182/blood-2012-05-433540 (2012).
- 24 Burger, J. A. *et al.* Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nature communications* **7**, 11589, doi:10.1038/ncomms11589 (2016).
- 25 Rose-Zerilli, M. J. *et al.* Longitudinal copy number, whole exome and targeted deep sequencing of 'good risk' IGHV-mutated CLL patients with progressive disease. *Leukemia* **30**, 1301-1310, doi:10.1038/leu.2016.10 (2016).
- 26 Smith, E. N. *et al.* Genetic and epigenetic profiling of CLL disease progression reveals limited somatic evolution and suggests a relationship to memory-cell development. *Blood cancer journal* **5**, e303, doi:10.1038/bcj.2015.14 (2015).

