

# Técnicas genéticas y moleculares en leucemia aguda

COORDINADORES: J. M. HERNÁNDEZ. *Salamanca*  
B. ESPINET. *Barcelona*

## Presentación

El desarrollo de las técnicas moleculares ha producido avances considerables en el diagnóstico de las leucemias agudas (LA) y ha posibilitado un mejor diagnóstico de estos procesos, lo que está permitiendo el desarrollo de tratamientos específicos de estos procesos. Algunas de las LA se caracterizan por presentar alteraciones citogenéticas recurrentes y mutaciones génicas bien caracterizadas. Sin embargo, otra parte importante tienen cariotipos normales y ausencia de mutaciones de los genes implicados en estas patologías, como pueden ser FLT3, NPM, CEBPA, KIT, MLL, NRAS y KRAS, entre otros. Por esta razón, es muy importante la aplicación de nuevas técnicas genéticas que permitan un mejor conocimiento de estas patologías. De hecho, la aplicación de las metodologías de secuenciación masiva ha demostrado la presencia de mutaciones de nuevos genes tanto en leucemias agudas como crónicas.

Este simposio consta de tres ponencias que versan sobre la aplicación de distintas técnicas genéticas en leucemias agudas.

En primer lugar, la doctora Norma Carmen Gutiérrez, del Hospital Universitario y del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca, abordará las técnicas de interferencia del RNA en la investigación biológica de las leucemias agudas. La interferencia del RNA (RNAi) es un proceso biológico por el que moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA) inducen una degradación del mRNA específica de secuencia. Además del silenciamiento de la expresión génica inducida por moléculas exógenas de dsRNA (generalmente de origen viral), la ruta de RNAi es también responsable del silenciamiento de mRNAs por pequeñas moléculas de RNA endógenas llamadas microRNAs que se generan mediante procesos enzimáticos a partir de precursores de RNA de doble cadena que adoptan una estructura de horquilla. La RNAi no solo ha tenido un profundo efecto sobre los estudios de regulación génica sino que también ha llevado al desarrollo de nuevas clases de agentes terapéuticos basados en dsRNA. La trascendencia del descubrimiento de la RNAi fue reconocida con el premio Nobel de Medicina de 2006 otorgado a sus descubridores, Andrew Fire y Craig Mello.

En segundo lugar, el Dr. Alexander Kohlmann, del MLL Münchner Leukämielabor de Munich, discutirá las aplicaciones de la técnica de ultrasecuenciación en neoplasias hematológicas, centrándose en leucemias agudas y neoplasias mieloproliferativas. El laboratorio MLL está en la primera línea de los estudios de microarrays de expresión y de la ultrasecuenciación aplicados al estudio de las hemopatías malignas en Europa. Su interés se centra en explorar estas nuevas metodologías de análisis masivo del genoma en el diagnóstico y pronóstico de las leucemias. El Dr. Kohlmann explicará hallazgos recientes que indican la posible utilidad de las técnicas de secuenciación masiva en la rutina diaria del laboratorio de hematología tanto en LA como en síndromes mielodisplásicos. Los primeros estudios publicados han permitido descubrir nuevas mutaciones génicas en los genes IDH1 y DNMT3A en LA y SMD, entre otros avances.

Finalmente, la Dra. María Dolores Odero, del Centro de Investigación en Medicina Aplicada de Pamplona, hablará sobre la función de las fosfatasa en el proceso de regulación de las vías de señalización importantes en el desarrollo de los procesos tumorales. La implicación de las fosfatasa en las leucemias ha sido mucho menos analizada que otros enzimas como las tirosina kinasas. Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha han determinado que las fosfatasa pudieran estar reprimidas en las leucemias agudas mieloblásticas por lo que el incremento de su expresión podría ser una nueva diana tumoral que merece ser analizada en detalle en el tratamiento de estos procesos.

## TÉCNICAS DE INTERFERENCIA DEL RNA EN LA INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS

N.C. GUTIÉRREZ, A. AIRES,  
I. MISIEWICZ-KZREMINSKA, D. QUWAIDER,  
J.M. HERNÁNDEZ, J.F. SAN MIGUEL

Servicio de Hematología. Hospital Universitario.  
Salamanca

Centro de Investigación del Cáncer (CIC). Universidad  
de Salamanca-CSIC

### Introducción

La interferencia del RNA (RNAi) es un proceso biológico muy conservado, observado en todos los eucariotas desde levaduras hasta mamíferos, por el que moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA) inducen una degradación del mRNA específica de secuencia. La ruta de RNAi se descubrió en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, cuando al inyectarle dsRNA se desencadenaba una degradación de los RNA mensajeros (mRNA) que contenían la misma secuencia que los dsRNA<sup>1</sup>. En nematodos, insectos y plantas la RNAi funciona como mecanismo de defensa frente a material genético foráneo como es el caso de dsRNA virales, que tras ser procesados enzimáticamente en moléculas más cortas llamadas *small-interfering RNA* (siRNA) inducen una respuesta de RNAi<sup>2</sup>. Además del silenciamiento de la expresión génica inducida por moléculas exógenas de dsRNA (generalmente de origen viral), la ruta de RNAi es también responsable del silenciamiento de mRNAs por pequeñas moléculas de RNA endógenas llamadas *micro-RNAs*, que se generan por procesos enzimáticos a partir de precursores de RNA de doble cadena que adoptan una estructura de horquilla. Los *micro-RNAs* se acoplan a las secuencias 3' UTRs (*untranslated region*) de los mRNAs, lo que conduce a una degradación del RNA –si la complementariedad entre las secuencias es total– o a una inhibición de la traducción del mRNA –si la homología es parcial–<sup>3,4</sup>. Por último, la maquinaria de RNAi puede también ejercer un silenciamiento génico transcripcional directo en el núcleo mediante una modificación en el patrón de metilación del DNA y de las histonas, provocando el silenciamiento del gen antes de que llegue incluso a transcribirse (Figura 1)<sup>5</sup>.

La ruta de RNAi puede desencadenarse experimentalmente mediante la introducción

de moléculas de dsRNA en las células. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en los invertebrados, la introducción de dsRNA sintéticos (>30 nt) en las células de mamífero provoca una potente respuesta antiviral mediada por interferón (IFN) que da lugar a una inhibición general de la traducción de proteínas, a una degradación del RNA inespecífica de secuencia y a la expresión de genes proinflamatorios<sup>6</sup>. Este inconveniente puede sortearse mediante la introducción de siRNAs que debido a su corta longitud (21-25 nt) es más difícil que induzcan respuestas mediadas por IFN<sup>7</sup>. Una vez que el siRNA se introduce en el célula, el mRNA disminuye en 24-48 horas y la proteína lo hace habitualmente entre 48 y 72 horas.

Todos estos avances han permitido que la RNAi mediada por siRNA se convierta en una herramienta básica en el campo de la genómica funcional. La RNAi no sólo ha tenido un profundo efecto sobre los estudios de regulación génica sino que también ha llevado al desarrollo de nuevas clases de agentes terapéuticos basados en dsRNA. La trascendencia del descubrimiento de la RNAi fue reconocida con el premio Nobel de Medicina de 2006, otorgado a sus descubridores, Andrew Fire y Craig Mello.

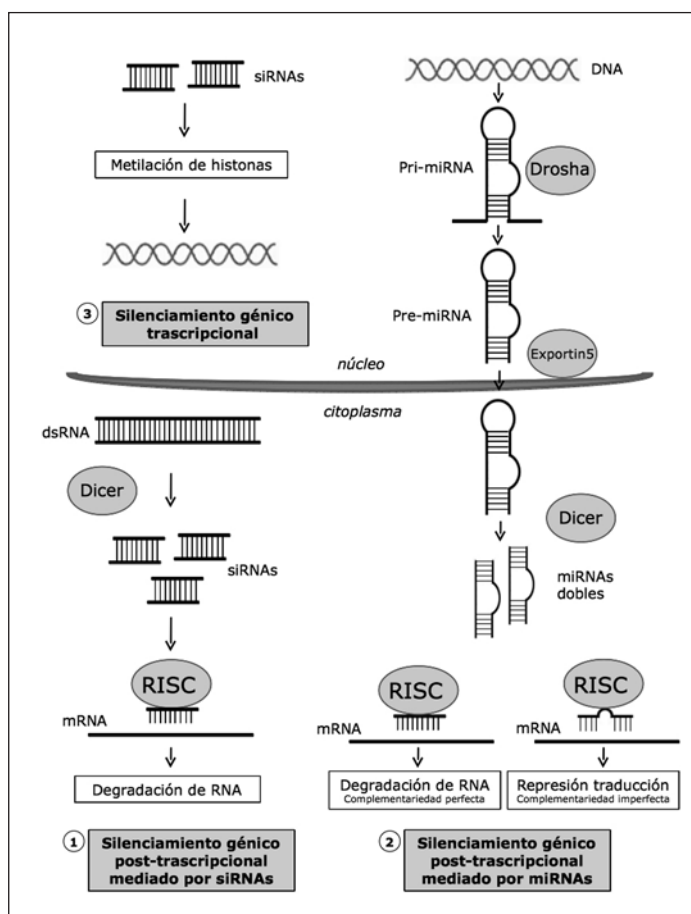


Figura 1. Esquema de la ruta de RNAi.

## Mecanismo de la interferencia del RNA mediado por siRNA

El silenciamiento génico que se produce al degradarse el mRNA cuando se introducen siRNA exógenos en las células se trata de un mecanismo específico ya que se basa en la complementariedad de bases entre la molécula de siRNA y la molécula de mRNA. Los siRNAs sintéticos siguen el mismo recorrido en la ruta RNAi que los siRNAs originados a partir de las moléculas de dsRNA que entran de manera natural en las células. Una vez que la larga cadena doble de dsRNA se introduce en el citoplasma, entra en la ruta de RNAi, donde es reconocida por la enzima Dicer, que la fragmenta en pequeñas moléculas de cadena doble de entre 20 y 25 nucleótidos (siRNAs). Posteriormente los siRNAs se ensamblan en un complejo multiproteico de endorribonucleasas conocido como RISC (RNAi silencing complex). Este complejo separa las dos hebras de la molécula de siRNA de manera que la hebra antisentido sirve para guiar al complejo RISC hacia los mRNA complementarios que van a ser destruidos (Figura 1)<sup>8</sup>. La inhibición de la expresión génica provocada por los siRNAs es fuerte pero transitoria, lo cual dificulta la inhibición de proteínas con una vida media prolongada. Estos inconvenientes se han resuelto mediante la generación de vectores que dirigen la síntesis de siRNA en el interior de la célula. El inserto integrado en el vector se transcribe en shRNAs (*short-hairpin RNA*) que son reconocidos por la enzima Dicer y procesados a siRNAs.

## Limitaciones de la tecnología de RNAi

Aunque es indiscutible que la implantación de las técnicas de silenciamiento génico mediante RNAi ha revolucionado la forma de abordar muchos de los estudios genómicos funcionales, existen algunas limitaciones que merece la pena reseñar.

- La primera afecta a la síntesis química de los siRNA, que aunque es un proceso relativamente sencillo al tratarse de moléculas de pequeño tamaño, no siempre consigue generar secuencias lo suficientemente efectivas.

- Una gran parte del éxito de los experimentos con siRNAs radica en la calidad de la transfección. En este sentido, las células en suspensión como las células de estirpe hematopoyéticas ofrecen cierta resistencia a la transfección con siRNAs.

- Por último, no hay que olvidar que la introducción de moléculas de siRNA en el interior celular puede desencadenar múltiples efectos no deseados, más allá del silenciamiento génico específico; los dos fundamentales son: 1. la activación de respuestas inmunitarias que estimulan la producción de IFN, con el

consecuente aumento de los genes activados por esta citocina; y 2. la inhibición de genes que comparten una homología parcial con el siRNA, debido a que éstos, en ocasiones, funcionan como miRNA que no requieren una complementariedad total para ejercer la represión génica.

## Aspectos metodológicos

A la hora de acometer los experimentos de silenciamiento génico mediante RNAi, hay una serie de requerimientos básicos que hay que tener previstos, y que van a depender fundamentalmente del tipo celular y de la duración deseada del silenciamiento. A continuación se enumeran los más importantes:

1. *Elección del dsRNA específico de un transcrito que desencadene la respuesta de RNAi.* El procedimiento más rápido para lograr una bajada eficiente de un mRNA particular es la utilización de siRNAs sintéticos que son liberados directamente en el interior del citoplasma. Sin embargo, su efecto es transitorio y no suele durar más de siete días. Cuando se requieren silenciamientos prolongados, lo ideal es introducir vectores que contienen DNA que expresa secuencias *short hairpin RNA* (shRNA), que son procesadas a siRNAs dentro de la célula. No obstante, la eficiencia de las transfecciones con shRNAs es generalmente menor que cuando se emplean siRNAs. La ventaja de los shRNA es que pueden cultivar como plásmidos coexpresados con marcadores fluorescentes o con genes resistentes a antibióticos para facilitar la selección de células transfectadas de forma estable.

2. *Método de transfección del dsRNA.* Se pueden clasificar en *virales* y *no virales* (químicos y físicos). La transfección mediada por lípidos, como método químico, y la electroporación, que utiliza pulsos eléctricos cortos para inducir en la membrana celular poros temporales por los que penetran los ácidos nucleicos, como procedimiento físico, son las técnicas no virales más utilizadas. Los métodos virales requieren la infección de las células con los vectores virales y suele ser la única alternativa cuando las células son difíciles de transfectar. La elección de unos u otros depende de múltiples factores, que se resumen en la Tabla 1.

3. *Controles esenciales.* Sin duda este punto es clave para evitar incurrir en resultados ficticios y erróneos. Algunas de las limitaciones descritas en el apartado anterior pueden detectarse y superarse con el uso de los controles apropiados. Es recomendable incluir un control positivo para monitorizar la eficiencia de la transfección, un control negativo para distinguir los efectos específicos de secuencia de los que no lo son, y un control de las células sin manipular para comprobar que la viabilidad no se ve afectada por la transfección y en qué medida se ve alterado el fenotipo celular.

Tabla 1. Comparación de los diferentes métodos de transfección

Métodos	Ventajas	Limitaciones
Químicos (lipofección)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Baja complejidad</li> <li>· Coste bajo</li> <li>· Alta eficiencia en líneas celulares adherentes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Baja eficiencia en células primarias y en suspensión</li> <li>· Citotoxicidad inducida por el agente lipídico</li> </ul>
Físicos (electroporación, nucleofección)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Alta eficiencia en líneas celulares adherentes y en suspensión</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Eficiencia intermedia en células primarias</li> <li>· Coste medio</li> <li>· Elevada mortalidad celular</li> </ul>
Virales (lentivirus, adenovirus, retrovirus)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Alta eficiencia en líneas celulares y en células primarias</li> <li>· Expresión estable</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Muy laborioso</li> <li>· Coste elevado</li> <li>· Requiere medidas de seguridad</li> </ul>

4. *Ensayos para detectar los efectos biológicos conseguidos con el silenciamiento génico.* Además de comprobar la reducción en el mRNA y en la proteína, lo habitual es explorar la repercusión del silenciamiento en las rutas biológicas donde participa el gen reprimido. Los análisis de expresión génica suelen ser muy útiles en este sentido.

#### Aplicación de la técnicas de RNAi al estudio de las leucemias agudas

La utilización de la tecnología de silenciamiento génico basada en RNAi está muy difundida en la investigación de las leucemias agudas. Si bien se acepta que las translocaciones cromosómicas están directamente implicadas en la transformación tumoral de las células hematopoyéticas que desemboca en el desarrollo de las leucemias agudas, no se conoce del todo la función exacta de las proteínas quiméricas resultantes de los reordenamientos cromosómicos en la patogenia de las leucemias. Con el fin de profundizar en esta cuestión, la tecnología de RNAi se ha utilizado para silenciar específicamente la expresión de los productos de fusión de algunas translocaciones cromosómicas. Así, se ha observado que la inhibición mediante siRNAs de la proteína de fusión RUNX1/CBFA2T1 generada por la t(8;21) permite la diferenciación monocítica de los blastos y da lugar a una parada del ciclo celular y una disminución drástica de la capacidad clonogénica<sup>9</sup>. Asimismo, la inhibición transitoria de MLL/AF4, producto de la t(4;11), impide la proliferación mientras que favorece la apoptosis y la diferenciación de las líneas celulares leucémicas<sup>10</sup>. Estos hallazgos no sólo sirven para demostrar el papel central de las proteínas de fusión en la expansión y el mantenimiento de las leucemias agudas, sino que abren las puertas de una futura aplicación de esta tecnología en la terapia antileucémica, con la ventaja de que las proteínas de fusión se expresan exclusivamente en las células leucémicas y su inhibición no provocaría daño en las células normales.

Los estudios de expresión génica mediante *microarrays* han revelado que los distintos subtipos de leucemias agudas, tanto mieloblásticas (LAM) como linfoblásticas (LAL), tienen perfiles de expresión génica característicos<sup>11,12</sup>. El significado del aumento de expresión de los genes incluidos en estas firmas genéticas también puede investigarse mediante técnicas de silenciamiento génico basadas en RNAi. En este sentido, los análisis comparativos de perfiles de expresión génica en LAM y LAL pusieron de manifiesto que el aumento de expresión de los genes *HOX* constituye el mecanismo central de la transformación leucémica por las oncoproteínas MLL. Para averiguar si *HOXA9* ejercía una función esencial en las leucemias agudas con reordenamientos de *MLL* se inhibió su expresión mediante shRNAs en líneas celulares y células primarias de pacientes. La bajada de *HOXA9* dio lugar a una reducción inmediata de la capacidad proliferativa de los blastos, a un aumento de la diferenciación celular y, subsiguientemente, a la progresiva inducción de apoptosis. Este efecto no se vio compensado por otros mecanismos que mantienen la proliferación y supervivencia celular<sup>13,14</sup>. Nuestro grupo ha investigado mediante la tecnología de RNAi el significado de la sobreexpresión del gen *HGF* (factor de crecimiento hepatocítico) de manera exclusiva en las leucemias agudas promielocíticas (LAP) respecto al resto de LAM. Después de silenciar *HGF* en los blastos promielocíticos, se observó una reducción significativa de la proliferación de los promielocitos y un aumento de la diferenciación a granulocitos. Además, el análisis del perfil de expresión génica de los blastos promielocíticos después de silenciar *HGF* reveló una reducción en los niveles de expresión de la trombospodina (*THBS1*) (Figura 2). Estudios previos han demostrado que esta proteína es un importante factor antiangiogénico y que sus niveles disminuyen como consecuencia de la activación de la ruta HGF/MET. También se comprobó que tanto la migración de las células endoteliales como la tubulogénesis desencadenada por la adición del sobrenadante de la línea promielocítica NB4 disminuía de manera significativa cuando se bloqueaba *HGF*. Este

hallazgo demuestra que *HGF* induce angiogénesis en la LAP.

La versatilidad de los métodos basados en RNAi hace posible diseñar librerías que contienen cientos de siRNAs dirigidos a conjuntos de genes implicados en rutas biológicas concretas o a familias de genes. Mediante la utilización de librerías de siRNAs capaces de silenciar todas las cinasas de tirosinas (“kinoma”) se han podido identificar algunas que son indispensables para mantener la viabilidad de las células leucémicas y, por tanto, susceptibles de llegar a ser dianas terapéuticas<sup>15</sup>.

## Conclusiones

La aplicación de la RNAi ha facilitado sustancialmente el análisis funcional de muchos de los oncogenes leucémicos. La combinación de esta metodología con las tecnologías genómicas de alto rendimiento, como el análisis de los perfiles de expresión génica, ha ayudado a comprender algunos de los mecanismos patogénicos de las leucemias agudas y a la identificación de dianas terapéuticas potenciales. Una vez que las técnicas de RNAi han demostrado su extraordinaria utilidad en la supresión de la expresión génica en los modelos experimentales, el siguiente desafío es desarrollar estas estrategias con fines terapéuticos.

## Referencias bibliográficas

1. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391: 806-11.
2. Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*. 1997; 276: 1558-60.
3. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6: 857-66.
4. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs: microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6: 259-69.

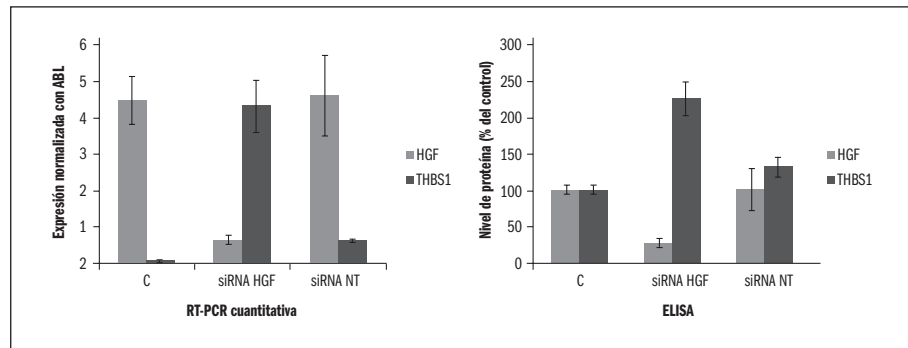


Figura 2. Representación gráfica de los niveles de HGF y THBS1, tanto a nivel de mRNA como de proteína, después de silenciar HGF. siRNA NT: control negativo

5. Ting AH, Schuebel KE, Herman JG, Baylin SB. Short double-stranded RNA induces transcriptional gene silencing in human cancer cells in the absence of DNA methylation. *Nat Genet*. 2005; 37: 906-10.
6. Sledz CA, Williams BR. RNA interference and interferon. *Discov Med*. 2003; 3: 30-1.
7. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001; 411: 494-8.
8. Hannon GJ. RNA interference. *Nature*. 2002; 418: 244-51.
9. Heidenreich O, Krauter J, Riehle H, Hadwiger P, John M, Heil G, et al. AML1/MTG8 oncogene suppression by small interfering RNAs supports myeloid differentiation of t(8; 21)-positive leukemic cells. *Blood*. 2003; 101: 3157-63.
10. Thomas M, Gessner A, Vornlocher HP, Hadwiger P, Greil J, Heidenreich O. Targeting MLL-AF4 with short interfering RNAs inhibits clonogenicity and engraftment of t(4; 11)-positive human leukemic cells. *Blood*. 2005; 106: 3559-66.
11. Gutiérrez NC, López-Pérez R, Hernández JM, Isidro I, González B, Delgado M, et al. Gene expression profile reveals deregulation of genes with relevant functions in the different subclasses of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2005; 19: 402-9.
12. Haferlach T, Kohlmann A, Schnittger S, Dugas M, Hidemann W, Kern W, et al. Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling. *Blood*. 2005; 106: 1189-98.
13. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, Den Boer ML, Minden MD, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet*. 2002; 30: 41-7.
14. Faber J, Krivtsov AV, Stubbs MC, Wright R, Davis TN, van dH-E, et al. HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. *Blood*. 2009; 113: 2375-85.
15. Tyner JW, Deininger MW, Loriaux MM, Chang BH, Gotlib JR, Willis SG, et al. RNAi screen for rapid therapeutic target identification in leukemia patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 8695-700.

## NEXT-GENERATION SEQUENCING APPLICATIONS IN HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES: NEW INSIGHTS INTO THE MOLECULAR HETEROGENEITY OF LEUKEMIAS AND MYELOPROLIFERATIVE DISEASES

A. KOHLMANN

MLL Munich Leukemia Laboratory. Múnich (Alemania)

### Introduction

Massively parallel pyrosequencing in picoliter-sized wells is an innovative next-generation DNA sequencing (NGS) technique that enables highly-sensitive deep-sequencing to detect molecular aberrations<sup>1</sup>. It has become apparent that NGS platforms will have practical applications in clinical diagnostics, and assay such as the detection of *EGFR* mutations in lung adenocarcinoma<sup>2</sup>, characterizing RAS and methylation pathway alterations in myeloproliferative diseases and myeloid leukemias<sup>3-6</sup>, or high-resolution, high-throughput human leukocyte antigen (HLA) genotyping have been developed<sup>7</sup>.

As recently published by various research groups there is already an impact seen from these next-generation sequencing technologies on daily routine workup, both for AML and for MDS patients. In particular, the pivotal first sequencing of an AML genome by Ley and colleagues<sup>8</sup> not only led to the discovery of novel molecular mutations, such as *IDH1* or *DNMT3A*<sup>9,10</sup>, but also provided the experimental basis to be applied to MDS<sup>11</sup>. Further, it was demonstrated that the method of next-generation sequencing can be performed in a clinically relevant time-frame<sup>12</sup>. Also with respect to MDS, next-generation sequencing delineated a previously unrecognized heterogeneity in low-risk MDS, i.e. detecting *TP53* mutations with a median clone size of 11% (range, 1% to 54%) in 18% of patients already at an early phase of the disease<sup>13</sup>.

### Amplicon deep-sequencing assays

Next-generation sequencing is a potential diagnostic platform and, in particular, amplicon deep-sequencing assays have been proposed to be applied in clinical applications. As demonstrated in our proof-of-principle study investigating a cohort of 81 chronic myelomonocytic leukemia patients we are routinely performing now analyses for molecular markers such as *TET2*,

*CBL*, *KRAS*, or *RUNX1* proving the technical feasibility of amplicon deep-sequencing<sup>5</sup>. In its current state, the Titanium chemistry for amplicon sequencing allows to bidirectionally sequence amplicons with a size of approximately 400 bp (454 Life Sciences, Branford, CT). Importantly, with Titanium amplicon sequencing it is also possible to apply 10-base molecular barcode sequences, i.e. so-called MIDs, incorporated into the gene-specific primer sequences. With such an assay design it is possible to achieve a high coverage of PCR amplicons to provide a high sensitivity in detecting molecular mutations for multiple patients per sequencing lane.

Moreover, recent advances in PCR preparation technologies enabled the implementation of even more amplicons per patient but using less input amount of material. In particular, this technology was used to sequence panels of genes in blast crisis CML<sup>4</sup> or chronic myelomonocytic leukemia, also including the novel important biomarker *EZH2*<sup>3</sup>.

Additionally, a methodology had been developed to identify *CEBPA* gene mutations in de novo AML using next generation sequencing. Using standard amplification conditions, GC-rich areas, as particularly prevalent in the coding *CEBPA* sequences do not usually amplify well during the emulsion PCR step. By modifying the emPCR setup Grossmann et al. presented an alternative workflow to increase the amplicon production and coverage of sequencing reads under GC-rich amplicon template conditions. It was further demonstrated that NGS is more sensitive than a standard Sanger-based sequencing approach in terms of detecting low level mutations in a subset of AML cases<sup>14</sup>.

### Detection of novel leukemia-specific fusion genes

Today, the genetic characterization necessary for optimal treatment of leukemias requires a combination of different labor-intensive methods such as chromosome banding analysis, multicolor immunophenotyping and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Characteristic leukemia-specific fusion genes, detected by quantitative real-time RT-PCR or direct sequencing, not only allow stratification of patients into distinct prognostic risk groups, but also serve as molecular markers to monitor minimal residual disease. Recently, Grossmann et al. combined 454 PicoTiterPlate pyrosequencing with long-oligonucleotide sequence capture arrays to evaluate whether this technique permits a comprehensive genetic characterization of a cancer genome. Using acute myeloid leukemias harboring *RUNX1* abnormalities as a model system, three novel chromosomal fusion sequences and *KCNMA1* as a novel *RUNX1* fusion partner gene were detected<sup>15</sup>.

A one-step methodological procedure comprehensively allowed the detection of balanced chromosomal aberrations, including translocations and inversions. Moreover, the genomic representation of only one of the partner genes of a chimeric fusion on the capture platform also permitted identification of the novel fusion partner genes<sup>15</sup>.

### Robustness of amplicon deep-sequencing

Next-generation sequencing (NGS) platforms have evolved to provide an accurate and comprehensive means for the detection of molecular mutations in heterogeneous tumor specimens. However, many facets of this assay need to be taken into account, e.g. the preparation of sequencing libraries with molecular barcodes, specific experimental design options when considering sequencing coverage to calculate diagnostic sensitivity, or the use of suitable software and data processing solutions to obtain accurate results. Still, amplicon deep-sequencing has already demonstrated a promising technical performance that warrants the further development towards a routine application of this technology in diagnostic laboratories so that an impact on clinical praxis can be achieved.

As such, an international consortium investigated the robustness, precision, and reproducibility of amplicon next-generation sequencing (NGS) across 10 laboratories from 8 countries<sup>16</sup>. In the so-called IRON study (Interlaboratory ROBustness of Next-generation sequencing), each participating laboratory had received blinded aliquots of 18 centrally collected patient DNA samples to be processed. This study had used preconfigured 96-well plates containing lyophilized primer pairs targeting genes of interest in hematological malignancies. As a first candidate gene *TET2* was selected, a frequently mutated gene in adult myeloproliferative neoplasms<sup>17</sup>. Additional primer pairs were amplifying hotspot regions of *CBL* and *KRAS*<sup>18,19</sup>. To execute the study, the small volume (SV) 454 Life Sciences Titanium emulsion PCR setup was used<sup>2,20</sup>. This consortium recently reported a high concordance in mutation detection across all laboratories, including a robust detection of novel variants which were undetected by standard Sanger sequencing. Moreover, it demonstrated that amplicon-based deep-sequencing is technically feasible, and allows a broad and in-depth molecular characterization of cancer specimens with high diagnostic sensitivity<sup>16</sup>.

### Conclusion

In conclusion, the utility of amplicon deep-sequencing is widely recognized. This is particularly apparent in a

diagnostic setting where multiple genes or hotspot regions thereof are sequenced in multiple patients in a massively parallel way. Given the total assay run time of approximately four days it is possible to meet the diagnostic requirement of fast turn-around time, as it is mandatory for candidate gene resequencing in myeloid malignancies such as AML or MDS. Moreover, miniaturization and automation of certain assay-steps will allow a reasonable bundling of multiple markers per patient such that high-throughput laboratories will be in a position of offering panels of genes for an individualized approach to diagnose and monitor a patient's disease.

### References

- 1 Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 2010; 11: 31-46.
- 2 Thomas RK, Nickerson E, Simons JF, Janne PA, Tengs T, Yuza Y, et al. Sensitive mutation detection in heterogeneous cancer specimens by massively parallel picoliter reactor sequencing. *Nat. Med.* 2006; 12: 852-5.
- 3 Grossmann V, Kohlmann A, Eder C, Haferlach C, Kern W, Cross NC, et al. Molecular profiling of chronic myelomonocytic leukemia reveals diverse mutations in >80% of patients with *TET2* and *EZH2* being of high prognostic relevance. *Leukemia* 2011; e-pub ahead of print 22 February 2011; doi: 10.1038/leu.2011.10.
- 4 Grossmann V, Kohlmann A, Zenger M, Schindela S, Eder C, Weissmann S, et al. A deep-sequencing study of chronic myeloid leukemia patients in blast crisis (BC-CML) detects mutations in 76.9% of cases. *Leukemia.* 2011; 25: 557-60.
- 5 Kohlmann A, Grossmann V, Klein HU, Schindela S, Weiss T, Kazak B, et al. Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in *TET2*, *CBL*, *RAS*, and *RUNX1*. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 3858-65.
- 6 Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, Lim Z, Gaken J, Lea NC, et al. Next-generation sequencing of the *TET2* gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood.* 2010; 116: 3923-32.
- 7 Holcomb CL, Høglund B, Anderson MW, Blake LA, Bohme I, Egholm M, et al. A multi-site study using high-resolution HLA genotyping by next generation sequencing. *Tissue Antigens.* 2011; 77: 206-17.
- 8 Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature.* 2008; 456: 66-72.
- 9 Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J Med.* 2010; 363: 2424-33.
- 10 Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N. Engl. J Med.* 2009; 361: 1058-66.
- 11 Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillo M, McLellan M, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2011; 25 (7): 1153-8.
- 12 Welch JS, Westervelt P, Ding L, Larson DE, Kline JM, Kulkarni S, et al. Use of whole-genome sequencing to diagnose a cryptic fusion oncogene. *JAMA.* 2011; 305: 1577-84.

- 13 Jadersten M, Saft L, Smith A, Kulasekararaj A, Pomplun S, Gohring G, et al. TP53 Mutations in Low-Risk Myelodysplastic Syndromes With del(5q) Predict Disease Progression. *J Clin Oncol*. 2011.
- 14 Grossmann V, Schnittger S, Schindela S, Klein HU, Eder C, Dugas M, et al. Strategy for robust detection of insertions, deletions, and point mutations in CEBPA, a GC-rich content gene, using 454 next-generation deep-sequencing technology. *J Mol. Diagn*. 2011; 13: 129-36.
- 15 Grossmann V, Kohlmann A, Klein HU, Schindela S, Schnittger S, Dicker F, et al. Targeted next-generation sequencing detects point mutations, insertions, deletions and balanced chromosomal rearrangements as well as identifies novel leukemia-specific fusion genes in a single procedure. *Leukemia*. 2011; 25 (4): 671-80.
- 16 Kohlmann A, Klein HU, Bresolin S, Chaplin T, Cuppens H, Garicochea B, et al. The Interlaboratory ROBustness of Next-Generation Sequencing (IRON) Study: Deep-Sequencing Investigating TET2, CBL, and KRAS Mutations In 4464 Amplicons by An International Group Involving 8 Laboratories. *Blood*. 2010; 116: 1665a.
- 17 Delhommeau F, Dupont S, Della V, V, James C, Trannoy S, Masse A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N. Engl. J Med*. 2009; 360: 2289-301.
- 18 Bowen DT, Frew ME, Hills R, Gale RE, Wheatley K, Groves MJ, et al. RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood*. 2005; 106: 2113-9.
- 19 Dunbar AJ, Gondek LP, O'Keefe CL, Makishima H, Rataul MS, Szpurka H, et al. 250K single nucleotide polymorphism array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous mutations, including novel missense substitutions of c-Cbl, in myeloid malignancies. *Cancer Res*. 2008; 68: 10349-57.
- 20 Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005; 437: 376-80.

## ROLE OF THE PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A) IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA

I. CRISTÓBAL, M.D. ODERO

*División de Oncología. Centro de Investigación Médica (CIMA). Universidad de Navarra. Pamplona*

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous clonal disease that disrupts normal hematopoiesis. Leukemic cells are characterized by a block in differentiation and apoptosis, together with an enhanced proliferation. Despite progressive advances in our understanding of the molecular biology of AML, patient outcomes are still very poor. Complete remission occurs in up to half of the cases; however, relapse is generally expected and prognosis is dismal<sup>1</sup>. Therefore, it is necessary to develop more effective treatment strategies to improve the survival of patients with AML<sup>2</sup>. Cytogenetic aberrations have been reported as the

most important prognostic factors for survival and response to therapy in AML, allowing the identification of molecular markers that have greatly advanced our understanding of leukemogenesis<sup>3</sup>; nevertheless, the nature of alterations responsible for initiation or progression of the disease is mostly unknown. Recent attempts to identify initiating or progression mutations by extensively re-sequencing tyrosine kinase genes<sup>4</sup>, expression profiling studies<sup>5</sup>, array-based CGH and/or SNP<sup>6-7</sup>, and even by unbiased whole-genome sequencing<sup>8</sup>, confirm that AML results from multiple genetic and epigenetic alterations, and suggest that we have not yet discovered most of the relevant aberrations that contribute to the pathogenesis of this disease.

### Protein phosphatase 2A (PP2A)

The unrestricted growth of transformed cells is caused by the cumulative deregulation of multiple cellular pathways involved in normal growth control<sup>9</sup>. Genetic aberrations that lead to constitutively active kinases are widely studied in AML development, and several targeted therapies focused on inhibiting particular kinase oncogenes have been approved for clinical use. However, the role of phosphatases in the transformation of this disease remains underexplored<sup>9</sup>. The ubiquitously expressed protein phosphatase 2A (PP2A) is a major serine/threonine phosphatase that accounts for most of the serine/threonine phosphatase activity in eukaryotic cells, and participates in many mammalian signaling pathways. PP2A is not a single entity but represents a family of heterotrimeric holoenzyme complexes consisting of an active core composed of the scaffold PP2A-A subunit, the catalytic PP2A-C subunit, and a regulatory PP2A-B subunit. There are two closely related isoforms of the PP2A-A (A $\alpha$ /PPP2R1A and A $\beta$ /PPP2R1B), and of the PP2A-C (C $\alpha$ /PPP2CA and C $\beta$ /PPP2CB) subunits<sup>10</sup>. The scaffold subunit mediates interaction of the core dimer with a wide variety of regulatory B subunits that regulate both the specific substrate and the localization of the holoenzyme. Four unrelated families of regulatory B subunits have been identified, including at least 26 different alternative transcripts and splice forms<sup>10</sup>. Therefore, PP2A has the ability to form a variety of specific heterotrimeric complexes that target different substrates, regulating signaling pathways with a key role in cancer development<sup>9-10</sup>.

### PP2A as a human tumor suppressor

PP2A is a human tumor suppressor that inhibits cellular transformation by regulating the activity of several signaling proteins critical for malignant cell behavior. In fact, a variety of mechanisms that inhibit PP2A

are present in transformed cells, including alterations in structural or regulatory PP2A subunits, and also the overexpression of specific endogenous inhibitors<sup>9</sup>. Somatic mutations of the PP2A structural subunits A $\alpha$  and A $\beta$  have been described in several types of cancer, causing a defective binding of the B and C subunits and thus inhibiting PP2A activity<sup>10</sup>. Moreover, suppression of PP2A A $\beta$  expression permits immortalized human cells to achieve a tumorigenic state through the deregulation of Ra1A GTPase activity. Cancer-associated A $\beta$  mutants fail to reverse this tumorigenic phenotype, indicating that these mutants function as null alleles<sup>10</sup>. In addition, both A $\alpha$  mutants and A $\alpha$  downregulation lead to a functional haploinsufficiency that seems to induce human cell transformation by activating AKT/PI3K signaling pathway<sup>10</sup>. However, it is likely that different sets of genetic aberrations during tumor formation require the loss of different PP2A holoenzyme complexes for the tumor progression, and this would involve the regulatory subunits that are playing a key role directing PP2A to dephosphorylate and regulate key tumor suppressors or oncogenes<sup>9</sup>. In this regard, several members of the B56 family of regulatory PP2A subunits appear to have a main role in directing PP2A potential tumor-suppressive activity<sup>10</sup>.

With regard to the endogenous PP2A inhibitors, upregulation of SET by the BCR/ABL oncogene leads to the suppression of PP2A, and contributes to leukemogenesis in chronic myeloid leukemia (CML) and Philadelphia-chromosome positive acute lymphoblastic leukemia (ALL)<sup>11</sup>. In addition, strong evidences showed that CIP2A (*cancerous inhibitor of PP2A*) selectively targets PP2A associated with c-Myc to inhibit its phosphatase activity and protect Ser62 from dephosphorylation. Interestingly, CIP2A expression is upregulated in transformed cell lines and cancer tissue samples<sup>9</sup>, and it seems to be a critical determinant of disease progression in CML at diagnosis<sup>12</sup>. Finally, it has been reported that JAK2 directly phosphorylate PP2A at tyrosine 307 of its catalytic subunit, making PP2A inactive<sup>13</sup>.

---

### PP2A in acute myeloid leukemia

Few studies have investigated the role of PP2A in AML. Gallay et al. reported that the intensity of phospho-Akt on Thr308 in AML was significantly correlated with high-risk cytogenetics, particularly with a complex karyotype, and they found correlation between decreased PP2A activity and Thr308 phosphorylation in this subgroup (7 cases)<sup>14</sup>. Moreover, a recent study shows that activating c-KIT mutations inhibit PP2A, and that reactivation of PP2A effectively suppresses the in vitro and in vivo growth of imatinib-sensitive and imatinib-resistant c-KIT positive cells, indicating

that functional inactivation of PP2A tumor suppressor activity could represent a key step in the induction and maintenance of KIT positive leukemias<sup>15</sup>.

Our group has reported that SETBP1 overexpression is a recurrent event in AML, which impairs PP2A activity via SET and promotes proliferation of AML cells<sup>16</sup>. In addition, we reported that PP2A activity is reduced in both myeloid Ph-negative cell lines and AML patient samples, and that restoration of PP2A activity by forskolin in AML cells blocks proliferation, induces caspase-dependent apoptosis, and affects AKT and ERK1/2 activity<sup>17</sup>. Moreover, we identified deregulated expression of the endogenous PP2A inhibitors CIP2A and SET, together with deregulated expression of the PP2A subunits PPP2R1B, PPP2R5B and PPP2R5C as possible mechanisms of PP2A inhibition in AML. These results are in agreement with a recent report that show that CIP2A overexpression predicts relapse in AML patients<sup>18</sup>; suggesting that CIP2A could be playing a key role in leukemia, probably through PP2A inhibition. More studies are necessary to clarify its importance in AML. Interestingly, we found an additive effect between PP2A activation by forskolin and the chemotherapy reagents Idarubicin and cytosine arabinoside (Ara-c), supporting that treatment with PP2A activators could be a therapeutic target in AML in combination with standard induction therapy<sup>17</sup>. PP2A activators such as FTY720 in CML, ALL and chronic lymphocytic leukemia (CLL), and forskolin in CML, show promising antileukemic effects in both in vitro and in vivo models<sup>11</sup>. Importantly, Neviani et al. (2005) demonstrated that PP2A inactivation in blast crisis CML results from increased expression of SET, which is induced by BCR/ABL in a dose- and kinase-dependent manner and, that like BCR/ABL, SET progressively increases during transition to blast crisis. In fact, imatinib treatment and SET downregulation restored PP2A activity back to normal levels<sup>11</sup>. Our results showed that high expression of SET also leads to PP2A inactivation in AML, independently of BCR/ABL induction.

In conclusion, it has been reported that impaired PP2A activity plays a key role in BCR/ABL positive leukemias such as CML and ALL<sup>11</sup>, in myeloid precursors expressing imatinib-sensitive (V560G) and imatinib resistant (D816V) mutant c-KIT<sup>15</sup>, and also in CLL<sup>19</sup>; moreover, activation of PP2A by either FTY720 or forskolin seems to have promising therapeutic effects in these diseases. In fact, it has been recently reported that FTY720 also reduced proliferation and produced caspase-independent cell death of Ph negative ALL cell lines and patient samples<sup>20</sup>. Our group has reported an impaired PP2A activity via SET as a consequence of SETBP1 overexpression, a recurrent event in AML (27%)<sup>16</sup>. This leads us to hypothesize that PP2A inhibition could be a recurrent event in AML. Our re-

sults in both cell lines and patient samples confirmed this hypothesis and showed that PP2A inhibition plays an important role in AML transformation, since the pharmacologic activation of PP2A in vitro reverse some of the leukemogenic features. Moreover, several PP2A targets have been reported to be deregulated in AML and some of them, as AKT, have been associated with poor outcome<sup>14</sup>; therefore, PP2A inactivation might be one of the events that contribute to these alterations, since PP2A plays an integral role in the regulation of a number of major signaling pathways whose deregulation contribute to cancer<sup>10</sup>. Of note, the knowledge that pharmacologic restoration of PP2A activity is able to antagonize leukemogenesis and has an additive effect with other drugs used in the treatment of AML highlights PP2A as a potential target for future therapies combined with PP2A activators. Therefore, PP2A activators, such as forskolin or FTY720, could represent potential novel therapeutic targets in AML (Figure 1).

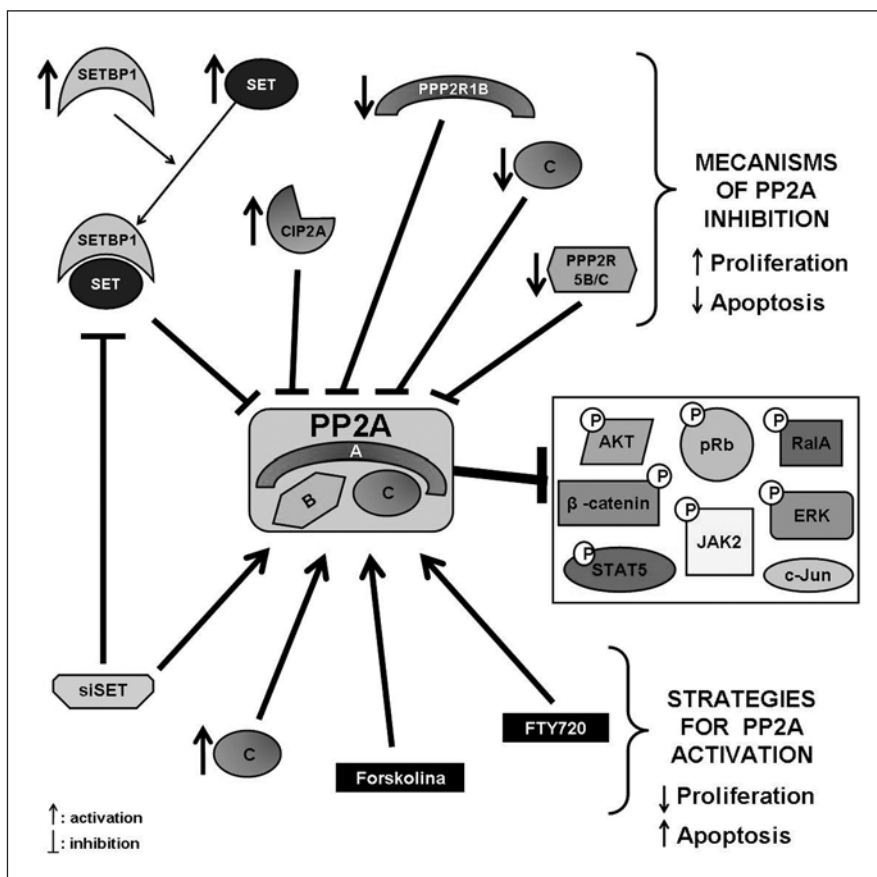


Figure 1. Mechanisms of PP2A inactivation in acute myeloid cells.

## References

- Rowe JM. Optimal induction and post-remission therapy for AML in first remission. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009; 396-405.
- Haferlach T. Molecular genetic pathways as therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008; 400-11.
- Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*. 2004; 18: 115-36.
- Loriaux MM, Levine RL, Tyner JW, et al. High-throughput sequence analysis of the tyrosine kinome in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008; 111: 4788-96.
- Valk PJ, Verhaak RG, Beijin MA, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004; 350: 1617-28.
- Paulsson K, Heidenblad M, Strombeck B, et al. High-resolution genome-wide array-based comparative genome hybridization reveals cryptic chromosome changes in AML and MDS cases with trisomy 8 as the sole cytogenetic aberration. *Leukemia*. 2006; 20: 840-6.
- Raghavan M, Lillington DM, Skoulakis S, et al. Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias. *Cancer Res*. 2005; 65: 375-8.
- Ley TJ, Mardis ER, Ding L, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008; 456: 66-72.
- Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med*. 2008; 14: 152-60.
- Eichhorn PJ, Creighton MP, Bernards R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1795: 1-15.
- Perrotti D, Neviani P. Protein phosphatase 2A (PP2A), a druggable tumor suppressor in Ph1(+) leukemias. *Cancer Metastasis Rev*. 2008; 27: 159-68.
- Lucas CM, Harris RJ, Giannoudis A, Copland M, Slupsky JR, Clark RE. Cancerous inhibitor of PP2A (CIP2A) at diagnosis of chronic myeloid leukemia is a critical determinant of disease progression. *Blood*. 2011; 117 (24): 6660-8.
- Yokoyama N, Reich NC, Miller WT. Determinants for the interaction between Janus kinase 2 and protein phosphatase 2A. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 417: 87-95.
- Gallay N, Dos Santos C, Cuzin L, et al. The level of AKT phosphorylation on threonine 308 but not on serine 473 is associated with high-risk cytogenetics and predicts poor overall survival in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2009; 23: 1029-38.
- Roberts KG, Smith AM, McDougall F, et al. Essential Requirement for PP2A Inhibition by the Oncogenic Receptor c-KIT Suggests PP2A Reactivation as a Strategy to Treat c-KIT+ Cancers. *Cancer Res*. 2010; 70: 5438-47.

16. Cristobal I, Blanco FJ, Garcia-Orti L, et al. SETBP1 overexpression is a novel leukemogenic mechanism that predicts adverse outcome in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010; 115: 615-25.
17. Cristobal I, Garcia-Orti L, Cirauqui C, Alonso MM, Calasanz MJ, Odero MD. PP2A impaired activity is a common event in acute myeloid leukemia and its activation by forskolin has a potent anti-leukemic effect. *Leukemia*. 2011; 25: 606-14.
18. Wang J, Li W, Li L, Yu X, Jia J, Chen C. CIP2A is over-expressed in acute myeloid leukaemia and associated with HL60 cells proliferation and differentiation. *Int J Lab Hematol*. 2011; 33: 290-8.
19. Liu Q, Zhao X, Frizzera F, et al. FTY720 demonstrates promising preclinical activity for chronic lymphocytic leukemia and lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Blood*. 2008; 111: 275-84.
20. Wallington-Beddoe CT, Hewson J, Bradstock KF, Bendall LJ. FTY720 produces caspase-independent cell death of acute lymphoblastic leukemia cells. *Autophagy*. 2011; 7 (7): 707-15.