



# MEMORIA

25.º RETORNO SOCIAL DE LA INVESTIGACIÓN  
CÁNCER

## ESTUDIO DEL ROL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN COMO MODULADORES DE LA CROMATINA Y CONDUCTORES DE LAS NEOPLASIAS LINFOIDES

**Dr. José I. Martín Subero**

IDIBAPS Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer

**Dr. Xabier Aguirre Ena**

Centro de Investigación Médica Aplicada - FIMA Fundación para la Investigación Médica  
Navarra

## 1. Resumen

Las alteraciones en la cantidad y distribución de marcas epigenéticas del genoma son una característica distintiva del cáncer. Aunque las consecuencias de la desregulación epigenética en el cáncer están relativamente bien descritas, las causas que conducen a los cambios epigenómicos están poco estudiadas. En trabajos anteriores, nuestros grupos de investigación identificaron que las modificaciones epigenéticas en la cromatina de tumores linfoides parecen estar mediadas por la unión aberrante al ADN de familias de factores de transcripción (FT) concretas. Así, la principal hipótesis en la que se basa este proyecto era que dichos FT pueden representar una lesión molecular inicial —complementaria a la genética—, que induce una activación *de novo* de regiones *enhancer* y promotoras, que a su vez conducirían a la generación de un programa transcripcional oncogénico.

En este proyecto, hemos estudiado el papel de los FT en la leucemia linfocítica crónica (LLC) y el mieloma múltiple (MM). Estas dos neoplasias se encuentran entre las neoplasias malignas linfoides más frecuentes y ambas exhiben una heterogeneidad genética y variabilidad clínica sustanciales. Sin embargo, a pesar de esta heterogeneidad, ambas muestran firmas de cromatina homogéneas específicas de cada enfermedad, que están enriquecidas en sitios de unión de unos pocos FT. Por lo tanto, para profundizar en los mecanismos de patogénesis de la LLC y el MM, propusimos tres objetivos principales: el primero, identificar los FT clave responsables de las firmas epigenómicas únicas de la LLC o el MM mediante una selección personalizada a través de la técnica de CRISPR/Cas9. En segundo lugar, definir funcionalmente el papel causal de los FT identificados como impulsores epigenéticos de la LLC o el MM, a través de la caracterización de sus sitios de unión y su papel principal en la transcripción y modificación epigenética. Y tercero, caracterizar los cofactores de los FT y estudiar su potencial como nuevas dianas terapéuticas en la LLC y el MM, identificando las proteínas de interacción de los FT y evaluando el impacto de su inhibición. Para alcanzar estos objetivos, utilizamos metodologías y diseños experimentales similares tanto para la LLC como para el MM, aunque adaptamos algunos de ellos a los recursos y modelos experimentales disponibles. Durante el transcurso del proyecto, ambos equipos han trabajado muy estrechamente, compartiendo herramientas, conocimientos y recursos, y además han revisado e interpretado sus respectivos resultados en videoconferencias periódicas y reuniones presenciales.

En las próximas páginas, resumiremos los resultados obtenidos en la LLC y el MM por separado, para luego discutir las implicaciones generales de nuestro trabajo y enumerar la literatura generada.

## 2. Resultados

Durante el período de financiación del proyecto, hemos podido cumplir todos los objetivos propuestos, tanto en la LLC como en el MM. A continuación, se incluye un breve resumen de los principales resultados obtenidos para cada una de las enfermedades.

### **Leucemia linfática crónica**

En este proyecto, hemos realizado un análisis exhaustivo del papel de los FT en la LLC. Como los modelos de líneas celulares de LLC disponibles no recapitulan bien algunas de las características moleculares clave de la enfermedad, inicialmente caracterizamos un sistema *in vitro* para cultivar células primarias de LLC y desarrollamos una nueva estrategia para realizar una investigación funcional, utilizando células de pacientes con LLC. A continuación, basándonos en publicaciones anteriores y datos de nuestro propio grupo de investigación, seleccionamos FT que están asociados con el desarrollo y la agresividad clínica de la enfermedad para realizar estudios mecanísticos. Además de los hallazgos que se han resumido en los informes anuales, en este proyecto evaluamos con gran detalle el papel del factor de transcripción LEF1 en la LLC. Debido a la relevancia de estos resultados, se resumirán con mayor detalle en esta síntesis del proyecto.

LEF1 es un factor de transcripción clave implicado en la proliferación y diferenciación de una gran cantidad de tipos de células normales, pero está ausente en las células B maduras. En la LLC, la expresión de LEF1 parece ser un evento oncogénico temprano, ya que ya está presente en la linfocitosis monoclonal de células B (MBL). Además, se sabe que varias de las isoformas de LEF1 tienen diferentes funciones en las células normales y cancerosas. A pesar de que la expresión de LEF1 es un sello distintivo de la LLC y un marcador de diagnóstico diferencial, su contribución a la patogénesis de la LLC sigue sin haberse estudiado en detalle. Por lo tanto, identificar el papel oncogénico exacto de LEF1 en la LLC fue uno de los objetivos principales de nuestro proyecto. En

particular, determinamos el papel funcional de LEF1 en muestras primarias de pacientes con LLC y donantes de MBL mediante citometría de flujo intracelular, CUT&RUN, LEF1 CRISPR-Cas9 KO y análisis de espectrometría de masas IP nuclear. Además, las diferentes isoformas de LEF1 se sobreexpresaron en líneas celulares de LLC (MEC1 y HG3).

A nivel de expresión génica, la expresión de LEF1 fue similar en MBL y LLC independientemente de su estado mutacional de IGHV. Sorprendentemente, a nivel de proteína, los casos clínicamente agresivos de IGHV no mutados (U-LLC) mostraron niveles de LEF1 significativamente más altos que los casos más indolentes de IGHV mutados (M-LLC) o MBL. Esta discordancia entre los niveles de ARNm y proteína se explicó por una mayor estabilidad de las proteínas en la U-LLC. Después de 8 horas de inhibición de la síntesis de proteínas con cicloheximida, los niveles de proteína LEF1 se redujeron en un 20% en las células U-LLC y en un 60% en las células M-LLC. Luego analizamos la distribución de todo el genoma de los sitios de unión al ADN de LEF1 mediante CUT&RUN e identificamos 2,7 veces más picos en U-LLC que en M-LLC. Si bien la mayoría de los picos identificados en M-LLC también se encontraron en U-LLC ( $n = 5.777$  picos), el 68% de los sitios de unión de LEF1 identificados en células U-LLC fueron únicos ( $n = 12.059$  picos). Los genes diana de los picos comunes estaban involucrados en funciones como la señalización BCR, mientras que los genes diana específicos de U-LLC estaban relacionados con la progresión del ciclo celular. De acuerdo con este hallazgo, observamos niveles más altos de proteína LEF1 en la fracción proliferativa (CXCR4<sup>low</sup>CD5<sup>high</sup>) en comparación con la fracción en reposo (CXCR4<sup>high</sup>CD5<sup>low</sup>). Los niveles de proteína LEF1 de las células primarias de LLC también aumentaron *in vitro* al recibir estímulos proliferativos. Validamos que LEF1 participa en la regulación del ciclo celular al inducir KO de LEF1 CRISPR-Cas9 en muestras primarias de LLC. En este modelo, el análisis RNA-Seq mostró una regulación negativa de los genes del ciclo celular, y las células que carecían de LEF1 mostraron niveles de Ki67 más bajos que las células que expresaban LEF1.

También investigamos el interactoma nuclear de LEF1 en U-LLC y descubrimos el regulador del ciclo celular CDC5L como socio de LEF1. Inesperadamente, CDC5L interactuó con las isoformas más cortas de LEF1 que carecen del exón 6 (LEF1- $\Delta$ exon6) y no con el transcrito completo (FL). De la misma forma, los estímulos proliferativos disminuyeron los niveles de LEF1-FL y aumentaron las isoformas LEF1-

$\Delta$ exon6. Además, la sobreexpresión de LEF1-FL, pero no de LEF1- $\Delta$ exon6, disminuyó la proliferación en líneas celulares de LLC. El análisis de RNA-Seq mostró que LEF1-FL induce un perfil transcripcional inactivo, que se recupera mediante la expresión de las isoformas LEF1- $\Delta$ exon6.

En resumen, hemos descubierto que la expresión *de novo* de LEF1 tiene una doble función en la patogénesis de la LLC dependiendo de los niveles de proteína y la expresión de isoformas. Los niveles más bajos de proteína LEF1 están relacionados con el desarrollo inicial de LLC, mientras que los niveles más altos de LEF1 y el aumento de la concentración relativa de la isoforma LEF1- $\Delta$ exon6 impulsan la proliferación en formas más agresivas de la enfermedad.

### **Mieloma múltiple**

En este proyecto nos planteamos la importancia de 54 TF, que mostraban sitios de unión de TF (TFBS) enriquecidos en regiones activas *de novo* en el MM, utilizando una librería CRISPR-Cas9 personalizada. La selección de la librería CRISPR-Cas9 en dos líneas celulares MM (MM.1R y KMS-11) mostró la importancia de 22 TF. Curiosamente, entre estos TF, detectamos 3 miembros de la familia IRF —IRF1, IRF2 e IRF5—, junto con el control positivo IRF4, lo que sugiere la importancia de los TF IRF en el MM. Los KO individuales de CRISPR-Cas9 identificaron IRF2 y, como se esperaba, IRF4 como los TF de IRF principales en el MM. Para determinar las vías de señalización reguladas por IRF2 e IRF4, analizamos las regiones de cromatina unidas por estos 2 TF (y el IRF1 como TF no esencial) mediante CUT&RUN en las mismas 2 líneas celulares de MM. Identificamos 16.300 regiones de cromatina unidas a IRF2 en células MM, significativamente enriquecidas en promotores activos, en comparación con IRF4 (7.512 picos detectados) e IRF1 (5.891 picos). El 60% de las regiones de cromatina unidas a IRF2 eran exclusivas de IRF2, asociadas a genes que participan principalmente en el ciclo celular, la diferenciación celular y la adhesión. El 40% restante de las regiones de unión de IRF2 se compartían con IRF4 y/o IRF1, y estaban relacionadas con genes implicados principalmente en el sistema inmunológico, la diferenciación celular y la adhesión. Además, IRF2 estaba presente en el 32% (498/1.556) de las regiones de cromatina activa *de novo*, donde 201 picos correspondían únicamente a IRF2 y regulaban genes implicados en la migración celular, la diferenciación de osteoblastos y la activación de quinasas, mientras que 297 picos correspondían a los 3 IRF y estaban relacionados con genes de estrés oxidativo.

Curiosamente, los genes reguladores de IRF2 se sobreexpresaban en su mayoría en el MM en comparación con células plasmáticas sanas de amígdalas y médula ósea. Posteriormente, el análisis del transcriptoma después del silenciamiento de IRF2 reveló que más del 30% de los genes regulados negativamente eran dianas de IRF2 identificados por CUT&RUN. Además, los genes regulados negativamente estaban asociados con el ciclo celular, la proliferación, la diferenciación celular, la adhesión y el sistema inmunológico. Estos resultados sugieren que IRF2, además de las vías también reguladas por IRF4, controla vías específicas involucradas en la biología del MM y no reguladas por otros miembros de la familia IRF. Finalmente, examinamos el impacto pronóstico de la expresión de IRF2 en el MM y observamos que los pacientes con mayor expresión de IRF2 presentaban una peor supervivencia libre de progresión (SSP) y supervivencia global (SG) en un análisis multivariado que incluía las alteraciones genéticas clásicas utilizadas para la estratificación de los pacientes de MM. En conclusión, hemos demostrado que IRF2 desempeña un papel importante como biomarcador y como gen esencial en la patogénesis del MM al participar en la regulación de genes relacionados con el ciclo celular, la diferenciación y la adhesión. Estos resultados establecen que IRF2 es un objetivo prometedor para nuevas dianas terapéuticas en el MM.

Además, en este proyecto estudiamos la posible modulación farmacológica de regiones activas *de novo* en el MM y su relación con la función de los TF. Tratamos 3 líneas celulares de MM (KMS-11, RPMI8226 y KMS-12) con 1  $\mu$ M de bromodominio JQ1 y un inhibidor de proteínas de dominio extraterminal (BET) (BETi) durante 72 h. Después del tratamiento con JQ1, detectamos una reducción significativa de más del 10% de los genes regulados por la activación *de novo* de la cromatina en MM. Curiosamente, SMILO, un lncRNA esencial en el MM, presentó una de las mayores inhibiciones, incluso en comparación con genes bien descritos regulados por BETi. A través de ChIP-Seq y ATAC-Seq, verificamos que la disminución de SMILO no se debe a cambios en la activación y accesibilidad de la cromatina producida por JQ1 en células MM, lo que sugiere que JQ1 puede desplazar la maquinaria transcripcional, como los TF, de las regiones activas *de novo* relacionadas con SMILO. El estudio de Reverse-ChIP mostró la unión de 16 proteínas en la región de la cromatina relacionada con SMILO. Entre estas, seleccionamos como nuestro candidato el TF FLI1, por varias razones: (1) FLI1 estaba sobreexpresado en el MM en comparación con las células B sanas; (2) presentaba una correlación positiva de expresión con SMILO; (3) los pacientes con MM

con mayor expresión de FLI1 presentaban peores PFS y OS, tanto en análisis univariados como multivariados considerando las alteraciones genéticas clásicas de MM, y (4) FLI1 mostraba una disminución significativa en H3K27ac en la región promotora después del tratamiento con JQ1, lo que se correlacionó con una disminución en niveles de proteína FLI1. Para determinar si FLI1 está causalmente implicado en la expresión de SMILO, se silenció FLI1 utilizando la tecnología CRISPR-Cas9, que disminuyó sustancialmente los niveles de proteína FLI1, lo que dio lugar a una reducción significativa de la expresión de SMILO. Estos resultados explican al menos uno de los mecanismos por los cuales JQ1 disminuye la expresión de SMILO a través de la desregulación del TF FLI1.

En conclusión, nuestro estudio destaca el potencial de BETi para modular la expresión de regiones activas *de novo* en el MM y, específicamente, la expresión del lncRNA SMILO en el MM. Esto abre la puerta al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas contra moléculas de ARN para el tratamiento del MM y otros tipos de tumores humanos.

### **3. Relevancia y posibles implicaciones futuras**

La relevancia e impacto de los resultados, y las implicaciones futuras de los datos generados en el transcurso del proyecto se relacionan con lo siguiente:

1. Generación de conocimiento: hemos proporcionado nuevas ideas sobre los mecanismos subyacentes a la desregulación epigenética en la LLC y el MM. Identificamos varios FT que desempeñan un papel clave en estas enfermedades, más notablemente LEF1 en la LLC e IRF2 en el MM. Estos resultados animarán investigaciones adicionales en el campo. Además, el enfoque experimental aplicado se puede extrapolar a otros cánceres para generar un catálogo de FT específicos involucrados en diferentes formas de cáncer.
2. Recursos de datos: hemos generado datos de cribados CRISPR-Cas9 en MM, así como datos multiómicos tanto en LLC como en MM, que una vez publicados pondremos a disposición a través de repositorios de datos internacionales (como EGA o GEO).

Estos datos representarán un recurso para la comunidad de investigadores que estudian estas enfermedades.

3. Nuevas herramientas y técnicas: hemos generado un nuevo método basado en CRISPR/Cas9 para permitir la edición de genes en neoplasias malignas de células B como la LLC.

4. Varios de los TF identificados en este estudio son, de hecho, excelentes objetivos terapéuticos, que constituirán la base para desarrollar inhibidores o degradadores específicos como posibles nuevas terapias.

#### 4. Bibliografía científica generada

##### Artículos publicados o en revisión

1. Valcárcel LV, Amundarain A, Kulis M, Charalampopoulou S, Melnick A, San Miguel J, Martín-Subero JI, Planes FJ, Agirre X, Prósper F.

*Gene expression derived from alternative promoters improves prognostic stratification in multiple myeloma.*

Leukemia. 2021 Oct;35(10):3012-3016. doi: 10.1038/s41375-021-01263-9.

2. Amundarain A, Valcárcel LV, Ordoñez R, Garate L, Miranda E, Cendoya X, Carrasco-Leon A, Calasanz MJ, Paiva B, Meydan C, Mason CE, Melnick A, Rodriguez-Otero P, Martín-Subero JI, San Miguel J, Planes FJ, Prósper F, Agirre X.

*Landscape and clinical significance of long noncoding RNAs involved in multiple myeloma expressed fusion transcripts.*

Am J Hematol. 2022 Mar 1;97(3):E113-E117. doi: 10.1002/ajh.26450.

3. Mateos-Jaimez J, Mangolini M, Vidal A, Kulis M, Colomer D, Campo E, Ringshausen I, Martín-Subero JI, Maiques-Diaz A.

*Robust CRISPR-Cas9 Genetic Editing of Primary Chronic Lymphocytic Leukemia and Mantle Cell Lymphoma Cells.*

Hemasphere. 2023 Jun 7;7(6):e909. doi: 10.1097/HS9.0000000000000909.

4. Maiques-Diaz A, Martín-Subero JI.

*Biological, prognostic, and therapeutic impact of the epigenome in CLL.*

Semin Hematol. 2023 Dec 1:S0037-1963(23)00092-6. doi:

10.1053/j.seminhematol.2023.11.005.

5. Gómez-Echarte N, San José-Enériz E, Carrasco-León A, Barrena N, Miranda E, Garate L, García-Torre B, Alonso-Moreno S, Gimenez-Camino N, Urizar-Compains E, Olaverri-Mendizabal D, Aguirre-Ruiz P, Ariceta B, Tamariz-Amador LE, Rodríguez-Otero P, Planes FJ, Belver L, Martín-Subero JI, Prósper F, Agirre X.

*BET inhibitors downregulate the expression of the essential lncRNA SMILO in multiple myeloma through regulation of the transcription factor FLI1.*

En revisión.

Además de estos artículos, actualmente estamos redactando dos manuscritos adicionales derivados del proyecto que se presentarán en el tercer y cuarto trimestre de 2024.

### **Presentaciones en congresos**

Mateos-Jaimez J, Vidal-Crespo A, Charalampopoulou S, Fernández Pérez R, Chapaprieta V, Largeot A, Herbst S, Dietrich S, Bastos Boente M, Alcoceba Sánchez M, Nadeu F, Ringshausen I, Paggetti J, Moussay E, Sabidó E, Espadas G, Colomer D, Campo E, Maiques-Diaz A,\* Martín-Subero JI.\* (\*Autores cosénior y de correspondencia.)

*Comprehensive functional analyses of LEF1 identify protein abundance and alternative isoform expression as drivers of cell proliferation in aggressive chronic lymphocytic leukemia.*

EHA 2024. Madrid (España), del 13 al 16 de junio de 2024. Presentación oral.

Gómez-Echarte N, Carrasco-León A, Maiques-Diaz A, Miranda E, Garate L, San-Martín L, Charalampopoulou S, Valcárcel LV, Ariceta B, Martín-Subero JI, San José-Eneriz E, Agirre X, Prósper F.

*IRF2 regulates specific signaling pathways that participate in the development and pathogenesis of multiple myeloma.*

EHA 2024. Madrid (España), del 13 al 16 de junio de 2024. Póster.

Gómez-Echarte N, Carrasco-León A, Barrena N, Miranda E, Garate L, García-Torre B, Alonso-Moreno S, Giménez-Camino N, Urizar-Compains E, Olaverri D, Aguirre-Ruiz P, Ariceta B, Rodríguez-Otero P, Planes FJ, Belver L, Martín-Subero JI, San José-Enériz E, Agirre X, Prósper F.

*Bet inhibitors downregulate the expression of the essential lncRNA SMILO in multiple myeloma through regulation of the transcription factor FLI1.*

EHA 2024. Madrid (España), del 13 al 16 de junio de 2024. Póster.

Gomez-Echarte N, Carrasco-León A, Maiques-Díaz A, Miranda E, Garate L, San-Martín P, Charalampopoulou S, Valcárcel LV, Martín-Subero JI, San José-Eneriz E, Agirre X, Prósper F.

*IRF2 regulates de novo active chromatin regions and participates in the development and pathogenesis of multiple myeloma.*

65th ASH Annual Meeting & Exposition. San Diego (Estados Unidos), del 9 al 12 de diciembre de 2023. Póster.

Gomez-Echarte N, Carrasco-León A, Maiques-Díaz A, Miranda E, Garate L, San-Martín P, Charalampopoulou S, Valcárcel LV, Martín-Subero JI, San José-Eneriz E, Agirre X, Prósper F.

*IRF2 como factor de transcripción clave en el desarrollo del mieloma múltiple.*

LXV Congreso Nacional SEHH, XXXIX Congreso Nacional SETH. Sevilla (España), del 26 al 28 de octubre de 2023. Comunicación oral.

Mateos-Jaimez J, Mangolini M, Vidal A, Colomer D, Campo E, Ringshausen R, Martín-Subero JI, Maiques-Diaz A.

*CRISPR-Cas9 genome-editing of primary chronic lymphocytic leukemia cells.*

64th ASH Annual Meeting & Exposition. Nueva Orleans (Estados Unidos), del 10 al 13 de diciembre de 2022. Póster.