

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LA LEUCEMIA MIELOIDE
AGUDA CON TRANSLOCACIÓN t(8;16)(p11;p13) Y
REORDENAMIENTO *MYST3-CREBBP*

Tesi presentada per
Mireia Camós Guijosa
per aspirar al grau de Doctora en Medicina

Director de la tesi Dr. Jordi Esteve i Reyner

Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona
Tutor de la tesi: Prof. Emili Montserrat i Costa

Barcelona, 2007

□ *discusión*

IV. DISCUSIÓN

□ *discusión*

Los trabajos que integran esta tesis han permitido profundizar en el conocimiento biológico de la LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP*, una entidad infrecuente, escasamente conocida desde el punto de vista biológico. En este sentido, la mayoría de los casos publicados corresponden a casos aislados incluidos en series extensas de leucemias, y ocasionalmente se han estudiado pequeñas series de casos de esta variedad (Giles et al, 1997; Panagopoulos et al, 2003; Schmidt et al, 2004). El análisis de los casos definidos por la t(8;16), como los que conforman la presente tesis, muestran una serie de características comunes que sugieren un sustrato biológico común, diferenciado del resto de leucemias. Hasta el momento de iniciar nuestros trabajos se habían estudiado desde el punto de vista molecular pocos casos de LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP*, y no se había abordado el estudio genómico de estas leucemias.

En nuestros trabajos diseñamos una técnica para el análisis rápido del reordenamiento, estudiamos los puntos de ruptura más frecuentes de los genes implicados y describimos un perfil de expresión génica específico de este subtipo de leucemia.

Detección molecular de la LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP*

La detección de la LMA con t(8;16) se ha basado en estudios citogenéticos, bien mediante el análisis convencional del cariotipo o bien mediante la técnica de *FISH*. La única técnica de RT-PCR para la confirmación del reordenamiento *MYST3-CREBBP* utilizada hasta el momento (Panagopoulos et al, 2000) consistía en una PCR que utilizaba unos oligonucleótidos situados en el exón 16 de *MYST3* y el exón 5 de *CREBBP*. Con esta técnica se buscaba la amplificación de un fragmento de ADNc de gran tamaño (>1000 pares de bases). La amplificación de fragmentos de ADNc de 1000 bases es difícil, en particular en muestras antiguas o en muestras procedentes de tejido histológico, en las que el RNA puede estar parcialmente degradado y dar lugar a una ausencia de amplificación (falsos negativos). Por ello, en el primer trabajo diseñamos una estrategia de amplificación mediante RT-PCR, utilizando unos oligonucleótidos en el exón 16 de *MYST3* y el exón 3 de *CREBBP*, la zona donde se encuentra el punto de ruptura, lo que limitaba a 212 pares de bases el fragmento de ADNc a amplificar. Con esta estrategia esperábamos reducir el número de falsos negativos de la técnica.

De esta manera, la aplicación de la estrategia de RT-PCR permitía identificar de forma rápida los casos cuyas características fueran sugestivas de corresponder a esta entidad. Entre dichas características cabe mencionar una presentación clínica muy abrupta, frecuentemente en pacientes con antecedentes del uso de quimioterapia; una coagulopatía grave; una diferenciación mielomonocítica con presencia de hemofagocitosis, junto con

un perfil inmunofenotípico característico CD34-, HLA-DR+, con expresión de marcadores monocíticos y de CD56. Así, mediante RT-PCR se detectó el reordenamiento *MYST3-CREBBP* en dos de nuestros pacientes sin información citogenética valorable, en un caso por falta de metafases y en el segundo por la presencia de necrosis medular, fenómeno no extraordinario en estas leucemias. Por otro lado, en la literatura se ha descrito un caso de LMA caracterizado por una inv(8)(p11q24) en el cariotipo convencional, pero con la demostración del reordenamiento *MYST3-CREBBP* (Chaffanet et al, 1999), por lo que la posibilidad de un reordenamiento críptico no detectable en el estudio citogenético convencional debe descartarse en los casos sospechosos. Por tanto, la implementación de la nueva técnica de RT-PCR puede ser útil para el diagnóstico molecular rápido de esta entidad, ya sea para confirmar el reordenamiento observado en el estudio citogenético o bien como único método de detección en aquellos casos con citogenética no informativa.

El transcrito tipo I es el más común en la LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP*

Por otro lado, el análisis molecular de nuestros casos mediante RT-PCR y posterior secuenciación nos permitió estudiar los puntos de ruptura de los genes implicados en la translocación. De este modo, pudimos observar, en todos los casos analizados, la presencia del denominado transcrito tipo I del gen quimérico *MYST3-CREBBP*. En este transcrito el punto de ruptura se localiza en el intrón 16 de *MYST3*, una región de 2389 pares de bases que contiene diferentes elementos repetitivos y, por otra parte, en el intrón 2 de *CREBBP*. En este sentido, se ha sugerido que el intrón 16 de *MYST3* podría ser

una región inestable proclive a reordenarse. Como alternativa, podría pensarse que sólo las alteraciones en el intrón 16 darían lugar a proteínas híbridas funcionales (Panagopoulos et al, 2003). Del mismo modo, en el resto de leucemias en las que *MYST3* se encuentra reordenado, es decir, en los casos de *inv(8)/MYST3-TIF2* y *t(8;22)/MYST3-EP300*, los puntos de ruptura se han localizado también en el intrón 16 de *MYST3* (Panagopoulos et al, 2003). De forma similar, en un caso de *t(10;16)* con reordenamiento *MYST4-CREBBP* se demostró que el punto de ruptura se encontraba en el intrón 16 del gen *MYST4* y en el intrón 2 de *CREBBP* (Panagopoulos et al, 2001); cabe recordar que el gen *MYST4* presenta una alta homología con el gen de la misma familia *MYST3*. Por el contrario, el punto de ruptura del gen *CREBBP* no es el mismo en todos los subtipos de leucemias: en las quimeras con *MYST3* o *MYST4* se produce en la mayoría de casos en el intrón 2, mientras que en las leucemias con *t(11;16)* y formación del gen *MLL-CREBBP*, el punto de ruptura de *CREBBP* se encuentra en una zona más distal, en los intrones 3 y 4 (Panagopoulos et al, 2003).

Los puntos de ruptura de *MYST3-CREBBP* podrían ser una zona de acción preferente de la enzima topoisomerasa II

Nuestra serie de pacientes con LMA y reordenamiento *MYST3-CREBBP* incluía 3 casos de leucemias secundarias, tras recibir tratamiento con inhibidores de topoisomerasas II (adriamicina en dos casos y etopósido en el tercero), por diferentes neoplasias primarias. En estos casos secundarios hallamos también el denominado transcrito tipo I del gen quimérico *MYST3-CREBBP*. En la literatura se ha descrito que más de un tercio de los casos de

LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP* se presentan de forma secundaria, tras recibir tratamiento con inhibidores de topoisomerasa II, y típicamente tras un intervalo de tiempo entre la quimioterapia y la aparición de la leucemia inferior a los 2 años (Bernasconi et al, 2000). Aunque no se conocen con exactitud aquellas secuencias de ADN (*hot spots*) donde es más probable que actúe la topoisomerasa II, algunos trabajos han identificado mediante secuenciación posibles zonas de unión a la topoisomerasa II en los puntos de ruptura de translocaciones en leucemias *de novo* y secundarias con reordenamiento de *MLL*, *RUNX1-RUNX1T1*, *PML-RAR α* y *NUP98* (Mistry et al, 2005). De esta manera, aunque los *hot spots* pueden situarse en diferentes puntos del genoma, sólo las translocaciones que confieren una ventaja proliferativa a un progenitor hematopoyético conducirán a una leucemia. De acuerdo con lo anterior, la alta frecuencia de LMA-*MYST3-CREBBP* secundaria, junto con el hallazgo de unos puntos de ruptura cromosómicos recurrente en la mayoría de casos, sugiere que la zona de ruptura de *MYST3*, de *CREBBP* o de ambos puede constituir un lugar de acción preferente de la topoisomerasa II, aunque no disponemos de estudios funcionales para confirmarlo. En el año 2003 Panagopoulos et al caracterizaron a nivel de ADN genómico cuatro casos de reordenamiento *MYST3-CREBBP* y observaron secuencias de ADN repetitivas en las regiones de ruptura (Panagopoulos et al, 2003). Como hipótesis, podríamos pensar que el intrón 16 de *MYST3* o el intrón 2 de *CREBBP* son una zona con una propensión a experimentar reordenamientos, posiblemente con zonas *hot spot* para la acción de la topoisomerasa II, y que la adición de inhibidores de topoisomerasa II aumenta la toxicidad a estos niveles y favorece la aparición de la t(8;16) secundaria.

La LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP* posee un perfil de expresión génica característico

En el análisis no supervisado comprobamos que los casos de LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP* presentaban un perfil genómico homogéneo, claramente diferenciado al observado en los otros subtipos de LMA. En el dendrograma se observaron dos ramas principales, que segregaban los casos con una diferenciación monocítica del resto de muestras. Dentro de la rama monocítica se identificaban tres subclases, constituidas por a) el agrupamiento de casos *MYST3-CREBBP* positivos; b) los casos de inv(16) y c) el resto de muestras monocíticas sin marcador molecular definido. Por tanto, en este análisis se confirma que el reordenamiento *MYST3-CREBBP* confiere a estas leucemias una individualidad biológica, con una firma genética distintiva, pero con un perfil de expresión parcialmente similar al del resto de muestras con diferenciación monocítica.

Genes característicos de la LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP*

Por otra parte, abordamos el análisis supervisado utilizando diferentes métodos comparativos. Por un lado intentamos identificar aquellos genes con una expresión diferencial en la LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP* respecto al resto de leucemias. Por otra parte, también nos interesó descubrir semejanzas en cuanto a la expresión génica de la LMA-*MYST3-CREBBP* con alguno de los otros subtipos de leucemia.

En primer lugar, observamos un grupo de genes altamente característicos de las LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP*; estos genes incluían genes relacionados con la transcripción, reparación de ADN y apoptosis, así como los oncogenes *RET* y *prolactina (PRL)*, que ya habían sido involucrados en la leucemogénesis. La proteína PRL, involucrada en la vía JAK-STAT, tiene múltiples funciones, que incluyen el control del crecimiento y la regulación inmune (Bole-Feysot et al, 1998). Además, interviene en diversas enfermedades autoinmunes y diferentes tipos de cáncer. En este sentido, se había descrito su expresión en casos aislados de leucemia aguda con diferenciación monocítica (Hatfill et al, 1990; Kooijman et al, 2000; Ales et al, 2001). A su vez, *RET* es un protooncogen que se expresa durante la diferenciación mielomonocítica normal, y cuya expresión se ha asociado a la presencia de marcadores monocíticos y la expresión aberrante de CD56 en la LMA (Gattei et al, 1998; Gattei et al, 1999). Este patrón inmunofenotípico es similar al encontrado en nuestra serie de LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP*. Además, el gen *RET* fue además uno de los más característicos de uno de los grupos (*cluster* número 16) de leucemias definidos según su expresión génica, en el trabajo ya mencionado de Valk et al (Valk et al, 2004). Aunque la expresión de *RET* podría atribuirse meramente a la diferenciación monocítica de las muestras, nuestros casos de LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP* mostraron una expresión de este gen claramente superior a la observada en el resto de leucemias monocíticas. La proteína RET funciona como receptor tirosin-quinasa y se expresa durante la embriogénesis en las células de la cresta neural y en los sistemas nervioso y urogenital. Se han

descrito múltiples mutaciones germinales y somáticas del gen *RET* a nivel de los exones 8 a 16 causantes de diferentes enfermedades, como la denominada *multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2)* y el carcinoma de tiroides (Hubner et al, 2006). Sin embargo, en el contexto de las leucemias agudas, no se había descrito la presencia de mutaciones de *RET* (Visser et al, 1997). Tras observar una sobreexpresión de *RET* en nuestra serie de pacientes con reordenamiento *MYST3-CREBBP* analizamos la posible presencia de mutaciones en los exones 8 a 16 del gen *RET* en nuestra serie de pacientes, pero tan sólo hallamos polimorfismos neutrales en los casos estudiados, lo que descartaba la mutación como mecanismo subyacente de la sobreexpresión del gen.

Similitudes de la LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP* y las leucemias con reordenamiento de *MLL*

Se seleccionaron aquellos genes con una expresión similar en las LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP* y en alguno de los otros subtipos de leucemia, con la intención de identificar posibles vías comunes de leucemogénesis o bien estadios similares de diferenciación. El mayor número de genes fueron expresados en común con las leucemias de diferenciación monocítica.

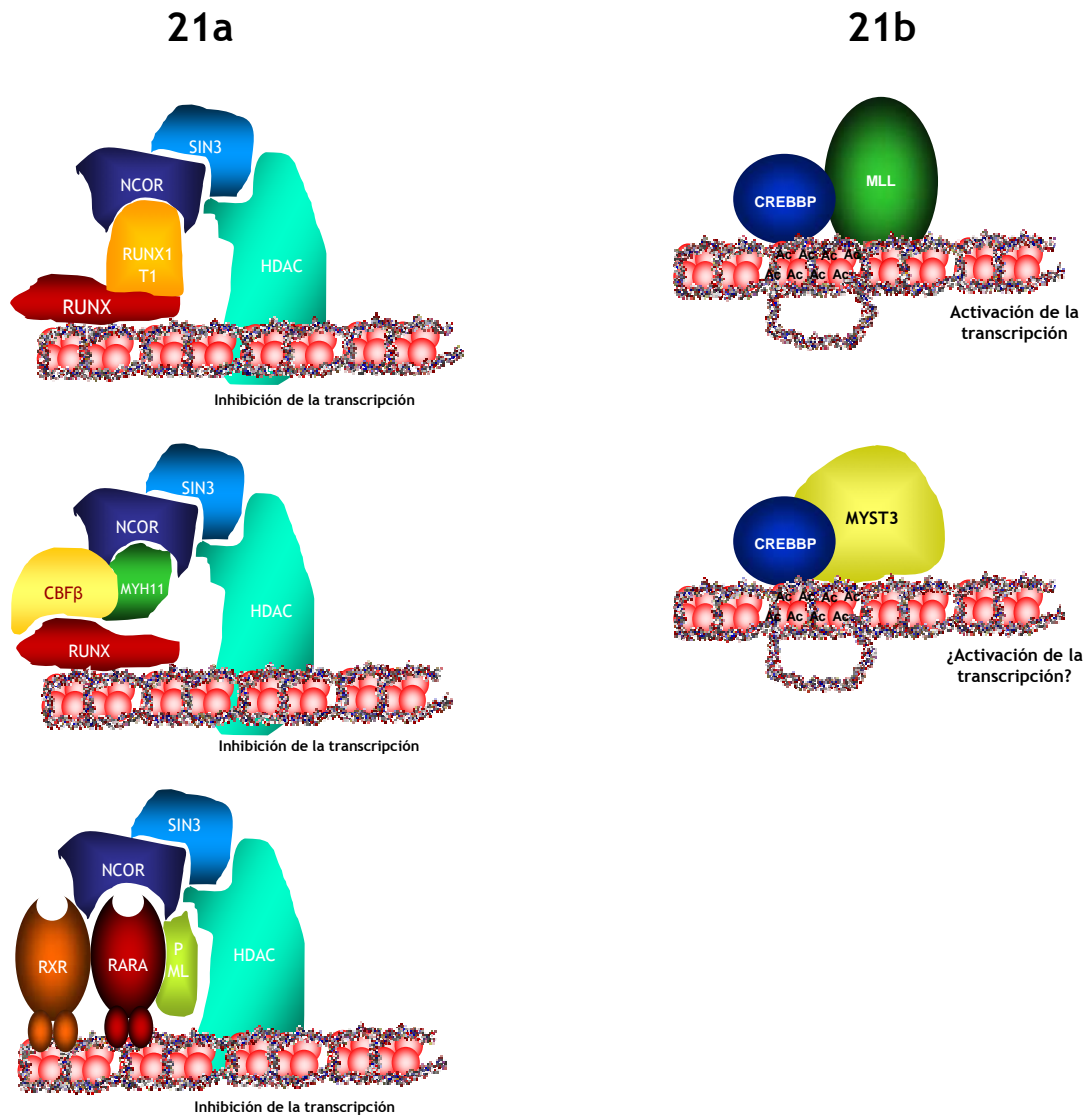
El estudio del perfil de expresión génica de las LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP* mostró algunas similitudes con el perfil descrito para las leucemias con reordenamiento del gen *MLL*. Así, observamos que los casos de LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP* presentaban altos niveles de los genes *HOXA9*, *HOXA10*, *MEIS1* y *FLT3*, todos ellos genes sobreexpresados

típicamente en las leucemias con reordenamiento de *MLL*. Además, en nuestros casos de *LMA-MYST3-CREBBP* observamos la sobreexpresión de otros genes como *AKR7A2*, *PBX3*, *NICAL* o *IRAKB1*, que también se ha descrito en la literatura en leucemias con reordenamiento de *MLL* (Kohlmann et al, 2005). Por otro lado, las leucemias con reordenamiento *MYST3-CREBBP* presentaron unos elevados niveles de expresión de diversos genes (*RET*, *C20orf103*, *GGA2*, *GAGE*□2, *AKR7A2* y *AK2*) que definían el mencionado *cluster* número 16 del trabajo de Valk y cols. (Valk et al, 2004). Cabe destacar que 5 de los 11 pacientes que constituían aquel *cluster* presentaban alteraciones en el cromosoma 11q23. A pesar de que en el estudio por microarrays no pudimos incluir casos de *LMA* con reordenamiento de *MLL*, conseguimos completar el análisis mediante RT-PCR cuantitativa de diversos casos de *LMA* con diferentes reordenamientos de *MLL*, de manera que confirmamos un perfil de expresión génica parcialmente similar para las *LMA* con reordenamiento *MYST3-CREBBP* y las leucemias *MLL* positivas.

Estas similitudes de las leucemias con reordenamiento *MYST3-CREBBP* y las *LMA* con reordenamiento del gen *MLL* podrían sugerir o bien un origen en una célula progenitora en el mismo estadio de diferenciación, o bien una coincidencia en el mecanismo de leucemogénesis, en el cual la proteína de fusión aberrante, *MYST3-CREBBP* o las quimeras de *MLL*, producirían una activación de la transcripción a través de un mecanismo de ganancia de función, que a su vez llevaría a una inadecuada expresión de determinados genes diana, como pueden ser los genes *HOX* (figura 21b). Este mecanismo contrastaría con la represión transcripcional y posterior bloqueo del programa

de diferenciación mieloide normal que provocan las proteínas quiméricas que afectan al CBF y la proteína *PML-RARα* en la LPA (figura 21a).

Figura 21. Posibles diferentes mecanismos de represión y activación de la transcripción en las LMA-CBF y LPA (figura 21a) y las LMA con reordenamiento de *MLL-CREBBP* y *MYST3-CREBBP* (figura 21b).



La LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP* posee un perfil de expresión de genes *HOMEBOX* específico

En el análisis genómico observamos que los casos de LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP* presentaron un perfil característico de expresión de genes *HOX*, de forma que los genes *HOXA9* y *HOXA10* mostraban un nivel muy elevado de expresión, mientras que existía una baja expresión del resto de genes *homeobox*. Este perfil contrastaba con el de los casos que presentaban reordenamiento de *MLL*, que mostraban una sobreexpresión global de genes *HOX*, y también era diferente del perfil de las LMA consideradas de buen pronóstico (LMA-CBF y las LPA), las cuales mostraron una baja expresión de todos los genes *HOX*.

Tanto *MYST3* como *CREBBP* se han relacionado con los genes *homeobox*. En este sentido, se demostró en un estudio en el pez cebra que el gen *Moz* (homólogo al humano *MYST3* o *MOZ*) juega un papel en la regulación de los genes *homeobox* probablemente a través de su actividad HAT (Miller et al, 2004). Por ello, estos autores sugirieron que una expresión alterada de los genes *HOX* podría desempeñar un papel en la leucemogénesis en las quimeras de *MYST3*.

Por otro lado, otro estudio demostró una interacción entre diversas proteínas *HOX* y *CREBBP*. Sin embargo, las proteínas *HOX* no constituyen sustratos biológicos para la acción de *CREBBP* (Shen et al, 2001). En el sentido contrario, se observó que las proteínas *HOX* eran capaces de inhibir la

actividad HAT de CREBBP, mediante una unión directa o bien mediante un aumento de la concentración de proteínas HOX en regiones cercanas a la cromatina por interacciones HOX-ADN; de este modo, las proteínas HOX liberadas por complejos de ADN podrían inhibir las concentraciones locales de CREBBP y p300, lo que daría lugar a una represión de la transcripción génica local (Shen et al, 2001). En la LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP*, en la que hemos observado una disminución de los niveles de *CREBBP* y un aumento de algunos genes *HOX*, podría producirse una inhibición de la transcripción mediada por *CREBBP* a través de este mecanismo.

Limitaciones del estudio y perspectivas futuras

La frecuencia de aparición de la LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP* es baja, de forma que no existen en la literatura grandes series de estos casos. En esta tesis se recogen las características de una serie de 7 pacientes con este subtipo de leucemias, lo que constituye una de las mayores series documentadas para esta entidad. Sin embargo, sólo pudimos analizar el perfil global de expresión génica con técnica de microarray en tres casos de LMA con reordenamiento *MYST3-CREBBP* debido a la degradación parcial del material disponible. Aún así, la técnica de RT-PCR mediante arrays de baja densidad permitió ampliar el análisis al total de casos de la serie (7 pacientes), al recuperar muestras procedentes de parafina y ARN parcialmente degradado. Además, este segundo análisis permitió validar los resultados en una serie independiente de leucemias con diversas alteraciones moleculares, y estudiar con un mayor número de muestras los diferentes subtipos existentes de LMA.

Sin embargo, debido a la naturaleza infrecuente de la enfermedad, el abordaje de otros estudios que pudieran clarificar algunos aspectos relevantes de estas leucemias, como pudiera ser una mejor definición del pronóstico de estos casos, debería realizarse en el ámbito de un grupo cooperativo. Por otro lado, estudios funcionales podrían indudablemente mejorar el conocimiento de las vías afectadas por la proteína quimérica MYST3-CREBBP.

A modo de resumen, podemos concluir que el reordenamiento *MYST3-CREBBP* confiere a este subtipo de leucemia unas características biológicas distintivas, fundamentalmente un perfil de expresión génica específico, con la sobreexpresión de diversos oncogenes y de determinados genes *homeobox*. Por otro lado, el análisis genómico mostró algunas similitudes con las leucemias que presentan un reordenamiento del gen *MLL*, lo que sugiere un mecanismo de leucemogénesis parcialmente compartido por ambos tipos de leucemia, claramente diferenciado del de otras categorías de LMA, como las LMA-CBF y las LPA.

□ *discusión*