

**Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias.**



**Programa de Biociencias Moleculares.**

**La desregulación de STAT5 en las neoplasias linfoblásticas de células T:  
bases moleculares subyacentes y posibles líneas de tratamiento.**

**Antonio Lahera Alonso.**

**Madrid, 2022.**



**Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias.**

**Universidad Autónoma de Madrid.**

**Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares.**

**La desregulación de STAT5 en las neoplasias linfoblásticas de células T:  
bases moleculares subyacentes y posibles líneas de tratamiento.**

**Doctorando: Antonio Lahera Alonso.**

**Graduado en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid.**

**Directores de tesis: Prof. José Fernández Piqueras y Dra. María Villa Morales.**

**Universidad Autónoma de Madrid**

**Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.**

Esta Tesis Doctoral se ha realizado gracias a una ayuda para contratos predoctorales para la formación de doctores (4 años) concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2016-076565).

Adicionalmente, para el desarrollo de la tesis se ha contado con financiación procedente de los siguientes proyectos:

- “Una visión genómica y epigenómica integrada de la heterogeneidad intratumoral durante la evolución de las neoplasias linfoblásticas de células T precursoras”. Referencia: SAF2015-70561-R. Proyecto de investigación del Ministerio de Economía y Competitividad. IPs: Prof. José Fernández-Piqueras y Dra. María Villa Morales.

- “Nuevos biomarcadores en neoplasias linfoblásticas de células T precursoras: heterogeneidad intratumoral, editado de ARNm y exosomas”. Referencia: RTI2018-093330-B-I00. Proyecto de investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación. IPs: Prof. José Fernández-Piqueras y Prof. Javier Santos Hernández.

- “T cell Lymphomas, integrated clinical and genomic analysis for a precision medicine”. Referencia: AECC-PROYECT18054PIRI. Proyecto de investigación de la Asociación Española Contra el Cáncer. IP: Prof. José Fernández-Piqueras.

## Resumen.

Las neoplasias linfoblásticas de células T son enfermedades hematológicas agresivas que derivan de linfoblastos comprometidos con el linaje de células T que se desarrollan principalmente en niños. Esta enfermedad afecta a la médula ósea y a la sangre (T-ALL) aunque también puede aparecer como una masa tumoral en el timo/mediastino o en los nódulos linfáticos (T-LBL). La toxicidad asociada a los tratamientos actuales y el mal pronóstico en caso de recaída, con tasas de supervivencia inferiores al 10%, ponen de manifiesto la necesidad de nuevas terapias personalizadas que resulten más eficaces y generen menos efectos adversos.

La vía de STAT5 es la segunda vía de señalización más frecuentemente desregulada en las T-ALL/LBL solamente por detrás de la vía de NOTCH. En este sentido, un alto número de pacientes muestra la fosforilación sostenida y consiguiente activación constitutiva de STAT5, que se transloca al núcleo, donde actúa como un factor de transcripción y promueve el desarrollo tumoral. Lamentablemente, todavía no existe un tratamiento específico para aquellos pacientes diagnosticados con T-ALL/LBL que presentan desregulada la vía de STAT5. Por un lado, porque la inhibición de STAT5 resulta complicada en términos de eficacia y especificidad. Por otro lado, porque las alteraciones que promueven la fosforilación sostenida de STAT5 afectan a múltiples genes, pueden aparecer de forma simultánea y no han sido caracterizadas en su totalidad, complicando la implementación de nuevas terapias.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es la caracterización de las bases moleculares subyacentes a las neoplasias linfoblásticas de células T, para identificar potenciales dianas terapéuticas que permitan el desarrollo de nuevos tratamientos personalizados dirigidos a aquellos pacientes diagnosticados con T-ALL/LBL que presenten una activación constitutiva de STAT5. La primera parte del trabajo ha consistido en la identificación y caracterización funcional de alteraciones susceptibles de contribuir a la fosforilación sostenida de STAT5 en los pacientes con neoplasias linfoblásticas de células T, entre las que se encuentran: la fusión SEPTIN6-ABL2, la hipermetilación de la isla CpG asociada con el inicio de la transcripción de *SOCS3* y diferentes mutaciones puntuales que afectan a los genes *JAK1*, *JAK3* y el propio *STAT5*.

En base a los resultados obtenidos, la segunda parte del trabajo se ha enfocado en el estudio de los mecanismos moleculares por los que una fosforilación sostenida de STAT5 promueve el desarrollo tumoral en los pacientes con T-ALL/LBL. En este sentido, nuestros resultados demuestran que la activación constitutiva de STAT5 induce un perfil de expresión génica alterado con niveles de transcritos aberrantes para múltiples genes. Entre ellos, la sobreexpresión de *PIM1* tiene un efecto directo en la señalización relativa a c-MYC y mTOR, resultando fundamental para la proliferación y viabilidad de aquellas células que presentan mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5. Por lo tanto, *PIM1* se postula como una diana terapéutica para la implementación de nuevos tratamientos dirigidos a aquellos pacientes diagnosticados con T-ALL/LBL que muestren una activación constitutiva de STAT5 causada por la presencia de diferentes alteraciones en su vía de señalización.

## **Abstract.**

T-cell lymphoblastic neoplasms are aggressive hematological malignancies that mainly develop in children and derive from immature lymphoblasts committed to the T-cell lineage. Such malignancies affect the bone marrow and blood (T-ALL) although they can also appear as a tumor mass in the thymus/mediastinum or the lymph nodes (T-LBL). The toxicity associated with current treatments and the poor prognosis in case of relapse, with survival rates below 10%, highlight the need for new personalized therapies that are more effective and generate fewer adverse effects.

The STAT5 pathway is the second most frequently deregulated signaling pathway in T-ALL/LBL only after the NOTCH pathway. In this regard, a high number of patients show sustained phosphorylation of STAT5 which becomes constitutively active and translocates to the nucleus where it acts as a transcription factor and promotes tumor development. Unfortunately, there is no specific treatment for those patients diagnosed with T-ALL/LBL who show STAT5 pathway dysregulation. This is mainly because of two reasons: on one hand, STAT5 inhibition is complicated in terms of efficacy and specificity. On the other hand, alterations that promote the sustained phosphorylation of STAT5 affect multiple genes, may appear simultaneously and remain to be fully elucidated, complicating the implementation of new therapies.

The present work aims to characterize the molecular alterations underlying T-cell lymphoblastic neoplasms and identify potential therapeutic targets allowing the development of new personalized treatments for those patients diagnosed with T-ALL/LBL who show constitutive STAT5 activation. Consequently, during the first part of the PhD Thesis, we focused on the identification and comprehensive characterization of alterations that are expected to promote the sustained phosphorylation of STAT5 in patients with T-cell lymphoblastic neoplasms: the SEPTIN6-ABL2 fusion, the hypermethylation of the CpG island associated with the transcription start site of *SOCS3* and different point mutations affecting *JAK1*, *JAK3* and *STAT5* genes.

Based on the previously obtained results, we studied the molecular pathways downstream of STAT5, which promote tumor development in patients with T-ALL/LBL. In this regard, our results demonstrate that constitutive STAT5 activation induces an altered gene expression profile with aberrant transcript levels for multiple genes. Among them, overexpression of *PIM1* has a direct effect on c-MYC and mTOR signaling, which is essential for the proliferation and viability of cells harboring oncogenic mutations in the STAT5 pathway. Therefore, PIM1 is postulated as a potential therapeutic target for novel personalized treatments directed to patients with T-ALL/LBL and constitutive STAT5 activation.

## **Índice.**

<b>Clave de abreviaturas:</b> .....	1
<b>1. Introducción</b> .....	3
1.1. Definición de cáncer.....	3
1.2. Alteraciones genéticas en el cáncer.....	3
1.3. Alteraciones epigenéticas. ....	4
1.3.1. Metilación del ADN. ....	4
1.3.2. Modificaciones de las histonas. ....	4
1.3.3. Silenciamiento génico por ARNs no codificantes.....	5
1.4. Proto-oncogenes y genes supresores de tumores como representativos de los principales genes “codificantes” implicados en cáncer .....	5
1.4.1. Proto-oncogenes.....	5
1.4.2. Genes supresores de tumores. ....	6
1.5. Características de las células tumorales.....	6
1.6. Origen de las células tumorales. ....	7
1.7. Las neoplasias linfoblásticas de células T: características y clasificación.....	7
1.8. Las neoplasias linfoblásticas de células T: Tratamientos convencionales. ....	9
1.9. Las neoplasias linfoblásticas de células T: Nuevas vías de tratamiento.....	10
1.10. La medicina personalizada. ....	11
1.11. La vía de señalización de NOTCH. ....	17
1.12. La vía de señalización de STAT5. ....	17
<b>2. Objetivos</b> .....	23
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	24
3.1. Biopsias humanas.....	24
3.1.1. Datos referentes a las muestras de origen humano. ....	24
3.1.2. Historial médico del paciente 14.....	25
3.2. Cultivo celular.....	25
3.2.1. Líneas celulares utilizadas. ....	25
3.2.2. Reactivos para el mantenimiento de las células. ....	26
3.2.3. Autenticación de las células.....	26
3.2.4. Inhibidores farmacológicos utilizados.....	27
3.3. Análisis del ADN. ....	27
3.3.1. Extracción y cuantificación del ADN.....	27
3.3.2. Análisis del exoma.....	28
3.3.3. Secuenciación Sanger.....	29
3.3.4. Variación del número de copias (CNV).....	29

3.3.5. Sondas utilizadas y síntesis de la sonda SEPTIN6-ABL2 .....	29
3.3.6. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	30
3.3.7. Análisis de la densidad de metilación. ....	31
3.4. Análisis del ARN.....	31
3.4.1. Extracción y cuantificación del ARN.....	31
3.4.2. Análisis de la secuenciación del ARN (RNA-seq) y expresión diferencial.....	31
3.4.3. GSEA.....	32
3.4.4. Análisis de transcritos de fusión.....	32
3.4.5. Análisis de la expresión por transcripción reversa y PCR cuantitativa (RT-qPCR). ...	33
3.5. Análisis morfológico e inmunofenotípico de las muestras tumorales correspondientes al paciente 14 así como de la línea celular derivada UAMTALL-SA. ....	33
3.6. Obtención, generación y aplicación de los vectores de expresión. ....	34
3.7. Transfección celular. ....	35
3.8. Transducción con partículas lentivirales. ....	35
3.9. Análisis de proteínas. ....	35
3.9.1. Extracción y cuantificación de las proteínas. ....	35
3.9.2. Inmunoprecipitación. ....	36
3.9.3. Electroforesis y Western blot.....	36
3.10. Análisis funcionales. ....	37
3.10.1. Mediante el contaje celular con azul de tripán.....	37
3.10.2. Mediante citometría de flujo. ....	37
3.11. Estadística.....	37
<b>4. Resultados.....</b>	<b>39</b>
4.1. Análisis de las mutaciones que afectan al gen <i>JAK1</i> . ....	39
4.2. Análisis de la mutación <i>JAK3</i> <sup>Q988P</sup> . ....	42
4.3. Análisis de la mutación <i>STAT5</i> <sup>G698E</sup> . ....	46
4.4. Identificación y caracterización funcional de la fusión SEPTIN6-ABL2.....	47
4.5. Terapia dirigida basada en la fusión SEPTIN6-ABL2. ....	56
4.6. La hipermetilación de la isla CpG asociada con el inicio de la transcripción del gen <i>SOCS3</i> . ....	63
4.7. Estudio de los mecanismos moleculares por los que la activación constitutiva de <i>STAT5</i> promueve el desarrollo tumoral en los pacientes con T-ALL/LBL que presentan alteraciones en diferentes miembros de la vía de <i>STAT5</i> .....	73
<b>5. Discusión.....</b>	<b>92</b>
5.1. Alteraciones de carácter genético.....	92
5.2 Alteraciones de carácter epigenético.....	98

5.3. Mecanismos moleculares por los que una activación constitutiva de STAT5 promueve el desarrollo tumoral en los pacientes con T-ALL/LBL que presentan alteraciones en diferentes miembros de la vía de STAT5. ....	101
<b>6. Conclusiones.</b> .....	108
<b>7. Bibliografía</b> .....	110
<b>8. Anexo 1.</b> .....	117



### **Clave de abreviaturas:**

7AAD. 7-amino-actinomicina D.  
*ABL1*. Gen, proteína tirosina quinasa Abelson 1.  
*ABL2*. Gen, proteína tirosina quinasa Abelson 2.  
aCGH. Micromatrices de hibridación genómica comparativa  
ADN. Ácido Desoxirribonucleico.  
ADNc. Ácido Desoxirribonucleico complementario.  
AKT. Gen, proteína quinasa B.  
ARN. Ácido Ribonucleico.  
ARNm. Ácido Ribonucleico mensajero.  
BAC. Cromosomas artificiales bacterianos.  
*BCL-2*. Gen, linfoma de células B-2.  
*BCR*. Gen, Región del clúster de puntos de ruptura.  
BSA. Albúmina de suero bovino.  
*CMVp*. Promotor del citomegalovirus.  
CNV. Variación en el número de copias.  
CTRL. Control.  
DAPI. 4',6-diamidino-2-fenilindol.  
DMEM. Medio de Eagle modificado de Dulbecco.  
DMSO. Dimetil-sulfóxido.  
ECL. Quimioluminiscencia potenciada.  
EdU. 5-etil-2'-desoxiuridina  
EMR. Enfermedad mínima residual.  
*EML1*. Gen, proteína asociada a los microtúbulos de los equinodermos 1.  
*EF1ap*. Promotor humano del factor de elongación-1 alfa.  
*ETV6*. Gen, variante del factor de transcripción ETS 6.  
EV. Vector vacío.FDA: Administración de alimentos y medicamentos.  
FDR: tasa de descubrimiento falso.  
FISH: Hibridación *in situ* fluorescente.  
GAS. Sitios activados-gamma.  
GFP. Proteína verde fluorescente.  
GSEA. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes.  
HD. Heterodimerización.  
*HOX11*. Gen, Homeo Box-11 (punto de ruptura asociado a la leucemia de células T-3, homólogo a *Drosophila* Notch).  
HRP. Peroxidasa de rábano.  
IL-3. Interleuquina 3.  
IL-7. Interleuquina 7.  
*IL7R*. Gen, subunidad alfa del receptor de interleuquina 7.  
LYL1. Gen, regulador de la hematopoyesis asociado a la leucemia linfoblástica 1.  
LIC. Células iniciadoras de la leucemia.  
*JAK*. Gen, proteína quinasa Janus.  
*MAPK*. Gen, proteína quinasa activada por mitógenos.  
MLPA. Sondas dependientes de ligandos múltiples.  
NCI. Instituto nacional del cáncer.

Nt. Nucleótido.  
*NUP214*. Gen, proteína del complejo de poros nucleares Nup214.  
OMS. Organización mundial de la salud.  
P/p-valor. Valor de probabilidad.  
P-/Phospho. Fosforilación.  
Pb. Pares de bases.  
PBS. Tampón fosfato salino  
PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.  
PETHEMA. Programa para el Estudio de Terapias en las Enfermedades Hematológicas.  
*PI3K*. Gen, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-quinasa subunidad catalítica alfa.  
PIAS. Proteínas inhibidoras de STATs activadas.  
*PIM*. Gen, proto-oncogén serina/treonina-quinasa.  
PTCL. Linfomas periféricos de células T.  
PTP. Proteína fosfatasa de tirosinas  
PTPN. No receptor proteína tirosina-fosfatasa.  
PTPR. Receptor proteína tirosina-fosfatasa.  
RT-qPCR. Transcripción Reversa y PCR cuantitativa.  
RNA-seq. Secuenciación del ARN.  
RPMI. Medio del Instituto Conmemorativo Roswell Park.  
SD. Desviación estándar.  
SDS. Dodecil sulfato sódico.  
*SEPTIN6*. Gen, proteína septina 6.  
SEHOP. Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica.  
SH2. Dominio de homología Src 2.  
*SHP*. Gen, proteína tirosina-fosfatasa que contiene un dominio SH2.  
*SIL*. Gen, proteína del locus de interrupción TAL-1.  
*SOCS*. Gen, supresor de la señalización por citoquinas.  
*SRC*. Gen, proto-oncogén proteína tirosina-quinasa Src  
SSC. Tampón citrato salino-sódico  
*STAT*. Gen, proteínas activadoras y transductoras de las señales de transcripción.  
STR. Repeticiones cortas en tándem.  
T-ALL. Leucemia linfoblástica aguda de células T.  
T-LBL. Linfoma linfoblástico de células T.  
*TAL1*. Gen, factor de transcripción TAL BHLH 1.  
TCR. Receptor de células T.  
TBS. Solución salina tamponada con Tris.  
TBS-T. Solución salina tamponada con Tris y Tween 20.  
TdT. Desoxirribonucleotidil transferasa terminal.  
*MLL*. Gen, leucemia de linaje mixto.  
WT. Salvaje o canónica.

## **1. Introducción.**

### **1.1. Definición de cáncer.**

El cáncer es un conjunto de enfermedades originadas por la acumulación secuencial de alteraciones de carácter genético y epigenético en los denominados proto-oncogenes y genes supresores de tumores. Dichas alteraciones, confieren a las células afectadas una serie de características concretas, que promueven su crecimiento descontrolado y su capacidad para invadir tejidos adyacentes, pudiendo provocar la muerte del individuo<sup>1</sup>.

### **1.2. Alteraciones genéticas en el cáncer.**

Producen un cambio en la secuencia de nucleótidos del ADN. Las más habituales son las mutaciones puntuales que afectan a un número muy limitado de nucleótidos en una región específica del gen. Pueden ser: sustituciones, que producen el cambio de un nucleótido por otro diferente; inserciones, que producen la adición de uno o varios nucleótidos; y deleciones, producen la eliminación de uno o varios nucleótidos. La patogenicidad de estos dos últimos tipos de mutaciones se debe normalmente a que dan lugar a un cambio en la pauta de lectura de ADN<sup>1</sup>.

Las mutaciones cromosómicas afectan a regiones específicas de uno o varios cromosomas produciendo cambios estructurales o numéricos de cromosomas. Las de carácter estructural pueden ser: duplicaciones, que producen la repetición de una determinada región cromosómica, dando lugar a un incremento en el número de copias de los genes afectados; deleciones, que producen la pérdida de una determinada región cromosómica, dando lugar a una reducción en el número de copias de los genes afectados; translocaciones, que producen la redistribución de una determinada región cromosómica, que adquiere una localización diferente bien dentro del mismo cromosoma o bien dentro de otro cromosoma no homólogo; e inversiones, que producen el cambio de orientación de una determinada región cromosómica.

Las de carácter numérico, que provocan un cambio en el número habitual de cromosomas que están presentes en la célula suelen producirse por una separación anormal de los cromosomas durante el proceso de división celular. Pueden ser

euploidías cuando afectan a juegos cromosómicos completos o aneuploidías cuando afectan a uno o varias cromosomas<sup>2</sup>.

### **1.3. Alteraciones epigenéticas.**

En este caso no producen un cambio en la secuencia de nucleótidos del ADN, pero pueden alterar la expresión génica. Las más comunes son:

#### **1.3.1. Metilación del ADN.**

La metilación del ADN es uno de los procesos epigenéticos más relevantes y tiene lugar tanto en las células normales como en las células tumorales. Es llevada a cabo por las enzimas ADN-metiltransferasas y consiste en la adición de grupos metilo sobre las bases de citosina que constituyen los dinucleótidos CpG. Los dinucleótidos CpG no se distribuyen homogéneamente a lo largo del genoma, sino que se encuentran especialmente concentrados en determinadas zonas del mismo y constituyen las denominadas islas CpG. De forma semejante, las islas CpG no se disponen aleatoriamente por el genoma, sino que tienden a presentar una localización específica como, por ejemplo, las proximidades del inicio de la transcripción de los genes, donde co-localizan con diferentes elementos reguladores, tales como promotores o potenciadores. En este sentido, se ha reportado que más del 70% de los genes codificantes muestran una isla CpG en las proximidades del inicio de la transcripción. Los niveles de metilación de las islas CpG pueden modular la transcripción de los genes. De este modo, cuando los niveles de metilación son bajos, la transcripción génica se produce de forma habitual. Por el contrario, cuando los niveles de metilación son altos, se dificulta la accesibilidad de la maquinaria de transcripción a esa región concreta del genoma y se produce una reducción en los niveles de expresión del gen en cuestión. En el caso concreto de los genes supresores de tumores, las islas CpG presentan unos niveles de metilación bajos en las células normales mientras que pueden estar altamente metiladas en las células tumorales, reduciéndose así la expresión de dichos genes y contribuyendo al desarrollo tumoral<sup>3,4</sup>.

#### **1.3.2. Modificaciones de las histonas.**

Las modificaciones que sufren las histonas modulan la arquitectura de la cromatina, el posicionamiento de los nucleosomas y en última instancia, el acceso al ADN para la

transcripción génica. En este sentido algunas modificaciones pueden romper las interacciones entre las histonas y el ADN, favoreciendo una conformación desempaquetada de la cromatina, o eucromatina, que facilita el acceso de la maquinaria transcripcional y aumenta la expresión génica. Por el contrario, otras pueden reforzar las interacciones entre las histonas y el ADN, favoreciendo una conformación empaquetada de la cromatina, o heterocromatina, que dificulta el acceso de la maquinaria transcripcional y disminuye la expresión génica. Si bien se han descrito hasta nueve tipos diferentes de modificaciones que afectan a las histonas, las más estudiadas en la actualidad son: la acetilación, la metilación, la fosforilación y la ubiquitinación<sup>5,6</sup>.

### 1.3.3. Silenciamiento génico por ARNs no codificantes.

Existen varios tipos como, por ejemplo: los ARNs largos no codificantes, ARNs asociados a Piwi o microARNs, siendo estos últimos los más estudiados en la actualidad. Los microARNs son pequeños ARN no codificantes con longitudes comprendidas entre 20-24 nucleótidos que pueden transcribirse directamente a partir del ADN de genes no codificantes propios (teniendo en este caso regiones reguladoras propias), aunque algunos se encuentran incluidos en la secuencia de otros genes codificantes o no codificantes (de modo que su expresión está sujeta a la de aquellos genes que los albergan). El mecanismo de acción de los microARNs se basa en la complementariedad de bases y en el complejo de silenciamiento inducido de ARN, también conocido como RISC, que promueve la degradación de los ARNm o bloquea el proceso de traducción<sup>7,8</sup>.

## **1.4. Proto-oncogenes y genes supresores de tumores como representativos de los principales genes “codificantes” implicados en cáncer**

### 1.4.1. Proto-oncogenes.

Su activación participa en la regulación positiva del desarrollo tumoral. Codifican proteínas con funciones proliferativas y anti-apoptóticas, así como también proteínas encargadas de inhibir los procesos de diferenciación, de reprogramar las células cancerígenas, de promover angiogénesis, invasividad o metástasis. Sufren mutaciones dominantes de ganancia de función que pueden dividirse en dos categorías principales. Por un lado, aquellas que producen cambios en la estructura de las proteínas como,

por ejemplo, mutaciones intragénicas que afectan a residuos cruciales para su actividad o las translocaciones cromosómicas que dan lugar a proteínas quiméricas. Por otro lado, aquellas que producen un incremento en los niveles de expresión, tales como duplicaciones génicas o las translocaciones cromosómicas que yuxtaponen a los proto-oncogenes bajo el control de secuencias promotoras o potenciadoras diferentes que llevan asociado un incremento en la expresión génica. Cuando los proto-oncogenes sufren alguna de las alteraciones previamente mencionadas y contribuyen activamente al desarrollo tumoral pasan a denominarse oncogenes<sup>1,9,10</sup>.

#### 1.4.2. Genes supresores de tumores.

Su inactivación participa en la regulación negativa del desarrollo tumoral. Codifican proteínas con funciones anti-proliferativas y pro-apoptóticas, así como también proteínas implicadas en el control de la integridad y estabilidad del genoma. Sufren alteraciones de pérdida de función que suelen tener un carácter recesivo, es decir, se necesita la inactivación de ambos alelos para producir un efecto fenotípico. Dichas alteraciones suelen ser mutaciones sin sentido en residuos clave para su actividad, mutaciones que producen una proteína truncada, deleciones o inserciones, así como también alteraciones de carácter epigenético, que incluyen una metilación aberrante o el silenciamiento génico mediado por microARNs. De forma general, durante el desarrollo tumoral se produce un mayor número de alteraciones en los genes supresores de tumores que en los proto-oncogenes. Adicionalmente, las alteraciones que implican a genes supresores de tumores se heredan con mayor frecuencia que aquellas que implican a proto-oncogenes y, una vez que pasan a la descendencia, incrementan la susceptibilidad para desarrollar determinados tipos de tumores<sup>1,11,12</sup>.

#### 1.5. Características de las células tumorales.

Las alteraciones previamente mencionadas confieren a las células afectadas una serie de características determinadas que contribuyen a la progresiva transformación de dichas células en las denominadas células tumorales o neoplásicas, como: (1) señales autosuficientes para el crecimiento, (2) insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento, (3) evasión de la muerte celular programada o apoptosis, (4) potencial de replicación ilimitado, (5) angiogénesis sostenida (6) capacidad de invadir otros tejidos y

generar metástasis (7) reprogramación del metabolismo energético y (8) evasión de los mecanismos de control asociados al sistema inmune<sup>13,14</sup>.

### **1.6. Origen de las células tumorales.**

Salvo algunas excepciones, la mayoría de los tumores se clasifican en cuatro grupos principales según su origen celular: epiteliales, mesenquimales, neuroectodérmicos y hematológicos. Si bien el cáncer puede iniciarse a partir de cualquier tipo celular, la mayoría de los tumores humanos tienen un origen epitelial y se denominan carcinomas. Existen dos tipos principales de carcinomas: los carcinomas de células escamosas, que surgen de los epitelios que componen las capas protectoras, y los adenocarcinomas, que surgen de los epitelios secretores. En cuanto a los tumores que no tienen un origen epitelial, existen: (1) los sarcomas, que se originan a partir de células mesenquimales, (2) los tumores neuroectodérmicos, que se originan a partir de células del sistema nervioso, y (3) las neoplasias hematológicas, que se originan a partir de células hematopoyéticas. Estas últimas engloban al subtipo específico de tumor que se ha estudiado en el presente trabajo y que son las neoplasias linfoblásticas de células T<sup>1,15</sup>.

### **1.7. Las neoplasias linfoblásticas de células T: características y clasificación.**

Las neoplasias hematológicas son la principal causa de muerte en niños y adolescentes en todo el mundo. Este tipo de cáncer engloba tumores que se originan en el sistema hematopoyético (médula ósea y tejido linfático) incluyendo leucemias, linfomas y mielomas múltiples. Las neoplasias de células T se dividen en dos grupos principales: los linfomas periféricos de células T (PTCL), que surgen de células T maduras post-tímicas y las neoplasias linfoblásticas de células T, derivadas de timocitos en maduración (linfoblastos comprometidos con el linaje T tras su entrada en el timo)<sup>16</sup>.

Según la organización mundial de la salud (OMS), las neoplasias linfoblásticas de células T son enfermedades agresivas que se desarrollan principalmente en niños, concretamente varones adolescentes, pero que también pueden afectar a los adultos. Estas neoplasias hematológicas están formadas por blastos de tamaño mediano que presentan una alta proporción de núcleo con respecto al citoplasma. En cuanto a los núcleos, pueden ser redondeados o irregulares y muestran una elevada

actividad mitótica. En cuanto al citoplasma, puede presentar vacuolas intracelulares y en ocasiones resulta muy similar al de los linfocitos maduros, de modo que se necesita de un estudio inmunofenotípico para poder discernir entre ambos tipos celulares<sup>17</sup>.

La manifestación más frecuente de esta enfermedad afecta principalmente a la médula ósea y a la sangre y, en tales casos, se denomina leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL). Sin embargo, de forma menos frecuente pueden aparecer como una masa tumoral en el timo/mediastino anterior o en los nódulos linfáticos, denominándose entonces linfomas linfoblásticos de células T (T-LBL). Puesto que las T-ALL y T-LBL presentan un alto grado de similitud a nivel clínico, morfológico e inmunofenotípico, tienden a considerarse como dos entidades de la misma enfermedad y, en muchos casos, reciben el mismo tipo de tratamiento. Sin embargo, varios análisis de la expresión génica han demostrado que las T-ALL y T-LBL no muestran perfiles de expresión idénticos y segregan en grupos distintos, lo que sugiere la existencia de diferencias subyacentes en cuanto a la biología de ambos tumores<sup>18-20</sup>.

Las neoplasias linfoblásticas de células T pueden estratificarse en diferentes estadios atendiendo a la expresión de los componentes del receptor de células T (TCR), así como también de otros antígenos que reflejan las propiedades inmunofenotípicas de las células progenitoras linfoides detenidas en las distintas etapas de la maduración temprana de las células T (Tabla 1)<sup>16,17</sup>.

	cCD3	sCD3	CD7	CD1a	TdT	CD2	CD5	CD34	CD4	CD8	
ETP-ALL	+/-	-	+	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	Positivo
Pro-T	+	-	+	-	+/-	-	-	+/-	-	-	Negativo
Pre-T	+	-	+	-	+	+	+	+/-	-	-	Intermedio
Cortical	+	+/-	+	+	+	+	+	-	+	+	
Medular	+	+	+	-	+/-	+	+	-	+/-	+/-	

**Tabla1. Clasificación de las T-ALL/LBL de acuerdo al inmunofenotipo.** Los subtipos de T-ALL se basan en la clasificación propuesta por la OMS en 2017 sobre los tumores de los tejidos hematopoyéticos y linfoides, que incluyó la ETP-ALL como una nueva entidad provisional. Esta clasificación se estableció mediante la clasificación inmunofenotípica basada en las moléculas de superficie expresadas en las etapas secuenciales intratímicas del desarrollo de las células T humanas. cCD3 (CD3 citoplásmico); sCD3 (CD3 de superficie); TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal). La presencia o ausencia de la molécula indicada se representa con (+) y (-), respectivamente.



### **1.8. Las neoplasias linfoblásticas de células T: Tratamientos convencionales.**

Si bien en la década de los 60 la tasa de curación para los pacientes diagnosticados con T-ALL/LBL era tan solo del 20%, los tratamientos actuales han permitido elevar considerablemente el número de pacientes curados. La primera línea de estos tratamientos consiste en ciclos quimioterapéuticos de alta intensidad y larga duración que se aplican en fases consecutivas (de inducción, consolidación, intensificación retardada y mantenimiento) y que incluyen combinaciones de diferentes fármacos tales como: doxorubicina, daunorrubicina, dexametasona, prednisona, vincristina, asparaginasa, ciclofosfamida, citarabina o metotrexato<sup>21-24</sup>.

Los pacientes son considerados de riesgo estándar, medio o alto dependiendo de la respuesta inicial a los esteroides y de la enfermedad mínima residual (EMR) tras los dos primeros ciclos de tratamiento. En función de los resultados, los pacientes reciben una combinación de fármacos determinada que, en ocasiones, puede estar acompañada por un trasplante de medula ósea. Varios estudios han demostrado que la aplicación de estos tratamientos resulta en una supervivencia global del 82% en los menores de 30 años, del 50% en los adultos y del 27% en los mayores de 50 años<sup>25-28</sup>.

Lamentablemente, en torno a la mitad de los pacientes adultos sufren recaídas antes de los 2 años que se caracterizan por un pronóstico especialmente desfavorable y muestran tasas de supervivencia inferiores al 10%. Las opciones terapéuticas disponibles para los pacientes que experimentan una recaída o para los que son refractarios a los regímenes quimioterapéuticos estándar son muy escasas, y desde la aprobación en 2005 de la Nelarabine por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), no se han desarrollado nuevos fármacos específicos para las T-ALL/LBL<sup>29</sup>. Nelarabine es un análogo de los nucleósidos de purina que inhibe la síntesis aberrante del ADN y produce citotoxicidad en las células tumorales dando lugar a una tasa de respuesta alrededor del 50%<sup>30</sup>. Sin embargo, su elevada toxicidad puede provocar la aparición de efectos neurológicos adversos, que son especialmente importantes en los niños mayores de 10 años, poniendo de manifiesto la necesidad de nuevas terapias dirigidas frente a estas neoplasias hematológicas<sup>31</sup>.

### **1.9. Las neoplasias linfoblásticas de células T: Nuevas vías de tratamiento.**

Teniendo en cuenta todo lo anterior y desde un punto de vista clínico, los tratamientos actuales presentan dos problemas principales. Por un lado, la alta toxicidad que llevan asociada y que en muchos casos provoca la interrupción de los mismos. Por otro lado, el terrible resultado en caso de recaída, con tasas de supervivencia inferiores al 10%. La base de estos problemas radica, al menos en parte, en los métodos tradicionales para la clasificación y el manejo clínico de los distintos tipos de cáncer, que se basa en la prescripción de un tratamiento de primera línea en función de la célula de origen y del grado del tumor. Sin embargo, esta aproximación tiene una utilidad limitada debido a la heterogeneidad inter-tumoral, por la cual las bases moleculares subyacentes al desarrollo tumoral pueden ser muy diferentes entre dos tumores originados a partir del mismo tipo celular y, por tanto, considerados tradicionalmente como una sola enfermedad. En este sentido, considerar a cada tumor como una entidad singular y compleja pone en cuestión la idea de un tratamiento único para todos los pacientes cuyos tumores se han originado a partir del mismo tipo celular y presentan un grado de desarrollo semejante. Los denominados tratamientos personalizados se consideran la propuesta de futuro para abordar el cáncer y se basan en el desarrollo e implementación de terapias a medida para cada individuo, que resulten más efectivas y ocasionen menos efectos secundarios. A este respecto, se ha demostrado que la iniciación y el desarrollo del cáncer dependen en gran medida del estatus del sistema inmune y de la biología del tumor, de modo que la inmunoterapia y la medicina personalizada se postulan actualmente como las dos líneas de actuación más prometedoras<sup>32,33</sup>.

La inmunoterapia consiste en la modificación y utilización de determinados componentes relativos al sistema inmune para el tratamiento de diversas enfermedades entre las cuales se incluye el cáncer. Lamentablemente, el desarrollo de nuevas inmunoterapias dirigidas contra las neoplasias de células T y, en particular, contra las T-ALL/LBL resulta especialmente difícil debido a la expresión compartida de marcadores de superficie entre las células T normales y las leucémicas, lo que tiene dos implicaciones fundamentales: (1) El reto de cosechar suficientes células T maduras de los pacientes con T-ALL/LBL sin que exista ninguna contaminación con linfoblastos

derivados del tumor. (2) El efecto fratricida inherente, que extinguiría rápidamente a las células T normales y, en su caso, también a las células modificadas (como por ejemplo las células CAR-T) y que puede producir problemas de inmunodeficiencia que deriven en la aparición de infecciones oportunistas o en la reactivación de infecciones latentes. En consecuencia, el principal reto para los futuros tratamientos de inmunoterapia frente a las T-ALL/LBL consiste en la identificación de marcadores únicos y específicos presentes en los linfoblastos derivados del tumor, especialmente en las células iniciadoras de la leucemia (LIC), que normalmente son las responsables de impulsar los fenómenos de resistencia y recaída<sup>34,35</sup>.

### 1.10. La medicina personalizada.

Consiste en la utilización de inhibidores farmacológicos, normalmente compuestos orgánicos de bajo peso molecular, que actúan sobre las alteraciones genéticas y epigenéticas que están presentes en las células cancerosas y que son susceptibles de modular el desarrollo tumoral. Por lo tanto, para que pueda aplicarse de una manera eficiente, la medicina personalizada requiere de una caracterización pormenorizada de las bases moleculares subyacentes al desarrollo tumoral. En este sentido, múltiples estudios han analizado el perfil molecular de las T-ALL/LBL y han identificado un amplio espectro de alteraciones (Tabla 2)<sup>36-39</sup>.

Gen	Tipo de alteración	Frecuencia	
		Pediátricos (%)	Adultos (%)
<b>Factores de transcripción</b>			
<i>BCL11B</i>	mutaciones inactivantes/ deleciones	10	9
<i>ETV6</i>	mutaciones inactivantes/ deleciones	8	14
<i>GATA3</i>	mutaciones inactivantes/ deleciones	5	3
<i>HOXA (CALM-AF10, MLL-ENL and SET-NUP214)</i>	reordenamientos cromosómicos/ inversiones/ expresión aberrante	5	8
<i>LEF1</i>	mutaciones inactivantes/ deleciones	10	2
<i>LMO2</i>	reordenamientos cromosómicos/ deleciones/ expresión aberrante	13	21
<i>MYB</i>	reordenamientos cromosómicos/ duplicaciones	7	17
<i>NKX2.1/NKX2.2</i>	reordenamientos cromosómicos/ expresión aberrante	8	
<i>RUNX1</i>	mutaciones inactivantes/ deleciones	8	10

<i>TAL1</i>	reordenamientos cromosómicos/ deleciones/ expresión aberrante	30	34
<i>TLX1</i>	reordenamientos cromosómicos/ deleciones/ expresión aberrante	8	20
<i>TLX3</i>	reordenamientos cromosómicos/ expresión aberrante	19	9
<i>WT1</i>	mutaciones inactivantes/ deleciones	19	11
<b>Reguladores del ciclo celular</b>			
<i>CDKN2A</i>	delección 9p21	61	55
<i>CDKN2B</i>	delección 9p21	58	46
<i>RB1</i>	deleciones	12	
<b>Factores epigenéticos</b>			
<i>DNMT3A</i>	mutaciones inactivantes	1	14
<i>EED</i>	mutaciones inactivantes/ deleciones	5	5
<i>EZH2</i>	mutaciones inactivantes/ deleciones	12	12
<i>KDM6A/UTX</i>	mutaciones inactivantes/ deleciones	6	7
<i>PHF6</i>	mutaciones inactivantes/ deleciones	19	30
<i>SUZ12</i>	mutaciones inactivantes/ deleciones	11	5
<b>Estabilidad del ARNm y traducción</b>			
<i>CNOT3</i>	mutaciones de cambio de sentido	3	8
<i>mTOR</i>	mutaciones activantes	5	
<i>RPL5</i>	mutaciones inactivantes	2	2
<i>RPL10</i>	mutaciones de cambio de sentido	8	1
<i>RPL22</i>	mutaciones inactivantes	4	0
<b>Vías de señalización</b>			
<b>Vía de señalización de NOTCH</b>			
<i>FBXW7</i>	mutaciones inactivantes	14	14
<i>NOTCH1</i>	reordenamientos cromosómicos/mutaciones activantes	50	57
<b>Vía de señalización de STAT5</b>			
<i>IL7R</i>	mutaciones activantes	10	12
<i>JAK1</i>	mutaciones activantes	5	7
<i>JAK3</i>	mutaciones activantes	8	12
<i>STAT5B</i>	mutaciones activantes	6	6
<i>DNM2</i>	mutaciones inactivantes	13	13
<i>PTPN2</i>	mutaciones inactivantes/ deleciones	3	7
<i>PTPRC</i>	mutaciones inactivantes/ deleciones	2	5
<i>FLT3</i>	mutaciones activantes	6	4
<i>NUP214-ABL1</i>	reordenamientos cromosómicos/ duplicaciones	5	
<i>EML1-ABL1</i>	reordenamientos cromosómicos	1	
<i>ETV6-ABL1</i>	reordenamientos cromosómicos	1	
<i>LCK-TCR<math>\beta</math></i>	reordenamientos cromosómicos	1	
<b>Vía de señalización de PI3K/AKT</b>			

<i>AKT</i>	mutaciones activantes	2	2
<i>PI3KCA</i>	mutaciones activantes	1	5
<i>PTEN</i>	mutaciones inactivantes/ deleciones	19	11
<b>Vías de señalización de MAPK/ERK</b>			
<i>KRAS</i>	mutaciones activantes	6	0
<i>NRAS</i>	mutaciones activantes	14	9
<i>NF1</i>	deleciones	4	4

**Tabla 2. Alteraciones genéticas en las T-ALL/LBL.** Modificado de **Girardi et al., 2017 (Blood)** y **Van Vlierberghe y Ferrando, 2012 (J Clin Invest)**.

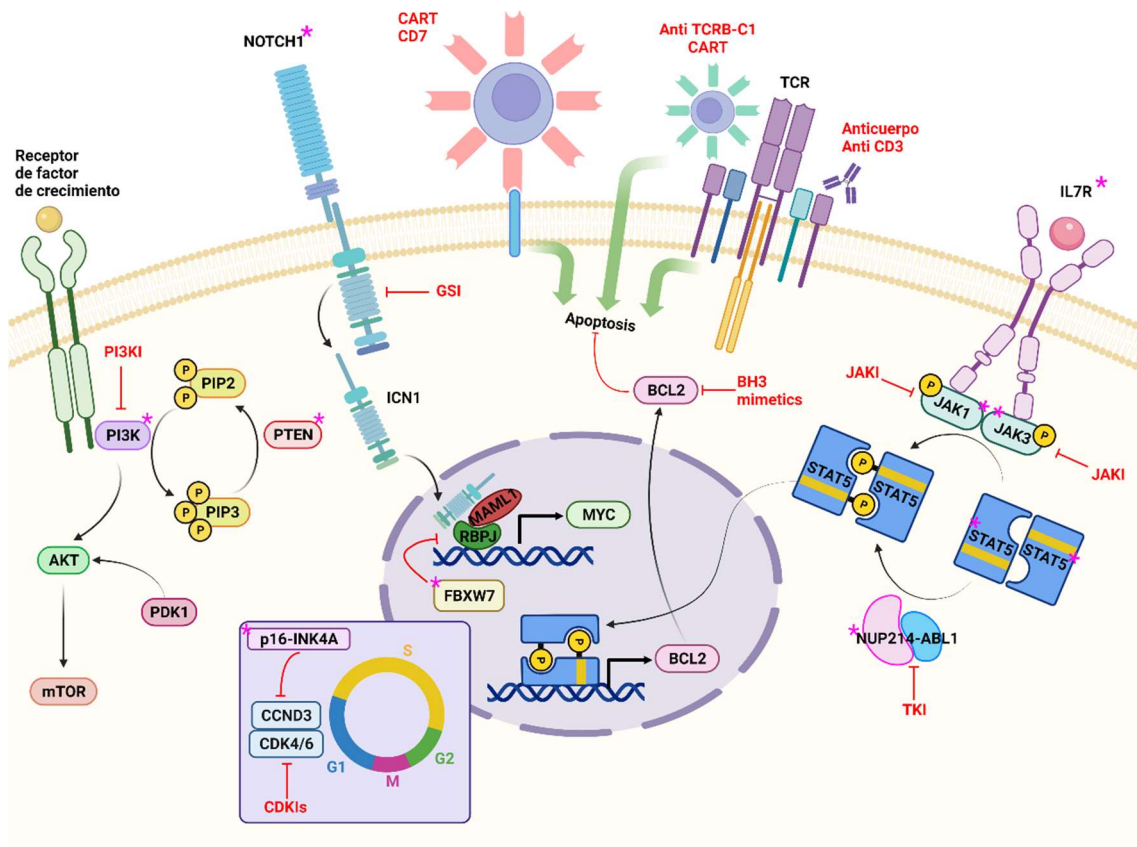
Tal y como se muestra en la Tabla 2, las alteraciones identificadas afectan principalmente a: i) factores de transcripción, ii) reguladores epigenéticos, iii) genes implicados en la progresión del ciclo celular, iv) genes relacionados con la traducción de proteínas y v) genes que forman parte de las vías de señalización de NOTCH, STAT5, PI3K/AKT y MAPK/ERK. La identificación y caracterización funcional de estas alteraciones ha permitido la puesta en marcha de múltiples ensayos clínicos con inhibidores farmacológicos susceptibles de bloquear el desarrollo tumoral en las neoplasias linfobásticas de células T (Tabla 3)<sup>40,41</sup>.

Diana	Agente terapéutico	Identificador del ensayo y año de publicación en clinicaltrials.gov
<b>Inhibidores de BHL3</b>		
Sobreexpresión de BCL2	Venetoclax (ABT-199)	NCT03236857 (p, ya); 2017 NCT03808610 (a); 2019
Sobreexpresión de BCL2 y BCLXL	Navitoclax (ABT-263)	NCT00406809 (a); 2006 NCT03181126 (p, a); 2017
Sobreexpresión de MCL1	AZD-5991	NCT03218683 (a); 2017
<b>Inhibidores de NOTCH1</b>		
Mutaciones activantes en <i>NOTCH1</i>	Brontictuzumab (OMP-52M51)	NCT01703572 (a); 2012
	<b>Inhibidores de <math>\gamma</math>-secretasa</b>	
	LY3039478	NCT02518113 (p, a); 2015
	BMS-906024	NCT01363817 (a); 2011
	PF-3084014	NCT00878189 (ya, a); 2009
<b>Inhibidores de BET</b>		
Actividad aberrante de BRD4 y c-MYC	OTX015 (MK-8628)	NCT01713582 (a); 2012
	GSK525762	NCT01943851 (a); 2013
<b>Inhibidores de ABL/SRC</b>		
Fusiones de <i>ABL1</i>	Dasatinib	NCT03117751 (p); 2017
	Imatinib	NCT02551718 (p, a); 2015
<b>Inhibidores de JAK1/2</b>		
Mutaciones activantes en <i>IL7Ra</i> , <i>JAK1/3</i> y <i>STAT5B</i>	Ruxolitinib	NCT01251965 (ya, a); 2010
		NCT03613428 (p, a); 2018
		NCT03117751 (p); 2017
		NCT03515200 (p, ya); 2018

Mutaciones activantes en <i>PIK3R1</i> , <i>PIK3CA/D</i> y <i>AKT</i> . Deleciones en <i>PTEN</i>	<b>Pan-PI3K inhibidores</b>	
	Buparlisib (BMK120)	NCT01396499 (a); 2011 NCT01833169 (a); 2013
	<b>Inhibidores de PI3K selectivos</b>	
	Duvelisib (IPI-145, $\gamma/\delta$ inhibitor)	NCT02711852 (a); 2016
	Idelalisib (CAL-101, $\delta$ inhibitor)	NCT03742323 (a); 2018
	<b>Inhibidores de mTOR</b>	
	Everolimus (rapamycin, RAD001)	NCT00968253 (p, a); 2009 NCT01523977 (p, ya); 2012 NCT00874562 (p, a); 2009 NCT03740334 (p,a); 2018
	Temsirolimus (CCI-799)	NCT00084916 (a); 2004 NCT01403415 (p, ya); 2011
	<b>Inhibidores duales de PI3K/mTOR</b>	
	Dactolisib (NVP-BEZ235)	NCT01756118 (a); 2012
	<b>Inhibidores de AKT</b>	
MK-2206 (allosteric)	NCT01231919 (p, ya); 2010	
Mutaciones en <i>NRAS/ KRAS</i>	<b>Inhibidores de MEK</b>	
	Selumetinib	NCT03705507 (p, a); 2018
	Trametinib	NCT00920140 (a); 2009 NCT02551718 (p, a); 2015
	Binimetinib (MEK162)	NCT01885195 (a); 2013
Inhibición de <i>CDKN2A/B</i> . Deleciones en <i>CDKN1B</i> . Sobreexpresión de <i>CCND3</i>	<b>Inhibidores de CDK4/6</b>	
	Ribociclib (LEE011)	NCT02187783 (a); 2014 NCT03740334 (p, a); 2018 NCT02813135 (p); 2016
	Palbociclib (PD-332991)	NCT03792256 (p); 2019 NCT03132454 (ya, a); 2017 NCT03515200 (p, ya); 2018
	<b>Análogos de purina</b>	
Síntesis de ADN aberrante	Nelarabine	NCT02551718 (p, a); 2015 NCT00866671 (p, ya); 2009 NCT00408005 (p, ya); 2006
Sobreexpresión de MDM2	<b>Inhibidores de MDM2</b>	
	Idasanutlin	NCT04029688 (p, ya); 2019
	HDM201	NCT02143635 (a); 2014
	ALRN-6924	NCT03654716 (p, ya); 2018
Expresión de CD38	<b>Inmunoterapia</b>	
	Daratumumab	NCT00501826 (p, a); 2007 NCT03384654 (p); 2017
	Isatuximab	NCT03860844 (p); 2019
<b>Células CAR T</b>		
Expresión de CD5	Anti-CD5 CAR T	NCT03081910 (p, a); 2017
Expresión de CD7	Anti-CD7 CAR T	NCT03690011 (p, a); 2018
<b>Otros fármacos</b>		
Exportación nuclear de proteínas y ARNm oncogénicos	<b>XPO1 inhibitor</b>	
	Selinexor (KPT-330)	NCT02212561 (p, ya); 2014 NCT02091245 (p, ya); 2014

	<b>Inhibidores de HDAC</b>	
Actividad aberrante de HDAC	Panobinostat	NCT00723203 (a); 2008 NCT02518750 (p); 2015 NCT01321346 (p); 2011
	Vorinostat	NCT03117751 (p); 2017 NCT01483690 (p, ya); 2011 NCT02553460 (p); 2015
	<b>Inhibidores de DNMT</b>	
Actividad aberrante de DNMT	5-Azacitidine	NCT02551718 (p,a); 2015 NCT01861002 (p); 2013
	Decitabine	NCT02551718 (p, a); 2015 NCT01483690 (p, ya); 2011 NCT00349596 (p, a); 2006 NCT03132454 (ya, a); 2017
	<b>Inhibidores del proteasoma</b>	
Rápida renovación de proteínas	Bortezomib	NCT02518750 (p); 2015 NCT02553460 (p); 2015 NCT02551718 (p, a); 2015 NCT00440726 (p); 2007 NCT04224571 (p, ya); 2020 NCT00873093 (p, a); 2009 NCT02112916 (p, ya); 2014 NCT03590171 (p); 2018 NCT03117751 (p); 2017 NCT03643276 (p); 2018
		<b>Inhibidores de NAE</b>
	Pevonedistat (MLN49243)	NCT03349281 (ya, a); 2017
	<b>Inhibidores de AURK</b>	
Sobreexpresión de AURK	Alisertib	NCT01154816 (p, ya); 2010
	AT-9283	NCT01431664 (p); 2011

**Tabla 3. Ensayos clínicos relevantes para la implementación de terapias dirigidas en las neoplasias linfoblásticas de células T. Modificado de Cordo et al., 2021 (*Blood Cancer Discovery*). P: pediátrico; ya: joven; a: adulto.**



**Figura 1. Alteraciones moleculares subyacentes a las T-ALL/LBL y los tratamientos dirigidos propuestos.** Aquellos genes cuya alteración contribuye al desarrollo tumoral aparecen marcados con un asterisco y los tratamientos dirigidos aparecen coloreados en rojo.

En base a estos datos, se pueden extraer dos conclusiones:

- i) Las bases moleculares subyacentes a las neoplasias linfoblásticas de células T son muy heterogéneas. De este modo, se han identificado alteraciones en un amplio espectro de genes con funciones celulares muy diversas y se han postulado múltiples dianas terapéuticas susceptibles de ser tratadas con diferentes inhibidores farmacológicos (Figura 1).
- ii) Las dos vías de señalización más frecuentemente desreguladas en los pacientes con T-ALL/LBL son la vía de NOTCH y la vía de STAT5, sugiriendo que muchas de las alteraciones identificadas contribuyen a la activación constitutiva de estas vías y que, por tanto, la inhibición de las mismas puede resultar efectiva a la hora de bloquear el desarrollo tumoral en un alto número de pacientes con T-ALL/LBL.



### **1.11. La vía de señalización de NOTCH.**

NOTCH1 es una glicoproteína transmembrana de clase I que tiene un papel fundamental en el compromiso de los progenitores hematopoyéticos con el linaje de las células T. La vía de señalización mediada por NOTCH comienza con la unión de su correspondiente ligando, que desencadena dos eventos de proteólisis consecutivos. La primera escisión de NOTCH, afecta a su dominio extracelular y es catalizada por la familia de metaloproteinasas ADAM. La segunda escisión de NOCTH, afecta a su dominio intracelular y es catalizada por el complejo  $\gamma$ -secretasa. Ambos eventos, tienen como consecuencia la liberación del dominio intracelular de NOTCH de la membrana, que se transloca al núcleo, donde se asocia con el complejo transcripcional CLS-MAML1 y modula la expresión de numerosos genes<sup>42</sup>.

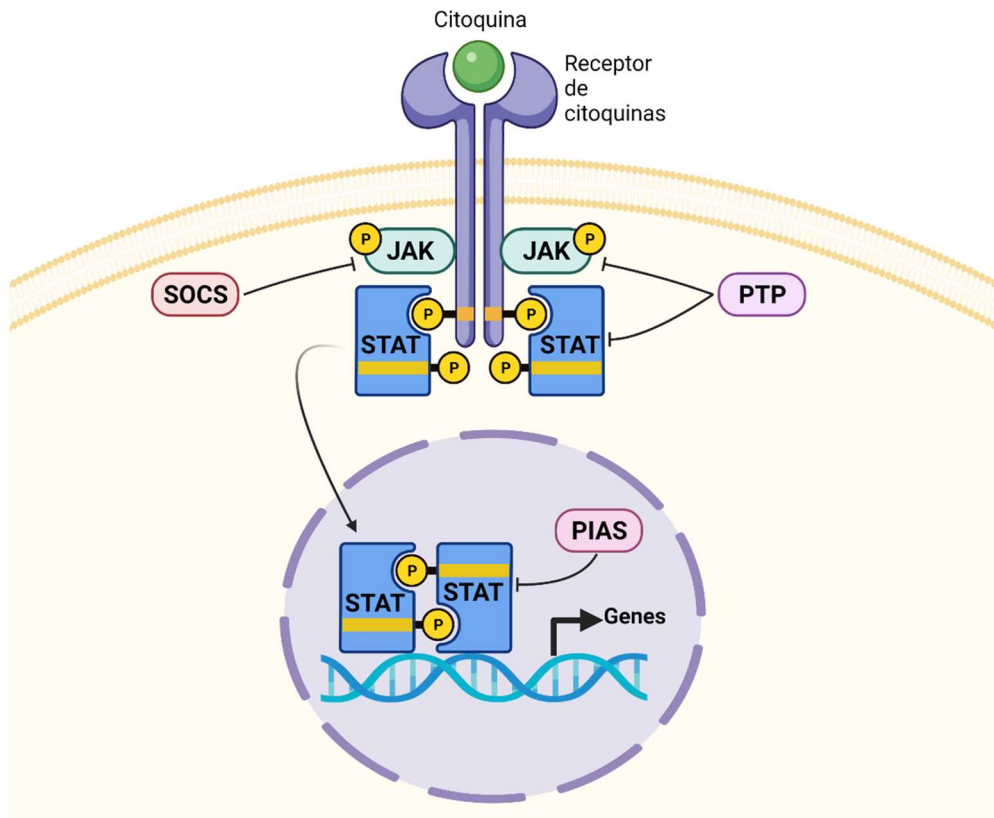
Los pacientes con T-ALL/LBL presentan fundamentalmente dos tipos de alteraciones en el gen *NOTCH1*. Por un lado, mutaciones en el dominio de heterodimerización (HD), que favorecen la escisión mediada por metaloproteinasas incluso en ausencia del ligando de NOTCH. Por otro lado, mutaciones en el dominio prolina, ácido glutámico, serina y treonina (PEST), que incrementan la estabilidad del dominio intracelular de NOTCH puesto que inhiben su interacción con la proteína FBW7 y su consiguiente degradación en el proteasoma<sup>43</sup>. Adicionalmente, el gen *FBXW7* también se encuentra frecuentemente alterado en los pacientes con T-ALL/LBL, normalmente mediante mutaciones de pérdida de función, que inhiben su capacidad para interactuar con NOTCH1, ubiquitarlo e inducir su degradación en el proteasoma<sup>44</sup>.

De este modo, los inhibidores de  $\gamma$ -secretasa y de algunas de sus subunidades como PSEN1 se han postulado como tratamientos potenciales para aquellos pacientes con T-ALL/LBL que presentan una activación constitutiva de la vía de NOTCH y, en este sentido, se están realizando ensayos clínicos al respecto<sup>45,46</sup>.

### **1.12. La vía de señalización de STAT5.**

La familia de proteínas activadoras y transductoras de las señales de transcripción (STAT) está constituida por 7 miembros (de STAT1 a STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6) cada uno de los cuales está codificado por un gen independiente. Adicionalmente, cada gen puede dar lugar a múltiples isoformas mediante procesos de proteólisis o de

editado del ARNm: las isoformas  $\alpha$  o canónicas y las isoformas  $\beta$ . Estas últimas carecen del extremo carboxilo-terminal y compiten con las isoformas  $\alpha$  por los sitios de anclaje, actuando como reguladores negativos de las mismas. Las proteínas STAT presentan una serie de dominios comunes (del extremo amino al extremo carboxilo): dominio de oligomerización, dominio de doble espiral, dominio de unión al ADN, dominio de enlace, dominio SH2 y dominio de transactivación. Las proteínas STAT pueden activarse a través de diversos mecanismos como, por ejemplo: i) receptores con actividad tirosina-quinasa intrínseca, como PDGFR, EGFR o FLT3; ii) proteínas tirosina-quinasa asociadas a los receptores, como la familia de proteínas Janus (JAK). La activación de las proteínas STAT en los timocitos se produce mayoritariamente a través de la vía JAK/STAT (Figura 2)<sup>47,48</sup>.



**Figura 2. Esquema representativo de la vía de señalización JAK/STAT mostrando los elementos principales de la misma.**

La vía JAK/STAT comienza con la unión de las citoquinas o los factores de crecimiento a su correspondiente receptor. Dicha unión produce una serie de cambios conformacionales en el receptor que permiten la unión de las proteínas JAK. Una vez

unidas al receptor, las proteínas JAK se activan mediante un proceso de auto-fosforilación o trans-fosforilación y actúan como proteínas tirosina-quinasa fosforilando una serie de residuos determinados del receptor al que se encuentran unidas. La fosforilación de dichos residuos, permite entonces que las proteínas STAT se unan al receptor, mediante sus dominios SH2, y que sean también fosforiladas por las proteínas JAK. Una vez fosforiladas, las proteínas STAT se activan y forman homodímeros o heterodímeros (a través de la interacción del residuo de fosfotirosina de una molécula con el dominio SH2 de otra molécula) y se translocan al núcleo donde actúan como factores de transcripción. Concretamente, los dímeros de STAT reconocen los elementos de unión denominados sitios activados-gamma (GAS), que contienen la secuencia palindrómica TTCNNGAA, y modulan la expresión de numerosos genes implicados en procesos como la supervivencia (*BCL-XL*, *BCL-2*, *MCL-1*), la progresión en el ciclo celular (*CCND1*, *CCND2*, and *c-MYC*) o la angiogénesis (*HIF1 $\alpha$* , *VEGF*)<sup>49</sup>.

En este sentido, STAT5 es esencial para la señalización promovida por múltiples citoquinas (tales como IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 o IL-12) y resulta indispensable para el desarrollo de las células B y T. Consecuentemente, la depleción de STAT5 provoca linfopenia y los ratones carentes de STAT5 presentan un fenotipo de inmunodeficiencia combinada grave. Por el contrario, se ha demostrado que la activación constitutiva de la vía de STAT5 contribuye al desarrollo tumoral y que STAT5 resulta fundamental tanto para la iniciación como para el desarrollo de diversas neoplasias hematológicas. Por tanto, en el ámbito de dichas enfermedades, STAT5 se utiliza en la clínica como un biomarcador asociado con mal pronóstico y se ha postulado como una diana terapéutica potencial <sup>47,50</sup>.

En base a lo anterior, la señal inducida por la vía JAK/STAT debe ser apagada en las células normales transcurrido un determinado periodo de tiempo para evitar una situación perjudicial. Para ello, la vía JAK/STAT cuenta con múltiples mecanismos encargados de su regulación negativa, algunos de los cuales se basan en la reducción del número de receptores expuestos en la superficie celular, en la separación de las proteínas JAK del receptor, o en el transporte de los factores de transcripción STAT

fuera del núcleo. Adicionalmente, existen tres familias de proteínas que inhiben directamente la actividad de diferentes miembros de la vía JAK/STAT<sup>51</sup>:

- i) Las proteínas fosfatasa de tirosinas (PTPs), tales como SHP1, SHP2, PTPN2 o PTPRC, que participan en la desfosforilación e inactivación de las proteínas JAK y STAT localizadas en el citoplasma.
- ii) La familia de proteínas supresoras de la señalización por citoquinas (SOCS), que está compuesta por 8 miembros diferentes (de SOCS1 a SOCS7 y CIS). Los genes SOCS constituyen un claro ejemplo de regulación por retroalimentación negativa, es decir, su expresión es muy baja en condiciones normales, pero se incrementa rápidamente tras la estimulación con citoquinas o factores de crecimiento, puesto que son dianas transcripcionales de las proteínas STAT activadas. Las proteínas SOCS pueden inhibir la vía de señalización JAK/STAT de tres formas diferentes: compitiendo con las proteínas JAK y STAT por los sitios de unión al receptor; interaccionando directamente con las proteínas JAK e inhibiendo su actividad quinasa; y promoviendo la ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma de las proteínas JAK. Esto se debe a que las proteínas SOCS pueden interaccionar con las elonguinas B y C, que forman parte del complejo ubiquitina-ligasa E3<sup>52,53</sup>.
- iii) Las proteínas inhibidoras de STATs activadas (PIAS), deben su nombre a que interaccionan exclusivamente con los dímeros de STAT, pero no con los monómeros y, por tanto, solamente pueden unirse a las proteínas STAT fosforiladas y activadas. Las proteínas PIAS pueden inhibir tanto la actividad transcripcional de las proteínas STAT como su capacidad de unión al ADN.

Se han detectado numerosas alteraciones que promueven la activación constitutiva de STAT5 en los pacientes con T-ALL/LBL y, en base a los genes que resultan afectados, se pueden clasificar en tres grupos principales:

- i) Alteraciones que afectan a los mecanismos de activación de la vía JAK/STAT. Se trata principalmente de mutaciones de ganancia de función que producen un cambio en la estructura de la proteína y que promueven su activación constitutiva en ausencia de los inductores característicos de la vía de señalización, que en este caso serían las

citoquinas y factores de crecimiento, como IL-2 o IL-7. Son mutaciones de cambio de sentido en los genes *JAK1*, *JAK3* y *STAT5*, así como también las inserciones o deleciones que mantienen la pauta de lectura en *IL7R*<sup>54-57</sup>.

ii) Alteraciones que afectan a los mecanismos de inactivación de la vía JAK/STAT. Se trata principalmente de mutaciones de pérdida de función que impiden que la vía JAK/STAT pueda apagarse correctamente y, por tanto, promueven su activación sostenida a lo largo del tiempo. Son mutaciones sin sentido o deleciones en los genes *DNM2*, *PTPN2* y *PTPRC*<sup>58-60</sup>.

iii) Alteraciones que no afectan directamente a miembros de la vía JAK/STAT pero que inducen la fosforilación permanente de STAT5. Se trata de mutaciones de ganancia de función que afectan a diferentes proteínas con actividad tirosina-quinasa. Se trata de las translocaciones que implican al gen *ABL1* y que originan las proteínas de fusión *NUP214-ABL1*, *EML1-ABL1* y *ETV6-ABL1*; las translocaciones que implican al gen *LCK* y lo colocan bajo la regulación del promotor de *TCR $\beta$* ; y mutaciones de cambio de sentido o inserciones que mantienen la pauta de lectura en el gen *FLT3* y que promueven su activación en ausencia de los ligandos correspondientes.<sup>61-65</sup>

Desafortunadamente, no existe un tratamiento específico para los pacientes con T-ALL/LBL que presentan una activación constitutiva de la vía de STAT5. Además, la inhibición de la vía de STAT5 en estos pacientes resulta sustancialmente más complicada que la inhibición de la vía de NOTCH1 por varias razones fundamentales:

i) Los miembros de la familia STAT presentan un alto grado de homología a nivel estructural, lo que dificulta la generación de inhibidores que puedan actuar específicamente sobre STAT5.

ii) Muchos procesos celulares que no están directamente implicados en el desarrollo tumoral requieren de STAT5, bien en solitario o bien en combinación con otras proteínas STAT y, por tanto, se verían seriamente afectados por aquellos inhibidores que actuaran sobre STAT5 pudiendo dar lugar a efectos secundarios adversos graves.

iii) Los miembros de la familia STAT presentan un cierto grado de redundancia funcional, de modo que la inhibición de STAT5 en las células tumorales podrían verse

contrarrestada por la desregulación de otras proteínas STAT y la consecuente aparición de resistencias<sup>66,67</sup>.

En base a estas afirmaciones, la mayoría de los esfuerzos actuales se concentran en la inhibición de aquellas proteínas cuya alteración promueve la fosforilación permanente de STAT5 en los pacientes con T-ALL/LBL. Lamentablemente, dichas alteraciones pueden afectar a un alto número de genes y, además, suelen aparecer de forma simultánea en los pacientes, dando lugar a que la activación constitutiva de la vía de STAT5 sea un proceso aditivo. Por tanto, su inhibición podría requerir de múltiples inhibidores, así como también de combinaciones entre los mismos, en función de las alteraciones presentadas por cada paciente concreto<sup>59,68-71</sup>. En este sentido, resulta imprescindible un estudio individualizado de las bases moleculares subyacentes al desarrollo tumoral con el objetivo de implementar tratamientos personalizados que sean más efectivos y presenten menos efectos adversos. Adicionalmente, se han reportado diversos casos que muestran una fosforilación permanente de STAT5 en ausencia de las alteraciones previamente descritas, sugiriendo la existencia de alteraciones adicionales que pueden afectar a otros miembros de la vía y que todavía no han sido identificadas o funcionalmente caracterizadas<sup>72</sup>.

El hecho de que la vía de señalización de STAT5 pueda ser activada a través de mutaciones en numerosos genes junto con la existencia de pacientes diagnosticados con T-ALL/LBL que muestran una fosforilación sostenida de STAT5 en ausencia de dichas mutaciones, sugieren la existencia de alteraciones adicionales que todavía no han sido descritas y que también contribuyen a la fosforilación permanente de STAT5. Nuestra hipótesis es que tales alteraciones podrían postularse como nuevas dianas terapéuticas para diferentes tratamientos dirigidos a los pacientes con T-ALL/LBL que presenten una activación constitutiva de STAT5.

## **2. Objetivos.**

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es la caracterización de las bases moleculares subyacentes a las neoplasias linfoblásticas de células T que presenten una activación constitutiva de la vía de señalización de STAT5, para identificar potenciales dianas terapéuticas que permitan el desarrollo e implementación de nuevos tratamientos personalizados.

El primer objetivo específico de este trabajo ha consistido en la identificación y caracterización funcional de alteraciones susceptibles de contribuir a la fosforilación permanente de STAT5 en los pacientes con neoplasias linfoblásticas de células T.

El segundo objetivo específico de este trabajo ha consistido en el estudio de los mecanismos moleculares por los que una activación constitutiva de STAT5 promueve el desarrollo tumoral en los pacientes con neoplasias linfoblásticas de células T que presentan alteraciones oncogénicas en la vía de STAT5.

### **3. Materiales y métodos.**

#### **3.1. Biopsias humanas.**

##### 3.1.1. Datos referentes a las muestras de origen humano.

Durante el desarrollo de la Tesis se han analizado datos relativos a 274 muestras tumorales correspondientes a pacientes diagnosticados con leucemias/linfomas linfoblásticos de células T de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS). Adicionalmente, se han utilizado timocitos procedentes de timos pediátricos (n=4) que no presentaban patologías previas conocidas y que fueron extraídos como consecuencia de una cirugía cardiaca.

Una parte de las muestras tumorales (n=24) fue obtenida a través de los siguientes biobancos, que forman parte de la Red Española de Biobancos en Hospitales (RetBioH; [www.redbiobancos.es](http://www.redbiobancos.es)): Hospital Universitario 12 de Octubre i+12, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Hospital La Paz, Hospital de Murcia y Fundación Jiménez Díaz. Todas las muestras se obtuvieron tras el consentimiento informado, conforme a la declaración de Helsinki, de acuerdo con las normas legales de los estudios clínicos en España y al reglamento de los comités de ética de los respectivos hospitales de procedencia. El trabajo realizado contó con la aprobación del Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid (referencias CEI31-773 y CEI-70-1260).

Los datos correspondientes al resto de las muestras tumorales (n=250) forman parte de la iniciativa Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments (TARGET), número de acceso phs000218 y número de acceso específico del subestudio phs000464.v19.p8 (TARGET Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Expansion Phase 2), gestionado por el Instituto nacional del cáncer (NCI). Los datos utilizados para este análisis son accesibles a través de la base de datos dbGaP (database of genotypes and phenotypes,

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/study.cgi?study\\_id=phs000464.v19.p8](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/study.cgi?study_id=phs000464.v19.p8)). Se puede encontrar información sobre TARGET en <http://ocg.cancer.gov/programs/target>.



### 3.1.2. Historial médico del paciente 14.

Según el protocolo LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 (versión 2. 0, 10/09/2014) de la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica (SEHOP) y el protocolo del Programa para el Estudio de Terapias en las Enfermedades Hematológicas (PETHEMA), el paciente recibió al ingreso una fase previa de tratamiento con corticoides (Prednisona) seguido de dos ciclos de inducción (IA y IB) y un ciclo de intensificación (bloque AR-1) consistente en Vincristina, Daunorubicina, L-asparaginasa, Ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, Citarabina, Dexametasona y Metotrexato. Para la profilaxis del sistema nervioso central se administró una triple quimioterapia intratecal por punción lumbar consistente en Metotrexato, Citarabina e Hidrocortisona. Posteriormente, recibió un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas pertenecientes a una hermana HLA idéntica. Tras la recaída, se administró Nelarabine pero el desarrollo de toxicidad hepática provocó la suspensión del tratamiento.

## 3.2. Cultivo celular.

### 3.2.1. Líneas celulares utilizadas.

Las líneas celulares: SUPT-1 (ATTC# CRL-1942), JURKAT con E6-1 (ATCC#TIB-152), MOLT-4 (ATTC# CRL- 1582), y HEK293T (ATTC# CRL-11268) se adquirieron en ATCC.

Las líneas celulares: HPB-ALL (DSMZ#ACC483), PEER (DSMZ#ACC6), KARPAS-45 (DSMZ#ACC105), HSB-2 (DSMZ#ACC435), ALL-SIL (DSMZ#ACC 511), K562 (DSMZ#ACC10), M07e (DSMZ#ACC104) y Ba/F3 (DSMZ#ACC300) se adquirieron en el Instituto Leibniz-DSMZ.

La línea celular U4A fue generosamente cedida por la doctora Elise Holvey-Bates (Cleveland Clinic).

La línea celular UAMTALL-SA se estableció siguiendo los protocolos previamente descritos a partir de una alícuota con  $100 \times 10^6$  células mononucleares aisladas mediante Ficoll y procedentes de una muestra de sangre periférica obtenida del paciente 14 en el momento de la recaída. Posteriormente, dichas células han sido depositadas en DSMZ a efectos de patente con el número de identificación DSM ACC3372 y según el Tratado de Budapest. Las células UAMTALL-SA se duplican

aproximadamente cada 86 horas y muestran tasas normales de crecimiento celular, viabilidad y progresión del ciclo en ausencia de citoquinas o factores de crecimiento.

### 3.2.2. Reactivos para el mantenimiento de las células.

La experimentación celular se realizó siempre en un periodo no superior a 6 meses después de la descongelación. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Las líneas celulares adherentes se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (GE Healthcare Life Sciences) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GE Healthcare Life Sciences), 2mM de L-glutamina (Merck Millipore) y 1mM de piruvato sódico (Merck Millipore).

Las líneas celulares en suspensión se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 2mM de L-glutamina.

Las células UA4, que son defectivas en JAK1 y en SOCS3, se utilizaron para los ensayos de transfección y se estimularon con 20ng/ml de interferón  $\gamma$  (R&DSystems). Las células HPB-ALL, que muestran hipermetilación de *SOCS3* y responden a interleuquina-7, se utilizaron para los ensayos de expresión y se estimularon con 10ng/ml de interleuquina-7 (R&DSystems).

Las células BaF3, que necesitan de citoquinas para su viabilidad y proliferación, se cultivaron rutinariamente con 5ng/ml de interleuquina-3 (Cell Signaling) en tanto que para los ensayos experimentales se lavaron 3 veces con PBS 1x y se sembraron en medio sin citoquinas.

Las células M07e, que necesitan de citoquinas para su viabilidad y proliferación, se cultivaron rutinariamente con 10ng/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (R&DSystems) en tanto que para los ensayos experimentales se lavaron 3 veces con PBS 1x y se sembraron en medio sin citoquinas.

### 3.2.3. Autenticación de las células.

ATCC y DSMZ llevan a cabo la autenticación sistemática de las líneas celulares utilizando como procedimiento el análisis de repeticiones cortas en tándem (STR) que se basa en el perfil de ADN. De un modo semejante, la línea celular UAMTALL-SA, que

ha sido generada y mantenida en nuestro laboratorio, se somete regularmente a pruebas de identidad genética mediante el análisis STR, utilizando el sistema GenePrint® 10, que permite la co-amplificación y la detección de diez loci humanos: TH01, TPOX, vWA, Amelogenina, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D21S11 y D5S818. Estos loci proporcionan colectivamente un perfil genético con una probabilidad de coincidencia aleatoria de 1 en  $2,92 \times 10^9$ . Las muestras se procesan con el analizador genético ABI Prism® 31300xl y los datos se analizan con el software GeneMapper® ID-X v1.2 (Applied Biosystems).

#### 3.2.4. Inhibidores farmacológicos utilizados

Todos los inhibidores se adquirieron en Selleckchem y se utilizaron en las dosis recomendadas por los fabricantes e indicadas a continuación: los inhibidores de tirosina-quinasas Imatinib (#STI571, 1 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M y 0.1 $\mu$ M), Nilotinib (#AMN-107, 100nM, 50nM y 10nM) y Dasatinib (#BMS-354825, 10nM, 5nM y 1nM); el pan-PIM inhibidor PIM447 (#LGH447, 10 $\mu$ M, 1 $\mu$ M y 0.1 $\mu$ M); el inhibidor de mTOR Rapamicina (#AY-22989, 100nM, 50nM y 1nM); el inhibidor de JAK1 y JAK2 Ruxolitinib (#INCB018424, 1 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M y 0.1 $\mu$ M); el inhibidor de JAK3 Tofacitinib (#CP-69055 1 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M y 0.1 $\mu$ M); y el inhibidor de ADN-metiltransferasas Decitabine (#NSC127716, 1 $\mu$ M).

Durante los ensayos funcionales que implicaron el uso de inhibidores farmacológicos, las denominadas “células sin tratar” se cultivaron en presencia de Dimetil-sulfóxido (DMSO) como control negativo.

### 3.3. Análisis del ADN.

#### 3.3.1. Extracción y cuantificación del ADN.

El ADN total se aisló utilizando el kit DNeasy 96 Blood and Tissue (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. La concentración y la calidad del ADN se comprobaron mediante Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc.), Qubit (Thermo Fisher Scientific Inc.) y TapeStation (Agilent Technologies).

### 3.3.2. Análisis del exoma.

La secuenciación del exoma completo fue realizada bien por NIMGenetics SL, utilizando el sistema Sure Select All Exome V6 (Agilent Technologies), o bien por Sistemas Genómicos S.L., utilizando la plataforma de secuenciación Illumina HiSeq (Illumina, Inc.).

Con respecto al sistema Sure Select All Exome V6, las bibliotecas se generaron con la tecnología SureSelectXT Human All Exon V6 y partiendo del ADN genómico fragmentado por Covaris (150-200 pb). A continuación, se capturaron las regiones genómicas de interés utilizando sondas de ARN de 120 pb (SureSelectXT). Las bibliotecas generadas se normalizaron y se combinaron en concentraciones equimoleculares para la generación óptima de grupos de ADN. La secuenciación pareada (2x150 pb) de las bibliotecas SureSelectXT (previamente enriquecidas, indexadas y multiplexadas) se realizó mediante la plataforma NovaSeq 6000 (Illumina, Inc). Los datos de secuenciación se demultiplexaron con el software bcl2fastq2 (Illumina) y la calidad se evaluó con la herramienta FASTQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). El alineamiento se realizó mediante Burrows-Wheeler Aligner (BWA-MEM) frente al genoma de referencia GRCh37/hg19 y los resultados se recalibraron para mejorar la calidad local. Todas las herramientas mencionadas están disponibles en el kit GATK, y se han utilizado siguiendo la guía de buenas prácticas recomendada (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/sections/360007226651-Best-Practices-Workflows>). La identificación y anotación de variantes se realizó mediante una combinación de las herramientas MuTect, VarScan 2 y ANNOVAR, incluyendo información perteneciente a las bases de datos dbSNP, el Proyecto 1000 Genomas, el Servidor de Variantes del Exoma (Proyecto de Secuenciación del Exoma del NHLBI GO, Seattle, WA, EE.UU.) y scripts internos.

Con respecto a la plataforma de secuenciación Illumina HiSeq, se generaron lecturas pareadas de 101nt de longitud y las regiones seleccionadas se enriquecieron utilizando el protocolo de secuenciación dirigida. Las lecturas se alinearon frente a la versión del genoma humano de referencia GRCh38/hg38 utilizando BWA y scripts "internos". La identificación y anotación de variantes se realizó mediante una

combinación de los algoritmos VarScan junto con la utilización de la base de datos Ensembl.

### 3.3.3. Secuenciación Sanger.

Los fragmentos de ADN amplificados mediante diferentes técnicas (productos de PCR, miniprep, maxiprep, etc) se enviaron a Macrogen para su secuenciación con una concentración final de 100 ng/ml (en el caso de los vectores) o de 20ng/ml (en el caso de los productos amplificados por PCR), y junto con los oligonucleótidos correspondientes. Las secuencias recibidas se analizaron con el programa Chromas Pro (Technelysium Pty Ltd) y se alinearon frente a su secuencia de referencia bien por medio del programa BioEdit (Ibis Therapeutics), cuando no implicaban fragmentos mayores de 500 pares de bases, o bien mediante el programa DNASTar (Largene Genomics Suite), cuando resultaba necesario alinear amplificaciones solapantes.

### 3.3.4. Variación del número de copias (CNV).

Los análisis de número de copias mediante hibridación genómica comparativa (aCGH) fueron realizados por NIMGenetics SL utilizando la plataforma KaryoNIM®180K (fabricada por Agilent Technologies). La resolución media del análisis es de aproximadamente 75Kb para las denominadas regiones sindrómicas (40 Kb para los genes críticos) y 100 Kb para el resto del genoma. Para el análisis bioinformático, se utilizó el genoma GRCh37/hg19 como referencia y se aplicó la estadística ADM-2 (ventana de 0,5Mb, A=6).

El análisis de número de copias para el gen *CDKN2A* mediante amplificación de sondas dependientes de ligandos múltiples (MLPA) fue realizado por NIMGenetics SL utilizando el kit Salsa ME024 (MRC-Holland).

### 3.3.5. Sondas utilizadas y síntesis de la sonda SEPTIN6-ABL2

La sonda de translocación XL ABL2 BA y la sonda centromérica para el cromosoma 17 fueron adquiridas en Metasystems probes.

Para la generación de una sonda FISH bicolor de doble fusión que permitiera detectar la translocación cromosómica que da lugar a la fusión SEPTIN6-ABL2 se obtuvieron dos conjuntos de clones de cromosomas artificiales bacterianos (BAC)

(RP11-379J1, RP11-207G22, RP11-142H10 y CH17-453G14 para *SEPTIN6*; y RP11-152K11, RP11-170H10, RP11-124A5 y RP11-1054P1 para *ABL2*) del Centro de Recursos BACPAC (<https://bacpacresources.org/>). Los BAC correspondientes a *SEPTIN6* se marcaron con Spectrum-Orange en tanto que los correspondientes a *ABL2* se marcaron con Spectrum-Green.

### 3.3.6. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Los análisis de hibridación *in situ* fluorescente se realizaron siguiendo el protocolo previamente publicado. Brevemente, las células fueron expuestas a colcemida, para arrestar la mitosis durante el estadio de metafase, tratadas con una solución hipotónica y fijadas con una combinación de ácido acético glacial y metanol. Tras su deshidratación, las muestras se desnaturalizaron a 73°C en presencia de la sonda específica y para su hibridación se incubaron durante toda la noche a 37°C. Por último, los portaobjetos se lavaron en tampón 20SSC con el detergente Tween-20 y se montaron en medios de montaje fluorescentes (DAPI en solución antifade).

Para el FISH de *ABL2* y del cromosoma 17 se utilizó un microscopio de fluorescencia NIKON eclipse 80i con un objetivo de inmersión en aceite de 100x, cubos de filtro de fluorescencia NIKON DAPI, verde y naranja, y una cámara CCD Cool Cube 1 (Metasystems) conectada a un PC con el sistema de análisis de imágenes ISIS (Metasystems) con el software Z stack para obtener imágenes de 200 células.

Para el FISH de *SEPTIN6-ABL2*, se utilizó un microscopio de fluorescencia Leica DM 5500B con un objetivo de inmersión en aceite de 100x, cubos de filtro de fluorescencia Leica DM DAPI, verde y naranja, y una cámara CCD (Photometrics SenSys) conectada a un PC con el sistema de análisis de imágenes Zytovision (Applied Imaging Ltd.) con el software Z stack para obtener imágenes de 200 células. La generación de la sonda *SEPTIN6-ABL2* y los ensayos de hibridación *in situ* fluorescente fueron realizados en colaboración con Rocío Salgado (FJD) y Sandra Rodríguez (CNIO).

### 3.3.7. Análisis de la densidad de metilación.

Los parámetros referentes a la extensión de las islas CpG y a su co-localización con potenciales secuencias reguladoras se extrajeron de las bases de datos Ensembl y UCSC Genome Browser.

El ADN previamente extraído se trató con bisulfito sódico (BS) de acuerdo con el kit EZ DNA Methylation-Gold™ (Zymo Research) de modo que las citosinas no metiladas sufren una desaminación oxidativa y se transforman en uracilos. A continuación, la densidad de metilación en las regiones seleccionadas se analizó bien mediante pirosecuenciación, utilizando los reactivos, el equipo y el software PyroMark Q24 (Qiagen), o mediante la micromatriz del perfil de metilación Infinium MethylationEPIC Kit (Illumina).

Los ensayos de metilación fueron realizados en colaboración con Pilar López (CBMSO), Agustín Fernández (IUOPA) y Ana González (CNIO).

## 3.4. Análisis del ARN.

### 3.4.1. Extracción y cuantificación del ARN.

El ARN total se aisló utilizando el kit miRNeasy (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. La concentración y la calidad del ARN se comprobaron mediante Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc.), Qubit (Thermo Fisher Scientific Inc.) y TapeStation (Agilent Technologies).

### 3.4.2. Análisis de la secuenciación del ARN (RNA-seq) y expresión diferencial.

La preparación de las bibliotecas de RNA-seq fue realizada por NIMGenetics SL utilizando el sistema TruSeq Stranded Total RNA Library Prep (Illumina, Inc.) e incluyó la fragmentación del ARN, la eliminación del ARNr, la síntesis del ADNc y la ligación del adaptador. Las bibliotecas generadas se normalizaron y se combinaron en concentraciones equimoleculares para la generación óptima de grupos de ADN. La secuenciación pareada (2x100bp) de las bibliotecas (previamente enriquecidas, indexadas y multiplexadas) se realizó con la plataforma de alto rendimiento NovaSeq 6000 (Illumina Inc.), con un mínimo de 100M de lecturas PE (50+50) por muestra y con una calidad de lectura del 85%>Q30. Para el análisis bioinformático, se utilizó el

genoma GRCh38/hg38 (Ensembl versión 103) como referencia. En las matrices de recuento de genes, las lecturas se sometieron a un filtrado no supervisado para descartar aquellos genes con muy pocas o ninguna lectura en todas las muestras del estudio (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/genefilter.html>), de modo que aquellos genes con una abundancia total inferior a 15 lecturas se excluyeron del análisis posterior.

El análisis de la expresión diferencial se realizó con el paquete estadístico DESeq2. La expresión diferencial entre dos condiciones se estimó mediante el estadístico de Wald y, para las pruebas múltiples, el p valor se ajustó mediante el procedimiento de Benjamini-Hochberg. La representación de mapas de calor relativos a la expresión génica diferencial para los genes seleccionados se realizó utilizando el software R (R versión 4.1.0) (<https://www.r-project.org/>) y su paquete "gplots" (<https://cran.rproject.org/web/packages/gplots/index.html>). El nivel de expresión génica (puntuación z) en las muestras experimentales se representa como una celda coloreada, con una interpretación de la clave de color indicada cuando es apropiado. El análisis de expresión diferencial fue realizado en colaboración con Pablo Fernández (Centro nacional de epidemiología ISCIII).

### 3.4.3. GSEA.

El análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes se realizó con el programa GSEA del Instituto Broad y siguiendo las instrucciones descritas en la guía del usuario<sup>73,74</sup>. El límite para la tasa de falsos descubrimientos (FDR) se fijó en el 5%. Todos los conjuntos de genes seleccionados pertenecen a la base de datos de firmas moleculares (MSigDB). Los nombres sistemáticos de los conjuntos de genes utilizados en este trabajo son los siguientes: M14001 (NOTCH), M16656 (GOBP\_PI3K), M16677 (ERK1/2), M5947 (STAT5), M5926 (MYC) y M5924 (MTORC1).

### 3.4.4. Análisis de transcritos de fusión.

Las fusiones génicas se estudiaron partiendo de los datos de RNA-seq sin procesar (Fastq) y utilizando el programa fusionCatcher (<https://github.com/ndaniel/fusioncatcher>). Para determinar la fiabilidad de las fusiones identificadas, las secuencias obtenidas se alinearon con los programas Bowtie,



Bowtie 2, STAR y BLAT. A continuación, se filtraron aquellas fusiones resultantes con: un número de réplicas superior a 2, recuentos de lecturas de mapeo comunes superiores a 0 y un número de lecturas cruzadas inferior a 10. Adicionalmente, las fusiones identificadas únicamente por Bowtie se consideraron como falsos positivos y también fueron descartadas.

3.4.5. Análisis de la expresión por transcripción reversa y PCR cuantitativa (RT-qPCR). Los niveles de expresión para los genes de interés se verificaron mediante RT-qPCR en tiempo real a partir de ARN total en dos pasos: el primero utilizando el kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ (Applied Biosystems) para la retrotranscripción (RT) y el segundo utilizando el kit Fast SYBR® Green Master Mix para la PCR cuantitativa (qPCR) en ABI PRISM 7900HT SDS (Applied Biosystems). Los valores de expresión obtenidos para los genes *β2-microglobulina* y *β-actina* en las mismas muestras se utilizaron para la normalización mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

### **3.5. Análisis morfológico e inmunofenotípico de las muestras tumorales correspondientes al paciente 14 así como de la línea celular derivada UAMTALL-SA.**

La morfología de las células tumorales se evaluó mediante la tinción de Wright en aspirados de médula ósea utilizando el kit Hema-Tek™ 2000 Slide Stainer (Bayer/Siemens).

La caracterización inmunofenotípica de las células tumorales correspondientes al paciente 14 al diagnóstico y recaída así como también de la línea celular derivada UAMTALL-SA se realizó en un citómetro FACS Canto II (BD Biosciences) mediante el estudio de expresión de diferentes marcadores de superficie celular utilizando anticuerpos conjugados con fluoróforos para CD4 (PE, clon 13B8. 2, Beckman Coulter), CD8 (FITC, clon DK25, PALEX), CD5 (PerCP-Cy5. 5, clon L17F12, Becton Dickinson), CD56 (PC7, clon N901/NKH, Beckman Coulter), CD7 (APC, clon HIT7, Immunostep), CD3 (APC-H7, clon SK7, Becton Dickinson), CD2 (V-450, clon S5.2, Becton Dickinson) y CD45 (V-500, clon 2D1, Becton Dickinson). Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa informático INFINICYT (Cytognos SL).

Los análisis morfológicos e inmunofenotípicos fueron realizados en colaboración con Rocío Salgado (FJD).

### **3.6. Obtención, generación y aplicación de los vectores de expresión.**

Los vectores lentivirales utilizados para la expresión, bien de forma transitoria o bien de forma estable, de las secuencias salvajes correspondientes a los genes *JAK1*, *JAK3*, *STAT5*, *ABL2* o *SOCS3* fueron adquiridos en Genecopoeia o Vectorbuilder. En dichos vectores la expresión del gen de interés se encuentra regulada por las secuencias promotoras *CMV* o *EF1A* y puede ser monitorizada a través de los niveles de Proteína verde fluorescente (GFP).

La introducción de las diferentes mutaciones en las secuencias salvajes de los genes previamente mencionados para generar versiones mutadas de los mismos se realizó con el kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies).

En el caso concreto de la fusión SEPTIN6-ABL2, el ADNc correspondiente al gen de fusión SEPTIN6-ABL2 se obtuvo directamente de las células tumorales del paciente 14 en recaída mediante la transcripción reversa del ARN total seguida de la amplificación específica por PCR utilizando los kits SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) y Expand High Fidelity PCR System (Roche) respectivamente. A continuación, los productos de la PCR fueron purificados con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) y clonados en el vector pGEM-T-Easy (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, la secuencia correspondiente a la fusión SEPTIN6-ABL2 fue subclonada en un vector de expresión lentiviral por Vectorbuilder.

De cara a obtener un alto número de copias para los vectores previamente mencionados, se llevó a cabo su amplificación mediante la transformación por choque térmico de bacterias competentes DH5α y su posterior crecimiento en medio Luria Bertani (LB) suplementado con Ampicilina (0,1%) durante toda la noche a 37°C y 225rpm. A continuación, el ADN plasmídico se extrajo mediante los kits Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification system (Promega) o GenoPure Plasmid Maxi Kit (Roche Applied Science) dependiendo del volumen inicial de cultivo.

### **3.7. Transfección celular.**

Para generar líneas celulares con expresión transitoria de las secuencias salvajes correspondientes a los genes *JAK1*, *JAK3* y *SOCS3*, así como de versiones mutadas de los mismos, los vectores de expresión que contienen dichas secuencias fueron transfectados en las células HEK-293T o U4A utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y medio Opti-MEM (Gibco).

### **3.8. Transducción con partículas lentivirales.**

Para generar las líneas celulares capaces de expresar de manera estable las secuencias salvajes correspondientes a los genes *JAK1*, *JAK3*, *STAT5*, *ABL2* o *SOCS3*, así como versiones mutadas de los mismos, los vectores lentivirales que contienen dichas secuencias fueron transfectados en las células HEK-293T, que funcionan como línea celular empaquetadora, junto con los vectores psPAX2 y pMD2.6, que contienen las secuencias correspondientes a la cubierta y la polimerasa necesarias para generar las partículas virales, utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y medio Opti-MEM (Gibco).

El medio de cultivo de las células empaquetadoras fue sustituido a las 24h y, una vez que se encuentra enriquecido en las partículas lentivirales necesarias para la transducción, fue filtrado (Millex), suplementado con polibreno (Sigma-Aldrich) y añadido a las células susceptibles de ser infectadas, en nuestro caso las líneas celulares BaF3, M07e o HPB-ALL, durante las siguientes 24 horas.

Los ensayos de transducción celular relativos a las mutaciones en *JAK1* fueron realizados en colaboración con Hernán Alarcón (UAM).

### **3.9. Análisis de proteínas.**

#### **3.9.1. Extracción y cuantificación de las proteínas.**

Las proteínas totales se extrajeron utilizando el tampón de lisis RIPA (150 mM NaCl; 50 mM de Tris-HCl pH 7,4; 0,5 % de ácido deoxicólico; 0,1% SDS y 1% Tritón X-100). A continuación, los extractos de proteínas se complementaron con 2mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 2,5µl/ml de cóctel de inhibidores de proteasas y 10µl/ml de cóctel de inhibidores de fosfatasa 2 (Roche Diagnostics GmbH).

La concentración proteica de cada extracto se cuantificó por medio del método colorimétrico BCA™ Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) utilizando como curva de calibración diluciones seriadas de BSA (Sigma-Aldrich). La lectura colorimétrica se realizó a una longitud de onda de 560 nm en el iMark Microplate Reader (Bio-Rad).

### 3.9.2. Inmunoprecipitación.

Puesto que no existe ningún anticuerpo comercial para detectar la forma fosforilada de SOCS3, los niveles de fosforilación de dicha proteína se analizaron mediante la inmunoprecipitación de SOCS3 con el anticuerpo policlonal frente a SOCS3 ab3693 (Abcam) seguida de la inmunodetección con el anticuerpo específico frente a tirosinas fosforiladas 4G10 (Upstate Biotechnology). Para ello, el anticuerpo ab3693 se incubó primero con microesferas magnéticas Dynabeads®-Protein G (ThermoFisher) y, a continuación, el complejo resultante se incubó con los extractos de proteínas previamente obtenidos y siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.9.3. Electroforesis y Western blot.

Para cada una de las muestras a evaluar se realizaron alícuotas con 15 µg de proteína que se resuspendieron en tampón de carga (6.5% SDS; 25% glicerol; 2M 2-mercaptoetanol; 0.02% de azul de bromofenol; 0.25 M Tris-HCl pH 6.8) se desnaturalizaron a 100°C durante 5 minutos y se cargaron en geles de poliacrilamida preparados en el laboratorio con un porcentaje variable entre el 6% y el 12% (Bio-Rad) según el tamaño de las proteínas que se desearan analizar.

Tras la separación de las proteínas por electroforesis, se realizó una transferencia semi-húmeda a membranas de nitrocelulosa por medio del Transfer-Blot Turbo (Bio-Rad) durante 15 minutos a 25V y 2.5 A. Las membranas se bloquearon en agitación con una solución de leche o BSA al 5% en tampón T-TBS (100mM Tris; 150mM NaCl; pH 7.5 y 0.1% de Tween-20) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C y, tras una serie de lavados, los anticuerpos secundarios frente a ratón o conejo y acoplados a la peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente.

La actividad peroxidasa se analizó mediante el sistema de detección WesternBright ECL (Advansta) y las bandas se visualizaron utilizando el lector de quimioluminiscencia ImageQuant LAS-4000 (Healthcare Life Sciences).

Los ensayos de Western blot relativos a la fusión SEPTIN6-ABL2 fueron realizados en colaboración con Laura Vela (UAM).

### **3.10. Análisis funcionales.**

#### **3.10.1. Mediante el conteo celular con azul de tripán.**

El crecimiento y la viabilidad celulares se analizaron mediante el conteo de las células teñidas con azul tripán (Sigma-Aldrich) y utilizando el contador celular automatizado TC10 (Bio-Rad Laboratories).

#### **3.10.2. Mediante citometría de flujo.**

Los ensayos funcionales mediante citometría de flujo de viabilidad, proliferación y progresión del ciclo celular se realizaron en un citómetro FACS Canto A (BD Biosciences) y los resultados obtenidos se analizaron con el programa informático Flowjo v10 (LLC). Análisis del ciclo celular mediante la tinción con yoduro de propidio utilizando el kit PI/RNasa (BD Biosciences). Análisis de la viabilidad celular mediante tinción de AnnexinaV y 7AAD utilizando el kit PE Annexin-V Apoptosis Detection (BD Biosciences). Análisis de la proliferación celular mediante la incorporación de 5-etil-2'-desoxiuridina (EdU) utilizando el kit EdU Staining Proliferation Kit (iFluor 488) (Abcam). Los ensayos funcionales relativos a la fusión SEPTIN6-ABL2 fueron realizados en colaboración con Laura Vela (UAM).

### **3.11. Estadística.**

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas GraphPad Prism 8 y R versión 4.1.0. Para comprobar que los grupos de datos se ajustaban a la normalidad se empleó el test de Saphiro-Wilk y para comprobar la homogeneidad de las varianzas se empleó el test de Levene. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante un análisis unidireccional o bidireccional de la varianza (ANOVA) con el test de Dunnett. Por el contrario, aquellas variables que no se ajustaban a la normalidad fueron analizadas

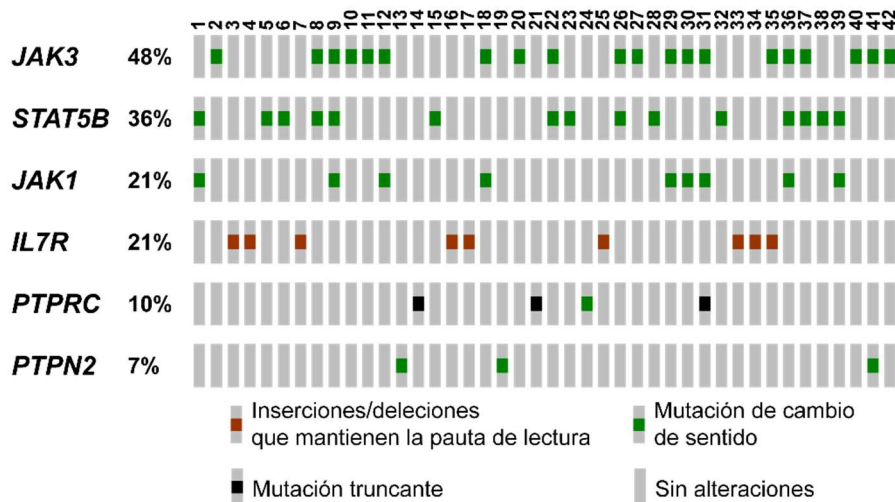
con el test no paramétrico de Mann-Whitney. Todos los p valores que resultaron inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

El análisis estadístico fue realizado en colaboración con Pablo Fernández (Centro nacional de epidemiología ISCIII).

#### 4. Resultados.

Para abordar los objetivos de esta Tesis, comenzamos por analizar los exomas de pacientes diagnosticados con T-ALL/LBL y, particularmente, aquellas mutaciones que afectan a miembros de la vía JAK/STAT y que son susceptibles de promover la activación constitutiva de STAT5. En este sentido, identificamos múltiples mutaciones en los genes *JAK1*, *JAK3*, *STAT5*, *IL7R*, *PTPN2* y *PTPRC* (Figura 3). Si bien la mayoría de las mutaciones que afectan a los genes *IL7R*, *PTPN2* y *PTPRC* han sido previamente caracterizadas como oncogénicas, también identificamos un número relevante de mutaciones en los genes *JAK1*, *JAK3* y *STAT5* que no han sido estudiadas hasta la fecha y cuyos efectos se desconocen. Por tanto, comenzamos por analizar si dichas mutaciones tienen un carácter oncogénico y contribuyen al desarrollo tumoral.

Figura 3



**Figura 3. Esquema representativo de las mutaciones susceptibles de contribuir a la activación constitutiva de la vía JAK/STAT en pacientes diagnosticados con T-ALL/LBL.** Las filas corresponden a los genes seleccionados que aparecen ordenados según su tasa de mutación en la cohorte. Las columnas representan las muestras tumorales para las que se han detectado alteraciones (n=42). Figura realizada con la herramienta oncoprint en cBioPortal<sup>75,76</sup>

(<https://www.cbioportal.org/oncoprinter>).

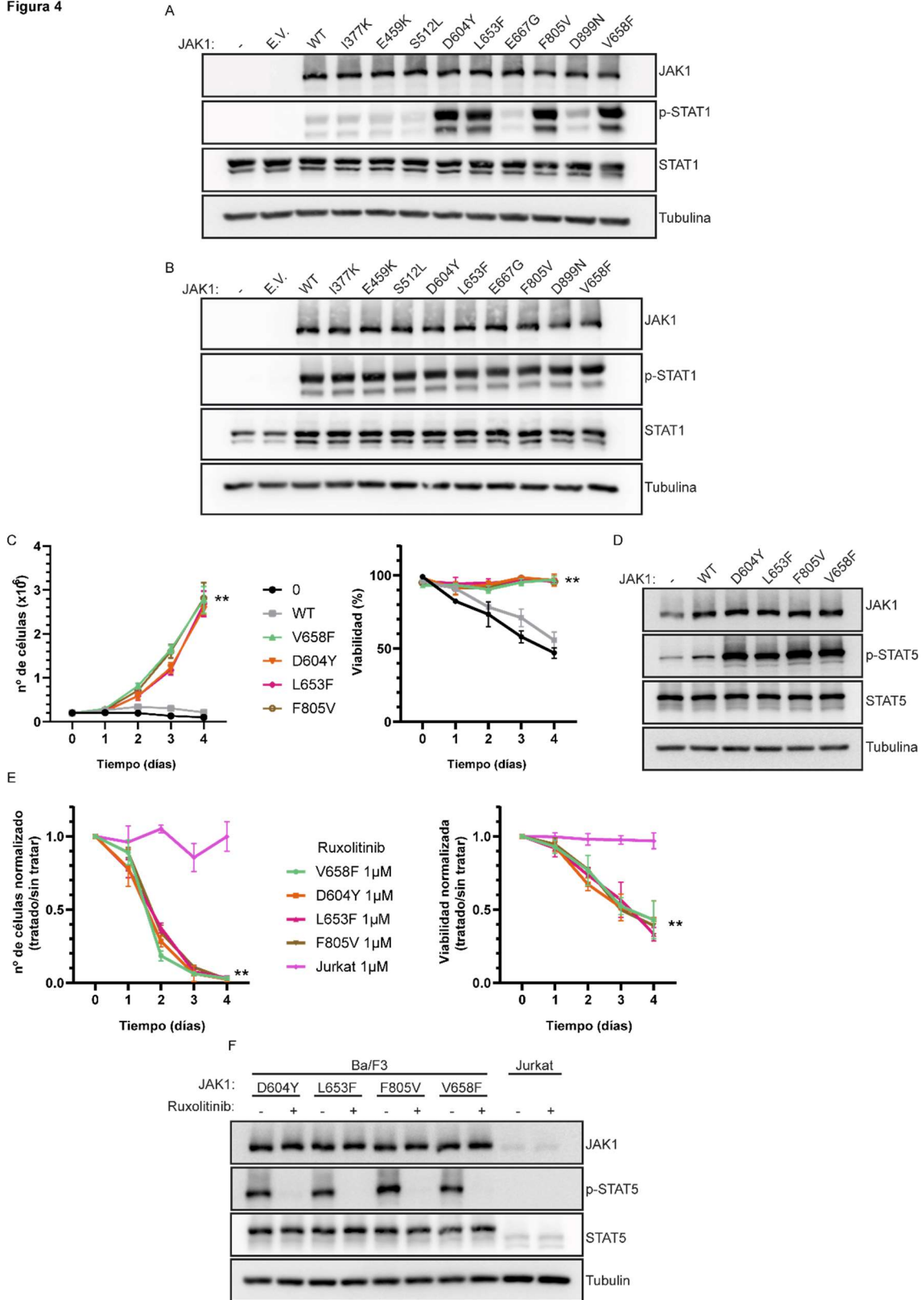
#### 4.1. Análisis de las mutaciones que afectan al gen *JAK1*.

Para determinar el potencial oncogénico de las mutaciones en *JAK1* I377K, E459K, S512L, D604Y, L653F, E667G, L805V analizamos su capacidad para promover la fosforilación sostenida de STAT1 tanto en presencia como en ausencia de interferón gamma, que actúa como inductor de la vía JAK/STAT a través de la activación

específica de JAK1 y STAT1. (Figura 4A y B). Nuestros resultados demuestran que las mutaciones en *JAK1* D604Y, L653F y F805V, al igual que la mutación V658F que empleamos como control positivo<sup>77</sup>, son capaces de activar la vía JAK/STAT en mayor medida que la proteína JAK1 salvaje en ausencia interferón gamma. Adicionalmente, estas mutaciones son capaces de inducir la fosforilación sostenida de STAT5 y la proliferación celular independiente de interleuquina-3 en las células Ba/F3 (Figura 4C y D). Para comprobar que dichos efectos se han producido específicamente por la actividad quinasa aberrante de los mutantes de JAK1, las células se trataron con Ruxolitinib, un inhibidor específico de las proteínas JAK1 y JAK2 (Figura 4E y F).



Figura 4



#### Figura 4. Análisis del potencial oncogénico de las mutaciones seleccionadas en *JAK1*.

A. Western blot para las proteínas JAK1, p-STAT1, STAT1 y Tubulina en las células U4A sin transfectar (-) o transfectadas bien con el vector vacío (EV), bien con la secuencia salvaje del gen *JAK1* (*JAK1*<sup>WT</sup>) o bien con diferentes versiones mutadas del mismo (*JAK1*<sup>V658F</sup>, *JAK1*<sup>I377K</sup>, *JAK1*<sup>E459K</sup>, *JAK1*<sup>S512L</sup>, *JAK1*<sup>D604Y</sup>, *JAK1*<sup>L653F</sup>, *JAK1*<sup>E667G</sup>, *JAK1*<sup>L805V</sup> o *JAK1*<sup>D899N</sup>) y estimuladas con interferón gamma (10ng/ml).

B. Western blot para las proteínas JAK1, p-STAT1, STAT1 y Tubulina en las células U4A sin transfectar (-) o transfectadas bien con el vector vacío (EV), bien con la secuencia salvaje del gen *JAK1* (*JAK1*<sup>WT</sup>) o bien con diferentes versiones mutadas del mismo (*JAK1*<sup>V658F</sup>, *JAK1*<sup>I377K</sup>, *JAK1*<sup>E459K</sup>, *JAK1*<sup>S512L</sup>, *JAK1*<sup>D604Y</sup>, *JAK1*<sup>L653F</sup>, *JAK1*<sup>E667G</sup>, *JAK1*<sup>L805V</sup> o *JAK1*<sup>D899N</sup>) en ausencia de interferón gamma. La mutación *JAK1*<sup>V658F</sup>, cuya capacidad para fosforilar a las proteínas STAT en ausencia de citoquinas y factores de crecimiento había sido previamente descrita, se utilizó como control positivo.

C. Análisis del crecimiento celular (izquierda) y de la viabilidad celular (derecha) mediante azul de tripán en las células Ba/F3 sin transducir (0) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK1* (*JAK1*<sup>WT</sup>) o bien con diferentes versiones mutadas del mismo (*JAK1*<sup>V658F</sup>, *JAK1*<sup>D604Y</sup>, *JAK1*<sup>L653F</sup> o *JAK1*<sup>L805V</sup>). La mutación *JAK1*<sup>V658F</sup>, cuya capacidad para promover el crecimiento y la viabilidad de las células Ba/F3 en ausencia de citoquinas había sido previamente descrita, se utilizó como control positivo.

D. Western blot para las proteínas JAK1, p-STAT5, STAT5 y Tubulina en las en las células Ba/F3 sin transducir (-) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK1* (*JAK1*<sup>WT</sup>) o bien con diferentes versiones mutadas del mismo (*JAK1*<sup>V658F</sup>, *JAK1*<sup>D604Y</sup>, *JAK1*<sup>L653F</sup> o *JAK1*<sup>L805V</sup>).

E. Análisis del crecimiento celular (izquierda) y de la viabilidad celular (derecha) mediante azul de tripán en las células Ba/F3 transducidas con diferentes versiones mutadas del gen *JAK1* (*JAK1*<sup>V658F</sup>, *JAK1*<sup>D604Y</sup>, *JAK1*<sup>L653F</sup> o *JAK1*<sup>L805V</sup>) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de Ruxolitinib (0 ó 1µM). Los resultados se han normalizado con respecto a las células sin tratar. Las células Jurkat, que no dependen de la vía de señalización de STAT5 para su proliferación y viabilidad, se usaron como control negativo.

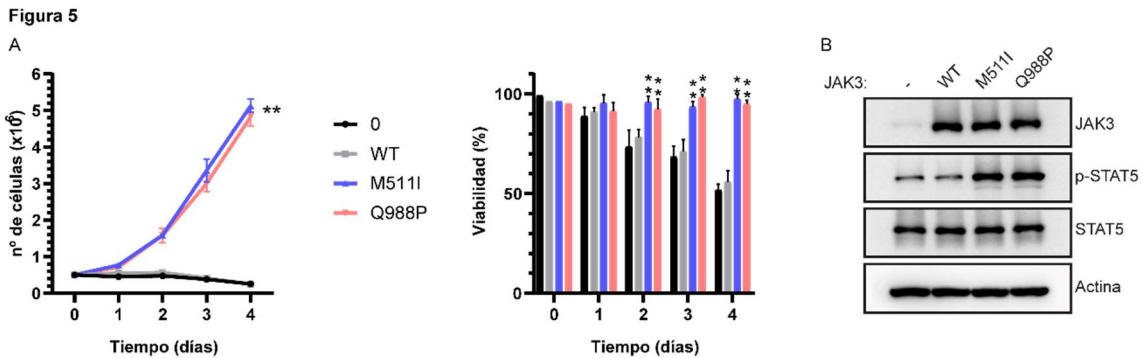
F. Western blot para las proteínas JAK1, p-STAT5, STAT5 y Tubulina en las en las células Ba/F3 transducidas con diferentes versiones mutadas del gen *JAK1* (*JAK1*<sup>V658F</sup>, *JAK1*<sup>D604Y</sup>, *JAK1*<sup>L653F</sup> o *JAK1*<sup>L805V</sup>) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de Ruxolitinib (0 ó 1µM). Las células Jurkat, que no muestran fosforilación en la proteína STAT5, se usaron como control negativo.

Los gráficos muestran la media ± desviación estándar (s.d.) tras tres experimentos independientes. \*p<0,05; \*\*p<0,01. Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

#### 4.2. Análisis de la mutación *JAK3*<sup>Q988P</sup>.

A continuación, pasamos a estudiar las mutaciones que afectan al gen *JAK3* y, concretamente, analizamos la capacidad de la mutación en *JAK3* Q988P para inducir la fosforilación sostenida de STAT5 y el crecimiento celular independiente de citoquinas en las células Ba/F3 (Figura 5A y B). En este sentido, las células que expresan el

mutante de JAK3 Q988P presentan niveles de crecimiento celular, viabilidad y STAT5-fosforilado similares a los inducidos por el mutante M511I<sup>55</sup>, que actúa como control positivo, y claramente superiores a los mostrados por las células no transducidas o transducidas con la secuencia salvaje de *JAK3*.



**Figura 5. Análisis del potencial oncogénico de la mutación en *JAK3* Q988P.**

A. Análisis del crecimiento celular (izquierda) y de la viabilidad celular (derecha) mediante azul de tripán en las células Ba/F3 sin transducir (0) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK3* (*JAK3*<sup>WT</sup>) o bien con diferentes versiones mutadas del mismo (*JAK3*<sup>M511I</sup> o *JAK3*<sup>Q988P</sup>). La mutación *JAK3*<sup>M511I</sup>, cuya capacidad para promover el crecimiento y la viabilidad de las células Ba/F3 en ausencia de citoquinas había sido previamente descrita, se utilizó como control positivo.

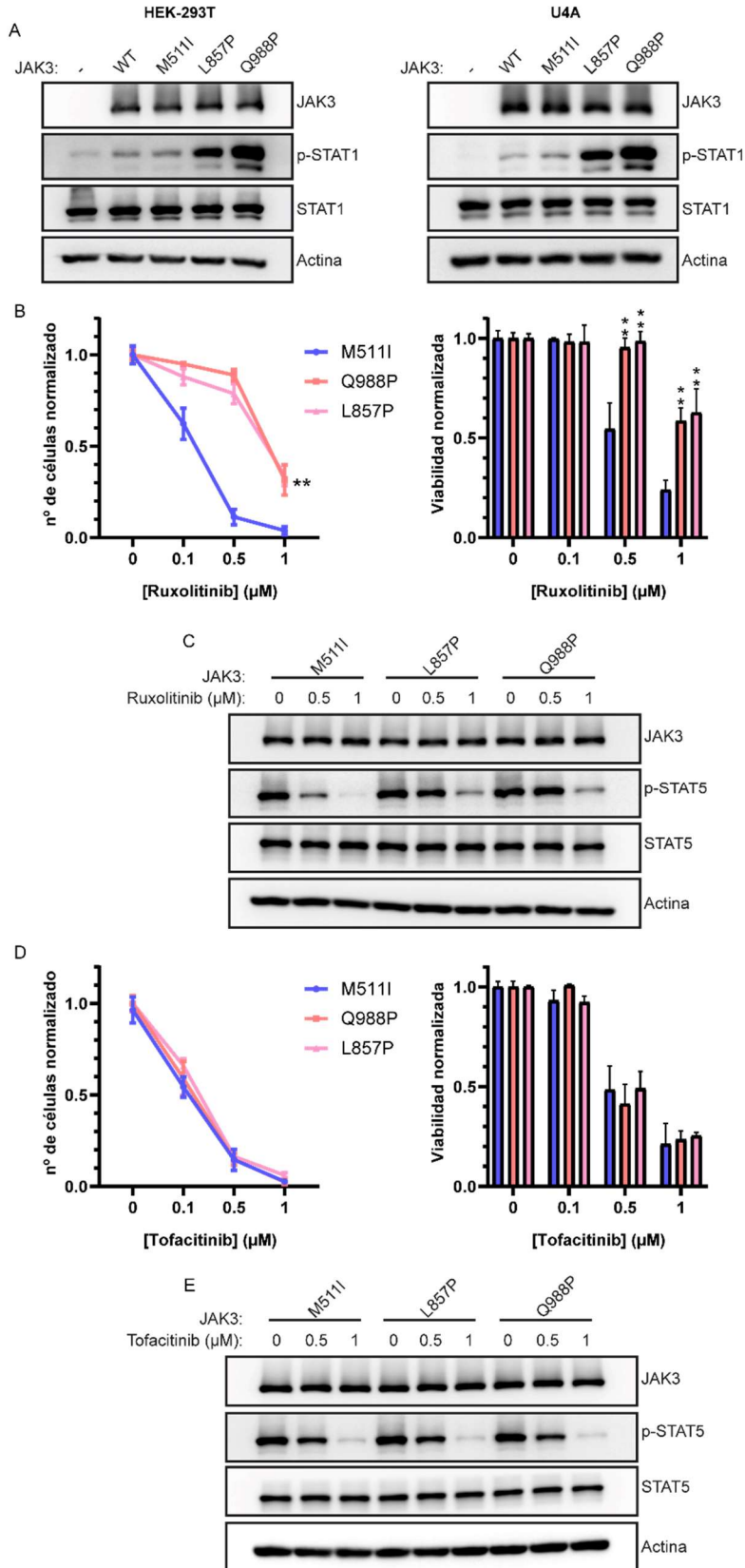
B. Western blot para las proteínas JAK3, p-STAT5, STAT5 y Actina en las en las células Ba/F3 sin transducir (-) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK3* (*JAK3*<sup>WT</sup>) o bien con diferentes versiones mutadas del mismo (*JAK3*<sup>M511I</sup> o *JAK3*<sup>Q988P</sup>).

Los gráficos muestran la media  $\pm$  desviación estándar (s.d.) tras tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

Cuando exploramos los cambios conformacionales inducidos por esta mutación al nivel de la estructura proteica observamos que, al contrario de lo que sucede con la mayoría de las mutaciones que afectan al gen *JAK3* en las T-ALL/LBL, la mutación Q988P no tiene lugar en el dominio pseudoquinasa sino en el dominio quinasa. Concretamente, dicha mutación ocurre en el extremo carboxilo terminal de la proteína, donde las aproximaciones bioinformáticas demuestran que se produciría una interacción entre la proteína *JAK3* y la cola intracelular de la subunidad  $\gamma$  del receptor de interleuquinas. Estos resultados sugieren que la mutación Q988P induciría un estado constitutivamente activado de la proteína *JAK3* por un mecanismo diferente al de la mayoría de las mutaciones oncogénicas en *JAK3* identificadas en pacientes con T-

ALL/LBL y que podría ser independiente de las proteínas IL7R y JAK1. Por consiguiente, analizamos la capacidad del mutante Q988P para inducir la fosforilación sostenida de las proteínas STAT en ausencia de las proteínas IL7R y JAK1 (Figura 6A) mediante su expresión ectópica en las células HEK-293T, que son defectivas en IL7R, y U4A, que son defectivas en IL7R y JAK1. Puesto que la activación constitutiva de la vía JAK/STAT es independiente de las proteínas IL7R y JAK1 solamente ha sido descrita para las mutaciones en *JAK3* L857P y L875H<sup>78</sup>, utilizamos el mutante L857P como control positivo en tanto que en este caso el mutante M511I funciona como control negativo. Adicionalmente, evaluamos la sensibilidad de dichos mutantes frente a los inhibidores Ruxolitinib (Figura 6B y C) y Tofacitinib (Figura 6D y E), que bloquean la actividad de JAK1 y JAK3 respectivamente. Nuestros resultados demuestran que la mutación Q988P es altamente oncogénica porque no solamente es capaz de inducir la fosforilación sostenida de las proteínas STAT, sino que además es capaz de hacerlo independientemente de las proteínas IL7R y JAK1, lo cual disminuye su sensibilidad al tratamiento con Ruxolitinib.

Figura 6



### Figura 6. Caracterización funcional de la mutación en *JAK3* Q988P.

A. Western blot para las proteínas JAK1, p-STAT1, STAT1 y Tubulina en las células HEK-293T (izquierda) y U4A (derecha) sin transfectar (-) o transfectadas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK3* (*JAK3*<sup>WT</sup>) o bien con diferentes versiones mutadas del mismo (*JAK3*<sup>M511I</sup>, *JAK3*<sup>Q988P</sup> o *JAK3*<sup>L857P</sup>). La mutación *JAK3*<sup>L857P</sup>, cuya capacidad para fosforilar a las proteínas STAT independientemente de las proteínas IL7R y JAK1 había sido previamente descrita, se utilizó como control positivo.

B. Análisis del crecimiento celular (izquierda) y de la viabilidad (derecha) mediante azul de tripán en las células Ba/F3 transducidas con diferentes versiones mutadas del gen *JAK3* (*JAK3*<sup>M511I</sup>, *JAK3*<sup>Q988P</sup> o *JAK3*<sup>L857P</sup>) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de Ruxolitinib (0, 0.1, 0.5 ó 1µM). Los resultados se han normalizado con respecto a las células sin tratar. La mutación *JAK3*<sup>L857P</sup>, cuya menor sensibilidad a Ruxolitinib había sido previamente descrita, se utilizó como control positivo en tanto que la mutación *JAK3*<sup>M511I</sup> funciona en este caso como control negativo. Las comparaciones se han realizado frente a la mutación *JAK3*<sup>M511I</sup>.

C. Western blot para las proteínas JAK3, p-STAT5, STAT5 y Actina en las en las células Ba/F3 transducidas con diferentes versiones mutadas del gen *JAK3* (*JAK3*<sup>M511I</sup>, *JAK3*<sup>Q988P</sup> o *JAK3*<sup>L857P</sup>) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de Ruxolitinib (0, 0.5 ó 1µM).

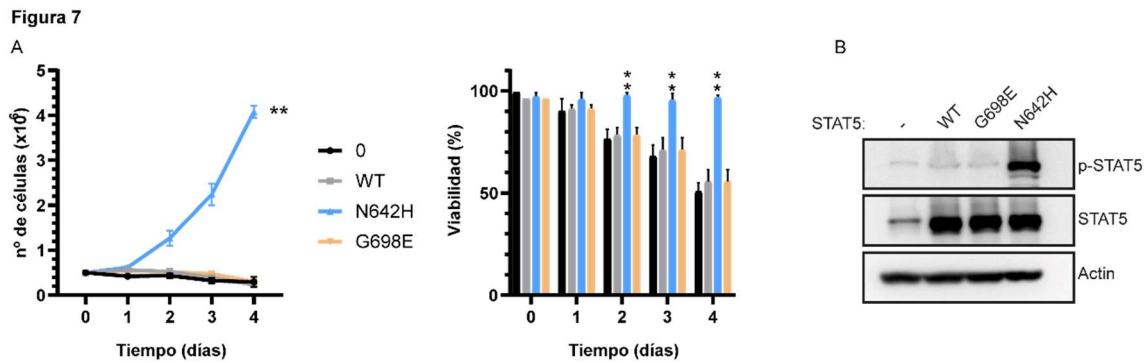
D. Análisis del crecimiento celular (izquierda) y de la viabilidad celular (derecha) mediante azul de tripán en las células Ba/F3 transducidas con diferentes versiones mutadas del gen *JAK3* (*JAK3*<sup>M511I</sup>, *JAK3*<sup>Q988P</sup> o *JAK3*<sup>L857P</sup>) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de Tofacitinib (0, 0.1, 0.5 ó 1µM). Los resultados se han normalizado con respecto a las células sin tratar. Las comparaciones se han realizado frente a la mutación *JAK3*<sup>M511I</sup>.

E. Western blot para las proteínas JAK3, p-STAT5, STAT5 y Actina en las en las células Ba/F3 transducidas con diferentes versiones mutadas del gen *JAK3* (*JAK3*<sup>M511I</sup>, *JAK3*<sup>Q988P</sup> o *JAK3*<sup>L857P</sup>) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de Tofacitinib (0, 0.5 ó 1µM).

Los gráficos muestran la media ± desviación estándar (s.d.) tras tres experimentos independientes. \*p<0,05; \*\*p<0,01. Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

### 4.3. Análisis de la mutación *STAT5*<sup>G698E</sup>.

Con respecto a la caracterización funcional de la mutación en *STAT5* G698E, los ensayos funcionales realizados demuestran que dicha mutación no es capaz de inducir la fosforilación sostenida de STAT5 ni la proliferación celular independiente de interleuquina-3 en las células Ba/F3 (7A y B). Curiosamente, la mutación G698E aparece en combinación con la mutación también en *STAT5* N642H, cuyo carácter oncogénico se había descrito previamente<sup>79</sup>. En este sentido, es probable que la mutación G698E no contribuya al desarrollo tumoral por sí sola, sino que simplemente podría incrementar el potencial oncogénico de la mutación N642H.



**Figura 7. Análisis del potencial oncogénico de la mutación en *STAT5* G698E.**

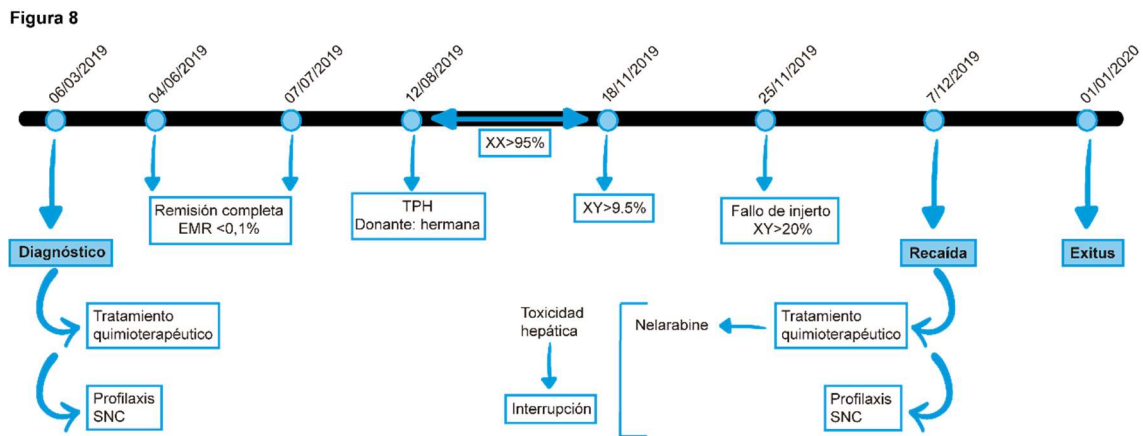
A. Análisis del crecimiento celular (izquierda) y de la viabilidad celular (derecha) mediante azul de tripán en las células Ba/F3 sin transducir (0) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *STAT5* (*STAT5*<sup>WT</sup>) o bien con diferentes versiones mutadas del mismo (*STAT5*<sup>N642H</sup> o *STAT5*<sup>G698E</sup>). La mutación *STAT5*<sup>N642H</sup>, cuya capacidad para promover el crecimiento y la viabilidad de las células Ba/F3 en ausencia de citoquinas había sido previamente descrita, se utilizó como control positivo.

B. Western blot para las proteínas p-STAT5, STAT5 y Actina en las en las células Ba/F3 sin transducir (-) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *STAT5* (*STAT5*<sup>WT</sup>) o bien con diferentes versiones mutadas del mismo (*STAT5*<sup>N642H</sup> o *STAT5*<sup>G698E</sup>). Los gráficos muestran la media  $\pm$  desviación estándar (s.d.) tras tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

#### 4.4. Identificación y caracterización funcional de la fusión SEPTIN6-ABL2.

El análisis de los exomas para la búsqueda de mutaciones somáticas implicadas en el desarrollo de las neoplasias linfoblásticas de células T demostró que el paciente 14 no presentaba ninguna mutación al diagnóstico y solamente dos mutaciones de cambio de pauta de lectura en el gen *PTPRC* en recidiva. Este gen codifica para una proteína tirosina-fosfatasa que actúa como un regulador negativo de la vía de STAT5 y que, como en este caso, sufre frecuentemente mutaciones de pérdida de función, por lo que es considerado como un gen supresor de tumores en las T-ALL/LBL. Ahora bien, la vía JAK/STAT está estrictamente regulada en las células normales y se ha demostrado que las mutaciones en *PTPRC* no son capaces de inducir por sí solas una activación constitutiva de STAT5 sino que cooperan con otras alteraciones, dentro de un proceso aditivo, para promover la fosforilación sostenida de STAT5<sup>59</sup>. Sin embargo, en el paciente 14 no se habían detectado mutaciones adicionales que hayan sido previamente descritas como susceptibles de promover la activación constitutiva de

STAT5, lo que sugería la presencia de nuevas alteraciones que todavía no hubieran sido identificadas.



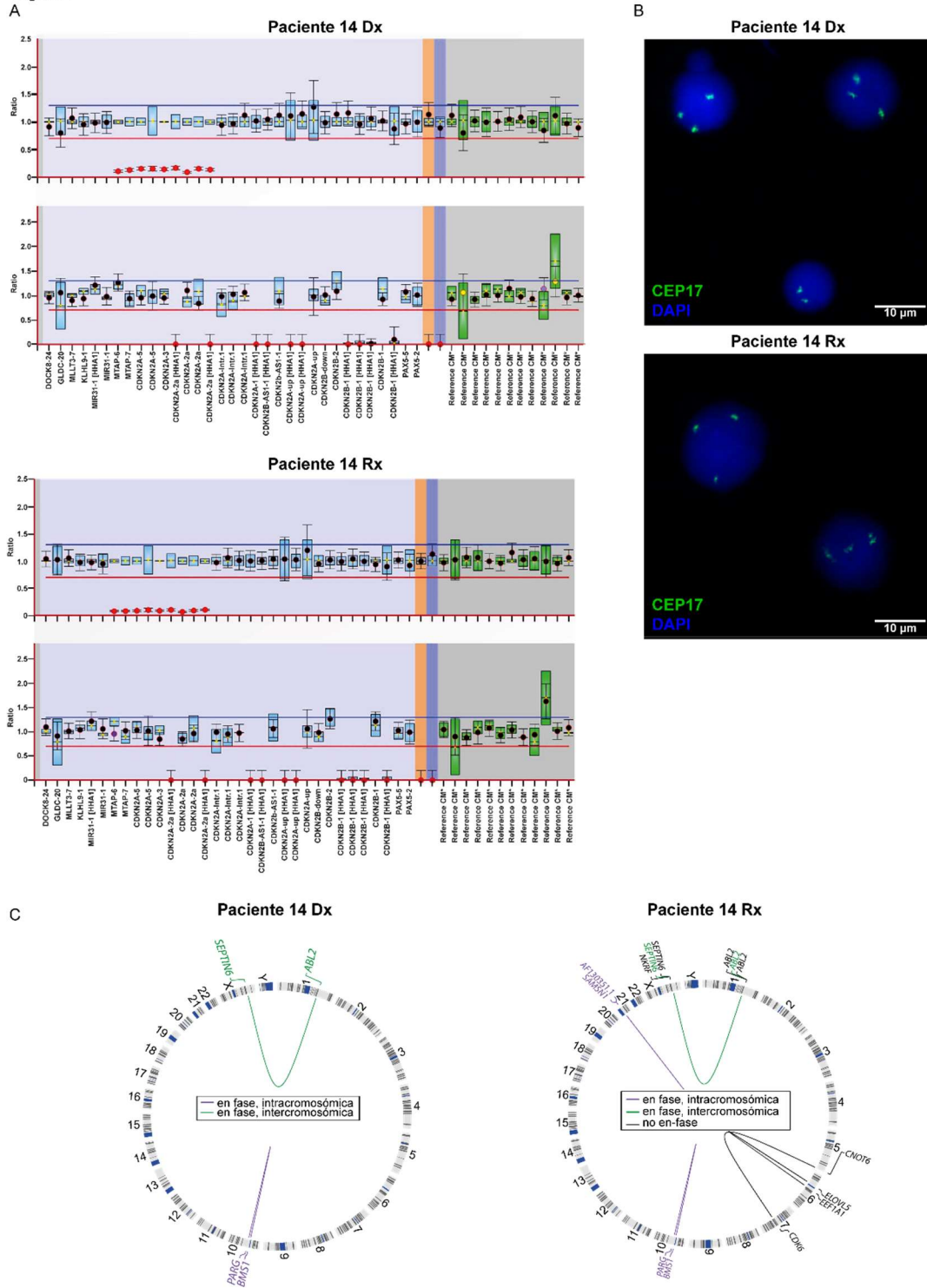
**Figura 8. Historial clínico del paciente 14.** SNC: Sistema nervioso central. EMR: enfermedad mínima residual. TPH: trasplante de progenitor hematopoyético.

El paciente indexado como 14 se corresponde con un varón de 16 años diagnosticado con T-ALL, tratado con la quimioterapia correspondiente al protocolo LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 y que, posteriormente, recibió un trasplante de medula ósea. Sin embargo, pasado un año el paciente sufrió una recaída y fue tratado con Nelarabine pero desarrolló toxicidad hepática, de modo que el tratamiento fue suspendido y, lamentablemente, el paciente falleció un mes después (Figura 8). En busca de alteraciones adicionales que pudiesen explicar la agresividad de este tumor, realizamos un análisis de hibridación genómica comparativa (aCGH) para identificar posibles variaciones en el número de copias y observamos una trisomía del cromosoma 17 (Figura 9A) y una delección homocigótica del gen *CDKN2A* (Figura 9B) que fueron confirmadas mediante dos protocolos adicionales (FISH y MLPA). Aunque la trisomía del cromosoma 17 no se podría considerar en principio como un evento decisivo en el desarrollo tumoral<sup>80</sup>, el gen *CDKN2A* es un gen supresor de tumores que codifica para la proteína p16INK4A y que sufre frecuentemente mutaciones de pérdida de función en los pacientes con T-ALL/LBL<sup>36</sup>. Ambas alteraciones están asociadas con un buen pronóstico en este tipo de neoplasias hematológicas<sup>81</sup>, lo que sugería la existencia de otras alteraciones adicionales capaces de actuar como oncogenes y promover el desarrollo tumoral. Por este motivo el paso siguiente fue analizar la presencia de transcritos de fusión en las muestras tumorales del paciente (Figura 9C). Dicho análisis,



reveló la presencia de dos fusiones al diagnóstico y de siete fusiones en la recaída. Entre todas ellas, la fusión SEPTIN6-ABL2 es la única que implica a genes codificantes de diferentes cromosomas y que mantiene la pauta de lectura. Consecuentemente, confirmamos la presencia de esta nueva fusión en las muestras tumorales del paciente, tanto al diagnóstico como en recaída, mediante la utilización de una sonda de translocación para *ABL2*, previamente existente (Figura 10A), y de una sonda de doble fusión para SEPTIN6-ABL2, que ha sido específicamente desarrollada para este caso (Figura 10B). Además, identificamos que el punto de fusión se encuentra entre el intrón 8-9 de *SEPTIN6* y el intrón 4-5 de *ABL2* y que se han añadido dos citosinas adicionales (Figura 10C). En consecuencia, la fusión SEPTIN6-ABL2 implica al extremo 5' del gen *SEPTIN6* y al extremo 3' del gen *ABL2*, que presenta una delección total y parcial de los dominios SH3 y SH2 respectivamente pero que conserva el dominio quinasa y, por tanto, su actividad catalítica (Figura 10D). A continuación, comprobamos que dicha fusión se expresa tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína (Figura 10E y F). Nuestros resultados demuestran la presencia y expresión de la nueva fusión SEPTIN6-ABL2, la primera fusión que implica a cualquiera de estos dos genes directamente identificada tanto al diagnóstico como en recaída en un paciente con T-ALL, sugiriendo que los tratamientos quimioterapéuticos convencionales no habían sido lo suficientemente eficaces como para eliminar o controlar los efectos causados por este determinado clon que podría ser altamente oncogénico.

**Figura 9**



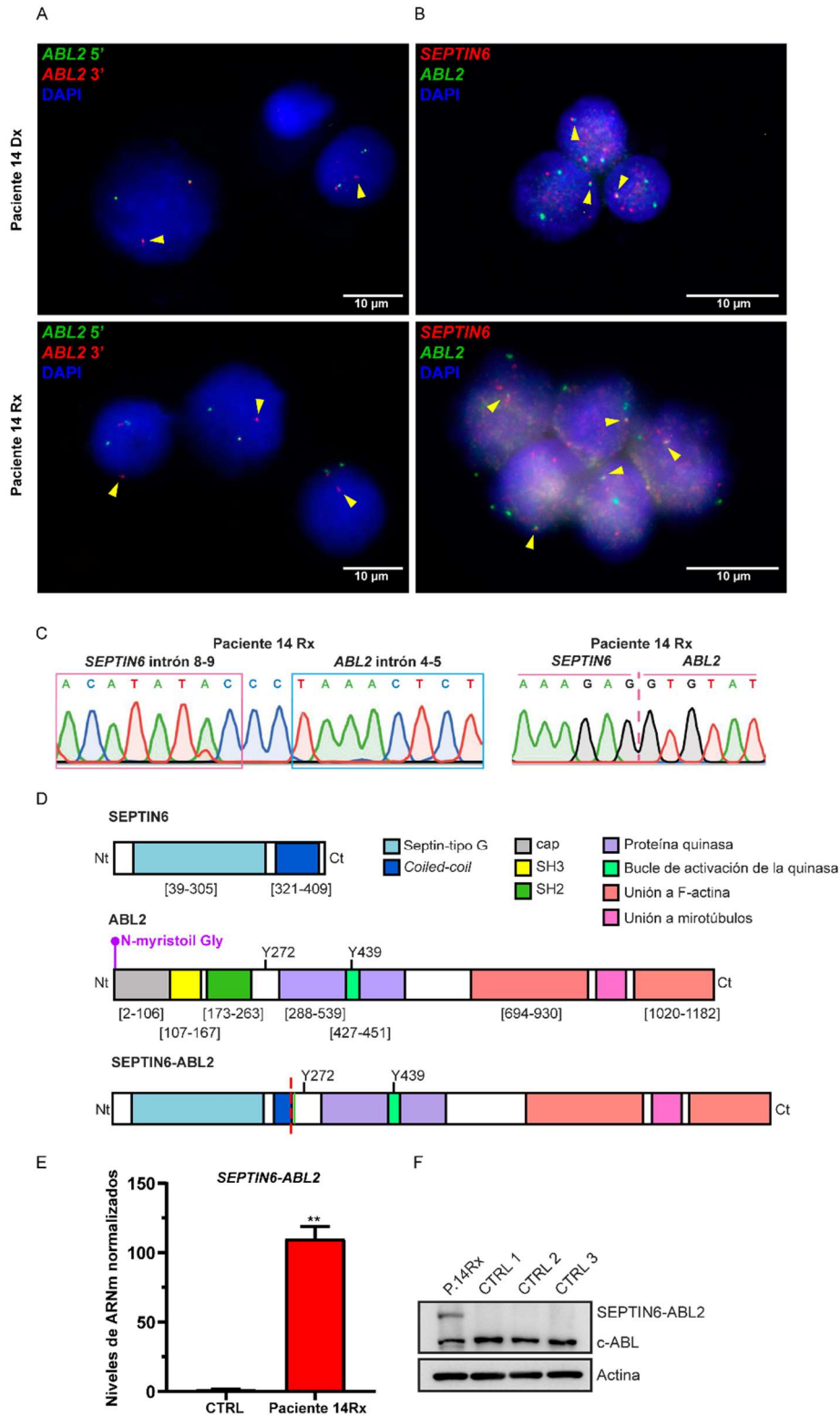
**Figura 9. Análisis de las células tumorales correspondientes al paciente 14.**

A. MLPA (amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples) para el gen *CDKN2A* en las células tumorales del paciente 14 al diagnóstico (Dx) (arriba) y recaída (Rx) (abajo).

B. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando una sonda centromérica para el cromosoma 17 en las células tumorales del paciente 14 al diagnóstico (Dx) (arriba) y recaída (Rx) (abajo). El núcleo se ha teñido con DAPI y se observa en azul. La barra de aumentos representa 10 μm.

C. Análisis de los transcritos de fusión que afectan a genes codificantes en el paciente 14 tanto al diagnóstico (Dx) (izquierda) como en recaída (Rx) (derecha). Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

Figura 10



### Figura 10. Identificación de la fusión SEPTIN6-ABL2.

A. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando una sonda de translocación para *ABL2* en las células tumorales del paciente 14 al diagnóstico (Dx) (arriba) y recaída (Rx) (abajo). El extremo 5' de *ABL2* aparece marcado en verde mientras que el extremo 3' de *ABL2* aparece marcado en rojo. Los puntos rojos que aparecen aislados se corresponderían por tanto con la región de *ABL2* que forma parte de la fusión SEPTIN6-ABL2 y que se indican con una cabeza de flecha amarilla. El núcleo se ha teñido con DAPI y se observa en azul. La barra de aumentos representa 10  $\mu\text{m}$ .

B. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando una sonda de doble fusión para SEPTIN6-ABL2 en las células tumorales del paciente 14 al diagnóstico (Dx) (arriba) y recaída (Rx) (abajo). La región correspondiente a *SEPTIN6* aparece marcada en rojo mientras que la región correspondiente a *ABL2* aparece marcada en verde. La co-localización de un punto rojo con un punto verde se correspondería por tanto con la fusión SEPTIN6-ABL2 y se indica con una cabeza de flecha amarilla. El núcleo se ha teñido con DAPI y se observa en azul. La barra de aumentos representa 10  $\mu\text{m}$ .

C. Electroferograma mostrando el punto de fusión entre los genes *ABL2* y *SEPTIN6* tanto a nivel de ADN genómico (izquierda) como a nivel de ADN complementario (derecha) en las células tumorales del paciente 14 en recaída (Rx).

D. Esquema que muestra los principales dominios de las proteínas SEPTIN6 y ABL2, así como también un modelo predictivo de la estructura correspondiente a la proteína de fusión SEPTIN6-ABL2 en base a la región donde ha tenido lugar el punto de fusión entre los dos genes (que aparece representado por una línea roja discontinua).

E. qPCR para los transcritos correspondientes a la fusión SEPTIN6-ABL2 en timocitos normales (CTRL) y en las células tumorales del paciente 14 en recaída (Rx). Los resultados se han normalizado frente a los timocitos.

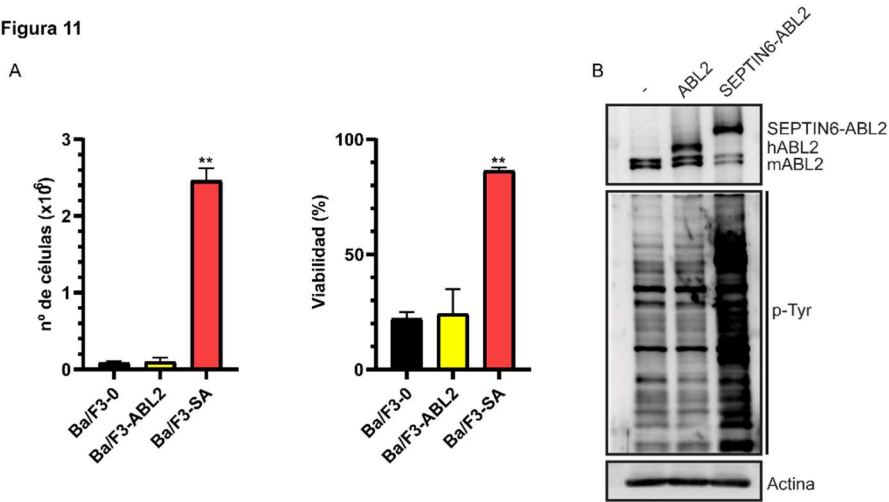
F. Western blot para las proteínas ABL y Actina en timocitos normales (CTRL) y en las células tumorales del paciente 14 en recaída (Rx).

Los gráficos muestran la media  $\pm$  desviación estándar (s.d.) tras tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

Puesto que en las muestras tumorales correspondientes al paciente 14 no se había identificado ningún oncogén y que los genes ABL, tanto *ABL1* como *ABL2*, pueden ser considerados como proto-oncogenes<sup>82</sup>, parece razonable pensar que la fusión SEPTIN6-ABL2 podría ser el evento oncogénico clave para el desarrollo de este tumor contribuyendo a su origen y agresividad. En consecuencia, evaluamos su capacidad para inducir la transformación celular y el crecimiento independiente de citoquinas en las células BaF3 (Figura 11A y B). Nuestros resultados demuestran que las células Ba/F3 con expresión ectópica de la fusión SEPTIN6-ABL2 presentan niveles superiores de crecimiento celular, viabilidad y fosforilación mediada por tirosina-quinasa que las

células Ba/F3 no transducidas o que expresan la proteína ABL2 salvaje, lo que postula a la fusión SEPTIN6-ABL2 como un nuevo oncogén.

Figura 11



**Figura 11. Demostración del carácter oncogénico de la fusión SEPTIN6-ABL2.**

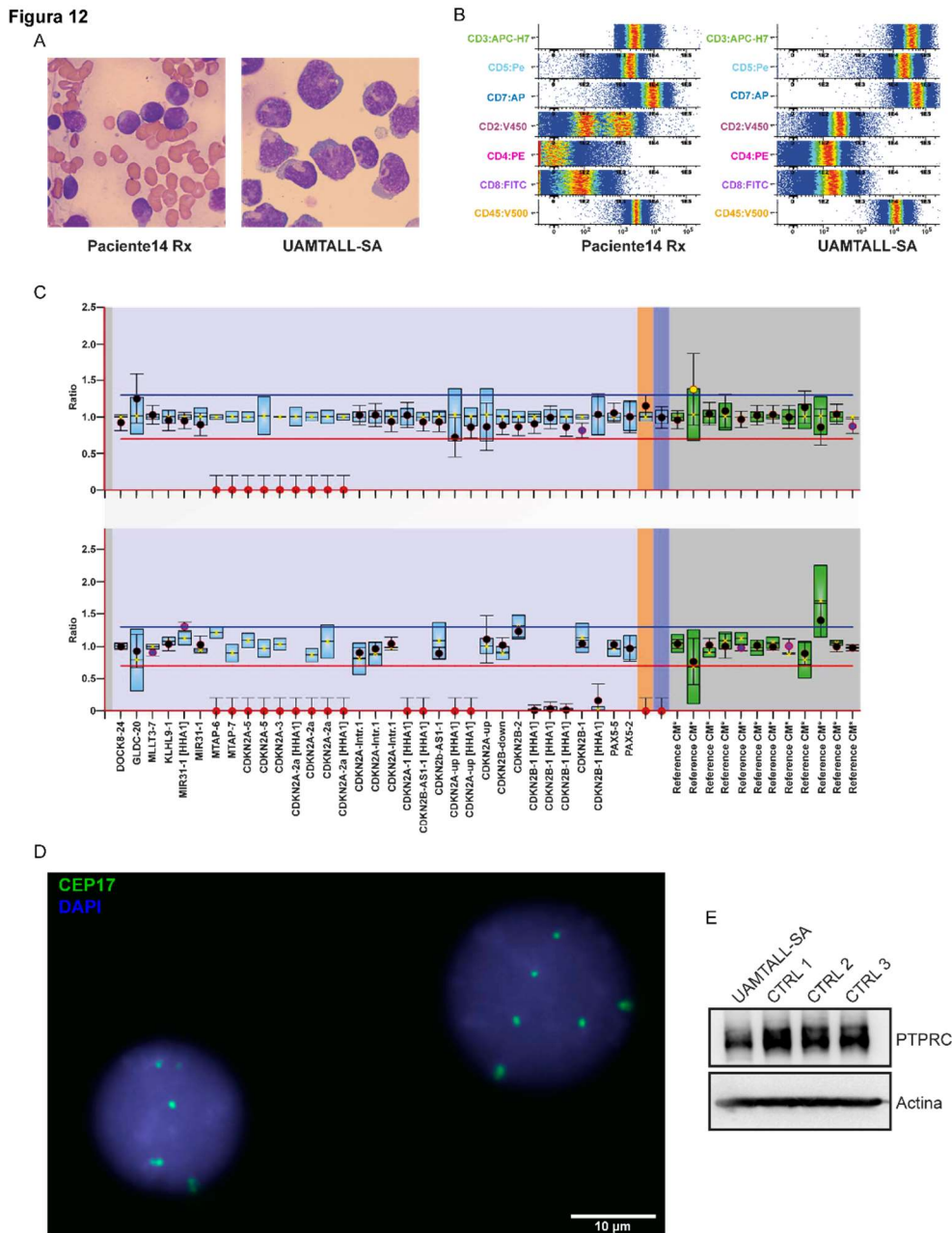
A. Análisis del crecimiento celular (izquierda) y de la viabilidad celular (derecha) mediante azul de tripán en las células Ba/F3 sin transducir (0) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen ABL2 (ABL2<sup>WT</sup>) o bien con la fusión SEPTIN6-ABL2 (SA).

B. Western blot para las proteínas ABL2, p-Tirosinas y Actina en las en las células Ba/F3 sin transducir (-) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen ABL2 (ABL2<sup>WT</sup>) o bien con la fusión SEPTIN6-ABL2.

Los gráficos muestran la media  $\pm$  desviación estándar (s.d.) tras tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

Para estudiar los efectos de la fusión SEPTIN6-ABL2 en el contexto específico de las neoplasias linfoblásticas de células T, establecimos una nueva línea celular a partir de las células tumorales del paciente 14 en recaída y la denominamos UAMTALL-SA. Las células UAMTALL-SA comparten una huella genética única con las células tumorales del paciente 14 en recaída y también mantienen sus características tanto morfológicas como inmunofenotípicas (Figura 12A y B). Además, las células UAMTALL-SA recapitulan las alteraciones previamente identificadas en el paciente, como son: la delección homocigótica de *CDKN2A* (Figura 12C), la trisomía del cromosoma 17 (Figura 12D), la disminución en los niveles de PTPRC (Figura 12E), y la presencia de la fusión SEPTIN6-ABL2 (Figura 13A y B). Resulta también interesante constatar el aumento en el número de copias del gen de fusión SEPTIN6-ABL2 debido a la aparición de una nueva

duplicación cromosómica que implica las citobandas 1q23.2q25.2 y Xq24q28, lo que apoyaría aún más la importancia de esta sugiriendo la adición oncogénica de las células tumorales a la misma (Figura 13C-E).



**Figura 12. Análisis de las alteraciones presentes en la línea celular UAMTALL-SA.**

A. Análisis morfológico de las células tumorales del paciente 14 en recaída (Rx) (izquierda) y de la línea celular derivada UAMTALL-SA (derecha).

B. Análisis inmunofenotípico de las células tumorales del paciente 14 en recaída (Rx) (izquierda) y de la línea celular derivada UAMTALL-SA (derecha). Se han utilizado diferentes marcadores propios de linaje de células T.

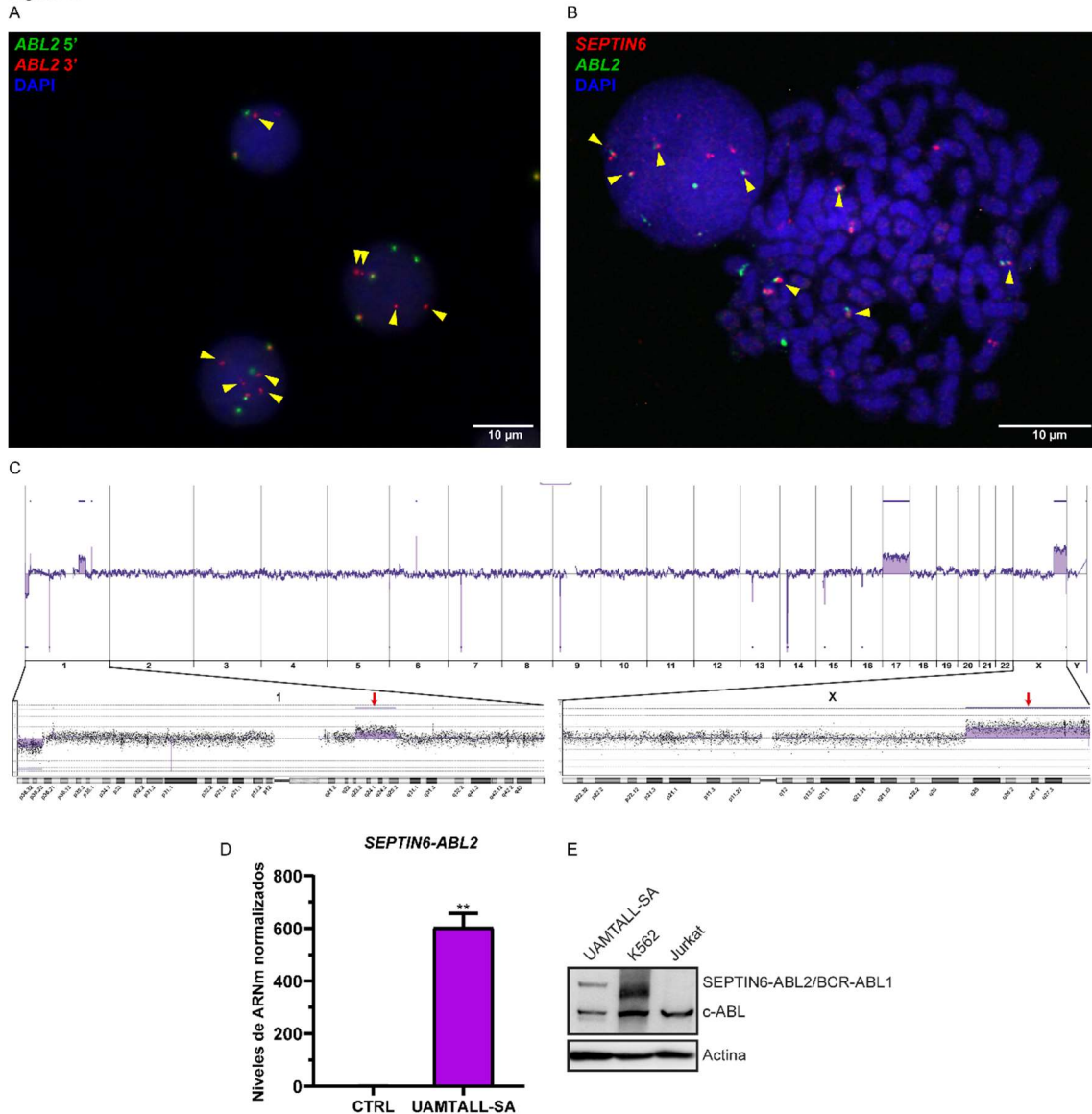
C. MLPA (amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples) para el gen *CDKN2A* en las células UAMTALL-SA.

D. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando una sonda centromérica para el cromosoma 17 en las células UAMTALL-SA. El núcleo se ha teñido con DAPI y se observa en azul. La barra de aumentos representa 10  $\mu\text{m}$ .

E. Western blot para las proteínas PTPRC y Actina en las células UAMTALL-SA y en timocitos normales (CTRL).

Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

Figura 13



**Figura 13. Presencia y expresión de la fusión SEPTIN6-ABL2 en la línea celular UAMTALL-SA.**

A. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando una sonda de translocación para *ABL2* en las células UAMTALL-SA. El extremo 5' de *ABL2* aparece marcado en verde mientras que el extremo 3' de *ABL2* aparece marcado en rojo. Los puntos rojos que aparecen aislados se corresponderían por tanto con la región de *ABL2* que forma parte de la fusión SEPTIN6-ABL2 y

se indican con una cabeza de flecha amarilla. El núcleo se ha teñido con DAPI y se observa en azul. La barra de aumentos representa 10  $\mu\text{m}$ .

B. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando una sonda de doble fusión para SEPTIN6-ABL2 en las células UAMTALL-SA. La región correspondiente a *SEPTIN6* aparece marcada en rojo mientras que la región correspondiente a *ABL2* aparece marcada en verde. La co-localización de un punto rojo con un punto verde se correspondería por tanto con la fusión SEPTIN6-ABL2 y se indica con una cabeza de flecha amarilla. El núcleo se ha teñido con DAPI y se observa en azul. La barra de aumentos representa 10  $\mu\text{m}$ .

C. Análisis del número de copias (VNC) mediante hibridación genómica comparativa (aCGH) en las células UAMTALL-SA. Se muestran en detalle los cromosomas 1 y X que presentan respectivamente las duplicaciones 1q23.2q25.2 (donde *ABL2* se corresponde con el primer gen) y Xq24q28 (donde *SEPTIN6* se corresponde con el último gen) que aparecen marcadas con flechas rojas.

D. qPCR para los transcritos correspondientes a la fusión SEPTIN6-ABL2 en timocitos normales (CTRL) y en las células UAMTALL-SA. Los resultados se han normalizado frente a los timocitos.

E. Western blot para la proteína ABL en las células UAMTALL-SA, K562 y Jurkat. Las células K562 presentan la fusión oncogénica BCR-ABL1 y se utilizan como control positivo, en tanto que las células Jurkat no muestran ninguna fusión para los genes *ABL* y se utilizan como control negativo.

Los gráficos muestran la media  $\pm$  desviación estándar (s.d.) tras tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

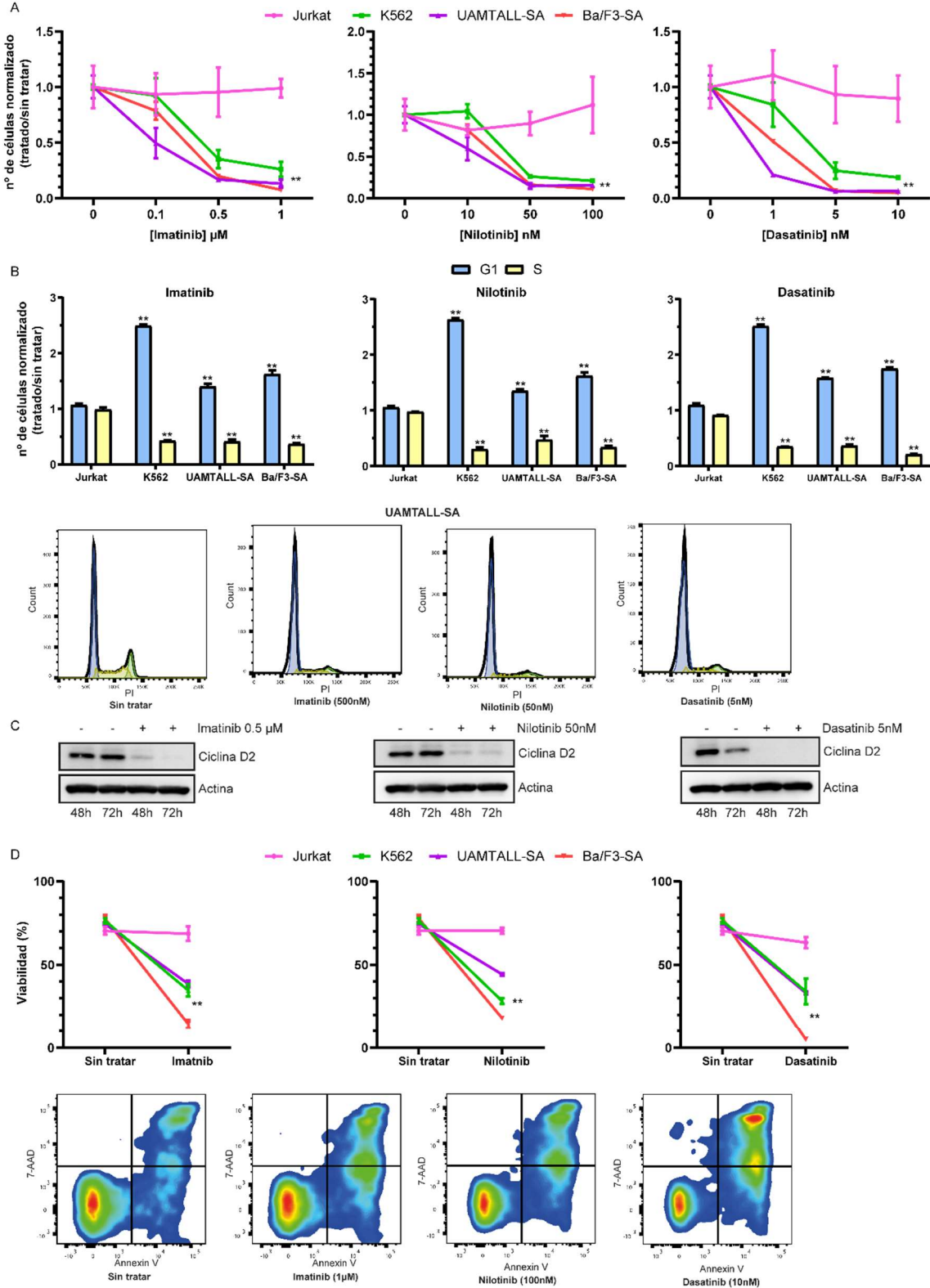
#### **4.5. Terapia dirigida basada en la fusión SEPTIN6-ABL2.**

Puesto que los tratamientos quimioterapéuticos convencionales resultaron insuficientes para el paciente, nos preguntamos si los inhibidores de tirosina-quinasa, que son frecuentemente utilizados para el tratamiento de otras fusiones oncogénicas que implican a los genes *ABL1* y *ABL2*, hubieran sido útiles frente a este tumor. Ahora bien, al contrario de lo que sucede en la mayoría de fusiones que implican a los genes *ABL1* o *ABL2* y como ya se ha mencionado anteriormente, la fusión SEPTIN6-ABL2 carece de los dominios SH2 y SH3 de *ABL2*, donde se ha descrito que la aparición de diferentes mutaciones puede modular la actividad de los inhibidores de tirosina-quinasa<sup>83</sup>. Consecuentemente, utilizamos tres inhibidores de tirosina-quinasa, como son Imatinib, Nilotinib y Dasatinib, para tener en cuenta las posibles diferencias derivadas de la particular estructura que rodea al dominio quinasa de *ABL2* en esta fusión. Además, incluimos en los ensayos a las células K562 y Jurkat que funcionan como controles positivo y negativo respectivamente puesto que su sensibilidad a los inhibidores de tirosina-quinasa ha sido previamente estudiada. Nuestros resultados



demuestran la eficacia de Imatinib, Nilotinib y Dasatinib para inhibir el crecimiento celular tanto en las células Ba/F3 que expresan ectópicamente la fusión SEPTIN6-ABL2 como en las células UAMTALL-SA, donde la fusión SEPTIN6-ABL2 coexiste con el resto de las alteraciones características del tumor (Figura 14A). Para determinar si la reducción observada en el crecimiento celular es la consecuencia de un bloqueo en el ciclo celular, analizamos el perfil de ciclo de las células, así como también los niveles de la proteína CiclinaD2, debido a su importancia para la transición G1/S<sup>84</sup> (Figura 14B y C). Por último, analizamos los niveles de viabilidad celular para determinar si los inhibidores de tirosina-quinasa producen un incremento en la apoptosis (Figura 14D). Nuestros resultados demuestran que Imatinib, Nilotinib y Dasatinib reducen de forma eficiente el crecimiento celular, la viabilidad y la transición G1/S tanto en las células Ba/F3 con expresión ectópica de la fusión SEPTIN6-ABL2 como en las células UAMTALL-SA, postulando de este modo a los inhibidores de tirosina-quinasa como un tratamiento potencial para aquellos tumores que presenten el oncogén SEPTIN6-ABL2.

Figura 14



**Figura 14. Sensibilidad de la fusión SEPTIN6-ABL2 a los inhibidores de tirosina-quinasa.**

A. Análisis del crecimiento celular mediante azul de tripán en las células Jurkat, K562, UAMTALL-SA y Ba/F3 transducidas con la fusión SEPTIN6-ABL2 (Ba/F3-SA), que han sido tratadas con diferentes concentraciones de los inhibidores Imatinib (0, 0.1, 0.5 ó 1  $\mu$ M), Nilotinib (0, 10, 50 ó 100nM) y Dasatinib (0, 1, 5 ó 10nM). Los resultados se han normalizado

con respecto a las células sin tratar. Las células K562 y Jurkat funcionan como controles positivo y negativo respectivamente.

B. Análisis del ciclo celular mediante yoduro de propidio en las células Jurkat, K562, UAMTALL-SA y Ba/F3 transducidas con la fusión SEPTIN6-ABL2, que han sido tratadas con diferentes concentraciones de los inhibidores Imatinib (0 ó 0.5 $\mu$ M), Nilotinib (0 ó 50nM) y Dasatinib (0 ó 5nM). Los resultados correspondientes a las fases G<sub>1</sub> y S se han normalizado con respecto a las células sin tratar. A continuación, se muestran imágenes representativas para las células UAMTALL-SA.

C. Western blot para las proteínas CiclinaD2 y Actina en las células UAMTALL-SA tratadas con diferentes concentraciones de los inhibidores Imatinib (0 ó 0.5 $\mu$ M), Nilotinib (0 ó 50nM) y Dasatinib (0 ó 5nM).

D. Análisis de la viabilidad celular mediante AnnexinaV y 7AAD en las Jurkat, K562, UAMTALL-SA y Ba/F3 transducidas con la fusión SEPTIN6-ABL2, que han sido tratadas con diferentes concentraciones de los inhibidores Imatinib (0 ó 1  $\mu$ M), Nilotinib (0 ó 100nM) y Dasatinib (1 ó 10nM). Los resultados se han normalizado con respecto a las células sin tratar. A continuación, se muestran imágenes representativas para las células UAMTALL-SA.

Los gráficos muestran la media  $\pm$  desviación estándar (s.d.) tras tres experimentos independientes. \*p<0,05; \*\*p<0,01. Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

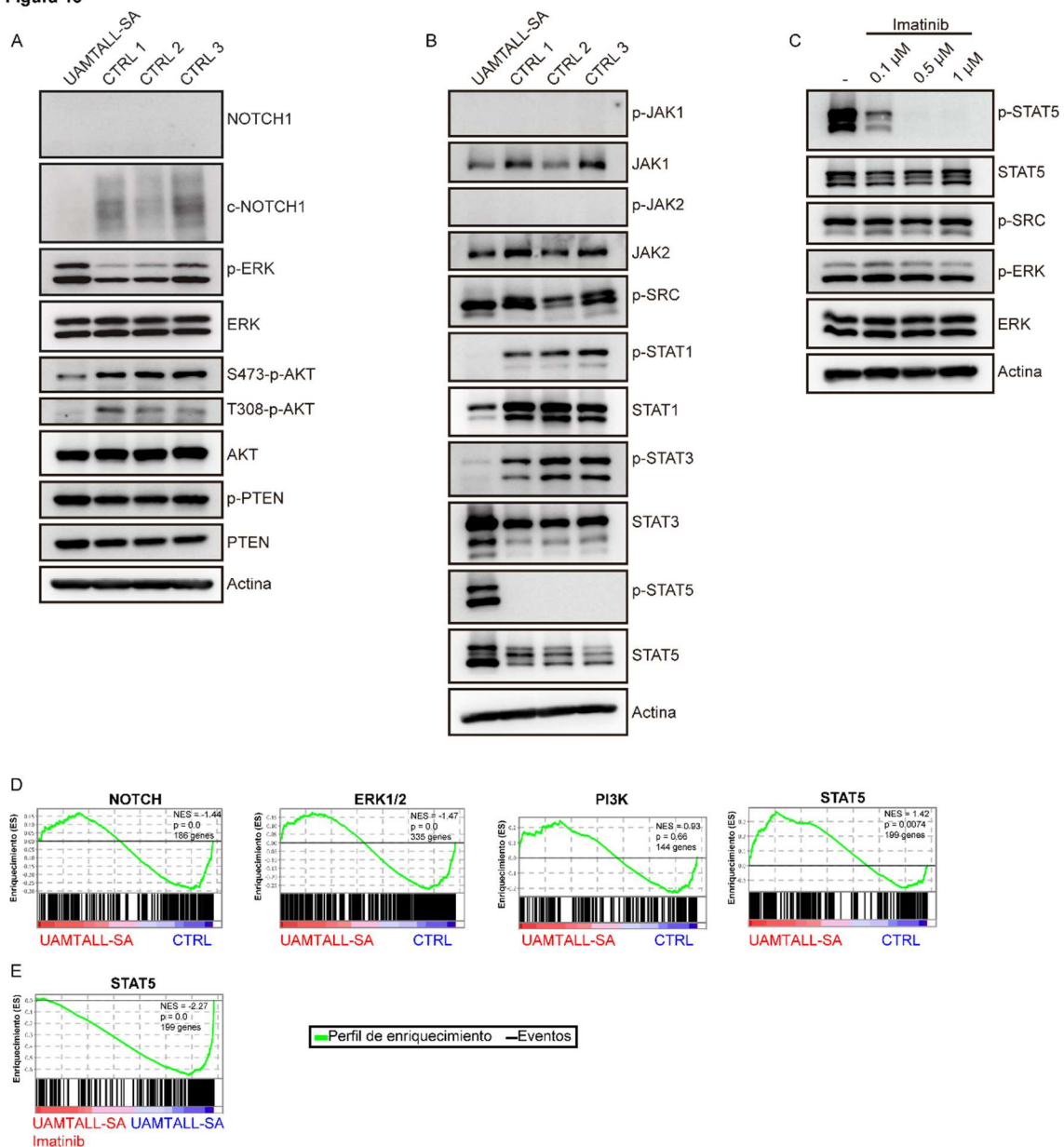
Puesto que las bases moleculares subyacentes a las fusiones de *ABL2* identificadas en los pacientes con T-ALL/LBL no se han explorado hasta el momento, nos planteamos estudiar cuales serían las dianas específicas de la fusión SEPTIN6-ABL2 que promueven el desarrollo tumoral en las células UAMTALL-SA. La especificidad de dichas dianas suele estar determinada por el otro gen que forma parte de la fusión, que en este caso es *SEPTIN6*<sup>85</sup>, así como también por el origen de la célula tumoral, que en este caso son linfoblastos tumorales comprometidos con el linaje de células T. En base a esto, es probable que la fusión SEPTIN6-ABL2 no promueva el desarrollo tumoral por mecanismos idénticos a los utilizados por otras fusiones que también implican a los genes *ABL1* o *ABL2*, como es el caso de la fusión BCR-ABL1<sup>86-92</sup>. Para comprobarlo, analizamos mediante GSEA y Western blot el estatus de activación de las principales vías de señalización que aparecen desreguladas en las T-ALL/LBL (Figura 15A-E).

Nuestros resultados descartan la activación de la vía de señalización de NOTCH y demuestran que la fusión SEPTIN6-ABL2, al contrario que otras fusiones que también implican a los genes *ABL1* o *ABL2*, no produce una activación directa de las vías de señalización de PI3K/AKT ni de MAPK/ERK sino solamente de la vía de STAT5.

Curiosamente, dicha activación se limita a la proteína STAT5, a pesar de la presencia de

niveles relevantes de otros miembros de la familia STAT que también juegan un papel importante en el desarrollo tumoral, tales como STAT1 o STAT3. Además, la activación de STAT5 resulta independiente de los niveles de fosforilación de las familias de proteínas JAK y SRC, que son tirosinas-quinasas frecuentemente implicadas en la fosforilación de STAT5 y que pueden presentar mutaciones de ganancia de función en las T-ALL/LBL. Por último, la activación de STAT5 puede ser revertida mediante el tratamiento con los inhibidores de tirosina-quinasas, Imatinib, Nilotinib y Dasatinib, cuya eficacia frente a la fusión SEPTIN6-ABL2 ha sido previamente demostrada, indicando que STAT5 es una diana específica de la fusión SEPTIN6-ABL2.

Figura 15



**Figura 15. Vías de señalización inducidas por la fusión SEPTIN6-ABL2.**

A. Western blot para las proteínas c-NOTCH1, NOTCH1, p-ERK, ERK, p-AKT(S473), p-AKT (T308), AKT, p-PTEN, PTEN y Actina en las células UAMTALL-SA y timocitos normales.

B. Western blot para las proteínas p-JAK1, JAK1, p-JAK2, JAK2, p-SRC, p-STAT1, STAT1, p-STAT3, STAT3, p-STAT5, STAT5 y Actina en las células UAMTALL-SA y timocitos normales.

C. Western blot para las proteínas p-SRC, p-STAT5, STAT5, p-ERK, ERK y Actina en las células UAMTALL-SA sin tratar o tratadas con Imatinib (0, 0.1, 0.5 ó 1µM).

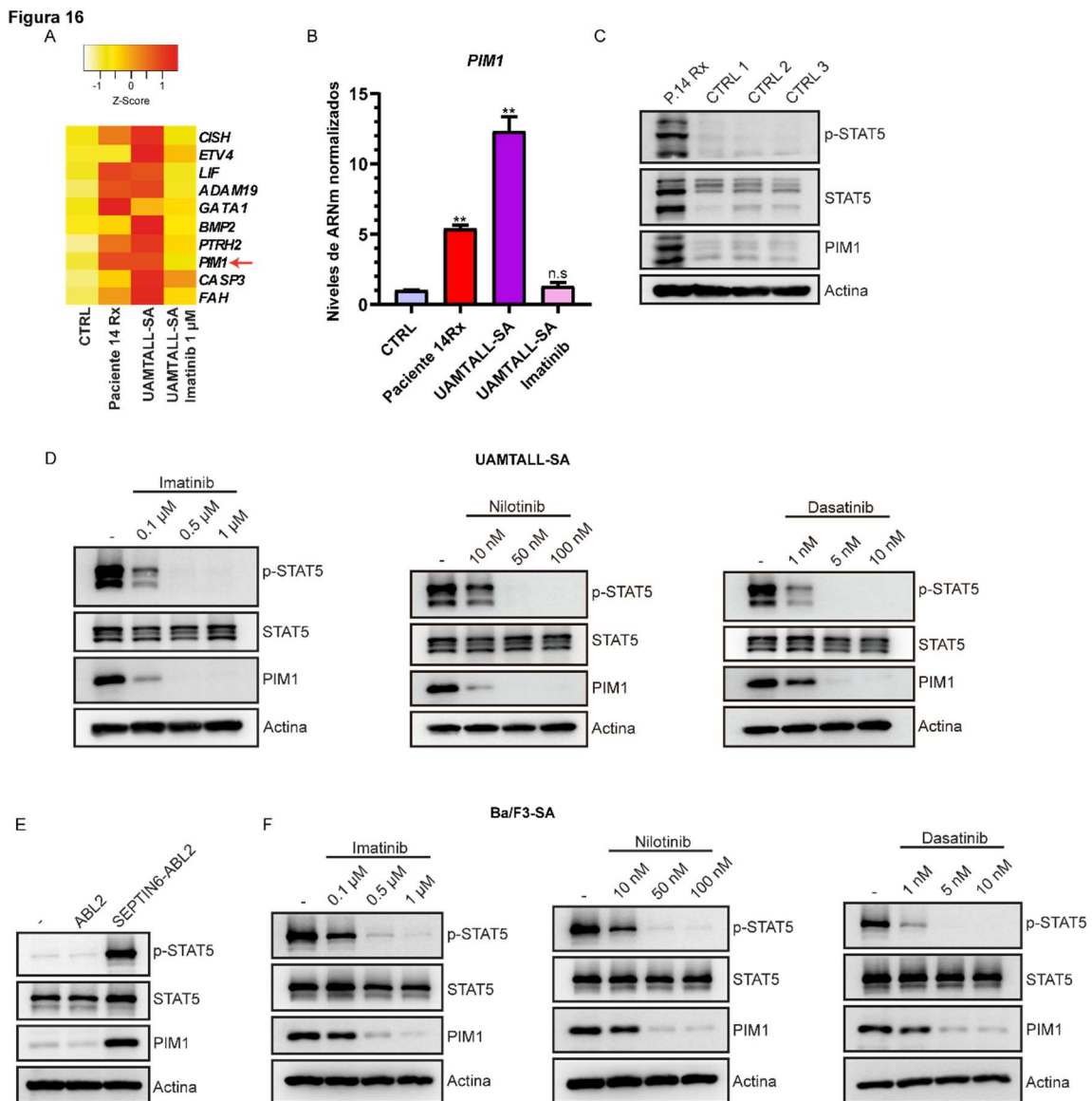
D. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) para las firmas correspondientes a NOTCH, STAT, PI3K/AKT y MAPK/ERK en las células UAMTALL-SA y timocitos normales. NES: valor de enriquecimiento normalizado; p: valor p nominal. La firma de GSEA correspondiente a la vía de STAT5 se encuentra sobre-expresada significativamente en la línea UAMTALL-SA, con respecto al CTRL (NES positivo, p valor<0.05) mientras que para el resto de las vías analizadas bien no hay un enriquecimiento significativo (vía de PI3K/AKT) (p valor > 0.05) o bien se encuentran sobreexpresadas significativamente en el CTRL con respecto a la línea UAMTALL-SA (vías de NOTCH y, MAPK/ERK) (NES negativos, p valor<0.05).

E. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) para la firma correspondiente a STAT5 en las células UAMTALL-SA sin tratar o tratadas con Imatinib (0.5 µM). NES: valor de enriquecimiento normalizado; p: valor p nominal.

Los gráficos muestran la media ± desviación estándar (s.d.) tras tres experimentos independientes. \*p<0,05; \*\*p<0,01. Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

A continuación, analizamos los niveles de transcritos de aquellos genes que constituyen la firma de GSEA correspondiente a STAT5 y que presentan una mayor expresión diferencial en el paciente en recaída y las células UAMTALL-SA con respecto a los timocitos normales y las células UAMTALL-SA tratadas con Imatinib (Figura 16A). Los resultados demuestran que *PIM1* es el único gen que tiene una implicación directa en el desarrollo tumoral y cuyos niveles de expresión son significativamente superiores en el paciente en recaída y en las células UAMTALL-SA sin tratar por lo que confirmamos los resultados mediante qPCR (Figura 16B). A continuación, verificamos que el eje STAT5-PIM1 se encuentra activo en las células UAMTALL-SA así como también en la muestra tumoral en recaída y en las células Ba/F3 que expresan ectópicamente la fusión SEPTIN6-ABL2 donde, además, dicho eje puede ser inhibido mediante el tratamiento con los inhibidores de tirosina-quinasa (Figura 16C-F). La sobreexpresión de *PIM1* a nivel de ARNm es un evento relativamente frecuente en las neoplasias hematológicas<sup>93</sup>, donde se ha asociado principalmente con la presencia de mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT o de reordenamientos que afectan al propio gen *PIM1*<sup>94</sup>, sin embargo, como ninguna de estas alteraciones está presente en

el paciente 14, parece razonable pensar que la fusión SEPTIN6-ABL2 estaría induciendo un incremento en los niveles de PIM1 a través de la activación constitutiva de STAT5.



**Figura 16. Identificación del eje STAT5-PIM1 inducido por la fusión SEPTIN6-ABL2.**

A. Mapa de calor que muestra los niveles de expresión para los 10 primeros genes que aparecen en la firma de GSEA correspondiente a STAT5 en timocitos normales (CTRL), las células tumorales del paciente 14 en recaída (Rx) y las células UAMTALL-SA sin tratar o tratadas con Imatinib (1µM).

B. qPCR para los transcritos correspondientes al gen *PIM1* en timocitos normales (CTRL), las células tumorales del paciente 14 en recaída (Rx) y las células UAMTALL-SA sin tratar o tratadas con Imatinib (1µM). Los resultados se han normalizado frente a los timocitos.

C. Western blot para las proteínas p-STAT5, STAT5, PIM1 y Actina en timocitos normales (CTRL) y las células tumorales del paciente 14 en recaída (Rx).

D. Western blot para las proteínas p-STAT5, STAT5, PIM1 y Actina en las células UAMTALL-SA, que han sido tratadas con diferentes concentraciones de los inhibidores Imatinib (0, 0.1, 0.5 ó 1  $\mu$ M), Nilotinib (0, 10, 50 ó 100nM) y Dasatinib (0, 1, 5 ó 10nM).

E. Western blot para las proteínas p-STAT5, STAT5, PIM1 y Actina en las células Ba/F3 sin transducir (-) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen ABL2 (ABL2<sup>WT</sup>) o bien con la fusión SEPTIN6-ABL2.

F. Western blot para las proteínas p-STAT5, STAT5, PIM1 y Actina en las células Ba/F3 transducidas con la fusión SEPTIN6-ABL2 que han sido tratadas con diferentes concentraciones de los inhibidores Imatinib (0, 0.1, 0.5 ó 1  $\mu$ M), Nilotinib (0, 10, 50 ó 100nM) y Dasatinib (0, 1, 5 ó 10nM).

Los gráficos muestran la media  $\pm$  desviación estándar (s.d.) tras tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

#### **4.6. La hipermetilación de la isla CpG asociada con el inicio de la transcripción del gen *SOCS3*.**

La mayoría de las alteraciones que promueven la activación constitutiva de la vía de STAT5 y que se han identificado hasta la fecha son de carácter genético, se han detectado mediante la secuenciación del genoma y afectan a genes que actúan como reguladores positivos de la vía JAK/STAT<sup>36</sup>. Nosotros exploramos también si las alteraciones de carácter epigenético pueden contribuir a la activación constitutiva de las proteínas STAT en los pacientes con T-ALL/LBL y, concretamente, nos centramos en las islas CpG que aparecen frecuentemente en las proximidades del inicio de transcripción de los genes, donde co-localizan con elementos reguladores de los mismos, tales como secuencias promotoras y activadoras. Dichas islas CpG suelen presentar una metilación basal en las células normales en tanto que pueden estar altamente metiladas en las células tumorales de modo que promueven el silenciamiento génico y, cuando afectan específicamente a los denominados genes supresores de tumores, también contribuyen al desarrollo tumoral<sup>4</sup>.

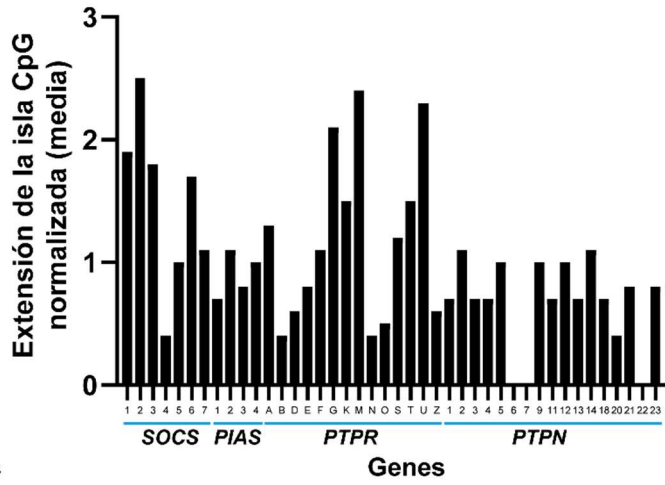
En la búsqueda de genes que puedan estar modulados por una metilación aberrante, decidimos analizar las islas CpG asociadas con el inicio de la transcripción de los genes pertenecientes a las familias *SHP*, *SOCS* y *PIAS*, que son considerados como potenciales reguladores negativos de la vía JAK/STAT<sup>51</sup>. Para ello, comenzamos por analizar la extensión de dichas islas CpG, su co-localización con elementos reguladores y también la presencia de dinucleótidos CpG hipermetilados en líneas celulares derivadas de T-

ALL/LBL (Figura 17A-C). En base a estos criterios identificamos una serie de candidatos que son susceptibles de ser modificados por una metilación aberrante (Figura 17D). De entre ellos, nos centramos en *SOCS3* que se encuentra hipermetilado en otras neoplasias hematológicas y para el que no se han descrito alteraciones genéticas en las T-ALL/LBL<sup>37,95-99</sup>.

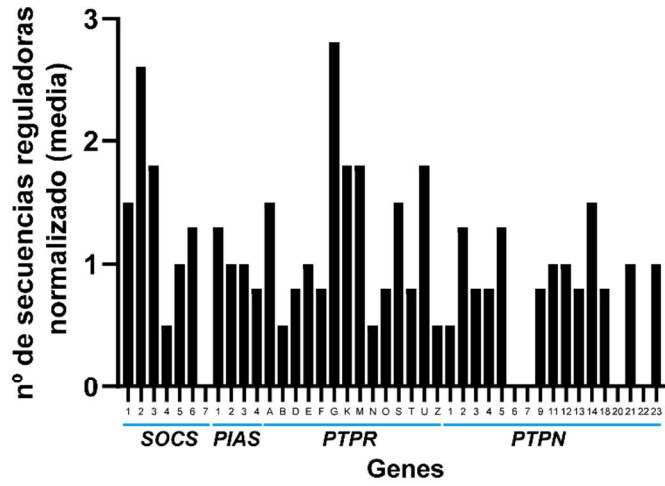


Figura 17

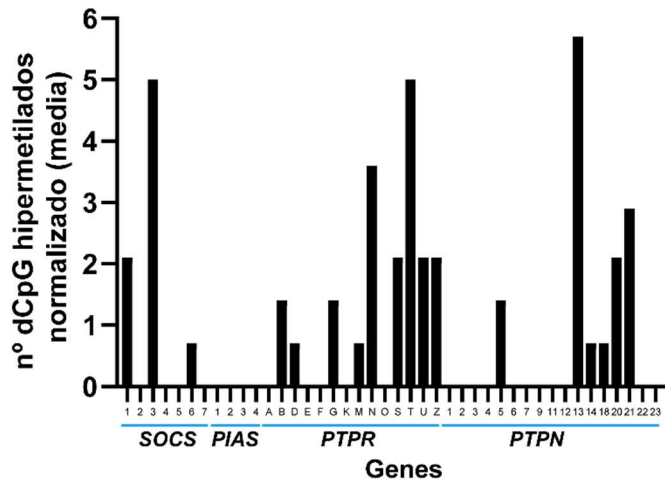
A



B



C



D

Extensión islas CpG	Número de elementos reguladores	Número de dinucleótidos CpG metilados
<i>SOCS2</i>	<i>PTPRG</i>	<i>PTPN13</i>
<i>PTPRM</i>	<i>SOCS2</i>	<i>SOCS3</i>
<i>PTPRU</i>	<i>SOCS3</i>	<i>PTPRT</i>
<i>PTPRG</i>	<i>PTPRK</i>	<i>PTPRN</i>
<i>SOCS1</i>	<i>PTPRM</i>	<i>PTPN21</i>
<i>SOCS3</i>	<i>PTPRU</i>	<i>SOCS1</i>
<i>SOCS6</i>	<i>SOCS1</i>	<i>PTPRS</i>
<i>PTPRK</i>	<i>PTPRA</i>	<i>PTPRU</i>
<i>PTPRT</i>	<i>PTPRS</i>	<i>PTPRZ1</i>
<i>PTPRA</i>	<i>PTPN14</i>	<i>PTPN20</i>

**Figura 17. Análisis de las islas CpG asociadas con el inicio de la transcripción de múltiples genes pertenecientes a las familias SHP, SOCS y PIAS.**

A. Extensión mostrada por las islas CpG que aparecen asociadas con el inicio de la transcripción de los genes pertenecientes a las familias *SHP*, *SOCS* y *PIAS*. Los resultados se han normalizado con respecto a la media de todos los genes analizados.

B. Número de potenciales secuencias promotoras y potenciadoras que co-localizan con las islas CpG seleccionadas. Los resultados se han normalizado con respecto a la media de todos los genes analizados.

C. Número de dinucleótidos CpG que aparecen hipermetilados y que se encuentran dentro de las islas CpG seleccionadas. La densidad de metilación de los dinucleótidos CpG se analizó mediante la matriz de metilación Illumina y se consideraron como hipermetilados aquellos que exhibían una densidad de metilación superior al 80% en al menos dos de las tres líneas celulares analizadas. Los resultados se han normalizado con respecto a la media de todos los genes analizados.

D. Tabla resumen donde se muestran los 10 primeros candidatos para cada uno de los parámetros analizados. Aquellos genes que están presentes en las tres columnas aparecen marcados en color verde.

Por tanto, decidimos comparar la densidad de metilación de múltiples dinucleótidos CpG localizados dentro de la isla CpG de *SOCS3* entre timocitos normales y pacientes con T-ALL/LBL (Figura 18A y B). Además, estudiamos si en dichos pacientes existe una posible asociación entre los niveles de metilación de *SOCS3* y diferentes parámetros importantes para el desarrollo y la progresión de la enfermedad tales como el subgrupo, el inmunofenotipo o la edad (Figura 18C). Para comprobar que la hipermetilación de *SOCS3* no es un evento limitado a nuestra corte de pacientes, analizamos también el estatus de metilación de *SOCS3* en un conjunto de líneas celulares derivadas de T-ALL/LBL (Figura 18D y E). Nuestros resultados demuestran que, al contrario de lo que sucede con la mayoría de las alteraciones que afectan a otros miembros específicos de la vía JAK/STAT, la hipermetilación de *SOCS3* es un evento relativamente frecuente en las T-ALL/LBL, puesto que está presente en más del 50% de las líneas celulares y los pacientes analizados, independientemente del subgrupo, el inmunofenotipo o la edad de los mismos.

Figura 18

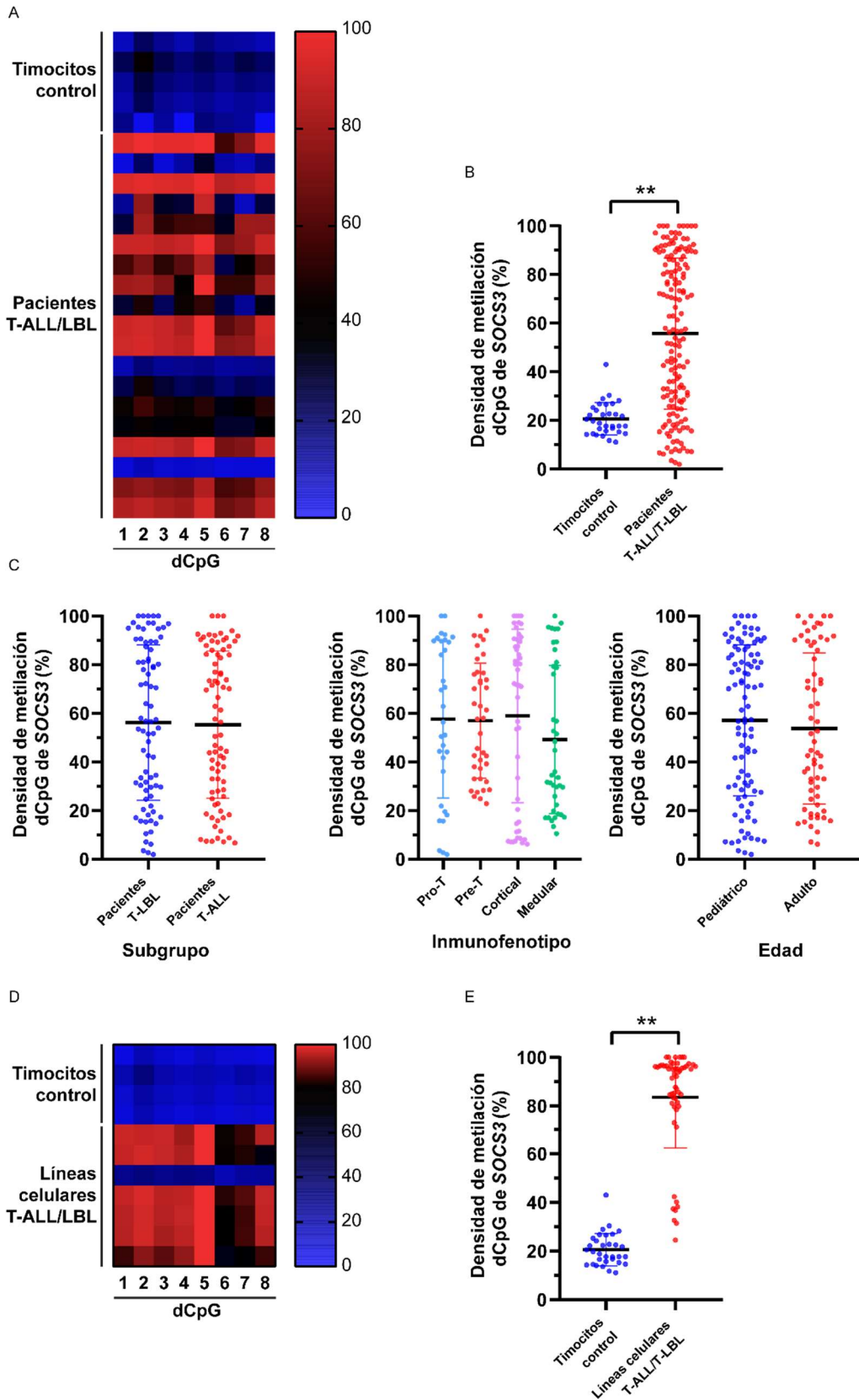


Figura 18. Evaluación del estatus de metilación de SOCS3 en las T-ALL/LBL.

A. Mapa de calor que muestra la densidad de metilación de múltiples dinucleótidos CpG localizados dentro de la isla CpG asociada con el inicio de la transcripción de *SOCS3* en

muestras tumorales procedentes de pacientes con T-ALL/LBL y timocitos normales. La densidad de metilación de los dinucleótidos CpG se analizó mediante pirosecuenciación y se consideraron como hipermetilados aquellos que exhibían una densidad de metilación superior al 40% para tener en cuenta las posibles variaciones derivadas de la contaminación con células no tumorales y de la heterogeneidad intratumoral.

B Estatus de metilación para los 8 dinucleótidos CpG relativos a timocitos normales (n=4) o muestras tumorales procedentes de pacientes con T-ALL/T-LBL (n=20).

C. Análisis de la posible asociación entre los niveles de metilación de *SOCS3* y el subgrupo (izquierda), el inmunofenotipo (centro) o la edad (derecha) de los pacientes con T-ALL/LBL.

D. Mapa de calor que muestra la densidad de metilación de múltiples dinucleótidos CpG localizados dentro de la isla CpG asociada con el inicio de la transcripción de *SOCS3* en líneas celulares derivadas de T-ALL/LBL y timocitos normales. La densidad de metilación de los dinucleótidos CpG se analizó mediante pirosecuenciación y se consideraron como hipermetilados aquellos que exhibían una densidad de metilación superior al 80%.

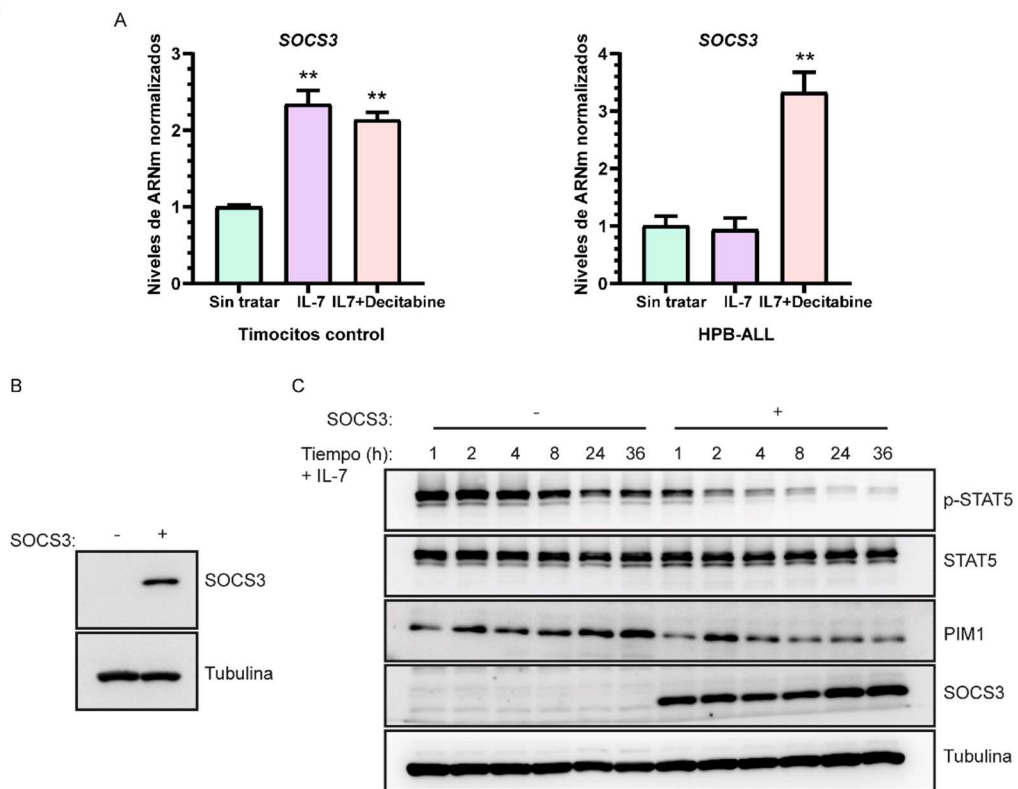
E. Estatus de metilación para los 8 dinucleótidos CpG relativos a timocitos normales (n=4) o líneas celulares derivadas de T-ALL/T-LBL (n=7). Las líneas celulares analizadas son (en orden de aparición): Jurkat, KARPAS-45, HSB-2, MOLT4, HPB-ALL, PEER y ALL-SIL. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

Para confirmar que la hipermetilación de *SOCS3* también produce su desregulación en las neoplasias linfoblásticas de células T, analizamos los niveles de expresión de *SOCS3* en las células HPB-ALL, que responden a interleuquina-7 y muestran hipermetilación de *SOCS3*, tanto en ausencia como en presencia del agente demetilante Decitabine (Figura 19A). En este sentido, observamos que el tratamiento con interleuquina-7 es suficiente para inducir la expresión de *SOCS3* en los timocitos normales, que presentan bajos niveles de metilación, pero no en las células HPB-ALL, que presentan altos niveles de metilación y donde la expresión de *SOCS3* se produce solamente tras el tratamiento conjunto de interleuquina-7 y Decitabine.

A continuación, pasamos a explorar las consecuencias funcionales de la desregulación de *SOCS3* en las T-ALL/LBL y si contribuye de algún modo a la activación constitutiva de la vía JAK/STAT. Ahora bien, puesto que la vía JAK/STAT se encuentra estrictamente regulada en las células normales<sup>51</sup>, parece improbable que una deficiencia de *SOCS3* sea capaz de promover por sí sola la fosforilación sostenida de las proteínas STAT. Por el contrario, resultaría más razonable pensar que la desregulación de *SOCS3* pudiera cooperar con otros mecanismos, como parte de un proceso aditivo y de forma similar a lo que ocurre con otras alteraciones que también afectan a reguladores negativos de la vía JAK/STAT, como por ejemplo las mutaciones de pérdida de función en los genes

*PTPN2* y *PTPRC*<sup>59,68</sup>. En este sentido, se sabe que diversas citoquinas y factores de crecimiento inducen la expresión de *SOCS3* en lo que sería un bucle de retroalimentación negativa para impedir que la vía JAK/STAT se mantenga activada durante demasiado tiempo<sup>100</sup>. De entre ellos, nos centramos en la interleuquina-7, puesto que estudios previos han demostrado que resulta esencial durante los primeros estadios del desarrollo tumoral en las T-ALL/LBL, incluso aunque dichos tumores presenten mutaciones oncogénicas que afecten a otras vías de señalización<sup>101,102</sup>. Mediante la expresión ectópica de *SOCS3* y el tratamiento con interleuquina-7 en las células HPB-ALL, observamos que la deficiencia de *SOCS3* promueve la señalización a través de la interleuquina-7, como demuestran un incremento en los niveles de STAT5-fosforilado, diana de interleuquina-7, y de PIM1, diana de STAT5-fosforilado y proto-oncogén, que se acumulan a lo largo del tiempo en ausencia de *SOCS3* (Figura 19B y C).

Figura 19



**Figura 19. Consecuencias funcionales derivadas de la hipermetilación y deficiencia de *SOCS3*.**

A. qPCR para los transcritos correspondientes al gen *SOCS3* en timocitos normales (izquierda) y en las células HPB-ALL (derecha), sin tratar o tratadas con IL-7 (10ng/ml) y/o Decitabine (1μM). Los resultados se han normalizado con respecto a las células sin tratar.

B. Western blot para las proteínas *SOCS3* y Tubulina en las células HPB-ALL sin transducir (-) o transducidas con la secuencia salvaje del gen *SOCS3*.

C. Western blot para las proteínas p-STAT5, STAT5, PIM1, SOCS3 y Tubulina en las células HPB-ALL sin transducir (-) o transducidas con la secuencia salvaje del gen *SOCS3* y que han sido tratadas con IL-7 (10ng/ml) durante diferentes periodos de tiempo (1, 2, 4, 8, 24 o 36 horas). Los gráficos muestran la media  $\pm$  desviación estándar (s.d.) tras tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

Tal y como se ha comentado anteriormente, en las neoplasias linfoblásticas de células T la vía JAK/STAT no se activa solamente a través de los mecanismos convencionales, como serían la presencia de citoquinas o de factores de crecimiento, sino también a través de mutaciones oncogénicas que afectan a diferentes miembros de la misma<sup>36</sup>. En este sentido, observamos que los pacientes con mutaciones en la vía JAK/STAT tienden a presentar niveles de metilación más altos en *SOCS3*, sugiriendo que la desregulación de *SOCS3* puede ser importante para la actividad oncogénica de dichas mutaciones (Figura 20A). Con respecto a las mutaciones que afectan a miembros de la vía JAK/STAT, las mutaciones en el gen *JAK1* aparecen como las más frecuentes entre los pacientes para los que hemos analizado el estatus de metilación de *SOCS3*, por lo que estudiamos los efectos que la desregulación de *SOCS3* produce sobre la actividad oncogénica de los mutantes de *JAK1*, concretamente sobre aquellos que han sido identificados en pacientes con T-ALL/LBL y que hemos caracterizado anteriormente como oncogénicos. Para ello, co-transfectamos las células U4A, que son deficientes en *JAK1* y *SOCS3*, con el gen *SOCS3* y las diferentes versiones mutadas del gen *JAK1*. Observamos que una deficiencia en *SOCS3* aumenta el potencial de los mutantes oncogénicos de *JAK1*, como se demuestra por un incremento en los niveles de STAT1-fosforilado, que es una diana específica de *JAK1*, así como también por los niveles globales de tirosinas-fosforiladas, con la excepción de una banda determinada que presenta un tamaño aproximado de 20Kda (Figura 20B y C). En este sentido, se ha demostrado que *SOCS3* también puede ser desregulado a través de una fosforilación aberrante en los residuos de tirosina 204 y 221, que puede ser inducida por diversas tirosinas quinasas entre las cuales se encuentra *JAK1*<sup>103,104</sup>. Puesto que el peso molecular de *SOCS3* son 27 Kda, comprobamos mediante la inmunoprecipitación de *SOCS3* seguida de un Western blot frente a tirosinas fosforiladas, si la banda previamente mencionada se corresponde con *SOCS3*. Adicionalmente, analizamos la

capacidad de los mutantes oncogénicos de JAK1 para fosforilar a SOCS3 en dichas tirosinas mediante la co-transfección de las células U4A con las diferentes versiones mutadas del gen *JAK1* y una versión mutada del gen *SOCS3* donde las tirosinas 204 y 221 han sido sustituidas por fenilalaninas (Figura 20D-F). Nuestros resultados demuestran que los mutantes oncogénicos de JAK1 son capaces de fosforilar a SOCS3 en mayor medida que la proteína JAK1 salvaje y dicha fosforilación ocurre específicamente en las tirosinas 204 y 221, puesto que el mutante de SOCS3 donde dichas tirosinas han sido sustituidas por fenilalaninas no resulta fosforilado en presencia de los mutantes oncogénicos de JAK1.

Figura 20

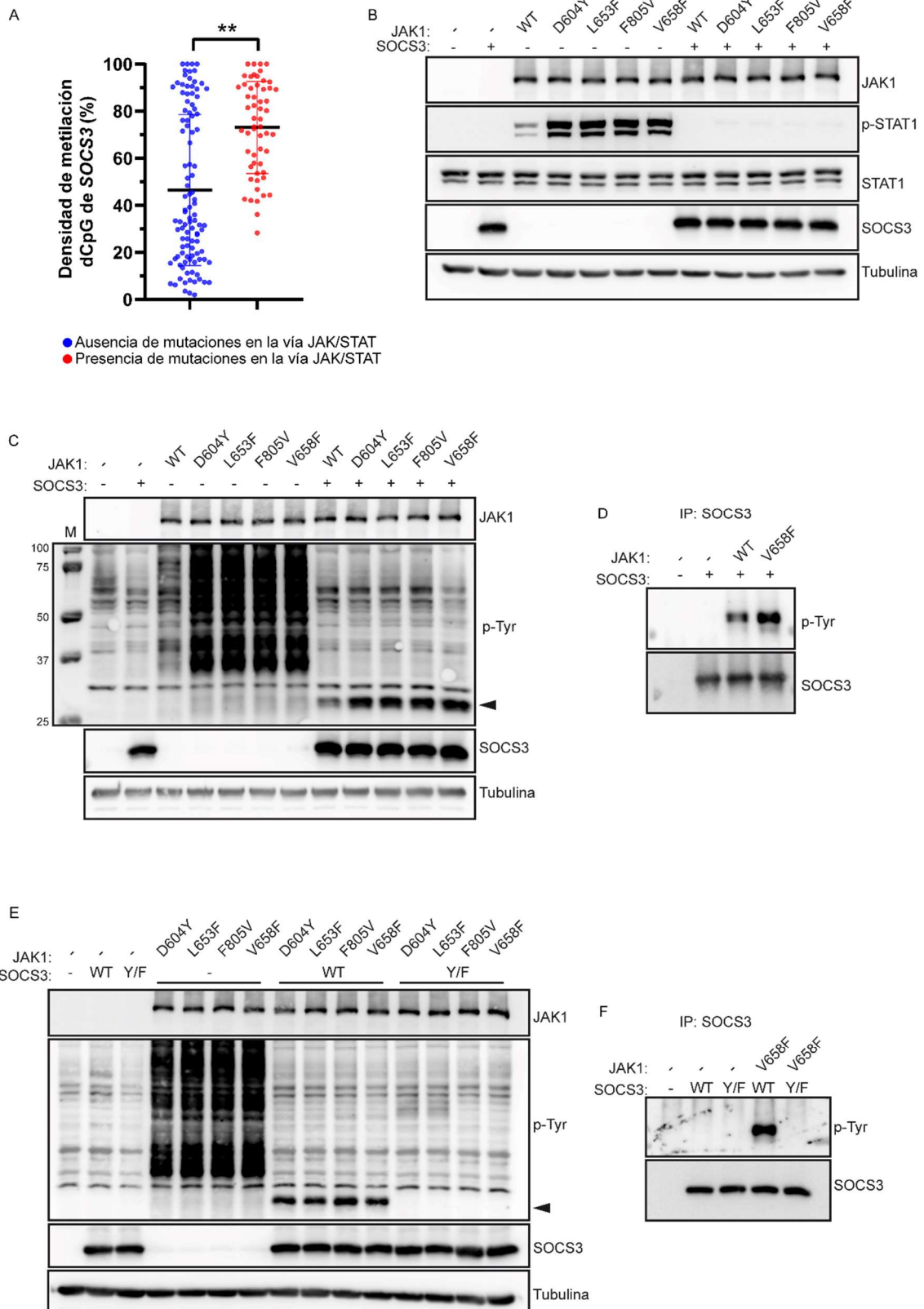


Figura 20. Análisis de la relación entre SOCS3 y diferentes mutantes oncogénicos de JAK1.

A. Estatus de metilación para los 8 dinucleótidos CpG relativos a pacientes con mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT (n=6) o sin ellas (n=14).



B. Western blot para las proteínas JAK1, p-STAT1, STAT1, SOCS3 y Tubulina en las células U4A sin transfectar (-) o transfectadas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK1* (*JAK1<sup>WT</sup>*) o bien con diferentes versiones mutadas del mismo (*JAK1<sup>V658F</sup>*, *JAK1<sup>D604Y</sup>*, *JAK1<sup>L653F</sup>* o *JAK1<sup>L805V</sup>*) solas o en combinación con la secuencia salvaje del gen *SOCS3*.

C. Western blot para las proteínas JAK1, p-Tirosinas, SOCS3 y Tubulina en las células U4A sin transfectar (-) o transfectadas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK1* (*JAK1<sup>WT</sup>*) o bien con diferentes versiones mutadas del mismo (*JAK1<sup>V658F</sup>*, *JAK1<sup>D604Y</sup>*, *JAK1<sup>L653F</sup>* o *JAK1<sup>L805V</sup>*) solas o en combinación con la secuencia salvaje del gen *SOCS3*. Con una cabeza de flecha negra se ha indicado la banda que presenta un peso molecular en torno a 20Kda.

D. Inmunoprecipitación y western blot para las proteínas JAK1, p-Tirosinas y SOCS3 en las células U4A sin transfectar (-) o transfectadas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK1* (*JAK1<sup>WT</sup>*) o bien con la versión mutada *JAK1<sup>V658F</sup>* solas o en combinación con el gen *SOCS3*.

E. Western blot para las proteínas JAK1, p-Tirosinas, SOCS3 y Tubulina en las células U4A sin transfectar (-) o transfectadas con diferentes versiones mutadas del gen *JAK1* (*JAK1<sup>V658F</sup>*, *JAK1<sup>D604Y</sup>*, *JAK1<sup>L653F</sup>* o *JAK1<sup>L805V</sup>*) solas o en combinación bien con la secuencia salvaje del gen *SOCS3* (*SOCS3<sup>WT</sup>*) o bien con una versión mutada del mismo donde las tirosinas correspondientes a los residuos 204 y 221 se han sustituido por fenilalaninas (*SOCS3<sup>Y204&221F</sup>*). Con una cabeza de flecha negra se ha indicado la banda que presenta un peso molecular en torno a 20Kda.

F. Inmunoprecipitación de SOCS3 y western blot para las proteínas JAK1, p-Tirosinas y SOCS3 en las células U4A sin transfectar (-) o transfectadas con la versión mutada del gen *JAK1* (*JAK1<sup>V658F</sup>*) sola o en combinación bien con la secuencia salvaje del gen *SOCS3* (*SOCS3<sup>WT</sup>*) o bien con una versión mutada del mismo donde las tirosinas correspondientes a los residuos 204 y 221 se han sustituido por fenilalaninas (*SOCS3<sup>Y204&221F</sup>*).

\*p<0,05; \*\*p<0,01. Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

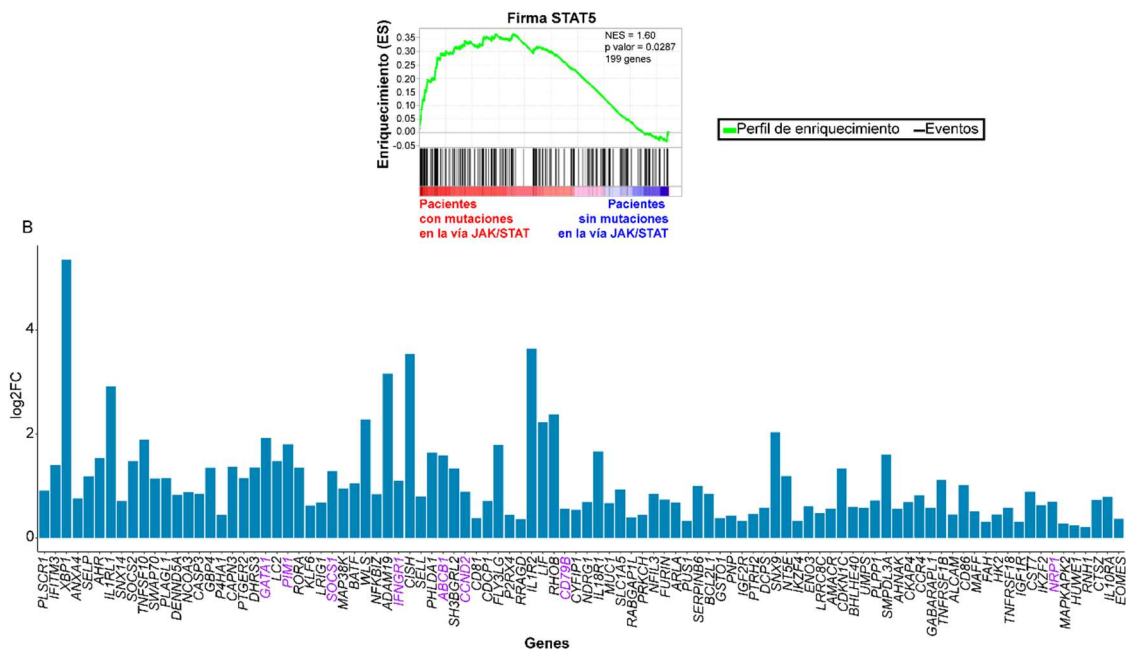
#### **4.7. Estudio de los mecanismos moleculares por los que la activación constitutiva de STAT5 promueve el desarrollo tumoral en los pacientes con T-ALL/LBL que presentan alteraciones en diferentes miembros de la vía de STAT5.**

La caracterización funcional de las diferentes alteraciones, así como el análisis de las bases moleculares subyacentes a las mismas, sugieren que el estudio de los mecanismos por los que la activación constitutiva de STAT5 promueve el desarrollo tumoral puede dar lugar a la identificación de nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de aquellos pacientes con neoplasias linfoblásticas de células T que presenten alteraciones en diferentes miembros de la vía de STAT5. Dichas alteraciones, promueven la fosforilación sostenida de la STAT5, que se activa y se transloca al núcleo, donde actúa como un factor de transcripción<sup>47</sup>. Por lo tanto, el

análisis de la expresión génica en aquellos pacientes con T-ALL/LBL y mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5 constituye el objetivo final de esta tesis.

En este sentido, comenzamos por analizar los perfiles de expresión génica entre aquellos pacientes que presentan mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5 y el resto de pacientes diagnosticados con T-ALL/LBL. Observamos que los pacientes con mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5 muestran un enriquecimiento en la firma de GSEA correspondiente a STAT5 (Figura 21A) debido a la expresión aberrante de múltiples genes (Figura 21B). De entre ellos, nos centramos en los que están relacionados con el desarrollo tumoral y que además tienen elementos de respuesta a STAT5, como son los genes: *GATA1*, *SOCS1*, *IFNGR1*, *ABCB1*, *CCND2*, *CD79B*, *NRP1* y *PIM1*, que ya aparecía sobre-expresado en la muestra tumoral correspondiente al paciente 14 y en la línea celular derivada del mismo. Además, *PIM1* codifica una proteína serina/treonina-quinasa que se encuentra constitutivamente activa puesto que no presenta ningún tipo de regulación negativa a nivel estructural y, por tanto, su actividad enzimática depende directamente de sus niveles de expresión<sup>105</sup>.

Figura 21  
A



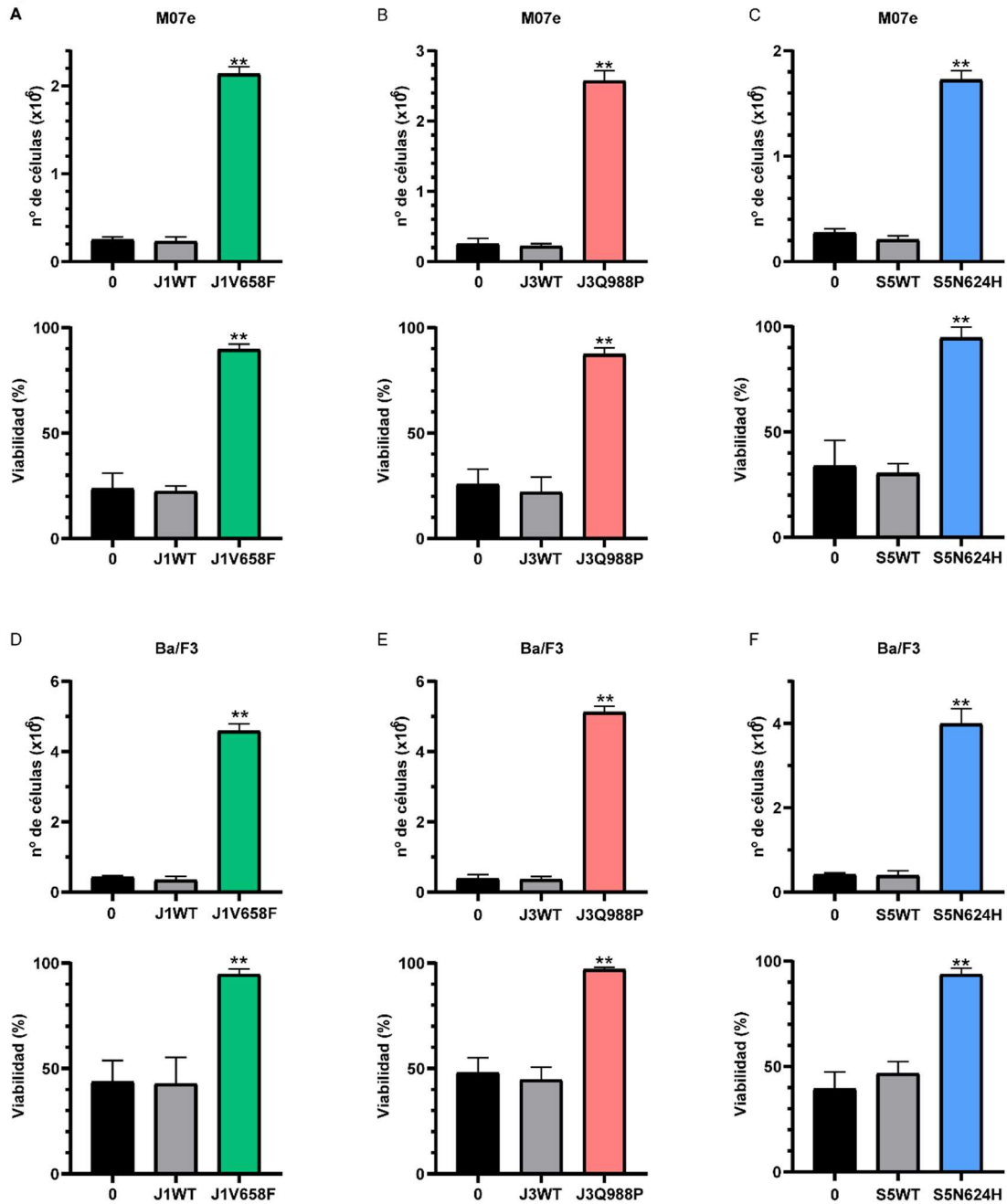
**Figura 21. Análisis de expresión relativo a la vía de STAT en los pacientes con T-ALL/LBL.**  
A. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) para la firma correspondiente a STAT5 entre los pacientes con mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT y el resto de pacientes diagnosticados con T-ALL/LBL. NES: valor de enriquecimiento normalizado; p: valor nominal

B. Análisis de expresión para los genes significativamente sobre-expresados que aparecen en la firma de GSEA correspondiente a STAT5 en los pacientes con mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT con respecto al resto de pacientes diagnosticados con T-ALL/LBL. Aquellos genes cuya alteración puede contribuir directamente al desarrollo tumoral aparecen marcados en morado.

Los gráficos muestran la media tras tres experimentos independientes.

La correlación observada entre la presencia de mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5 y los altos niveles de expresión de *PIM1*, que ya había sido previamente indicada<sup>94</sup>, postula a PIM1 como una posible diana específica de dichas alteraciones. Para determinar si dicha correlación es realmente el resultado de que las mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5 inducen la expresión de PIM1, generamos una colección de líneas celulares que dependen para su proliferación y viabilidad de mutaciones oncogénicas en diferentes miembros pertenecientes a la vía JAK/STAT (Figura 22A-F). Concretamente, utilizamos las células M07e y Ba/F3 que muestran niveles basales de activación para la vía JAK/STAT y en condiciones normales necesitan de citoquinas o factores de crecimiento para su viabilidad y proliferación, de modo que la expresión ectópica de las diferentes mutaciones promueve su transformación e independización de citoquinas y factores de crecimiento. Las mutaciones seleccionadas son JAK3<sup>Q988P</sup>, JAK1<sup>V658F</sup> y STAT5<sup>N642H</sup> puesto que *JAK3*, *JAK1* y *STAT5* son los genes de la vía JAK/STAT que aparecen más frecuentemente mutados entre los pacientes diagnosticados con T-ALL/LBL y cuyo exoma se ha analizado.

Figura 22



**Figura 22. Generación de líneas celulares que dependen de diferentes mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT para su viabilidad y proliferación.**

A. Análisis de crecimiento celular (arriba) y viabilidad (abajo) mediante azul de tripán en las células M07e sin transducir o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK1* (*JAK1*<sup>WT</sup>) o bien con la versión mutada *JAK1*<sup>V658F</sup>.

B. Análisis de crecimiento celular (arriba) y viabilidad (abajo) mediante azul de tripán en las células M07e sin transducir o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK3* (*JAK3*<sup>WT</sup>) o bien con la versión mutada *JAK3*<sup>Q988P</sup>.

C. Análisis de crecimiento celular (arriba) y viabilidad (abajo) mediante azul de tripán en las células M07e sin transducir o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *STAT5* (*STAT5*<sup>WT</sup>) o bien con la versión mutada *STAT5*<sup>N642H</sup>.

D. Análisis de crecimiento celular (arriba) y viabilidad (abajo) mediante azul de tripán en las células Ba/F3 sin transducir o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK1* (*JAK1*<sup>WT</sup>) o bien con la versión mutada *JAK1*<sup>V658F</sup>.

E. Análisis de crecimiento celular (arriba) y viabilidad (abajo) mediante azul de tripán en las células Ba/F3 sin transducir o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK3* (*JAK3*<sup>WT</sup>) o bien con la versión mutada *JAK3*<sup>Q988P</sup>.

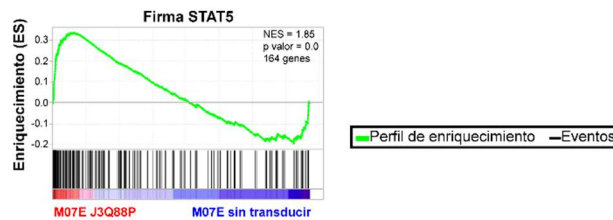
F. Análisis de crecimiento celular (arriba) y viabilidad (abajo) mediante azul de tripán en las células Ba/F3 sin transducir o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *STAT5* (*STAT5*<sup>WT</sup>) o bien con la versión mutada *STAT5*<sup>N642H</sup>.

Los gráficos muestran la media ± desviación estándar (s.d.) tras tres experimentos independientes. \*p<0,05; \*\*p<0,01

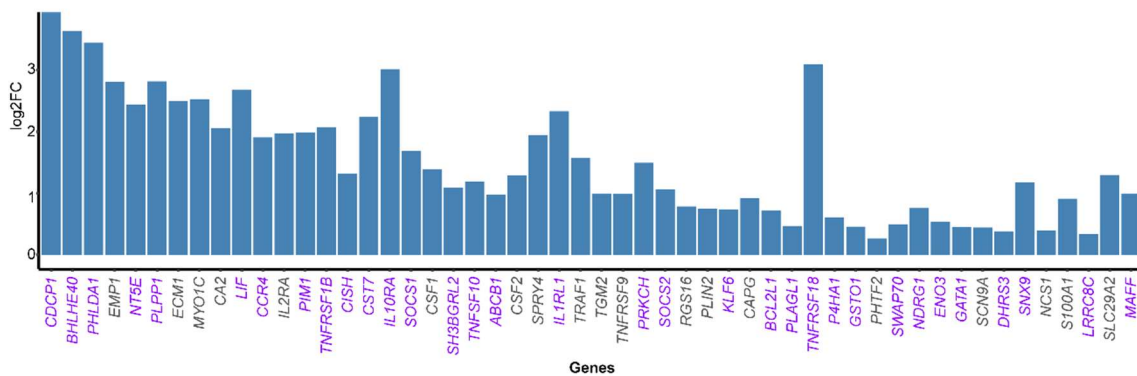
Tomando como modelo las células M07e transducidas con la mutación *JAK3*<sup>Q988P</sup> observamos que el GSEA correspondiente a la firma de *STAT5* entre las células M07e no transducidas y las células M07e que expresan ectópicamente la mutación *JAK3*<sup>Q988P</sup> recapitula las observaciones previamente obtenidas al comparar los pacientes con y sin mutaciones oncogénicas en la vía de *STAT5* (Figura 23A y B), indicando que estas mutaciones promueven un perfil de expresión génica alterado y además otorgando validez a nuestro modelo experimental.

Figura 23

A



B



**Figura 23. Análisis de expresión relativo a la vía de STAT5 en las células M07e.**

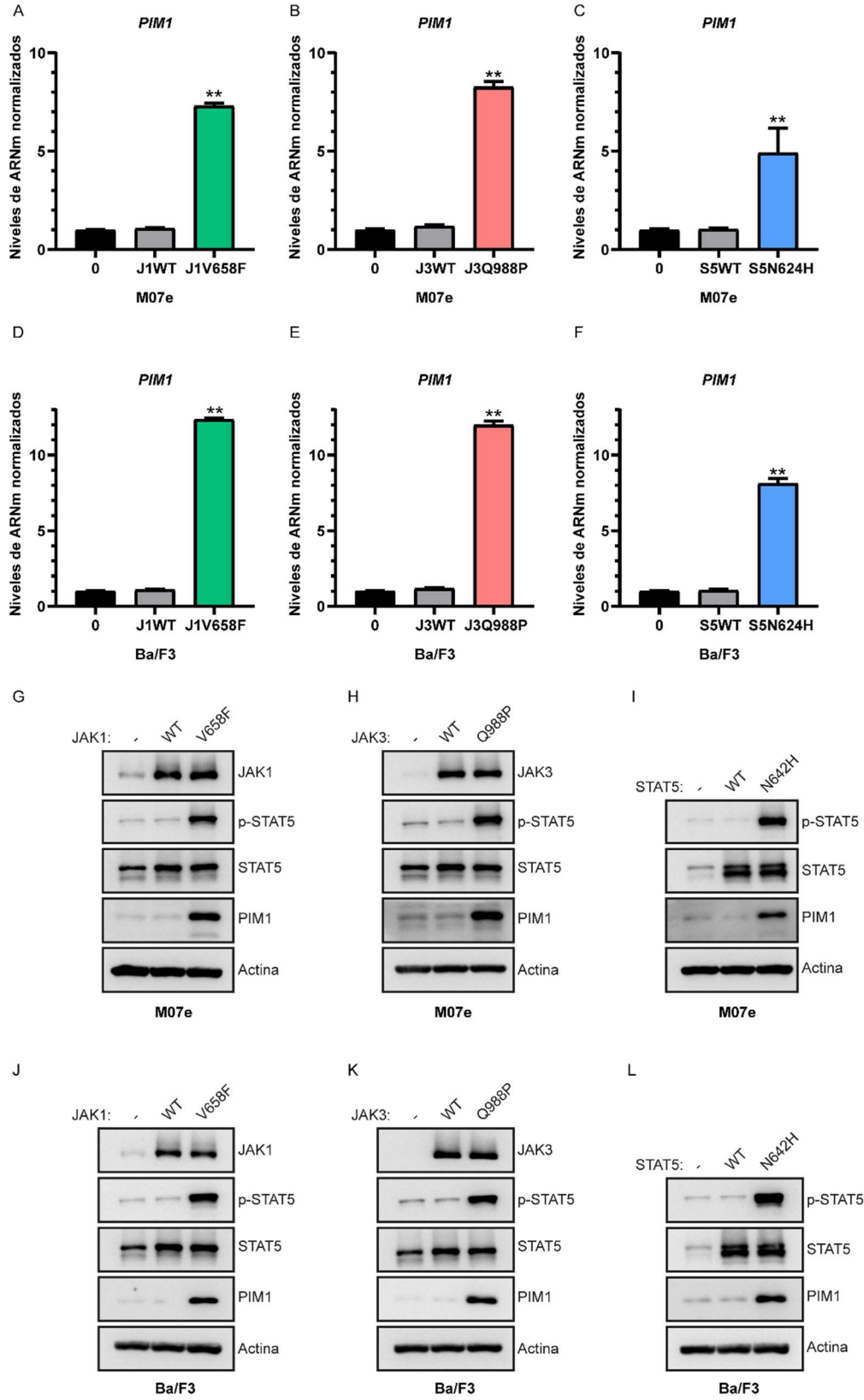
A. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) para la firma correspondiente a STAT5 entre las células M07e sin transducir y transducidas con la versión mutante del gen *JAK3* (*JAK3*<sup>Q988P</sup>). NES: valor de enriquecimiento normalizado; p: valor p nominal.

B. Análisis de expresión para los genes significativamente sobre-expresados que aparecen en la firma de GSEA correspondiente a STAT5 en las células M07e transducidas con la versión mutante del gen *JAK3* (*JAK3*<sup>Q988P</sup>) con respecto a las células M07e sin transducir. Aquellos genes que aparecían sobre-expresados en los pacientes con mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT con respecto al resto de pacientes diagnosticados con T-ALL/LBL se muestran en morado.

Los gráficos muestran la media tras tres experimentos independientes.

Notablemente, *PIM1* está entre los genes sobre-expresados en las células M07e con expresión ectópica de la mutación Q988P en comparación con las células M07e no transducidas, por lo que analizamos la capacidad del resto de las mutaciones oncogénicas seleccionadas para inducir la expresión de *PIM1* y también si dicha expresión no se limita solamente al ARNm, sino que se mantiene a nivel de proteína (Figura 24A-L). Además, confirmamos la ausencia de *PIM1* en múltiples líneas celulares derivadas de T-ALL/LBL que carecen de mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5 (Figura 25A y B), reforzando la idea de que *PIM1* es una diana específica de dichas mutaciones. Por último, comprobamos que *PIM1* es el principal gen de la familia PIM cuya expresión se ve incrementada por el mutante *JAK3*<sup>Q988P</sup> analizando los niveles de *PIM1*, *PIM2* y *PIM3* mediante dos aproximaciones complementarias. Por un lado, comparando los niveles de transcritos entre las células M07e no transducidas o transducidas con la mutación *JAK3*<sup>Q988P</sup>. Por otro lado, comparando los niveles de proteínas entre las células M07e transducidas con la mutación *JAK3*<sup>Q988P</sup> sin tratar o tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor de *JAK3* Tofacitinib (Figura 25C y D). Nuestros resultados demuestran que las mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5 promueven un enriquecimiento para la firma de GSEA correspondiente a STAT5 y también un perfil de expresión génica alterado con la expresión aberrante de múltiples genes relacionados con el desarrollo tumoral. Además, demuestran que las mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5 inducen de forma específica la expresión de *PIM1*, que tiene lugar no solamente a nivel de ARNm sino también a nivel de proteína.

Figura 24



**Figura 24. Análisis de la expresión para el gen *PIM1* a nivel de ARNm y proteína en las líneas celulares que dependen para su viabilidad y proliferación de diferentes mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT.**

A. qPCR para los transcritos correspondientes al gen *PIM1* en las células M07e sin transducir (0) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK1* (*JAK1<sup>WT</sup>*) o bien con la versión mutada *JAK1<sup>V658F</sup>*.

B. qPCR para los transcritos correspondientes al gen *PIM1* en las células M07e sin transducir (0) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK3* (*JAK3<sup>WT</sup>*) o bien con la versión mutada *JAK3<sup>Q988P</sup>*.

C. qPCR para los transcritos correspondientes al gen *PIM1* en las células M07e sin transducir (0) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *STAT5* (*STAT5<sup>WT</sup>*) o bien con la versión mutada *STAT5<sup>N642H</sup>*.

D. qPCR para los transcritos correspondientes al gen *PIM1* en las células Ba/F3 sin transducir (0) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK1* (*JAK1<sup>WT</sup>*) o bien con la versión mutada *JAK1<sup>V658F</sup>*.

E. qPCR para los transcritos correspondientes al gen *PIM1* en las células Ba/F3 sin transducir (0) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK3* (*JAK3<sup>WT</sup>*) o bien con la versión mutada *JAK3<sup>Q988P</sup>*.

F. qPCR para los transcritos correspondientes al gen *PIM1* en las células Ba/F3 sin transducir (0) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *STAT5* (*STAT5<sup>WT</sup>*) o bien con la versión mutada *STAT5<sup>N642H</sup>*. En todos los casos los resultados se han normalizado frente a las células sin transducir.

G. Western blot para las proteínas JAK1, p-STAT5, STAT5, PIM1 y Actina en las células M07e sin transducir (-) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK1* (*JAK1<sup>WT</sup>*) o bien con la versión mutada *JAK1<sup>V658F</sup>*.

H. Western blot para las proteínas JAK3, p-STAT5, STAT5, PIM1 y Actina en las células M07e sin transducir (-) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK3* (*JAK3<sup>WT</sup>*) o bien con la versión mutada *JAK3<sup>Q988P</sup>*.

I. Western blot para las proteínas p-STAT5, STAT5, PIM1 y Actina en las células M07e sin transducir (-) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *STAT5* (*STAT5<sup>WT</sup>*) o bien con la versión mutada *STAT5<sup>N642H</sup>*.

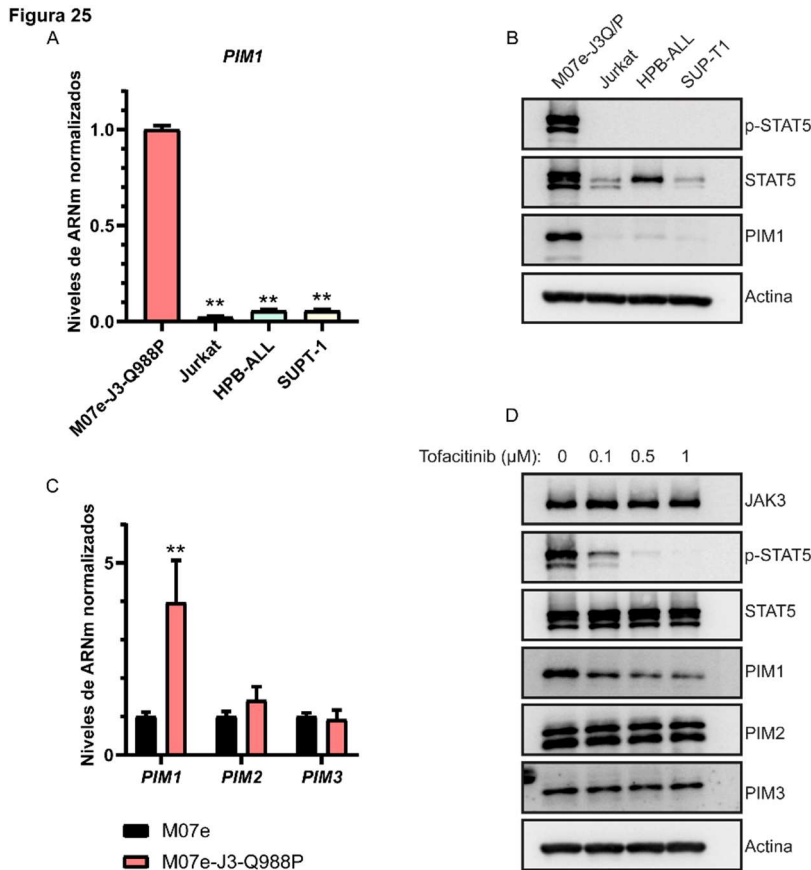
J. Western blot para las proteínas JAK1, p-STAT5, STAT5, PIM1 y Actina en las células Ba/F3 sin transducir (-) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK1* (*JAK1<sup>WT</sup>*) o bien con la versión mutada *JAK1<sup>V658F</sup>*.

K. Western blot para las proteínas JAK3, p-STAT5, STAT5, PIM1 y Actina en las células Ba/F3 sin transducir (-) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK3* (*JAK3<sup>WT</sup>*) o bien con la versión mutada *JAK3<sup>Q988P</sup>*.

L. Western blot para las proteínas p-STAT5, STAT5, PIM1 y Actina en las células Ba/F3 sin transducir (-) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *STAT5* (*STAT5<sup>WT</sup>*) o bien con la versión mutada *STAT5<sup>N642H</sup>*.

Los gráficos muestran la media  $\pm$  desviación estándar (s.d.) tras tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.





**Figura 25. Capacidad del mutante de JAK3 Q988P para inducir la expresión de PIM1 de forma específica.**

A. qPCR para los transcritos correspondientes al gen *PIM1* en las células M07e transducidas con la versión mutante del gen *JAK3* ( $JAK3^{Q988P}$ ), Jurkat, HPB-ALL y SUPT-1. Los resultados se han normalizado frente a las células M07e-J3-Q988P.

B. Western blot para las proteínas p-STAT5, STAT5, PIM1 y Actina en las células M07e transducidas con la versión mutante del gen *JAK3* ( $JAK3^{Q988P}$ ), Jurkat, HPB-ALL y SUPT-1.

C. Análisis de los transcritos correspondientes a los genes *PIM1*, *PIM2* y *PIM3* en las células M07e sin transducir o transducidas con la versión mutante del gen *JAK3* ( $JAK3^{Q988P}$ ). Los resultados se han normalizado frente a las células M07e.

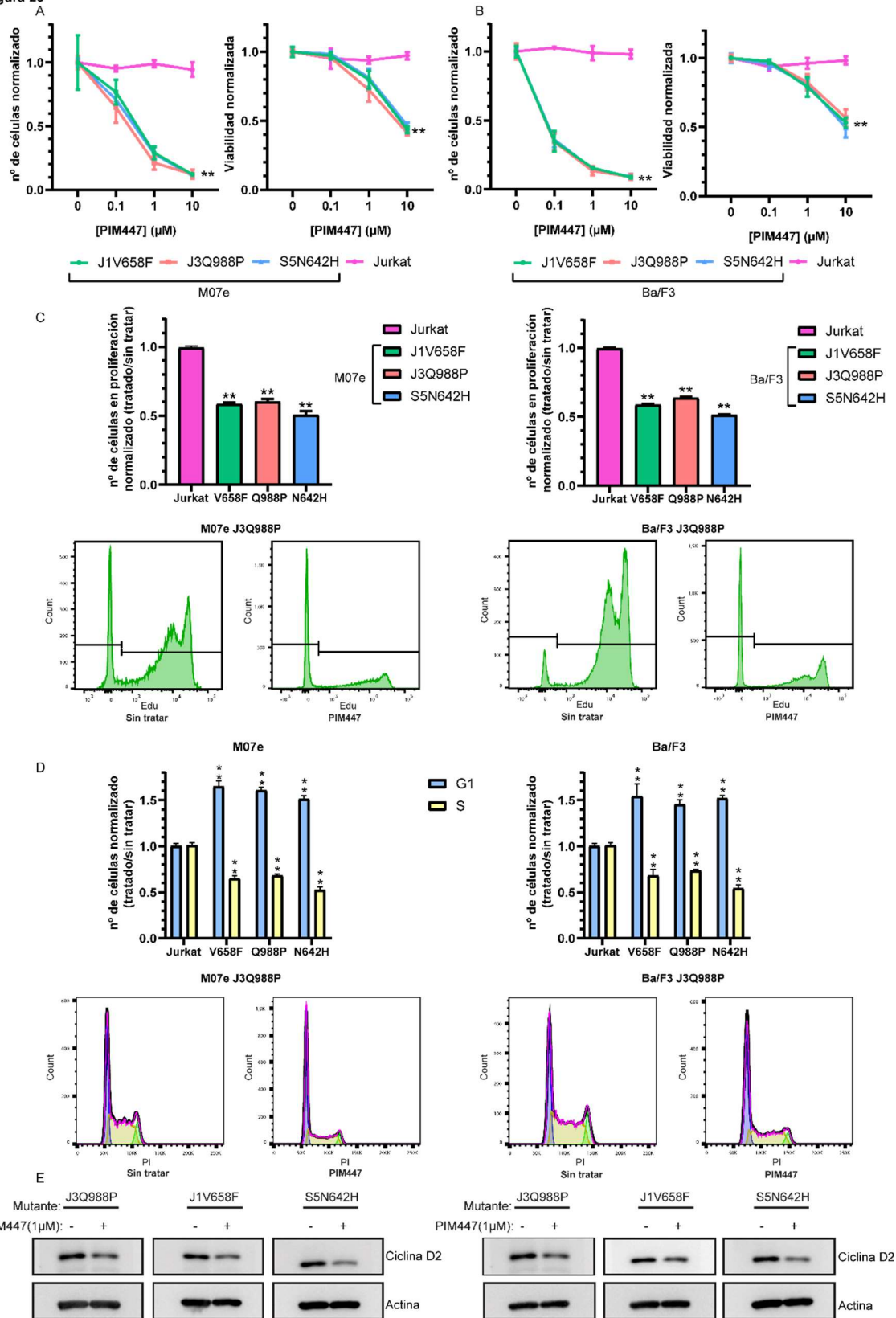
D. Western blot para las proteínas p-STAT5, STAT5, PIM1, PIM2, PIM3 y Actina en las células M07e transducidas con la versión mutante del gen *JAK3* ( $JAK3^{Q988P}$ ) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de Tofacitinib (0, ó 0.5μM).

Los gráficos muestran la media  $\pm$  desviación estándar (s.d.) tras tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

A la hora de investigar la importancia que tiene la sobreexpresión de PIM1 para el desarrollo tumoral de las T-ALL/LBL con mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5 y, por tanto, si PIM1 podría postularse como una diana terapéutica en estas neoplasias

hematológicas, nos enfocamos en los pan-PIM inhibidores. Tales inhibidores afectan a la estructura común que comparten los tres miembros de la familia PIM (*PIM1*, *PIM2* y *PIM3*) puesto que los ratones deficientes en estos tres genes son viables y fértiles<sup>106</sup>. Por el contrario, el uso de ARNs antisentido frente a *PIM1* también induce la expresión de otros miembros de la familia PIM como un mecanismo compensatorio y, por tanto, resultan menos eficaces, ya que solamente producen un efecto parcial<sup>107</sup>. En este contexto, los pan-PIM inhibidores han dado lugar a resultados diversos cuando se han utilizado en líneas celulares y xenotransplantes derivados de pacientes con T-ALL/LBL<sup>108,109</sup>, ninguno de los cuales presentaba mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT, probablemente porque las bases moleculares subyacentes a estas neoplasias hematológicas son muy heterogéneas y limitan la efectividad de los pan-PIM inhibidores a un subgrupo específico de las mismas. Por tanto, investigamos el impacto que tendría el recientemente desarrollado y altamente potente pan-PIM inhibidor, PIM447<sup>110</sup>, en diversas líneas celulares donde mutaciones oncogénicas recurrentes en los pacientes con T-ALL/T-LBL son esenciales para el crecimiento y la viabilidad. Además, incluimos en los ensayos a las células Jurkat, para las que hemos descartado previamente una expresión significativa de PIM1, y que por tanto funcionan como control negativo. En primer lugar, analizamos el crecimiento celular en presencia o ausencia del inhibidor PIM447 (Figura 26A). A continuación, analizamos la viabilidad y la proliferación celulares para determinar si la reducción previamente observada en el crecimiento es la consecuencia de un incremento en la apoptosis de una reducción en la división celular o de ambas (Figura 26B y C). Después analizamos el perfil del ciclo celular para determinar si la reducción observada en la proliferación es la consecuencia de un arresto en el ciclo celular (Figura 26D). Finalmente, analizamos los niveles de CiclinaD2, puesto que dicha proteína es importante para la transición G1/S y su reducción serviría como marcador de un bloqueo en la fase G1 del ciclo celular<sup>84</sup> (Figura 26E). Nuestros resultados demuestran que la actividad de PIM1 es fundamental para el desarrollo tumoral de aquellas células que presentan mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT, como demuestran una reducción en el crecimiento celular, la viabilidad, la proliferación, la transición G1/S y los niveles de CiclinaD2 cuando estas células son tratadas con el inhibidor PIM447.

Figura 26



**Figura 26. Sensibilidad de diferentes líneas celulares que presentan mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT al inhibidor PIM447.**

A. Análisis de crecimiento celular mediante azul de tripán en las células M07e (izquierda) y Ba/F3 (derecha) transducidas con versiones mutadas de los genes *JAK1* (*JAK1*<sup>V658F</sup>), *JAK3* (*JAK3*<sup>Q988P</sup>) y *STAT5* (*STAT5*<sup>N642H</sup>) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de PIM447 (0, 0.1, 1 ó 10µM). Los resultados se han normalizado con respecto a las células sin tratar. Las células Jurkat se han usado como control negativo.

B. Análisis de viabilidad celular mediante azul de tripán en las células M07e (izquierda) y Ba/F3(derecha) transducidas con versiones mutadas de los genes *JAK1* (*JAK1*<sup>V658F</sup>), *JAK3* (*JAK3*<sup>Q988P</sup>) y *STAT5* (*STAT5*<sup>N642H</sup>) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de PIM447 (0, 0.1, 1 ó 10µM). Los resultados se han normalizado con respecto a las células sin tratar.

C. Análisis de la proliferación celular mediante EdU (5-etil-2'-desoxiuridina) en las células M07e (izquierda) y Ba/F3 (derecha) transducidas con versiones mutadas de los genes *JAK1* (*JAK1*<sup>V658F</sup>), *JAK3* (*JAK3*<sup>Q988P</sup>) y *STAT5* (*STAT5*<sup>N642H</sup>) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de PIM447 (0 ó 1µM). Los resultados se han normalizado con respecto a las células sin tratar y se han comparado con los obtenidos para las células Jurkat, que son insensibles a PIM447 y funcionan como control negativo. A continuación (abajo), se muestran imágenes representativas para el mutante *JAK3*<sup>Q988P</sup>.

D. Análisis del ciclo celular mediante yoduro de propidio en las células M07e (izquierda) y Ba/F3 (derecha) transducidas con versiones mutadas de los genes *JAK1* (*JAK1*<sup>V658F</sup>), *JAK3* (*JAK3*<sup>Q988P</sup>) y *STAT5* (*STAT5*<sup>N642H</sup>) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de PIM447 (0 ó 1µM). Los resultados correspondientes a las fases G<sub>1</sub> y S se han normalizado con respecto a las células sin tratar y se han comparado con los obtenidos para las células Jurkat, que son insensibles a PIM447 y funcionan como control negativo. A continuación (abajo), se muestran imágenes representativas para el mutante *JAK3*<sup>Q988P</sup>.

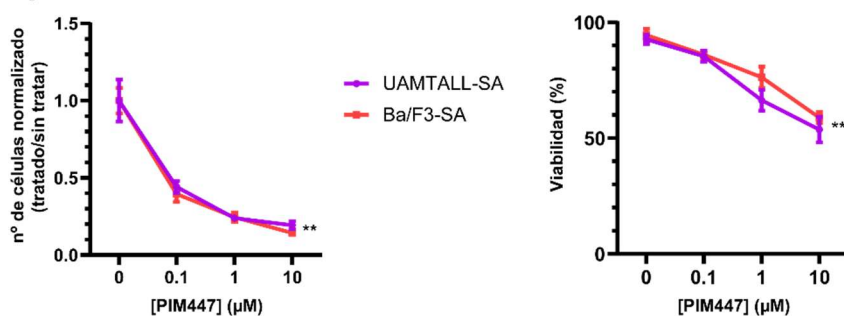
E. Western blot para las proteínas CiclinaD2 y Actina en las células M07e (izquierda) y Ba/F3(derecha) transducidas con versiones mutadas de los genes *JAK1* (*JAK1*<sup>V658F</sup>), *JAK3* (*JAK3*<sup>Q988P</sup>) y *STAT5* (*STAT5*<sup>N642H</sup>) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de PIM447 (0 ó 1µM).

Los gráficos muestran la media ± desviación estándar (s.d.) tras tres experimentos independientes. \*p<0,05; \*\*p<0,01. Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

Aprovechando que previamente habíamos generado las células UAMTALL-SA y Ba/F3 con expresión ectópica de SEPTIN6-ABL2, evaluamos la eficacia de PIM447 frente a estas líneas celulares, puesto que ambas presentan la fusión SEPTIN6-ABL2 que, como hemos demostrado anteriormente, también induce el eje STAT5-PIM1 (Figura 27). Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con PIM447 inhibe el crecimiento celular y la viabilidad en aquellas células que presentan la fusión SEPTIN6-ABL2, indicando que la actividad de PIM1 también resulta fundamental para dichas células y

postulando a PIM447 como una línea de tratamiento secundaria a las terapias con inhibidores de tirosina-quinasas para la fusión SEPTIN6-ABL2<sup>111</sup>.

Figura 26

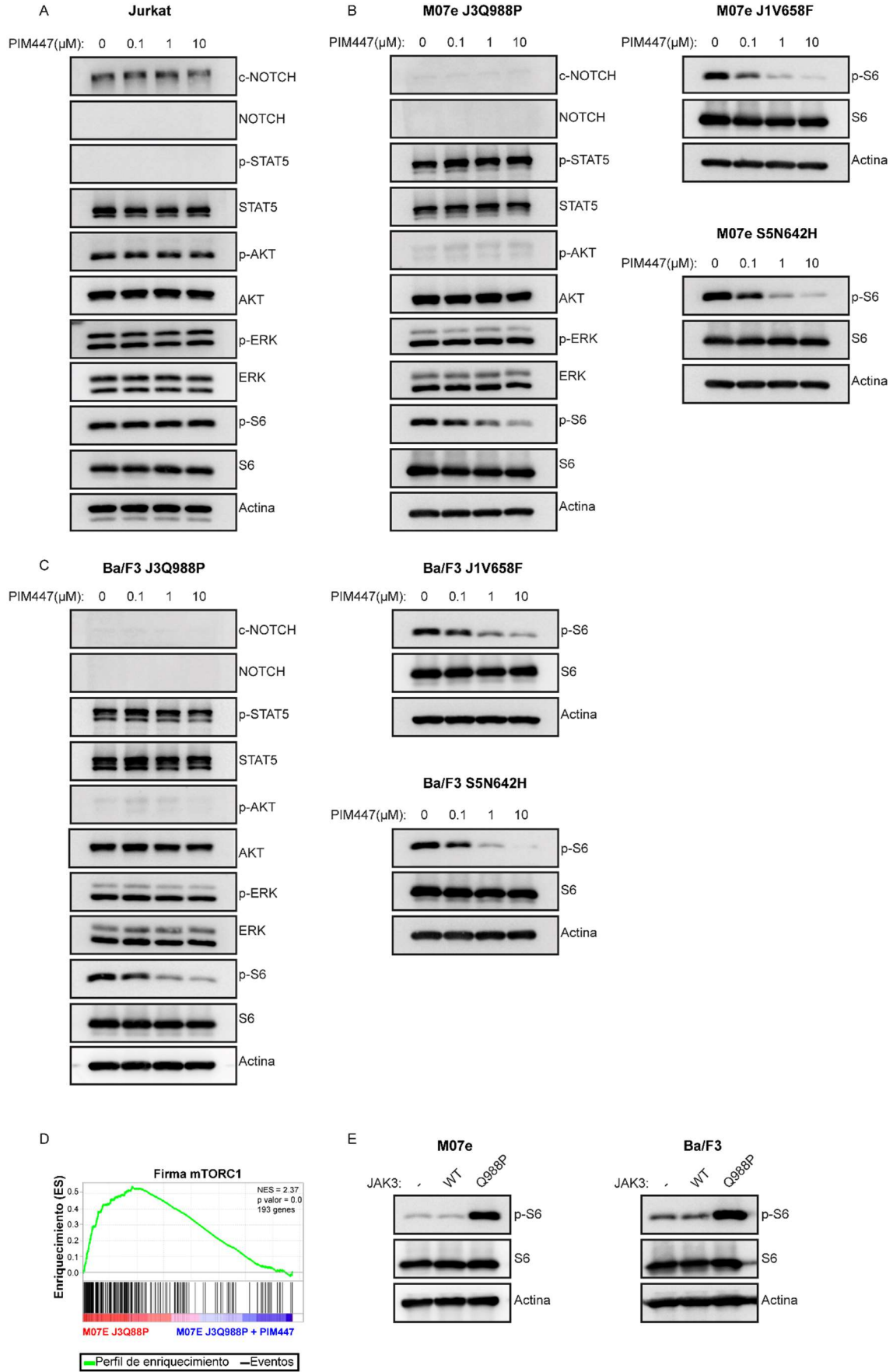


**Figura 27. Sensibilidad de la fusión SEPTIN6-ABL2 al inhibidor PIM447.**

Análisis del crecimiento celular (izquierda) y la viabilidad celular (derecha) mediante azul de tripán en las células UAMTALL-SA y Ba/F3 transducidas con la fusión SEPTIN6-ABL2 (Ba/F3-SA), que han sido tratadas con diferentes concentraciones de PIM447 (0, 0.1, 1 ó 10μM). Los resultados se han normalizado con respecto a las células sin tratar.

Con el fin de explorar los mecanismos moleculares por los que PIM1 contribuye al desarrollo tumoral en las células que presentan mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT, analizamos el estatus de activación de las vías de señalización más frecuentemente desreguladas en las T-ALL/LBL antes y después del tratamiento con PIM447 para determinar si en este contexto PIM1 induce la activación de otras vías de señalización (Figura 28A-C). Para ello, empleamos de nuevo las líneas celulares M07e y Ba/F3, donde mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT son responsables de su crecimiento y viabilidad. A diferencia de lo que ocurre en las células Jurkat, las líneas celulares M07e y Ba/F3 con expresión estable para el mutante JAK3<sup>Q988P</sup> muestran una diferencia sustancial en los niveles de fosforilación correspondientes a la proteína ribosómica S6, que es una diana directa de la vía de señalización de mTOR, en tanto que no se observan diferencias para el resto de los sustratos. Adicionalmente, confirmamos esa diferencia en la fosforilación de S6 en células con expresión estable de los mutantes JAK1<sup>V658F</sup> y STAT5<sup>N642H</sup>. En consecuencia, la inhibición de PIM1 disminuye la señalización correspondiente a la vía de mTOR (Figura 28D) indicando que las mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT tienen un impacto sobre la vía de mTOR a través del incremento en los niveles de PIM1 (Figura 28E).

**Figura 28**



**Figura 28. Capacidad de las mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT para promover la activación de la vía de mTOR a través de un incremento en los niveles de PIM1.**

A. Western blot para las proteínas c-NOTCH1, NOTCH1, p-STAT5, STAT5, p-AKT (T308), AKT, p-ERK, ERK, p-S6, S6 y Actina en las células Jurkat que han sido tratadas con diferentes concentraciones de PIM447 (0, 0.1, 1 ó 10 $\mu$ M).

B. Western blot para las proteínas c-NOTCH1, NOTCH1, p-STAT5, STAT5, p-AKT (T308), AKT, p-ERK, ERK, p-S6, S6 y Actina en las células M07e transducidas con la versión mutante del gen *JAK3* (*JAK3*<sup>Q988P</sup>) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de PIM447 (0, 0.1, 1 ó 10 $\mu$ M). Adicionalmente se analizan los niveles de proteínas p-S6, S6 y Actina en las células M07e transducidas con las versiones mutadas de los genes *JAK1* (*JAK1*<sup>V658F</sup>) y *STAT5* (*STAT5*<sup>N642H</sup>) y que también han sido tratadas con diferentes concentraciones de PIM447 (0, 0.1, 1 ó 10 $\mu$ M).

C. Western blot para las proteínas c-NOTCH1, NOTCH1, p-STAT5, STAT5, p-AKT (T308), AKT, p-ERK, ERK, p-S6, S6 y Actina en las células Ba/F3 transducidas con la versión mutante del gen *JAK3* (*JAK3*<sup>Q988P</sup>) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de PIM447 (0, 0.1, 1 ó 10 $\mu$ M). Adicionalmente se analizan los niveles de proteínas p-S6, S6 y Actina en las células Ba/F3 transducidas con las versiones mutadas de los genes *JAK1* (*JAK1*<sup>V658F</sup>) y *STAT5* (*STAT5*<sup>N642H</sup>) y que también han sido tratadas con diferentes concentraciones de PIM447 (0, 0.1, 1 ó 10 $\mu$ M).

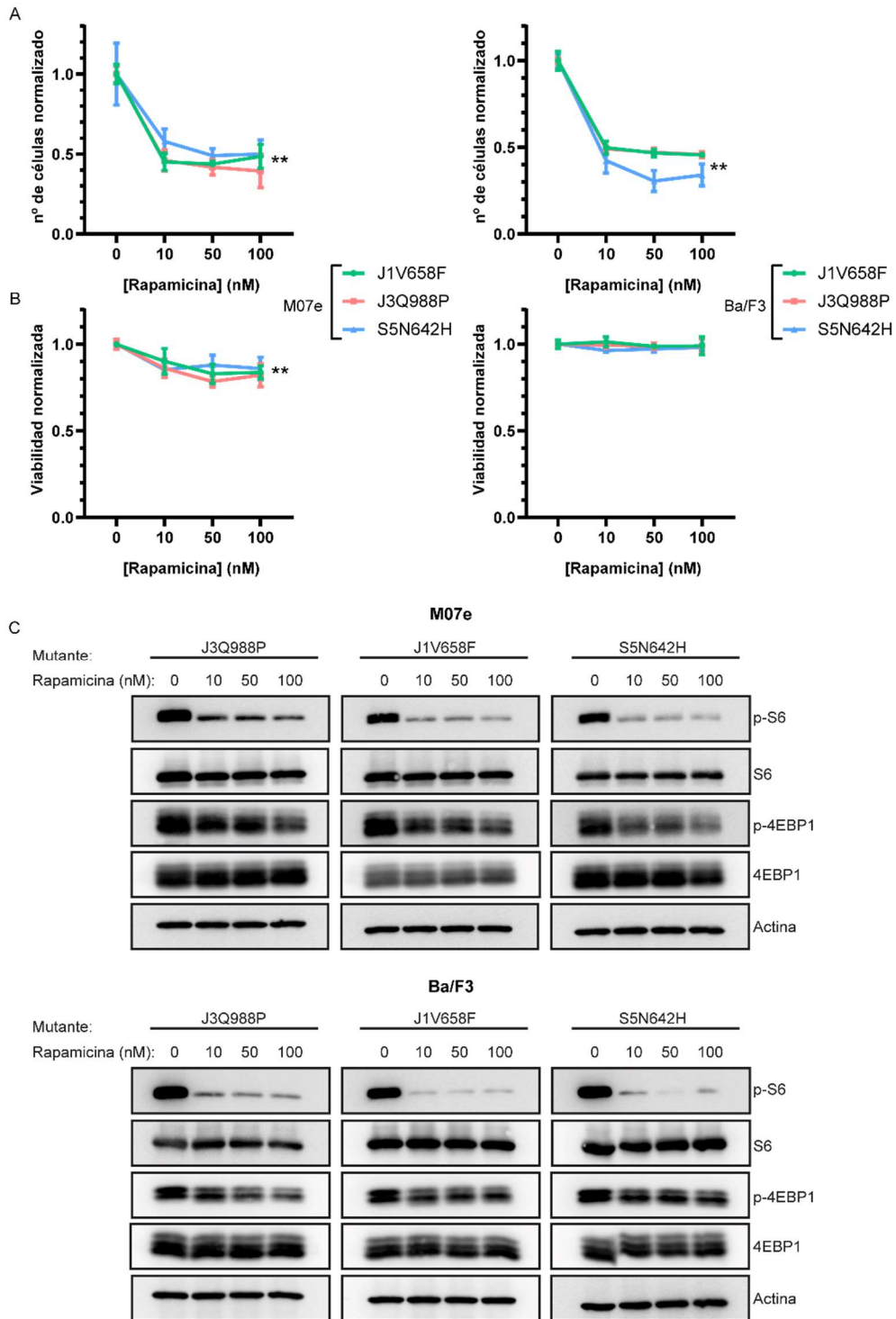
D. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) para la firma correspondiente a mTOR entre las células M07e transducidas con la versión mutante del gen *JAK3* (*JAK3*<sup>Q988P</sup>) bien sin tratar o bien tratadas con PIM447 (1  $\mu$ M). NES: valor de enriquecimiento normalizado; p: valor p nominal.

E. Western blot para las proteínas p-S6, S6 y Actina en las células M07e (izquierda) y Ba/F3(derecha) sin transducir (-) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK3* (*JAK3*<sup>WT</sup>) o bien con la versión mutada *JAK3*<sup>Q988P</sup>.

Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

Para determinar la importancia que tiene la vía de señalización de mTOR en el desarrollo tumoral de estas células, las tratamos con el inhibidor de mTOR, Rapamicina, y analizamos su crecimiento, su viabilidad y también el estatus de fosforilación de varias dianas de mTOR, como S6 y 4EBP1 (Figura 29A-C). Observamos que, de forma similar a lo que sucedía con el inhibidor PIM447, el tratamiento con Rapamicina también reduce los niveles de fosforilación de S6 y 4EBP1, pero los efectos observados a nivel de crecimiento celular y viabilidad son solamente parciales en comparación a los inducidos por el inhibidor PIM447, sugiriendo que PIM1 contribuye al desarrollo tumoral en estas células a través de mecanismos adicionales a la activación de la vía de señalización de mTOR.

Figura 29



**Figura 29. Sensibilidad de diferentes líneas celulares que presentan mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT al inhibidor Rapamicina.**

A. Análisis de crecimiento celular mediante azul de tripán en las células M07e (izquierda) y Ba/F3(derecha) transducidas con versiones mutadas de los genes JAK1 ( $JAK1^{V658F}$ ), JAK3 ( $JAK3^{Q988P}$ ) y STAT5 ( $STAT5^{N642H}$ ) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de Rapamicina (0, 10, 50 ó 100nM). Los resultados se han normalizado con respecto a las células sin tratar.



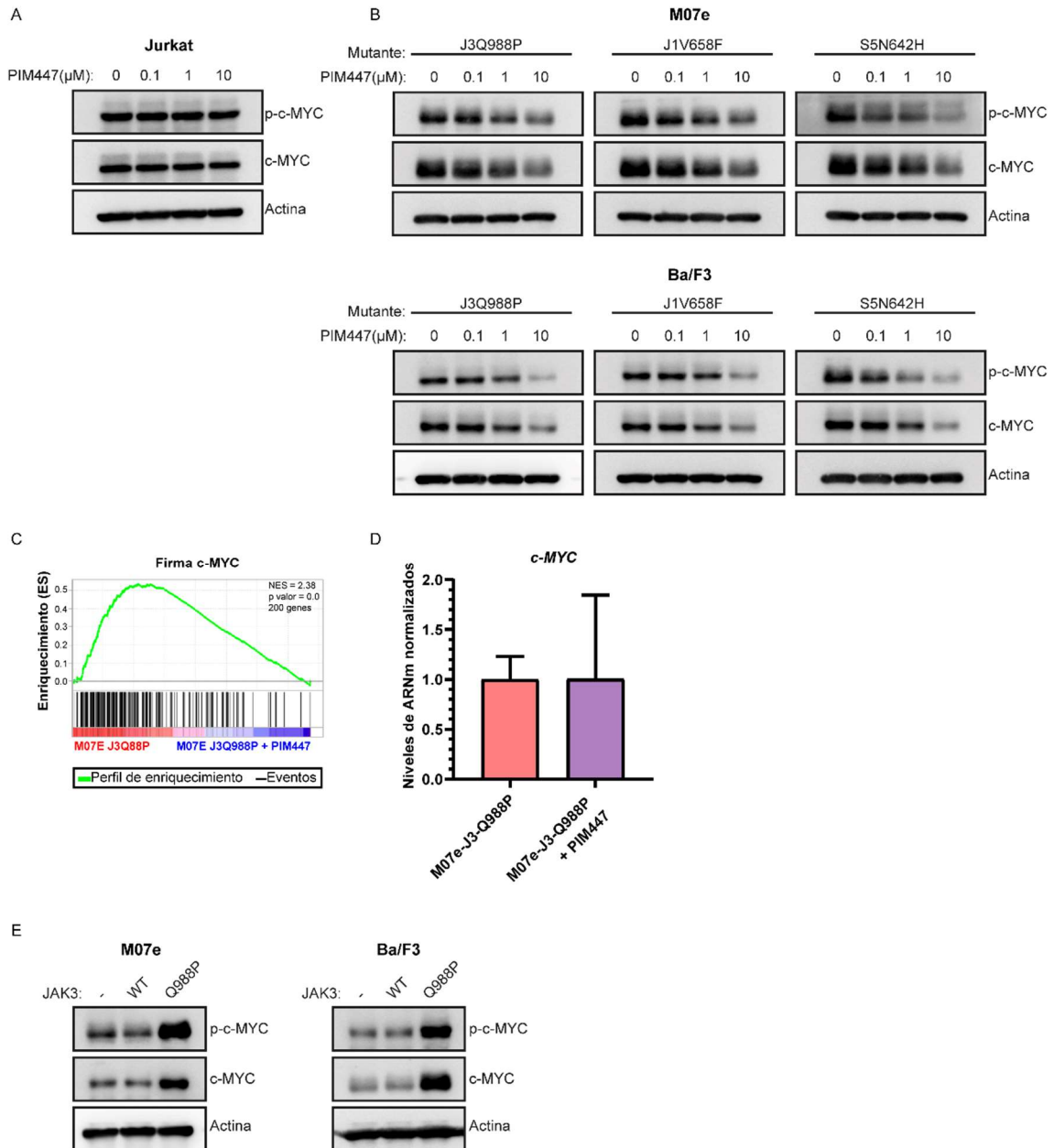
B. Análisis de viabilidad celular mediante azul de tripán en las células M07e (izquierda) y Ba/F3 (derecha) transducidas con versiones mutadas de los genes JAK1 (JAK1<sup>V658F</sup>), JAK3 (JAK3<sup>Q988P</sup>) y STAT5 (STAT5<sup>N642H</sup>) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de Rapamicina (0, 10, 50 ó 100nM). Los resultados se han normalizado con respecto a las células sin tratar.

C. Western blot para las proteínas p-S6, S6, p-4EBP1, 4EBP1 y Actina en las células M07e (arriba) y Ba/F3 (abajo) transducidas con versiones mutadas de los genes JAK1 (JAK1<sup>V658F</sup>), JAK3 (JAK3<sup>Q988P</sup>) y STAT5 (STAT5<sup>N642H</sup>) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de Rapamicina (0, 10, 50 ó 100nM).

Los gráficos muestran la media  $\pm$  desviación estándar (s.d.) tras tres experimentos independientes. \*p<0,05; \*\*p<0,01. Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

En este sentido, se ha descrito que PIM1 modula la estabilidad y funcionalidad de c-MYC a través de su fosforilación en la Serina 62<sup>112-114</sup>, de modo que analizamos el estatus de fosforilación de c-MYC, así como también sus niveles de proteína después de tratar a las células con PIM447. Al contrario de lo que sucede en las células Jurkat (Figura 30A), la inhibición de PIM1 en las líneas celulares M07e y Ba/F3 que expresan de forma estable los mutantes oncogénicos seleccionados produce una reducción tanto en los niveles de la proteína c-MYC como en la señalización correspondiente (Figura 30B y C) sin afectar a sus niveles de ARNm (Figura 30D), indicando que las mutaciones oncogénicas de la vía JAK/STAT tienen un impacto en el estatus de c-MYC a través del incremento de los niveles de PIM1 (Figura 30E). Desafortunadamente, de un modo similar a lo que sucede con STAT5, c-MYC también es un factor de transcripción cuya inhibición farmacológica se considera complicada<sup>115</sup>, dificultando así su papel como una potencial diana terapéutica para el tratamiento de las células que presenten mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5.

**Figura 30**



**Figura 30. Capacidad de las mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT para promover la activación de c-MYC a través de un incremento en los niveles de PIM1.**

A. Western blot para las proteínas p-c-MYC, c-MYC y Actina en las células Jurkat que han sido tratadas con diferentes concentraciones de PIM447 (0, 0.1, 1 ó 10μM).

B. Western blot para las proteínas p-c-MYC, c-MYC y Actina en las células M07e (arriba) y Ba/F3 (abajo) transducidas con versiones mutadas de los genes *JAK1* (*JAK1*<sup>V658F</sup>), *JAK3* (*JAK3*<sup>Q988P</sup>) y *STAT5* (*STAT5*<sup>N642H</sup>) y que han sido tratadas con diferentes concentraciones de PIM447 (0, 0.1, 1 ó 10μM).

C. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) para la firma correspondiente a c-MYC entre las células M07e transducidas con la versión mutante del gen *JAK3* (*JAK3*<sup>Q988P</sup>) bien sin tratar o bien tratadas con PIM447 (1 μM). NES: valor de enriquecimiento normalizado; p: valor p nominal.

D. Análisis de los transcritos correspondientes al gen *c-MYC* en las células M07e transducidas con la versión mutante del gen *JAK3* ( $JAK3^{Q988P}$ ) bien sin tratar o bien tratadas con PIM447 ( $1\mu\text{M}$ ). Los resultados se han normalizado frente a las células M07e-J3-Q988P.

E. Western blot para las proteínas p-c-MYC, c-MYC y Actina en las células M07e (izquierda) y Ba/F3 (derecha) sin transducir (-) o transducidas bien con la secuencia salvaje del gen *JAK3* ( $JAK3^{WT}$ ) o bien con la versión mutada  $JAK3^{Q988P}$ .

Los gráficos muestran la media  $\pm$  desviación estándar (s.d.) tras tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Las imágenes son ejemplos representativos de al menos tres experimentos independientes.

## **5. Discusión.**

La primera parte del trabajo ha consistido en la identificación y caracterización funcional de alteraciones susceptibles de contribuir a la activación constitutiva de STAT5 en pacientes con T-ALL/LBL. Para ello, ha sido necesario un enfoque transversal que requiere de la medicina y de la biología, y que tiene como punto de partida la obtención de muestras tumorales. En este sentido, el análisis y la utilización de muestras humanas resulta sustancialmente complejo porque se encuentra limitado por el número de pacientes diagnosticados, lo cual es especialmente relevante en el caso de los T-ALL/LBL, que son considerados como un tipo de enfermedad rara y que únicamente tienen una incidencia del 1% con respecto al número total de tumores detectados cada año<sup>116</sup>. Adicionalmente, el número de células tumorales obtenidas de cada paciente suele ser relativamente bajo y depende directamente de las biopsias realizadas. Pese a todo, la colaboración directa con varias instituciones sanitarias ha permitido al laboratorio la obtención de un número significativo de muestras tumorales y la subsiguiente identificación de alteraciones tanto de carácter genético como epigenético, que serán discutidas a continuación. A este respecto, cabe destacar que la caracterización funcional de las alteraciones previamente identificadas es un proceso complejo, puesto que requiere de la generación de modelos celulares que permitan determinar de una forma precisa si dichas alteraciones contribuyen al desarrollo tumoral y, en ese caso, si son susceptibles de ser tratadas con inhibidores farmacológicos específicos.

### **5.1. Alteraciones de carácter genético.**

El estudio de las alteraciones genéticas ha permitido la identificación de mutaciones de cambio de sentido en los genes *JAK1*, *JAK3* y *STAT5*. Si bien las alteraciones en dichos genes ya han sido descritas previamente como potencialmente oncogénicas<sup>37</sup>, nuestros resultados no solo confirman el carácter recurrente de las mismas, sino que además reivindican la importancia de la caracterización funcional e individualizada de las mutaciones previamente identificadas, en base a dos razones fundamentales.

En primer lugar, **para determinar si las mutaciones contribuyen de manera directa al desarrollo tumoral**. En segundo lugar, **para determinar las razones por las que una mutación contribuye al desarrollo tumoral**.

La mayor parte de las mutaciones presentes en una célula tumoral determinada no tienen un origen germinal, es decir, no han sido transmitidas por los progenitores a través de los gametos, sino que son de carácter somático. Dichas mutaciones aparecen de una manera relativamente espontánea y aleatoria en el genoma cuando la célula es sometida a un cierto estrés, que puede estar originado por agentes mutagénicos, tales como la radiación ultravioleta o el tabaco, pero también por agentes no mutagénicos, como por ejemplo la señalización mitogénica sostenida o la inflamación. En consecuencia, solamente una minoría de las mutaciones presentes en una célula tumoral determinada van a ser consideradas conductoras (*drivers*), es decir, mutaciones que promueven directamente el desarrollo tumoral y que podrían actuar como potenciales dianas terapéuticas. Por el contrario, el resto de las mutaciones (que en la mayoría de los tipos de cáncer representa hasta el 99% de las mutaciones) van a ser consideradas pasajeras, es decir, mutaciones que no contribuyen de forma directa al desarrollo tumoral y que en la mayoría de los casos son el producto de las alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN y la inestabilidad genética resultante que caracteriza a las células tumorales<sup>1,10</sup>.

A pesar de que estudios previos han demostrado la contribución de las mutaciones de cambio de sentido en el gen *JAK1* al desarrollo tumoral en los pacientes con T-ALL/LBL<sup>54</sup>, de las diez mutaciones caracterizadas funcionalmente en este trabajo solamente cuatro de ellas, incluyendo el control positivo *JAK1*<sup>V658F</sup> cuyos efectos habían sido previamente descritos<sup>77</sup>, producen la fosforilación permanente de las proteínas STAT en ausencia de citoquinas o factores de crecimiento y, por tanto, podrían ser consideradas mutaciones conductoras. En cuanto a las otras mutaciones, o bien no contribuyen al desarrollo tumoral, y por tanto serían consideradas mutaciones pasajeras, o bien contribuyen al desarrollo tumoral de una forma más sutil y a través de mecanismos diferentes a los analizados en este trabajo. En cualquier caso, no tendrían un impacto tan directo sobre la viabilidad y la proliferación celular como el de las mutaciones a las que hemos considerado conductoras. Esta discriminación resulta fundamental en el caso de genes como *JAK1*, para el cual se han identificado más de 40 mutaciones diferentes de cambio de sentido que afectan a múltiples dominios fundamentales de la proteína, sobre todo a la hora de proponer un tratamiento

potencial. En este sentido, se ha demostrado que el inhibidor Ruxolitinib bloquea la actividad quinasa de la proteína JAK1 y se ha postulado que los pacientes con T-ALL/LBL que presenten mutaciones en *JAK1* son potenciales candidatos a ser tratados con Ruxolitinib. De hecho, actualmente se están realizando ensayos clínicos para comprobar este supuesto. Sin embargo, Ruxolitinib solo podría inducir una respuesta significativa en aquellos pacientes cuyas mutaciones en *JAK1* sean conductoras, en tanto que para el resto de los pacientes el tratamiento con Ruxolitinib no reportaría ningún beneficio y, además, se arriesgan a sufrir los efectos secundarios derivados de dicho tratamiento.

En cuanto a las razones por las que una mutación contribuye al desarrollo tumoral, la mayoría de las mutaciones conductoras que afectan a los genes *JAK1*, *JAK3* y *STAT5* en los pacientes con T-ALL/LBL son mutaciones de cambio de sentido que producen un cambio conformacional en la proteína resultante, de modo que se encuentra en un estado activado incluso en ausencia de los inductores pertinentes, que en este caso serían citoquinas y factores de crecimiento. Sin embargo, dichas alteraciones también pueden contribuir al desarrollo tumoral por otros mecanismos adicionales, como es el caso de la mutación en *JAK3* Q988P, que se ha caracterizado funcionalmente en este trabajo. Dicha mutación no solo promueve la activación constitutiva de STAT5 en ausencia de citoquinas y factores de crecimiento, al igual que sucede con la mayoría de mutaciones conductoras en *JAK3* identificadas en pacientes con T-ALL/LBL<sup>55</sup>, sino que además es capaz de hacerlo independientemente de la presencia de IL7R y de JAK1, lo cual resulta mucho menos frecuente ya que, hasta ahora, solamente había sido descrito para las mutaciones en *JAK3* L857P y L875H<sup>78</sup>. Este hecho resulta determinante a la hora de elegir el tratamiento adecuado para aquellos pacientes que presenten la mutación *JAK3*<sup>Q988P</sup> que, además, parece tener un carácter recurrente. Si bien estudios previos han demostrado que Ruxolitinib también es eficaz frente a las mutaciones conductoras en *JAK3*, debido a su necesidad de una proteína JAK1 funcionalmente activa<sup>55</sup>, este no sería el caso de la mutación Q988P. Nuestros resultados demuestran que dicha mutación es significativamente menos sensible a Ruxolitinib que aquellas mutaciones conductoras de *JAK3* que sí necesitan de una proteína JAK1 funcionalmente activa. En este sentido, el tratamiento de la mutación

JAK3<sup>Q988P</sup> con otros inhibidores, como por ejemplo Tofacitinib, tendría un mayor impacto en términos de eficacia.

En base a lo anterior, sería interesante profundizar sobre los cambios conformacionales que permiten a las mutaciones L857P, L875H y la aquí descrita Q988P producir no solamente una activación constitutiva de la proteína JAK3 sino también hacerlo de forma independiente a las proteínas JAK1 e IL7R. Si bien es cierto que dichas mutaciones no tienen lugar en el dominio pseudoquinasa, que es el dominio de la proteína JAK3 más frecuentemente afectado por mutaciones de cambio de sentido, sino que se localizan en el dominio quinasa, dicha característica no resultaría determinante por sí sola, puesto que existen otras mutaciones oncogénicas en *JAK3* que también se localizan en el dominio quinasa pero que no son capaces de actuar independientemente de IL7R y JAK1. Además, algunas de estas mutaciones, como es el caso de P906S y E958K, se encuentran en un punto intermedio, a nivel de secuencia, entre las mutaciones L875H y Q988P, sugiriendo que los cambios conformacionales producidos por estas dos mutaciones independientes de IL7R y JAK1 tienen un efecto semejante sobre la estructura terciaria de la proteína, al menos en lo que se refiere a la interacción con las proteínas IL7R y JAK1.

La alteración de carácter genético más relevante que se ha identificado durante el transcurso de este trabajo es la **fusión entre los genes *SEPTIN6* y *ABL2***, probablemente por la singularidad de la misma. En este sentido, la fusión SEPTIN6-ABL2 no solamente es nueva, sino que además es la primera fusión que ha sido identificada directamente en un paciente con T-ALL/LBL tanto al diagnóstico como en recaída que implica a *SEPTIN6* o *ABL2*, explicándose así por qué no fue detectada durante la evaluación inicial del paciente. Si bien en torno a un 50% de los pacientes con T-ALL/LBL presenta un cariotipo anormal y las translocaciones son eventos relativamente frecuentes, la mayoría de ellas consisten en la yuxtaposición de las secuencias promotoras y potenciadoras de los genes TCR (*TCRβ* y *TCRγ* en el cromosoma 7, *TCRα* y *TCRδ* en el cromosoma 14) con genes que codifican factores de transcripción oncogénicos tales como *TAL1*, *LYL1* o *HOX11*, produciendo una sobreexpresión o expresión aberrante de los mismos. Por el contrario, solamente una minoría de las translocaciones identificadas en pacientes con T-ALL/LBL da lugar a

genes de fusión que codifican para proteínas quiméricas con funciones oncogénicas, tales como las fusiones de *SIL* con *TAL1* o las fusiones de *MLL* con diversos genes<sup>36</sup>. Dentro de este último grupo, las fusiones de *ABL2* habían pasado desapercibidas. Sin embargo, la reciente identificación de CD99-ABL2<sup>117</sup> junto con la aquí descrita SEPTIN6-ABL2, sugiere que las fusiones de *ABL2* son eventos raros pero recurrentes en los pacientes con TA-LL/T-LBL y, por tanto, deben ser tenidos en cuenta durante la evaluación inicial de los casos.

El clonaje de la secuencia codificante de la fusión SEPTIN6-ABL2 en un vector lentiviral y su posterior expresión ectópica en las células Ba/F3 han permitido demostrar, de una forma específica, el carácter oncogénico de la misma. Sin embargo, a la hora de desentrañar los mecanismos moleculares a través de los cuales la fusión SEPTIN6-ABL2 contribuye al desarrollo tumoral, el establecimiento de la línea celular UAMTALL-SA ha resultado una herramienta fundamental. Esto se debe a que la línea celular UAMTALL-SA deriva directamente de las células tumorales del paciente en recaída y ha sido establecida sin necesidad de llevar a cabo procesos de inmortalización (a través de la expresión ectópica de oncogenes adicionales que pueden implicar a los genes *RAS* o *c-MYC* entre otros) o de selección clonal (que permiten una selección positiva de aquellos clones del tumor que presentan un mayor grado de malignidad) lo cual tiene dos implicaciones fundamentales. Por un lado, demuestra que las células tumorales del paciente en recidiva ya presentaban una capacidad oncogénica extraordinaria y, por tanto, una predisposición para ser cultivadas *in vitro*. Por otro lado, favorece que la línea celular guarde un alto grado de similitud con las células del paciente, lo cual no solamente se refleja en el hecho de que ambas presenten un inmunofenotipo y una huella genética semejantes, sino que además, la línea celular UAMTALL-SA recapitula todas las alteraciones principales identificadas en las células del paciente: la alteración de *PTPRC*, la delección de *CDKN2A*, la trisomía del cromosoma 17 y la fusión SEPTIN6-ABL2. Por todo lo anterior, la línea UAMTALL-SA ha permitido demostrar la forma en que la fusión SEPTIN6-ABL2 contribuye al desarrollo tumoral, que no es idéntica a la que opera en otras fusiones que también implican a los genes *ABL*. Concretamente, SEPTIN6-ABL2 no produce una activación directa de las vías de señalización de PI3K/AKT o de MAPK/ERK, sino solamente de la vía de señalización de STAT. Además,



la activación de dicha vía se limita a la proteína STAT5, a pesar de la presencia de otros miembros de la familia STAT que también están implicados en cáncer tales como STAT1 o STAT3, y parece ser independiente del estatus de fosforilación de las familias de proteínas JAK y SRC.

Estos resultados apoyan que la especificidad de las proteínas diana de las fusiones que implican a ABL1 o ABL2 viene determinada por el tipo celular de origen y por el otro gen que forma parte de la fusión. Con respecto a la célula de origen, la fusión SEPTIN6-ABL2 se ha detectado en linfoblastos T tumorales, en tanto que la mayoría de las fusiones de este tipo son identificadas en pacientes con leucemia mieloide crónica o con leucemia linfoblástica de células B<sup>118</sup>. Con respecto al otro gen que forma parte de la fusión, en el caso de SEPTIN6-ABL2, se trata de *SEPTIN6* que pertenece a la familia de las septinas. Dichas proteínas, que se consideran el cuarto elemento del citoesqueleto, se caracterizan porque contienen una región conservada de unión a GTP y porque pueden formar complejos heteroméricos que se asocian con un alto grado de orden estructural. Este hecho resulta especialmente relevante puesto que podría favorecer una posible interacción entre las proteínas de fusión SEPTIN6-ABL2, de un modo análogo a como sucede entre las proteínas de fusión BCR-ABL1 a través de determinados dominios de la región BCR. Además, las septinas también pueden asociarse con filamentos de actina, microtúbulos y fosfolípidos de la membrana, sugiriendo posibles interacciones entre la proteína quimérica SEPTIN6-ABL2 y diferentes componentes del citoesqueleto. Finalmente, las septinas actúan a modo de andamio participando en el reclutamiento y organización de otras proteínas, por lo que su mal funcionamiento está asociado con diferentes enfermedades neurodegenerativas, tales como el alzhéimer o el párkinson, y también con algunos tipos de cáncer<sup>85</sup>. De este modo, un estudio pormenorizado de las funciones canónicas de la proteína SEPTIN6 podría ayudar a la identificación de nuevas dianas específicas de la fusión SEPTIN6-ABL2. Además, al contrario de lo que sucede en la mayoría de las fusiones de *ABL1* y *ABL2*, SEPTIN6-ABL2 presenta alteraciones en los dominios SH3 y SH2 de la proteína ABL2, que se han delecionado de forma total y parcial respectivamente. Este hecho resulta especialmente relevante puesto que ambos dominios regulan negativamente la actividad quinasa tanto en ABL1 como en ABL2 y,

por tanto, la pérdida de los mismos favorece que ABL2 se encuentre en una conformación constitutivamente activa.

El estudio simultáneo de la línea celular UAMTALL-SA y de las células Ba/F3 con expresión ectópica de SEPTIN6-ABL2 ha demostrado la sensibilidad de SEPTIN6-ABL2 y también de las células derivadas del paciente a los inhibidores de tirosina-quinasa Imatinib, Nilotinib y Dasatinib, así como también a inhibidores para las proteínas PIM. Sin embargo, ninguno de estos inhibidores está actualmente aprobado para el tratamiento de las T-ALL/LBL a pesar de que algunos de ellos, como los inhibidores de tirosina-quinasa Imatinib, Nilotinib y Dasatinib, son utilizados de forma rutinaria para el tratamiento de otras neoplasias hematológicas como, por ejemplo, la leucemia mieloide crónica o la leucemia linfoblástica de células B. En este aspecto, la baja incidencia de las fusiones de ABL2 en las T-ALL/LBL complica la realización de ensayos clínicos para los inhibidores de tirosina-quinasa. Sin embargo, a la vista de los resultados mostrados en este trabajo y dado que las fusiones de ABL2 parecen tener un carácter recurrente en las T-ALL/LBL, resultaría razonable que futuros pacientes diagnosticados con T-ALL/LBL que presenten la fusión SEPTIN6-ABL2, y probablemente también otras fusiones de ABL2, puedan ser tratados desde un punto de vista tumor-agnóstico. De este modo, el tratamiento no estaría exclusivamente basado en el origen celular del tumor sino también en los biomarcadores presentes en las células tumorales, tales como la fusión SEPTIN6-ABL2, y los inhibidores de tirosina-quinasa serían entonces potenciales opciones a tener en cuenta. Cabe resaltar que los tratamientos tumor-agnóstico han adquirido una importancia considerable durante los últimos años, que ha dado lugar a la reciente aprobación por la FDA de inhibidores con carácter tumor-agnóstico como Pembrolizumab, Larotectinib y Entrectinib en los años 2017, 2018 y 2019 respectivamente<sup>119</sup>.

## **5.2 Alteraciones de carácter epigenético.**

Hemos analizado el estatus de metilación en los pacientes con T-ALL/LBL, así como también sus posibles consecuencias en lo referente a la activación constitutiva de STAT5 en dichos pacientes. Concretamente nos hemos centrado en las islas CpG asociadas con el inicio de la transcripción de los genes pertenecientes a las familias SHP, SOCS y PIAS que son considerados como potenciales reguladores negativos de la

vía JAK/STAT<sup>51</sup>. Nuestros resultados demuestran que, al contrario de lo que sucede con la mayoría de alteraciones que afectan a otros miembros de la vía de STAT5, la hipermetilación de *SOCS3* es un evento relativamente frecuente en los pacientes con T-ALL/LBL, ya que está presente en más del 50% de las líneas celulares y tumores primarios analizados, independientemente de ciertos parámetros tales como la edad, el inmunofenotipo o el subgrupo celular al que pertenecen. Adicionalmente, nuestros resultados demuestran que la desregulación de *SOCS3* puede contribuir a la fosforilación permanente de las proteínas STAT en los pacientes con T-ALL/LBL a través de varios mecanismos, como son el incremento del potencial de las mutaciones oncogénicas en *JAK1* y el incremento de señalización a través de la interleuquina-7. En este sentido, los T-ALL/LBL, al igual los timocitos normales, también requieren de la interleuquina-7 para la viabilidad y proliferación celular, al menos durante los primeros estadios del desarrollo tumoral e independientemente de que presenten mutaciones oncogénicas en otras vías de señalización<sup>101,102</sup>. Por tanto, la alta incidencia de la hipermetilación de *SOCS3* podría ser explicada desde su capacidad para contribuir al desarrollo tumoral en la mayoría de pacientes con T-ALL/LBL.

Además, la desregulación de *SOCS3* puede cooperar con otras alteraciones que afecten a la vía de STAT5 para producir la activación constitutiva de la misma, siguiendo un modelo aditivo, por el cual son necesarias varias alteraciones dentro de una misma vía de señalización para producir su completa desregulación. Este modelo resulta especialmente plausible en el caso de la vía de STAT5, que está estrictamente regulada en las células normales tanto a nivel de inducción, mediante citoquinas o factores de crecimiento, como a nivel de inhibición, a través de diversas familias de proteínas, entre ellas la familia SOCS. En lo relativo a esta idea, hay estudios previamente publicados que ya muestran la cooperación entre las alteraciones de *JAK1* y *PTPN2* o entre las alteraciones de *JAK3* y *PTPRC*<sup>59,68</sup>. En nuestro caso, observamos que la desregulación de *SOCS3* incrementa el potencial de las mutaciones oncogénicas en *JAK1*. Sin embargo, puesto que *SOCS3* no sólo bloquea la actividad quinasa de los mutantes oncogénicos en *JAK1* sino también de la proteína *JAK1* normal, la desregulación de *SOCS3* también podría ser relevante para las mutaciones oncogénicas

que afectan a los genes *IL7R* y *JAK3*, dado que ambos requieren de una proteína JAK1 normal funcional<sup>55,57</sup>.

Nuestros resultados demuestran que los mutantes oncogénicos de JAK1 son capaces de fosforilar a SOCS3 en mayor medida que la proteína JAK1 normal y que dicha fosforilación ocurre específicamente en los residuos de tirosina 204 y 221. En este sentido, estudios previos han descrito que la fosforilación de ambas tirosinas modula la estabilidad de SOCS3, puesto que inhibe su interacción con la Elonguina-E y favorece su degradación en el proteasoma<sup>103,104</sup>. Por tanto, nuestros resultados sugieren que los niveles de SOCS3 pueden reducirse en los pacientes con T-ALL/LBL a través de dos mecanismos complementarios, la hipermetilación y la fosforilación, poniendo de manifiesto la importancia de la desregulación de SOCS3 para el desarrollo tumoral de estas neoplasias hematológicas. Adicionalmente, nuestros resultados indican que los mutantes oncogénicos de JAK1 no solo contribuirían a la activación constitutiva de la vía JAK/STAT mediante una fosforilación aberrante de las proteínas STAT, como ya se había demostrado previamente, sino también de SOCS3, identificando así un nuevo mecanismo por el que las mutaciones oncogénicas en JAK1 promoverían el desarrollo tumoral en las neoplasias linfoblásticas de células T.

En base a los resultados anteriores, SOCS3 podría considerarse como una potencial diana terapéutica (Figura 31) para aquellos pacientes en los que se encuentre desregulado y que además presenten una activación constitutiva de STAT5, puesto que el restablecimiento de la expresión de *SOCS3* contribuiría a reducir la sobre-activación de STAT5 y, por ende, a frenar el desarrollo tumoral en dichos pacientes. A este respecto, los agentes demetilantes tales como Decitabine, actualmente aprobado para el tratamiento de los mielomas múltiples, podrían ser una opción a explorar. Sin embargo, dichos inhibidores de la metilación no actuarían específicamente sobre la isla CpG asociada a *SOCS3*, sino que lo harían a un nivel general. Por tanto, resulta imprescindible evaluar su adecuación en términos de eficacia de modo que los potenciales beneficios no se vean opacados por una serie de efectos secundarios adversos que, por otro lado, son relativamente habituales en este tipo de tratamientos. En esta línea, resultaría de gran utilidad comprobar si, a parte de *SOCS3*, otros genes que puedan actuar como supresores tumorales también se encuentran

afectados por un perfil de metilación aberrante, favoreciendo que el tratamiento con agentes demetilantes actuase simultáneamente sobre varias dianas y pudiera tener un efecto más notable sobre el desarrollo tumoral. Otra aproximación razonable, consistiría en determinar si la hipermetilación de *SOCS3* está relacionada con la presencia de mutaciones en genes implicados en el proceso de metilación o si por el contrario se trata de un evento independiente promovido por la alta plasticidad que muestran las células tumorales a la hora de generar cambios en el ADN.

Figura 31



Figura 31. Implicaciones de la desregulación y deficiencia de *SOCS3* en las T-ALL/LBL.

### 5.3. Mecanismos moleculares por los que una activación constitutiva de *STAT5* promueve el desarrollo tumoral en los pacientes con T-ALL/LBL que presentan alteraciones en diferentes miembros de la vía de *STAT5*.

Puesto que la fosforilación de *STAT5* da lugar a su dimerización y translocación al núcleo, donde actúa como un factor de transcripción, sería razonable pensar que dicha activación de *STAT5* tuviese como consecuencia directa un cambio en la expresión génica. En este sentido, el estudio de la expresión génica para un amplio número de pacientes diagnosticados con T-ALL/LBL ha demostrado que los pacientes con mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT muestran un enriquecimiento en la firma de GSEA correspondiente a *STAT5*. Si bien el número de genes reconocidos como dianas transcripcionales de *STAT5* es muy elevado y oscila en torno a 2000, los análisis de expresión diferencial muestran que solo una minoría de ellos se encuentran sobre-expresados en los pacientes que presentan mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT. Por consiguiente, es probable que la especificidad mostrada por *STAT5* a la hora de inducir la expresión de unos genes u otros esté relacionada con el mecanismo molecular a través del cual se ha producido la activación de *STAT5* y, probablemente, también con el tipo celular en el que se ha producido dicha activación. Además, de entre todos los genes sobre-expresados, *PIM1* es uno de los pocos que aparece

considerado como un gen directamente implicado en cáncer, según la base de datos Intogen (<https://www.intogen.org/search>). Sin embargo, este dato no implica que el resto de genes sobre-expresados no contribuyan al desarrollo tumoral de una forma u otra y, en este sentido, es probable que lo hagan puesto que la mayoría de ellos presenta una expresión aberrante en diferentes tipos de cáncer, según la base de datos Atlasgeneticsoncology (<https://atlasgeneticsoncology.org/gene-explorer/>).

Si bien la correlación entre la presencia de mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT y los niveles de transcrito de *PIM1* ya había sido previamente descrita<sup>94</sup>, la generación durante este trabajo de modelos celulares, cuya proliferación y viabilidad dependen de mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5, ha permitido demostrar que dicha correlación es el resultado de que los mutantes oncogénicos en la vía de STAT5 inducen un incremento en los niveles de PIM1 que, además, no solamente tiene lugar a nivel de ARN mensajero sino también a nivel de proteína. Este hecho es especialmente relevante a la hora de considerar a PIM1 como una potencial diana terapéutica, puesto que los inhibidores de PIM1 más populares que existen a día de hoy actúan inhibiendo la actividad quinasa de dicha proteína. Esto se debe a que PIM1 forma parte de la familia de serina-treonina quinasas PIM, que está compuesta por los miembros PIM1, PIM2 y PIM3. Los 3 miembros se caracterizan por presentar un considerable grado de redundancia en cuanto a su actividad funcional, y también mecanismos compensatorios en cuanto a sus niveles de transcritos. Estas características se traducen en que la inhibición transcripcional de solamente uno de los miembros de la familia *PIM* no tenga un impacto relevante en cuanto a los niveles de actividad, puesto que, a modo de compensación, se produce un incremento en la expresión génica de los otros dos miembros<sup>107</sup>. Por lo tanto, una inhibición simultánea y a nivel de proteína de los 3 miembros de la familia PIM, a través de los denominados pan-PIM inhibidores, se postula como una opción mucho más atractiva en términos de efectividad y, además, resulta viable en base a dos razones fundamentales. Por un lado, los tres miembros de la familia PIM presentan un alto nivel de homología estructural, que es superior al 60%, y comparten la característica de ser las únicas quinasas que presentan una prolina en la bisagra del centro activo, lo que resulta en un solo puente de hidrogeno interaccionando con la molécula de ATP<sup>105</sup>. Por otro lado,

la triple delección de *PIM1*, *PIM2* y *PIM3* da lugar a ratones viables y fértiles. Como características diferenciales, dichos animales presentan un tamaño más pequeño, así como también la incapacidad por parte de algunas de sus células hematopoyéticas para responder de forma adecuada a diversas citoquinas o factores de crecimiento. En concreto, las proteínas PIM resultan fundamentales para la viabilidad y proliferación de los linfocitos T periféricos, lo cual sugiere que un incremento en los niveles de dichas proteínas, como por ejemplo *PIM1*, pueda contribuir al desarrollo tumoral en las T-ALL/LBL y afecte de forma específica a este tipo celular<sup>106</sup>. Estos aspectos apoyan que la inhibición de la actividad de las proteínas PIM a través de los pan-PIM inhibidores sea específica y esté exenta de efectos secundarios adversos graves. Además, a diferencia de la mayoría de proteínas quinasas, los miembros de la familia PIM no presentan ninguna regulación negativa a nivel estructural, por lo que se encuentran en un estado permanentemente activo. De este modo, los niveles de actividad de las proteínas PIM van a estar directamente relacionados con sus niveles de expresión génica. Por lo tanto, la sobreexpresión de *PIM1* puede suponer por sí misma una contribución directa al desarrollo tumoral<sup>120</sup>.

Nuestros resultados demuestran que la sobreexpresión de *PIM1* resulta fundamental para la contribución al desarrollo tumoral que ejercen las mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5, puesto que el tratamiento con el pan-PIM inhibidor, PIM447, reduce los niveles de crecimiento celular, proliferación, progresión G1/S y viabilidad en las células que presentan este tipo de mutaciones. Este hecho resulta de gran interés puesto que, si bien *PIM1* es uno de los pocos genes diana de STAT5 que aparece sobreexpresado en los pacientes con mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5 y al que se le reconoce una implicación directa en el cáncer, múltiples estudios han reportado que algunos miembros de la vía JAK/STAT con un alto número de mutaciones oncogénicas, como por ejemplo *JAK1* y *JAK3*, son capaces de contribuir al desarrollo tumoral a través de diversos mecanismos. A este respecto, *JAK1* y *JAK3* son capaces de fosforilar no solamente a STAT5 sino a varios miembros de la familia STAT<sup>47</sup>. Sin embargo, el hecho de que sea STAT5 el miembro más frecuentemente fosforilado de una forma aberrante en los pacientes con T-ALL/LBL puede deberse a que, en dichas neoplasias hematológicas, *JAK1* y *JAK3* funcionan mayoritariamente a través del receptor de la

interleuquina-7, que produce una activación específica de STAT5<sup>37</sup>. De todas formas, una vez que están unidas a su correspondiente receptor, las proteínas JAK no solamente promueven la fosforilación de las proteínas STAT, sino que también dan lugar a la activación de otras vías de señalización, como por ejemplo la vía de MAPK/ERK. Aunque la mecánica de dicha activación no está completamente descrita a nivel molecular, se postula que las proteínas JAK fosforilan varios residuos de tirosina del receptor al que se encuentran unidas, que a su vez actúan como sitios de anclaje para diversas proteínas que regulan la actividad de RAS, como serían SHC y el complejo GRB2-SOS<sup>121</sup>. Adicionalmente, las proteínas JAK son capaces de fosforilar a otras proteínas que no forman parte de la vía de señalización JAK/STAT, como serían PIK2, JBP1, IRS1, IRS2 o RAF1<sup>122</sup>. Por último, se ha descrito que la proteína JAK1 no tiene por qué llevar a cabo su actividad tirosina-quinasa solamente cuando está unida a su correspondiente receptor, sino que presenta una señal de localización nuclear y puede translocarse al núcleo, donde es capaz de fosforilar a la tirosina 41 de la histona H3. Este evento rompe la interacción entre la histona H3 y la proteína HP1 $\alpha$ , dando lugar a un cambio en los niveles de expresión de multitud de genes, tales como *LMO2*, que parece estar implicado en el proceso de leucemogénesis<sup>123,124</sup>.

Puesto que la sobreexpresión de PIM1 resulta fundamental para la contribución al desarrollo tumoral ejercida por las mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5, el siguiente paso ha consistido determinar los mecanismos moleculares por los que dicha sobreexpresión de PIM1 promueve proliferación y viabilidad en las células que presentan mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5. En este sentido, el análisis de las vías de señalización más frecuentemente alteradas en los pacientes con T-ALL/LBL ha permitido demostrar que el tratamiento con el pan-PIM inhibidor, PIM447, produce una disminución en los niveles de activación de la vía de mTOR. Estudios previos han demostrado que las proteínas PIM son capaces de fosforilar y modular la actividad de diferentes miembros de la vía de mTOR, tales como eIF4B (fosforilado en las serinas 406 y 422), PRAS40 (fosforilado en la treonina 246) y TSC2 (fosforilado en la serina 1798)<sup>125-127</sup>. Sin embargo, cuando los modelos celulares previamente generados y que dependen de las mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5 para su proliferación y viabilidad son tratados con el inhibidor de mTOR, Rapamicina, los resultados



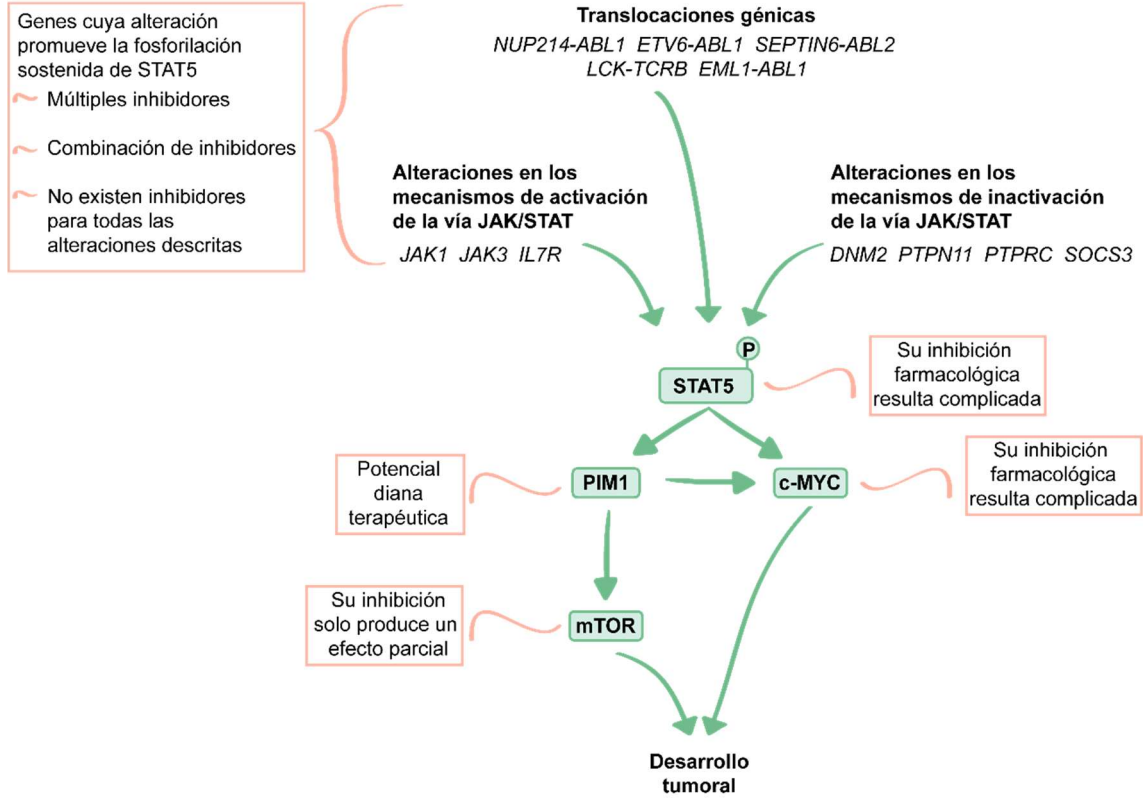
observados, en cuanto a la inhibición de la viabilidad y la proliferación celular, son sensiblemente menores a los obtenidos para las células tratadas con PIM447. Por tanto, estos resultados sugieren que PIM1 contribuye al desarrollo tumoral a través de mecanismos adicionales a la activación de la vía de mTOR.

En este sentido, estudios previos realizados en ratones han demostrado una fuerte cooperación sinérgica entre las proteínas PIM1 y c-MYC a la hora de promover el desarrollo tumoral<sup>112</sup>. Esta sinergia, parece ser el resultado de la capacidad de PIM1 para fosforilar a c-MYC en la serina 62<sup>113</sup>. La fosforilación de c-MYC en dicha serina produce un incremento en su estabilidad y, consecuentemente, en su capacidad transcripcional. Por el contrario, una fosforilación adicional en su treonina 58 da lugar a que la serina 62 sea desfosforilada por la proteína PP2A y a que c-MYC sea ubiquitinado para su posterior degradación en el proteasoma<sup>114</sup>. De este modo, las fosforilaciones en la serina 62 y en la treonina 58 de c-MYC tienen efectos opuestos a la hora de controlar su estabilidad. Siguiendo esta línea, nuestros resultados demuestran que la inhibición de PIM reduce tanto los niveles de proteína de c-MYC como la señalización correspondiente sin afectar a sus niveles de ARNm, indicando que las mutaciones oncogénicas de la vía JAK/STAT tienen un impacto en el estatus de c-MYC a través del incremento de los niveles de PIM1. Sin embargo, al igual que sucede con STAT5, c-MYC es un factor de transcripción cuya inhibición a nivel farmacológico resulta difícil en términos de eficacia y especificidad, complicándose así su papel como potencial diana terapéutica<sup>115</sup>.

Estos resultados ponen de manifiesto que las mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5 van a contribuir al desarrollo tumoral, al menos en parte, a través de un incremento en los niveles de PIM1 y la consiguiente activación de c-MYC y mTOR. También se demuestra que existe un cierto grado de homología entre las dos vías de señalización más frecuentemente desreguladas en los pacientes con T-ALL/LBL, las vías de NOTCH y de STAT5, a la hora de contribuir al desarrollo tumoral, puesto que ambas promueven un incremento en los niveles de actividad de c-MYC, aunque lo hacen de formas diferentes. En el caso de la vía de NOTCH, a través del incremento de los niveles de expresión de c-MYC puesto que c-MYC es una diana transcripcional de NOTCH<sup>128</sup>, y en el caso de la vía de STAT5, a través de un incremento tanto en los

niveles de expresión de c-MYC como en la estabilidad de la proteína resultante por medio de PIM1<sup>71</sup>. En consecuencia, los mecanismos ejercidos por ambas vías de señalización para incrementar los niveles de actividad de c-MYC no son excluyentes, sino que más bien resultan complementarios, lo cual podría dar lugar a un efecto sinérgico entre ambas vías que podría explicar la co-existencia de mutaciones oncogénicas que afectan a las vías de NOTCH y de STAT5 en muchos pacientes con T-ALL/LBL<sup>39</sup>. En definitiva, nuestros resultados muestran que el incremento de PIM1 promovido por las mutaciones oncogénicas en la vía de STAT5 contribuye al desarrollo tumoral y, consecuentemente, que PIM1 puede convertirse en una potencial diana terapéutica para tratar aquellos pacientes con T-ALL/LBL que presenten mutaciones oncogénicas en la vía JAK/STAT. La inhibición de PIM1 resulta más asequible, en términos de especificidad y eficacia, que la inhibición de la mayoría de los miembros de la vía de STAT5 que sufren mutaciones oncogénicas, así como también, que la inhibición de mTOR o c-MYC (Figura 32).

Figura 32



**Figura 32. Esquema con las principales alteraciones que promueven la fosforilación sostenida de STAT5 en las T-ALL/LBL.** Los mecanismos por los que una activación constitutiva de STAT5 contribuye al desarrollo tumoral los pacientes con T-ALL/LBL aparecen en negro. Las posibles dianas terapéuticas de cara futuros tratamientos personalizados se muestran en recuadros verdes. Las ventajas/ inconvenientes de las potenciales dianas terapéuticas se muestran en recuadros naranjas.

## **6. Conclusiones.**

1. El análisis detallado del exoma de pacientes con T-ALL/T-LBL procedentes de diversos Hospitales españoles nos ha permitido identificar nuevas mutaciones activadoras en los genes *JAK1* y *JAK3*. Los mutantes de *JAK1* D604Y, L653F y F805V tienen un carácter oncogénico puesto que en ausencia de citoquinas y factores de crecimiento son capaces de fosforilar tanto a las proteínas STAT como a SOCS3 en mayor medida que la proteína *JAK1* salvaje, postulándose como dianas terapéuticas sensibles al tratamiento con Ruxolitinib.
2. La Mutación en *JAK3* Q988P se revela como recurrente y altamente oncogénica puesto que la proteína resultante no solamente promueve la activación de la vía JAK/STAT en ausencia de citoquinas y factores de crecimiento, sino que además es capaz de actuar independientemente de las proteínas IL7R y *JAK1*, lo cual disminuye su sensibilidad a Ruxolitinib y postula a Tofacitinib como un tratamiento más eficaz.
3. La detección y caracterización funcional de la nueva fusión SEPTIN6-ABL2 revela el carácter oncogénico de las alteraciones que afectan al gen *ABL2* en las neoplasias linfoblásticas de células T, identifica las vías de señalización que resultan activadas de forma aberrante por dicha fusión y postula a los inhibidores de tirosina-quinasa como adyuvantes a la terapia convencional, bien solos o bien en combinación con otros fármacos, tales como inhibidores para las proteínas PIM1 y mTOR.
4. La desregulación y consiguiente deficiencia de SOCS3, producida por unos niveles de metilación o de fosforilación aberrantes, juega un papel importante en la activación constitutiva de las proteínas STAT en los pacientes con T-ALL/LBL a través de un incremento tanto en la señalización inducida por la interleuquina-7 como en el potencial oncogénico de determinadas mutaciones en la vía JAK/STAT.
5. La activación constitutiva de STAT5 promueve un perfil de expresión génica alterado con niveles de transcritos aberrantes para múltiples genes. Entre ellos, la sobreexpresión de *PIM1* tiene un efecto directo en la señalización relativa a c-MYC y mTOR, resultando fundamental para la proliferación y viabilidad de aquellas células

que presentan mutaciones en la vía JAK/STAT. En este sentido, PIM1 aparece como una potencial diana terapéutica para los pacientes diagnosticados con T-ALL/LBL que presenten una activación constitutiva de la vía de señalización de STAT5. V

## **7. Bibliografía.**

1. Weinberg, R. A. *The Biology of Cancer*. (Garland Science, 2013).
2. Balmain, A., Gray, J. & Ponder, B. The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet* **33 Suppl**, 238–244 (2003).
3. Dawson, M. A. & Kouzarides, T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* **150**, 12–27 (2012).
4. Kulis, M. & Esteller, M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet* **70**, 27–56 (2010).
5. Sharma, S., Kelly, T. K. & Jones, P. A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* **31**, 27–36 (2010).
6. Esteller, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* **8**, 286–298 (2007).
7. Anastasiadou, E., Jacob, L. S. & Slack, F. J. Non-coding RNA networks in cancer. *Nat Rev Cancer* **18**, 5–18 (2018).
8. Lee, Y. S. & Dutta, A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* **4**, 199–227 (2009).
9. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**, 789–799 (2004).
10. Vogelstein, B. *et al.* Cancer genome landscapes. *Science* **339**, 1546–1558 (2013).
11. Weinberg, R. A. The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Ann N Y Acad Sci* **758**, 331–338 (1995).
12. Haber, D. & Harlow, E. Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age. *Nat Genet* **16**, 320–322 (1997).
13. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
14. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
15. Visvader, J. E. Cells of origin in cancer. *Nature* **469**, 314–322 (2011).
16. de Leval, L., Bisig, B., Thielen, C., Boniver, J. & Gaulard, P. Molecular classification of T-cell lymphomas. *Crit Rev Oncol Hematol* **72**, 125–143 (2009).
17. SH, S. *et al.* *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*.
18. Burkhardt, B. Paediatric lymphoblastic T-cell leukaemia and lymphoma: one or two diseases? *Br J Haematol* **149**, 653–668 (2010).
19. Basso, K. *et al.* T-cell lymphoblastic lymphoma shows differences and similarities with T-cell acute lymphoblastic leukemia by genomic and gene expression analyses. *Genes Chromosomes Cancer* **50**, 1063–1075 (2011).
20. Raetz, E. A. *et al.* Gene expression profiling reveals intrinsic differences between T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-cell lymphoblastic lymphoma. *Pediatr Blood Cancer* **47**, 130–140 (2006).
21. Hefazi, M. & Litzow, M. R. Recent Advances in the Biology and Treatment of T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* **13**, 265–274 (2018).
22. Patel, A. A., Thomas, J., Rojek, A. E. & Stock, W. Biology and Treatment Paradigms in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Older Adolescents and Adults. *Curr Treat Options Oncol* **21**, 57 (2020).
23. Litzow, M. R. & Ferrando, A. A. How I treat T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* **126**, 833–841 (2015).
24. Teachey, D. T. & O'Connor, D. How I treat newly diagnosed T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-cell lymphoblastic lymphoma in children. *Blood* **135**, 159–166 (2020).

25. Marks, D. I. *et al.* T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults: clinical features, immunophenotype, cytogenetics, and outcome from the large randomized prospective trial (UKALL XII/ECOG 2993). *Blood* **114**, 5136–5145 (2009).
26. Marks, D. I. & Rowntree, C. Management of adults with T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood* **129**, 1134–1142 (2017).
27. Hunger, S. P. *et al.* Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children’s oncology group. *J Clin Oncol* **30**, 1663–1669 (2012).
28. Winter, S. S. *et al.* Improved Survival for Children and Young Adults With T-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia: Results From the Children’s Oncology Group AALL0434 Methotrexate Randomization. *J Clin Oncol* **36**, 2926–2934 (2018).
29. Berg, S. L. *et al.* Phase II study of nelarabine (compound 506U78) in children and young adults with refractory T-cell malignancies: a report from the Children’s Oncology Group. *J Clin Oncol* **23**, 3376–3382 (2005).
30. DeAngelo, D. J. *et al.* Nelarabine induces complete remissions in adults with relapsed or refractory T-lineage acute lymphoblastic leukemia or lymphoblastic lymphoma: Cancer and Leukemia Group B study 19801. *Blood* **109**, 5136–5142 (2007).
31. Kuhlén, M. *et al.* Neurotoxic side effects in children with refractory or relapsed T-cell malignancies treated with nelarabine based therapy. *Br J Haematol* **179**, 272–283 (2017).
32. Maciejko, L., Smalley, M. & Goldman, A. Cancer Immunotherapy and Personalized Medicine: Emerging Technologies and Biomarker-Based Approaches. *J Mol Biomark Diagn* **8**, 350 (2017).
33. Kiyotani, K., Toyoshima, Y. & Nakamura, Y. Personalized immunotherapy in cancer precision medicine. *Cancer Biol Med* j.issn.2095-3941.2021.0032 (2021) doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2021.0032.
34. Bayón-Calderón, F., Toribio, M. L. & González-García, S. Facts and Challenges in Immunotherapy for T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci* **21**, E7685 (2020).
35. Clappier, E. *et al.* Clonal selection in xenografted human T cell acute lymphoblastic leukemia recapitulates gain of malignancy at relapse. *J Exp Med* **208**, 653–661 (2011).
36. Girardi, T., Vicente, C., Cools, J. & De Keersmaecker, K. The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood* **129**, 1113–1123 (2017).
37. Belver, L. & Ferrando, A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* **16**, 494–507 (2016).
38. Zhang, J. *et al.* The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **481**, 157–163 (2012).
39. Liu, Y. *et al.* The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **49**, 1211–1218 (2017).
40. Ferrando, A. Can one target T-cell ALL? *Best Pract Res Clin Haematol* **31**, 361–366 (2018).
41. Cordo’, V., van der Zwet, J. C. G., Canté-Barrett, K., Pieters, R. & Meijerink, J. P. P. T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Roadmap to Targeted Therapies. *Blood Cancer Discov* **2**, 19–31 (2021).
42. Aifantis, I., Raetz, E. & Buonamici, S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol* **8**, 380–390 (2008).
43. Weng, A. P. *et al.* Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* **306**, 269–271 (2004).

44. Yeh, C.-H., Bellon, M., Pancewicz-Wojtkiewicz, J. & Nicot, C. Oncogenic mutations in the FBXW7 gene of adult T-cell leukemia patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 6731–6736 (2016).
45. Palomero, T. & Ferrando, A. Therapeutic targeting of NOTCH1 signaling in T-ALL. *Clin Lymphoma Myeloma* **9**, S205 (2009).
46. López-Nieva, P. *et al.* More Insights on the Use of  $\gamma$ -Secretase Inhibitors in Cancer Treatment. *The Oncologist* **26**, e298–e305 (2021).
47. Decker / Müller | Jak-Stat Signaling : From Basics to Disease. <https://www.beck-shop.de/decker-mueller-jak-stat-signaling-basics-to-disease/product/8853516>.
48. Shuai, K. & Liu, B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* **3**, 900–911 (2003).
49. Murray, P. J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* **178**, 2623–2629 (2007).
50. Liongue, C. & Ward, A. C. Evolution of the JAK-STAT pathway. *JAKSTAT* **2**, e22756 (2013).
51. Starr, R. & Hilton, D. J. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays* **21**, 47–52 (1999).
52. Alexander, W. S. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**, 410–416 (2002).
53. Starr, R. *et al.* A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* **387**, 917–921 (1997).
54. Flex, E. *et al.* Somatic acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* **205**, 751–758 (2008).
55. Degryse, S. *et al.* JAK3 mutants transform hematopoietic cells through JAK1 activation, causing T-cell acute lymphoblastic leukemia in a mouse model. *Blood* **124**, 3092–3100 (2014).
56. Kontro, M. *et al.* Novel activating STAT5B mutations as putative drivers of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **28**, 1738–1742 (2014).
57. Zenatti, P. P. *et al.* Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **43**, 932–939 (2011).
58. Kleppe, M. *et al.* Deletion of the protein tyrosine phosphatase gene PTPN2 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **42**, 530–535 (2010).
59. Porcu, M. *et al.* Mutation of the receptor tyrosine phosphatase PTPRC (CD45) in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **119**, 4476–4479 (2012).
60. Tremblay, C. S. *et al.* Loss-of-function mutations of Dynamin 2 promote T-ALL by enhancing IL-7 signalling. *Leukemia* **30**, 1993–2001 (2016).
61. Graux, C. *et al.* Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **36**, 1084–1089 (2004).
62. De Keersmaecker, K. *et al.* Fusion of EML1 to ABL1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia with cryptic t(9;14)(q34;q32). *Blood* **105**, 4849–4852 (2005).
63. Van Limbergen, H. *et al.* Molecular cytogenetic and clinical findings in ETV6/ABL1-positive leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* **30**, 274–282 (2001).
64. Tycko, B., Smith, S. D. & Sklar, J. Chromosomal translocations joining LCK and TCRB loci in human T cell leukemia. *J Exp Med* **174**, 867–873 (1991).
65. Paietta, E. *et al.* Activating FLT3 mutations in CD117/KIT(+) T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Blood* **104**, 558–560 (2004).



66. Furqan, M. *et al.* STAT inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol* **6**, 90 (2013).
67. Seif, F. *et al.* The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Commun Signal* **15**, 23 (2017).
68. Kleppe, M. *et al.* PTPN2 negatively regulates oncogenic JAK1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **117**, 7090–7098 (2011).
69. Degryse, S. *et al.* Mutant JAK3 signaling is increased by loss of wild-type JAK3 or by acquisition of secondary JAK3 mutations in T-ALL. *Blood* **131**, 421–425 (2018).
70. Springuel, L. *et al.* Cooperating JAK1 and JAK3 mutants increase resistance to JAK inhibitors. *Blood* **124**, 3924–3931 (2014).
71. Vanden Bempt, M. *et al.* Cooperative Enhancer Activation by TLX1 and STAT5 Drives Development of NUP214-ABL1/TLX1-Positive T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* **34**, 271–285.e7 (2018).
72. Maude, S. L. *et al.* Efficacy of JAK/STAT pathway inhibition in murine xenograft models of early T-cell precursor (ETP) acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **125**, 1759–1767 (2015).
73. Mootha, V. K. *et al.* PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* **34**, 267–273 (2003).
74. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545–15550 (2005).
75. Cerami, E. *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* **2**, 401–404 (2012).
76. Gao, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* **6**, pl1 (2013).
77. Staerk, J., Kallin, A., Demoulin, J.-B., Vainchenker, W. & Constantinescu, S. N. JAK1 and Tyk2 activation by the homologous polycythemia vera JAK2 V617F mutation: cross-talk with IGF1 receptor. *J Biol Chem* **280**, 41893–41899 (2005).
78. Losdyck, E. *et al.* Distinct Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL)-associated Janus Kinase 3 (JAK3) Mutants Exhibit Different Cytokine-Receptor Requirements and JAK Inhibitor Specificities. *J Biol Chem* **290**, 29022–29034 (2015).
79. Pham, H. T. T. *et al.* STAT5BN642H is a driver mutation for T cell neoplasia. *J Clin Invest* **128**, 387–401 (2018).
80. Sheltzer, J. M. *et al.* Single-chromosome Gains Commonly Function as Tumor Suppressors. *Cancer Cell* **31**, 240–255 (2017).
81. Van Vlierberghe, P. *et al.* Prognostic relevance of integrated genetic profiling in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **122**, 74–82 (2013).
82. Hantschel, O. & Superti-Furga, G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 33–44 (2004).
83. Sherbenou, D. W. *et al.* BCR-ABL SH3-SH2 domain mutations in chronic myeloid leukemia patients on imatinib. *Blood* **116**, 3278–3285 (2010).
84. Chiles, T. C. Regulation and function of cyclin D2 in B lymphocyte subsets. *J Immunol* **173**, 2901–2907 (2004).
85. Mostowy, S. & Cossart, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 183–194 (2012).
86. Ren, R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* **5**, 172–183 (2005).

87. Puil, L. *et al.* Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J* **13**, 764–773 (1994).
88. Skorski, T. *et al.* Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J* **16**, 6151–6161 (1997).
89. Xie, S. *et al.* Involvement of Jak2 tyrosine phosphorylation in Bcr-Abl transformation. *Oncogene* **20**, 6188–6195 (2001).
90. Ilaria, R. L. & Van Etten, R. A. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* **271**, 31704–31710 (1996).
91. Shuai, K., Halpern, J., ten Hoeve, J., Rao, X. & Sawyers, C. L. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* **13**, 247–254 (1996).
92. Hu, Y. *et al.* Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia. *Nat Genet* **36**, 453–461 (2004).
93. Amson, R. *et al.* The human protooncogene product p33pim is expressed during fetal hematopoiesis and in diverse leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8857–8861 (1989).
94. La Starza, R. *et al.* High PIM1 expression is a biomarker of T-cell acute lymphoblastic leukemia with JAK/STAT activation or t(6;7)(p21;q34)/TRB@-PIM1 rearrangement. *Leukemia* **32**, 1807–1810 (2018).
95. Palmer, D. C. & Restifo, N. P. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends Immunol* **30**, 592–602 (2009).
96. Inagaki-Ohara, K., Kondo, T., Ito, M. & Yoshimura, A. SOCS, inflammation, and cancer. *JAKSTAT* **2**, e24053 (2013).
97. Weber, A. *et al.* SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition. *Oncogene* **24**, 6699–6708 (2005).
98. Teofili, L. *et al.* Epigenetic alteration of SOCS family members is a possible pathogenetic mechanism in JAK2 wild type myeloproliferative diseases. *Int J Cancer* **123**, 1586–1592 (2008).
99. He, B. *et al.* SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14133–14138 (2003).
100. Yoshimura, A., Naka, T. & Kubo, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* **7**, 454–465 (2007).
101. Silva, A. *et al.* IL-7 contributes to the progression of human T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Cancer Res* **71**, 4780–4789 (2011).
102. González-García, S. *et al.* IL-7R is essential for leukemia-initiating cell activity of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **134**, 2171–2182 (2019).
103. Haan, S. *et al.* Tyrosine phosphorylation disrupts elongin interaction and accelerates SOCS3 degradation. *J Biol Chem* **278**, 31972–31979 (2003).
104. Cacalano, N. A., Sanden, D. & Johnston, J. A. Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras. *Nat Cell Biol* **3**, 460–465 (2001).
105. Nawijn, M. C., Alendar, A. & Berns, A. For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **11**, 23–34 (2011).

106. Mikkers, H. *et al.* Mice deficient for all PIM kinases display reduced body size and impaired responses to hematopoietic growth factors. *Mol Cell Biol* **24**, 6104–6115 (2004).
107. Martín-Sánchez, E. *et al.* PIM kinases as potential therapeutic targets in a subset of peripheral T cell lymphoma cases. *PLoS One* **9**, e112148 (2014).
108. De Smedt, R. *et al.* Pre-clinical evaluation of second generation PIM inhibitors for the treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemia and lymphoma. *Haematologica* **104**, e17–e20 (2019).
109. Padi, S. K. R. *et al.* Targeting the PIM protein kinases for the treatment of a T-cell acute lymphoblastic leukemia subset. *Oncotarget* **8**, 30199–30216 (2017).
110. Burger, M. T. *et al.* Identification of N-(4-((1R,3S,5S)-3-Amino-5-methylcyclohexyl)pyridin-3-yl)-6-(2,6-difluorophenyl)-5-fluoropicolinamide (PIM447), a Potent and Selective Proviral Insertion Site of Moloney Murine Leukemia (PIM) 1, 2, and 3 Kinase Inhibitor in Clinical Trials for Hematological Malignancies. *J Med Chem* **58**, 8373–8386 (2015).
111. Braun, T. P., Eide, C. A. & Druker, B. J. Response and Resistance to BCR-ABL1-Targeted Therapies. *Cancer Cell* **37**, 530–542 (2020).
112. Möröy, T. *et al.* E mu N- and E mu L-myc cooperate with E mu pim-1 to generate lymphoid tumors at high frequency in double-transgenic mice. *Oncogene* **6**, 1941–1948 (1991).
113. Zhang, Y., Wang, Z., Li, X. & Magnuson, N. S. Pim kinase-dependent inhibition of c-Myc degradation. *Oncogene* **27**, 4809–4819 (2008).
114. Yeh, E. *et al.* A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol* **6**, 308–318 (2004).
115. Madden, S. K., de Araujo, A. D., Gerhardt, M., Fairlie, D. P. & Mason, J. M. Taking the Myc out of cancer: toward therapeutic strategies to directly inhibit c-Myc. *Mol Cancer* **20**, 3 (2021).
116. Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M. & Jemal, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **25**, 16–27 (2016).
117. Norvilas, R. *et al.* Population-based targeted RNA sequencing reveals novel disease-related gene fusions in pediatric and adult T-ALL. *Leuk Res* **116**, 106825 (2022).
118. Roberts, K. G. *et al.* Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* **371**, 1005–1015 (2014).
119. Looney, A.-M., Nawaz, K. & Webster, R. M. Tumour-agnostic therapies. *Nature Reviews Drug Discovery* **19**, 383–384 (2020).
120. For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21150935/>.
121. Winston, L. A. & Hunter, T. Intracellular signalling: putting JAKs on the kinase MAP. *Curr Biol* **6**, 668–671 (1996).
122. Rane, S. G. & Reddy, E. P. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* **19**, 5662–5679 (2000).
123. Zouein, F. A., Duhé, R. J. & Booz, G. W. JAKs go nuclear: emerging role of nuclear JAK1 and JAK2 in gene expression and cell growth. *Growth Factors* **29**, 245–252 (2011).
124. Zhu, F., Hwang, B., Miyamoto, S. & Rui, L. Nuclear Import of JAK1 Is Mediated by a Classical NLS and Is Required for Survival of Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Mol Cancer Res* **15**, 348–357 (2017).

125. Yang, J. *et al.* eIF4B phosphorylation by pim kinases plays a critical role in cellular transformation by Abl oncogenes. *Cancer Res* **73**, 4898–4908 (2013).
126. Zhang, F. *et al.* PIM1 protein kinase regulates PRAS40 phosphorylation and mTOR activity in FDCP1 cells. *Cancer Biol Ther* **8**, 846–853 (2009).
127. Lu, J. *et al.* Pim2 is required for maintaining multiple myeloma cell growth through modulating TSC2 phosphorylation. *Blood* **122**, 1610–1620 (2013).
128. Herranz, D. *et al.* A NOTCH1-driven MYC enhancer promotes T cell development, transformation and acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* **20**, 1130–1137 (2014).

## **8. Anexo 1.**

**Artículo enviado para su publicación a la revista Nature Genetics (#NG-LE60250):**

### **Comprehensive characterization of the novel SEPTIN6-ABL2 oncogenic fusion as a potential therapeutic target in T-ALL.**

Lahera A<sup>1,2,3\*</sup>, Vela-Martín L<sup>1,2,3\*</sup>, López-Nieva P<sup>1,2,3,4</sup>, Salgado RN<sup>5</sup>, Rodríguez-Perales S<sup>6</sup>, Torres-Ruiz R<sup>6,7,8</sup>, López-Lorenzo JL<sup>9</sup>, Cornago J<sup>9</sup>, Llamas P<sup>9</sup>, Fernández-Navarro P<sup>10,11</sup>, Sánchez-Domínguez R<sup>7,8,12</sup>, Segovia JC<sup>7,12</sup>, Sastre I<sup>2</sup>, Cobos-Fernández MA<sup>1,2,3,4</sup>, Santos J<sup>1,2,3,4</sup>, Fernández-Piqueras J<sup>1,2,3,4†</sup> and Villa-Morales M<sup>1,2,3,4†</sup>.

<sup>1</sup> Department of Biology, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain (28049).

<sup>2</sup> Department of Genome dynamics and function, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM), Madrid, Spain (28049).

<sup>3</sup> Area of Genetics and Genomics, IIS Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain (28040).

<sup>4</sup> Institute for Molecular Biology-IUBM (Universidad Autónoma de Madrid) Madrid, Spain (28049).

<sup>5</sup> Cytogenetics Service, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain.

<sup>6</sup> Molecular Cytogenetics & Genome Editing Unit, Human Cancer Genetics Program, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, Spain (28029).

<sup>7</sup> Division of Hematopoietic Innovative Therapies, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Madrid, Spain (28029).

<sup>8</sup> Advanced Therapy Unit, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD/UAM), Madrid, Spain (28040).

<sup>9</sup> Division of Hematology and Hemotherapy, IIS Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain (28040).

<sup>10</sup> Unit of Cancer and Environmental Epidemiology, Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (28029).

<sup>11</sup> Consorcio de Investigación Biomédica de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain (28029).

<sup>12</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain (28029).

\* These authors contributed equally to this work.

† Corresponding authors.

The development of successful therapies for T-ALL patients who relapse is still an unmet need. In this work, molecular profiling allowed the identification of a novel SEPTIN6-ABL2 fusion at diagnosis and relapse in a T-ALL patient who did not respond to conventional treatment. Although alterations involving ABL2 are recurrent events in hematological malignancies, the molecular mechanisms whereby such alterations promote tumor development remain largely unexplored, hindering the development of tailored-therapies. We generated complementary cellular models, including a patient-derived cell line, to comprehensively characterize SEPTIN6-ABL2. Our results unveil the specific molecular pathways aberrantly activated by this fusion and demonstrate an unprecedented role for ABL2 as an oncogene in T-ALL. Furthermore, we identified several pharmacological compounds that inhibit the oncogenic signaling induced by SEPTIN6-ABL2, some of them also efficient against the recurrent NUP214-ABL1 fusion. Therefore, patients harboring these highly oncogenic fusions could greatly benefit from tailored-therapies.