



MEMÒRIA

25è RETORN SOCIAL DE LA RECERCA
CÀNCER

ESTUDI DEL ROL DELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ COM A MODULADORS DE LA CROMATINA I CONDUCTORS DE LES NEOPLÀSIES LIMFOIDES

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. Resum

Les alteracions en l'abundància i la distribució de les marques epigenètiques en el genoma són un dels trets característics del càncer. Tot i que les conseqüències de la desregulació epigenètica en el càncer estan relativament ben estudiades, les causes que porten a aquests mateixos canvis epigenètics encara són poc conegudes. En treballs previs, els equips dels sol·licitants van identificar que les modificacions epigenètiques en regions de cromatina en tumors limfoides semblaven estar mediatas per unions aberrants al DNA d'unes poques famílies de factors de transcripció (FT). Així, la hipòtesi subjacent a aquest projecte és que aquests FT podrien representar una lesió molecular inicial —complementària a la genètica— que alhora indueix activacions *de novo* de promotors i d'amplificadors genètics que porten, al seu torn, a la generació d'un programa transcripcional oncogènic.

En aquest projecte, hem estudiat el paper dels FT en la leucèmia limfàtica crònica (LLC) i el mieloma múltiple (MM). Aquestes dues neoplàsies es troben entre els tumors limfoides més freqüents, i les dues exhibeixen una heterogeneïtat genètica i variabilitat clínica substancials. Tanmateix, malgrat aquesta heterogeneïtat, ambdues mostren senyals de cromatina homogenis específics de cada malaltia que estan enriquits en uns pocs FT. Així, doncs, per obtenir més coneixements de la patogènesi de l'LLC i l'MM, vam proposar tres objectius ambiciosos: el primer, identificar els FT clau responsables dels senyals epigenètics únics de l'LLC i l'MM, utilitzant un cribratge dels FT personalitzat amb CRISPR/Cas9. El segon, definir funcionalment el rol dels FT identificats com a iniciadors epigenètics de l'LLC i l'MM, a través de la caracterització dels seus llocs d'unió i el seu paper directe en la transcripció i la modificació epigenètica. I el tercer, caracteritzar els FT com a cofactors i estudiar-ne el potencial com a estratègies terapèutiques innovadores en l'LLC i l'MM, a través de la identificació de les proteïnes que interaccionen amb els FT i l'impacte de la seva inhibició. Per assolir aquests objectius, vam usar metodologies i dissenys experimentals similars per estudiar l'LLC i l'MM, tot i que en vam adaptar alguns per fer-los servir amb els recursos i els models experimentals disponibles. Durant el transcurs del projecte, els dos equips han treballat junts de prop compartint eines, mètodes i recursos, així com revisant i interpretant els resultats respectius en videoconferències regulars i reunions presencials.

En les pròximes pàgines, resumirem els resultats obtinguts en l'LLC i l'MM per separat, per després analitzar les implicacions generals de la nostra feina i detallar la bibliografia generada.

2. Resultats

Durant el període de finançament, hem sigut capaços de completar tots els objectius proposats tant per a l'LLC com per a l'MM. A continuació hi ha un resum breu dels resultats més importants obtinguts per a cadascuna de les malalties.

Leucèmia limfàtica crònica

En aquest projecte, hem portat a terme una anàlisi exhaustiva del paper dels FT en l'LLC. Atès que els models de línies cel·lulars disponibles per a l'LLC no són capaços de recapitular completament alguns dels trets moleculars principals de la malaltia, inicialment vam caracteritzar un sistema *in vitro* per cultivar cèl·lules d'LLC primàries. Això va culminar en el desenvolupament d'una nova estratègia per portar a terme recerca mecanicista emprant cèl·lules primàries de pacients d'LLC. Després, basant-nos en publicacions i dades prèvies del nostre grup de recerca, vam seleccionar els FT associats amb el desenvolupament i l'agressivitat clínica de la malaltia per estudiar-ne els mecanismes. A més d'altres troballes que ja s'han resumit en els informes anuals, en aquest projecte vam avaluar amb gran detall el paper del factor de transcripció LEF1 en l'LLC. Atesa la rellevància d'aquests resultats, apareixeran més detallats en aquest resum del projecte.

LEF1 és un factor de transcripció clau involucrat en la proliferació i la diferenciació de múltiples tipus cel·lulars normals, però es troba absent en cèl·lules B madures. En l'LLC, l'expressió de LEF1 sembla un esdeveniment oncogènic primerenc, ja que està present en la condició premaligna de la limfocitosi de cèl·lula B monoclonal (LBM). Addicionalment, se sap que les diverses isoformes de LEF1 tenen diferents rols en les cèl·lules normals i les canceroses. Tot i que l'expressió de LEF1 és un tret característic de l'LLC i un marcador diferencial de diagnòstic, la seva contribució a la patogènesi de l'LLC és esquiva. Així, doncs, una de les primeres qüestions en què es va centrar en nostre projecte va ser en la identificació del paper oncogènic exacte de LEF1 en l'LLC. En particular, vam determinar el rol funcional de LEF1 en mostres primàries de

pacients d'LLC i donants d'LBM usant citometria de flux intracel·lular, CUT&RUN, KO de LEF1 amb CRISPR-Cas9 i anàlisi d'espectrometria de masses d'immunoprecipitació nuclear. A més, les isoformes de LEF1 es van sobreexpressar en les línies cel·lulars d'LLC (MEC1 i HG3).

Pel que fa a l'expressió gènica, l'expressió de LEF1 era similar en les LBM i les LLC independentment de l'estatus mutacional de l'IGHV. Notablement, al nivell de proteïna els casos d'IGHV no mutada (U-LLC), més agressius clínicament, van mostrar uns nivells significativament més alts de LEF1 que els casos d'IGHV mutada (M-LLC), més indolents, o d'LBM. Aquesta discordança entre els nivells d'mRNA i de proteïna s'explica a través d'un increment en l'estabilitat proteica en la U-LLC. Passades les 8 hores d'inhibició de la síntesi de proteïna amb cicloheximida, els nivells de proteïna de LEF1 es van reduir un 20% en les cèl·lules d'U-LLC i un 60% en les d'M-LLC. Després, vam analitzar la distribució dels llocs d'unió al DNA de LEF1 en el genoma emprant CUT&RUN i vam identificar 2,7 vegades més pics en la U-LLC que en l'M-LLC. Si bé la major part dels pics identificats en l'M-LLC també es trobaven en la U-LLC ($n = 5.777$ pics), el 68% dels llocs d'unió de LEF1 identificats en les cèl·lules d'U-LLC eren únics ($n = 12.059$ pics). Els gens diana dels pics en comú estaven involucrats en funcions com ara la senyalització del BCR, mentre que els gens diana dels pics específics de la U-LLC estaven relacionats amb la progressió del cicle cel·lular. En línia amb aquest descobriment, vam observar un increment en els nivells de proteïna de LEF1 en la fracció proliferativa (CXCR4^{low}CD5^{high}) en comparació amb la fracció en repòs (CXCR4^{high}CD5^{low}). Els nivells de proteïna de LEF1 de les cèl·lules primàries d'LLC també augmentaven davant estímuls proliferatius *in vitro*. Vam validar que LEF1 s'implica en la regulació del cicle cel·lular induint un KO, a escala global de mostra, de LEF1 en cèl·lules primàries d'LLC. En aquest model, l'anàlisi d'RNA-Seq va mostrar una desregulació dels gens de cicle cel·lular, i les cèl·lules sense LEF1 tenien nivells més baixos de Ki67 que les cèl·lules que expressaven LEF1.

També vam investigar l'interactoma nuclear de LEF1 en la U-LLC i vam descobrir el regulador del cicle cel·lular CDC5L com a lligand de LEF1. De forma inesperada, CDC5L interaccionava amb les isoformes més curtes de LEF1, de les quals manca l'exó 6, i no amb el transcrit de llargada completa (LC). D'acord amb això, els estímuls proliferatius feien baixar els nivells de LEF1-LC i incrementaven les isoformes de LEF1- Δ exon6. A més, la sobreexpressió de LEF1-LC però no de LEF1- Δ exon6 feien decreixer la

proliferació en les línies cel·lulars d'LLC. L'anàlisi d'RNA-Seq va mostrar que LEF1-LC indueix un perfil transcripcional quiescent que es recupera amb l'expressió de les isoformes de LEF1- Δ exon6.

En global, vam descobrir que l'expressió *de novo* de LEF1 té un paper dual en la patogènesi de l'LLC dependent dels nivells de proteïna i la isoforma expressada. Uns nivells de proteïna de LEF1 més baixos s'associen al desenvolupament inicial de l'LLC, mentre que un increment dels nivells i un increment de l'abundància relativa de les isoformes LEF1- Δ exon6 condueixen a la proliferació en formes més agressives de la malaltia.

Mieloma múltiple

En aquest projecte vam indagar en l'essencialitat de 54 FT que mostraven llocs d'unió a FT (LUFT) enriquits en regions actives *de novo* en l'MM, emprant una llibreria de CRISPR-Cas9 personalitzada. El cribratge de la llibreria de CRISPR-Cas9 en dues línies cel·lulars de l'MM, MM.1R i KMS-1, van mostrar l'essencialitat de 22 FT.

Sorprenentment, entre aquests FT vam detectar 3 membres de la família IRF —IRF1, IRF2 i IRF5—, juntament amb el control positiu IRF4, cosa que suggereix la importància dels FT IRF en l'MM. *Knock-downs* individuals de CRISPR-Cas9 van identificar IRF2 i, com s'esperava, IRF4, com els FT IRF més essencials en l'MM. Per determinar les vies de senyalització regulades per IRF2 i IRF4, vam analitzar les regions de cromatina a què s'uneixen aquests dos FT (i IRF1 com un FT no essencial) amb CUT&RUN en les dues mateixes línies cel·lulars de l'MM. Vam identificar 16.300 regions de cromatina a les quals IRF2 s'unia en les cèl·lules de l'MM, significativament enriquides en promotors actius, en comparació amb IRF4 (7.512 pics detectats) i IRF1 (5.891 pics). El 60% de les regions de cromatina reconegudes per IRF2 eren exclusives a IRF2, associades a gens que participen principalment en el cicle cel·lular, la diferenciació cel·lular i l'adhesió. El 40% restant de les regions d'IRF2 estaven compartides amb IRF4 i/o IRF1, i estaven relacionades amb gens implicats en el sistema immunològic, la diferenciació cel·lular i l'adhesió. A més, IRF2 estava present en el 32% (498/1.556) de les regions de cromatina actives *de novo* en què 201 pics corresponien únicament a IRF2 i regulaven gens implicats en la migració cel·lular, la diferenciació d'osteoblasts i l'activació de quinases; mentre que 297 pics corresponien als tres IRF i estaven relacionats amb gens d'estrès oxidatiu. És interessant saber que els gens regulats per IRF2 estaven sobreexpressats majorment

en l'MM en comparació amb cèl·lules plasmàtiques sanes de les amígdales o de la medul·la òssia. L'anàlisi del transcriptoma després de silenciar IRF2 va revelar que més del 30% dels gens que disminuïen eren dianes d'IRF2 identificades en el CUT&RUN. A més, els gens que disminuïen estaven relacionats amb el cicle cel·lular, la proliferació, la diferenciació cel·lular, l'adhesió i el sistema immunològic. Aquests resultats suggereixen que IRF2, a més de vies regulades per IRF4, controla vies específiques de la biologia de l'MM i no regulades per altres membres de la família IRF. Finalment, vam indagar en l'impacte pronòstic de l'expressió d'IRF2 en l'MM i vam observar que els pacients amb expressió incrementada d'IRF2 presentaven una pitjor supervivència lliure de progressió i supervivència global en una anàlisi multivariada que incloïa alteracions genètiques clàssiques usades per a l'estratificació dels pacients de l'MM. En conclusió, hem demostrat que IRF2 té un paper important com a biomarcador i com a gen essencial en la patogènesi de l'MM a través de la seva funció en la regulació de gens relacionats amb el cicle cel·lular, la diferenciació i l'adhesió. Aquests resultats estableixen IRF2 com a diana prometedora per a noves estratègies terapèutiques en l'MM.

A més, en aquest projecte hem estudiat la possible modulació farmacològica de regions actives *de novo* en l'MM (Ordoñez R *et al.*, Genome Research 2019), i la seva relació amb la funcionalitat dels FT. Hem tractat 3 línies cel·lulars de l'MM (KMS-11, RPMI8226 i KMS-12) amb 1 µM de JQ1, inhibidor de les proteïnes de domini bromodomini i domini extraterminal (BET) (BETi) durant 72 h. Passat el tractament amb JQ1, vam detectar una disminució significant de més del 10% de gens regulats per l'activació de cromatina *de novo* en l'MM. Resulta interessant, també, que SMILO, un lncRNA essencial en l'MM (Carrasco-León A *et al.*, Leukemia, 2021), va presentar una de les inhibicions més fortes, fins i tot en comparació amb els ben coneguts gens regulats per BETi. A través de l'anàlisi de ChIP-Seq i ATAC-Seq vam verificar que la disminució de SMILO no era deguda als canvis en l'activació de la cromatina i l'accessibilitat produïts per JQ1 en les cèl·lules de l'MM, cosa que suggereix que JQ1 podria desplaçar la maquinària transcripcional, com els FT, de les regions actives *de novo* relacionades amb SMILO. L'estudi de ChIP-reversa va revelar la unió de 16 proteïnes en la regió de cromatina relacionada amb SMILO. Entre aquestes, vam seleccionar com a candidat l'FT FLI1, per diversos motius: (1) FLI1 estava sobreexpressat en l'MM en comparació amb les cèl·lules B sanes; (2) FLI1 presentava una correlació positiva amb SMILO; (3) els pacients amb MM amb una expressió de FLI1 més alta van presentar pitjor

supervivència lliure de progressió i supervivència global tant en anàlisis univariades com multivariades considerant alteracions genètiques clàssiques de l'MM, i (4) FLI1 va mostrar una disminució significativa d'H3K27ac a la regió del promotor després del tractament amb JQ1, fet que es correlacionava amb una disminució dels nivells de proteïna de FLI1. Per confirmar que FLI1 està causalment implicat en l'expressió de SMILO, es va silenciar FLI1 amb tecnologia CRISPR-Cas9, que, en fer créixer substancialment els nivells de proteïna de FLI1, va provocar una reducció significativa de l'expressió de SMILO. Aquests resultats expliquen almenys un dels mecanismes pels quals JQ1 fa créixer SMILO a través de la desregulació de l'FT FLI1.

En conclusió, el nostre estudi posa de manifest el potencial de BETi per modular l'expressió de les regions actives *de novo* en l'MM i, específicament, l'expressió de l'ncRNA SMILO en l'MM. Això obre la porta al desenvolupament de noves estratègies terapèutiques dirigides contra molècules d'RNA per al tractament de l'MM i altres tipus de tumors humans.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

La rellevància i l'impacte dels resultats i les futures implicacions de les dades generades en el transcurs del projecte es relacionen amb els elements següents:

1. Generació de coneixement: hem aportat noves visions als mecanismes subjacents a la desregulació epigenètica en l'LLC i l'MM. Hem identificat diversos FT amb papers clau en aquestes malalties, entre els quals destaquen LEF1 en l'LLC i IRF2 en l'MM. Aquests resultats impulsaran més recerca en el camp. A més, el procediment experimental aplicat pot extrapolar-se a altres càncers per generar un catàleg específic d'FT involucrats en diferents formes de càncer.
2. Dades: hem generat dades de cribratges de CRISPR-Cas9 en l'MM, així com dades de multiòmiques tant en l'LLC com en l'MM, que un cop publicats estaran disponibles en repositoris de dades internacionals (com ara EGA i GEO). Aquestes dades representen un recurs per a la comunitat d'investigadors que estudien aquestes malalties.

3. Noves eines i tècniques: hem generat un nou mètode basat en CRISPR-Cas9 per permetre l'edició de gens en neoplàsies de cèl·lules B com l'LLC.

4. Diversos FT identificats en aquest estudi representen unes dianes terapèutiques excel·lents, que constituïran la base per desenvolupar inhibidors específics com a noves teràpies potencials.

4. Bibliografia científica generada

Articles publicats o en revisió

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 revisió.

A més d'aquests articles, estem elaborant dos manuscrits més derivats del projecte i que enviarem en el tercer i quart trimestres del 2024.

Presentacions en congressos

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.* (*Autors cosènior i de correspondència.)

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 (Espanya), del 13 al 16 de juny de 2024. Presentació 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-Enériz E, Agirre X, Prósper F.

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

EHA 2024. Madrid (Espanya), del 13 al 16 de juny de 2024. Pòster.

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 (Espanya), del 13 al 16 de juny de 2024. Pòster.

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 (Estats Units), del 9 al 12 de desembre de 2023. Pòster.

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 (Espanya), del 26 al 28 d'octubre de 2023. Comunicació 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. Nova Orleans (Estats Units), del 10 al 13 de desembre de 2022. Pòster.