



MEMORIA

25.º RETORNO SOCIAL DE LA INVESTIGACIÓN
CÁNCER

BÚSQUEDA DE ARN NO CODIFICANTES, COMO NUEVOS BIOMARCADORES Y DIANAS, PARA LA MEJORA DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON IBRUTINIB EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA

Dr. Luis Hernández Pous

IDIBAPS Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer

Dr. Valter Gattei

IRCCS Centro di Riferimento Oncologico di Aviano, Itàlia

1. Resumen

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es una neoplasia linfoide muy común, y los pacientes muestran diversas características biológicas, comportamientos clínicos y respuestas al tratamiento. Queremos identificar qué genes son particularmente relevantes para la predicción de la respuesta a nuevos fármacos desarrollados contra la LLC, como Ibrutinib. En particular, queremos estudiar una familia de genes denominados *ARN no codificantes* que son muy importantes en la regulación de funciones celulares al contribuir a la expresión de otros genes que se traducen en proteínas, algunas de las cuales están relacionadas con la agresividad de la LLC y la respuesta al tratamiento. Además, previamente hemos descrito algunos ARN no codificantes relacionados con estímulos del microambiente tumoral en las células de LLC, lo que potencia su proliferación y ayuda a prevenir la muerte celular. Por lo tanto, la identificación de más ARN no codificantes de este tipo representaría nuevos avances para la predicción de la respuesta a Ibrutinib entre pacientes con LLC y de nuevas dianas para tratamientos complementarios basados en la regulación negativa de su expresión para superar la resistencia a este tratamiento observada en algunos pacientes con LLC.

El abordaje de este objetivo se realizó en un trabajo colaborativo en el que participaron dos equipos —Barcelona (IDIBAPS) y Aviano (CRO)—, que trabajaron en paralelo en la detección de dichos ARN, pero que se centraban en diferentes familias: ARNlnc y micro-ARN, respectivamente. En una primera fase de selección, se estudió la expresión de todas las familias de ARN en diferentes cohortes de muestras de LLC (con o sin características moleculares, como alteraciones del gen TP53 o trisomía 12), en un modelo *ex vivo* que emulaba algunos efectos del microambiente relevantes para el tratamiento con Ibrutinib (CpG -ODN, CD40L, IL10, estimulación BCR). Los ARNlnc que se encontraron sobreexpresados en comparación con los controles en respuesta a tales estímulos se analizaron posteriormente para determinar su impacto clínico, utilizando la expresión y los datos clínicos de una serie independiente de 266 pacientes con LLC. Además, también se utilizaron análisis de enriquecimiento de vías para reducir el número de ARNlnc clínicamente relevantes involucrados en las vías moleculares estimuladas por los factores del microambiente. Uno de esos ARNlnc (MALAT1) fue particularmente notable en cuanto a su impacto clínico, siendo este independiente de todos los demás factores pronósticos conocidos en la LLC. También pudimos mostrar

su potencial como un interesante biomarcador clínico no invasivo de los estímulos del microambiente que ocurren en los ganglios linfáticos de los pacientes.

Además de eso, seleccionamos otros 3 ARNInc candidatos de particular interés, tanto desde el punto de vista biológico como clínico. Distintos análisis adicionales nos permitieron refinar en la variante transcripcional los amplicones que se utilizaron para determinar su expresión en los experimentos funcionales. Analizamos la relevancia funcional de dichos candidatos en experimentos de silenciamiento en la línea celular de LLC llamada *MEC1* y pudimos demostrar su participación efectiva en la regulación de la expresión de genes involucrados en vías similares a las observadas previamente en asociación en el modelo experimental de muestras primarias de LLC tratadas *ex vivo*. Cabe destacar que entre los genes modulados por estos ARNInc encontramos un precursor del micro-ARN miR-155. Curiosamente, el equipo de CRO también estudió el micro-ARN modulado por los mismos factores del microambiente y encontró miR-155 entre los micro-ARN regulados positivamente. En conjunto, nuestros resultados sugieren que parte del efecto oncogénico del ARNInc identificado está mediado por el control indirecto de los niveles de este micro-ARN.

En conclusión, obtuvimos evidencia de los posibles efectos sinérgicos del uso de Ibrutinib con terapias sinérgicas centradas en silenciar el ARNInc aquí caracterizado, así como el bloqueo de miR-155.

2. Resultados

Selección de muestras

Se seleccionaron un total de 16 muestras de LLC en función de lo siguiente:

- a) Estado mutacional del gen IGHV (selección de muestras no mutadas).
- b) Perfil genético de grupos con alteraciones en 11q13, trisomía 12 o TP53mut/del17p, y también otro grupo sin ninguna de las alteraciones anteriores (*wild-type*, WT).
- c) Ausencia de tratamiento previo (particularmente con respecto a Ibrutinib).

Además, se utilizó el criterio de la capacidad de las células B de ser activadas por bolas anti-IgM que estimulan la señalización de BCR, lo que resulta en un aumento de los

niveles de p-BTK y p-ERK y da lugar a la selección para experimentos posteriores de 6 casos de LLC WT y 6 casos de LLC con mutación/eliminación de TP53. En las otras cohortes encontramos casos sin activación clara, por lo que al final pudimos incluir solo 3 casos con trisomía 12 (estudiados solo para ARNinc).

Caracterización inmunofenotípica de la estimulación de células de LLC

Se utilizó un panel de citometría celular de 6 colores (evaluación de CD19, CD5, CD69, MCL1, PARP escindido, tinción de célula viva/muerta) para evaluar los cambios de fenotipo obtenidos utilizando los cuatro tratamientos propuestos:

- (A) Células tratadas únicamente con bolas policlonales recubiertas de Ig.
- (B) Células tratadas con bolas recubiertas de IgM + Ibrutinib.
- (C) Tratamiento como en A más una mezcla de agonistas (CpGODN, Mega CD40L e IL-10).
- (D) Tratamiento como en B más la mezcla de agonistas.

De acuerdo con el efecto proliferativo de la mezcla de agonistas, los casos de WT mostraron un aumento en la expresión de CD69 y MCL1 (condición A frente a C, y B frente a D). Por el contrario, los casos con alteración de TP53 no mostraron diferencias entre las dos condiciones, posiblemente debido a una expresión relativamente alta tanto de CD69 como de MCL1 en el contexto de la alteración de TP53 con respecto a los casos WT. Ibrutinib fue capaz de bloquear la activación de CD69 y MCL1 inducida por estimulación anti-IgM, mientras que la adición de estímulos microambientales pareció contrarrestar, al menos en parte, la inhibición de CD69/MCL1. Las muestras alteradas con TP53 mostraron una ligera disminución de CD69 y MCL1 después del tratamiento con Ibrutinib, principalmente relacionada con el bajo efecto de la estimulación anti-IgM en este conjunto particular de casos.

Perfiles de expresión de ARN no codificantes y estudios funcionales

Para los **micro-ARN**, buscamos aquellos expresados diferencialmente entre condiciones experimentales con *microarrays* dedicados (Agilent). Entre los casos con alteración de WT y TP53, identificamos 32 micro-ARN que separaban claramente los casos de WT de los casos con alteración de TP53. Como se ha descrito para otros tumores, miR-34 moduló su expresión significativamente en los casos de WT. Estos datos podrían explicar la baja supervivencia de los casos alterados por TP53, ya que

miR-34 es un regulador negativo de c-Myc y BCL2, y está involucrado en un circuito de retroalimentación positiva en el que TP53 extiende su efecto inhibitor sobre el tumor. Al comparar la condición A con la C, identificamos una sobreexpresión del micro-ARN perteneciente a la familia del grupo mir-17~92, después de la estimulación con estímulos microambientales, de acuerdo con nuestros estudios anteriores. Esta regulación positiva es clara en los casos de WT, mientras que en el contexto de los casos alterados por TP53, los miembros de la familia mir-17~92 no mostraron diferencias en el término de expresión, lo que apunta a una posible interferencia de la proteína mutada TP53 en la expresión de estos micro-ARN. Además, miR-155, uno de los oncomiR mejor caracterizados en neoplasias hematológicas, resultó sobreexpresado después de la estimulación.

Por el contrario, con respecto a los micro-ARN miR-17~92, la regulación positiva de miR-155 resultó independiente del estado de TP53; de hecho, se vio una sobreexpresión significativa de miR-155 tanto en WT como en casos de interrupción de TP53 tras la estimulación. Curiosamente, incluso en el contexto de muestras estimuladas con anti-IgM y tratadas con Ibrutinib, observamos un perfil de micro-ARN similar. Las muestras de WT aumentaron los micro-ARN pertenecientes a la familia miR-17~92, lo que indica que, como se esperaba, Ibrutinib no pudo bloquear estos micro-ARN. Estos resultados están en consonancia con la capacidad de Ibrutinib de bloquear la señalización de BCR en lugar de otros estímulos que no dependen de BTK y con la noción de que Ibrutinib generalmente no induce apoptosis. Cabe señalar que miR-132, un micro-ARN regulado positivamente que es bien conocido después de la estimulación anti-IgM, resultó regulado negativamente solo en la condición D (combinación de Ibrutinib y otros estímulos microambientales), lo que probablemente respalda una regulación independiente de BTK. Como se vio anteriormente para la estimulación microambiental canónica, incluso en este contexto, miR-155 resultó ser el único micro-ARN expresado diferencialmente que había en común en muestras WT y mutadas.

También realizamos análisis de perfiles de expresión de ARNm mediante matrices para investigar la modulación de ARNm asociada que se llevó a cabo mediante el uso de la técnica ARN-Seq. Así, al analizar el perfil de expresión génica diferencial de la condición A frente a la C, identificamos 1.614 genes expresados diferencialmente (1.306 regulados positivamente y 308 regulados negativamente en la condición). De

acuerdo con la regulación positiva de los miembros de la familia miR-17~92 y miR-155, el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) identificó una regulación negativa significativa de las dianas de estos micro-ARN en la condición C, lo que subraya nuevamente la importancia funcional de estos micro-ARN. Se obtuvieron los mismos resultados comparando el GEP diferencial de las condiciones B y D. Nuevamente, el GSEA reveló una regulación positiva de los miembros de la familia mir-17~92 y miR-155 en la condición D. Según nuestros datos anteriores y los resultados de estos experimentos, se pone de manifiesto la importancia de miR-17 en el contexto de estímulos microambientales.

También tuvimos la oportunidad de investigar la capacidad de la expresión de miR-17 para predecir el pronóstico tanto en LLC como en otros trastornos linfoproliferativos primarios, como el linfoma de células del manto (LCM) y el linfoma de células B grandes (LCBG). Específicamente, se analizaron 399 muestras de LLC, 77 muestras de LCM y 78 muestras de LCBG para determinar los niveles de expresión de miR-17. En LLC y LCM, fue posible demostrar que los niveles altos de miR-17 pudieron distinguir a los pacientes con una supervivencia general más baja en comparación con los pacientes que tenían niveles bajos de miR-17. Según estos resultados, seleccionamos miR-17 y miR-155 como candidatos para el silenciamiento en muestras primarias. Experimentos preliminares demostraron la capacidad del tratamiento con antagomiR-17 para reducir la viabilidad y aumentar la apoptosis de líneas celulares tumorales (LCM en este caso, donde se instaló originalmente la técnica). Los datos mostraron que, tras la transfección con nanoburbujas que contienen un antagonista de miR-17 (antagomiR-17), se produce un aumento de la apoptosis. La transfección no solo provocó un aumento de la apoptosis sino también una reducción de la proliferación celular. En conclusión, aquí proporcionamos datos preliminares que indican que miR-17 está involucrado en la proliferación de células de LLC mediante interacciones microambientales y que antagonizar miR-17 puede tener un papel relevante en la supervivencia y proliferación de las células de LLC. Se están llevando a cabo experimentos similares para investigar el papel de miR-155 en el mismo contexto.

Con respecto a los **ARNinc**, realizamos el análisis de los perfiles de expresión en las muestras mencionadas anteriormente utilizando la plataforma de *microarrays* Clariom D WT Pico (Thermofisher). El análisis preliminar (PCA) demostró que el grupo WT de LLC de Barcelona y Aviano, así como el grupo TP53mut/del17p, tenían una muestra

cada uno con valores atípicos según el perfil de expresión global. Por lo tanto, excluimos estas muestras para el análisis de la expresión diferencial. A partir de los genes codificantes incluidos en la matriz, pudimos confirmar la expresión diferencial de genes o vías que concuerdan con el impacto esperado del tratamiento con mezcla de agonistas. Así, EZH2 está dramáticamente regulado positivamente por este tratamiento, y es un factor ya descrito como regulador epigenético clave de esta estimulación del microambiente de las células de LLC en los ganglios linfáticos (PMID: 31227476). También obtuvimos una lista de candidatos a ARNlnc que fueron modulados por dicho tratamiento en los diferentes grupos de muestra estudiados. Cabe señalar entre ellos la regulación positiva del ARNlnc de MALAT1 mediante una mezcla de agonistas solo en algunas de las cohortes estudiadas. El análisis *in silico* de los datos de expresión en casos de LLC previamente estudiados nos permitió identificar MALAT1 como un ARNlnc con un fuerte impacto clínico en la LLC y potencialmente asociado a vías inducidas por el microambiente de los ganglios linfáticos, por lo que es un marcador subrogado del grado de estimulación del microambiente en los ganglios linfáticos. Por lo tanto, estos resultados señalan MALAT1 como un potencial ARNlnc de interés en relación con nuestro proyecto.

Para reducir el número de candidatos a ARNlnc, también realizamos análisis de todo el transcriptoma del impacto clínico de la expresión de ARNlnc en el tiempo hasta el tratamiento (TTT) de una gran serie de LLC con datos de expresión disponibles del proyecto ICGC ($n = 266$). Así, identificamos 1.904 ARNlnc y, de estos, hubo 1.171 cuya expresión más alta se asoció con un TTT más corto; estos últimos fueron los más interesantes para nuestro enfoque de validación para nuestro tercer objetivo.

Analizamos cuáles de los ARNlnc candidatos regulados positivamente por el tratamiento con mezcla de agonistas se incluyeron en el subconjunto de ARNlnc identificados con un comportamiento clínico más agresivo, y hubo 83 comunes en ambos análisis. También aplicamos diferentes criterios complementarios para reducir aún más el número de candidatos de interés de ARNlnc. Teníamos datos previos del proyecto ICGC sobre varias líneas celulares de LLC y se incluyó la línea celular MEC1 disponible para que pudiéramos verificar la expresión de los candidatos más interesantes e identificar cuáles eran mejores para análisis funcionales adicionales, porque sus niveles de expresión basal más altos permitirían monitorear su expresión al silenciarlos en líneas celulares como MEC1. Seleccionamos 3 de los ARNlnc candidatos

más altamente expresados en la línea celular MEC1 mediante qRT-PCR. Una evaluación patogénica adicional utilizando un análisis de enriquecimiento de vías en la lista clasificada de genes codificantes correlacionados con candidatos de ARNlnc seleccionados demostró su participación potencial como reguladores reales de vías patogénicas relevantes moduladas por estímulos del microambiente. En este sentido presentamos un póster en el 28.º Congreso de la Asociación Europea de Hematología (EHA), celebrado del 8 al 15 de junio de 2023 en Fráncfort, Alemania. Los resultados presentados corresponden a uno de estos candidatos seleccionados (LINC00152-CYTOR) porque los datos publicados anteriormente apuntaban a la falta de valor clínico de este ARNlnc en la LLC. Por el contrario, nuestros resultados muestran claramente que es un ARNlnc relevante en esta neoplasia y su expresión está relacionada con estímulos del microambiente. La validación funcional de los 3 candidatos fue exitosa, ya que logramos un grado significativo de silenciamiento de los 3 candidatos en la línea celular MEC1, de acuerdo con los niveles de expresión medidos por *microarrays*, así como por qRT-PCR.

Realizamos un análisis para identificar aquellos genes significativamente modulados por el silenciamiento para cada ARNlnc analizado en la línea celular MEC1 LLC. También realizamos un análisis de enriquecimiento de vías en las listas de genes modulados. Notablemente, estos resultados mostraron algunos genes relevantes (incluido MCL1) modulados por los estímulos del microambiente. Además, entre los genes expresados diferencialmente también pudimos ver la implicación de los 3 candidatos en la expresión del precursor de miR-155 (MIR155HG). Esto concuerda con la regulación positiva encontrada por el equipo de CRO, que involucra la forma madura de este micro-ARN y sugiere que parte de la función oncogénica de esos ARNlnc en la LLC estaría mediada por su influencia en la expresión de miR-155, por lo que vincula también este fenómeno con la estimulación de las células de LLC por el microambiente.

Finalmente, entre las vías enriquecidas encontradas se incluyeron varias previamente conocidas por estar desreguladas patogénicamente en la LLC, lo que involucra elementos en la respuesta y la transducción de señales de estímulos del microambiente (receptores tipo Toll, citoquinas, interleuquinas, entre otros). Aún se están realizando experimentos complementarios para demostrar los beneficios potenciales de combinar el silenciamiento *in vitro* de estos ARNlnc con el tratamiento con Ibrutinib.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Como la expresión de ARNInc puede reducirse *in vitro*, como se muestra en este proyecto —aunque también se sabe que podría hacerse *in vivo* utilizando los mismos oligonucleótidos LNA (gapmers)—, la identificación de ARNInc implicados en el control de vías patogénicas impulsada por el microambiente nos ha permitido identificar nuevas dianas para el uso potencial de gapmers como herramienta en tratamientos conjuntos con Ibrutinib para mejorar la baja sensibilidad que algunos pacientes con LLC muestran a dicho tratamiento. Como también determinamos que nuestros 3 ARNInc relacionados con el microambiente son reguladores de un precursor de miR-155, nuestros resultados sugieren que parte de su efecto oncogénico está mediado a través del control indirecto de los niveles de este micro-ARN.

De manera relevante, la aplicación clínica de todos estos hallazgos es notoria, ya que existe un fármaco ya desarrollado (MRG-106; Cobomarsen) que es un inhibidor de miR-155 sintetizado como un ácido nucleico (oligonucleótido LNA). Un ensayo clínico de fase 1 con este agente en varios tipos de linfoma (aunque distintos de la LLC) fue muy exitoso y puede ser prometedor para aplicaciones clínicas en el futuro, incluida la mejora de la respuesta de Ibrutinib en la LLC.

4. Bibliografía científica generada

1. Artículo científico:

Fernández-Garnacho EM, Nadeu F, Martín S, Mozas P, Rivero A, Gine E, López-Guillermo A, Duran-Ferrer M, Salaverria I, López C, Beà S, Demajo S, Jares P, Martín-Subero JI, Puente X, Campo E, Hernández L.

MALAT1 Expression is Associated with Aggressive Behavior in Indolent B-Cell Neoplasms: an investigation based on multiple transcriptomic approaches.

Sci Rep 2023 Oct 6;13(1):16839. doi: 10.1038/s41598-023-44174-8. PMID: 37803049.

2. Artículo científico:

Barés G, Beà A, Hernández L, Navaridas R, Felip I, Megino C, Blasco N, Nadeu F, Campo E, Llovera M, Dolcet X, Sanchis D.

ENDOG Impacts on Tumor Cell Proliferation and Tumor Prognosis in the Context of PI3K/PTEN Pathway Status.

Cancers (Basel). 2021 Jul 28;13(15):3803. doi: 10.3390/cancers13153803. PMID: 34359707.

3. Póster en un congreso:

Hernández L, Nadeu F, Delgado J, *et al.*, Gattei V.

The Expression of CYTOR LncRNA has poor prognostic value in CLL patients and is associated with microenvironmental stimuli.

EHA2023 Hybrid Congress, 28th Congress of the EHA European Hematology Association (EHA), 8-15 de junio de 2023, Fráncfort, Alemania. PMC10429169.