



MEMÒRIA

25è RETORN SOCIAL DE LA RECERCA
CÀNCER

CERCA D'ARNS NO CODIFICANTS, COM NOUS BIOMARCADORS I DIANES, PER MILLORAR LA RESPOSTA AL TRACTAMENT AMB IBRUTINIB EN LA LEUCÈMIA LIMFOCÍTICA CRÒNICA

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. Resum

La leucèmia limfocítica crònica (LLC) és una neoplàsia limfoide molt comuna, i els pacients mostren diverses característiques biològiques, comportaments clínics i respostes al tractament. Volem identificar quins gens són particularment rellevants per a la predicció de la resposta a nous fàrmacs desenvolupats contra l'LLC, com ara Ibrutinib. En particular, volem estudiar una família de gens anomenats *RNA no codificants* que són molt importants en la regulació de funcions cel·lulars perquè contribueixen a l'expressió d'altres gens que es tradueixen en proteïnes, algunes de les quals estan relacionades amb l'agressivitat de l'LLC i la resposta al tractament. A més, prèviament hem descrit alguns RNA no codificants relacionats amb estímuls del microambient tumoral a les cèl·lules d'LLC, cosa que en potencia la proliferació i ajuda a prevenir la mort cel·lular. Per tant, la identificació de més RNA no codificants d'aquest tipus representaria nous avenços per a la predicció de la resposta a Ibrutinib entre pacients amb LLC i de noves dianes per a tractaments complementaris basats en la regulació negativa de la seva expressió per superar la resistència a aquest tractament observada en alguns pacients amb LLC.

L'abordatge d'aquest objectiu es va realitzar en un treball de col·laboració en què van participar dos equips —Barcelona (IDIBAPS) i Aviano (CRO)—, que treballaven en paral·lel en la detecció dels RNA però se centraven en diferents famílies: lncRNA i micro-RNA, respectivament. En una primera fase de selecció, es va estudiar l'expressió de totes les famílies d'RNA en diferents cohorts de mostres d'LLC (amb característiques moleculars o sense, com alteracions del gen TP53 o trisomia 12) en un model *ex vivo* que emulava alguns efectes del microambient rellevants per al tractament amb Ibrutinib (CpG-ODN, CD40L, IL10, estimulació BCR). Els lncRNA que es van trobar sobreexpressats en comparació amb els controls en resposta a aquests estímuls es van analitzar posteriorment per determinar-ne l'impacte clínic, utilitzant l'expressió i les dades clíniques d'una sèrie independent de 266 pacients amb LLC. A més, també es van utilitzar anàlisis d'enriquiment de vies moleculars per reduir el nombre d'lncRNA clínicament rellevants involucrats en les vies moleculars estimulades pels factors del microambient. Un d'aquests lncRNA (MALAT1) va ser particularment notable respecte al seu impacte clínic, i és independent de tots els altres factors pronòstics coneguts en l'LLC. També vam poder mostrar el seu potencial com un interessant biomarcador clínic

no invasiu dels estímuls del microambient que tenen lloc als ganglis limfàtics dels pacients.

A més d'això, vam seleccionar 3 lncRNA més que eren candidats de particular interès, tant des del punt de vista biològic com clínic. Unes anàlisis addicionals ens van permetre refinar en la variant transcripcional els amplicons que es van utilitzar per determinar-ne l'expressió en els experiments funcionals. Vam analitzar la rellevància funcional d'aquests candidats en experiments de silenciament en la línia cel·lular d'LLC anomenada *MEC1* i vam poder demostrar la seva participació efectiva en la regulació de l'expressió de gens involucrats en vies similars a les observades prèviament en associació en el model experimental de mostres primàries d'LLC tractades *ex vivo*. Cal destacar que entre els gens modulats per aquests lncRNA trobem un precursor del micro-RNA miR-155. Curiosament, l'equip de CRO també va estudiar el micro-RNA modulats pels mateixos factors del microambient i va trobar miR-155 entre els micro-RNA regulats positivament. En conjunt, els nostres resultats suggereixen que part de l'efecte oncogènic de l'lncRNA identificat està intervingut pel control indirecte dels nivells d'aquest micro-RNA.

En conclusió, vam obtenir evidència dels possibles efectes sinèrgics de l'ús d'Ibrutinib amb teràpies combinades centrades a silenciar els lncRNA caracteritzats aquí, així com el bloqueig de miR-155.

2. Resultats

Selecció de mostres

Es van seleccionar un total de 16 mostres d'LLC en funció del següent:

- a) Estat mutacional del gen IGHV (selecció de mostres no mutades).
- b) Perfil genètic de grups amb alteracions en 11q13, trisomia 12 o TP53mut/del17p, i també un altre grup sense cap de les alteracions anteriors (*wild-type*, WT).
- c) Absència de tractament previ (particularment respecte a Ibrutinib).

A més, es va utilitzar el criteri de la capacitat de les cèl·lules B de ser activades per boles anti-IgM que estimulen la senyalització de BCR, cosa que dona com a resultat un

augment dels nivells de p-BTK i p-ERK i dona lloc a la selecció per a experiments posteriors de 6 casos d'LLC WT i 6 casos d'LLC amb mutació/eliminació de TP53. En les altres cohorts vam trobar casos sense activació clara, per la qual cosa al final vam poder incloure només 3 casos amb trisomia 12 (estudiats només per a lncRNA).

Caracterització immunofenotípica de l'estimulació de cèl·lules d'LLC

Es va utilitzar un panel de citometria cel·lular de 6 colors (avaluació de CD19, CD5, CD69, MCL1, PARP escindit i tinció de cèl·lula viva/morta) per avaluar els canvis de fenotip obtinguts utilitzant els quatre tractaments proposats:

- (A) Cèl·lules tractades únicament amb boles policlonals recobertes d'Ig.
- (B) Cèl·lules tractades amb boles recobertes d'IgM + Ibrutinib.
- (C) Tractament com en A més una barreja d'agonistes (CpGODN, Mega CD40L i IL-10)
- (D) Tractament com en B més una barreja d'agonistes.

D'acord amb l'efecte proliferatiu de la barreja d'agonistes, els casos de WT van mostrar un augment en l'expressió de CD69 i MCL1 (condició A enfront de C, i B enfront de D). Per contra, els casos amb alteració de TP53 no van mostrar diferències entre les dues condicions, possiblement per una expressió relativament alta tant de CD69 com de MCL1 en el context de l'alteració de TP53 pel que fa als casos de WT. Ibrutinib va ser capaç de bloquejar l'activació de CD69 i MCL1 induïda per estimulació anti-IgM, mentre que l'addició d'estímuls microambientals va semblar que contrarestavava, almenys en part, la inhibició de CD69/MCL1. Les mostres alterades amb TP53 van mostrar una lleugera disminució de CD69 i MCL1 després del tractament amb Ibrutinib, principalment relacionada amb el baix efecte de l'estimulació anti-IgM en aquest conjunt particular de casos.

Perfils d'expressió d'RNA no codificants i estudis funcionals

Respecte dels **micro-RNA**, vam cercar els expressats diferencialment entre condicions experimentals amb *microarrays* dedicats (Agilent). Entre els casos amb alteració de WT i TP53, vam identificar 32 micro-RNA que separaven clarament els casos de WT dels casos amb alteració de TP53. Com s'ha descrit respecte d'altres tumors, miR-34 va modular la seva expressió significativament en els casos de WT. Aquestes dades podrien explicar la baixa supervivència dels casos alterats per TP53, ja que miR-34 és un regulador negatiu de c-Myc i BCL2, i està involucrat en un circuit de

retroalimentació positiva en què TP53 estén el seu efecte inhibidor sobre el tumor . En comparar la condició A amb la C, vam identificar una sobreexpressió del micro-RNA pertanyent a la família del grup mir-17~92, després de l'estimulació amb estímuls microambientals, tal com havíem vist en els nostres estudis anteriors. Aquesta regulació positiva és clara en els casos de WT, mentre que en el context dels casos alterats per TP53, els membres de la família mir-17~92 no van mostrar diferències en el terme d'expressió, cosa que apunta a una possible interferència de la proteïna mutada TP53 en l'expressió d'aquests micro-RNA. A més, miR-155, un dels oncomiR més ben caracteritzats en neoplàsies hematològiques, també va resultar sobreexpressat després de l'estimulació.

Per contra, pel que fa als micro-RNA miR-17~92, la regulació positiva de miR-155 va resultar independent de l'estat de TP53; de fet, es va veure una sobreexpressió significativa de miR-155 tant a WT com en casos d'interrupció de TP53 després de l'estimulació. Curiosament, fins i tot en el context de mostres estimulades amb anti-IgM i tractades amb Ibrutinib, observem un perfil de micro-RNA similar. Les mostres de WT van augmentar els micro-RNA pertanyents a la família miR-17~92, cosa que indica que, com s'esperava, Ibrutinib no va poder bloquejar aquests micro-RNA. Aquests resultats estan en consonància amb la capacitat d'Ibrutinib de bloquejar la senyalització de BCR en lloc d'altres estímuls que no depenen de BTK i amb la noció que Ibrutinib generalment no indueix l'apoptosi. Cal assenyalar que miR-132, un micro-RNA regulat positivament que és ben conegut després de l'estimulació anti-IgM, va resultar regulat negativament només en la condició D (combinació d'Ibrutinib i altres estímuls microambientals), cosa que probablement dona suport a una regulació independent de BTK. Com es va veure anteriorment per a l'estimulació microambiental canònica, fins i tot en aquest context, miR-155 va ser l'únic micro-RNA expressat diferencialment que hi havia en comú en mostres WT i mutades.

També vam fer anàlisis de perfils d'expressió d'mRNA mitjançant matrius per investigar la modulació d'mRNA associada, que es va fer mitjançant l'ús de la tècnica RNA-Seq. Així, en analitzar el perfil d'expressió gènica diferencial de la condició A enfront de la C, vam identificar 1.614 gens expressats diferencialment (1.306 de regulats positivament i 308 de regulats negativament en la condició). D'acord amb la regulació positiva dels membres de la família miR-17~92 i miR-155, l'anàlisi d'enriquiment de conjunts de gens (GSEA) va identificar una regulació negativa significativa de les dianes d'aquests

micro-RNA en la condició C, cosa que subratlla novament la importància funcional d'aquests micro-RNA. Es van obtenir els mateixos resultats comparant el GEP diferencial de les condicions B i D. Novament, la GSEA va revelar una regulació positiva dels membres de la família mir-17~92 i miR-155 en la condició D. Segons les nostres dades anteriors i els resultats d'aquests experiments, es posa de manifest la importància de miR-17 en el context d'estímuls microambientals.

També vam tenir l'oportunitat d'investigar la capacitat de l'expressió de miR-17 per predir el pronòstic tant en LLC com en altres trastorns limfoproliferatius primaris, com ara el limfoma de cèl·lules del mantell (LCM) i el limfoma de cèl·lules B grans (LCBG). Específicament, es van analitzar 399 mostres d'LLC, 77 mostres d'LCM i 78 mostres d'LCGB per determinar els nivells d'expressió de miR-17. A LLC i LCM va ser possible demostrar que els nivells alts de miR-17 van permetre distingir els pacients amb una supervivència general més baixa en comparació amb els pacients que tenien nivells baixos de miR-17. Segons aquests resultats, es van seleccionar miR-17 i miR-155 com a candidats per al silenciament en mostres primàries. Experiments preliminars van demostrar la capacitat del tractament amb antagomiR-17 per reduir la viabilitat i augmentar l'apoptosi de línies cel·lulars tumorals (LCM en aquest cas, on es va instal·lar originàriament la tècnica). Les dades van mostrar que, després de la transfecció amb nanobombolles que contenen un antagonista de miR-17 (antagomiR-17), es produeix un augment de l'apoptosi. La transfecció no sols va provocar un augment de l'apoptosi sinó també una reducció de la proliferació cel·lular. En conclusió, aquí proporcionem dades preliminars que indiquen que miR-17 està involucrat en la proliferació de cèl·lules d'LLC mitjançant interaccions microambientals i que antagonitzar miR-17 pot tenir un paper rellevant en la supervivència i la proliferació de les cèl·lules d'LLC. S'estan duent a terme experiments similars per investigar el paper de miR-155 en el mateix context.

Pel que fa als **lncRNA**, es van analitzar els perfils d'expressió en les mostres esmentades anteriorment utilitzant la plataforma de *microarrays* Clariom D WT Pico (ThermoFisher). L'anàlisi preliminar (PCA) va demostrar que el grup de WT d'LLC de Barcelona i Aviano, així com el grup TP53mut/del17p, tenien una mostra cadascun amb valors atípics segons el perfil d'expressió global. Per tant, vam excloure aquestes mostres per a l'anàlisi de l'expressió diferencial. A partir dels gens codificants inclosos a la matriu, vam poder confirmar l'expressió diferencial de gens o vies que són

concordants amb l'impacte esperat del tractament amb barreja d'agonistes. Així, EZH2 està dramàticament regulat de forma positiva per aquest tractament, i és un factor ja descrit com a regulador epigenètic clau d'aquesta estimulació del microambient de les cèl·lules d'LLC als ganglis limfàtics (PMID: 31227476). També vam obtenir una llista de candidats a lncRNA que van ser modulats per aquest tractament als diferents grups de mostra estudiats. D'aquests, cal assenyalar la regulació positiva de l'lncRNA de MALAT1 mitjançant una barreja d'agonistes només en algunes de les cohorts estudiades. L'anàlisi *in silico* de les dades d'expressió en casos d'LLC prèviament estudiats ens va permetre identificar MALAT1 com un lncRNA amb un fort impacte clínic a l'LLC i potencialment associat a vies induïdes pel microambient dels ganglis limfàtics, motiu pel qual és un marcador subrogat del grau d'estimulació del microambient als ganglis limfàtics. Per tant, aquests resultats assenyalen MALAT1 com un potencial lncRNA d'interès en relació amb el nostre projecte.

Per reduir el nombre de candidats a lncRNA, també vam fer anàlisis de tot el transcriptoma de l'impacte clínic de l'expressió d'lncRNA en el temps fins al tractament (TTT) d'una gran sèrie d'LLC amb dades d'expressió disponibles del projecte ICGC ($n = 266$). Així, vam identificar 1.904 lncRNA; d'aquests, n'hi va haver 1.171 l'expressió més alta dels quals es va associar amb un TTT més curt; aquests últims van ser els més interessants per al nostre enfocament de validació per al nostre tercer objectiu.

Vam analitzar quins dels lncRNA candidats regulats positivament pel tractament amb barreja d'agonistes s'havien inclòs en el subconjunt d'lncRNA identificats amb un comportament clínic més agressiu, i n'hi va haver 83 de comuns entre les dues anàlisis. També vam aplicar diferents criteris complementaris per reduir encara més el nombre de candidats d'interès d'lncRNA. Teníem dades prèvies del projecte ICGC sobre diverses línies cel·lulars d'LLC i es va incloure la línia cel·lular MEC1 disponible perquè poguéssim verificar l'expressió dels candidats més interessants i identificar quins eren millors per fer anàlisis funcionals addicionals, perquè els nivells d'expressió basal més alts permetrien monitorar-ne l'expressió en silenciar-los en línies cel·lulars com MEC1. Vam seleccionar 3 dels lncRNA candidats més altament expressats en la línia cel·lular MEC1 mitjançant qRT-PCR. Una avaluació patogènica addicional utilitzant una anàlisi d'enriquiment de vies a la llista classificada de gens codificants correlacionats amb candidats d'lncRNA seleccionats va demostrar la seva participació potencial com a

reguladors reals de vies patogèniques rellevants modulades per estímuls del microambient. En aquest sentit, vam presentar un pòster al 28è Congrés de l'Associació Europea d'Hematologia (EHA), que es va fer del 8 al 15 de juny de 2023 a Frankfurt, Alemanya. Els resultats presentats corresponen a un d'aquests candidats seleccionats (LINC00152-CYTOR) perquè les dades publicades anteriorment apuntaven a la manca de valor clínic d'aquest lncRNA en l'LLC. Per contra, els nostres resultats mostren clarament que és un lncRNA rellevant en aquesta neoplàsia i la seva expressió està relacionada amb estímuls del microambient. La validació funcional dels 3 candidats va ser reeixida, ja que vam aconseguir un grau significatiu de silenciament dels 3 candidats en la línia cel·lular MEC1, d'acord amb els nivells d'expressió mesurats per *microarrays*, així com per qRT-PCR.

Vam fer una anàlisi per identificar aquells gens significativament modulats pel silenciament per a cada lncRNA analitzat en la línia cel·lular MEC1 LLC. També vam fer una anàlisi d'enriquiment de vies a les llistes de gens modulats. Notablement, aquests resultats van mostrar alguns gens rellevants (inclòs MCL1) modulats pels estímuls del microambient. A més, entre els gens expressats diferencialment també vam poder veure la implicació dels 3 candidats en l'expressió del precursor de miR-155 (MIR155HG). Això concorda amb la regulació positiva trobada per l'equip de CRO, que involucra la forma madura d'aquest micro-RNA i suggereix que part de la funció oncogènica d'aquests lncRNA en l'LLC estaria intervinguda per la seva influència en l'expressió de miR-155; per tant, també vincula aquest fenomen a l'estimulació de les cèl·lules d'LLC pel microambient.

Finalment, entre les vies enriquides trobades se'n van incloure algunes prèviament conegudes perquè estan desregulades patogènicament en l'LLC, fet que involucra elements en la resposta i la transducció de senyals d'estímuls del microambient (receptors de tipus Toll, citocines, interleucines, entre d'altres). Encara s'estan fent experiments complementaris per demostrar els beneficis potencials de combinar el silenciament *in vitro* d'aquests lncRNA amb el tractament amb Ibrutinib.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Com que l'expressió d'IncRNA es pot reduir *in vitro*, com es mostra en aquest projecte —tot i que també se sap que es podria fer *in vivo* utilitzant els mateixos oligonucleòtids LNA (gapmers)—, la identificació d'IncRNA implicats en el control de vies patogèniques impulsada pel microambient ens ha permès identificar noves dianes per a l'ús potencial de gapmers com a eina en tractaments juntament amb Ibrutinib per millorar la baixa sensibilitat que alguns pacients amb LLC mostren a aquest tractament. Com que també vam determinar que els nostres 3 IncRNA candidats relacionats amb el microambient són reguladors d'un precursor de miR-155, els nostres resultats suggereixen que part del seu efecte oncogènic està intervingut a través del control indirecte dels nivells d'aquest micro-RNA.

De manera rellevant, l'aplicació clínica de totes aquestes troballes és notòria, atès que hi ha un fàrmac ja desenvolupat (MRG-106; Cobomarsen) que és un inhibidor de miR-155 sintetitzat com un àcid nucleic (oligonucleòtid LNA). Un assaig clínic de fase 1 amb aquest agent en diversos tipus de limfoma (tot i que diferents de l'LLC) va tenir resultats molt positius i pot ser prometedora per a aplicacions clíniques en el futur, inclosa la millora de la resposta d'Ibrutinib en l'LLC.

4. Bibliografia científica generada

1. Article científic:

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. Article científic:

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. Pòster en un congrés:

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 European Hematology Association (EHA), 8-15 de juny de 2023, Frankfurt, Alemanya. PMC10429169.