

Estudio de la etiología de la leucemia linfoblástica aguda con el objetivo de establecer nuevas estrategias terapéuticas y profilácticas

ALBERTO MARTÍN LORENZO

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA-CSIC

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

Salamanca, 2017

El trabajo recogido en la presente tesis doctoral ha dado lugar a la elaboración de 2 artículos científicos:

Infection exposure is a causal factor in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia as a result of Pax5-inherited susceptibility. **Alberto Martín-Lorenzo**^{*}, Julia Hauer^{*}, Carolina Vicente-Dueñas^{*}, Franziska Auer, Inés González-Herrero, Idoia García-Ramírez, Sebastian Ginzl, Ralf Thiele, Stefan N. Constantinescu, Christoph Bartenhagen, Martin Dugas, Michael Gombert, Daniel Schäfer, Oscar Blanco, Andrea Mayado, Alberto Orfao, Diego Alonso-López, Javier De Las Rivas, César Cobaleda, María Begoña García-Cenador, Francisco Javier García-Criado, Isidro Sánchez-García[#] and Arndt Borkhardt[#]. **Cancer Discovery**. 2015 Dec;5(12):1328-43. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0892. Epub 2015 Sep 25.

Loss of Pax5 confers the metabolic shift essential for the development of pB-ALL as a result of BCR-ABL^{D190} susceptibility. **Alberto Martín-Lorenzo**^{*}, Franziska Auer^{*}, Lai N. Chan^{*}, Idoia García-Ramírez, Carolina Vicente-Dueñas, Inés González-Herrero, Guillermo Rodríguez-Hernández, Christoph Bartenhagen, Martin Dugas, Michael Gombert, Sebastian Ginzl, Oscar Blanco, Alberto Orfao, Diego Alonso-López, Javier De Las Rivas, María Begoña García-Cenador, Francisco Javier García-Criado, Julia Hauer, Markus Müschen[#], Isidro Sánchez-García[#] and Arndt Borkhardt[#]. **Nature Communications**. EN REVISIÓN

D. Isidro Sánchez García, investigador científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C) en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC) de Salamanca.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “**Estudio de la etiología de la leucemia linfoblástica aguda con el objetivo de establecer nuevas estrategias terapéuticas y profilácticas**”, que presenta el doctorando **D. Alberto Martín Lorenzo**, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para ser presentado ante el correspondiente tribunal y optar al título de doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Salamanca a 20 de Junio de 2017.



Fdo. Dr. Isidro Sánchez García

La investigación en nuestro laboratorio está financiada parcialmente por FEDER y por MINECO (SAF2012-32810, SAF2015-64420-R, y Red de Excelencia Consolidar OncoBIO SAF2014-57791-REDC), por el Instituto de Salud Carlos III (PIE14/00066), por el ISCIII-Plan de Ayudas IBSAL 2015 Proyectos Integrados (IBY15/00003), por la Junta de Castilla y León (BIO/SA51/15, CSI001U14, UIC-017, y CSI001U16), por la Fundación Inocente Inocente, por el ARIMMORA project (*European Union's Seventh Framework Programme* ((FP7/2007-2013) *under grant agreement no. 282891*) y por la German Carreras Foundation (DJCLS R13/26). El grupo es miembro de EuroSyStem y de DECIDE Network, financiadas por el programa FP7 de la Unión Europea.

Durante la realización de este proyecto doctoral he disfrutado de una beca predoctoral para personal investigador de la Junta de Castilla y León, cofinanciada por el Fondo Social Europeo, con referencia CSI001-13, y de una beca con cargo a la investigación (Contrato Art.83 LOU (GRIFOLS-USAL)) con referencia LBNL.

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han ayudado a lo largo de estos años, tanto en el ámbito profesional como personal, y han contribuido a que el recorrido realizado durante esta tesis doctoral haya sido más agradable y productivo.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi director, el Dr. Isidro Sánchez-García, la oportunidad que me brindó de formar parte de su laboratorio, así como por ser un ejemplo de dedicación, trabajo y lucha constante por avanzar y lograr las metas propuestas.

A todos los miembros del Laboratorio 13, presentes y pasados: Idoia, Guille, Inés, Ana, Xiomara, Carolina, Lidia, Lucía, Marcos, Isa, Ester y Fer. Muchas han sido las horas que hemos compartido, dentro y fuera del laboratorio, gracias por toda la ayuda, el apoyo y los buenos momentos vividos.

Al grupo del Prof. Arndt Borkhardt, del Hospital Universitario de Dusseldorf (Alemania): Julia, Franzi, Daniel, Sanil, Ute y al propio Arndt; por su colaboración durante estos años, así como por las ideas aportadas en nuestras reuniones científicas semestrales, que han servido para dar forma a nuestros proyectos.

Al Dr. Markus Müschen y la Dra. Linda Lai, de la Universidad de San Francisco, California (USFC) (Estados Unidos), por su colaboración en los estudios metabólicos.

Al Dr. Jesús Pérez Losada, del Centro de Investigación del Cáncer, y los miembros de su laboratorio: Adri, Aurora, Roberto y Milena, con los que hemos compartido seminarios a lo largo de todos estos años.

Al Dr. Dionisio Martín Zanca del Instituto de Biología funcional y Genómica de Salamanca y al Dr. Rafael Jiménez del departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, por su asesoramiento científico en nuestros seminarios semanales.

Al Dr. Francisco Javier García Criado y la Dra. M. Begoña García Cenador, del dpto. de Cirugía de la Universidad de Salamanca, por facilitarnos el trabajo con los ratones y por su colaboración a lo largo de estos años.

Al Dr. Alberto Orfao y a Andrea Mayado, del Centro de Investigación del Cáncer, por su colaboración y ayuda con los experimentos de medición de citoquinas en suero sanguíneo.

Al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca, por todo el esfuerzo realizado con el objetivo de facilitar nuestro trabajo. En especial a Juan, por lo mucho que se ha involucrado con nosotros y “los buenos ratos” pasados en el animalario.

Al Servicio Citometría de la Universidad de Salamanca, en especial a M^a Luz, que siempre ha estado dispuesta a ayudar y facilitar todos los estudios que hemos tenido que realizar.

Al Servicio de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer, dirigido por la Dra. Encarna Fermiñán Benito, por el procesado de las muestras de los arrays de expresión.

Al Servicio de Bioinformática del Centro de Investigación del Cáncer, en especial al Dr. Javier De Las Rivas y a Diego Alonso, por el análisis de los arrays de expresión.

Al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca, muy especialmente a la Dra. Teresa Flores y Oscar Blanco, que han llevado a cabo el procesado y análisis anatomopatológico de las muestras de ratón.

Al Dr. M. Busslinger del Research Institute of Molecular Pathology (IMP), Viena (Austria), por cedernos el modelo animal *Pax5^{+/-}*.

También querría agradecer el apoyo de mis amigos: Héctor, Miguel, Rafa, Abel, Barru, Jaime, Chemi, Pablo, Juampa, Carlos, Vidal, Vicente, Ricardo, Idoia, Guille y Adri, y a mi sobrino Jesús, que han sabido tolerar mis ausencias y siempre están ahí para hacer de los problemas una oportunidad para sonreír y disfrutar. Gracias por vuestra amistad y por los buenos momentos que aún nos quedan por compartir.

Agradecer a mis padres y a mi hermana el apoyo incondicional que me han dado desde pequeño, dejando que cometa mis errores y estando siempre a mi lado para ayudarme a volver a levantar, han reforzado mi personalidad y han hecho de mí la persona que soy hoy en día.

Por último, a Carmen. Muchas son las etapas de nuestra vida que hemos abierto y cerrado juntos, muchas son las etapas que nos quedan por vivir. Gracias por ser mi pilar en todas ellas, por tu apoyo infinito, comprensión y lo maravilloso que es compartir la vida contigo.

A mi familia y a Carmen

“Recorre los caminos de la lógica. Todo efecto tiene una causa y todo dilema,
una solución. Todos los candados tienen una llave.”

Anthony Doerr, “La luz que no puedes ver”

Índice

Índice

ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	11
1. Leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL)	11
1.1. Características de la leucemia linfoblástica aguda	11
2. Etiología de la ALL	14
2.1. Teoría de la infección como agente causal del desarrollo de ALL	18
2.2. Agentes infecciosos y B-ALL humana	20
3. Alteraciones genéticas adquiridas frente a susceptibilidad genética en B-ALL ..	23
4. Papel de <i>BCR-ABL</i> ^{p190} en la etiología de la B-ALL	25
4.1. Descubrimiento y características del oncogén <i>BCR-ABL</i>	25
4.2. Mecanismo de acción de <i>BCR-ABL</i>	27
4.3. Características de la B-ALL <i>BCR-ABL</i> positiva	28
4.4. Importancia de la utilización de modelos animales en el estudio de la B-ALL <i>BCR-ABL</i> ^{p190} positiva	31
5. Papel de <i>PAX5</i> en la etiología de la B-ALL	33
5.1. Papel de <i>PAX5</i> en el desarrollo B normal	33
5.2. Implicaciones de <i>PAX5</i> en la B-ALL	36
5.2.1. <i>PAX5</i> como evento secundario en el desarrollo de B-ALL	36
5.2.2. <i>PAX5</i> como gen de susceptibilidad al desarrollo de B-ALL	37
HIPÓTESIS DE TRABAJO	43
OBJETIVOS	47
RESULTADOS	51
1. La restricción de la expresión de <i>BCR-ABL</i> ^{p190} al compartimento <i>stem</i> induce B-ALL con baja incidencia	51
1.1. Generación del modelo murino <i>Sca1-BCR-ABL</i> ^{p190}	51
1.2. El modelo animal <i>Sca1-BCR-ABL</i> ^{p190} desarrolla B-ALL con baja incidencia	53
1.3. Las células pro-B/pre-B con defecto en <i>Pax5</i> son permisivas al desarrollo de B-ALL <i>BCR-ABL</i> ^{p190} positiva	57
2. La pérdida de <i>Pax5</i> provoca el cambio metabólico esencial para el desarrollo de B-ALL como resultado de la susceptibilidad producida por <i>BCR-ABL</i> ^{p190}	60
2.1. Generación del modelo murino <i>Sca1-BCR-ABL</i> ^{p190} + <i>Pax5</i> ^{+/-}	60
2.2. El modelo murino <i>Sca1-BCR-ABL</i> ^{p190} + <i>Pax5</i> ^{+/-} desarrolla B-ALL con alta incidencia	63
2.3. Identificación de <i>Pax5</i> como obstáculo para la selección clonal en el desarrollo de B-ALL <i>BCR-ABL</i> ^{p190} positiva	69
2.4. La reducción de la actividad de <i>Pax5</i> dirige un cambio metabólico hacia la producción de energía en células leucémicas que no expresan <i>BCR-ABL</i> ^{p190}	72
3. La exposición a la infección es un agente causal en el desarrollo de pB-ALL como resultado de la susceptibilidad proporcionada por mutaciones heredadas en <i>Pax5</i> ..	75
3.1. Generación de un diseño experimental que permita el estudio de la relación entre la exposición a la infección y el desarrollo de pB-ALL	76

3.2.	La exposición a infección provoca el desarrollo de pB-ALL en ratones <i>Pax5</i> ^{+/-}	77
3.3.	La heterozigosis en <i>Pax5</i> genera un compartimento B aberrante sensible a ausencia de IL7	85
3.4.	Estudios de secuenciación identificaron el segundo <i>hit</i> en la vía de señalización IL7R/JAK3/STAT5.....	89
3.5.	La vía de JAK puede ser una diana terapéutica en individuos con mutaciones en <i>PAX5</i> en línea germinal	97
DISCUSIÓN		105
CONCLUSIONES		115
MATERIAL Y MÉTODOS.....		119
1.	Animales utilizados en el estudio	119
2.	Análisis de citometría de flujo	119
3.	Análisis histológicos	120
4.	Extracción de DNA	120
5.	Recombinación V(D)J	121
6.	Extracción de RNA.....	122
7.	Síntesis de cDNA	122
8.	RT-PCR de BCR-ABL ^{p190}	122
9.	Análisis de <i>arrays</i> de expresión	123
10.	Análisis de enriquecimiento	123
11.	Secuenciación de DNA y preparación de las librerías	124
12.	Secuenciación	125
13.	<i>Screening</i> de delección de <i>Pax5</i>	125
14.	<i>Deep sequencing</i>	126
15.	Estudio de la actividad transcripcional de los mutantes de <i>Pax5</i>	126
15.1.	Cultivo celular	126
15.2.	Clonación de las construcciones en células Hek293T	126
15.3.	Ensayos de Luciferasa	127
16.	Estudios de <i>Western blot</i>	127
17.	Cultivos de células pro-B	128
18.	Estudios de apoptosis	128
19.	Mediciones de glucosa, lactato y ATP	128
20.	Análisis metabólicos	129
21.	Análisis de expresión de <i>Cdkn2a/Arf</i>	129
22.	Experimentos con células Ba/F3	130
22.1	Generación de Jak3 ^{R653H} murino:.....	130
23.	Estudios de proliferación celular	131
24.	Inhibidores de JAK	131
25.	Experimentos de trasplante de células de médula ósea.....	131
26.	Tratamiento pre-clínico.....	131
BIBLIOGRAFÍA		135

Abreviaturas

ABREVIATURAS

A

ALL: Leucemia linfoblástica aguda

APC: Aloficocianina

ATP: Adenosín trifosfato

B

B-ALL: Leucemia linfoblástica aguda de células B

BCR: Receptor de células B

BSAP: Proteína activadora específica de células B

C

cDNA: DNA copia

CF: Animalario convencional

CLP: Progenitor linfoide común

CML: Leucemia mieloide crónica

CMV: Citomegalovirus

CNV: Variación en el número de copias

CSC: Célula madre cancerígena

D

ddH₂O: Agua bidestilada

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ABREVIATURAS

E

EBV:	Epstein-Barr virus
ECAR:	Tasa de acidificación extracelular
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético

F

F1:	Primera generación filial
FACS:	Separación celular por activación por fluorescencia
FCS:	Suero fetal bovino
FDR:	Tasa de descubrimiento de falsos positivos
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína

G

GDP:	Guanosín difosfato
GFP:	Proteína de fluorescencia verde
GTP:	Guanosín trifosfato
GSEA:	Análisis de enriquecimiento mediante <i>gene sets</i>

H

HSC:	Célula madre hematopoyética
HS/PC:	Célula madre/progenitora hematopoyética

I

iAMP21:	Amplificación intracromosómica del cromosoma 21
Ig:	Inmunoglobulina
iRNA:	RNA de interferencia

L

LRP: Progenitor restringido a linaje linfoide

M

MACS: Separación celular por activación magnética

mRNA: RNA mensajero

N

NGS: Secuenciación de última generación

P

Pb: Pares de bases

pB-ALL: Leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PE: Ficoeritrina

PI: Ioduro de propidio

Q

qPCR: PCR cuantitativa

R

RCLB: Tampón de lisis de células rojas

RNA: Ácido ribonucleico

ABREVIATURAS

S

SDS:	Dodecil sulfato sódico
SNC:	Sistema nervioso central
SNP:	Polimorfismo de nucleótido único
SNV:	Variación de nucleótido único
SPF:	Libre de patógenos específicos

T

TK:	Timidina quinasa
------------	------------------

W

WES:	Secuenciación de todo el exoma
WGS:	Secuenciación de todo el genoma
WT:	Tipo silvestre

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL)

1.1. Características de la leucemia linfoblástica aguda

La leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés) es un tipo de leucemia muy agresivo caracterizado por una acumulación de células inmaduras de tipo blástico (linfoblastos) en la médula ósea, que impiden su correcta hematopoyesis. Dichas células blásticas son capaces de invadir otros tejidos, preferentemente sangre periférica, bazo, hígado, nódulos linfáticos y sistema nervioso central (SNC), desestructurando la arquitectura normal de dichos órganos y dificultando seriamente su función normal. Además, la ALL es una enfermedad que, en ausencia de tratamiento, tiende a desarrollarse muy rápidamente. La enfermedad cursa, generalmente, con la manifestación de algunos de los siguientes síntomas: debilidad o fatiga, fiebre o sudores nocturnos, moratones y sangrados (por ejemplo, encías sangrantes o puntos rojos en la piel), dificultad para respirar, pérdida de peso o anorexia, dolor de huesos o articulaciones, inflamación de nódulos linfáticos, hinchazón o malestar en el abdomen, e infecciones frecuentes.

Se ha estimado que en el año 2017 habrá 5.970 nuevos casos de ALL en Estados Unidos, con una estimación de la mortalidad de 1.440 casos¹. La incidencia de ALL es diferente en niños y adultos. Mientras que en niños, la ALL es el tipo de cáncer más común (representa aproximadamente el 20% de los casos de cáncer infantil), presentando un pico de incidencia entre los 2 y 5 años de edad y afectando principalmente a niños de países industrializados; en adultos representa aproximadamente el 1,2% de todos los casos de cáncer² (**Fig. 1**). Cuando la ALL es diagnosticada, se trata con quimioterapia muy agresiva que provoca efectos secundarios muy severos. El tratamiento de la enfermedad se prolonga normalmente durante 2-2,5 años y comprende 3 fases diferenciadas: inducción de la remisión, intensificación o consolidación y continuación o mantenimiento. La mayoría de los fármacos utilizados fueron desarrollados antes de los años 70. Sin embargo, sus dosis y la programación en quimioterapia combinada han sido optimizadas en función de las características de las células leucémicas a tratar³:

- Fase de inducción de la remisión: La terapia se prolonga durante 4-6 semanas y consigue erradicar la masa inicial de células leucémicas, restaurando la hematopoyesis normal en el 96-99% de los niños y 78-92% de los adultos con

ALL. La quimioterapia incluye, generalmente, glucocorticoides, vincristina y asparaginasa, con o sin antraciclina. En pacientes con B-ALL *BCR-ABL1* positiva y *BCR-ABL1 like* se utilizan inhibidores de tirosinquinasa como Imatinib o Dasatinib.

- Fase de intensificación (o consolidación): Esta fase se inicia tras la fase de inducción de la remisión y busca erradicar las células leucémicas residuales. Se utilizan altas dosis de metotrexato con mercaptopurina, así como pulsos de vincristina y glucocorticoides durante 20-30 semanas. En pacientes con B-ALL *BCR-ABL1* positiva y *BCR-ABL1 like* también se mantienen los inhibidores de tirosinquinasa.
- Fase de mantenimiento (o continuación): Dura 2 o más años y utiliza principalmente la administración diaria de mercaptopurina y semanal de metotrexato, con o sin pulsos de vincristina y dexametasona.

El trasplante alogénico de células *stem* hematopoyéticas es una opción para pacientes con subtipos de alto riesgo o enfermedad persistente⁴.

De este modo, gracias a la mejora en la administración del tratamiento, las tasas de supervivencia han mejorado y la mortalidad ha sido reducida. Sin embargo, a pesar que la tasa de curación de la ALL infantil es excelente (aproximadamente del 90%), sigue siendo la primera causa de muerte infantil por enfermedad en el mundo debido a que cerca de un 20% de los niños recae y muere por la falta de tratamientos óptimos para las recaídas³. Por otro lado, aunque la prevalencia de la ALL disminuye según aumenta la edad, los resultados del tratamiento en adultos son inferiores a los de la ALL infantil⁵. Esto se explica parcialmente debido a que los subtipos de ALL de mejor pronóstico son más frecuentes en niños que en adultos, y viceversa.

No obstante, a pesar de la mejora en la supervivencia, de acuerdo con los datos de la plataforma SEER (<https://seer.cancer.gov/>) del Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos, la incidencia de la ALL infantil se ha incrementado de 2,2 casos por cada 100.000 niños en 1975 a 4 casos por cada 100.000 niños en 2005. Este aumento podría ser debido a un mejor registro de los casos de cáncer en los últimos años, pero también a que la incidencia de esta enfermedad haya aumentado debido al estilo de vida en los países desarrollados.

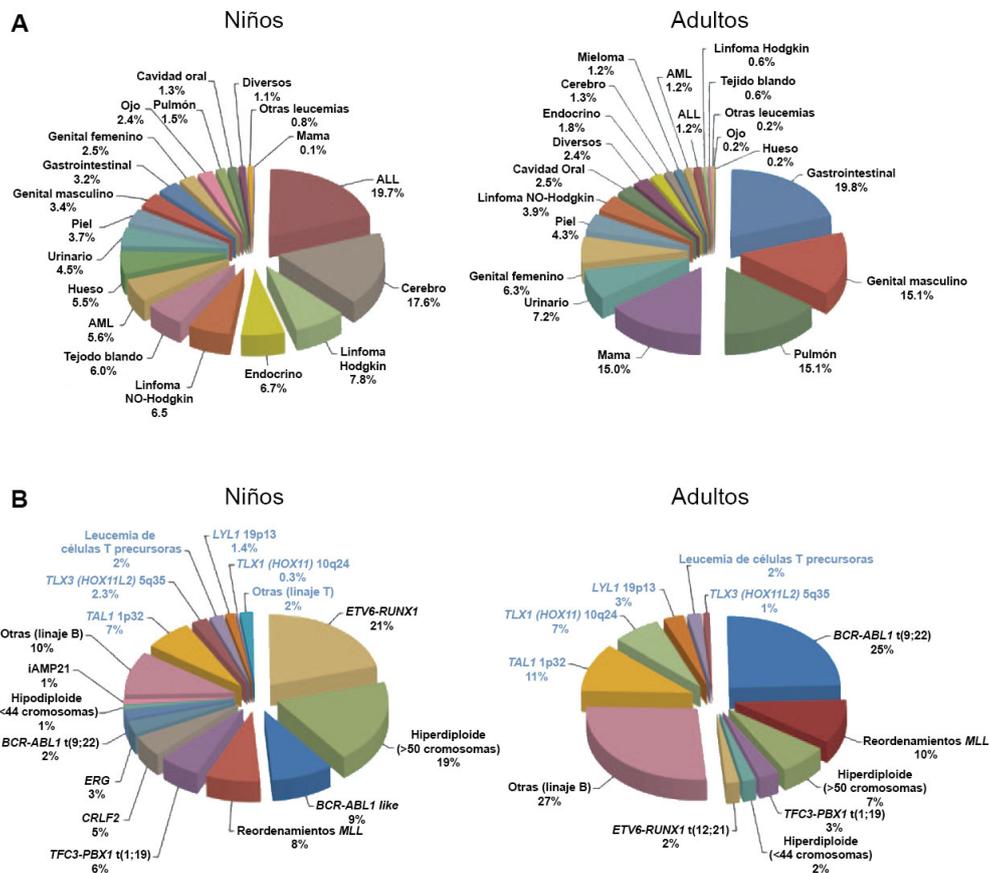


Figura 1. Frecuencia de diagnóstico de cáncer y subtipos de leucemia en niños y adultos. **A)** Frecuencia de tipos de cáncer en niños (izquierda) y adultos (derecha) en 2012 según datos SEER. **B)** Frecuencia de subtipos de ALL de linaje T (azul) y linaje B (negro) en niños (izquierda) y adultos (derecha). Adaptada de Downing JR et al.. *Nat Gen* (2012)

La percepción que no sólo factores genéticos, sino también el estilo de vida y factores ambientales, influyen en el desarrollo tumoral ha permitido el impulso de terapias preventivas que ayudan a disminuir la incidencia de ciertos cánceres. Un ejemplo de estrategias preventivas de cáncer exitosas, que implican cambios en el estilo de vida y el comportamiento, lo tenemos en el cáncer de pulmón, donde el mejor conocimiento de la etiología de esta enfermedad ha permitido conocer la relación entre el tabaquismo y el cáncer de pulmón^{6,7}. De esta forma, como terapia preventiva, se ha restringido la venta de tabaco a menores, se ha prohibido fumar en lugares públicos y han aparecido campañas de concienciación contra el tabaquismo. Por otro lado, un ejemplo de relación entre la detección precoz de células premalignas y la disminución de la incidencia de cáncer lo encontramos en el cáncer de colon, donde gracias a estudios de detección precoz que permiten detectar pólipos pre-tumorales, estos pueden ser eliminados antes

de evolucionar a un estadio maligno⁸. Así, un mejor conocimiento de la etiología de la ALL permitirá desarrollar nuevas terapias preventivas que ayuden a evitar el desarrollo de la enfermedad, principal causa de muerte infantil por enfermedad en el mundo.

Por todo ello, las estrategias preventivas son claramente superiores a cualquier mejora en el tratamiento. Las exposiciones ambientales han sido objeto de muchos estudios epidemiológicos con el objetivo de determinar el papel de la infección, la cercanía a plantas de energía nuclear, la irradiación terrestre y otros muchos posibles factores ambientales en la etiología de la ALL. Así, el estudio de la etiología de la enfermedad permitirá un mejor desarrollo de estrategias profilácticas que permita la mejora de la detección precoz e, incluso, la prevención del desarrollo de la ALL.

2. Etiología de la ALL

A la hora de estudiar la etiología de la ALL, debemos tener en cuenta que el desarrollo de la enfermedad parece producirse como consecuencia de una combinación entre factores de riesgo genéticos (predisposición genética y susceptibilidad genética) y factores de riesgo ambientales.

En cuanto a los factores de riesgo genéticos, se ha postulado que la B-ALL es un proceso multietapa³, que ocurriría de la siguiente manera: las células madre hematopoyéticas o células progenitoras linfoides adquieren el evento oncogénico inicial (por ejemplo, las translocaciones *ETV6-RUNX1* o *BCR-ABL1*), que confiere propiedades de auto-renovación a dichas células. Se ha propuesto que dicho evento oncogénico inicial tiene un papel dominante durante el desarrollo de la enfermedad. Además, los individuos podrían tener mutaciones heredadas que confieran susceptibilidad al desarrollo de B-ALL (como mutaciones en *IKZF1* o *PAX5*). Sin embargo, estos eventos iniciales o mutaciones heredadas no son capaces de inducir el desarrollo de la enfermedad por sí solos. De este modo, alteraciones en genes que codifican para factores de transcripción de células B (como *EBF1*, *PAX5*, etc.) o lesiones en genes involucrados en el desarrollo de células B, como alteraciones en *RAG*, provocarían una parada en el desarrollo de células B que, junto con otros eventos cooperantes (alteraciones en supresores tumorales, quinasas, etc.), desencadenarían el inicio del desarrollo de la B-ALL. Cuando la enfermedad es diagnosticada, el

tratamiento quimioterápico provocaría una presión selectiva, que seleccionaría aquellos subclones que presenten alteraciones genéticas que confieran resistencia frente al tratamiento. De este modo, dichos clones serán los responsables de las recaídas tras la retirada del tratamiento (**Fig. 2**).

Según esta hipótesis del desarrollo de B-ALL como proceso multietapa, para que se produzca el desarrollo de ALL deben ocurrir al menos 2 *hits*. El primer *hit* en leucemia infantil podría ocurrir en el útero (translocación cromosómica), seguido de un segundo *hit* que ocurre tras el nacimiento y da lugar al inicio del desarrollo de la enfermedad. Es importante tener en cuenta que el primer *hit* está presente en recién nacidos con una frecuencia que es 100 veces mayor que el riesgo de desarrollar la enfermedad⁹. Similar proporcionalidad se puede aplicar a otros tumores infantiles, como los tumores de Wilms o el neuroblastoma, indicando que esta iniciación prenatal de los tumores pediátricos podría ser muy común, pero la transformación a enfermedad manifiesta es un evento poco habitual¹⁰. Esto sugiere que el evento inicial genera susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad y no predisposición, pues necesita alteraciones secundarias para desencadenar el desarrollo de B-ALL.

Además, debemos tener en cuenta que, en los procesos cancerígenos, un mosaico de células tumorales compite por el espacio y los recursos, por evadir su eliminación por el sistema inmune, y pueden cooperar para dispersarse y colonizar otros tejidos. Por ello, el estudio evolutivo de las células tumorales podría explicar por qué tenemos cáncer y por qué es tan difícil de eliminar¹¹. El concepto de cáncer como un proceso evolutivo dirigido por una secuencia de mutaciones somáticas multietapa con selección subclonal fue propuesto por primera vez por Peter Nowell en 1976¹². Este proceso sería equivalente a la selección natural Darwiniana (los clones tumorales representarían los equivalentes de las especies en la teoría de Darwin). Las mutaciones producidas en las células tumorales generarán una variación heredable que confiere ventajas o desventajas a las células hijas. De esta forma, se seleccionarán las células tumorales mejor adaptadas. Gracias a las nuevas técnicas genómicas, la selección Darwiniana en cáncer ha sido validada¹¹. Debido a la competencia por el espacio y los recursos de cada clon individual y su progenie (subclones) en cada etapa de esta evolución, los análisis mutacionales de células individuales (idealmente en muestras seriadas) son el camino más apropiado para examinar la arquitectura clonal del cáncer. Hasta la fecha, la evidencia de la segregación clonal de mutaciones ha sido demostrada en leucemia linfoblástica aguda^{13,14}, así como en cáncer de mama¹⁵, lesiones metastásicas¹⁶ y en algunos casos de cáncer testicular bilateral¹⁷. Por último, hemos de tener en cuenta que

el tratamiento del cáncer puede ejercer una presión selectiva sobre los clones tumorales. Debido a la alta tasa de muerte celular como resultado del tratamiento, serán seleccionados aquellos clones capaces de resistir la terapia^{18,19}. Además, estudios en ALL han demostrado que subclones ancestrales que no son responsables del desarrollo de la ALL primaria, pueden ser responsables de las recaídas que se producen tras el tratamiento²⁰. Estos estudios demuestran que las alteraciones genómicas responsables de la recaída son seleccionadas durante el tratamiento.

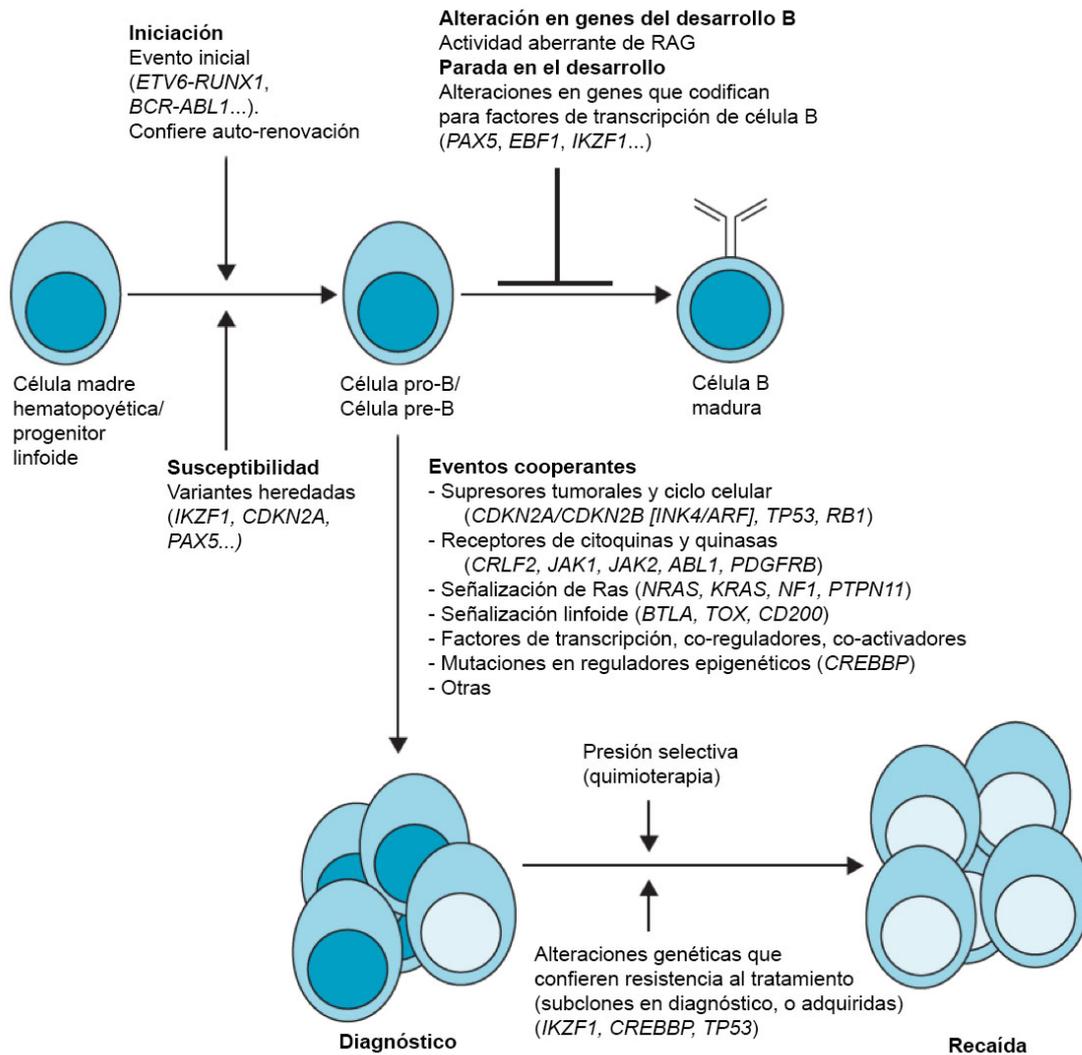


Figura 2. Concepto de B-ALL como enfermedad multietapa.
Adaptada de Inaba H et al. *Lancet* (2013)

La ALL, como el cáncer en general, probablemente surja por interacciones entre exposiciones exógenas o endógenas, la susceptibilidad genética y el azar. Por tanto, el reto radica en un mejor conocimiento de esas interacciones para identificar las exposiciones y modificaciones genéticas relevantes en el desarrollo de la enfermedad, contribuyendo de manera directa en el proceso multietapa que da lugar al desarrollo de la ALL, desde su iniciación (posiblemente en el útero) hasta su evolución a enfermedad manifiesta. A su vez, la alta toxicidad y efectos secundarios del tratamiento de la ALL hacen que una mejor comprensión de la etiología de la enfermedad permita conocer los mecanismos que implican el desencadenamiento de la misma. De esta forma, podrían desarrollarse tratamientos preventivos que evitasen los efectos adversos que se observan tras el tratamiento de la enfermedad.

Además de los factores genéticos, muchos han sido los factores ambientales propuestos como posibles contribuyentes en el desarrollo de ALL¹⁰. Numerosos trabajos epidemiológicos han estudiado la posible relación entre factores ambientales y desarrollo de B-ALL. Sin embargo, pocos de los factores ambientales propuestos han podido ser demostrados con datos reproducibles y biológicamente consistentes.

El único factor ambiental reconocido y probado en su contribución al desarrollo de la ALL es la radiación ionizante. Dicha asociación fue demostrada gracias a estudios de caracterización de ALL en niños que estuvieron expuestos a altos niveles de radiación ionizante tras la bomba atómica de 1945 en Japón²¹ y el débil, pero significativo, incremento en el riesgo de desarrollar ALL asociado a la exposición a rayos X durante el embarazo²².

La exposición a campos electromagnéticos no ionizantes ha sido especial objeto de controversia. Sin embargo, hasta la fecha, no ha habido evidencias suficientes para probar un incremento en el riesgo de desarrollar ALL^{23,24}.

En cuanto al orden de nacimiento, se propuso que el riesgo de desarrollar ALL disminuye con el orden de nacimiento. Por tanto, el mayor riesgo lo poseería el primer nacido²⁵, aunque los estudios realizados teniendo en cuenta el orden de nacimiento han mostrado resultados inconsistentes²⁶.

La lactancia prolongada ha sido asociada con una leve protección frente al desarrollo de ALL. No obstante, no todos los estudios realizados confirman este hecho²⁶.

El sobrepeso al nacimiento parece estar ligado a un mayor riesgo de desarrollar ALL, con varios estudios soportando esta hipótesis²⁷.

En cuanto a la vacunación en la infancia, podría esperarse que tuviera algún efecto en el riesgo de desarrollo de ALL debido a que, en general, produce una modulación del sistema inmune que podría provocar posibles respuestas aberrantes en ciertos individuos. Sin embargo, los estudios realizados acerca de la posible implicación de la vacunación en el desarrollo de la enfermedad han mostrado resultados contradictorios^{26,28}.

Otros posibles factores ambientales que podrían influir en el desarrollo de ALL y sobre los que, tras estudios epidemiológicos, hay una gran controversia sobre su implicación, son: El consumo de alcohol de los padres, la exposición o consumo de tabaco de los padres, la dieta de la madre durante el embarazo o la exposición a pesticidas o solventes²⁹.

Quizá, las infecciones han sido los mayores candidatos como agentes causales del desarrollo de ALL. Así, ha sido estudiada la relación entre asistencia a guardería y desarrollo de la enfermedad, teniendo en cuenta que los niños que han ido a la guardería habrían estado expuestos a agentes infecciosos desde edades tempranas, pudiendo provocar posibles respuestas inmunológicas aberrantes en ciertos individuos. Sin embargo, estos estudios también muestran resultados contradictorios^{26,30}. Por ello, en la siguiente sección, profundizaremos en la posible relación causal entre la exposición a infección y desarrollo de ALL.

2.1. Teoría de la infección como agente causal del desarrollo de ALL

La posible relación causal entre las infecciones y desarrollo de ALL fue propuesta por primera vez en 1917 por G. Ward³¹. En 1942, J.V. Cooke estudió los antecedentes infecciosos de niños que habían desarrollado ALL, observando que era bastante común que los niños hubieran sufrido procesos infecciosos (como sarampión, infecciones respiratorias, etc.) previos o coincidentes con el desarrollo de la leucemia³². Estas observaciones apoyaron la idea que las infecciones podrían jugar un papel importante en el desarrollo de ALL.

En 1988, dos hipótesis fueron propuestas postulando que las infecciones podrían ser un importante factor causal del desarrollo de ALL: (1) La hipótesis de “mezcla de poblaciones” de Leo Kinlen³³ y (2) la hipótesis de “la exposición tardía” de Mel Greaves³⁴ (**Fig. 3**).

Kinlen propuso que un incremento de leucemia infantil sería visto en lugares donde ha habido una inusual mezcla de poblaciones (como lugares industriales, a los que llegó un gran flujo de población durante la revolución industrial). El agente que predispondría al desarrollo de la enfermedad sería una infección débil y el desarrollo de ALL se debería a una respuesta aberrante del sistema inmune a este agente infeccioso. Dicha respuesta podría ser debida a que, en las poblaciones relativamente aisladas, los individuos no habrían estado expuestos a este agente infeccioso. De este modo, el flujo de poblaciones que se produjo durante la revolución industrial, habría hecho que los recién llegados a las zonas industriales no hubieran estado expuestos previamente a agentes infecciosos de estas nuevas zonas, desencadenando así el desarrollo de leucemia que fue observado por los clústeres de ALL que aparecieron en zonas cercanas a los nuevos lugares de trabajo.

Por su parte, Greaves propuso que el desarrollo de ALL es consecuencia de, al menos, dos mutaciones independientes. La primera ocurriría en el útero o muy pronto tras el nacimiento y generaría un clon pre-leucémico. La segunda mutación ocurriría más tarde y sería la responsable del inicio de la leucemia manifiesta. Greaves sugirió que las infecciones promoverían la aparición de la segunda mutación y/o la proliferación celular. Además, propuso que la exposición tardía a la infección incrementaría el riesgo de desarrollar ALL.

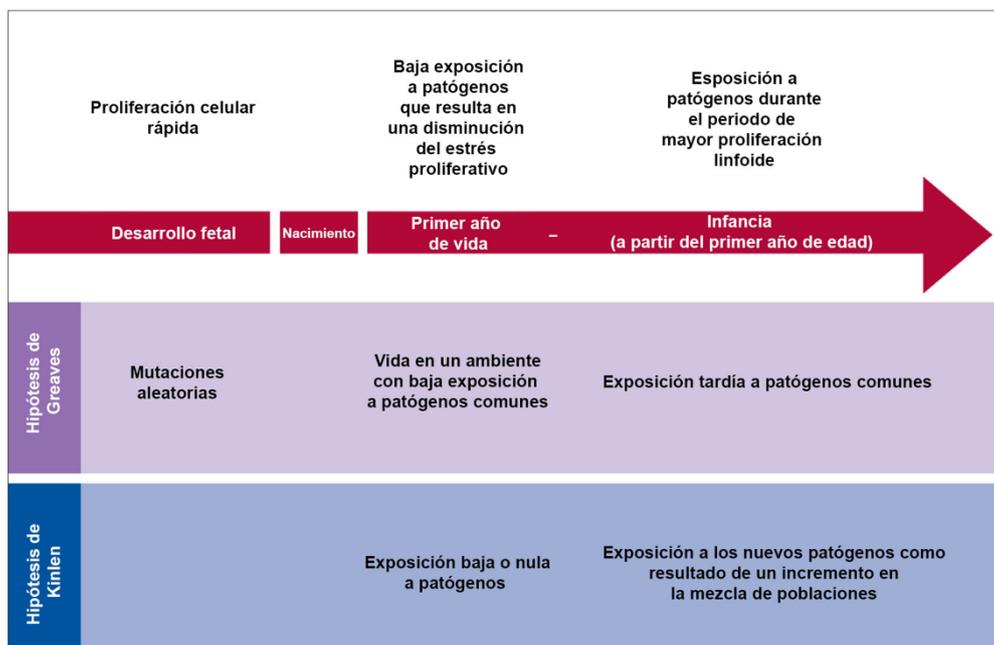


Figura 3. Teorías que relacionan la exposición a infecciones con el desarrollo de B-ALL. Adaptada de Pui CH et al. *Lancet* (2008)

Aunque ambas hipótesis difieren en pequeños detalles y en el hipotético mecanismo que da lugar al desarrollo de ALL, ambas coinciden en postular que este desarrollo es la consecuencia de una respuesta anormal a las infecciones comunes¹⁰. Ambos estudios sugieren que la falta de exposición a infecciones en la vida postnatal debido a los “ambientes limpios” de las sociedades desarrolladas podría predisponer al sistema inmune a tener respuestas aberrantes o patológicas tras la exposición “retardada” de los niños a infecciones comunes.

Muchos han sido los estudios epidemiológicos que han estudiado la posible relación entre la exposición a infección y el desarrollo de B-ALL. Sin embargo, dichos estudios siempre han sido descriptivos y hay mucha variabilidad entre las conclusiones de los mismos. Por ello, no hay evidencias científicas que apoyen que la exposición a infección podría causar ese segundo *hit* relacionado con el desarrollo de ALL, que se sumaría a una iniciación prenatal¹⁰.

2.2. Agentes infecciosos y B-ALL humana

Ha sido publicado que la infección con algunos virus de DNA, principalmente Adenovirus y Herpes virus, interfiere con los mecanismos celulares de reparación de daño a DNA^{35,36} y podrían, por tanto, jugar un papel en el desarrollo de B-ALL. Para determinar si una infección prenatal podría jugar un papel en el desarrollo de la enfermedad, se han realizado diversos estudios que analizan la posible presencia de secuencias virales en DNA de sangre de recién nacidos. Dichos estudios no han mostrado una asociación directa entre Polyomavirus³⁷, Herpes virus³⁸, Parvovirus B19³⁹ y desarrollo de B-ALL. Sin embargo, un estudio realizado con Adenovirus C, parece mostrar una posible asociación con una mayor presencia de Adenovirus C en DNA de sangre de recién nacidos que después desarrollaron B-ALL⁴⁰. Dichos resultados mostraron que habría 5 veces más posibilidades de encontrar secuencias de Adenovirus C en sangre de recién nacidos que años más tarde desarrollaron B-ALL, que en la sangre analizada tras el nacimiento de niños que nunca desarrollaron la enfermedad. Sin embargo, esta asociación no muestra ninguna evidencia directa de la causalidad de la infección en el desarrollo de B-ALL, por lo que es necesaria más investigación para esclarecer el posible papel de la infección con Adenovirus C en el desarrollo de la enfermedad.

El Citomegalovirus (CMV) ha sido otro de los agentes infecciosos objeto de estudio. El CMV podría ser un buen candidato por 2 razones: (1) Ha sido publicado que la infección por CMV provoca inestabilidad cromosómica⁴¹ y, (2) el CMV tiene la secuencia

genómica más grande de todos los virus humanos conocidos y, en ella, presenta varios genes relacionados con la evasión inmune⁴². Estudios epidemiológicos han mostrado resultados contradictorios cuando abordan la pregunta de si el CMV podría estar asociado con el desarrollo de B-ALL. Un estudio realizado en el año 2006 por B. Gustafsson y colaboradores afirma que la infección prenatal con CMV parece no estar asociada con el desarrollo de B-ALL⁴³. Sin embargo, en el año 2016, ha sido publicado un nuevo estudio que encuentra una asociación positiva entre las infecciones prenatales con CMV y el posterior desarrollo de B-ALL⁴². Por tanto, de nuevo, son necesarias investigaciones adicionales para establecer el posible papel de la infección con CMV en el desarrollo de B-ALL.

Este mismo año (2017), ha sido publicado que podría haber una correlación entre la infección con Epstein-Barr virus (EBV) y la incidencia de leucemia aguda. Este estudio describe como los niños que desarrollaron leucemia aguda tenían una mayor tasa de infección por EBV que los controles sanos. Además, observaron que el ratio de infección con EBV es mayor en B-ALL que en T-ALL⁴⁴. Sin embargo, estudios previos habían manifestado resultados opuestos³⁸. Por tanto, una vez más, son necesarios nuevos análisis que puedan esclarecer la posible implicación de la infección con EBV en el desarrollo de B-ALL.

Un estudio publicado en *Lancet Oncology*⁴⁵, que utiliza datos del servicio de salud Taiwanés, ha estudiado la posible relación entre las infecciones por Enterovirus y el riesgo de desarrollo de B-ALL. Dicho estudio afirma que las infecciones por Enterovirus reducen el riesgo de desarrollar B-ALL a la mitad. Estos resultados, según los autores, apoyarían la hipótesis de infección tardía de M. Greaves³⁴. Sin embargo, debido a que los datos han sido extraídos del estudio de una población muy restringida, son necesarios estudios adicionales que confirmen dicha afirmación⁴⁶.

Quizá, el virus de la gripe (influenza H1N1) ha sido uno de los agentes víricos más estudiados en la búsqueda de una relación entre infección y desarrollo de B-ALL. Un ejemplo es el trabajo recientemente publicado por G. Cazzaniga y colaboradores, quienes han observado que, en los alrededores de Milán, ha habido un clúster de B-ALL, y han estudiado la posible causalidad infecciosa⁴⁷. Los investigadores observaron que, entre 3 y 6 meses antes de que aparecieran los casos de B-ALL, hubo una epidemia de gripe en la zona. Realizaron estudios serológicos que revelaron que todos los niños que desarrollaron B-ALL fueron seropositivos para el virus AH1N1. Por ello, este trabajo

afirma que podría haber una relación entre la infección por AH1N1 y el desarrollo de B-ALL.

En cuanto a la posible relación entre la presencia de parásitos y el riesgo de desarrollar B-ALL, se ha estudiado una posible relación entre *Toxoplasma gondii* y riesgo a desarrollo de leucemia. Un meta-análisis, que incluye datos de 6 análisis publicados previamente, ha establecido que podría haber relación entre el incremento en el desarrollo de leucemia y la infección por *Toxoplasma gondii*⁴⁸.

Todos los trabajos previamente comentados son estudios epidemiológicos, que únicamente intentan establecer una correlación entre el agente infeccioso de estudio y el riesgo de desarrollar ALL, sin tener en cuenta los mecanismos moleculares que podrían desencadenar ese posible riesgo. Tratando de arrojar luz sobre los mecanismos moleculares, se publicó un estudio realizado por Mackenzie y colaboradores⁴⁹. En dicho estudio, analizaron el DNA de células leucémicas buscando la inserción de secuencias virales exógenas, no encontrándolas en el DNA de las células leucémicas. Estos resultados negativos sugieren que una transformación oncogénica debida a la inserción viral es poco probable, haciendo más plausible la posibilidad que dicha transformación se produzca por la activación de un mecanismo inmunológico indirecto. En línea con este trabajo, en 2016 fue publicado un nuevo análisis que estudió el viroma en células sanguíneas de niños que más tarde desarrollaron ALL⁵⁰, concluyendo que, a pesar de identificar varios virus candidatos, estos no juegan un papel importante en el desarrollo de ALL. Por último, un estudio recientemente publicado por el grupo del Prof. A. Borkhardt utilizando NGS (del inglés, secuenciación de última generación), siendo así posible detectar secuencias víricas muy pequeñas, ha concluido que algunos patógenos humanos comunes son detectados en la mayoría de los casos de B-ALL. Sin embargo, dichos patógenos fueron también encontrados en frecuencias similares en el grupo control, lo que indica, una vez más, que la integración viral en el DNA no es la causante de la transformación oncogénica.

Todos estos resultados sugieren que la exposición a la infección, y no la integración viral, podría ser la responsable del desarrollo de B-ALL mediante una activación aberrante del sistema inmune.

3. Alteraciones genéticas adquiridas frente a susceptibilidad genética en B-ALL

Centrándonos en los factores de riesgo genéticos, el estudio de la etiología de la B-ALL ha puesto de manifiesto que hay 2 grandes grupos de factores de riesgo asociados al desarrollo de B-ALL: factores que confieren predisposición genética y factores que confieren susceptibilidad genética.

Entendemos por predisposición genética la relación directa entre el desarrollo de B-ALL y la existencia de alteraciones oncogénicas en el genoma. A dichas alteraciones se les ha atribuido un papel de *driver* en el desarrollo de la enfermedad. En contraposición, la susceptibilidad genética es el pequeño incremento en el riesgo que tiene un individuo de desarrollar B-ALL debido a la existencia de variantes génicas heredadas. Dichas variantes crean una susceptibilidad que hace que, en presencia de una alteración secundaria tipo *driver*, el individuo desarrolle leucemia.

Hablaremos primero de las alteraciones que han sido calificadas como dominantes o *drivers* en el desarrollo de B-ALL. Así, los diferentes subtipos de B-ALL pueden ser clasificados atendiendo a sus características moleculares. Gracias a estudios de secuenciación y de perfil genómico, el conocimiento de estas características moleculares ha avanzado mucho en los últimos años, permitiendo no sólo profundizar en el conocimiento de las características genómicas de cada subtipo, sino también en el conocimiento de las bases genómicas de la heterogeneidad clonal de la ALL y de las recaídas. Teniendo en cuenta las diferentes alteraciones genéticas adquiridas, se han identificado los siguientes subtipos de B-ALL atendiendo a las alteraciones cromosómicas recurrentes que pueden presentar: *ETV6-RUNX1* t(12;21), ALL hiperdiploide (>50 cromosomas), ALL *BCR-ABL1 like*, reordenamientos *MLL*, *TCF3-PBX1* t(1;19), *CRLF2*, *ERG*, *BCR-ABL1* t(9;22), ALL hipodiploide (<44 cromosomas), *iAMP21* y otras (sin alteraciones cromosómicas conocidas) (**Tabla 1**). La incidencia de los diferentes subtipos de B-ALL difiere entre niños y adultos. El subtipo más común de ALL infantil es *ETV6-RUNX1*, representando aproximadamente el 21% de los casos de ALL infantil; mientras que en adultos, el subtipo más común es *BCR-ABL1*, representando aproximadamente el 25% de los casos de ALL adulta² (**Fig. 1**).

Sin embargo, a pesar de que se les ha atribuido un papel dominante, estas alteraciones cromosómicas no son capaces de desencadenar el desarrollo de ALL por sí solas, sino que necesitan la presencia de alteraciones secundarias que desencadenen el inicio del desarrollo de la enfermedad. Comparada con otros tipos de tumores, la ALL presenta

una tasa de mutaciones relativamente baja. Las deleciones son más comunes que la amplificación, e involucran generalmente a un único gen. Entre los genes que aparecen mutados de forma recurrente, se encuentran genes involucrados en importantes vías de señalización, como: (1) factores de transcripción (*IKZF1*, *PAX5*, *EBF1*, *ETV6*...), (2) supresores tumorales y reguladores del ciclo celular (*TP53*, *RB1*, *CDKN2A/CDKN2B*...), (3) señalización de receptores de citoquinas (*CRLF2*, *IL7R*, *EPOR*), quinasas (*ABL1*, *ABL2*, *JAK2*...) y Ras (*KRAS*, *NRAS*, *PTPN11*...); (4) señalización linfoide (*BTLA*, *CD200*) y (5) modificadores epigenéticos (*EZH2*, *CREBBP*, *SETD2*...) ⁵¹. Estudios de secuenciación genómica han determinado que las alteraciones secundarias más comunes ocurren en genes que codifican para factores de transcripción involucrados en la diferenciación de linfocitos B (por ejemplo: *IKZF1* o *PAX5*), apareciendo en aproximadamente un 40% de las B-ALLs ⁵².

Tabla 1. Alteraciones citogenéticas presentes en B-ALL.

Subtipo	Características	Referencia
<i>ETV6-RUNX1</i> t(12;21)	Pronóstico excelente. Alteración cromosómica más frecuente en B-ALL infantil.	53
ALL hiperdiploide (>50 cromosomas)	Buen pronóstico.	54
<i>BCR-ABL1</i> like	Varias lesiones en receptores de citoquinas y mutaciones activantes de quinasas. Asociadas con alteraciones en <i>IKZF1</i> . Tratable con inhibidores de tirosinquinasa.	55
reordenamientos <i>MLL</i>	Mal pronóstico. Común en ALL infantil.	56
<i>TCF3-PBX1</i> t(1;19)	Generalmente buen pronóstico. Asociada a recaídas de SNC.	57
<i>CRLF2</i>	Común en ALL asociada a Síndrome de Down y Ph-Like (50%). Asociada con deleción de <i>IKZF1</i> y mutaciones en <i>JAK1</i> y <i>JAK2</i> . Mal pronóstico en ALL no asociada a Síndrome de Down.	58
<i>ERG</i>	Asociada a alteraciones en <i>IKZF1</i> . Generalmente buen pronóstico.	55
<i>BCR-ABL1</i> t(9;22)	Históricamente asociada a mal pronóstico. Su pronóstico mejoró con la aparición de inhibidores de tirosinquinasa.	59
ALL hipodiploide (<44 cromosomas)	Mal pronóstico. Alta frecuencia de mutaciones en la vía de <i>RAS</i> , familia <i>IKAROS</i> y <i>TP53</i> .	60

En relación a la susceptibilidad genética, ha habido evidencias limitadas del papel de la susceptibilidad heredada en el desarrollo de ALL. Estas evidencias provienen de estudios de ALL familiar y estudios de la concordancia en el desarrollo de la enfermedad en gemelos, atribuida a la transmisión intrauterina de los clones leucémicos⁶¹. Sin embargo, un mejor conocimiento de los perfiles genómicos de la ALL ha permitido identificar variantes genómicas heredadas que confieren un mayor riesgo de desarrollar ALL. Estudios recientes han asociado un mayor riesgo de desarrollar ALL en individuos que poseen mutaciones heredadas en genes como: *CDKN2A*⁶², *ETV6*⁶³⁻⁶⁵, *TYK*⁶⁶ o *PAX5*^{67,68}. En estos individuos podría ser posible que la relación entre factores ambientales y la susceptibilidad genética al desarrollo de B-ALL provocada por las mutaciones heredadas, sea la responsable del desarrollo de la enfermedad.

En el presente trabajo de tesis doctoral, hemos estudiado *BCR-ABL*^{p190} como modelo de alteración genética adquirida que confiere predisposición al desarrollo de B-ALL. Para estudiar la posible relación entre factores ambientales y alteraciones genéticas que confieren susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad hemos utilizado como modelo *Pax5*. Así, en las siguientes secciones de la introducción, hablaremos del papel de *BCR-ABL*^{p190} y *PAX5* en la etiología de la B-ALL.

4. Papel de *BCR-ABL*^{p190} en la etiología de la B-ALL

4.1. Descubrimiento y características del oncogén *BCR-ABL*

El gen de fusión *BCR-ABL* (también llamado cromosoma Filadelfia) es el producto de la translocación t(9;22)(q34;q11). El producto génico de esta translocación fue descubierto en 1960 por Peter Nowell (Escuela de Medicina de la Universidad de Pensilvania) y David Hungerford (Fox Chase Cancer Center, Filadelfia)⁶⁹, siendo la primera translocación descubierta asociada a un tipo específico de leucemia. Trece años después se observó que, el denominado cromosoma Filadelfia, era el resultado de la translocación t(9;22)⁷⁰. Fue en 1983 y 1984, cuando se determinó que dicha translocación involucraba al proto-oncogén *ABL* situado en el cromosoma 9⁷¹ y a un gen, previamente desconocido, al que llamaron *BCR* (*Breakpoint cluster region*)⁷².

Finalmente, en 1990, fue descrito que el mecanismo por el cual BCR-ABL es capaz de transformar las células era debido a una activación constitutiva de la quinasa ABL⁷³.

Se ha observado que existen 3 isoformas diferentes del gen de fusión *BCR-ABL* (p190, p210 y p230). Dichas isoformas se generan en función del sitio en que se produzca el punto de rotura en el gen *BCR*. Como hemos comentado anteriormente, el gen *BCR* se encuentra en el cromosoma 22 y en él se distinguen tres regiones diferentes que pueden estar implicadas en la translocación:

- Región mayor (M-BCR): situada entre los exones 12 y 16 (exones b1-b5).
- Región menor (m-BCR): situada entre los exones e2' y e2.
- Microrregión (μ -BCR): situada en el exón 19.

Los puntos de rotura más frecuentes en el gen *BCR* se localizan en los exones 1(e1), 12(b2), 13 (b3) y 19 (e19). En el gen *ABL* el punto de rotura se produce habitualmente en el exón 2 (a2). De esta forma se generan los reordenamientos e1a2, b2a2 o b3a2 y e19a2 que se corresponden a las proteínas de fusión BCR-ABL^{p190}, BCR-ABL^{p210} y BCR-ABL^{p230}, respectivamente⁷⁴ (**Fig. 4**).

Cada isoforma muestra una asociación preferencial, pero no exclusiva, con un tipo diferente de leucemia: BCR-ABL^{p190} con leucemia linfoblástica aguda (ALL), BCR-ABL^{p210} con leucemia mieloide crónica (CML) y BCR-ABL^{p230} con leucemia mieloide crónica neutrófila (CML neutrófila)⁷⁵.

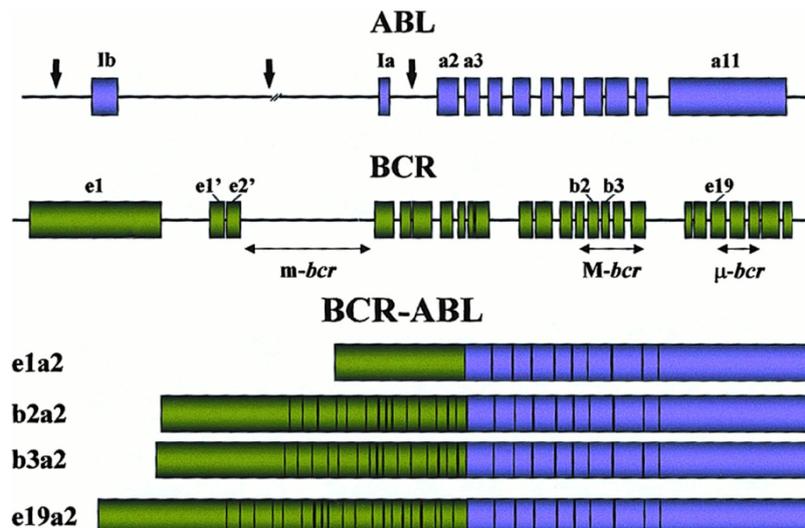


Figura 4. Localización de los puntos de rotura de los genes *BCR* y *ABL* y estructura del mRNA derivado de dichas roturas.

Adaptada de Deininger MW et al. *Blood* (2000)

4.2. Mecanismo de acción de BCR-ABL

La consecuencia de la formación de la proteína de fusión BCR-ABL es la activación constitutiva de la actividad quinasa ABL, de esta forma se favorece su dimerización o tetramerización y su sucesiva autofosforilación. Gracias a la autofosforilación se produce un incremento de residuos de tirosina fosforilados en BCR-ABL que permiten el aumento de sitios de unión de dominios SH2 de otras proteínas^{76,77}. Además, se ha observado que la fosforilación de la tirosina 177 es clave en el desarrollo de la leucemia mediada por BCR-ABL⁷⁸.

La interacción de BCR-ABL con otras moléculas citoplasmáticas lleva a la desregulación de procesos celulares clave. Por ejemplo, la alteración de la ruta de las MAP quinasas lleva a una proliferación descontrolada, la interacción con la vía JAK-STAT impide la actividad transcripcional, o la interacción con la vía PI3K/AKT desencadena un incremento de la apoptosis⁷⁷.

Cuando BCR-ABL interacciona con otras proteínas citoplasmáticas, que actúan como moléculas adaptadoras, se produce la formación de complejos de señalización multiproteína. La proteína GRB2 se une a BCR-ABL por su dominio SH2 formando un complejo que es capaz de reclutar a la proteína SOS. El complejo BCR-ABL/GRB2/SOS estimula la conversión de la forma de RAS inactiva (unida a GDP) por la forma activa (unida a GTP) y la activación de GAB2^{77,79}. Como consecuencia, el complejo GRB2/GAB2/SOS activa de forma constitutiva la vía de RAS, activando a ERK1/2 y otras MAP quinasas, provocando una proliferación celular exacerbada. Por otra parte, este complejo es capaz de activar la ruta PI3K/AKT⁸⁰.

La activación de PI3K por BCR-ABL puede darse por diferentes vías. Además de la mencionada en el párrafo anterior, BCR-ABL es capaz de activar PI3K gracias a la interacción con CRK y CRLK⁸¹. Una vez activada, PI3K activa AKT, el cual ejerce de efector fosforilando sustratos que están involucrados en apoptosis (MDM2, CASPASA 9, BAD, etc.), lo cual resulta en un aumento de la supervivencia celular⁸². Gracias a la vía PI3K/AKT, que desencadena la activación de mTOR, BCR-ABL también es capaz de bloquear la autofagia⁷⁷.

Entre los factores de transcripción que están involucrados en la señalización de BCR-ABL se encuentran STAT1 y STAT5. Se ha observado que ambos están activados de forma constitutiva en líneas celulares BCR-ABL positivas y células primarias de pacientes con CML⁸³. Parece que los efectos de la activación de STAT1/5 por BCR-ABL tienen efectos anti-apoptóticos que involucran la activación de BCL-XL⁸⁴. Además,

debido a que la ruta JAK-STAT está implicada en la respuesta celular a factores de crecimiento, como la IL3 por ejemplo, la modificación de esta vía de señalización por parte de BCR-ABL confiere independencia a factores de crecimiento en células dependientes de los mismos⁸⁵.

Por último, otro gen que parece estar regulado de forma anormal por BCR-ABL es MYC. La activación de MYC parece ser independiente de la vía de RAS, siendo inducida su expresión por su unión al dominio SH2 de ABL. Además, la inhibición in vitro de MYC inhibe la capacidad transformante de BCR-ABL⁸⁶.

De las tres proteínas de fusión que se pueden generar debido a la translocación t(9;22), BCR-ABL^{p190} es la más pequeña. En ella, la proteína BCR retiene únicamente el motivo de dimerización de bobina helicoidal, el sitio de unión de GRB2 en la tirosina 177 y los dominios de unión SH, todos ellos codificados por el exón 1 del gen *BCR*. A pesar de ser la proteína más pequeña de las 3 posibles generadas por dicha translocación, es la que posee mayor actividad tirosinquinasa⁸⁵.

Recientemente, 2 grupos independientes han publicado sendos artículos en los que se han comparado las vías de señalización de BCR-ABL^{p210} y BCR-ABL^{p190}. En estos estudios han observado que las vías de señalización de ambas isoformas difieren, encontrando que hay grandes diferencias en la red de interacción de proteínas de p190 y p210^{87,88}. Mientras que el complejo adaptador AP2 interacciona preferentemente con p190, la fosfatasa Sts1 hace lo propio con p210. Otro ejemplo es la observación de una activación mucho mayor de Stat5 y Erk1/2 observada con p210, mientras que la quinasa Lyn es más activada por p190⁸⁸. Estos estudios ponen de manifiesto la posibilidad de que las diferentes isoformas de BCR-ABL estén ligadas a diferentes tipos de leucemia porque poseen una actividad quinasa diferente.

4.3. Características de la B-ALL BCR-ABL positiva

Como ya hemos comentado en el punto “1.1. Características de la B-ALL”, la translocación BCR-ABL es la alteración molecular más común en B-ALL adulta, representando un 25% de los casos², y está asociada a mal pronóstico. Una posible explicación del motivo por el que la translocación está asociada a mal pronóstico la proporciona el estudio realizado en nuestro laboratorio que observa que la edad de la célula de origen donde se produce el evento inicial BCR-ABL^{p190} afecta a la malignidad de la enfermedad⁸⁹. Dicho estudio reveló que induciendo la expresión de BCR-ABL^{p190}

en ratones de 12 o 20 meses de edad se producía un desarrollo de B-ALL mucho más agresiva e invasiva que si el evento inicial era inducido en ratones de 4 meses.

Sin embargo, en humanos, la sola presencia de la translocación cromosómica no es suficiente para dar lugar al desarrollo de B-ALL, como demuestra un estudio con gemelos que poseían la translocación BCR-ABL al nacer. Así, el desarrollo o no de B-ALL se produjo en función de la adquisición o no de mutaciones secundarias⁹⁰. El gemelo que generó mutaciones secundarias desarrolló leucemia, mientras que aquel sin alteraciones secundarias no la desarrolló. Además, un alto porcentaje de individuos sanos presenta dicha alteración en leucocitos circulantes y nunca desarrollarán leucemia^{91,92}. Por tanto, las alteraciones secundarias son necesarias para que se produzca el desarrollo de la enfermedad. En línea con esta afirmación encontramos la publicación que descubrió que BCR-ABL no es capaz de conferir auto-renovación a células progenitoras⁹³, indicando que el oncogén no tiene capacidad transformante por sí solo.

Estudios de secuenciación del genoma han revelado que hay una media de 8,79 alteraciones somáticas en las B-ALLs BCR-ABL positivas⁹⁴. *IKZF1* está deletado en el 63-85% de las leucemias BCR-ABL^{p190} positivas^{94,95}. Estas deleciones resultan en haploinsuficiencia, expresión de isoformas dominantes negativas de IKAROS o la pérdida completa de la expresión del gen. Por ello, los pacientes que portan alteraciones en *IKZF1* presentan mal pronóstico⁹⁵. Además, se ha observado que la haploinsuficiencia de *IKZF1* acelera la progresión de la enfermedad en ratones BCR-ABL^{p190} (Ref. ⁹⁶). También se han observado alteraciones en *CDKN2A* como eventos cooperantes junto con las alteraciones de *IKZF1*⁵². Sin embargo, en un 60% de muestras leucémicas que presentan alteraciones en *IKZF1* hay una selección de alteraciones genéticas adicionales en otros factores de transcripción (como *PAX5*, *EBF1*, o *ETV6*) indicando que las alteraciones en *IKZF1* podrían no ser transformantes por sí solas⁹⁷.

Se han observado alteraciones que afectan a *EBF1* en un 14% de las leucemias BCR-ABL^{p190} positivas⁹⁸. La haploinsuficiencia de *EBF1* ocurre con más frecuencia junto con deleciones del gen *BTG1*, indicando que ambos genes podrían cooperar en la génesis de la leucemia⁹⁹.

Alteraciones en *PAX5* han sido observadas en un 35% de B-ALLs. Sin embargo, son más frecuentes en B-ALLs BCR-ABL^{p190} positivas, apareciendo alterado en un 33-50% de B-ALLs BCR-ABL^{p190} positivas^{52,100,101}. Además, se ha observado que, al igual que con *IKZF1*, aparecen alteraciones en el gen *CDKN2A* con alta frecuencia cuando *PAX5*

está alterado, sugiriendo que ambos genes pueden cooperar en el desarrollo de B-ALL^{52,102}. No obstante, a pesar del alto porcentaje de B-ALLs que presentan alteraciones en *PAX5*, no se ha observado asociación entre el pronóstico y la presencia de dichas alteraciones^{52,101}.

Como hemos comentado anteriormente, *CDKN2A* se encuentra alterado comúnmente en B-ALLs BCR-ABL^{p190} positivas, coincidiendo en una alta proporción de las veces que lo encontramos alterado con mutaciones en *IKZF1* y *PAX5*^{52,102}.

Por último, a pesar que la translocación *BCR-ABL*^{p190} es muy poco frecuente en B-ALLs de niños con síndrome de Down, la polisomía del 21 es la aneuploidía somática más común en las B-ALLs BCR-ABL^{p190} positivas¹⁰³.

En consecuencia, *BCR-ABL*^{p190} necesita alteraciones secundarias para iniciar el desarrollo de B-ALL. *BCR-ABL* sería el evento oncogénico inicial (probablemente formado en el útero) que, en ausencia de mutaciones secundarias, permanece clínicamente silente. Esta afirmación se encuentra avalada por los estudios en gemelos que portan *BCR-ABL* en el momento del nacimiento⁹⁰, comentados anteriormente. Además, dichas alteraciones secundarias pueden marcar la agresividad de la enfermedad. Así, el gemelo con el gen *IKZF1* delecionado murió tras el tratamiento y trasplante; mientras que el gemelo que tenía hiperdiploidía, superó el tratamiento y está en remisión⁹⁰.

Otro ejemplo que muestra la importancia de las alteraciones secundarias en la génesis de la B-ALL BCR-ABL positiva es un estudio en el cual se observó la recaída, 22 años después, de un niño que fue curado de B-ALL¹⁰⁴. Dicho estudio describe como 22 años después de haber sido tratado, y presumiblemente curado, se produjo la recaída en forma de una leucemia mielobástica aguda que tenía una secuencia de *BCR-ABL* idéntica a la observada en el diagnóstico realizado 22 años antes, así como reordenamientos de inmunoglobulinas idénticos. Estas observaciones confirmaron que la recaída derivaba del clon fundador. El resto de cambios genéticos (alteraciones secundarias) fueron diferentes en el diagnóstico y la recaída¹⁰⁴.

En cuanto a las características fenotípicas de la B-ALL BCR-ABL positiva se ha observado que, en humanos, presenta una coexpresión de marcadores linfoides y mieloides CD10⁺CD34⁺CD38^{débil}CD13⁺. Por tanto, la expresión aberrante del marcador mieloides CD13 en células B es altamente sugestiva de reordenamiento genético BCR-ABL¹⁰⁵.

A pesar del aumento del conocimiento sobre el papel que juegan las alteraciones secundarias en el desarrollo de leucemia en individuos que portan la translocación BCR-ABL gracias a las nuevas técnicas de secuenciación masiva, es necesaria la utilización de un modelo animal que reproduzca la enfermedad de forma adecuada para poder comprender los mecanismos moleculares generados por dichas alteraciones secundarias que desencadenan el desarrollo de la enfermedad.

4.4. Importancia de la utilización de modelos animales en el estudio de la B-ALL BCR-ABL^{p190} positiva

Con el objetivo de reproducir de una forma más fidedigna todos los aspectos que intervienen en el desarrollo de B-ALL, los modelos animales son la mejor aproximación que podemos utilizar, debido a que la neoplasia se desarrolla en el microambiente adecuado.

Analizando la historia de la investigación en cáncer, el descubrimiento de los oncogenes¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ y genes supresores de tumores¹¹⁰⁻¹¹² supuso un gran avance en el estudio de la enfermedad, demostrando por primera vez que las alteraciones de ciertos genes son capaces de inducir el desarrollo de cáncer. De estos estudios surgió la idea que los oncogenes eran el “talón de Aquiles” del cáncer, de forma que, dirigiendo las terapias hacia ellos, se podría acabar con la enfermedad¹¹³. Para demostrarlo, se realizaron estudios en ratón en los cuales la expresión de los oncogenes estaba dirigida por promotores específicos de tejido. En ellos, el tumor aparecía con alta frecuencia cuando el oncogén estaba activo y desaparecía cuando se apagaba su expresión^{114,115}. Sin embargo, esto no ocurre en humanos. Un ejemplo es el tratamiento de la CML con inhibidores de quinasas como el STI571/Imatinib, capaz de eliminar células tumorales diferenciadas que expresan BCR-ABL, pero no el “pool” de células madre que expresan el oncogén, lo cual explica las recidivas tras terapias prolongadas¹¹⁶

A lo largo de la historia se han desarrollado diferentes modelos de ratón en un intento de mimetizar la B-ALL BCR-ABL^{p190} positiva y así poder estudiarla de una forma más eficiente. En los siguientes párrafos citaremos algunos de ellos.

Heisterkamp y colaboradores demostraron en 1990 la capacidad oncogénica de la proteína de fusión BCR-ABL^{p190} expresándola bajo el control del promotor de la metalotianina en ratón. Observaron que los animales morían a causa de leucemia aguda (linfoide o mieloide) en pocas semanas¹¹⁷.

Gracias a estudios en los que se realizó la micro-inyección de BCR-ABL en huevos fertilizados, se observó que, aunque el oncogén se exprese en muchos tejidos diferentes, el fenotipo de la enfermedad siempre era hematológico¹¹⁸.

Modelos animales en los que se indujo la expresión de BCR-ABL por recombinación homóloga en el locus del *Bcr* demostraron que las quimeras desarrollaban B-ALL con características similares a la leucemia humana¹¹⁹. Sin embargo, la expresión de *BCR-ABL*^{p190} en la generación filial F1 producía letalidad embrionaria.

Debido a la necesidad de eventos secundarios en el desarrollo de B-ALL se han generado modelos que coexpresaran el oncogén *BCR-ABL*^{p190} y algún evento secundario conocido. Un ejemplo es que la haploinsuficiencia de *IKZF1* acelera la progresión de la B-ALL *BCR-ABL*^{p190} positiva en modelos animales⁹⁶. Resultados similares se pudieron observar con AID, donde se demostró que AID acelera la progresión de la B-ALL *BCR-ABL*^{p190} positiva¹²⁰.

El uso de modelos inducibles, en los que se puede activar o reprimir la expresión del gen de estudio, ha permitido profundizar en el análisis de la patogénesis de la B-ALL. Un ejemplo de modelo inducible fue la expresión del oncogén *BCR-ABL*^{p210} bajo un promotor inducible por tetraciclina, que llevó al desarrollo de B-ALL en el 100% de los ratones. Además, cuando apagaban la expresión del oncogén la enfermedad remitía, incluso tras varias rondas de activación/remisión¹¹⁴. Sin embargo, debemos tener en cuenta que la expresión de *BCR-ABL*^{p210} en B-ALL es muy inusual. Un segundo estudio, utilizando en este caso *BCR-ABL*^{p190} inducible por tetraciclina, demostró que los animales desarrollaban la enfermedad, pero, en este caso, la inactivación del oncogén una vez la enfermedad había sido iniciada no era suficiente para remitirla¹²¹.

La mayoría de estos estudios sugieren que *BCR-ABL*^{p190} es necesario en las células leucémicas con el fin de poder generar la B-ALL en cooperación con el evento genético secundario.

5. Papel de *PAX5* en la etiología de la B-ALL

5.1. Papel de *PAX5* en el desarrollo B normal

El gen *PAX5* es un miembro de la familia de factores de transcripción *PAX* (del inglés, *paired box*). Esta familia está compuesta por 9 miembros (*PAX1-9*) y se caracteriza por poseer un dominio de unión al DNA denominado *paired box*¹²². Las proteínas *PAX* juegan un papel importante en el desarrollo temprano y alteraciones en las mismas están ligadas al desarrollo de algunos cánceres. El gen *PAX5* es el único miembro de la familia que se expresa en células hematopoyéticas y, dentro del sistema hematopoyético, su expresión está restringida a células B. Además, también es expresado en SNC y testículo, estando implicado en el desarrollo de estos órganos¹²³.

PAX5 codifica la proteína específica activadora de células B o BSAP (del inglés, *B cell specific activation protein*). La expresión de *PAX5* comienza en estadios muy tempranos de células B y su función es esencial para el compromiso de diferenciación de los progenitores hematopoyéticos a células B¹²⁴. Además, este factor de transcripción ha sido definido como el guardián de la identidad B debido a que, en su ausencia, el desarrollo de células B no es posible y se puede inducir la transdiferenciación a células T o células mieloides aplicando los factores de crecimiento adecuados^{124,125}.

Con la generación del modelo murino en 1994, se pudo determinar la importancia del gen en el desarrollo B¹²³. Los ratones *Pax5*^{-/-} carecen de células B maduras, así como la expresión de *Cd19* está apagada en los mismos (*Cd19* es una diana directa de *Pax5* que sirve como marcador de actividad del gen. Cuando *Cd19* está expresado significa que *Pax5* también lo está, y viceversa). Además, el estudio de nuestro laboratorio publicado en 2015 y presentado en esta tesis doctoral demuestra que los ratones *Pax5*^{+/-} tienen un acumulo de células pro-B/pre-B en médula ósea y por tanto el desarrollo B alterado debido a la inactivación de uno de los alelos del gen¹²⁶.

La expresión de *PAX5* se extiende desde el estadio pro-B hasta células B maduras, apagándose entonces para permitir la diferenciación de célula B madura a célula plasmática. En un primer momento el grupo del Dr. M. Busslinger publicó que la expresión de *Pax5* estaba sujeta a una regulación alelo específica a lo largo de la diferenciación B, estableciendo que *Pax5* era predominantemente transcrito por un único alelo en células pro-B y células B maduras, mientras que su transcripción era bi-alelica en células B inmaduras¹²⁷. Sin embargo, el mismo grupo publicó en el año 2007 un nuevo trabajo que desmentía dicha afirmación, estableciendo que la transcripción de

Pax5 es bi-alélica a lo largo de todo el desarrollo B¹²⁸. Este segundo estudio demostró que los resultados obtenidos en el primero de ellos estuvieron causados por un artefacto, debido a que la inserción del gen de resistencia a neomicina alteraba la regulación transcripcional del alelo *Pax5* en el que era insertado. El estudio publicado en 2007 se realizó generando ratones *knock-in* que portaban como marcadores los genes *GFP* en un alelo y *CD2* humano en el otro, observando que las células B expresaban ambos marcadores a lo largo del desarrollo y confirmando así la transcripción bi-alélica a lo largo del desarrollo B.

El mecanismo por el cual *PAX5* mantiene el compromiso de célula B es la represión de genes inapropiados para linaje B y la activación de genes apropiados para linaje B (**Fig. 5**). Así, esta reprogramación transcripcional dirige la amplia capacidad de diferenciación de los progenitores a la ruta de diferenciación de células B, regula la adhesión y la migración celular, induce la recombinación V_H-D_H-J_H, facilita la señalización del receptor pre-BCR y promueve el desarrollo hacia célula B madura¹²⁴.

			<u>Función en:</u>	
Genes reprimidos por Pax5	<i>Ccl3</i> (MIP-1 α ; S)	<i>Ccl9</i> (MIP-1 γ ; S)	<i>Ccr2</i> (R)	Adhesión Migración
	<i>Ccr5</i> (R)	<i>Itgal</i> (LFA-1; R)	<i>Cd47</i> (IAP; R)	
	<i>Tspan7</i> (Tm4sf2; R)	<i>Emb</i> (Embigin; R)	<i>Vav3</i> (ST)	
	<i>Igf2</i> (S)	<i>Flt3</i> (Flk2; R)	<i>Ly6a</i> (Sca1; R)	Progenitores
	<i>Tnfrsf11</i> (OPGL; S)	<i>Csf1r</i> (M-CSFR; R)	<i>Lilrb4</i> (Gp49b; R)	Células mieloides
<i>Cd33</i> (Siglec-3; R)	<i>Ramp1</i> (CGRP-R; R)	<i>Fcer1g</i> (FcR- γ ; R)		
<i>Grap2</i> (Mona; ST)	<i>Lat2</i> (NTAL; ST)	<i>Lmo2</i> (TF)		
Células T	<i>Notch1</i> (R, TF)	<i>Tcrd</i> (R)	<i>Cd28</i> (R)	
	<i>Grap2</i> (Mona; ST)	<i>Ppp3ca</i> (CnA- α ; ST)	<i>Lck</i> (ST)	
	<i>Satb1</i> (TF)			
Células plasmáticas	<i>Igj</i> (J-chain; S)	<i>Sdc1</i> (CD138; R)	<i>Prdm1</i> (Blimp1; TF)	
Genes activados	<i>Cd19</i> (R)	<i>Cr2</i> (CD21; R)	<i>Fcer2a</i> (CD23; R)	Células B
	<i>Cd40</i> (R)	<i>Cd72</i> (R)	<i>Cd79a</i> (I α ; R)	
	<i>Blnk</i> (SLP65; ST)	<i>Ebf1</i> (TF)	<i>Lef1</i> (TF)	
	<i>C2ta</i> (CIITA; TF)	<i>Aicda</i> (AID)		

Figura 5. Principales genes activados y reprimidos por Pax5 en células pro-B.
Adaptada de Cobaleda et al. Nat Immunology (2007)

La demostración científica definitiva de que *Pax5* es capaz de reprimir/activar genes inapropiados/apropiados para linaje B se produjo en los años 2006 y 2007. En el año 2006, Delogu y colaboradores mostraron los genes reprimidos por *Pax5* en células pro-B¹²⁹. En este estudio identificaron 110 genes reprimidos por *Pax5* (entre ellos encontramos *Flt3*, *Ly6a*, *Notch1*, *Vav3*, *Cd33* o *Lmo2*), demostrando que *Pax5* es capaz de desregular diversas actividades biológicas en las células, como receptores de señalización, adhesión celular, migración, control transcripcional o metabolismo celular. Además, observaron que la represión de estos genes inapropiados para linaje B requiere la actividad continua de *Pax5*. En el año 2007, Schebesta y colaboradores mostraron los genes activados por *Pax5* en células pro-B¹³⁰. Este estudio identificó 170 genes activados por *Pax5* (entre los cuales están *Cd19*, *Blnk*, *Cd79a*, *Ebf1* o *Sit1*), demostrando que *Pax5* activa genes implicados en la señalización de células B, adhesión, migración, presentación de antígenos y formación del centro germinal. De nuevo, la actividad continua de *Pax5* es requerida para el mantenimiento de la actividad de dichos genes. Finalmente, en el año 2012, Revilla-i-Domingo y colaboradores publicaron un trabajo en el que demostraron que los genes regulados por *Pax5* apenas solapan entre células pro-B y células B maduras, demostrando que *Pax5* controla la identidad y función de células B mediante la regulación de genes distintos en el desarrollo B temprano y tardío¹³¹. Este estudio mostró, además, los genes activados y reprimidos por *Pax5* en cada transición a través de los diferentes estadios de desarrollo de células B.

Una tarea esencial de las células pro-B es la recombinación del gen *IgH* a partir de los segmentos V, D y J. Se ha observado que la recombinación D_H-J_H se produce de forma adecuada en ausencia de *Pax5*. Sin embargo, los reordenamientos $V_H-D_HJ_H$ que envuelven a los genes $V_H J558$ están reducidos 100 veces en células *Pax5*^{-/-} comparado con células *wild-type* (WT)¹²⁴. Estos segmentos están localizados en el extremo distal del locus *IgH*. Analizando los reordenamientos $V_H-D_HJ_H$ que se observan en células *Pax5*^{-/-}, se observó que la eficiencia de recombinación $V_H-D_HJ_H$ aumenta conforme disminuye la distancia entre los segmentos V_H y D_HJ_H ¹³². Esto es debido a que *Pax5* participa en la contracción del locus *IgH*¹³³, de forma que en ausencia de *Pax5* se previenen dichos reordenamientos.

Como hemos comentado en secciones anteriores, las alteraciones en *PAX5* están ligadas a B-ALL. Aproximadamente el 30% de las B-ALLs presentan alteraciones en este gen que provocan la pérdida de función del mismo⁵². Por ello, en la siguiente

sección analizaremos el papel que juegan las alteraciones en *PAX5* en el desarrollo de B-ALL.

5.2. Implicaciones de *PAX5* en la B-ALL

5.2.1. *PAX5* como evento secundario en el desarrollo de B-ALL

Como ya hemos comentado, se ha postulado que el desarrollo de B-ALL implica un proceso multietapa en el cual los eventos iniciantes requieren la presencia de alteraciones secundarias para dar lugar al desarrollo de la enfermedad. Las alteraciones secundarias más comunes en B-ALL tienen lugar en factores de transcripción implicados en el desarrollo de células B, siendo *PAX5* uno de los genes que más frecuentemente aparece mutado o delecionado.

PAX5 ha sido identificado como evento secundario que tiene un rol de supresor tumoral en el desarrollo de B-ALL, apareciendo alterado en 30% de las B-ALLs⁵².

Estudios en modelos animales, han demostrado que cuando se pierde completamente *Pax5* en células B maduras, estas sufren un proceso de desdiferenciación dando lugar a linfomas agresivos de células progenitoras, demostrando que *Pax5* mantiene la identidad de célula B y funciona como supresor tumoral en el linaje B¹³⁴.

Además, también se ha observado que la heterocigosidad de *Pax5* coopera con la activación constitutiva de Stat5, Jak1 o Jak3 en el desarrollo de B-ALL¹³⁵. Sabemos que la señalización de STAT es importante en el desarrollo de B-ALL, por ejemplo, porque BCR-ABL es capaz de fosforilar y activar STAT5. En este estudio se observó que los ratones *Stat5+Pax5^{+/-}* desarrollan leucemia con una incidencia del 100%. Por otro lado, bajo condiciones libres de patógenos (SPF) (del inglés, *specific pathogen free*), los ratones *Pax5^{+/-}* no desarrollan leucemia. Por tanto, la heterocigosidad de *Pax5* es el evento secundario necesario para que se produzca el desarrollo de B-ALL en este modelo animal.

Más adelante se observó que la restauración de los niveles de expresión normales de *Pax5* provoca la maduración inmunofenotípica de las células tumorales y la remisión de la B-ALL mediante un programa transcripcional que se asemeja mucho a la diferenciación B normal¹³⁶. Este estudio fue llevado a cabo utilizando iRNA transgénico para reducir de forma reversible la expresión endógena de *Pax5* en el compartimento hematopoyético de ratones. Al cruzar estos ratones con la expresión de *Pax5* reducida

de forma reversible con ratones Stat5 se generaban B-ALLs en el 100% de los animales. El tratamiento con doxiciclina a los animales leucémicos restauró los niveles de Pax5 llevando a la maduración de las células leucémicas y la remisión de la enfermedad.

En la misma dirección, la utilización de un sistema inducible por doxiciclina para expresar *PAX5* permitió observar que células con bajos niveles de *PAX5* tienen una expresión bi-fenotípica de marcadores linfoides B y mieloides ($B220^+CD19^-CD11b^+$). No ocurre lo mismo cuando los niveles de *PAX5* son elevados, observándose células que únicamente expresan marcadores linfoides B ($B220^+CD19^+IgM^+$)¹³⁷. De esta forma, cuando los niveles de expresión de *PAX5* son bajos, se genera una población celular que se asemeja mucho al fenotipo de algunas B-ALLs.

Sin embargo, aunque estos estudios en humanos y ratón definen *PAX5* como un gen supresor tumoral ligado al desarrollo de B-ALL, la respuesta a cómo la pérdida de *PAX5* contribuye al desarrollo de la misma permanece aún sin resolver.

5.2.2. *PAX5* como gen de susceptibilidad al desarrollo de B-ALL

Gracias al avance de las técnicas de secuenciación, en los últimos años se han descubierto mutaciones heredadas en ciertos genes que confieren susceptibilidad al desarrollo de pB-ALL⁶²⁻⁶⁸.

A finales de 2013 y principios de 2014, dos grupos de investigación independientes identificaron *PAX5* como gen que confiere susceptibilidad al desarrollo de B-ALL en individuos que presentan mutaciones en línea germinal^{67,68}. En estos trabajos observaron que los individuos que poseían la mutación c.547G>A (p.Gly183Ser), que afecta al dominio octapéptido de *PAX5*, parecen producir un clon pre-leucémico que se mantiene oculto y da lugar al desarrollo de B-ALL en un 30% de los miembros de la familia que tienen la mutación. Análisis de citometría de flujo mostraron que las células leucémicas eran $CD19^+CD10^+CD20^+$. Además, análisis moleculares identificaron que estas leucemias no poseían translocaciones *ETV6-RUNX1*, *BCR-ABL*, ni reordenamientos *MLL*⁶⁷. En las células leucémicas de los individuos que desarrollaron la enfermedad se observó la pérdida homocigótica de una región en 9p, perdiendo así el alelo WT de *PAX5*. Esta pérdida homocigótica de 9p supuso además la pérdida del locus *CDKN2A/B*^{67,68}. Se observó que la pérdida de *CDKN2A/B* solamente ocurre en las muestras tumorales, pues el estudio de mutaciones en línea germinal resultó negativo para dicho locus. Además, algunos individuos presentan mutaciones puntuales en el otro alelo de *PAX5* dando lugar a una actividad transcripcional reducida del gen. Estos

datos implicaron a *PAX5* en un nuevo síndrome de susceptibilidad al desarrollo de pB-ALL y fueron validados en 3 familias independientes con origen étnico diferente^{67,68}.

Debido a que las mutaciones en *PAX5* en estas familias muestran una baja incidencia, es muy probable que sean requeridas alteraciones secundarias que desencadenen el desarrollo de la enfermedad. Los mecanismos mediante los cuales se produce la conversión del clon pre-leucémico a una pB-ALL manifiesta aún no han sido revelados. Por tanto, estudios adicionales en humanos y modelos animales son necesarios para resolver el mecanismo que desencadena el desarrollo de leucemia en individuos con una susceptibilidad genética producida por mutaciones heredadas en *PAX5*.

Hipótesis de trabajo

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La B-ALL es el cáncer infantil más frecuente en el mundo y, a pesar que la tasa de curación es excelente (aproximadamente del 90%), sigue siendo la primera causa de muerte infantil por enfermedad, debido a que cerca de un 20% de los niños recaen y mueren por la falta de tratamientos óptimos para las recaídas. Los grandes avances en técnicas de secuenciación han permitido poner de manifiesto un gran número de alteraciones que participan en el desarrollo de la B-ALL. Sin embargo, el mecanismo que desencadenan dichas alteraciones y produce el inicio del desarrollo de la enfermedad aún no ha sido revelado. Por ello, el estudio de la etiología de la B-ALL podría permitir el desarrollo de fármacos más efectivos, así como estrategias preventivas que impidan el desarrollo de la enfermedad.

Existen 2 tipos de factores de riesgo genéticos que participan en la etiología de la B-ALL: predisposición genética y susceptibilidad genética. Con el objetivo de determinar si las alteraciones iniciales confieren predisposición o susceptibilidad al desarrollo de B-ALL, hemos decidido utilizar BCR-ABL^{p190} como modelo. Nosotros proponemos que la expresión limitada del oncogén en las células madre hematopoyéticas (HSCs) proporcionará una susceptibilidad al desarrollo de B-ALL que, en presencia de la alteración secundaria, dará lugar a la formación de una masa tumoral que no necesita la expresión del oncogén. Para demostrar esta hipótesis, hemos generado un modelo de ratón que restringe la expresión de BCR-ABL^{p190} al compartimento de células madre/progenitoras hematopoyéticas y lo hemos cruzado con ratones *Pax5*^{+/-}, asegurándonos así la ocurrencia del segundo *hit*.

En cuanto a los factores de riesgo ambientales, las infecciones han sido propuestas como agentes ambientales que podrían jugar un papel en el desarrollo de B-ALL. Sin embargo, no hay evidencias científicas que apoyen esta afirmación. Recientemente ha sido publicado que la mutación heredada de *PAX5* confiere susceptibilidad al desarrollo de B-ALL. Nosotros proponemos que la exposición a infección podría ser el evento ambiental que desencadene el inicio del desarrollo de B-ALL en individuos con una susceptibilidad genética intrínseca. Para demostrarlo hemos utilizado el modelo de ratón *Pax5*^{+/-} y lo hemos expuesto a un “ambiente convencional”, por tanto, expuesto a patógenos.

Objetivos

OBJETIVOS

1. Estudiar si la expresión limitada de BCR-ABL^{p190} al compartimento de células madre/progenitoras hematopoyéticas es suficiente para dar lugar a la susceptibilidad al desarrollo de B-ALL.
2. Estudiar el mecanismo de acción de Pax5 como alteración secundaria en ratones con susceptibilidad generada previamente por la expresión limitada de BCR-ABL^{p190} al compartimento de células madre/progenitoras hematopoyéticas.
3. Estudiar la implicación de la exposición a infección como causa del desarrollo de B-ALL utilizando un modelo animal que mimetiza la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad que se observa en individuos con mutaciones heredadas de *PAX5*.

Resultados

RESULTADOS

1. La restricción de la expresión de *BCR-ABL*^{p190} al compartimento *stem* induce B-ALL con baja incidencia

1.1. Generación del modelo murino Sca1-BCR-ABL^{p190}

Estudios en gemelos apoyan un modelo de leucemiogénesis según el cual el oncogén *BCR-ABL*^{p190} puede ser un evento genético inicial prenatal, que da lugar a un clon pre-leucémico que permanece clínicamente silente en ausencia de eventos secundarios adicionales⁹⁰. Con el objetivo de estudiar los cambios celulares en las células madre/progenitoras hematopoyéticas (HS/PC, por sus siglas en inglés) pre-leucémicas que expresan el oncogén *BCR-ABL*^{p190}, decidimos generar un modelo murino en el que la expresión del oncogén está restringida al compartimento de HS/PCs. Para ello, se insertó el cDNA del oncogén *BCR-ABL*^{p190} humano bajo el control del promotor Sca1 (*Stem Cell Antigen 1*). La inserción de la construcción *TK-IRES-BCR-ABL*^{p190} bajo el control del promotor de ratón Ly-6E.1 (Sca-1)¹³⁸ generó el plásmido Sca1-BCR-ABL^{p190} (**Fig. 6A**), el cual fue utilizado para restringir la expresión de *BCR-ABL*^{p190} en células Sca-1 positivas en ratones C57BL/6 x CBA.

Una vez generado el modelo de ratón, inicialmente quisimos confirmar que la expresión de *BCR-ABL*^{p190} estaba restringida al compartimento de HS/PCs. Para ello, decidimos analizar por PCR cuantitativa si la expresión del oncogén estaba limitada a células madre/progenitoras. Como se puede observar en la **Fig. 6B**, la expresión de *BCR-ABL*^{p190} está ligada únicamente a células Sca1⁺Lin⁻, no observándose expresión, como era de esperar, en el compartimento Sca1⁻Lin⁺. Además, estudios de Western Blot confirmaron que la expresión de *BCR-ABL*^{p190}, así como la vía de señalización de la proteína de fusión (la fosforilación de Stat5), estaban ausentes en células pro-B/pre-B de médulas ósea de ratones pre-leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190} (**Fig. 6C**). Finalmente, estudios de enriquecimiento mediante GSEA demostraron que los genes diana de *BCR-ABL*^{p190} no están activados en células pro-B/pre-B de médula ósea de ratones pre-leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190} (**Fig. 6D**).

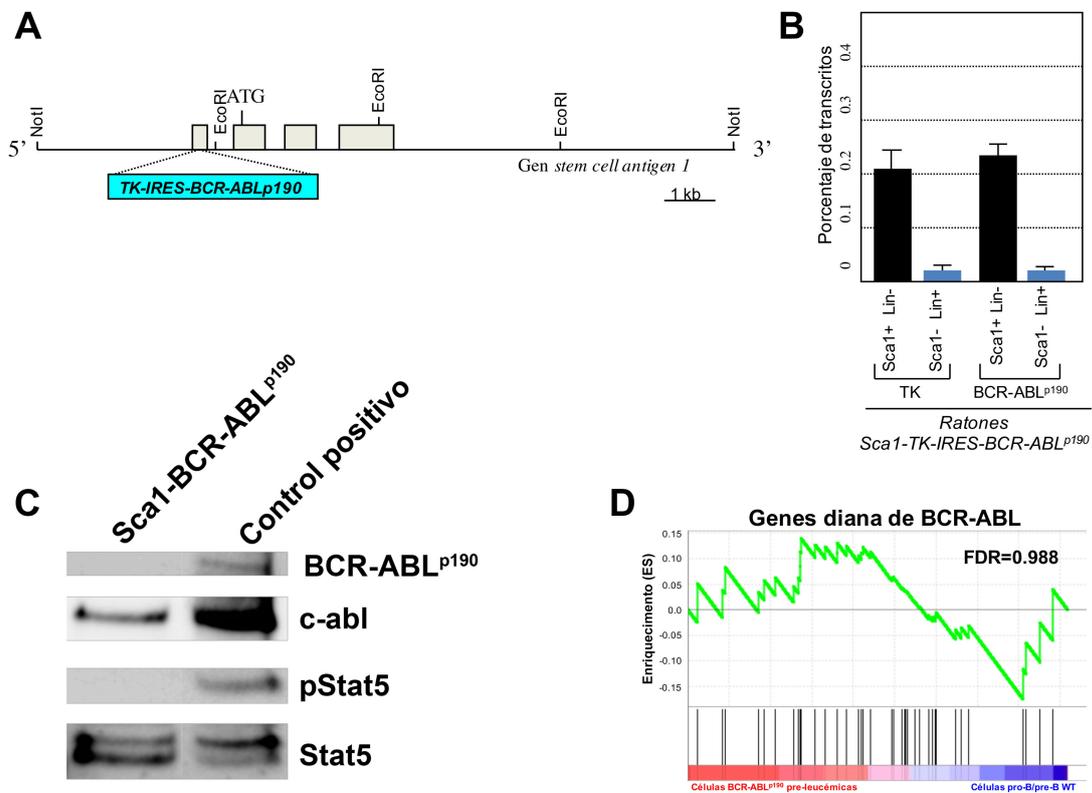


Figura 6. Generación del modelo murino Sca1-BCR-ABL^{p190}.

A) Representación esquemática de la estructura genómica del locus Sca1 y del vector transgénico utilizado. Los sitios NotI fueron usados para aislar el transgén. **B)** Cuantificación de la expresión de timidina quinasa (TK) y BCR-ABL^{p190} en células Sca1⁺Lin⁻ y Sca1⁻Lin⁺ mediante qPCR. El porcentaje de transcritos está representado tomando como referencia la expresión de β-actina. **C)** BCR-ABL^{p190} y pStat5 están ausentes en células pro-B/pre-B de médula ósea de ratones pre-leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190}. Se utilizaron c-abl y Stat5 como controles. Se utilizaron células Ba/F3 que expresan BCR-ABL^{p190} como control positivo. Este experimento es representativo de 2 réplicas biológicas. **D)** El análisis de GSEA muestra que los genes diana de BCR-ABL^{p190} no están activados en células pro-B/pre-B de ratones pre-leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190} comparadas con células pro-B/pre-B de ratones *wild-type* (WT) de edad similar (*gene set* "KLEIN_TARGETS_OF_BCR_ABL1_FUSION" obtenido de <http://www.broad.mit.edu/gsea/>; FDR=0.988).

Estos resultados ponen de manifiesto que nuestro modelo de ratón Sca1-BCR-ABL^{p190} expresa el oncogén BCR-ABL^{p190} únicamente en el compartimento de HS/PCs, no observándose ni expresión del oncogén ni activación de la vía de señalización del mismo en células hematopoyéticas maduras.

1.2. El modelo animal Sca1-BCR-ABL^{p190} desarrolla B-ALL con baja incidencia

Una vez generada, la cohorte de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} fue monitorizada hasta que los animales presentaron síntomas de enfermedad o alcanzaron los 2 años de edad; entonces, dichos animales fueron sacrificados y analizados. Durante la monitorización realizamos análisis bimensuales de citometría de flujo de sangre periférica con el objetivo de analizar la posible presencia de blastos en sangre periférica. Además, extrajimos DNA de sangre periférica durante los sangrados rutinarios que nos permitiera un posible análisis posterior.

Gracias a la monitorización de la cohorte pudimos observar que los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} desarrollaron B-ALL con baja incidencia (un 13% de los animales transgénicos desarrolló la enfermedad) (**Fig. 7A**). La leucemia fue caracterizada por infiltración de células blásticas B (CD19⁺B220⁺IgM⁻) en médula ósea, bazo y sangre periférica, así como la desestructuración de la arquitectura normal del bazo debida a la infiltración por dichas células blásticas (**Fig. 7B y Fig. 8**).

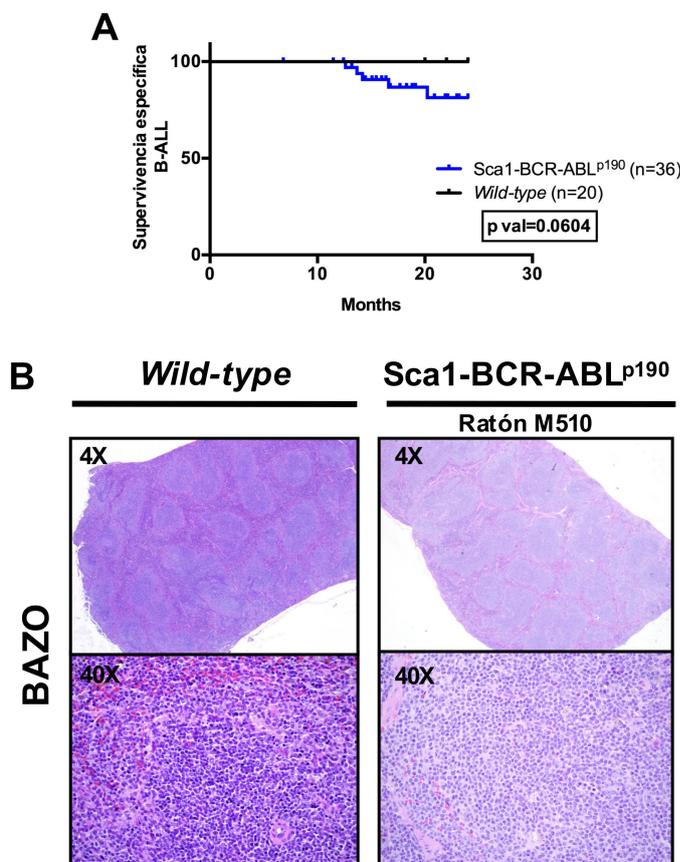


Figura 7. Los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} desarrollan B-ALL con baja incidencia.
A) Curva de supervivencia específica a B-ALL de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} (azul; n=36) comparada con ratones WT (negro; n=20) (p val log-rank=0.0604). **B)** Tinción de hematoxilina/eosina en bazo de ratones leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190} comparado con bazo de ratones WT. Se puede observar como los bazos de ratones leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190} pierden la arquitectura como consecuencia de la infiltración por células blásticas.

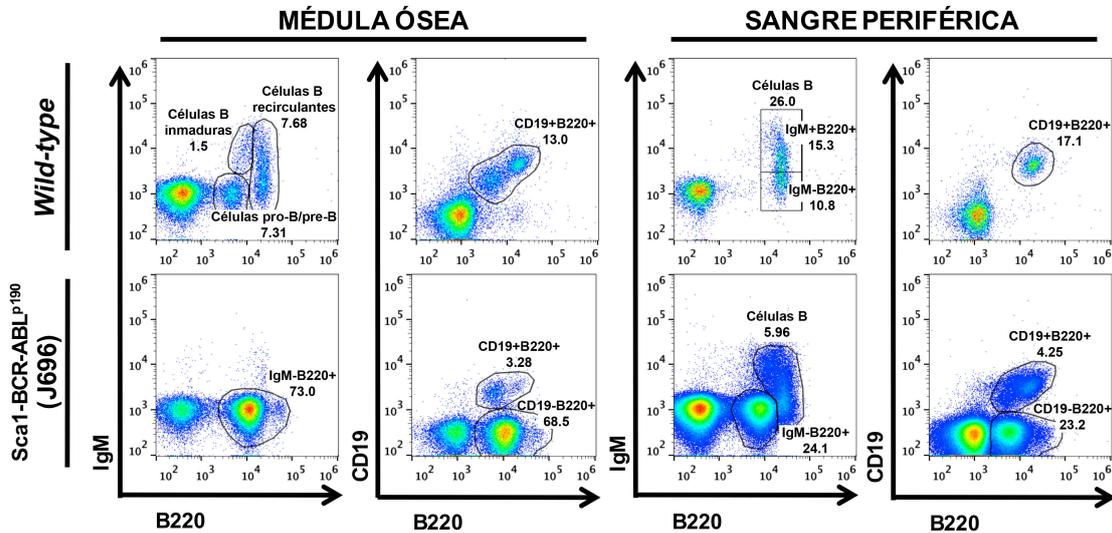


Figura 8. Immunofenotipo de las células leucémicas observadas en los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}. Análisis de citometría de flujo de médula ósea y sangre periférica de ratones leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190} (n=5) comparados con ratones WT (n=5). Se observa la acumulación de células blásticas en médula ósea y sangre periférica de ratones leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190}.

Con el fin de determinar la firma transcripcional de las B-ALLs desarrolladas por los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}, decidimos realizar *arrays* de expresión en los que comparamos médula ósea total de ratones leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190} con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT. Los análisis de enriquecimiento realizados pusieron de manifiesto que las células blásticas de los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} no tienen activada la vía de señalización de BCR-ABL (Fig. 9A), corroborando que la expresión de BCR-ABL^{p190} está ausente en las células blásticas de los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}. Dichos análisis también mostraron que las B-ALLs desarrolladas por los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} están enriquecidas en *gene sets* que representan los estadios de célula pro-B y célula pre-B^{139,140} (Fig. 9B) y, a pesar de la ausencia de expresión de BCR-ABL^{p190} en las células leucémicas, en *gene sets* que representan la firma transcripcional de la leucemia humana BCR-ABL^{p190} positiva (Fig. 9C). Finalmente, gracias a los análisis de enriquecimiento, pudimos confirmar que las células leucémicas de los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} mostraron la pérdida o, al menos, una marcada reducción de la actividad transcripcional de Pax5 (Fig. 10).

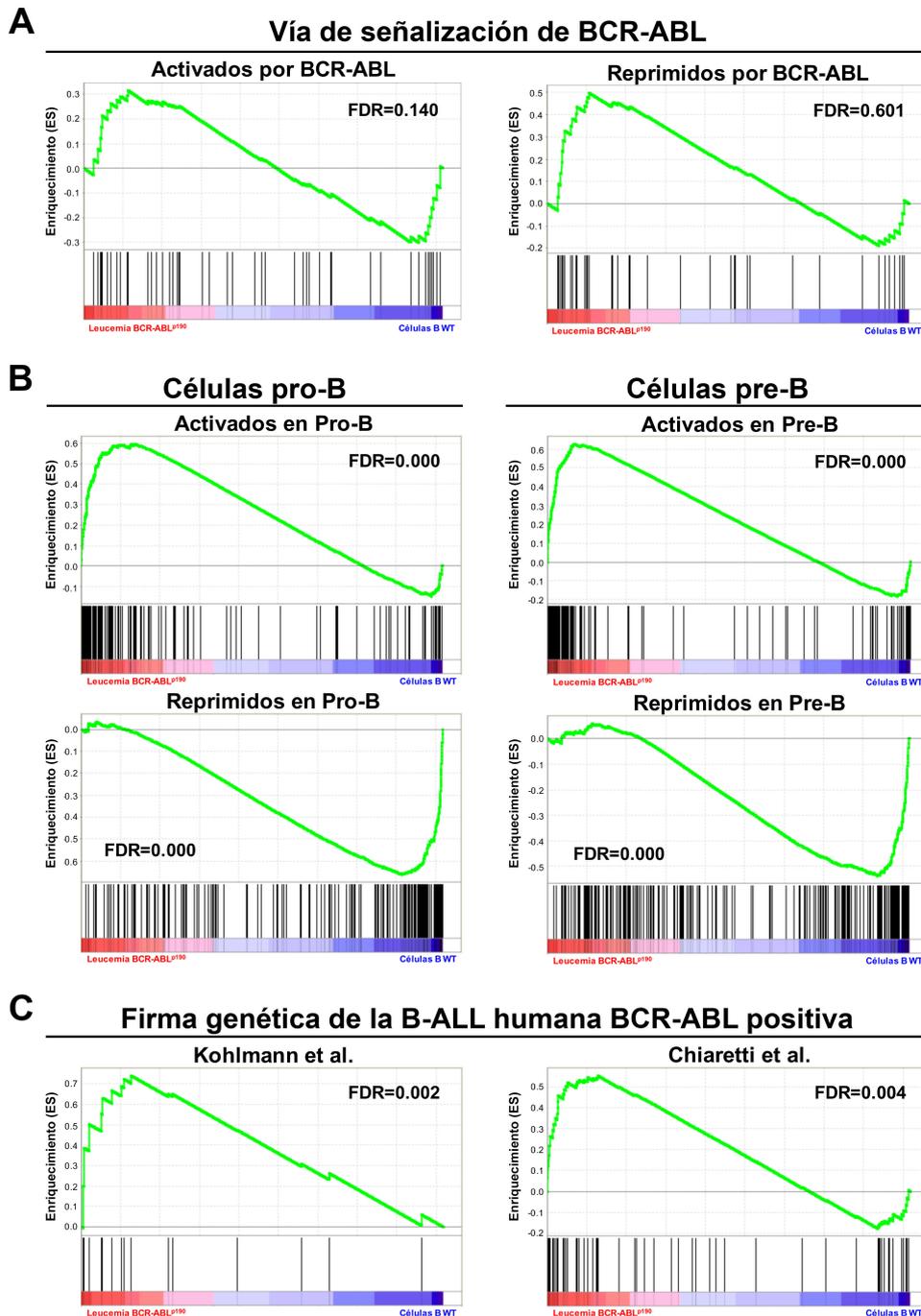


Figura 9. Análisis transcriptómicos muestran que las B-ALLs desarrolladas por los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} son similares a las leucemias humanas.

A) Análisis de enriquecimiento GSEA que muestra que la vía de señalización de BCR-ABL (extraída de¹⁴¹) no está enriquecida en células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR= 0.140 y FDR=0.601). **B)** Análisis de GSEA que demuestra que las células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} están enriquecidas en *gene sets* que representan los estadios pro-B y pre-B del desarrollo B de ratón (extraídos de¹³⁹) comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (pro-B: FDR=0.000 y FDR=0.000; pre-B: FDR=0.000 y FDR=0.000). **C)** Análisis GSEA que muestra que las células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} están enriquecidas en *gene sets* que representan la firma genética de la B-ALL humana BCR-ABL positiva (extraídos de^{142,143}) comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (Kohlmann: FDR=0.002; Chiaretti: FDR=0.004).

Genes regulados por Pax5

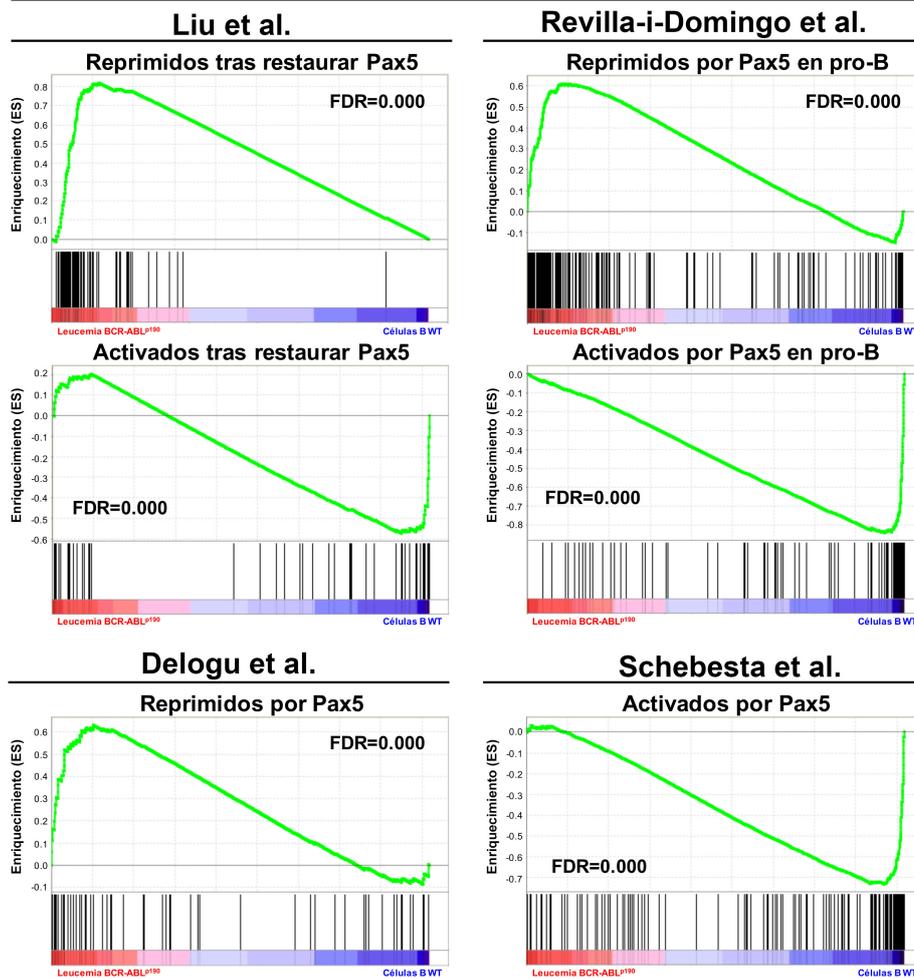


Figura 10. La actividad transcripcional de Pax5 está reducida en células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}.

Análisis de GSEA identificaron enriquecimiento en “genes reprimidos tras restaurar Pax5” (extraído de¹³⁶) en células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), también identificaron enriquecimiento negativo en “genes activados tras restaurar Pax5” (extraído de¹³⁶) en células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), mostrando una correlación inversa. Análisis de GSEA identificaron enriquecimiento en “genes reprimidos por Pax5 en pro-B” (extraído de¹³¹) en células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), también identificaron enriquecimiento negativo en “genes activados por Pax5 en pro-B” (extraído de¹³¹) en células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), mostrando una correlación inversa. Análisis de GSEA identificaron enriquecimiento en el *gene set* “reprimidos por Pax5” (extraído de¹²⁹) en células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), también identificaron enriquecimiento negativo en el *gene set* “activados por Pax5” (extraído de¹³⁰) en células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), mostrando una correlación inversa.

Estos resultados demuestran que la expresión de BCR-ABL^{p190} restringida al compartimento de HS/PCs es capaz de inducir B-ALLs similares a las leucemias humanas BCR-ABL^{p190} positivas, siendo independientes del oncogén *BCR-ABL*^{p190} y de la activación de su vía de señalización.

1.3. Las células pro-B/pre-B con defecto en Pax5 son permisivas al desarrollo de B-ALL BCR-ABL^{p190} positiva

Para aclarar cuál es el mecanismo de esta susceptibilidad al desarrollo de B-ALL mediada por BCR-ABL^{p190}, decidimos analizar los diferentes estadios de diferenciación B en ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} pre-leucémicos de 4 meses de edad. Los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} muestran una reducción de las células stem hematopoyéticas (HSC), los progenitores linfoides comunes (CLP) y los progenitores restringidos a linaje (LRP) comparados con ratones WT de la misma edad, mientras que el porcentaje de células pro-B/pre-B de médula ósea está incrementado de forma significativa (**Fig. 11A-B**). Además, los análisis bimensuales de sangre periférica realizados mostraron que, aunque los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} muestran mayores números de células B220⁺ a los 2 meses de edad, estas células rápidamente disminuyen a un nivel de aproximadamente el 20% a los 6 meses y se mantienen en niveles bajos hasta la muerte (**Fig. 12A-B**). Estos resultados indican que los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} presentan un defecto en el desarrollo B que hace que se produzca un acúmulo de células pro-B/pre-B en la médula ósea y disminuyan los números de células B maduras en la periferia comparado con ratones WT.

Las células B precursoras murinas son dependientes de una vía de señalización IL7/IL7R intacta. Por ello, decidimos analizar la respuesta a la retirada de IL7 de células pro-B pre-leucémicas provenientes de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}. Para ello separamos por MACS células B220⁺ de médula ósea de ratones pre-leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190} y WT, cultivamos estas células en un medio específico de células pro-B y retiramos la IL7 del medio de cultivo para analizar la respuesta de las células a dicha retirada. Pudimos observar que la respuesta de las células pro-B Sca1-BCR-ABL^{p190} a la retirada de IL7 fue similar a la respuesta de las células pro-B WT (**Fig. 12C**). Estos resultados están en línea con el hecho de que las células pro-B Sca1-BCR-ABL^{p190} no expresan el oncogén ni tienen activada la vía de señalización del mismo.

Por tanto, los datos obtenidos sugieren que BCR-ABL^{p190} favorece la aparición de un compartimento de células B precursoras aberrante en la médula ósea, que impide la diferenciación a célula B madura sin necesidad de exponer estas células B precursoras a la actividad quinasa oncogénica BCR-ABL^{p190}. Así, nuestro grupo hipotetizó que la naturaleza y la función del segundo *hit* determinará la expansión de la célula diana que dará lugar a la formación de la masa tumoral.

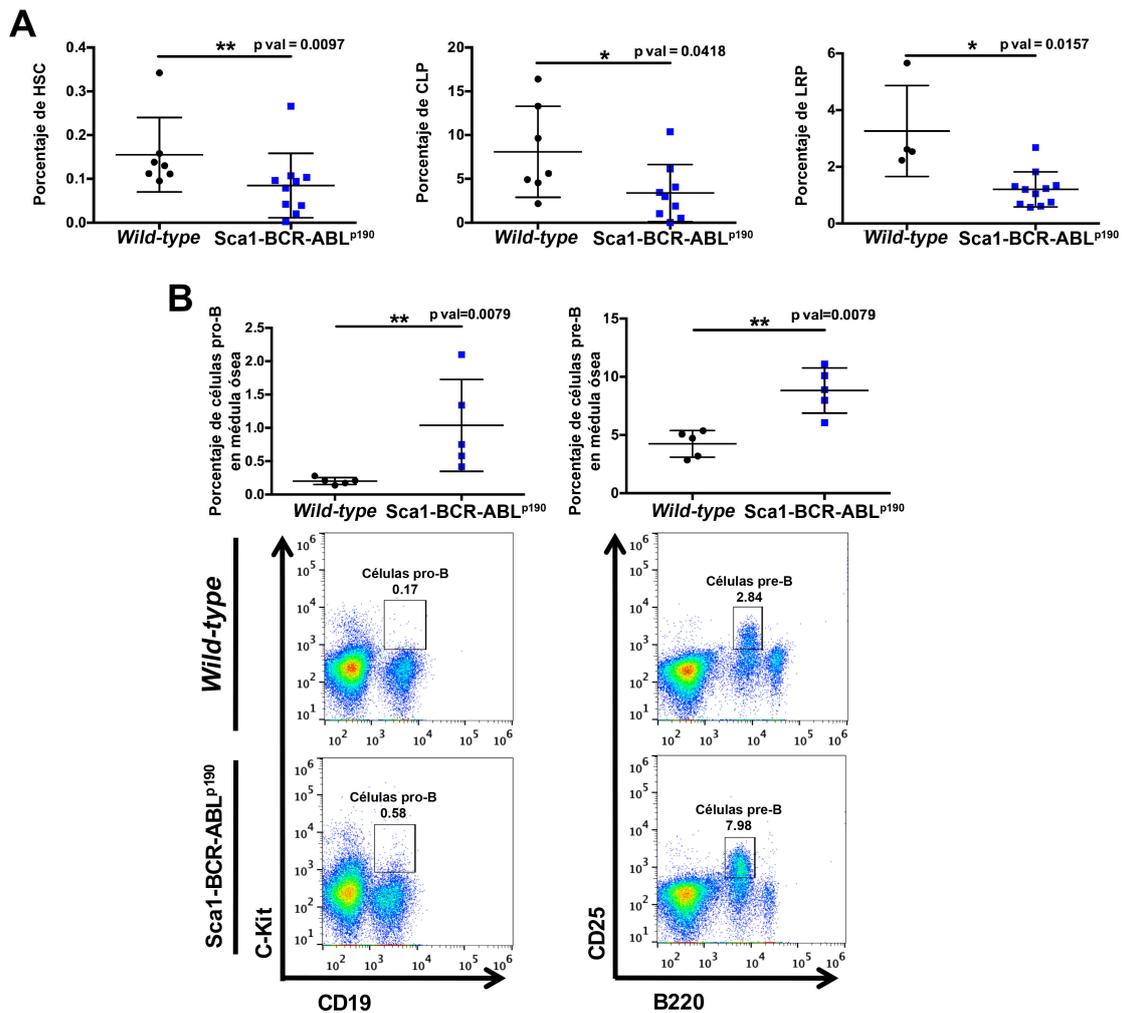


Figura 11. BCR-ABL^{p190} favorece la aparición de un compartimento de células B precursoras aberrante en la médula ósea.

A) Porcentaje de células madre hematopoyéticas (HSC), progenitores linfoides comunes (CLP) y progenitores restringidos a linaje (LRP) en ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} (n=9-11) de 4 meses de edad comparados con ratones WT (n=4-7) de la misma edad y analizados por citometría de flujo. Las barras de error representan la desviación estándar. Se realizó un *t-test* estadístico en cada caso. **B)** Porcentaje de células pro-B y células pre-B de médula ósea en ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} (n=5) de 4 meses de edad comparados con ratones WT (n=5) de la misma edad y analizados por citometría de flujo. Las barras de error representan la desviación estándar. Se realizó un *t-test* estadístico en cada caso. Se muestran gráficos de citometría de flujo representativos de ambas líneas bajo el análisis estadístico.

Además de la pérdida de expresión de CD19 en las células blásticas de los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}, observamos, gracias a estudios de enriquecimiento, que la actividad transcripcional de Pax5 está perdida o, al menos, marcadamente reducida (**Fig. 7C y Fig. 8D**). También, como regulador principal del desarrollo y la identidad de células B, mutaciones en *PAX5* que producen la pérdida de su función ocurren en la mayoría de los casos de B-ALL BCR-ABL^{p190} positiva^{52,94,100,101}. Estos datos sugieren a *Pax5* como candidato para el segundo *hit* oncogénico.

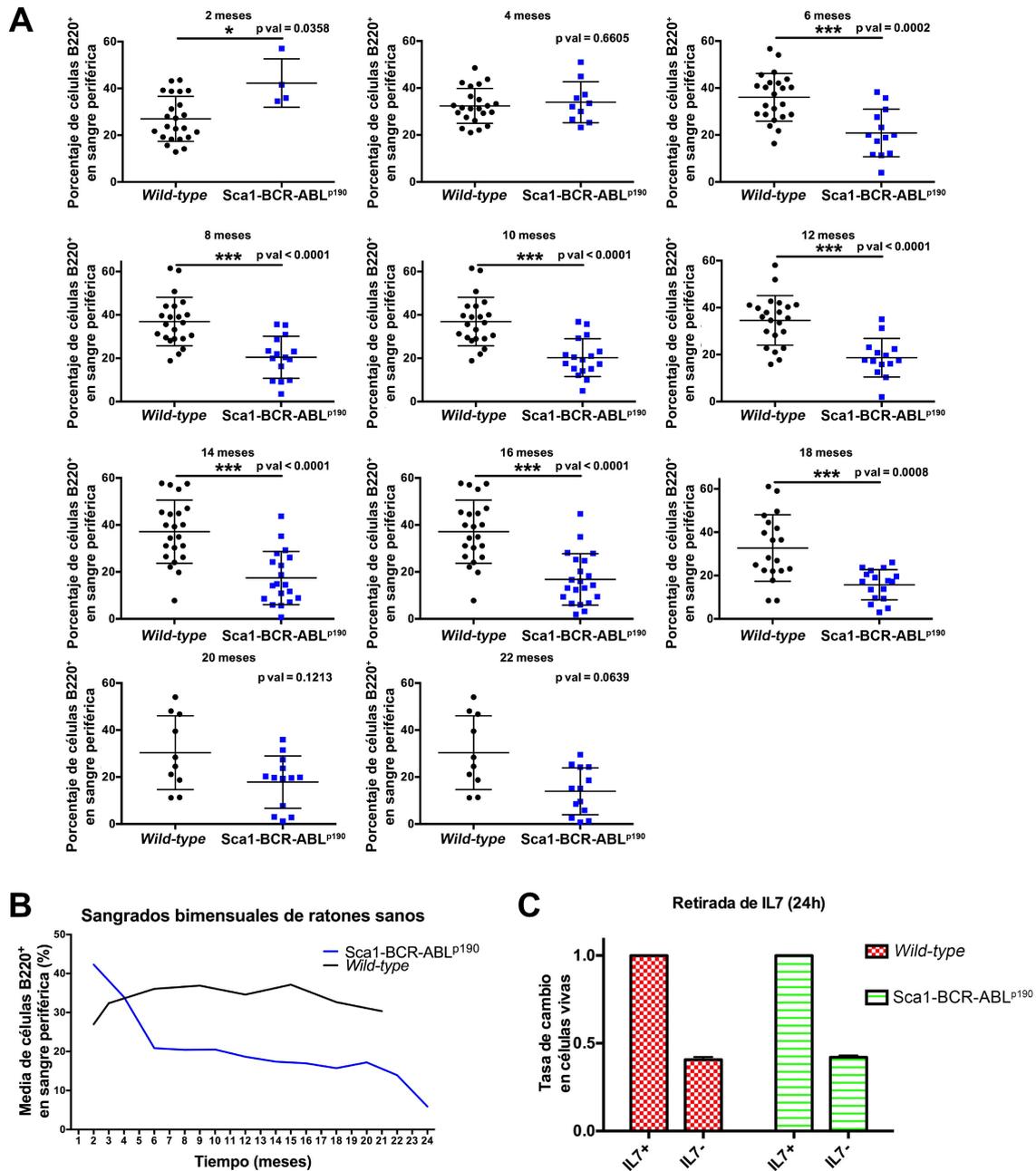


Figura 12. BCR-ABL^{p190} favorece la disminución del porcentaje de células B maduras en la periferia.
A) Porcentaje de células B220⁺ en sangre periférica, analizadas por citometría de flujo, de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} (n=5-21) y ratones WT (n=21-23) en diferentes puntos de tiempo. Las barras de error representan la desviación estándar. Se realizó un *t*-test estadístico en cada caso. **B)** Representación gráfica de la media de células B220⁺ en sangre periférica, analizadas por citometría de flujo, en ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} (n=5-21) y ratones WT (n=10-23) a lo largo del tiempo. **C)** Susceptibilidad a la muerte celular mediada por la retirada de IL7 en células pro-B Sca1-BCR-ABL^{p190} comparadas con células pro-B WT. Las células pro-B fueron cultivadas durante 24h sin IL7. La inducción de la apoptosis fue evaluada mediante citometría de flujo utilizando la tinción Anexina V/Ioduro de propidio. En el gráfico aparece representada la media ± la desviación estándar de las células vivas normalizadas de 6 experimentos independientes.

2. La pérdida de Pax5 provoca el cambio metabólico esencial para el desarrollo de B-ALL como resultado de la susceptibilidad producida por BCR-ABL^{p190}

2.1. Generación del modelo murino Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-}

Con el objetivo de estudiar el mecanismo de acción de Pax5 como alteración secundaria en ratones con susceptibilidad al desarrollo de B-ALL, generada previamente por la expresión de BCR-ABL^{p190} limitada al compartimento de HS/PCs, decidimos generar una cohorte de animales resultante del cruce de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} con Pax5^{+/-}.

Gracias a estudios de Western blot y análisis transcriptómicos pudimos confirmar que los ratones pre-leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} no expresan BCR-ABL^{p190} en células pro-B/pre-B de médula ósea. Además, la vía de señalización de la proteína de fusión está apagada (no hay fosforilación de Stat5) en dichas células (**Fig. 13A**). Al mismo tiempo, estudios de enriquecimiento mediante GSEA demostraron que los genes diana de BCR-ABL^{p190} no están activados en células pro-B/pre-B de médula ósea de ratones pre-leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} (**Fig. 13B**). Estas observaciones confirman la ausencia de expresión de BCR-ABL^{p190} fuera del compartimento de HS/PCs.

Con la intención de estudiar el impacto del evento oncogénico secundario en el desarrollo B de ratones pre-leucémicos decidimos analizar por citometría de flujo el compartimento de células B de médula ósea de ratones de 4 meses de edad, observando que los ratones pre-leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} tienen un aumento significativo de las células pro-B de médula ósea comparado con ratones WT (**Fig. 13C**). Dicho aumento se observó previamente en el modelo animal Sca1-BCR-ABL^{p190}. Del mismo modo, gracias a los análisis rutinarios de sangre periférica realizados a los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-}, observamos que dicho modelo murino presenta una disminución de células B220⁺ en sangre periférica desde el nacimiento (**Fig. 14A-B**). Así, del mismo modo que el modelo animal Sca1-BCR-ABL^{p190}, los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} presentan un desarrollo B aberrante que se manifiesta mediante un acúmulo de células pro-B en médula ósea y una disminución de células B maduras en sangre periférica.

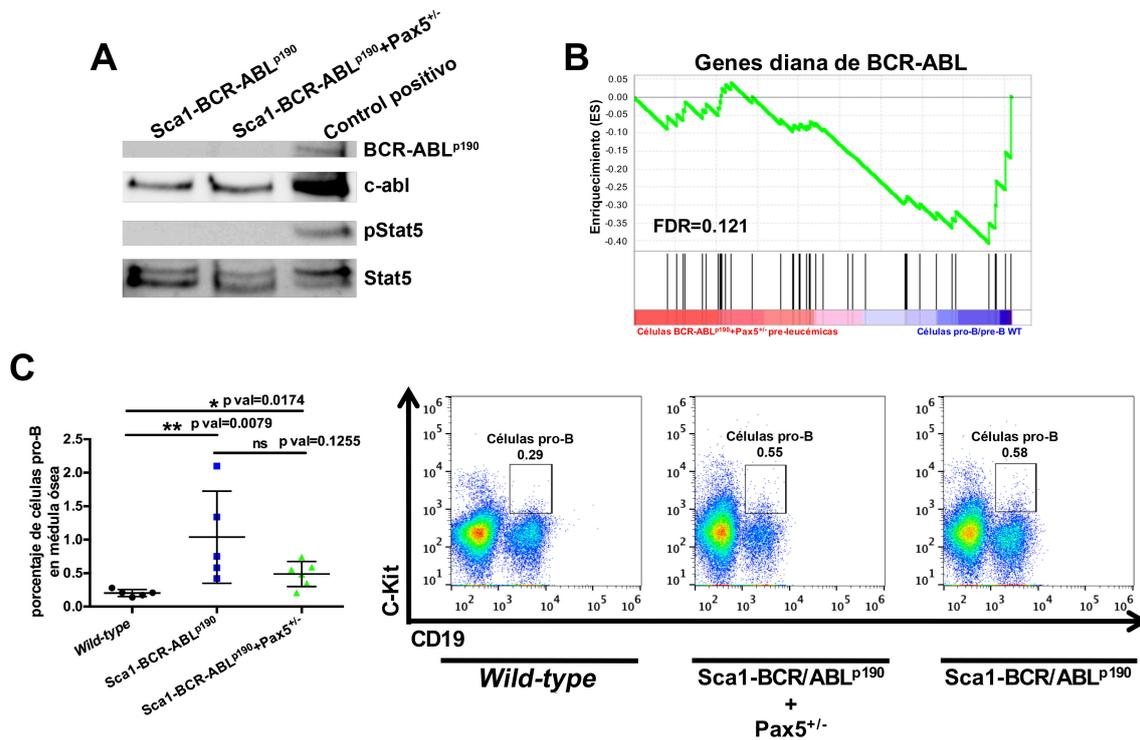


Figura 13. El modelo animal Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} presenta un defecto en el desarrollo de células B.
A) BCR-ABL^{p190} y pStat5 están ausentes en células pro-B/pre-B de médula ósea de ratones pre-leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-}. Se utilizaron c-abl y Stat5 como controles. Se utilizaron células Ba/F3 que expresan BCR-ABL^{p190} como control positivo. Experimento representativo de 2 réplicas biológicas. **B)** Análisis de GSEA que muestra que los genes diana de BCR-ABL^{p190} no están activados en células pro-B/pre-B de ratones pre-leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} comparadas con células pro-B/pre-B de ratones WT de edad similar (*gene set* "KLEIN_TARGETS_OF_BCR_ABL1_FUSION" obtenido de <http://www.broad.mit.edu/gsea/>; FDR_0.121). **C)** Porcentaje de células pro-B de médula ósea en ratones pre-leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} (n=5) de 4 meses de edad comparados con ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} (n=5) y WT (n=5) de la misma edad y analizados por citometría de flujo. Las barras de error representan la desviación estándar. Se realizó un *t-test* estadístico en cada caso. Se muestran gráficos de citometría de flujo representativos de cada línea junto al análisis estadístico.

Finalmente, debido a la dependencia de las células B precursoras murinas de la vía de señalización IL7/IL7R, decidimos analizar la respuesta a la retirada de IL7 en células pro-B pre-leucémicas de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-}. Dicho análisis mostró que las células pro-B Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} tienen una sensibilidad a la retirada de IL7 mayor que las células WT (mayor apoptosis en células pro-B Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} que en células pro-B WT tras retirar la IL7 del medio de cultivo) y, como era de esperar debido a la ausencia de expresión del oncogén BCR-ABL^{p190} en las células pro-B, la respuesta a la retirada de IL7 en células Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} fue similar a la respuesta observada en células pro-B Pax5^{+/-} (ref. ¹²⁶) (**Fig. 10C**). De esta forma, la pérdida de un alelo de *Pax5* parece generar una mayor susceptibilidad a la ausencia de IL7 en células pro-B.

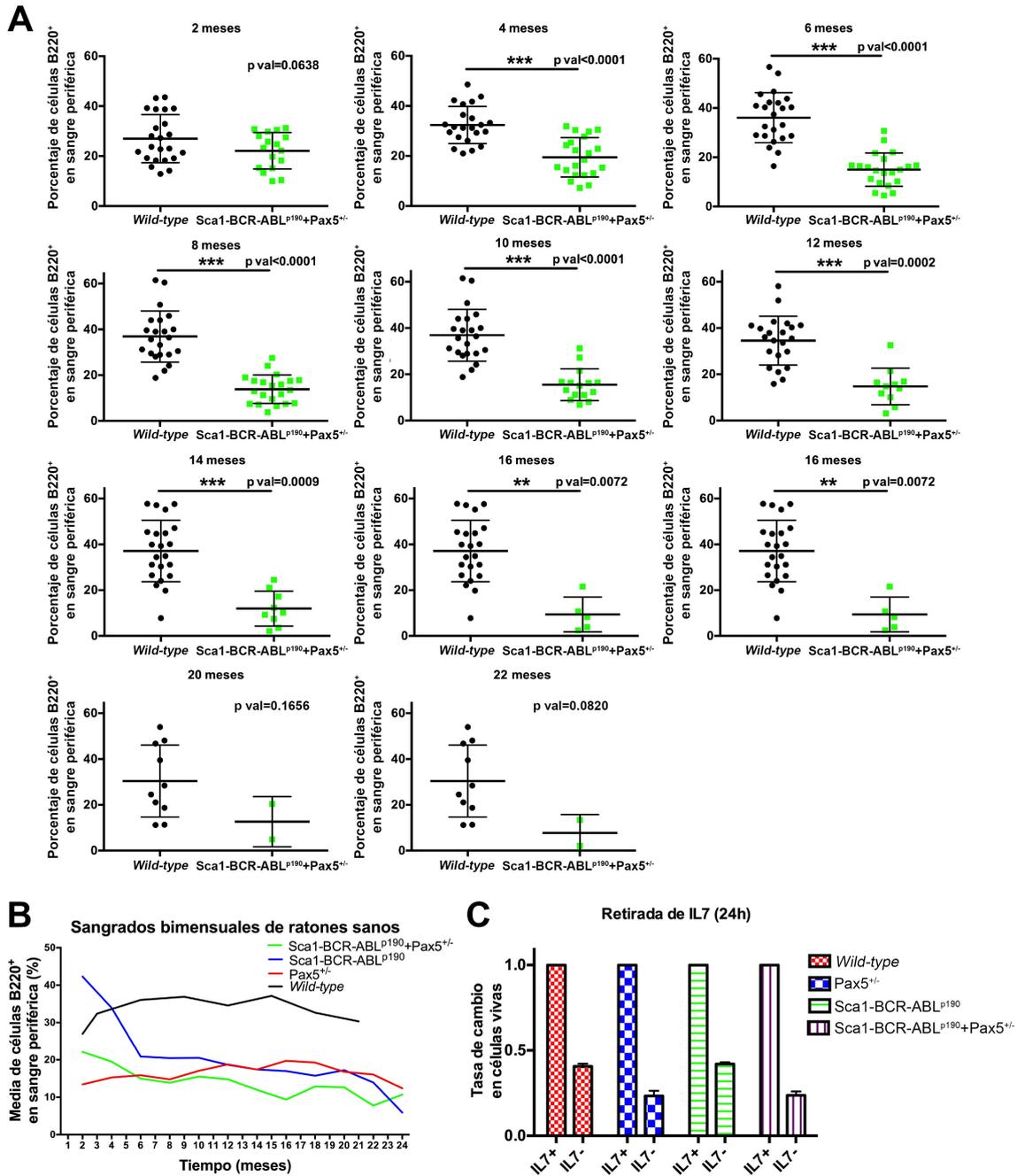


Figura 14. El modelo animal Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} presenta un defecto en el desarrollo de células B y mayor susceptibilidad a la ausencia de IL7.

A) Porcentaje de células B220⁺ en sangre periférica, analizadas por citometría de flujo, de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} (n=17-21) y ratones WT (n=21-23) en diferentes puntos de tiempo. Las barras de error representan la desviación estándar. Se realizó un *t-test* estadístico en cada caso. **B)** Representación gráfica de la media de células B220⁺ en sangre periférica, analizadas por citometría de flujo, en ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} (n=17-21), Sca1-BCR-ABL^{p190} (n=5-21), Pax5^{+/-} (n=15-34) y ratones WT (n=10-23) a lo largo del tiempo. **C)** Susceptibilidad a la muerte celular mediada por la retirada de IL7 en células pro-B Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} comparadas con células pro-B Sca1-BCR-ABL^{p190}, Pax5^{+/-} y WT. Las células pro-B fueron cultivadas durante 24h sin IL7. La inducción de la apoptosis fue evaluada mediante citometría de flujo utilizando la tinción Anexina V/ioduro de propidio. En el gráfico aparece representada la media \pm la desviación estándar de las células vivas normalizadas de 6 experimentos independientes.

2.2. El modelo murino Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} desarrolla B-ALL con alta incidencia

Una vez analizados los ratones pre-leucémicos y demostrado que la expresión del oncogén no está presente en las células diferenciadas del modelo animal Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-}, así como el defecto en el desarrollo de células B que presenta dicho modelo, decidimos realizar el seguimiento de una cohorte de 30 ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-}. Gracias al seguimiento y monitorización bimensual de dicha cohorte, pudimos observar que los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} desarrollan pB-ALL con una incidencia mucho mayor que el modelo animal Sca1-BCR-ABL^{p190}, observando que un 90% de los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} desarrollaron una pB-ALL más agresiva que el modelo animal sin la alteración secundaria (**Fig. 15A**). Estudios de citometría de flujo mostraron la presencia de blastos (B220⁺CD19⁺IgM⁻Mac1^{+/-}) en médula ósea y sangre periférica (**Fig. 15B**), así como en bazo y nódulos linfáticos (datos no mostrados). Dicha población blástica fue capaz de invadir otros tejidos hematopoyéticos y no hematopoyéticos como muestran las imágenes de histología de la **Figura 15C**. Además, estudios de PCR, realizados para analizar el reordenamiento de las cadenas de las inmunoglobulinas, confirmaron la clonalidad de las células blásticas (**Fig. 16A**). La presencia del marcador mielóide Mac1 en el inmunofenotipo de los blastos pone de manifiesto que el modelo animal reproduce la enfermedad humana, pues la co-expresión de marcadores linfoides B y mieloides es característica de la B-ALL humana BCR-ABL^{p190} positiva¹⁰⁵. Por otra parte, las células pro-B leucémicas aisladas de dicho modelo animal son capaces de crecer en medio de cultivo en ausencia de IL7 (**Fig. 16B**), confirmando así su capacidad tumorigénica.

Con el objetivo de confirmar la ausencia de expresión de BCR-ABL^{p190} en los blastos presentes en los diferentes tejidos de los animales leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} y descartar así la posibilidad de que las células leucémicas provengan de una célula *stem* que se convierta en tumoral, decidimos realizar un estudio de PCR cuantitativa que confirmó la ausencia de expresión de BCR-ABL^{p190} en los blastos de los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} (**Fig. 17A**). Además, análisis de enriquecimiento mediante GSEA demostraron que las células blásticas de los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} no tienen activada la vía de señalización de BCR-ABL (**Fig. 17B**), confirmando nuevamente que la expresión de BCR-ABL^{p190} está ausente en las células blásticas de los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}.

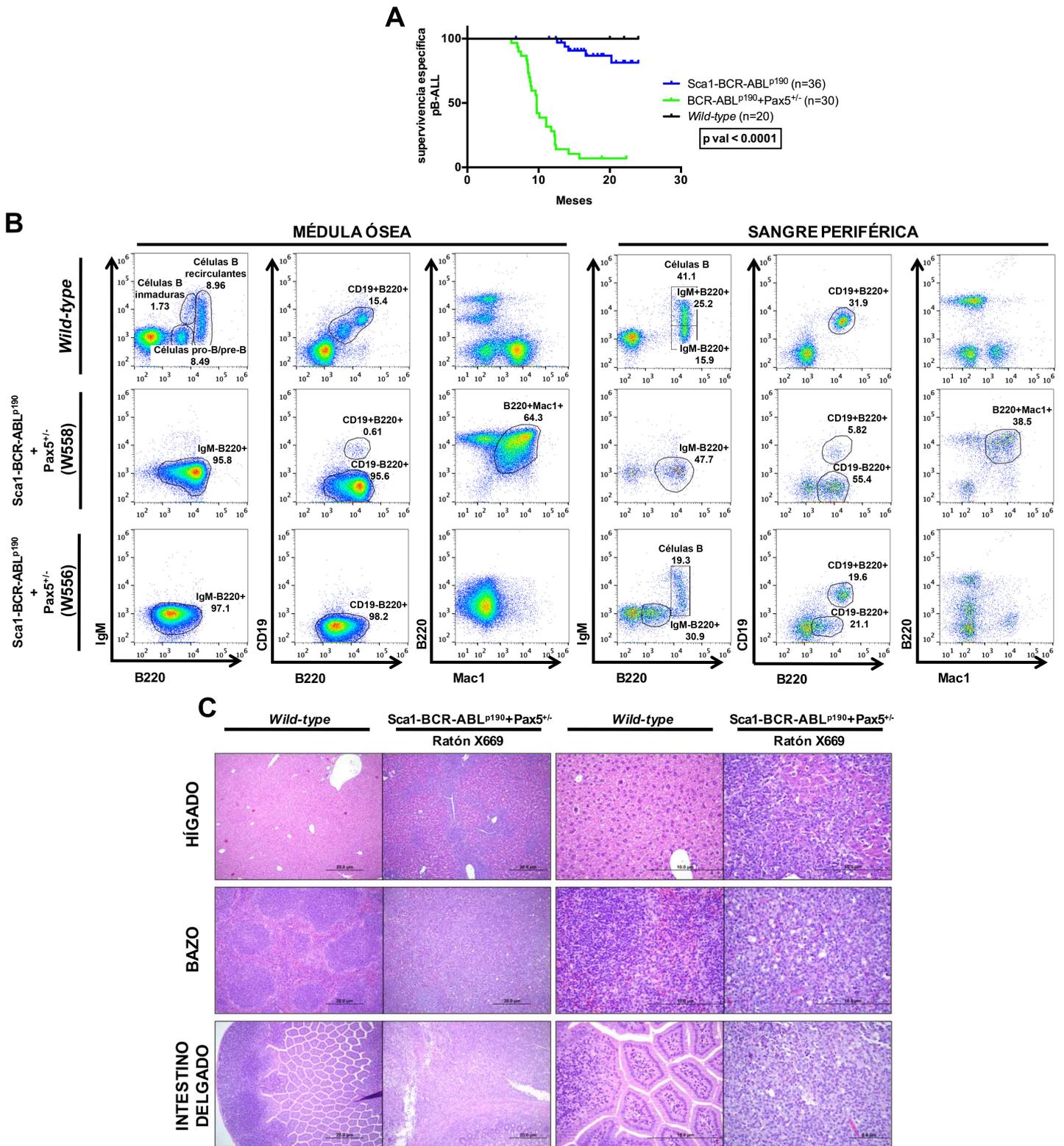


Figura 15. Los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} desarrollan pB-ALL con alta incidencia.

A) Curva de supervivencia específica a pB-ALL de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} (verde, n=30) comparada con ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} (azul, n=36) y WT (negro, n=20) (p val log-rank<0.0001). **B**) Análisis de citometría de flujo de médula ósea y sangre periférica de ratones leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} (n=27) comparados con WT (n=5). Se observa la acumulación de células blásticas en médula ósea y sangre periférica de ratones leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-}. **C**) Tinción de hematoxilina/eosina en hígado, bazo e intestino delgado de ratones leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} comparados con ratones WT. Se puede observar como los tejidos de los ratones leucémicos Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} pierden la arquitectura como consecuencia de la infiltración por células blásticas.

Una vez caracterizamos el inmunofenotipo de las células blásticas y demostramos la ausencia de expresión del oncogén en las mismas, decidimos realizar análisis de expresión génica para caracterizar dicha B-ALL y poder compararla con la B-ALL humana BCR-ABL^{p190} positiva. Estos análisis de expresión génica demostraron que las leucemias observadas en ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} se agrupan junto con las leucemias de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} (**Fig. 17C**), demostrando así que las leucemias de ambos modelos animales tienen perfiles de expresión similares. Además, los estudios de enriquecimiento realizados demostraron que las leucemias observadas en ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} están enriquecidas en el *gene set* que representa el estadio de célula pro-B murina (**Fig. 18A**). También, a pesar de la ausencia del oncogén en los blastos Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-}, se observó que las leucemias desarrolladas por el modelo animal se asemejan a las B-ALLs humanas BCR-ABL^{p190} positivas (**Fig. 18B**). Finalmente, pudimos confirmar que las células leucémicas de los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} mostraron la pérdida o, al menos, una marcada reducción de la actividad transcripcional de Pax5 (**Fig. 19**).

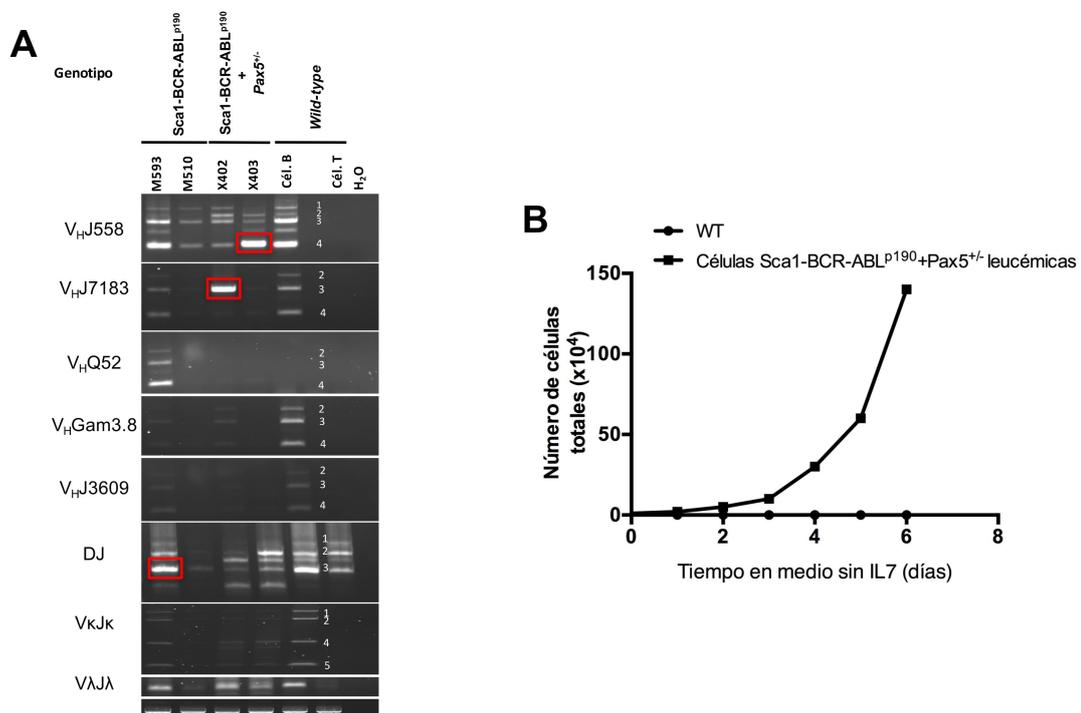


Figura 16. Las células leucémicas de los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} son independientes de IL7.
A) Clonalidad de inmunoglobulinas en médulas óseas de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} y Sca1-BCR-ABL^{p190} infiltrados por blastos B. Análisis por PCR de los reordenamientos de las inmunoglobulinas en médulas óseas de ratones leucémicos. Se usaron timocitos (células T) como control negativo y células CD19+ (células B) de bazo de ratones sanos como control positivo. Los cuadrados rojos marcan la clonalidad de las médulas óseas leucémicas (n=4). **B)** Células Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} leucémicas y pro-B WT fueron cultivadas en medio sin IL7. La proliferación fue medida utilizando Trypan blue. Los valores representan la media de 3 réplicas diferentes medidas en condiciones similares.

RESULTADOS

Teniendo en cuenta estos datos, las características de las pB-ALLs observadas en los ratones $Sca1\text{-BCR-ABL}^{p190}+Pax5^{+/-}$ solapan en gran medida con las pB-ALLs observadas en los ratones $Sca1\text{-BCR-ABL}^{p190}$. Sin embargo, el incremento de la incidencia y la agresividad de las mismas, sin afectar a la incidencia de tumores mieloides y tumores no hematopoyéticos, sugiere que el momento y el compartimento celular donde se producen las mutaciones de *Pax5* facilitan y determinan en gran medida la evolución clonal del desarrollo de pB-ALL mediado por BCR-ABL^{p190}.

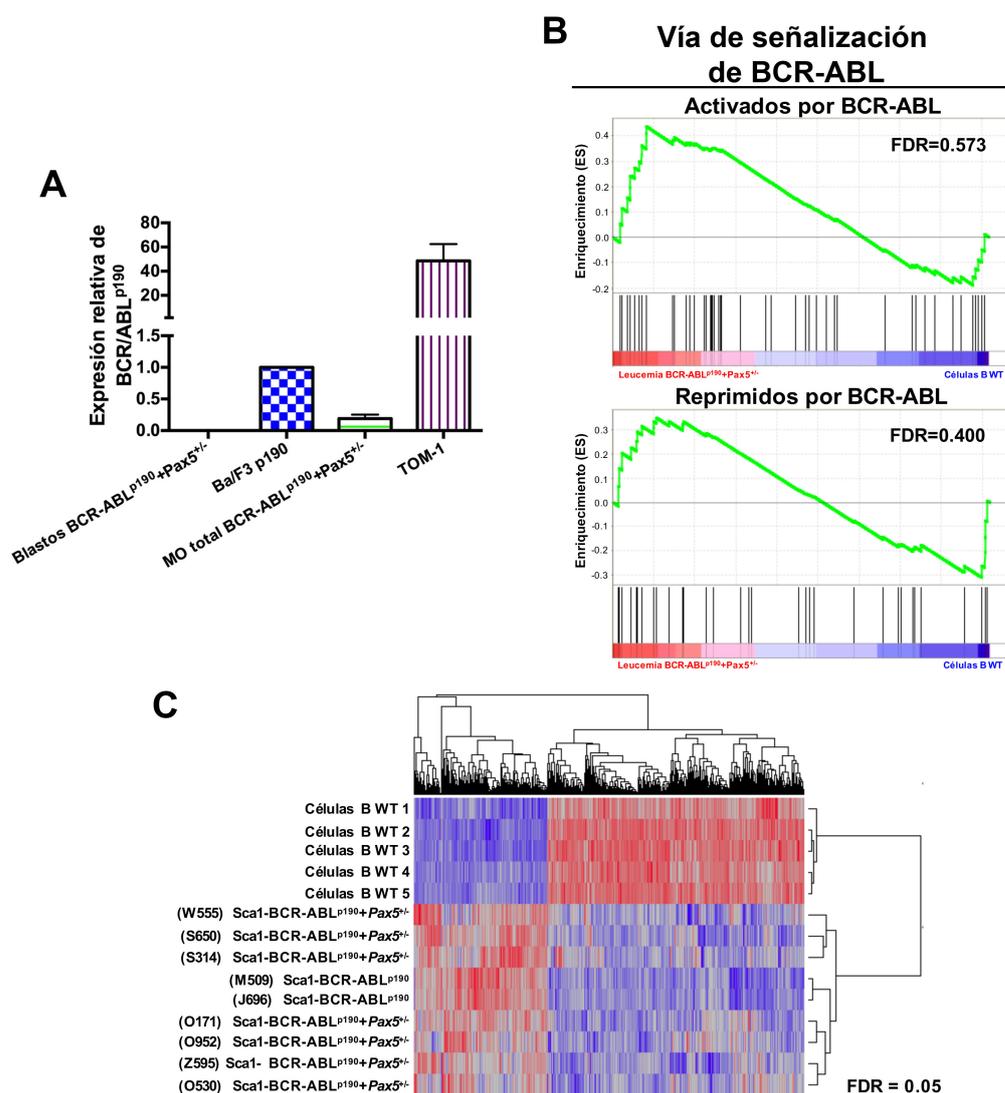


Figura 17. Análisis transcriptómico muestran que las células blásticas presentes en los ratones $Sca1\text{-BCR-ABL}^{p190}+Pax5^{+/-}$ no expresan BCR-ABL^{p190}.

A) Expresión relativa de BCR-ABL^{p190} en médula ósea de ratones WT leucémicos trasplantados con células pro-B $Sca1\text{-BCR-ABL}^{p190}+Pax5^{+/-}$, médula ósea total de ratones pre-leucémicos $Sca1\text{-BCR-ABL}^{p190}+Pax5^{+/-}$ y línea celular TOM-1, respectivamente. La línea celular Ba/F3 p190 fue utilizada como control positivo. Las barras de error representan la media \pm la desviación estándar de 3 réplicas. **B)** Análisis de enriquecimiento GSEA que muestra que la vía de señalización de BCR-ABL (extraída de¹⁴¹) no está enriquecida en células leucémicas de médula ósea de ratones $Sca1\text{-BCR-ABL}^{p190}+Pax5^{+/-}$ comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR= 0.573 y FDR=0.400). **C)** Análisis de expresión génica diferencial de médulas óseas tumorales de 2 ratones $Sca1\text{-BCR-ABL}^{p190}$ y 7 ratones $Sca1\text{-BCR-ABL}^{p190}+Pax5^{+/-}$ comparadas con células B220⁺ de médula ósea de 5 ratones WT (FDR=0.05).

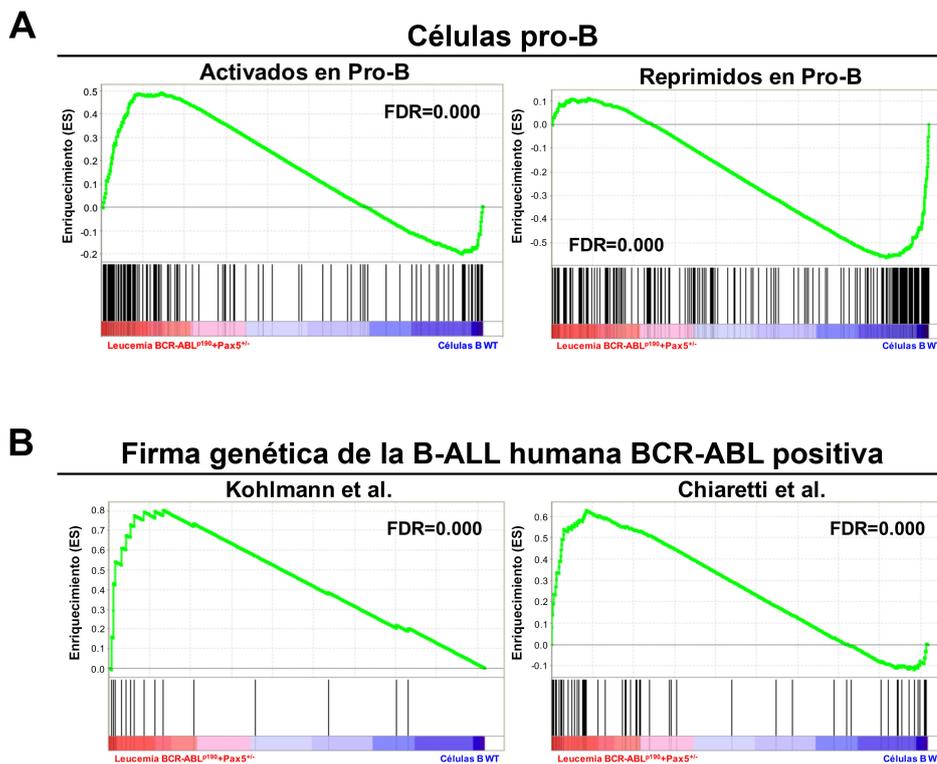


Figura 18. Análisis transcriptómicos muestran que las B-ALLs desarrolladas por los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} son similares a las leucemias humanas.

A) Análisis de GSEA que demuestra que las células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} están enriquecidas en *gene sets* que representan el estadio pro-B del desarrollo B de ratón (extraídos de¹³⁹) comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000 y FDR=0.000). **B)** Análisis GSEA que muestra que las células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} están enriquecidas en *gene sets* que representan la firma genética de la B-ALL humana BCR-ABL positiva (extraídos de^{142,143}) comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (Kohlmann: FDR=0.000; Chiaretti: FDR=0.000).

Genes regulados por Pax5

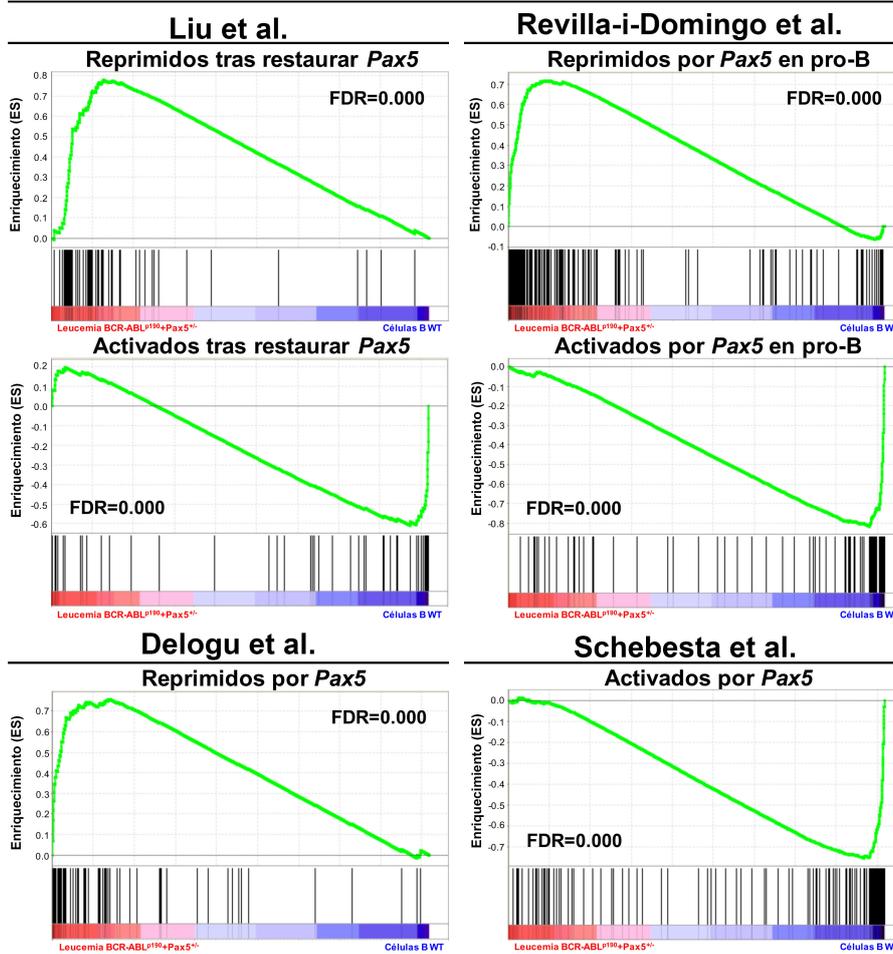


Figura 19. La actividad transcripcional de Pax5 está reducida en células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-}.

Análisis de GSEA identificaron enriquecimiento en “genes reprimidos tras restaurar Pax5” (extraído de¹³⁶) en células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), también identificaron enriquecimiento negativo en “genes activados tras restaurar Pax5” (extraído de¹³⁶) en células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), mostrando una correlación inversa. Análisis de GSEA identificaron enriquecimiento en “genes reprimidos por Pax5 en pro-B” (extraído de¹³¹) en células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), también identificaron enriquecimiento negativo en “genes activados por Pax5 en pro-B” (extraído de¹³¹) en células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), mostrando una correlación inversa. Análisis de GSEA identificaron enriquecimiento en el *gene set* “reprimidos por Pax5” (extraído de¹²⁹) en células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), también identificaron enriquecimiento negativo en el *gene set* “activados por Pax5” (extraído de¹³⁰) en células leucémicas de médula ósea de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), mostrando una correlación inversa.

2.3. Identificación de Pax5 como obstáculo para la selección clonal en el desarrollo de B-ALL BCR-ABL^{p190} positiva

Para validar estos descubrimientos a nivel genómico, así como para identificar mutaciones somáticas secundarias que juegan un papel en el desarrollo de la B-ALL, decidimos realizar estudios de secuenciación del exoma (WES, por sus siglas en inglés) de 3 ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} y 13 ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-}. En los estudios de WES se secuenció DNA de médulas óseas totales que provenían de ratones leucémicos y se utilizó DNA de cola de los mismos animales como control. De este modo, se utiliza como control el DNA de línea germinal de cada animal. Las variantes somáticas observadas tras comparar el DNA tumoral con el DNA de línea germinal de cada animal mostraron que los genes *Jak3* y *Pax5* estaban mutados de forma recurrente en los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-}, mientras que los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} mostraron un espectro de mutaciones heterogéneo (**Fig. 20A-B**).

Centrándonos en *Pax5*, se observó una variedad de diferentes mutaciones en el gen (*Pax5* p.V26G, p.P32L, p.R38C, p.I54N, p.P80R y p.P80L) en un 46% de los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-}, todas ellas localizadas en el dominio de unión al DNA (**Fig. 21A**), una región del gen muy conservada entre especies. Gracias a la adquisición de DNA de sangre periférica durante los sangrados bimensuales realizados a los animales transgénicos, pudimos monitorizar la evolución de la enfermedad a lo largo del tiempo y analizar en qué momento se produce la mutación en el segundo alelo de *Pax5*, pudiendo así determinar la relevancia que tiene dicha mutación en el desarrollo de la enfermedad. Mediante análisis de secuenciación pudimos observar que la mutación en *Pax5* era solamente detectable en las muestras tumorales (**Fig. 21B**), enfatizando así la importancia de dichas mutaciones en el desarrollo de la enfermedad.

Se ha demostrado que, en humanos, las mutaciones *PAX5* p.P80R y p.V26G provocan una disminución de la actividad del gen^{52,68}. Por ello, quisimos analizar mediante estudios con un gen reportero dependiente de Pax5¹⁴⁴ si las mutaciones observadas en los ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} provocan también una reducción de la actividad transcripcional del gen. Gracias a dichos estudios, confirmamos que las mutaciones observadas en los ratones leucémicos provocan una disminución significativa de la actividad transcripcional de Pax5 comparadas con la actividad transcripcional de Pax5 WT (**Fig. 21C**).

RESULTADOS

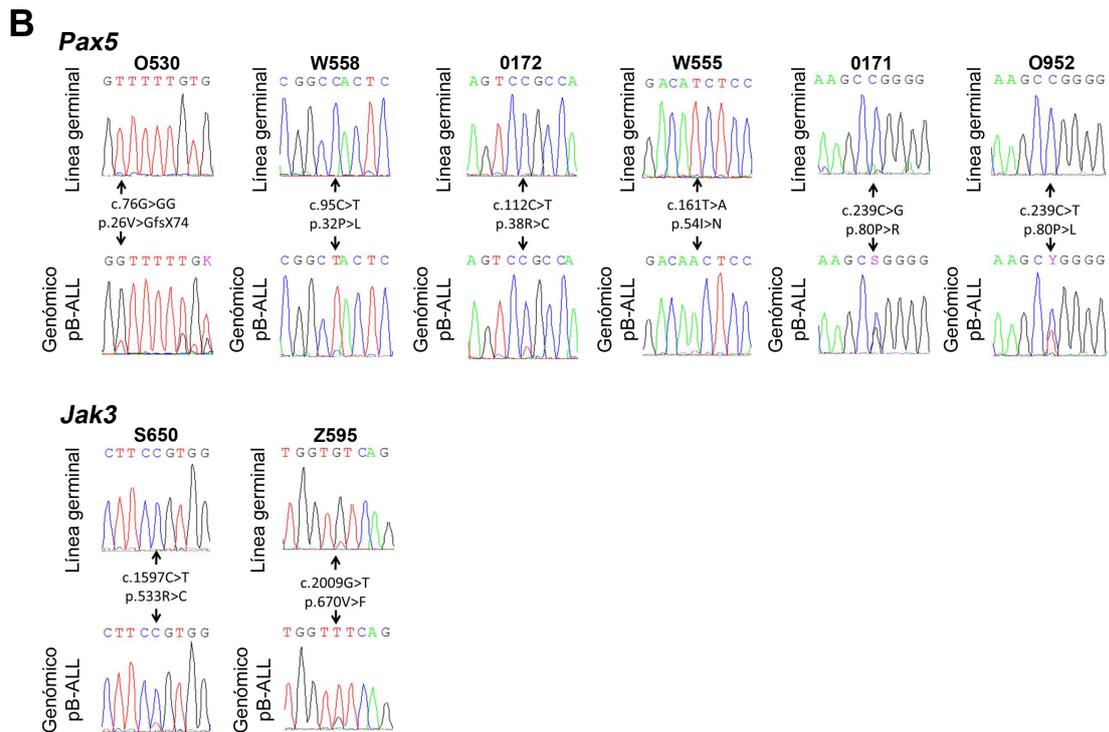
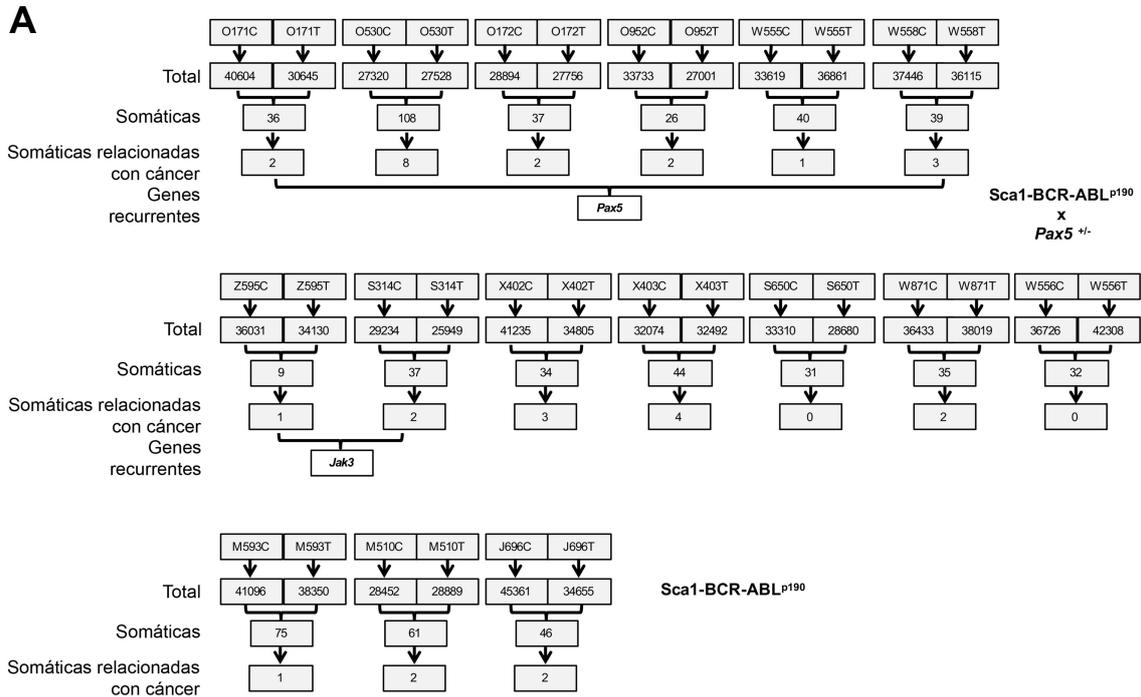


Figura 20. La secuenciación de las leucemias de los animales transgénicos identificó mutaciones recurrentes en los genes Pax5 y Jak3.

A) Análisis de secuenciación del exoma (WES) revelaron una media de 35.000 SNVs (variantes de nucleótidos) a lo largo del exoma. Se identificó una media de 40 SNVs somáticas tras el análisis con MUTECT. Se observaron mutaciones recurrentes en los genes Pax5 y Jak3. **B)** Validación por Sanger Sequencing de las mutaciones puntuales encontradas en los genes Pax5 y Jak3.

Finalmente, análisis de secuenciación del genoma (WGS, por sus siglas en inglés) revelaron deleciones en el gen *Pax5* en otro ratón *Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-}* (W556). Sorprendentemente, mediante estudios de PCR, fueron detectadas deleciones similares a la encontrada por WGS en otros dos ratones leucémicos *Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-}* (S650 y S314) (**Fig. 21D-E**).

Estos resultados ponen de manifiesto que, en el momento en que se produce la selección clonal en B-ALLs mediadas por *BCR-ABL^{p190}*, la eliminación o la reducción significativa de la actividad de *Pax5* es crítica para la progresión de la enfermedad.

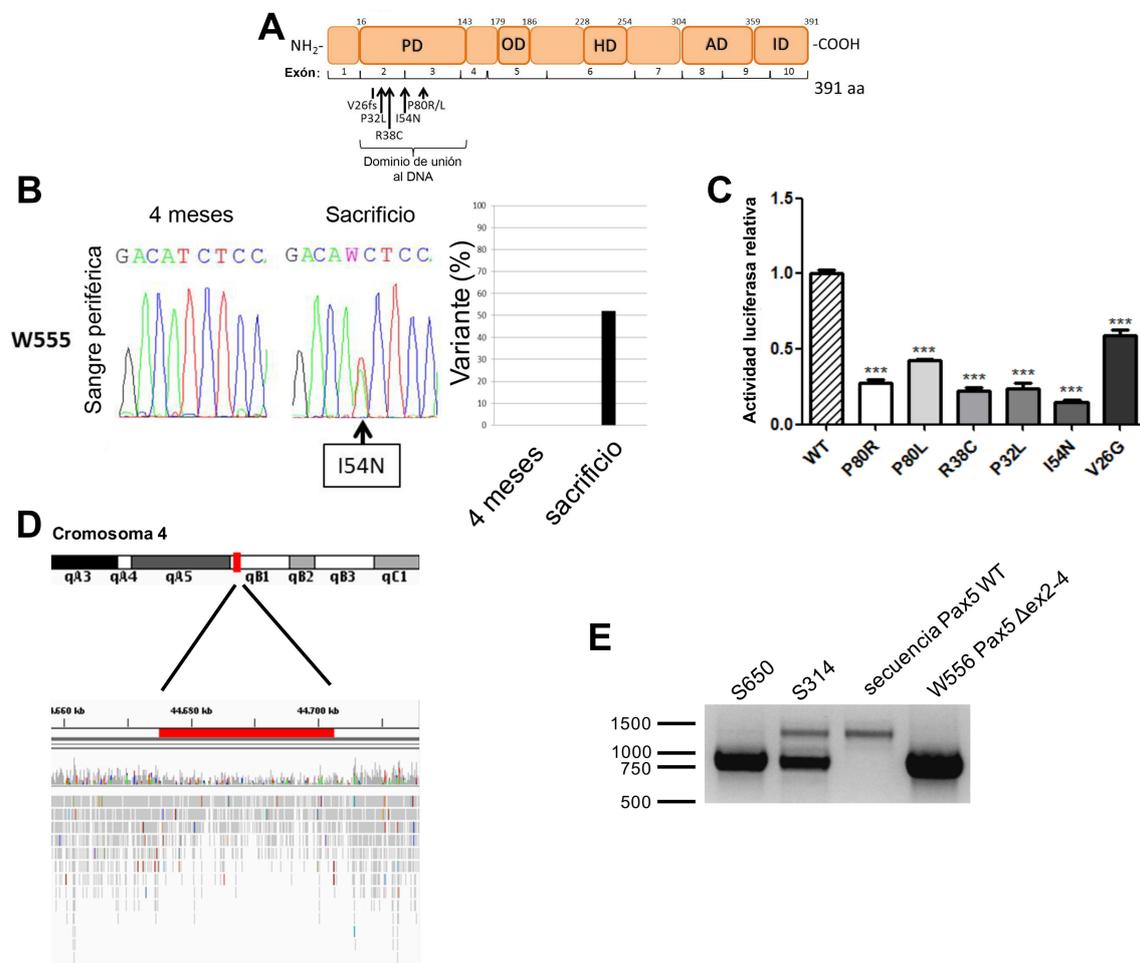


Figura 21. La secuenciación del exoma de los tumores de los ratones transgénicos identificó el segundo *hit* en el alelo WT de *Pax5*.

A) Representación esquemática de los diferentes dominios del gen *Pax5*. Se indican mediante flechas las diferentes mutaciones identificadas mediante WES en los ratones leucémicos *Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-}*. Todas ellas están localizadas en el dominio de unión al DNA. **B)** Rastreo del momento de aparición de la mutación en el segundo alelo de *Pax5*. Ejemplo de análisis de mutación *Pax5* p.I54N mediante *Sanger Sequencing* utilizando DNA de sangre periférica de un ratón *Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-}* a lo largo del tiempo. La mutación es únicamente detectable en el momento en el que el ratón ha desarrollado B-ALL (n=2). **C)** Actividad transcripcional reducida en las proteínas *Pax5* mutantes. La actividad luciferasa relativa es indicada para *Pax5^{WT}* y *Pax5^{mutantes}*. Dicha actividad fue medida mediante el análisis de un gen reportero dependiente de *Pax5* en células Hek293T, las cuales fueron transfectadas con las construcciones de las diferentes variantes mutantes de *Pax5*. Las barras muestran la media de la actividad luciferasa de tres experimentos independientes. **D)** Análisis mediante WGS identificaron una deleción de más de 27kb en el gen *Pax5* del ratón leucémico W556. **E)** Análisis de PCR mostraron que dos ratones leucémicos presentaban deleciones en el gen *Pax5* similares al ratón W556. cDNA de médula ósea total de un ratón sano *Pax5^{+/-}* fue utilizada como control.

2.4. La reducción de la actividad de Pax5 dirige un cambio metabólico hacia la producción de energía en células leucémicas que no expresan BCR-ABL^{p190}

Con el objetivo de determinar el mecanismo por el cual la reducción de la actividad de Pax5 desencadena la progresión de la B-ALL, decidimos realizar análisis metabólicos en las células leucémicas. Recientemente, el grupo de Markus Müschen ha publicado que genes que codifican para factores de transcripción de células B, como *Ikzf1* o *Pax5*, también están involucrados en la represión de la glicolisis y del aporte energético, postulando que, en el desarrollo de la B-ALL, la heterozigosidad en *Pax5* facilita el incremento de aporte energético demandado por el oncogén¹⁴⁵.

En nuestro caso, quisimos analizar el metabolismo energético en nuestro modelo animal, es decir, sin expresión del oncogén BCR-ABL^{p190} en las células leucémicas. En primer lugar, realizamos análisis transcriptómicos que demostraron que los genes que participan en la glicolisis están fuertemente activados en las células leucémicas de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} y ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} comparados con células B de médula ósea de ratones WT (**Fig. 22**). Por otro lado, análisis metabólicos mostraron que el consumo de glucosa, la producción de lactato y los niveles totales de ATP están incrementados (~1,7 veces, ~1,4 veces y ~3 veces, respectivamente) en células pro-B provenientes de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} sanos que tienen ambos alelos WT de *Pax5* (**Fig. 23A**). De forma similar, se observó un incremento del consumo de glucosa (~1,3 veces), de la producción de lactato (~1,2 veces) y de los niveles totales de ATP (~3 veces) en células pro-B provenientes de ratones Pax5^{+/-} sanos comparadas con células pro-B provenientes de ratones WT (**Fig. 23A**). Estos resultados sugieren que la deficiencia en Pax5 podría mediar la progresión de la B-ALL promoviendo el consumo de glucosa y su metabolismo.

De acuerdo con estos resultados, los análisis metabólicos realizados en células leucémicas Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} mostraron un enorme incremento en el consumo de glucosa (~55 veces), la producción de lactato (~37 veces) y los niveles totales de ATP (~16 veces) (**Fig. 23B**). Para obtener más información acerca del papel metabólico de Pax5 en el desarrollo de B-ALL, se monitorizaron los perfiles glicolíticos en condiciones basales (actividad glicolítica) y en respuesta a oligomicina (un inhibidor de la ATP sintasa). La oligomicina suprime la producción mitocondrial de ATP, provocando un incremento en la glicolisis que compense la demanda de energía de la célula (capacidad glicolítica). De acuerdo con las observaciones anteriores, las actividades glicolíticas de células pro-B provenientes de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} sanos y ratones

Pax5^{+/-} sanos fueron elevadas (~2 veces y ~2-3 veces, respectivamente) en comparación con células pro-B provenientes de ratones WT (**Fig. 23C**). Del mismo modo, las capacidades glicolíticas de células pro-B provenientes de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190} sanos y ratones *Pax5*^{+/-} sanos fueron elevadas (~2 veces y ~4-5 veces, respectivamente) en comparación con células pro-B provenientes de ratones WT (**Fig. 23D**). Además, las células leucémicas Sca1-BCR-ABL^{p190}+*Pax5*^{+/-} mostraron incrementos significativos en actividad glicolítica (~5-6 veces) y capacidad glicolítica (~9-10 veces) (**Fig. 23C-D**).

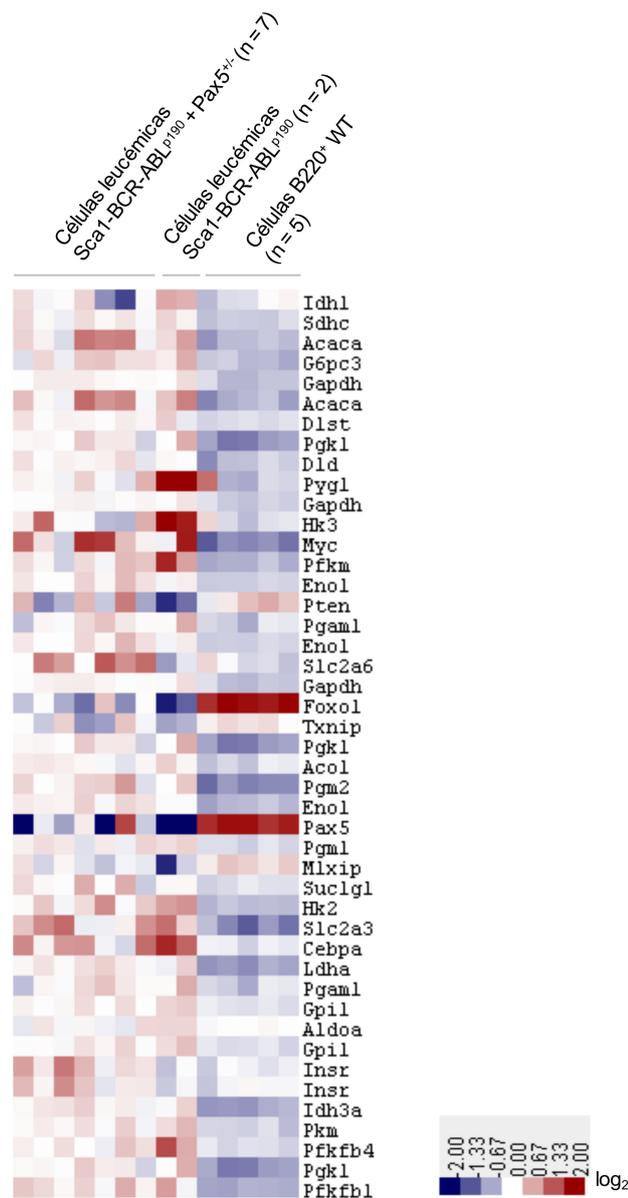


Figura 22. Cambios de expresión génica en reguladores del consumo de glucosa y del aporte de energía. Cambios de expresión génica en reguladores del consumo de glucosa y del aporte de energía en células leucémicas Sca1-BCR-ABL^{p190} (n=2), Sca1-BCR-ABL^{p190}+*Pax5*^{+/-} (n=7) y células B WT de médula ósea (n=5) representados en un *heat map*.

RESULTADOS

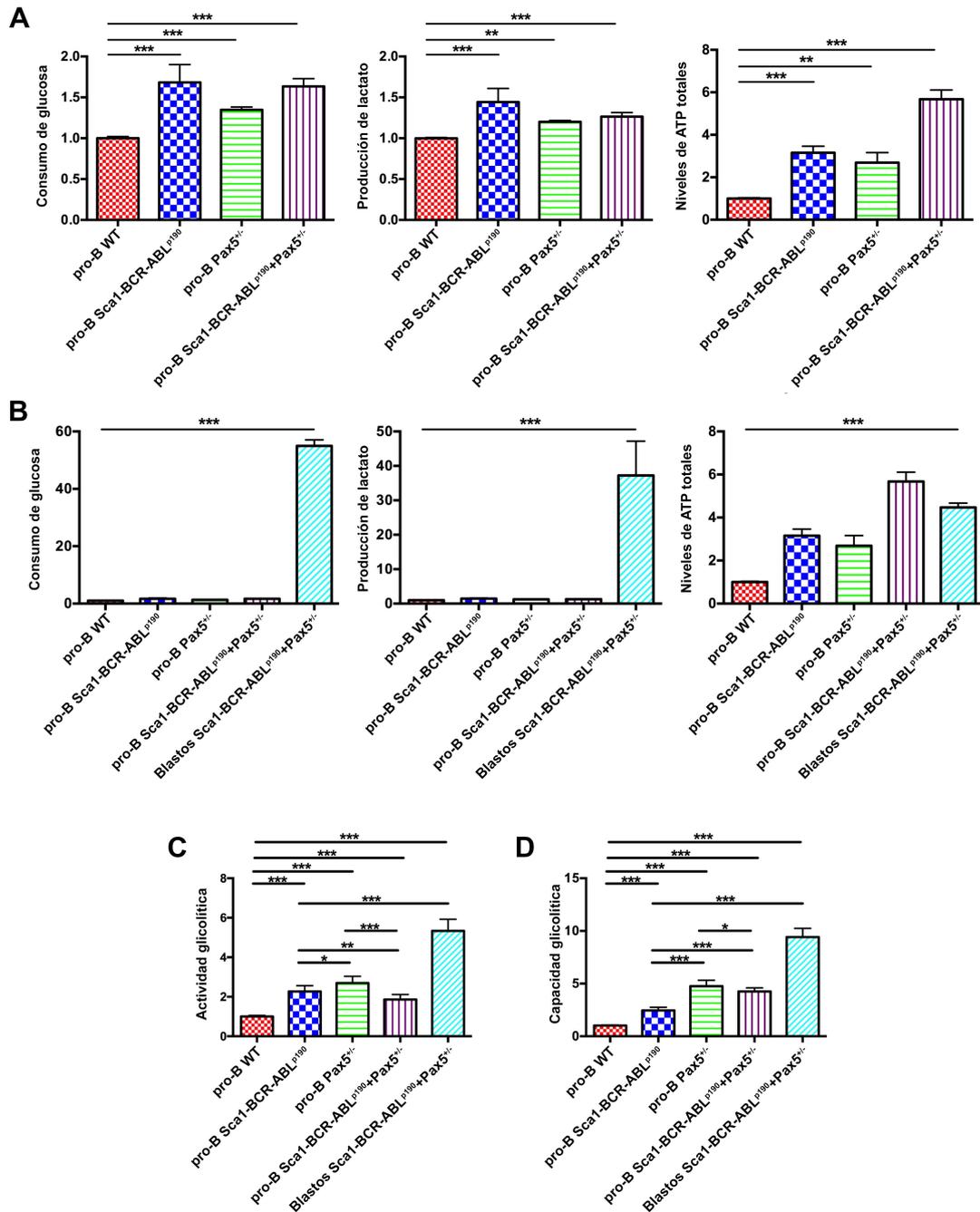


Figura 23. Producción de energía glicolítica en células leucémicas que no expresan BCR-ABL^{P190}.

A) Medición del consumo de glucosa, producción de lactato y niveles de ATP totales en células pro-B provenientes de ratones sanos (4 meses de edad). El día 3 tras ser cultivadas *in vitro*, las células y el medio fueron recogidos y procesados para las mediciones metabólicas. Los valores fueron normalizados respecto al número de células y son mostrados como cantidades medias relativas a los valores medios del control WT \pm la desviación estándar (n=3). **B)** Medición del consumo de glucosa, producción de lactato y niveles de ATP totales en células pro-B provenientes de ratones sanos (4 meses de edad) comparadas con células leucémicas de ratones Sca1-BCR-ABL^{P190}+Pax5^{-/-}. El día 3 tras ser cultivadas *in vitro*, las células y el medio fueron recogidos y procesados para las mediciones metabólicas. Los valores fueron normalizados respecto al número de células y son mostrados como cantidades medias relativas a los valores medios del control WT \pm la desviación estándar (n=3). **C)** Tasa de acidificación extracelular medida en condiciones basales (actividad glicolítica). Los valores fueron normalizados respecto al número de células y son mostrados como cantidades medias relativas a los valores medios del control WT \pm la desviación estándar (n=3). **D)** Tasa de acidificación extracelular medida en respuesta a oligomicina (capacidad glicolítica). Los valores fueron normalizados respecto al número de células y son mostrados como cantidades medias relativas a los valores medios del control WT \pm la desviación estándar (n=3).

La transformación de las células leucémicas impone unos requerimientos de aporte de energía muy elevados para soportar la síntesis molecular que se produce durante la proliferación. Nuestros resultados sugieren que la reducción en la actividad de Pax5 dirige la progresión de la enfermedad, incluso en ausencia de expresión de BCR-ABL^{p190} en las células tumorales, mediante el ajuste del consumo de glucosa y del metabolismo energético.

Por todo ello, podemos decir que BCR-ABL^{p190} no tiene un papel dominante en el desarrollo de la B-ALL, sino que confiere una susceptibilidad que, únicamente gracias a la reducción de la actividad transcripcional de Pax5, que actúa como *driver*, desemboca en el desarrollo de la enfermedad.

3. La exposición a la infección es un agente causal en el desarrollo de pB-ALL como resultado de la susceptibilidad proporcionada por mutaciones heredadas en *Pax5*

Recientemente ha sido publicado que, además del papel de *PAX5* como alteración secundaria en el desarrollo de la B-ALL, *PAX5* podría tener el rol gen de susceptibilidad al desarrollo de B-ALL en humanos^{67,68}. Por otra parte, las infecciones han sido el agente ambiental que más enérgicamente ha sido propuesto como posible causante del desarrollo de la enfermedad; sin embargo, no hay evidencias científicas que avalen la hipótesis de la infección como agente causal del desarrollo de B-ALL en humanos. Del mismo modo, estudios en modelos animales han mostrado que la exposición a la infección no causa desarrollo de B-ALL en ratones WT, sugiriendo que la exposición a la infección no está involucrada en el desarrollo de B-ALL. Sin embargo, podría ser posible que la exposición a la infección pudiera favorecer el desarrollo de B-ALL en individuos con una susceptibilidad genética intrínseca. Por ello, con el fin de determinar la posible relación entre exposición a la infección y desarrollo de leucemia en individuos con susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad, decidimos utilizar ratones *Pax5*^{+/-} como modelo animal.

3.1. Generación de un diseño experimental que permita el estudio de la relación entre la exposición a la infección y el desarrollo de pB-ALL

La decisión de utilizar ratones *Pax5*^{+/-} como modelo animal para estudiar la relación entre la exposición a la infección y el desarrollo de pB-ALL fue debida a los siguientes motivos: (1) El reciente descubrimiento de *PAX5* como gen de susceptibilidad al desarrollo de B-ALL^{67,68}, asociándose la presencia de mutaciones heredadas en *PAX5* con el desarrollo de pB-ALL en un 30% de los miembros de la familia que poseen la mutación. (2) Ha sido publicado que el modelo animal *Pax5*^{+/-} no desarrolla B-ALL cuando es estabulado en condiciones SPF^{135,146}.

Una vez tomada la decisión de utilizar ratones *Pax5*^{+/-} como modelo animal, en primer lugar, se generó una cohorte compuesta por ratones *Pax5*^{+/-} y WT que nacieron y fueron mantenidos en condiciones SPF durante 2 años (**Fig. 24A**). La monitorización de esta cohorte nos permitió observar que ni los animales *Pax5*^{+/-} ni los animales WT desarrollan pB-ALL cuando son estabulados en condiciones SPF (**Fig. 24B**), confirmando así resultados previamente publicados por otros grupos de investigación^{135,146}.

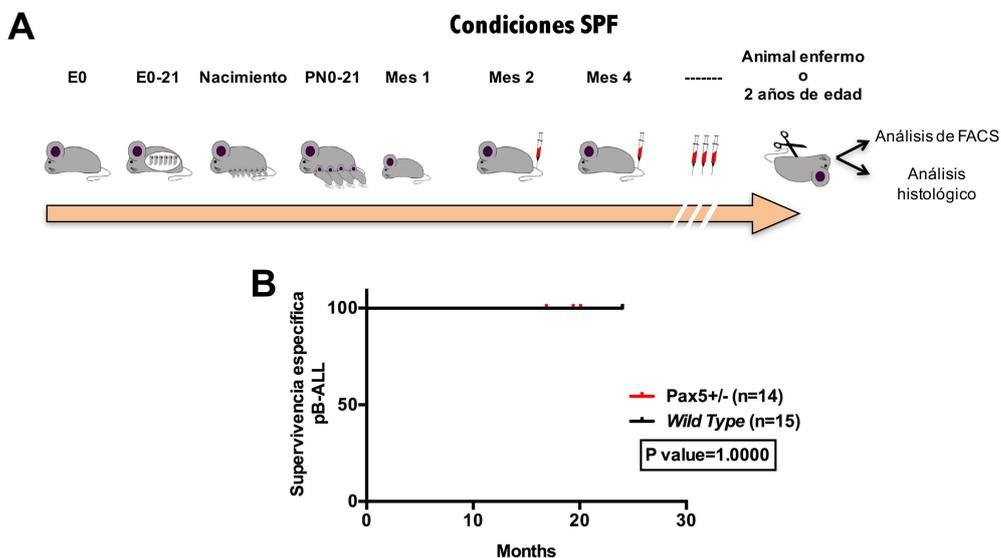


Figura 24. Los ratones *Pax5*^{+/-} y *wild-type* no desarrollan pB-ALL en condiciones SPF.
A) Diseño experimental. Ratones *Pax5*^{+/-} y ratones *wild-type* nacen y son mantenidos en condiciones SPF. **B)** Curva de supervivencia específica a pB-ALL de ratones *Pax5*^{+/-} mantenidos en condiciones SPF (rojo; n=14) comparada con ratones WT (negro; n=15) (p val log-rank=1.0000).

En segundo lugar, se generó una cohorte compuesta por ratones *Pax5^{+/-}* y WT que nacieron y fueron mantenidos en condiciones SPF hasta ser trasladados a condiciones de exposición a infección debido a su estabulación en un animalario convencional (CF, por sus siglas en inglés) (**Fig. 25A**). De esta forma, generamos un diseño experimental que mimetizaría la exposición tardía a la infección en niños, como ha sido postulado en las “hipótesis de la infección” en el desarrollo de B-ALL de M. Greaves y L. Kinlen. La monitorización de dicha cohorte será expuesta en la siguiente sección.

3.2. La exposición a infección provoca el desarrollo de pB-ALL en ratones *Pax5^{+/-}*

Una vez generada la cohorte de ratones con exposición tardía a la infección, estos fueron monitorizados durante 2 años (**Fig. 25A**). El estatus microbiológico en el animalario convencional fue definido y monitorizado durante los 2 años de seguimiento (**Tabla 2**). En este escenario, pudimos comprobar que un 22% (9 de 41) de los ratones *Pax5^{+/-}* desarrolló pB-ALL, mientras que ningún animal WT desarrolló la enfermedad (**Fig. 25B-C y Fig. 26A-B**). La baja incidencia de pB-ALL en los ratones *Pax5^{+/-}* reproduce la baja ocurrencia de desarrollo de pB-ALL observada en las familias que poseen la mutación heterocigota *PAX5* c.547G>A^{67,68}.

Con el objetivo de determinar si el momento en el que los animales son expuestos a infección juega un papel determinante en el desarrollo de la pB-ALL, los ratones fueron movidos desde condiciones SPF a condiciones CF cuando tenían entre 5 y 21 semanas de edad. No se observó relación entre el desarrollo de la enfermedad y el momento de inicio de exposición a la infección, por lo que podemos confirmar que el momento de exposición tardía a la infección no juega un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad.

Estudios de citometría de flujo mostraron la presencia de blastos (B220⁺CD19^{+/-}IgM⁻) en médula ósea y sangre periférica (**Fig. 25C**), así como bazo y nódulos linfáticos (datos no mostrados). Dicha población blástica fue capaz de invadir otros tejidos hematopoyéticos y no hematopoyéticos, como muestran las imágenes de histología de la **figura 26A**. La infiltración de las células blásticas en el bazo se manifestó mediante las esplenomegalias observadas en los ratones *Pax5^{+/-}* con pB-ALL (datos no mostrados). Además, los estudios de PCR realizados para analizar el reordenamiento de las cadenas de las inmunoglobulinas confirmaron la clonalidad de las células blásticas (**Fig. 26B**).

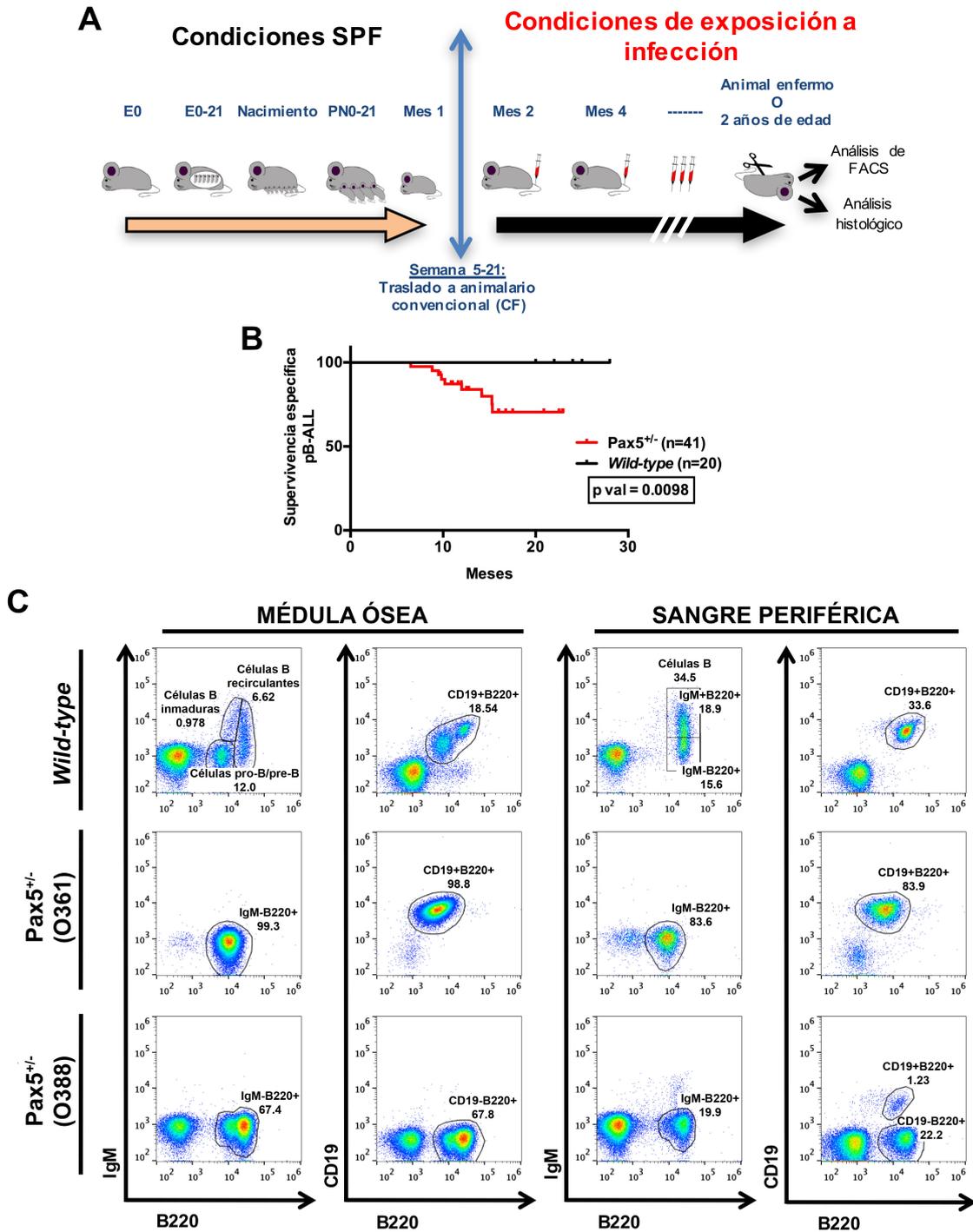


Figura 25. La heterozigosidad en *Pax5* y la exposición a infección colaboran en el desarrollo de pB-ALL.
A) Diseño experimental. Los ratones *Pax5*^{+/-} y ratones *wild-type* nacen en condiciones SPF y son mantenidos en ellas hasta que son trasladados a condiciones de exposición a infección (CF). **B)** Curva de supervivencia específica a pB-ALL de ratones *Pax5*^{+/-} mantenidos en condiciones de exposición a infección (rojo; n=41) comparada con ratones WT (negro; n=20) (p val log-rank=0.0098). **C)** Análisis de citometría de flujo de médula ósea y sangre periférica de ratones leucémicos *Pax5*^{+/-} (n=9) comparados con WT (n=4). Se observa la acumulación de células blásticas en médula ósea y sangre periférica de ratones leucémicos *Pax5*^{+/-}.

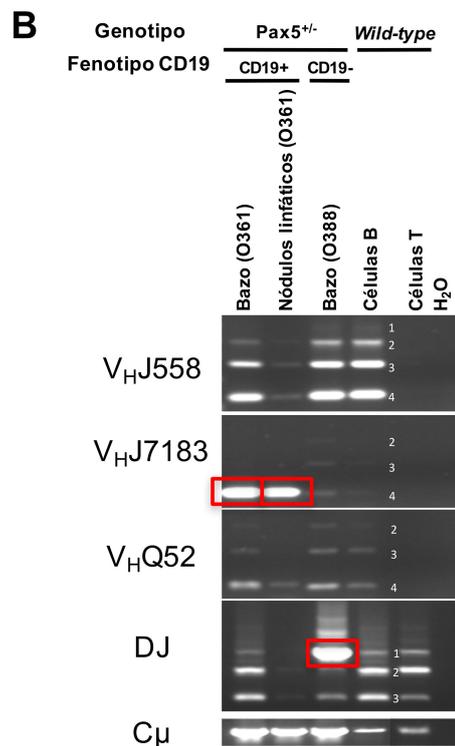
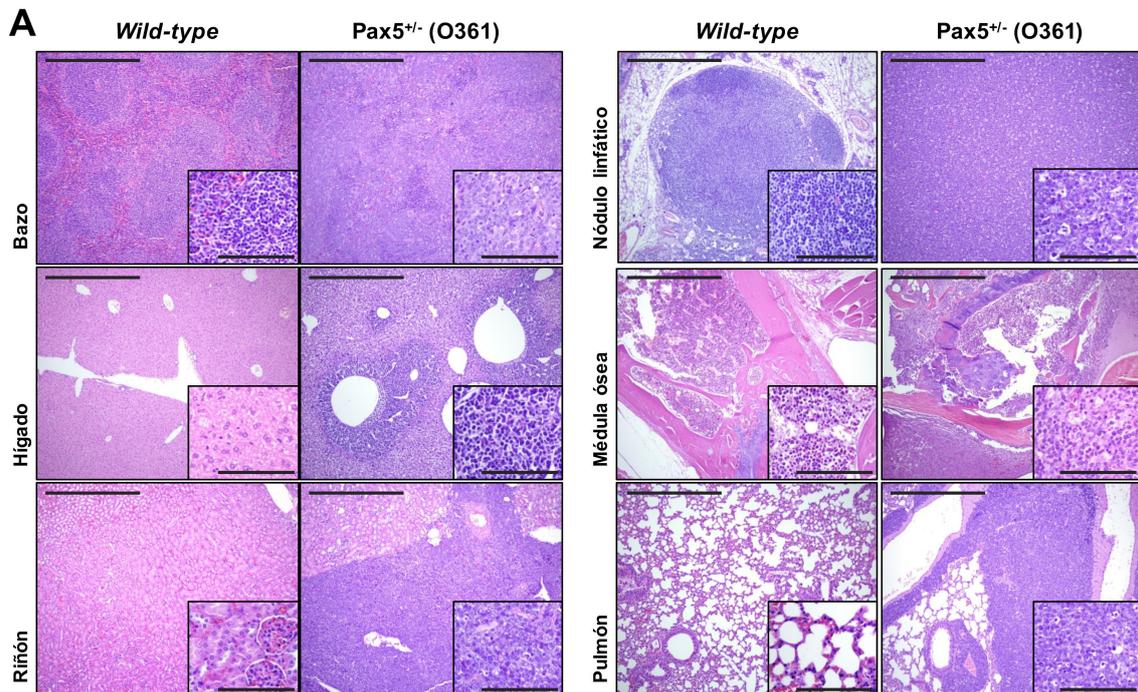


Figura 26. Las células leucémicas de los ratones Pax5^{+/-} invaden otros tejidos.

A) Tinción de hematoxilina/eosina en bazo, hígado, riñón, nódulos linfáticos, médula ósea y pulmón de ratones leucémicos Pax5^{+/-} comparado con ratones WT. Se puede observar como los tejidos de los ratones leucémicos Pax5^{+/-} pierden la arquitectura como consecuencia de la infiltración por células blásticas. **B)** Clonalidad de inmunoglobulinas en bazo y nódulos linfáticos de ratones Pax5^{+/-} infiltrados por blastos B. Análisis por PCR de los reordenamientos de las inmunoglobulinas en bazo y nódulos linfáticos de ratones leucémicos. Se usaron timocitos (células T) como control negativo y células CD19⁺ (células B) de bazos de ratones sanos como control positivo. Los cuadrados rojos marcan la clonalidad de las células leucémicas.

RESULTADOS

Tabla 2. Estatus microbiológico de los animalarios.

ESTATUS MICROBIOLÓGICO DEL ANIMALARIO CONVENCIONAL				ESTATUS MICROBIOLÓGICO DEL ANIMALARIO SPF
Cronograma	Momento en que los ratones fueron trasladados al animalario convencional	1 año después	2 años después	
VIRUS				
MAD (Adenovirus tipo 1 y 2)	NEG	NEG	NEG	NEG
MCMV (Cytomegalovirus de ratón)	NEG	NEG	NEG	NEG
LCMV (Coriomeningitis linfocítica)	NEG	NEG	NEG	NEG
Ectromelia	NEG	NEG	NEG	NEG
EDIM	NEG	NEG	NEG	NEG
Virus Hanta	NEG	NEG	NEG	NEG
MHV (Virus de la hepatitis de ratón)	POS	POS	POS	NEG
MVM (Minute virus)	NEG	NEG	NEG	NEG
MPV (Parvovirus tipo 1 y 2)	NEG	NEG	NEG	NEG
PVM (Virus Pneumonía)	NEG	NEG	NEG	NEG
Reovirus tipo 3	NEG	NEG	NEG	NEG
Sendai	NEG	NEG	NEG	NEG
TMEV (Encefalomiелitis murina de Theiler)	NEG	NEG	NEG	NEG
K virus	NEG	NEG	NEG	NEG
Polyoma virus	NEG	NEG	NEG	NEG
MNV (Norovirus)	POS	POS	POS	NEG
BACTERIAS				
Bordetella bronchiseptica	NEG	NEG	NEG	NEG
Car-bacillus	NEG	NEG	NEG	NEG
Citrobacter rodentium	NEG	NEG	NEG	NEG
Clostridium piliforme (Enfermedad de Tyzzer)	NEG	NEG	NEG	NEG
Corynebacterium kutscheri	NEG	NEG	NEG	NEG
Mycoplasma pulmonis	NEG	NEG	NEG	NEG
Pasteurella pneumotropica	NEG	NEG	NEG	NEG
Pasteurella multocida	NEG	NEG	NEG	NEG
Salmonella spp	NEG	NEG	NEG	NEG
Streptobacillus moniliformis	NEG	NEG	NEG	NEG
Streptococci beta hemolíticos (A,G)	NEG	NEG	NEG	NEG
Streptococcus pneumoniae	NEG	NEG	NEG	NEG
Helicobacter spp	POS	POS	POS	NEG
PARÁSITOS				
Ectoparásitos	NEG	NEG	NEG	NEG
Helminfos (A.tetraptrera, Syphacia spp)	NEG	NEG	NEG	NEG
Cestodos (Hymenolepis spp)	NEG	NEG	NEG	NEG
Eimeria spp	NEG	NEG	NEG	NEG
Entamoeba muris	NEG	NEG	NEG	NEG
Giardia spp	NEG	NEG	NEG	NEG
Trichomonas muris	POS	POS	NEG	NEG
Spironucleus spp	NEG	NEG	NEG	NEG
Encephalitozoon cuniculi	NEG	NEG	NEG	NEG
NECROPSIA	Sin lesiones mayores	Sin lesiones mayores	Sin lesiones mayores	Sin lesiones mayores
NEG: Negativo				
POS: Positivo				

Una vez caracterizamos el inmunofenotipo de las células blásticas de los ratones leucémicos *Pax5*^{+/-}, decidimos realizar análisis de expresión génica con el objetivo de definir dicha pB-ALL y poder compararla con la enfermedad humana. Dichos análisis identificaron 5.511 genes reprimidos y 3.929 genes activados (FDR=0.005) en médula ósea tumoral de ratones *Pax5*^{+/-} leucémicos comparada con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT. Estos análisis mostraron que las leucemias de los ratones *Pax5*^{+/-} se agrupan juntas y tienen un perfil de expresión similar, independientemente de la expresión o no de CD19 (**Fig. 27A, izquierda**). Los análisis de enriquecimiento realizados mediante GSEA demostraron que las leucemias desarrolladas por los ratones *Pax5*^{+/-} están enriquecidas en el *gene set* que representa el estadio de célula pro-B murina (**Fig. 27B**). Además, se observó que las leucemias desarrolladas por el modelo animal están enriquecidas en *gene sets* que representan las B-ALLs humanas (**Fig. 27C**). Con el objetivo de descartar que la heterogeneidad de las células B WT utilizadas como control pudiera contribuir a la expresión génica diferencial observada, realizamos un segundo análisis de expresión génica comparando médula ósea tumoral de ratones *Pax5*^{+/-} leucémicos con células pro-B/pre-B de médula ósea de ratones WT. Dicho análisis mostró una expresión génica diferencial similar a la observada en la comparación con célula B total (**Fig. 27A, derecha**), confirmando que el perfil de expresión de las células tumorales no depende del control con el que se comparen.

Las leucemias humanas que aparecen como consecuencia de la susceptibilidad provocada por la mutación *PAX5* c.547G>A presentan la delección del alelo WT de *PAX5*. Esto sugiere que para que se produzca el inicio del desarrollo de la pB-ALL es necesaria una reducción significativa de la actividad del alelo WT de *PAX5*. Por ello, decidimos analizar el estatus de *Pax5* en las pB-ALLs desarrolladas por los ratones *Pax5*^{+/-} expuestos a infección. La mayoría de las pB-ALLs observadas en los ratones leucémicos *Pax5*^{+/-} (5/9; 55%) no expresan el marcador CD19, sugiriendo la pérdida o, al menos, una marcada reducción en la actividad transcripcional de *Pax5*. Además, análisis de enriquecimiento confirmaron que las células leucémicas de los ratones *Pax5*^{+/-} (expresen CD19 o no) sufrieron la pérdida o, al menos, una marcada reducción de la actividad transcripcional de *Pax5* (**Fig. 28**), de forma similar a lo que ocurre en las leucemias humanas. Por otro lado, estudios de secuenciación realizados en células tumorales de ratones *Pax5*^{+/-} identificaron 2 casos en los se observó la adquisición de una mutación adicional en *Pax5*, manifestada por la variante *Pax5* p.P80R, que provoca la reducción de la actividad transcripcional de *PAX5* en humanos, y una segunda variante *Pax5* p.P80L. Sin embargo, el hecho que 4 ratones expresen el marcador CD19

RESULTADOS

sugiere que la pérdida completa de la actividad de PAX5 no es necesaria para que se produzca el inicio de la enfermedad en un porcentaje significativo de casos.

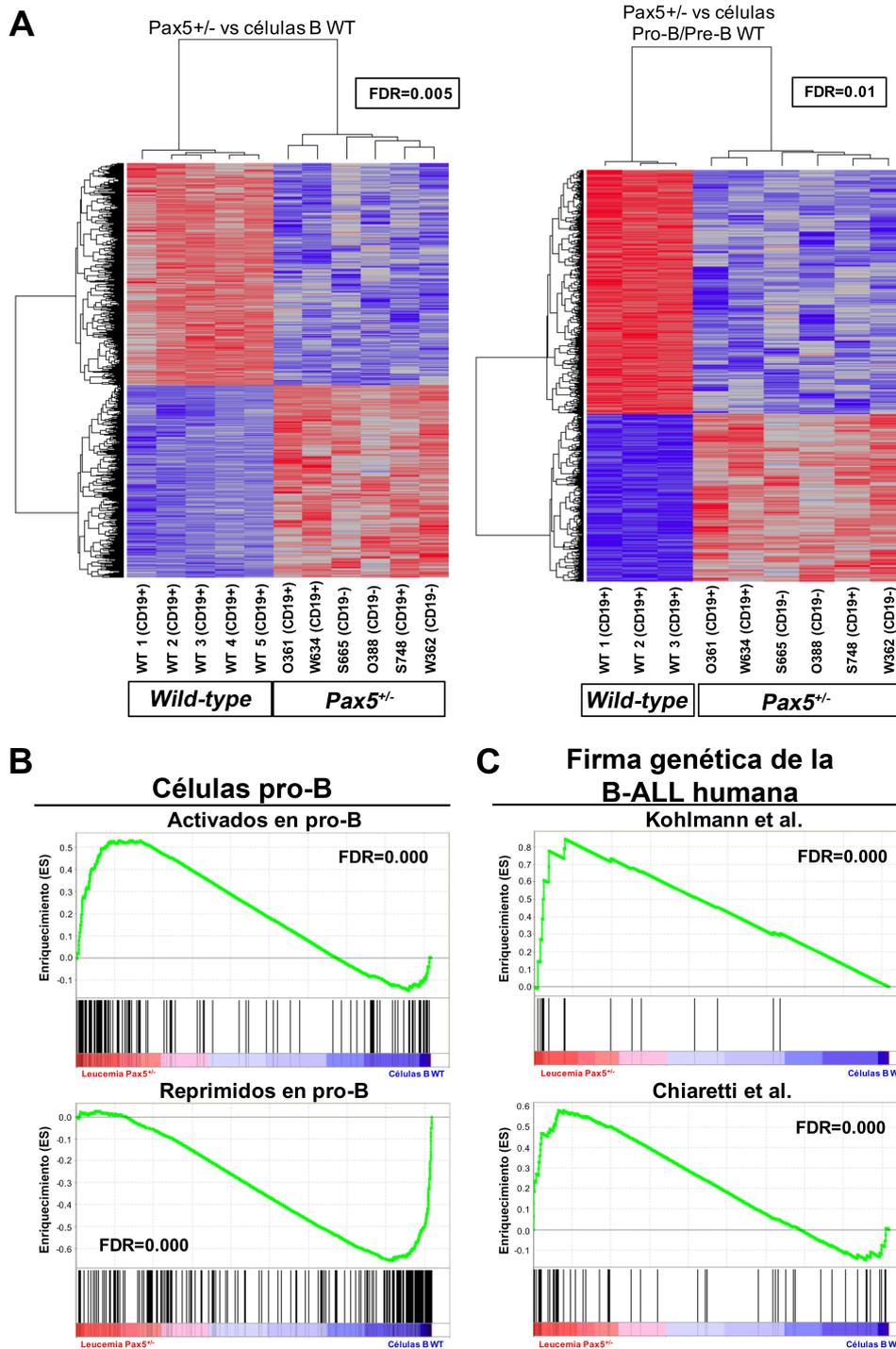


Figura 27. Las pB-ALLs observadas en los ratones Pax5^{+/-} mimetizan la pB-ALL humana.

A) Análisis de expresión génica diferencial de médulas óseas tumorales de 6 ratones Pax5^{+/-} comparados con células B220⁺ de médula ósea de 5 ratones WT (FDR=0.005) (izquierda) y, médulas óseas tumorales de 6 ratones Pax5^{+/-} comparados con células pro-B/pre-B de médula ósea de 3 ratones WT (FDR=0.01) (derecha). **B)** Análisis de GSEA que demuestra que las células leucémicas de médula ósea de ratones Pax5^{+/-} están enriquecidas en *gene sets* que representan el estadio pro-B del desarrollo B de ratón (extraídos de¹³⁹) comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000 y FDR=0.000). **C)** Análisis GSEA que muestra que las células leucémicas de médula ósea de ratones Pax5^{+/-} están enriquecidas en *gene sets* que representan la firma genética de la B-ALL humana (extraídos de^{142,143}) comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (Kohlmann: FDR=0.000; Chiaretti: FDR=0.000).

Genes regulados por Pax5

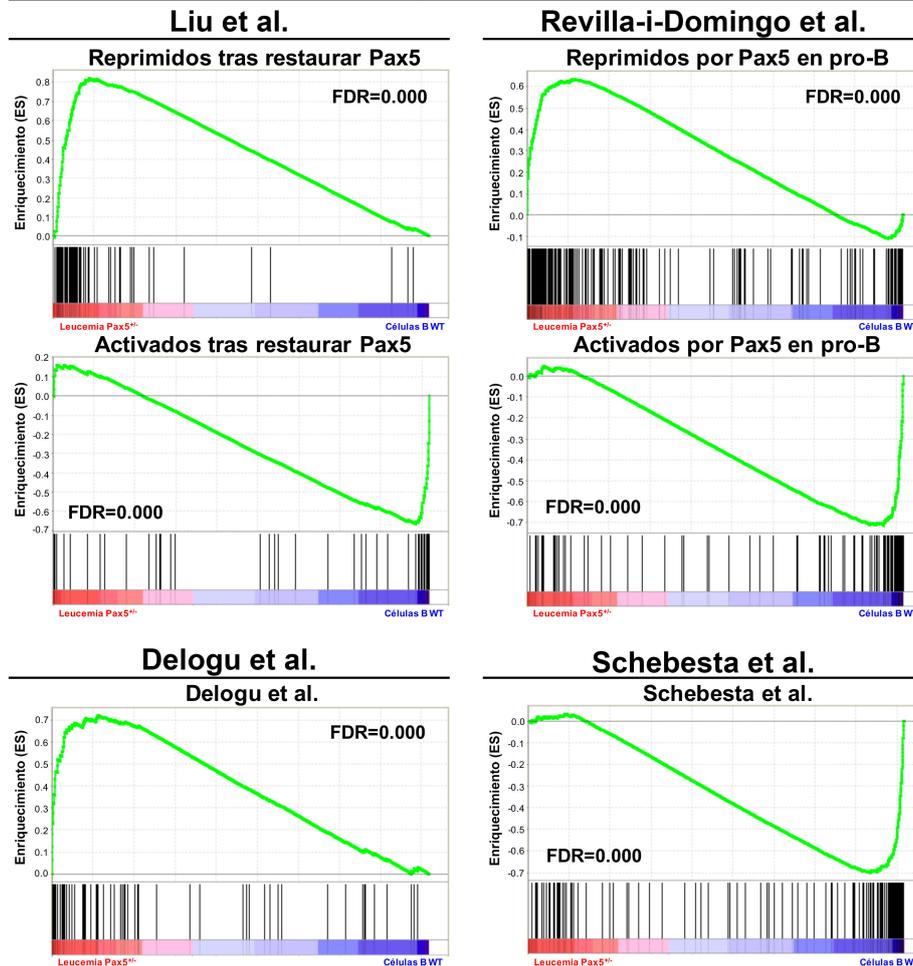


Figura 28. La actividad transcripcional de Pax5 está reducida en células leucémicas de médula ósea de ratones $Pax5^{+/-}$.

Análisis de GSEA identificaron enriquecimiento en “genes reprimidos tras restaurar Pax5” (extraído de¹³⁶) en células leucémicas de médula ósea de ratones $Pax5^{+/-}$ comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), también identificaron enriquecimiento en “genes activados tras restaurar Pax5” (extraído de¹³⁶) en células leucémicas de médula ósea de ratones $Pax5^{+/-}$ comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), mostrando una correlación inversa. Análisis de GSEA identificaron enriquecimiento en “genes reprimidos por Pax5 en pro-B” (extraído de¹³¹) en células leucémicas de médula ósea de ratones $Pax5^{+/-}$ comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), también identificaron enriquecimiento en “genes activados por Pax5 en pro-B” (extraído de¹³¹) en células leucémicas de médula ósea de ratones $Pax5^{+/-}$ comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), mostrando una correlación inversa. Análisis de GSEA identificaron enriquecimiento en el *gene set* “reprimidos por Pax5” (extraído de¹²⁹) en células leucémicas de médula ósea de ratones $Pax5^{+/-}$ comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), también identificaron enriquecimiento negativo en el *gene set* “activados por Pax5” (extraído de¹³⁰) en células leucémicas de médula ósea de ratones $Pax5^{+/-}$ comparadas con células B220⁺ de médula ósea de ratones WT (FDR=0.000), mostrando una correlación inversa.

RESULTADOS

Por último, en humanos se ha observado que el 100% de los miembros de la familia que desarrollaron pB-ALL muestran la pérdida homocigótica del gen *CDKN2A* (*p19ARF/INK4A*)^{67,68}. Estudios de PCR realizados en nuestro modelo animal mostraron que 2 de los 5 animales leucémicos analizados perdieron la expresión de *Cdkn2a* (**Fig. 29A**). Además, gracias a un estudio bioinformático en el que pudimos chequear el estatus de *Cdkn2a* en 3 leucemias del modelo animal, confirmamos la pérdida genómica del locus en el ratón O361 (**Fig. 29B**).

Estos resultados demuestran que el modelo animal reproduce la enfermedad humana, observándose que los ratones *Pax5*^{+/-} desarrollan pB-ALL únicamente cuando son expuestos a infección y que las características fenotípicas y genotípicas de las células blásticas observadas en el modelo animal son similares a las observadas en humanos con una susceptibilidad al desarrollo de pB-ALL provocada por la mutación heredada *PAX5* c.547C>G. Por ello, nuestros resultados representan la primera prueba de que la exposición tardía a la infección puede inducir pB-ALL, similar a la leucemia humana, en ratones con una susceptibilidad genética heredada.

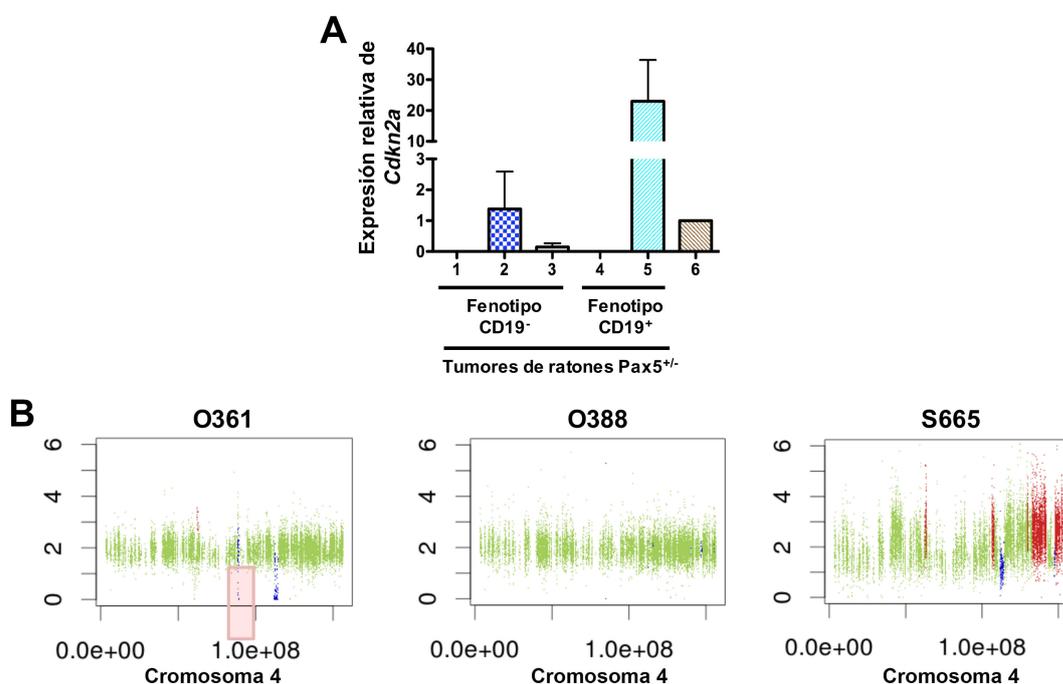


Figura 29. El modelo animal *Pax5*^{+/-} mimetiza la pérdida de *Cdkn2a* observada en las leucemias humanas.

A) Expresión relativa de *Cdkn2a* en médula ósea de ratones leucémicos *Pax5*^{+/-} (muestras 1-5). Como control positivo se utilizó médula ósea total de ratones Sca1-BCR-ABL^{D210} (muestra 6). Las barras de error representan la media \pm la desviación estándar de 3 réplicas. **B)** Pérdida del locus *Cdkn2a*. Las CNVs (del inglés, variaciones en el número de copias) fueron calculadas utilizando la aplicación bioinformática FREEC. Se observó como el ratón O361 presenta la pérdida de heterocigosidad en 4:89274500-89276999.

Una vez confirmado que la exposición a la infección causa el desarrollo de pB-ALL en animales con una susceptibilidad producida por mutaciones heredadas en *Pax5*, decidimos estudiar los tipos de patógenos a los que estaban expuestos los animales estabulados en el CF. Para ello, en primer lugar, recurrimos al informe que proporciona la dirección del animalario con una lista de patógenos (virus, bacterias y parásitos) testados, informando cuáles están presentes y cuáles no en ambos animalarios. Los informes, realizados a partir de análisis serológicos en ratones centinela en ambos animalarios, mostraron que los animales estabulados en condiciones SPF estaban libres de patógenos, mientras que cuando los animales eran trasladados a condiciones CF, eran expuestos a una variedad de patógenos entre los que se encuentran Norovirus murino, Virus de la hepatitis de ratón, especies de *Helicobacter* y *Trichomonas muris* (**Tabla 2**).

Con el objetivo de descartar que una posible inserción de virus en el genoma de las células de ratón fuera la responsable del desarrollo de la pB-ALL, como consecuencia de una mutación producida por la integración de la secuencia viral, realizamos WGS en 3 pB-ALLs *Pax5*^{+/-}. Como control positivo para confirmar la validez de la aproximación experimental, utilizamos la secuencia de localización nuclear del virus SV40, el cual forma parte de la construcción de recombinación homóloga utilizada para la generación de modelo animal *Pax5*^{-/-123}. Así, la detección de esta secuencia de tan solo 127pb validó nuestra aproximación experimental, confirmando una gran sensibilidad en la detección de pequeñas secuencias de virus integradas en el genoma. El análisis de WGS no identificó integración viral próxima a proto-oncogenes, descartando así la posibilidad del desarrollo de pB-ALL debido a mutagénesis por la inserción de virus y proporcionando evidencias contra la transformación viral, del mismo modo que ha sido observado en B-ALL humana⁴⁹.

3.3. La heterozigosidad en *Pax5* genera un compartimento B aberrante sensible a ausencia de IL7

El siguiente propósito fue determinar el mecanismo por el cual se produce la susceptibilidad al desarrollo de pB-ALL debida a la heterozigosidad en *Pax5* en condiciones de exposición a infección. Para ello, analizamos el desarrollo B en ratones *Pax5*^{+/-} y ratones WT de 4 meses de edad. Análisis de citometría de flujo mostraron que los ratones pre-leucémicos *Pax5*^{+/-} tienen un aumento significativo de las células pro-B/pre-B y las células inmaduras de médula ósea comparados con ratones WT (**Fig. 30**). Además, gracias a los análisis rutinarios de sangre periférica realizados, observamos

RESULTADOS

que los ratones $Pax5^{+/-}$ presentan una disminución de células $B220^+$ en sangre periférica desde el nacimiento (**Fig. 31A**). Dicha disminución no fue inducida por la exposición de los animales a infección, pues una disminución similar fue observada cuando los animales fueron estabulados en condiciones SPF (**Fig. 31B**). Estos resultados sugieren que la heterozigosidad en $Pax5$ favorece el desarrollo de un precursor B aberrante en médula ósea y que la diferenciación a célula B madura en sangre periférica es impedida *in vivo*, de igual modo que ha sido observado en ratones $Pax5^{-/-125}$ y en un modelo *knockdown* de $Pax5$ *in vivo*¹³⁶.

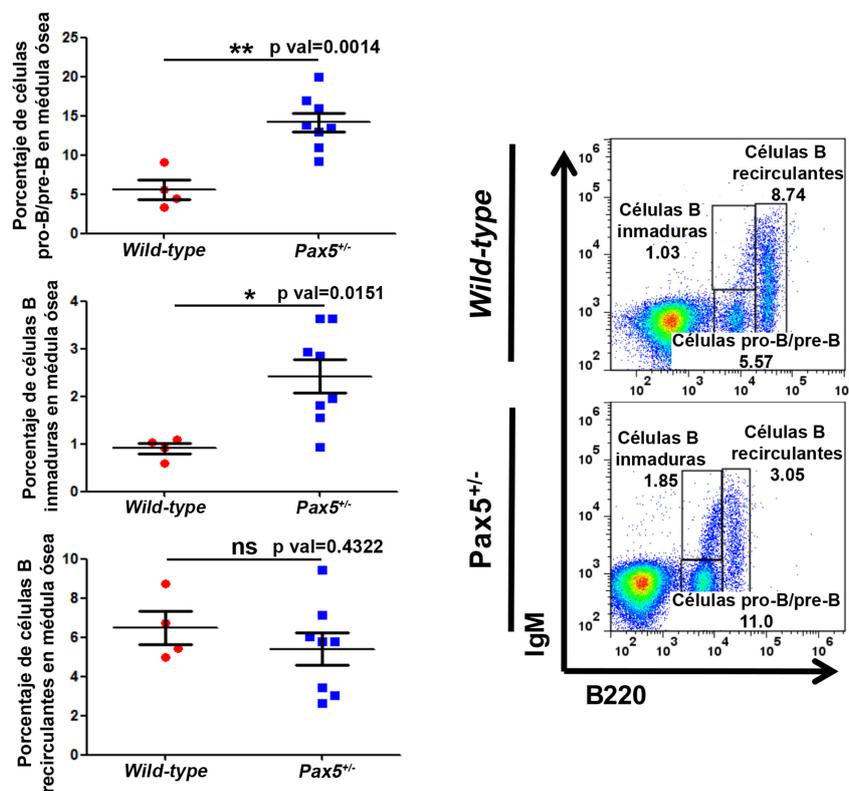


Figura 30. Desarrollo B en médula ósea de ratones pre-leucémicos $Pax5^{+/-}$.

Porcentaje de células pro-B/pre-B, inmaduras y recirculantes de médula ósea en ratones pre-leucémicos $Pax5^{+/-}$ (n=8) de 4 meses de edad comparados con ratones WT (n=4) de la misma edad, analizados por citometría de flujo. Las barras de error representan la desviación estándar. Se realizó un *t-test* estadístico en cada caso. Gráficos de citometría de flujo representativos de cada línea son mostrados junto al análisis estadístico.

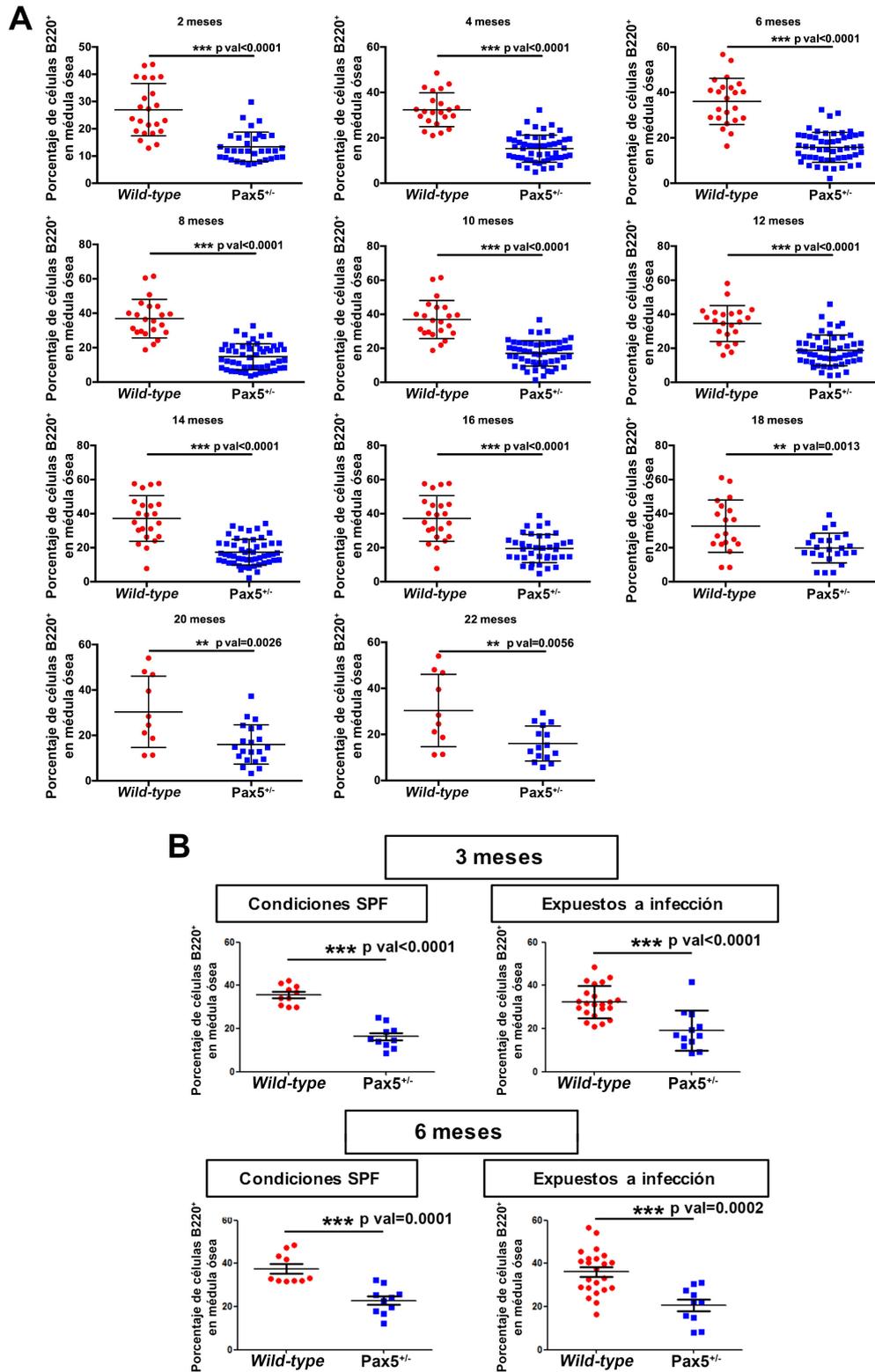


Figura 31. Los ratones *Pax5*^{+/-} presentan una disminución de células B maduras en la periferia.

A) Porcentaje de células B220⁺ en sangre periférica, analizadas por citometría de flujo, de ratones *Pax5*^{+/-} (n=15-34) y ratones WT (n=10-23) en diferentes puntos de tiempo. Las barras de error representan la desviación estándar. Se realizó un *t-test* estadístico en cada caso. **B)** Disminución de las células B de sangre periférica en ratones *Pax5*^{+/-} establecidos en condiciones SPF (n=10) comparados con ratones WT (n=10), analizados mediante citometría de flujo a los 3 y 6 meses de edad. Las barras de error representan la desviación estándar. Se realizó un *t-test* estadístico en cada caso.

RESULTADOS

Debido a que el desarrollo B en ratón es dependiente de la vía de señalización IL7/IL7R, que promueve la activación de JAK3 y la fosforilación de STAT5, decidimos analizar la susceptibilidad de las células pro-B de ratones *Pax5*^{+/-} a las alteraciones en esta vía. Para ello, aislamos mediante MACS células pro-B de ratones *Pax5*^{+/-} y WT de 4 meses de edad y las cultivamos *in vitro*. Decidimos impedir la vía de señalización IL7/ILR mediante dos aproximaciones diferentes: (1) retirando la IL7 del medio de cultivo, impidiendo así que comience la vía de señalización por ausencia de ligando, e (2) inhibiendo la activación de JAK, impidiendo así que se produzca la fosforilación de STAT5 aunque la unión de la IL7 al receptor IL7R haya iniciado la vía de señalización. Gracias a la eliminación de la IL7 del medio de cultivo pudimos observar que las células pro-B *Pax5*^{+/-} son más sensibles a la retirada de esta interleuquina que las células pro-B WT (**Fig. 32A**). Resultados similares fueron obtenidos cuando se administraron inhibidores de JAK al medio de cultivo, las células pro-B *Pax5*^{+/-} son más sensibles a la inhibición de JAK que las células pro-B WT (**Fig. 32B**). Por tanto, estos resultados sugieren que los precursores B aberrantes presentes en los ratones *Pax5*^{+/-} son extremadamente sensibles a la inhibición de la vía de señalización IL7/IL7R y, por tanto, susceptibles a segundos *hits* que den lugar al inicio del desarrollo de la pB-ALL.

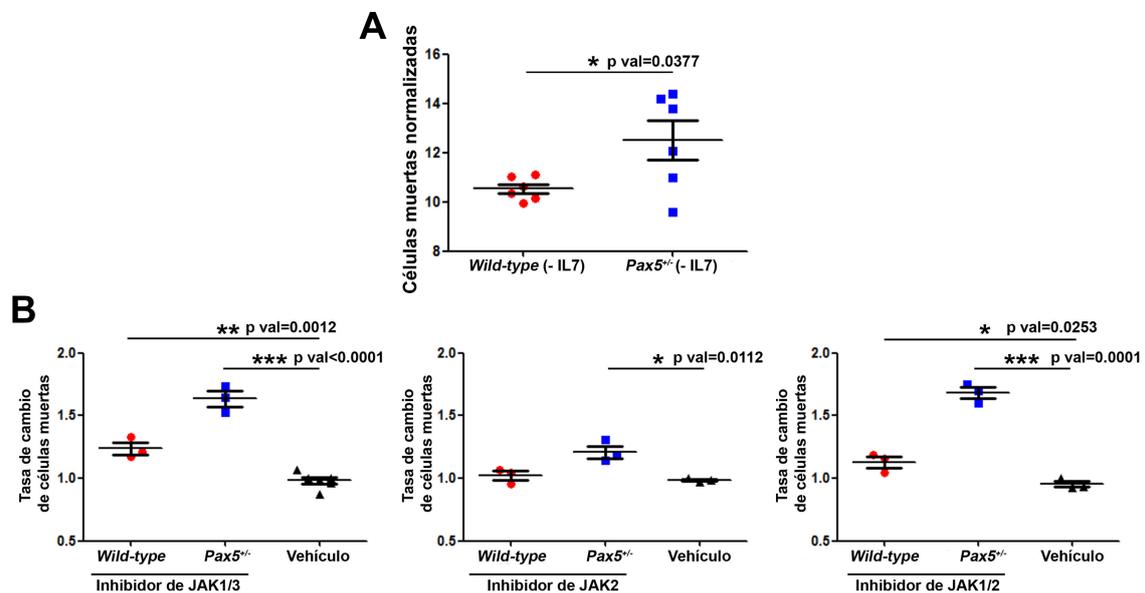


Figura 32. Las células pro-B de los ratones *Pax5*^{+/-} son sensibles a alteraciones en la vía IL7/IL7R.

A) Susceptibilidad a la muerte celular mediada por la retirada de IL7 en células pro-B *Pax5*^{+/-} comparadas con células pro-B WT. Las células pro-B fueron cultivadas durante 24h sin IL7. La inducción de la apoptosis fue evaluada mediante citometría de flujo utilizando la tinción Anexina V/Ioduro de propidio. En el gráfico aparece representada la media ± la desviación estándar de las células vivas normalizadas de 6 experimentos independientes. **B)** Susceptibilidad a la muerte celular mediada por el tratamiento con inhibidores de JAK en células pro-B *Pax5*^{+/-} comparadas con células pro-B WT. Las células pro-B fueron cultivadas durante 24h con TOFACITINIB (inhibidor de Jak1/3; 1µmol/L), TG101348 (inhibidor de Jak2; 1µmol/L) y RUXOLITINIB (inhibidor de Jak1/2; 1µmol/L). La inducción de la apoptosis fue evaluada mediante citometría de flujo utilizando la tinción Anexina V/Ioduro de propidio. Cada gráfico representa la tasa de cambio en células muertas tratadas con el inhibidor en cada experimento comparada con células tratadas con vehículo. En cada gráfico aparece representada la media ± la desviación estándar de las células vivas normalizadas de 3 experimentos independientes.

3.4. Estudios de secuenciación identificaron el segundo *hit* en la vía de señalización IL7R/JAK3/STAT5

Para identificar el segundo *hit* relacionado con el inicio de la pB-ALL debido a la exposición a la infección en el contexto de un desarrollo B deficiente, realizamos análisis de WES de 3 tumores *Pax5*^{+/-} y sus correspondientes muestras control de línea germinal. Las células tumorales *Pax5*^{+/-} provenían de médulas óseas de ratones enfermos. Dichos análisis mostraron la presencia de variaciones de nucleótido único (SNV) somáticas en las tres muestras tumorales analizadas, concretamente 31 (O361; CD19⁺), 17 (O388, CD19⁻) y 9 (S665; CD19⁻) SNVs. De estas SNVs somáticas encontradas, 4(O361), 2 (O388) y 1 (S665) fueron SNVs relacionadas con cáncer incluidas en la base de datos “*cancer gene census*” de COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/census>). Se observó que una de las SNVs relacionadas con cáncer observadas estaba presente en 2 de las 3 muestras analizadas. Dicha mutación, *Jak3* c1958G>A (p.R653H), afecta al dominio pseudoquinasa del gen *Jak3* (**Fig. 33A**). El correspondiente homólogo humano (*JAK3*^{R657Q}) aparece en la base de datos “*cancer gene census*” de COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/census>). Al observar la mutación recurrente en *Jak3*, decidimos analizar mediante *Sanger Sequencing* si dicha mutación también está presente en el resto de los ratones *Pax5*^{+/-} con pB-ALL. Sorprendentemente, se identificaron mutaciones en *Jak3* en 6 de los 9 ratones leucémicos: *Jak3*^{R653H} (4/9; homólogo humano: *JAK3*^{R657Q}), *Jak3*^{R653C} (1/9; homólogo humano: *JAK3*^{R657Q}) y *Jak3*^{V670A} (1/9; homólogo humano: *JAK3*^{V674A}) (**Fig. 33B**). Estos resultados, y el hecho de que todas las variantes de *Jak3* (*Jak3*^{R653H}, *Jak3*^{R653C} y *Jak3*^{V670A}) están localizadas en una región fuertemente conservada entre especies, indican que las mutaciones en *Jak3* juegan un papel importante en la evolución de la enfermedad. Además, se realizó *deep sequencing* con una “profundidad” de entre 600.000 y 2,5x10⁶ lecturas por cada SNV en *Jak3* y se observó la presencia de variantes en *Jak3* únicamente en las muestras tumorales, no apareciendo en muestras de médula ósea de ratones pre-leucémicos *Pax5*^{+/-} ni ratones WT (**Fig. 33C**).

Además, gracias a la monitorización clínica y biológica realizada, pudimos analizar el momento en el que se produce la mutación en *Jak3*. Para ello, analizamos mediante *deep sequencing* muestras de sangre periférica adquiridas de forma bimensual a lo largo de la vida de los ratones *Pax5*^{+/-}. Examinamos la evolución de la enfermedad en 3 ratones *Pax5*^{+/-} que desarrollaron pB-ALL (S748 (*Jak3*^{V670A}), W634(*Jak3*^{R653H}) y S767(*Jak3*^{R653C})). En todos los casos, las variantes de *Jak3* únicamente fueron detectadas cuando el ratón apareció enfermo de pB-ALL (**Fig. 34**). Estos resultados son incompatibles con la posibilidad de que las mutaciones en *Jak3* estuvieran presentes en

RESULTADOS

unas pocas células en el momento del nacimiento y fuesen seleccionadas a lo largo del tiempo. Por tanto, nuestros datos sugieren que la exposición a la infección sería el evento oncogénico ambiental que lleva a la adquisición de mutaciones en *Jak3* que aparecen con una latencia muy cercana al desarrollo de B-ALL.

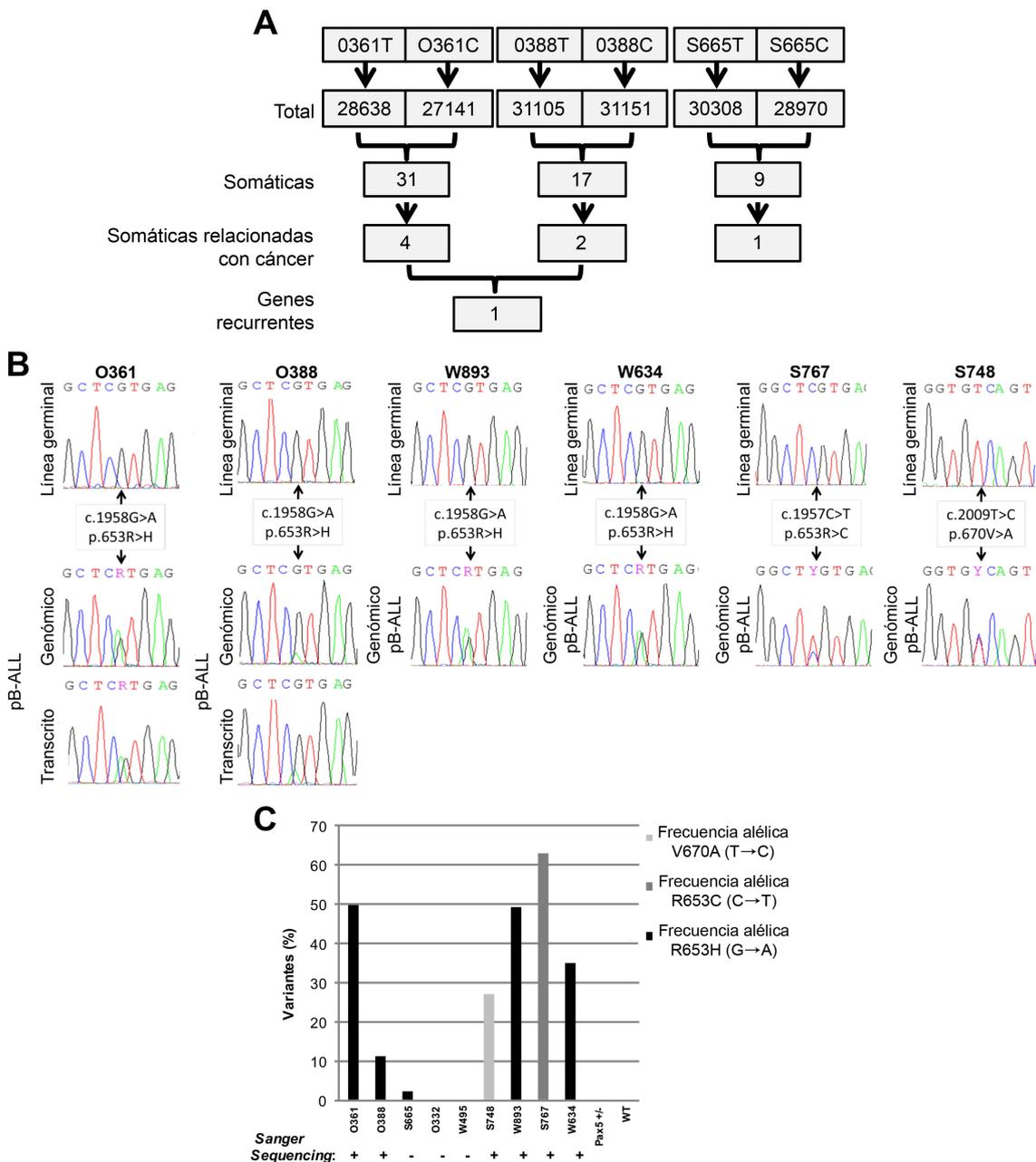


Figura 33. Estudios de secuenciación del exoma de los tumores de ratones *Pax5*^{+/-} identificaron el segundo *hit* en la ruta de señalización IL7R/JAK3/STAT5.

A) Análisis de secuenciación del exoma (WES) revelaron una media de 30.000 SNVs a lo largo del exoma. Se identificaron entre 1 y 4 SNVs somáticas relacionadas con cáncer tras el análisis con MUTECT. Se observaron mutaciones recurrentes en el gen *Jak3*. **B)** Análisis mediante *Sanger Sequencing* de posibles mutaciones puntuales en el gen *Jak3*. **C)** Frecuencia alélica de las variantes *Jak3*^{V670A}, *Jak3*^{R653C} y *Jak3*^{R653H} en los 9 ratones *Pax5*^{+/-} que desarrollaron pB-ALL. Ratones pre-leucémicos *Pax5*^{+/-} y ratones WT fueron utilizados como controles negativos. Las variantes confirmadas por *Sanger Sequencing* aparecen marcadas con "+".

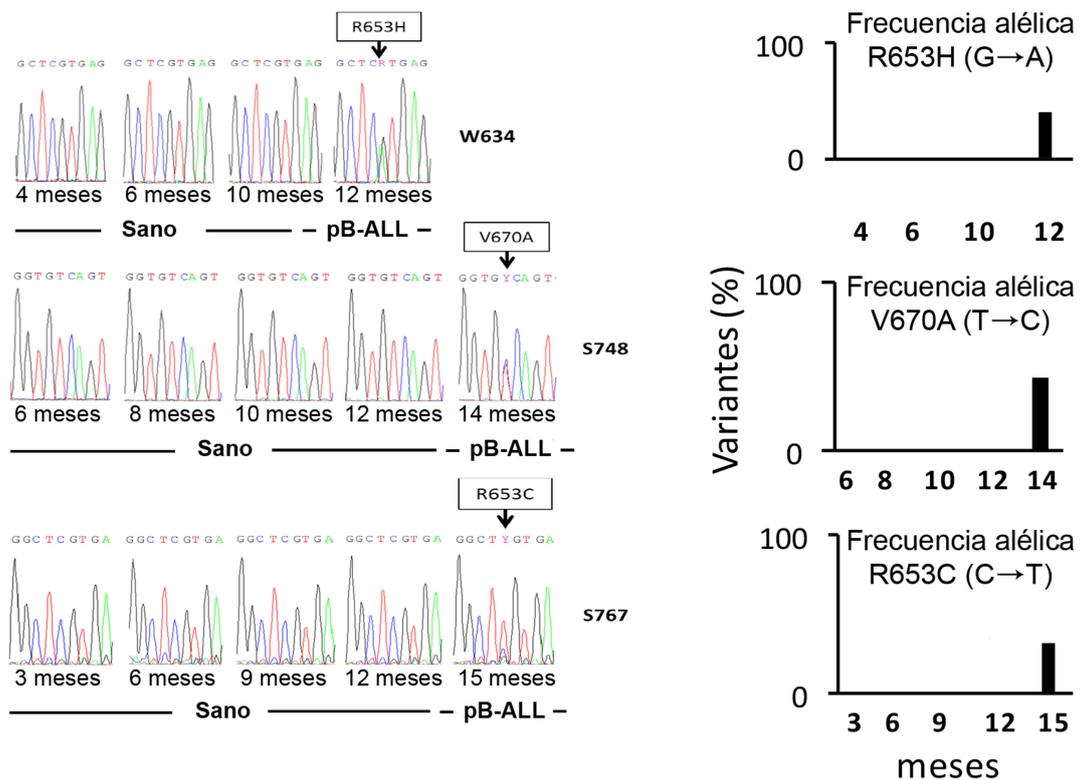


Figura 34. Las variantes de *Jak3* únicamente son detectadas cuando el ratón desarrolla la pB-ALL. Rastreo del momento de aparición de las mutaciones en el gen *Jak3* mediante *Sanger Sequencing* y *Deep Sequencing* utilizando DNA sangre periférica de ratones *Pax5^{+/-}* a lo largo del tiempo. La mutación es únicamente detectable en el momento en el que el ratón ha desarrollado B-ALL.

Las variantes humanas $JAK3^{R657Q}$ y $JAK3^{V674A}$ dan lugar a una activación constitutiva de la actividad de JAK3 y la fosforilación de STAT5^{147,148}. Por ello, quisimos comprobar si las variantes murinas $Jak3^{R653H}$ y $Jak3^{V670A}$ también conferirían dicha activación constitutiva a Jak3. Para ello, transfectamos células Ba/F3 (dependientes de IL3) con la variante $Jak3^{R653H}$ y las cultivamos en ausencia de IL3, observando que la presencia de la variante $Jak3^{R653H}$ confiere independencia a IL3 a células Ba/F3 en cultivo (**Fig. 35A**), lo cual sugiere que la actividad quinasa de Jak3 está constitutivamente activada en dichas células. Para confirmar la activación constitutiva de Jak3 en células Ba/F3 transfectadas con la variante $Jak3^{R653H}$ realizamos un análisis de western blot chequeando la fosforilación de Stat5. Dicho análisis confirmó que, aún en ausencia de IL3, Stat5 es fosforilado en células Ba/F3 transfectadas con la variante $Jak3^{R653H}$ (**Fig. 35B**). De forma similar, gracias a estudios de western blot, confirmamos que Stat5 es fosforilado en células leucémicas de ratones *Pax5^{+/-}* que poseen la mutación $Jak3^{V670A}$ (**Fig. 36A**), confirmando de esta forma que las variantes mutantes murinas de Jak3

RESULTADOS

producen la activación constitutiva de la quinasa. Consecuentemente, las células pro-B tumorales aisladas de ratones leucémicos *Pax5*^{+/-} que poseen las mutaciones *Jak3*^{R653H} y *Jak3*^{V670A} son capaces de crecer en medio de cultivo independientemente de la presencia de IL7 (**Fig. 36B-D**). Finalmente, con el objetivo de determinar la sensibilidad de las células tumorales a la inhibición de Jak3, se administraron inhibidores de Jak al medio de cultivo y se observó que las células pro-B tumorales son sensibles a la inhibición de Jak (**Fig. 36E**). En 2 pB-ALLs, se identificaron mutaciones adicionales en *Jak1*. Ha sido publicado que las variantes mutantes de *Jak3* son dependientes de *Jak1* para producir la transformación celular¹⁴⁹, lo cual está en línea con el incremento en la muerte celular cuando se administra el inhibidor JAK1/2 RUXOLITINIB *in vitro* (**Fig. 36E**).

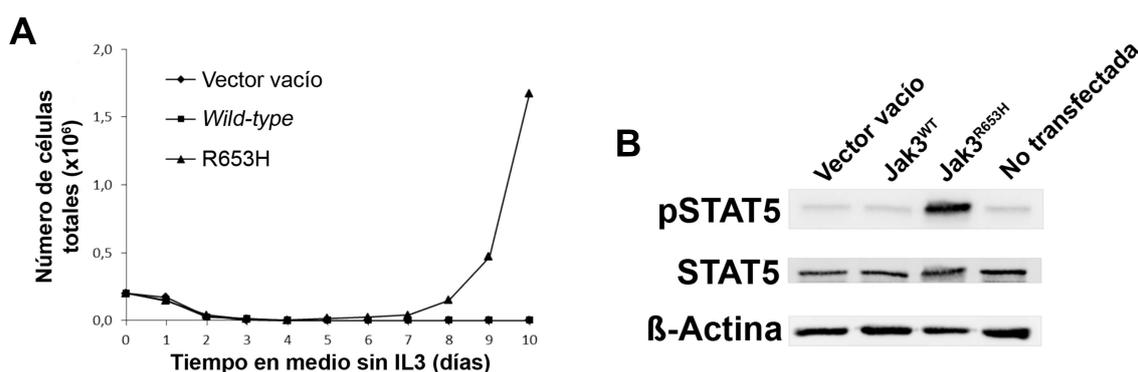


Figura 35. Las variantes de *Jak3* dan lugar a una activación constitutiva de la quinasa.

A) Células Ba/F3 fueron transfectadas con el vector pMC3 vacío, pMC3-*Jak3*^{WT} y pMC3-*Jak3*^{R653H}. Se seleccionaron las células resistentes a higomicina y fueron cultivadas en ausencia de IL3. Su proliferación fue medida utilizando Trypan blue. Los valores representan las medias de 2 estudios independientes realizados en condiciones idénticas. **B)** Las células Ba/F3 transfectadas fueron cultivadas en medio sin IL3 durante 4 horas. A continuación, se realizó un análisis de western blot para pSTAT5. STAT5 y β-actina fueron utilizados como controles de carga (n=2).

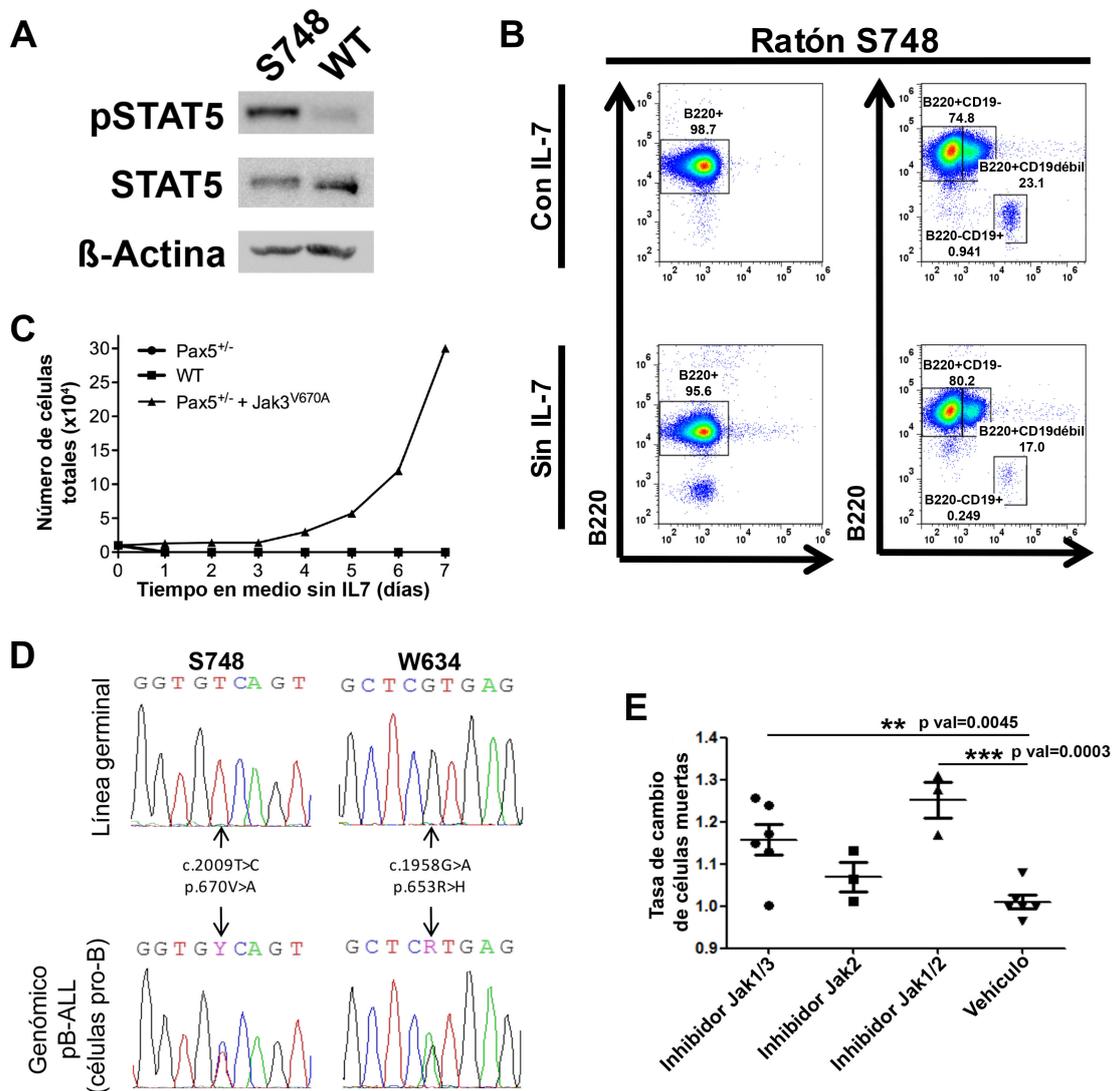


Figura 36. Las variantes de *Jak3* dan lugar a una activación constitutiva de la quinasa en las células leucémicas de los ratones *Pax5*^{+/-}.

A) Análisis de western blot para pSTAT5 del lisado de células leucémicas de bazo (S748) que poseen la mutación *Jak3*^{V670A}. STAT5 y β -actina fueron utilizados como controles de carga (n=2). **B)** Inmunofenotipo de células pro-B tumorales *Pax5*^{+/-} que poseen la mutación *Jak3*^{V670A}. Células B220⁺ aisladas de médula ósea de ratones leucémicos *Pax5*^{+/-} fueron cultivadas bajo condiciones que permiten aislar y expandir una población pura de células pro-B. Dicha población fue crecida en medio con y sin IL7. Las células tumorales fueron capaces de crecer en ausencia de IL7 debido a la presencia de mutaciones activantes en *Jak3*. **C)** Células pro-B WT, *Pax5*^{+/-} y *Pax5*^{+/-} con la mutación *Jak3*^{V670A} fueron cultivadas en ausencia de IL7. Su proliferación fue medida utilizando Trypan blue. Los valores representan las medias de 3 estudios independientes realizados en condiciones idénticas. **D)** Análisis mediante *Sanger Sequencing* de las células pro-B leucémicas aisladas de los ratones S748 y W634, y crecidas en ausencia de IL7, validaron la presencia de las mutaciones *Jak3*^{V670A} y *Jak3*^{R653H}, respectivamente (n=2). **E)** Células pro-B leucémicas *Pax5*^{+/-} con la mutación *Jak3*^{V670A} fueron cultivadas durante 24h con TOFACITINIB (1 μ mol/L), TG101348 (1 μ mol/L) y RUXOLITINIB (1 μ mol/L). La inducción de la apoptosis fue evaluada mediante citometría de flujo utilizando la tinción Anexina V/Ioduro de propidio. El gráfico representa la tasa de cambio en células muertas tratadas con el inhibidor en cada experimento comparada con células tratadas con vehículo. En cada gráfico aparece representada la media \pm la desviación estándar de las células vivas normalizadas de 3 experimentos independientes.

RESULTADOS

Para identificar la capacidad tumorigénica de las células leucémicas de los ratones *Pax5*^{+/-} expuestos a infección, decidimos trasplantar células mieloides y células pro-B aisladas de ratones *Pax5*^{+/-} que poseen el gen *Jak3*^{WT}, así como células pro-B aisladas de ratones *Pax5*^{+/-} que poseen la variante mutante *Jak3*^{V670A}, en ratones singénicos irradiados de forma sub-lethal (4Gy). Todos los ratones trasplantados (n=9) con 10⁵ células pro-B aisladas de ratones *Pax5*^{+/-} que poseen la variante mutante *Jak3*^{V670A} desarrollaron pB-ALL con una latencia de 13±3 días. La pB-ALL que desarrollaron los receptores secundarios fue fenotípicamente idéntica a la enfermedad primaria desarrollada por los ratones *Pax5*^{+/-} expuestos a infección (**Fig. 37A-C**). Sin embargo, cuando los ratones fueron trasplantados con células mieloides (n=7; 10⁶ células por animal) o células pro-B (n=10; 10⁵ células por animal) aisladas de ratones *Pax5*^{+/-} que poseen el gen *Jak3*^{WT}, dichas células fueron incapaces de dar lugar al desarrollo de pB-ALL en los receptores secundarios. Estos resultados indican que las pB-ALLs *Pax5*^{+/-} inducidas por la exposición a la infección son propagadas por células pro-B *Pax5*^{+/-} transformadas que poseen la mutación *Jak3*^{V670A}, pero no por células pro-B *Pax5*^{+/-} que poseen *Jak3*^{WT}, y confirman que *Jak3*^{V670A} puede inducir pB-ALL en ratones. Por tanto, parece que la heterocigosidad en *Pax5* únicamente establece el ambiente necesario para que se produzcan mutaciones en *Jak3* y, por tanto, no tiene papel de *driver* en la patogénesis de la pB-ALL final. Por ello, decidimos analizar el potencial para iniciar el desarrollo de pB-ALL de las variantes mutantes de *Jak3* identificadas en ausencia de la heterocigosidad en *Pax5*. Para ello, inyectamos 10⁶ células Ba/F3 transfectadas con *Jak3*^{V670A} (n=5) o *Jak3*^{R653H} (n=4) en ratones desnudos (nu/nu) y monitorizamos el posible desarrollo de pB-ALL mediante el análisis periódico de la presencia de blastos en sangre periférica. Los resultados obtenidos demostraron que ambos mutantes son capaces de generar pB-ALL con una latencia de 27±3 días (**Fig. 38 D-E**), sugiriendo que la inactivación de *Pax5* promueve el desarrollo de pB-ALL mediante la generación de un precursor B aberrante sensible a IL7 que es susceptible de sufrir una transformación maligna a través de la acumulación de mutaciones secundarias en *Jak3* como mecanismo de rescate de la vía de señalización IL7/IL7R/STAT5.

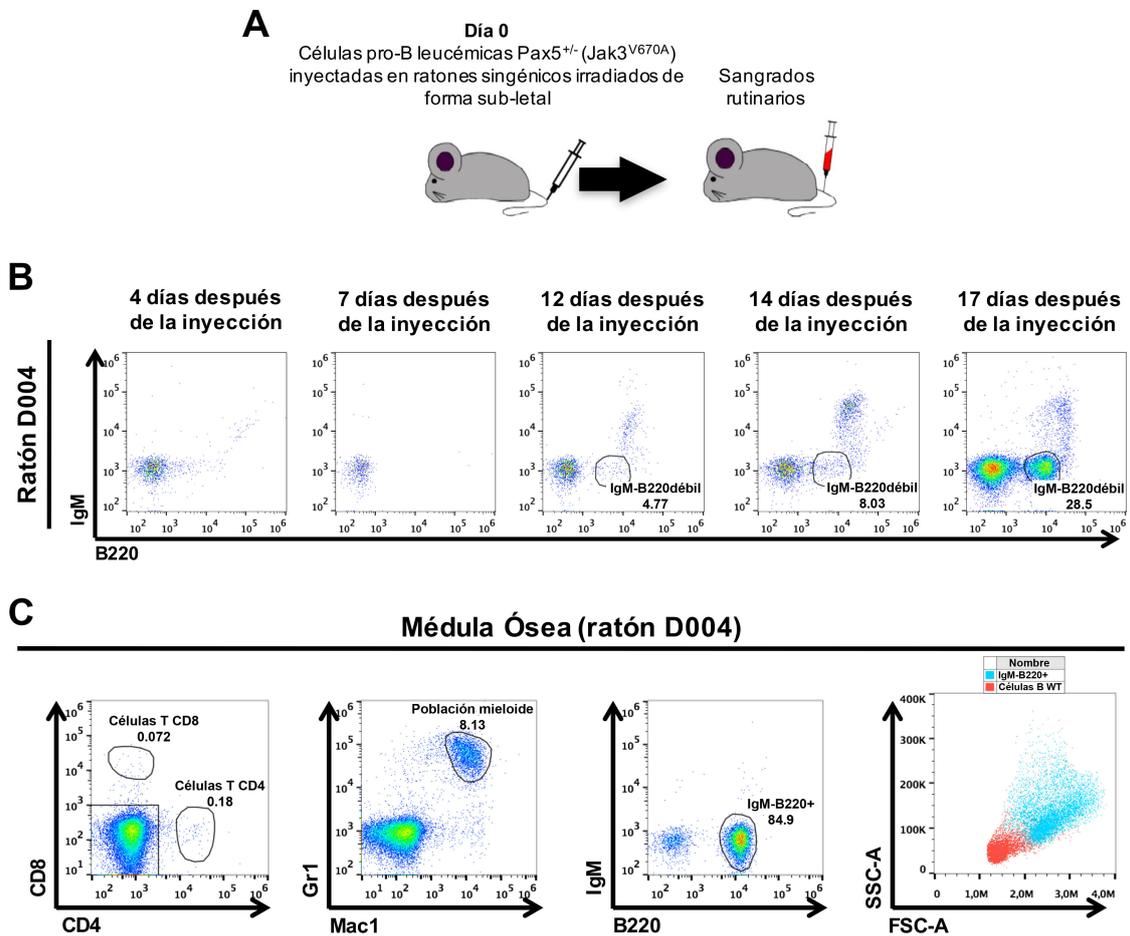


Figura 37. La pB-ALL es trasplantable a receptores secundarios.

A) Diseño experimental. 100.000 células pro-B leucémicas Pax5^{+/-} que poseen la mutación Jak3^{V670A} fueron inyectadas en ratones WT singénicos irradiados de forma sub-lethal. Se realizaron sangrados rutinarios para monitorizar el desarrollo de pB-ALL. **B)** Análisis de citometría de flujo representativo de los ratones inyectados con células pro-B leucémicas Pax5^{+/-} que poseen la mutación Jak3^{V670A}. Dichos análisis mostraron que las células leucémicas (IgM⁺B220^{débil}) fueron capaces de crecer en receptores secundarios. **C)** Análisis de citometría de flujo mostraron la acumulación de células leucémicas Pax5^{+/-} que poseen la mutación Jak3^{V670A} (IgM⁺B220^{débil}) en médula ósea de los ratones receptores.

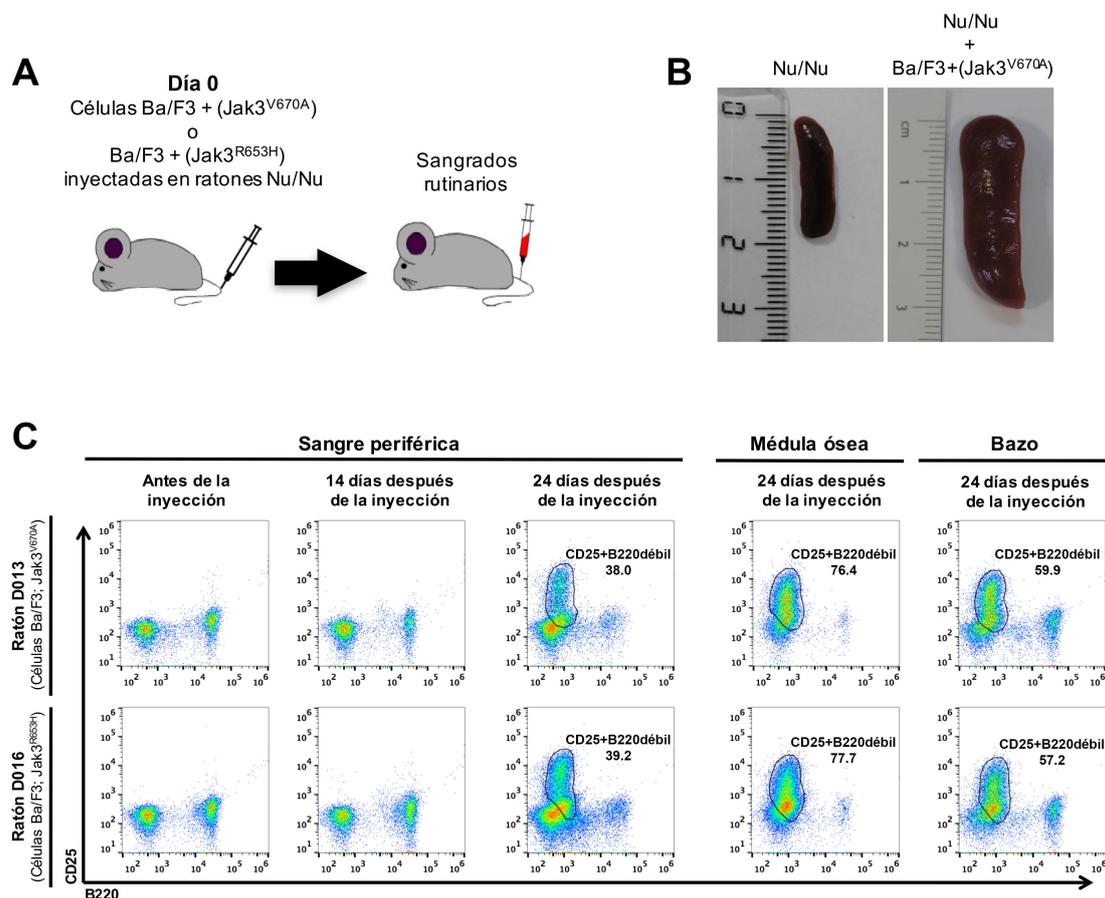


Figura 38. Las células Ba/F3 transfectadas con *Jak3*^{V670A} o *Jak3*^{R653H} son capaces de crecer en receptores secundarios.

A) Diseño experimental. 100.000 células Ba/F3 transfectadas con *Jak3*^{V670A} o *Jak3*^{R653H} fueron inyectadas en ratones Nu/Nu. Se realizaron sangrados rutinarios para monitorizar el desarrollo de pB-ALL. **B)** Ejemplo de esplenomegalia observado en el 100% de los ratones Nu/Nu inyectados con células Ba/F3 transfectadas con *Jak3*^{V670A} o *Jak3*^{R653H}. Un bazo de un ratón control Nu/Nu es mostrado como referencia. **C)** Análisis de citometría de flujo representativo de los ratones inyectados con células Ba/F3 transfectadas con *Jak3*^{V670A} o *Jak3*^{R653H}. Dichos análisis mostraron que las células Ba/F3 transfectadas con *Jak3*^{V670A} o *Jak3*^{R653H} (CD25⁺B220^{débil}) fueron capaces de crecer en receptores secundarios, así como la acumulación de dichas células (CD25⁺B220^{débil}) en médula ósea y bazo de los ratones receptores.

3.5. La vía de JAK puede ser una diana terapéutica en individuos con mutaciones en PAX5 en línea germinal

Los resultados obtenidos sugieren que los inhibidores de JAK podrían ser una opción terapéutica válida en pacientes con pB-ALL inducida por mutaciones en *PAX5* en línea germinal. Para validar esta posibilidad, tratamos células pro-B leucémicas *Pax5*^{+/-} que poseen la variante mutante *Jak3*^{V670A} con diferentes inhibidores de JAK: TOFACITINIB (JAK1/3); TG101348 (JAK2) y RUXOLITINIB (JAK1/2). Las células pro-B tumorales fueron sensibles al tratamiento *in vitro* con inhibidores de JAK1/3 y JAK1/2, pero no a inhibidores de JAK2 (Fig. 36E).

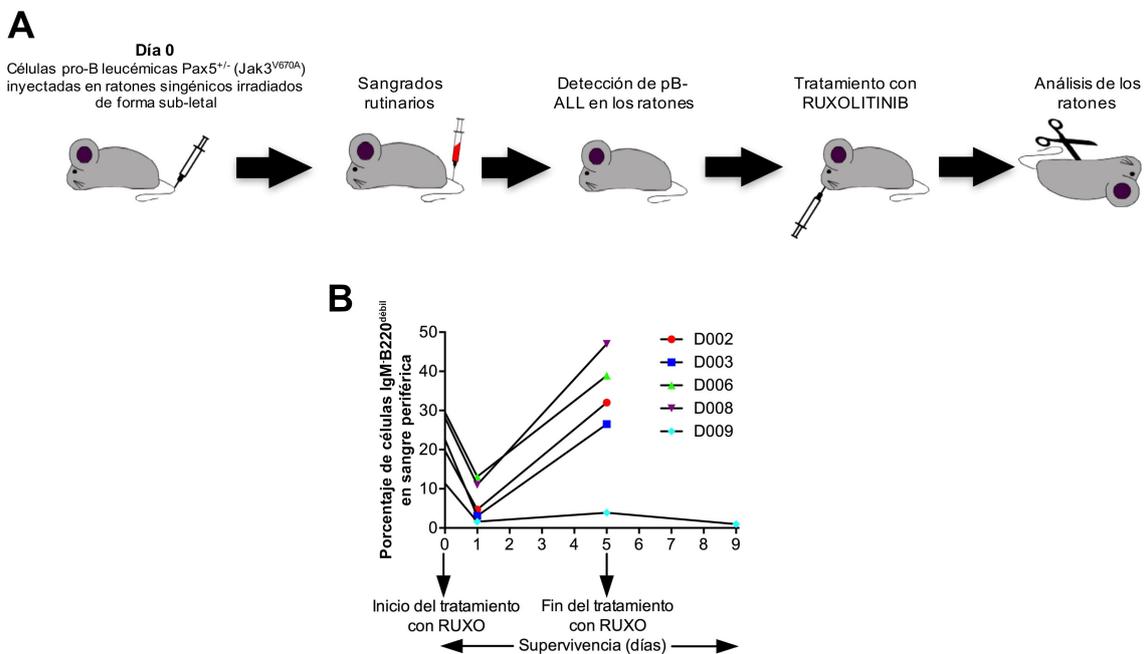


Figura 39. Eficacia de la inhibición *in vivo* de *Jak3* en células leucémicas *Pax5*^{+/-} que poseen la mutación *Jak3*^{V670A}.
A) Diseño experimental. 100.000 células pro-B leucémicas *Pax5*^{+/-} que poseen la mutación *Jak3*^{V670A} fueron inyectadas en ratones WT singénicos irradiados de forma sub-lethal. Se realizaron sangrados rutinarios para monitorizar el desarrollo de pB-ALL. Cuando se detectaron células leucémicas (IgM B220^{débil}) en sangre periférica, los ratones fueron tratados con RUXOLITINIB durante 5 días. Se realizaron análisis de citometría de flujo para monitorizar la posible remisión de la enfermedad durante la terapia. **B)** Gráfico representativo del porcentaje de células leucémicas (IgM B220^{débil}) en sangre periférica durante el tratamiento con RUXOLITINIB.

Una vez comprobada la sensibilidad a inhibidores de JAK *in vitro*, decidimos analizar la eficacia de los inhibidores de JAK *in vivo*. Para ello, 10⁵ células pro-B tumorales aisladas de ratones *Pax5*^{+/-} que poseen la variante mutante *Jak3*^{V670A} fueron trasplantadas en receptores singénicos secundarios y se monitorizó el desarrollo de la enfermedad.

RESULTADOS

Cuando el inicio de la pB-ALL fue confirmado por la presencia de blastos en sangre periférica, algunos de los animales leucémicos fueron elegidos aleatoriamente para ser tratados con RUXOLITINIB durante 5 días (**Fig. 39A**). Se realizaron análisis de citometría de flujo para valorar la efectividad del tratamiento mediante una posible remisión de la enfermedad. Aunque el tratamiento con RUXOLITINIB no proporcionó una ventaja significativa en cuanto a supervivencia, todos los ratones tratados (n=5) mostraron un descenso transitorio en el número de células blásticas en sangre periférica (**Fig. 39B**). Sin embargo, la diseminación de la pB-ALL, documentada con criterios clínicos y citometría de flujo (**Fig. 40 y Fig. 41**) reapareció en todos los animales, salvo en 1 de los 5 ratones que permaneció vivo y sano 33 días después de la retirada del tratamiento, momento en que fue sacrificado y analizado por citometría de flujo para confirmar la ausencia de blastos en sangre periférica y médula ósea (**Fig. 42**). De esta forma, nuestros datos sugieren que las mutaciones en *Jak3* tienen un papel de *driver* en el desarrollo de la pB-ALL y, por ello, el tratamiento dirigido a la vía de señalización JAK-STAT (desregulada en este tipo de pB-ALL) podría ser una terapia prometedora en la lucha contra la enfermedad.

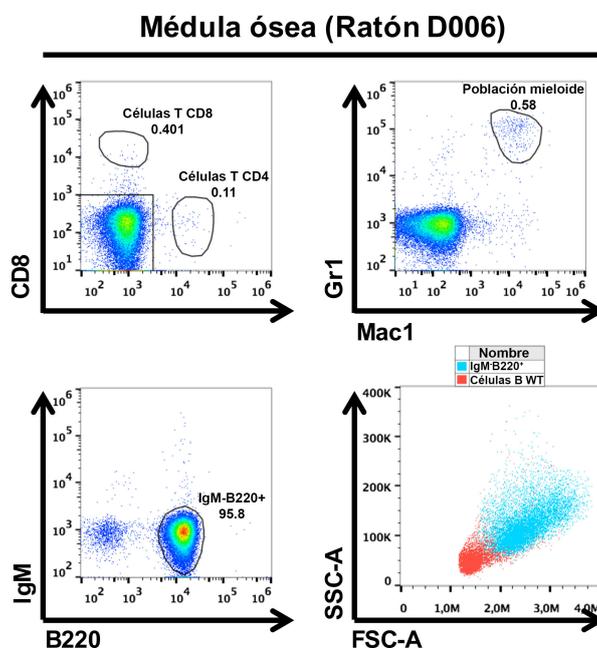


Figura 40. Ejemplo de la diseminación de la pB-ALL 5 días después del inicio del tratamiento con RUXOLITINIB. Gráficos de citometría de flujo representativos de la diseminación de células leucémicas (IgM⁺B220⁺) a médula ósea 5 días después del inicio del tratamiento con RUXOLITINIB.

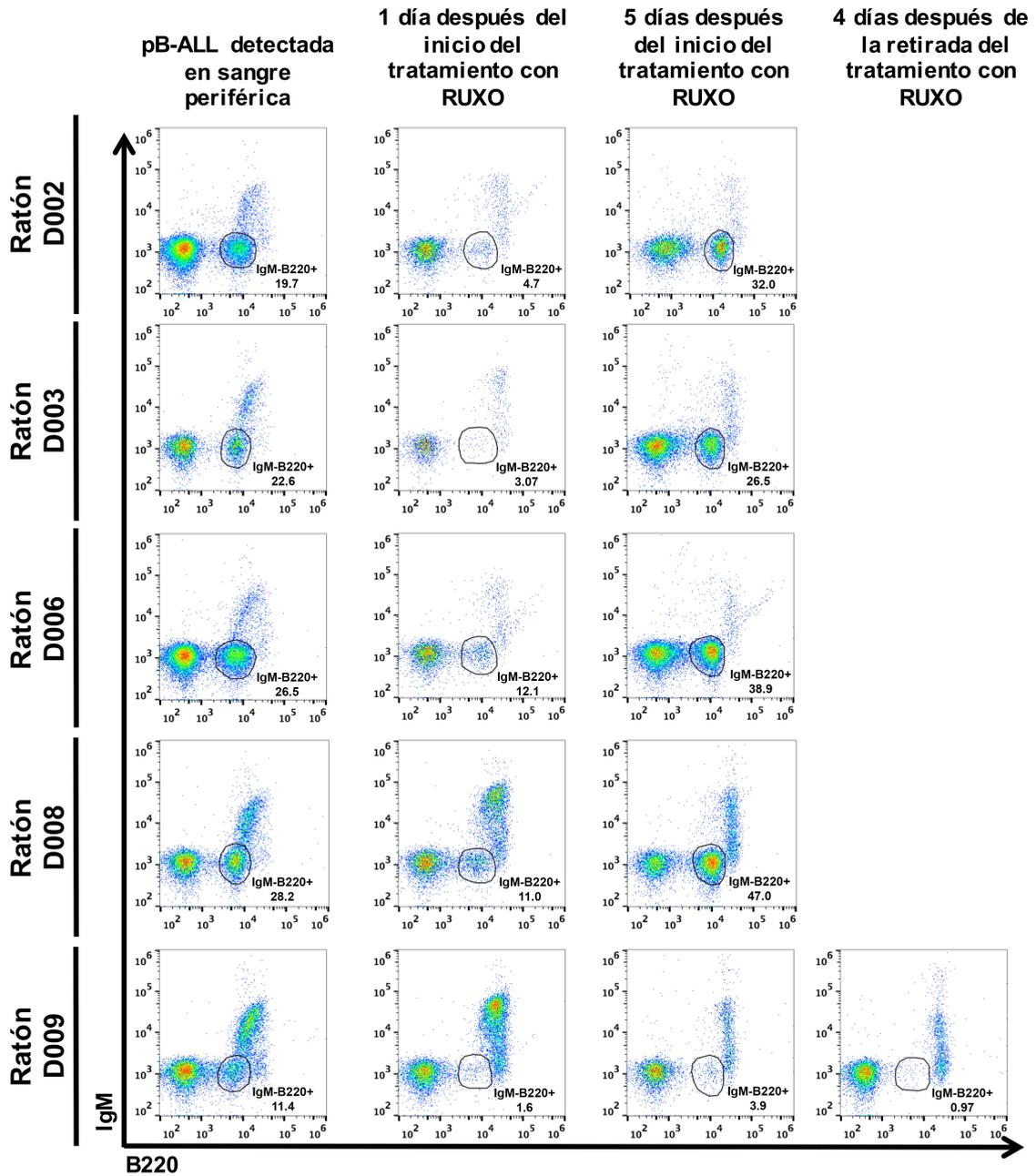


Figura 41. Gráficos de citometría de flujo que muestran la monitorización de las pB-ALLs (IgM⁺B220⁺) en sangre periférica durante y después del tratamiento con RUXOLITINIB.

Todos los ratones tratados con RUXOLITINIB mostraron un descenso transitorio de los blastos (IgM⁺B220⁺) en sangre periférica excepto el ratón D009, que permaneció vivo y sano 33 días tras la retirada del tratamiento, momento en que fue sacrificado para confirmar la ausencia de células leucémicas en el resto de órganos.

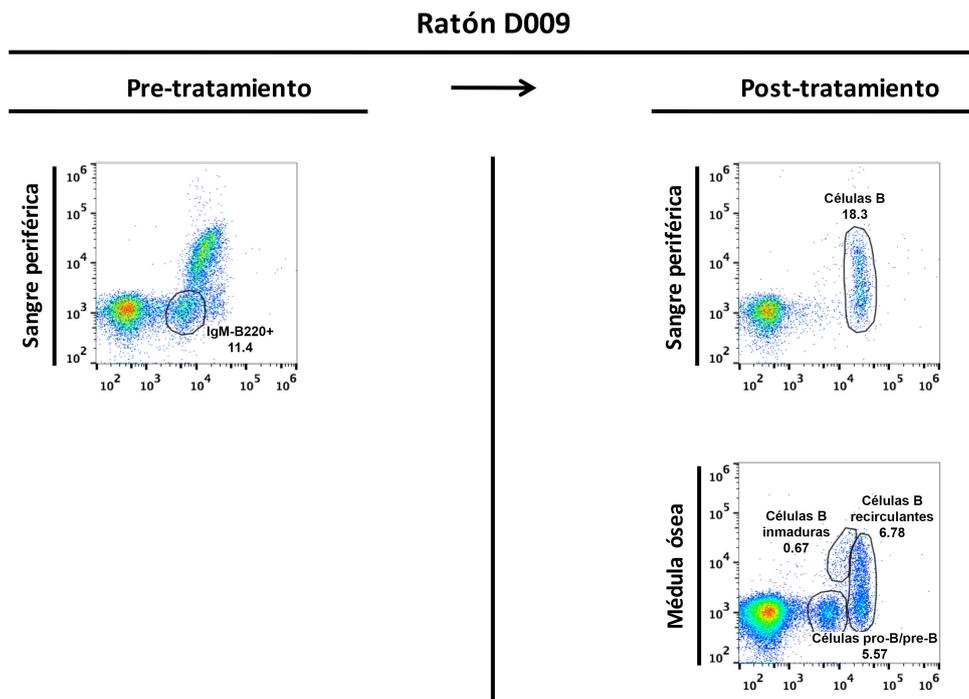


Figura 42. La pB-ALL fue curada en el ratón D009 después de ser tratado con RUXOLITINIB.
Los gráficos de citometría de flujo demuestran la ausencia de células leucémicas en sangre periférica y médula ósea 33 días después de la finalización del tratamiento con RUXOLITINIB.

Discusión

DISCUSIÓN

La ALL es el tipo de cáncer más común en niños y, aunque la mejora en los tratamientos ha permitido alcanzar una tasa de supervivencia cercana al 90%, sigue siendo la principal causa de muerte infantil por enfermedad debido a las recaídas. Además, el tratamiento de la ALL es muy tóxico y produce efectos secundarios severos que pueden condicionar el resto de la vida de estos niños. Por ello, un mejor conocimiento de la etiología de la enfermedad permitirá el desarrollo de nuevos fármacos menos agresivos, así como un posible cambio en el modo en que hacemos frente a la ALL, desde el diagnóstico y tratamiento, a la prevención del desarrollo de la enfermedad, evitando así, la toxicidad del tratamiento. Por ello, en el presente trabajo de tesis doctoral, decidimos estudiar la etiología de la B-ALL utilizando 2 modelos de ratón que nos permitiesen analizar (1) factores de riesgo genéticos que están involucrados en el desarrollo de la enfermedad y (2) la exposición a la infección como factor de riesgo ambiental.

El dogma establecido en el desarrollo de B-ALL postula que los niños que desarrollan la enfermedad presentan translocaciones cromosómicas (por ejemplo, *ETV6-RUNX1* o *BCR-ABL*), la mayoría de ellas en el útero durante la hematopoyesis fetal, como eventos oncogénicos primarios que son seguidos por un amplio espectro de alteraciones secundarias que desencadenan el inicio del desarrollo de la enfermedad. La mayoría de los autores, e incluso los libros de hematología, sostienen que la B-ALL se origina en células pro-B/pre-B que dependen directamente de señales de supervivencia¹⁵⁰. Sin embargo, el oncogén *BCR-ABL*^{p190} no es capaz de conferir propiedades de auto-renovación a células progenitoras de ratón⁹³. En línea con esta afirmación, tanto estudios realizados en gemelos⁹⁰ como estudios de sangre de cordón umbilical¹⁵¹ apoyan que el gen de fusión *BCR-ABL*^{p190} genera un clon pre-leucémico que permanece clínicamente silente hasta que aparecen alteraciones secundarias que dan lugar al inicio del desarrollo de la B-ALL. Entre las alteraciones secundarias que se observan con mayor frecuencia en el desarrollo de la B-ALL se encuentran alteraciones en el gen *PAX5*, que aparecen aproximadamente en un tercio de todas las B-ALLs diagnosticadas y, concretamente, son muy comunes en B-ALL *BCR-ABL*^{p190} positiva^{52,94,100}. La mayoría de las alteraciones en *PAX5* son mutaciones puntuales que dan lugar a una reducción de la actividad transcripcional del gen¹⁵², apoyando la afirmación que las deleciones en *PAX5* podrían contribuir al desarrollo de la leucemia⁵². De este modo, la deficiencia en *PAX5* parece tener función de *driver* en B-ALL ya que, como ha sido publicado previamente, la reconstitución de la expresión endógena de *Pax5* provoca la remisión

de la enfermedad en ratón¹³⁶. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual *BCR-ABL*^{p190} y *PAX5* contribuyen al desarrollo de la B-ALL permanece aún sin resolver. En el presente trabajo de tesis doctoral hemos demostrado que la expresión de *BCR-ABL*^{p190} limitada al compartimento de HS/PCs es capaz de inducir el desarrollo de B-ALL con baja incidencia, sugiriendo que *BCR-ABL*^{p190} favorecería la aparición de un precursor de células B aberrante en la médula ósea. De esta forma, la expresión de *BCR-ABL*^{p190} limitada al compartimento de HS/PCs generaría un clon pre-leucémico que permanece clínicamente silente hasta la aparición de alteraciones secundarias que dan lugar al inicio del desarrollo de la B-ALL. En este contexto, la pérdida de la actividad transcripcional de *Pax5* es crítica para que se produzca el inicio del desarrollo de la enfermedad, como demuestra el hecho que las leucemias que desarrollan los animales Sca1-*BCR-ABL*^{p190} no expresan *Cd19* (gen diana de *Pax5* que únicamente se expresa cuando *Pax5* está activo) y los análisis de enriquecimiento mediante GSEA que demuestran que la actividad transcripcional de *Pax5* está perdida o fuertemente reducida en los blastos de los ratones leucémicos. Además, la observación que la incidencia de B-ALL aumenta drásticamente en el modelo animal Sca1-*BCR-ABL*^{p190}+*Pax5*^{+/-} junto con la aparición de mutaciones en el segundo alelo de *Pax5* en los ratones Sca1-*BCR-ABL*^{p190}+*Pax5*^{+/-} leucémicos, confirma nuevamente la importancia que tiene la reducción de la actividad transcripcional del gen en el desarrollo de la B-ALL *BCR-ABL*^{p190} positiva. La aparición de las variantes en *Pax5* parece, además, estar ligada con el inicio del desarrollo de B-ALL debido a que los estudios de secuenciación realizados mediante *Sanger Sequencing* en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de forma rutinaria (cada 2 meses) han revelado que la presencia de mutaciones coincide con el momento de detección de la B-ALL, no siendo observadas en las muestras obtenidas en los sangrados rutinarios previos al desarrollo de la enfermedad. Este resultado enfatiza el hecho de que la pérdida de *Pax5* no tiene función de evento que confiere susceptibilidad durante el desarrollo de la B-ALL *BCR-ABL*^{p190} positiva. Nuestro modelo demuestra que la expresión de *BCR-ABL*^{p190} limitada al compartimento de HS/PCs genera susceptibilidad al desarrollo de B-ALL mediante la inducción de mutaciones secundarias en *Pax5*, que actúan como *driver*, desencadenando la selección clonal de células pro-B/pre-B que forman la masa tumoral de la B-ALL. En cuanto al mecanismo molecular, hemos mostrado que la capacidad oncogénica de la reducción de la actividad transcripcional de *Pax5* en células pre-leucémicas da lugar a la reprogramación metabólica de las células de la masa tumoral (que no expresan *BCR-ABL* y tienen una actividad reducida de *Pax5*). Esta reprogramación metabólica está caracterizada por el aumento de actividad glicolítica y

de los niveles de ATP, así como por un incremento de la capacidad glicolítica en las células tumorales. El aumento en la capacidad glicolítica indica que las células pro-B leucémicas, que recordemos, no expresan BCR-ABL^{p190} y tienen una actividad reducida de Pax5, tienen la habilidad de incrementar la tasa de glicolisis para así restaurar los niveles de ATP cuando la producción de ATP mitocondrial es inhibida. Este cambio metabólico es intensificado cuando la pérdida de Pax5 actúa como evento secundario en el contexto de una susceptibilidad previa generada por la expresión de BCR-ABL^{p190} limitada al compartimento de HS/PCs, y es un evento temprano recapitulado en células pre-leucémicas pro-B que no expresan BCR-ABL^{p190} y son heterocigotas para Pax5. Por tanto, los resultados mostrados en el presente trabajo de tesis doctoral demuestran que la eliminación o reducción de la actividad transcripcional de Pax5 es crítica para el desarrollo y la progresión de la B-ALL debido a que dirige el cambio metabólico esencial para desencadenar el desarrollo de la enfermedad en ratones con una susceptibilidad generada previamente por la expresión de BCR-ABL^{p190} limitada al compartimento de células madre/progenitoras hematopoyéticas.

Hasta la fecha, únicamente se habían estudiado las alteraciones en PAX5 como eventos secundarios en el desarrollo de la B-ALL. Sin embargo, con la publicación a finales de 2013 y principios de 2014 de dos estudios que relacionaron la presencia de mutaciones heredadas en PAX5 con un nuevo síndrome de susceptibilidad al desarrollo de pB-ALL^{67,68}, se ha ampliado el posible papel de PAX5 en el desarrollo de la enfermedad. La presencia de mutaciones heredadas en PAX5 parece generar un clon pre-leucémico que permanece clínicamente oculto y silente, y que se transforma en pB-ALL únicamente en un porcentaje bajo (aproximadamente un 25%) de los miembros de la familia^{67,68}. Los pacientes, además, pierden el alelo WT de PAX5 debido a alteraciones estructurales en 9p. En el modelo animal (*Pax5*^{+/-}) que mostramos en la presente tesis doctoral, reproducimos el mismo escenario, pero la secuencia de *hits* es inversa: los ratones nacen con la pérdida de uno de los alelos WT de Pax5 y, posteriormente, adquieren mutaciones puntuales en el segundo alelo. Sin embargo, el mecanismo final es común en ambas especies: la disminución de la actividad transcripcional de PAX5.

Durante el siglo pasado, las infecciones han sido consideradas como un probable factor ambiental implicado en el desarrollo de leucemias infantiles. Sin embargo, los estudios epidemiológicos llevados a cabo para tratar de correlacionar la exposición a la infección durante la infancia y el desarrollo de B-ALL han mostrado resultados contradictorios^{10,26,30}. De acuerdo con la falta de evidencias científicas que relacionen la exposición a la infección y el desarrollo de B-ALL, los ratones WT nacidos en

condiciones SPF y movidos a condiciones de exposición a infección nunca desarrollan leucemia¹²⁶, lo cual sugiere que la exposición tardía a la infección podría no estar ligada al desarrollo de B-ALL. Sin embargo, es posible que, en humanos, la exposición a la infección favorezca el desarrollo de B-ALL solo en niños con una susceptibilidad genética previa (como son las mutaciones heredadas en *PAX5*). El mecanismo responsable de la conversión del clon pre-leucémico, que tiene mutaciones heredadas en *PAX5*, en pB-ALL aún no ha sido descifrado. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la enzima AID, una enzima específica de células B, podría jugar el papel de *driver* en la evolución clonal de la B-ALL ETV6-RUNX1 positiva¹⁵³⁻¹⁵⁵ y en linfomas de células B¹⁵⁶. Estos resultados están en línea con estudios previos que demostraron que AID es capaz de iniciar alteraciones genómicas aberrantes en células B¹⁵⁷. La pB-ALL que se originó como resultado de la exposición a infección de los ratones *Pax5*^{+/-} ofrece una posibilidad única de confirmar si los mecanismos previamente propuestos están involucrados en la progresión del clon pre-leucémico a pB-ALL^{30,158}.

La aceptación de una interacción funcional entre la susceptibilidad heredada y la exposición postnatal a infección es una explicación muy atractiva de la etiología de la B-ALL infantil. Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral demuestran por primera vez la hipótesis de la infección, que postula que la exposición a la infección representa el evento oncogénico ambiental que promueve el desarrollo de la B-ALL, en un modelo *in vivo*. En nuestro modelo experimental, los ratones *Pax5*^{+/-} nunca desarrollan B-ALL cuando son mantenidos en condiciones SPF. Sin embargo, la exposición de los ratones *Pax5*^{+/-} a estímulos infecciosos cuando tenían entre 2 y 5 meses de edad representa el evento oncogénico ambiental necesario para el desarrollo de la enfermedad. Por tanto, el modelo animal reproduce la situación humana, donde los niños se exponen a una gran cantidad de agentes infecciosos diferentes cuando tienen entre 2 y 5 años de edad. Hasta la fecha, todos los intentos por identificar un único agente infeccioso relacionado con el desarrollo de B-ALL han fallado²⁶. Esto indica que, en lugar de la exposición a un único patógeno, la exposición a una secuencia de infecciones y la respuesta aberrante de un sistema inmune no protegido serían las responsables del inicio del desarrollo de la enfermedad. De igual modo, varios meses antes de del desarrollo de la ALL, los niños muestran una marcada reducción de la respuesta inmune y un mayor riesgo frente a una variedad de infecciones.³⁰

En nuestro modelo, las mutaciones inactivantes en *Pax5* promueven el desarrollo de B-ALL mediante la generación de un precursor aberrante sensible a alteraciones en la ruta de IL7/IL7R. Esta población progenitora es susceptible de sufrir una transformación

maligna debida a la adquisición de mutaciones secundarias en *Jak3* provocadas por la presión selectiva desencadenada por la exposición a la infección a la que los animales se ven expuestos en el animalario convencional. Estas mutaciones somáticas en *Pax5* inducen el desarrollo de pB-ALL con un fenotipo muy similar a la pB-ALL humana ligada a mutaciones en línea germinal del gen *PAX5*. El trasplante *in vivo* de las células leucémicas *Pax5*^{+/-} con mutaciones activantes en *Jak3* demuestra que dichas mutaciones son suficientes para iniciar el desarrollo de la B-ALL y, por tanto, juegan el papel de *driver* en el desarrollo de la enfermedad. Por ello, los fármacos dirigidos a esta vía JAK-STAT desregulada en B-ALL, podrían ser una terapia prometedora para dicha enfermedad, como ha demostrado el tratamiento *in vivo* de los animales enfermos.

Sorprendentemente, el modelo animal reproduce fielmente la baja incidencia observada en las leucemias humanas relacionadas con la presencia de mutaciones heredadas en *PAX5*. Estudios adicionales con ratones *Pax5*^{+/-} expuestos a los mismos estímulos infecciosos en el útero y durante el primer mes de vida revelarán si el momento de inicio de exposición y el patrón de infecciones son realmente relevantes para el desarrollo de la pB-ALL, descifrando así la importancia de la exposición tardía a la infección en el desarrollo de pB-ALL o si, por el contrario, únicamente la exposición postnatal a la infección, independientemente del momento en que se produzca, es suficiente para favorecer el desarrollo de pB-ALL. Por todo ello, nuestros resultados son importantes no solo para aportar credibilidad a la teoría de la infección, sino también para alentar la perspectiva de nuevas intervenciones que podrían ayudar a prevenir una proporción significativa de las leucemias infantiles.

Finalmente, gracias al estudio de los dos modelos presentados en el presente trabajo de tesis doctoral, hemos podido determinar que el momento en el que se produce la alteración en *Pax5* determina si dicha alteración juega un papel de *driver* o de gen de susceptibilidad en la etiología de la B-ALL. Cuando la alteración en *Pax5* se produce en línea germinal, los ratones *Pax5*^{+/-} no desarrollan B-ALL a menos que no sean expuestos a infección¹²⁶. Por ello, en este contexto *Pax5* ejerce la función de gen de susceptibilidad al desarrollo de B-ALL y requiere la exposición a la infección, como evento oncogénico ambiental, y mutaciones en *Jak3*, que actúan como *drivers*, para que se produzca el inicio del desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, en un contexto en el que hay una susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad, impuesta por la expresión de BCR-ABL^{p190} limitada al compartimento de HS/PCs, las alteraciones en *Pax5* desencadenan el inicio del desarrollo de la B-ALL, jugando así el papel de *driver* en la etiología de la B-ALL. Por todo ello, los resultados mostrados en el presente trabajo de tesis doctoral

DISCUSIÓN

demuestran que el momento del desarrollo de la B-ALL en el que ocurren las alteraciones en *PAX5* determina su función como gen de susceptibilidad o *driver* en la etiología de la B-ALL.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La presencia de BCR-ABL^{p190} no es necesaria en todas las células para dar lugar al desarrollo de B-ALL. Por tanto, la expresión de BCR-ABL^{p190} limitada al compartimento de células madre/progenitoras hematopoyéticas genera susceptibilidad al desarrollo de B-ALL, favoreciendo la aparición de un precursor B aberrante en la médula ósea que, en ausencia de alteraciones secundarias, permanece clínicamente silente.
2. La eliminación o reducción de la actividad de Pax5 es crítica para el desarrollo y la progresión de la B-ALL, debido a que dirige el cambio metabólico esencial para desencadenar el desarrollo de la enfermedad en ratones con una susceptibilidad generada previamente por la expresión de BCR-ABL^{p190} limitada al compartimento de células madre/progenitoras hematopoyéticas.
3. La exposición de los ratones Pax5^{+/-} a estímulos infecciosos representa el evento oncogénico ambiental necesario para dar lugar a la adquisición de mutaciones activantes en *Jak3*, las cuales representan el segundo *hit* que da lugar al desarrollo de B-ALL con un fenotipo muy similar a las leucemias humanas ligadas a mutaciones de *PAX5* en línea germinal. Por tanto, estos resultados representan la primera prueba experimental de la “hipótesis infecciosa”, propuesta por Ward en 1917, como evento oncogénico ambiental que promueve el desarrollo de leucemia.

Material y métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales utilizados en el estudio

Los ratones Sca1-TK-IRES-BCR-ABL^{p190} fueron generados de la siguiente forma. El cassette de 9kb EcoRI-EcoRI TK-IRES-BCR-ABL^{p190} (con la secuencia de cDNA de BCR-ABL^{p190} humano) fue insertado en el sitio ClaI del vector pLy6¹³⁸, dando lugar al vector Sca1-TK-IRES-BCR-ABL^{p190}. El fragmento del transgén fue escindido del vector utilizando la enzima de restricción NotI, purificado por inyección (2ng/ml), e inyectado en cigotos fertilizados CBAXC57BL/6J. Los ratones transgénicos generados fueron identificados mediante análisis de Southern Blot usando DNA de cola digerido con la enzima EcoRI. Se utilizó cDNA de ABL humano para la detección del transgén.

Los ratones Pax5^{+/-} fueron cedidos por el laboratorio de M. Busslinger y su generación ha sido descrita previamente¹²³.

El modelo animal Sca1-TK-IRES-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} fue generado gracias al cruce de los dos modelos descritos previamente.

Todos los ratones utilizados en este trabajo tienen un *background* mixto CBAXC57BL/6J.

El trabajo con animales ha sido realizado siguiendo las pertinentes directrices nacionales e internacionales, y ha sido aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca (USAL) y por el Subcomité de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Para la realización de este proyecto he obtenido la capacitación para experimentadores en ciencias del animal de laboratorio, Categoría B.

Cuando fueron observados signos de enfermedad, los animales fueron sacrificados y se les realizaron procedimientos estándar de necropsia. Los análisis de supervivencia fueron realizados utilizando el test estadístico log-rank (Mantel-Cox).

2. Análisis de citometría de flujo

Se obtuvieron leucocitos de médula ósea total (haciendo *flushing* de los huesos largos), sangre periférica, timo, bazo o nódulos linfáticos de los ratones. Los eritrocitos fueron eliminados mediante la lisis de los mismos con buffer de lisis (RCLB, por sus siglas en inglés: *Red Cell Lysis Buffer*) y las células restantes fueron lavadas con PBS con 1% de FCS (PBS-1%FCS). Tras ser teñidas, las células se lavaron una vez más con PBS-1%FCS y resuspendieron en PBS-1%FCS que contenía 2mg/ml de ioduro de propidio

MATERIAL Y MÉTODOS

(PI, por sus siglas en inglés), permitiendo así excluir las células muertas en los análisis posteriores. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro ACCURI C6 y analizadas utilizando el software informático Flowjo. La fluorescencia específica para los fluorocromos FITC, PE, PI y APC, excitados a 488nm (0,4W) y 633nm (30mW), así como las propiedades conocidas de dispersión de la luz directa y ortogonal de las células de ratón fueron utilizadas para establecer los *gates*. En cada análisis fue examinado un mínimo de 50.000 células viables (negativas para PI).

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados en los análisis de citometría de flujo: anti-B220 (RA3-6B2; 1:100), anti-CD4 (RM4-5; 1:500), anti-CD8a (53-6.7; 1:500), anti-CD11b/Mac1 (M1/70; 1:200), anti-CD19 (1D3; 1:100), anti-CD117/c-Kit (2B8; 1:200), anti-CD127/IL7R α (A7R34; 1:50), anti-Ly-6G/Gr1 (RB6-8C5; 1:100), anti-IgM (R6-60.2; 1:100), anti-Sca1/Ly-6A/E (E13-161.7; 1:50), anti-CD25 (PC61; 1:500), anti-CD48 (HM48-1; 1:100) y anti-CD150 (TC15-12F12.2; 1:100). La posible unión inespecífica de los anticuerpos utilizados fue suprimida mediante la pre-incubación previa de las muestras con anti-CD16/CD32 Fc-block (2.4G2; 1:100). Todos los anticuerpos fueron adquiridos de BD Biosciences.

3. Análisis histológicos

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y las muestras obtenidas de los mismos fueron fijadas en formaldehído 4% e incluidas en parafina. Los estudios patológicos fueron realizados sobre secciones teñidas con hematoxilina-eosina bajo la supervisión del experto en patología Óscar Blanco, del hospital Universitario de Salamanca.

4. Extracción de DNA

Los tejidos fueron disgregados con 500 μ l o 5ml, en función de la celularidad de cada tejido, de tampón proteinasa K (0.25M de sacarosa, 50mM Tris pH 7.4, 25mM KCl, 5mM MgCl₂; 1% SDS; 20mM EDTA pH 8; 1 μ g de proteinasa K (Roche)) durante 16h a 55°C. Tras este periodo de incubación se realizó una extracción fenol-cloroformo para limpiar el DNA de restos celulares. Brevemente, se añadió a la muestra incubada un volumen de fenol (Gibco BRL), se centrifugó 5 minutos a máxima rpm y temperatura ambiente y nos quedamos con la fase superior. Después se añadió la fase superior en medio volumen de fenol (Gibco BRL) y medio volumen de cloroformo (Merk), realizándose otra centrifugación similar a la anterior, y quedándonos con la fase superior. Posteriormente,

se añadió la fase superior a un volumen de cloroformo (Merk), realizándose el mismo protocolo de centrifugación. La fase superior obtenida se precipitó en 2 volúmenes de etanol 100% (Merk). El precipitado de DNA obtenido se lavó con etanol 70%. Posteriormente, se resuspendió el DNA en agua bidestilada (ddH₂O), cuantificándose la concentración de DNA mediante la medida de absorción a 260nm con el espectrofotómetro Nanodrop-1000 (THERMO Scientific).

5. Recombinación V(D)J

Los reordenamientos de las inmunoglobulinas fueron amplificados por PCR utilizando los oligos listados al final de esta sección. Las condiciones de la PCR consistieron en una activación inicial a 95°C seguida por 31-37 ciclos de desnaturalización (1 minuto a 95°C), anillamiento (1 minuto a 65°C), y elongación (1 minuto y 45 segundos a 72°C). Este paso fue seguido por una elongación final de 10 minutos a 72°C. Para determinar las secuencias de DNA de cada reordenamiento V(D)J individual, los fragmentos de PCR fueron aislados del gel de agarosa y clonados en el vector pGEM-Teasy (Promega); Los insertos de DNA de, al menos 10 clones correspondientes al mismo fragmento de la PCR, fueron secuenciados para chequear su clonalidad.

Los oligos utilizados fueron los siguientes:

V_HJ558: sentido: CGAGCTCTCCARCACAGCCTWCATGCARCTCARC.
 anti-sentido: GTCTAGATTCTCACAAGAGTCCGATAGACCCTGG.

V_H 7183: sentido: CGGTACCAAGAASAMCCTGTWCCTGCAAATGASC.
 anti-sentido: GTCTAGATTCTCACAAGAGTCCGATAGACCCTGG.

V_H Q52: sentido: CGGTACCAGACTGARCATCASCAAGGACAAYTCC.
 anti-sentido: GTCTAGATTCTCACAAGAGTCCGATAGACCCTGG.

DH: sentido: TTCAAAGCACAATGCCTGGCT.
 anti-sentido: GTCTAGATTCTCACAAGAGTCCGATAGACCCTGG.

C_μ: sentido: TGGCCATGGGCTGCCTAGCCCGGGACTT.
 anti-sentido: GCCTGACTGAGCTCACACAAGGAGGA.

6. Extracción de RNA

Los tejidos fueron disgregados con filtros “*cell strainer*” de 70µm de nylon (BD FALCON). Posteriormente, se procedió a la extracción de RNA utilizando TRIzol (Life Technologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La calidad e integridad del RNA obtenido fue calculada en función de la relación resultante del cociente entre la longitud de onda de absorción del RNA, 260nm, y de las proteínas, 280nm, utilizando para ello el espectrofotómetro Nanodrop-100 (THERMO Scientific).

7. Síntesis de cDNA

Trabajando bajo condiciones *RNasa free* se añadió, sobre Eppendorf *RNasa free* en hielo, un volumen total de 13µl que contenía: Agua bidestilada (ddH₂O) *RNasa free*, 1µl de RNasin (30 unidades; Promega) y 5µg de RNA (que previamente fue cuantificado en el espectrofotómetro Nanodrop-100 (THERMO Scientific)). Esta muestra fue incubada durante 5 minutos a 65°C. Posteriormente, añadimos a temperatura ambiente: 0.5µl de Oligo d(T) mRNA primer (New England BioLabs), 1µl de RNasin (Promega), 4µl de BUFFER 5x (50mM Tris-HCl pH 8.3, 100mM KCl, 10mM MgCl₂, 5mM DTT, 500µM dGTP, 500µM dATP, 500µM dTTP, 500µM dCTP) y 1µl de RTasa (20 unidades; superRT, Anglia). La muestra fue posteriormente incubada durante 5 minutos a 42°C y resuspendida en agua bidestilada (ddH₂O) *RNasa free*.

8. RT-PCR de BCR-ABL^{p190}

El cDNA utilizado en estudios de PCR cuantitativos fue sintetizado utilizando la transcriptasa reversa (Promega). 5µl de RNA fueron transcritos. Los oligos y las sondas tipo TaqMan utilizados para la PCR cuantitativa han sido descritos previamente¹²¹. Las sondas fueron diseñadas para no detectar el DNA genómico durante la PCR.

Los oligos y las sondas utilizados fueron los siguientes:

BCR-ABL^{p190}: sentido: CCGCAAGACCGGGCAGAT

anti-sentido: CAGATGCTACTGGCCGCTGA

sonda: TGGCCCAACGATGGCGAGGG

Abl: sentido: CACTCTCAGCATCACTAAAGGTGAA
 anti-sentido: CGTTTGGGCTTCACACCATT
 sonda: CCGGGTCTTGGGTATAATCACAATG

9. Análisis de arrays de expresión

El RNA total fue aislado en 2 pasos, utilizando TRIzol (Life Technologies) seguido de la purificación con RNesay Mini-Kit (Qiagen) siguiendo el protocolo “RNA clean-up” con tratamiento opcional de DNasa. La integridad y calidad del RNA, así como su concentración, fueron verificadas y medidas utilizando Agilent (Agilent Technologies). Las muestras fueron analizadas utilizando los *arrays* “Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST”.

Brevemente, el algoritmo “*robust microarray analysis*” (RMA) fue utilizado para la corrección del *background*, la normalización intra- e inter-microarray, y el cálculo de la expresión de la señal¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Una vez fue calculada la señal de expresión absoluta para cada gen (por ejemplo, el valor de cada *probe set*) en cada microarray, un método denominado “*significance analysis of microarray*” (SAM)¹⁶² fue utilizado para calcular la expresión diferencial significativa y encontrar los *probe sets* de genes que caracterizan las muestras problema comparadas con las muestras control. Este método utiliza permutaciones para calcular de forma robusta la inferencia estadística de la mayoría de los genes y proporciona p-valores ajustados a múltiples test utilizando el “*false discovery rate*” (FDR)¹⁶³. Un corte en, al menos, FDR<0.05 fue utilizado para los cálculos de expresión diferencial. Todos estos métodos fueron aplicados utilizando R¹⁶⁴ y Bioconductor¹⁶⁵.

Los datos discutidos en esta tesis doctoral han sido publicados y depositados en la plataforma Gene Expression Omnibus¹⁶⁶ y son accesibles a través de los números de acceso de GEO GSE85600 y GSE62529.

10. Análisis de enriquecimiento

El análisis de enriquecimiento de los genes expresados diferencialmente fue realizado utilizando la plataforma GSEA de MSigDB¹⁴⁰ (<http://www.broad.mit.edu/gsea/>). El solapamiento de las firmas de expresión génica que son específicamente activadas o reprimidas en los *gene sets* “Firma genética de la B-ALL humana”^{142,143} fue evaluado con los genes activados y reprimidos de las muestras problema utilizando el análisis de enriquecimiento de GSEA. Del mismo modo fue evaluado el solapamiento de los

siguientes *gene sets*: un conjunto de gene sets que representan los diferentes estadios de diferenciación de células B en ratón¹³⁹, vía de señalización de BCR-ABL¹⁴¹, los genes diana de BCR-ABL (obtenidos de <http://www.broad.mit.edu/gsea/>), y los genes regulados por *Pax5*^{129-131,136}.

11. Secuenciación de DNA y preparación de las librerías

El DNA fue purificado siguiendo los métodos detallados en la sección “4. Extracción de DNA”.

La preparación de la librería del exoma fue realizada utilizando el kit Agilent SureSelectXT Mouse All exon. Se realizó la captura dirigida por la hibridación con una librería de RNA, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. La purificación y el enriquecimiento de la librería capturada fue conseguida mediante la unión a “MyOne Streptavidin T1 Dynabeads” (Life Technologies) y la amplificación de los elementos no unidos a los *beads* por PCR en un rango lineal. La secuenciación de 2×10^2 pares de bases (pb) con un índice de lectura de 6 pb fue realizada utilizando el kit TruSeq SBS kit v3 en el secuenciador HiSeq 2500 (Illumina).

Los archivos fastq fueron generados utilizando BcltoFastq 1.8.4 (Illumina). Se utilizó la versión 0.7.4. de BWA para alinear los datos secuenciados con el genoma referencia de ratón (GRCm38.71). Los pasos de conversión fueron llevados a cabo utilizando Samtools, seguidos por la retirada de las lecturas duplicadas (<http://broadinstitute.github.io/picard>). El reordenamiento local alrededor de los indels, la denominación de los SNP, la anotación y la recalibración fueron facilitados por GATK 2.4.9. Los SNPs de ratón dbSNP138 y dbSNP fueron utilizados como conjuntos de datos de prueba para las cepas de ratón utilizadas. Las variaciones resultantes entre los datos secuenciados y la secuencia referencia fueron anotadas por el programa Variant Effect Predictor utilizando la base de datos de Ensembl (v70) e importadas a una base de datos propia (servidor MySQL interno), para facilitar la anotación automática y manual, y el análisis de los datos mediante consultas complejas de bases de datos.

Las anotaciones somáticas fueron realizadas utilizando MuTect¹⁶⁷. Los genes relacionados con cáncer fueron determinados traduciendo la lista “*cancer gene consensus*” de COSMIC, utilizando la aplicación Biomart de Ensembl. Para evaluar deleciones en las muestras tumorales, las secuencias brutas fueron mapeadas con el genoma de referencia mm10/GRCm38 con BWA-MEM¹⁶⁸ (parámetros por defecto, versión 0.7.10) y las lecturas con extremos finales duplicados fueron eliminadas

basándonos en sus posiciones de mapeo. Los alineamientos fueron analizados con SoftSV¹⁶⁹ (parámetros por defecto, versión 1.4) para anotar variaciones estructurales (pequeñas deleciones, inversiones, duplicaciones en tándem y translocaciones) y con Control-FREEC¹⁷⁰ (versión 7.2) para detectar alteraciones en el *copy number*.

12. Secuenciación

Las mutaciones fueron validadas por *Sanger Sequencing* en un analizador genético 3130 (Applied Biosystems) utilizando los siguientes oligos (5' → 3'):

mJak3 exón 12: sentido: CACAATTCCAACGGACAGCC
 anti-sentido: TTCTGCAAGGCCTTCTCTGG

mJak3 exón 15: sentido: CGGGATGTGGGGCTTTAACT
 anti-sentido: GCAGACACGGGGTATAGTGG

mPax5 exón 2: sentido: TCATCCGCATGATTGACACC
 anti-sentido: GCTGCGGGCTATCTTTTAGC

mPax5 exón 3: sentido: CTCGTACATGCACGGAGACA
 anti-sentido: GGACCCTTCAGTACACCAGC

mJak1: sentido: CCAGACAGCCAGGAGAACAG
 anti-sentido: CGTCTGCATAGTACCCACCC

13. Screening de delección de Pax5

Se utilizó 1 µg de RNA proveniente de células de médula ósea total de ratones Sca1-BCR-ABL^{p190}+Pax5^{+/-} leucémicos para generar cDNA mediante transcriptasa reversa utilizando el kit QantiTect Reverse Transcription (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Toda la región codificante de *Pax5* fue amplificada utilizando los siguientes oligos:

Pax5: sentido: GGAAACTTTTCCTCGCTGTCC
 anti-sentido: GAAGCTCATCAAGCGACCCT

14. Deep sequencing

Para la realización del *deep sequencing* se utilizaron adaptadores Illumina TruSeq junto con los siguientes oligos específicos:

mJak3 R533C:	sentido: AGCCACCTTCAACTGTCCTC
	anti-sentido: CCTCCATGCAGTTCCGATGT
mJak3 R653H/C:	sentido: CCCTGTTCCCTCCTGTAACAC
	anti-sentido: AGTGGGACTGACACCAGGAT
mJak3 V670A:	sentido: AACGTCTCAGCACGGAAGG
	anti-sentido: GTGCAAAGGTGACCATGACAG
mPax5 I54N:	sentido: GACTGGTTCTAACCACCCTTC
	anti-sentido: CCAAGAATTTTGCTGACACAACC

Las muestras fueron secuenciadas en el secuenciador HiSeq 2500 (Illumina Inc.)

15. Estudio de la actividad transcripcional de los mutantes de Pax5

15.1. Cultivo celular

Las células Hek293T fueron obtenidas del banco de células DMSZ (ACC 635, Heidelberg) y cultivadas en medio DMEM GlutaMAX™ (Life Technologies) suplementado con 10%FCS (v/v) inactivado por calor y penicilina-estreptomina (100 unidades/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomina, Life Technologies), a 37°C y 5% de CO₂.

15.2. Clonación de las construcciones en células Hek293T

El cDNA que contiene la secuencia codificante del gen murino *Pax5 wild-type* (WT) fue obtenida del plásmido de Pax5 (#35003) (Addgene) mediante PCR utilizando la DNA polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific). Los cDNAs para las formas mutantes del gen murino *Pax5* (P80R, P80L, R38C, P32L, I54N, V26G) fueron creados por mutagénesis dirigida por PCR utilizando la misma polimerasa. Las secuencias de *Pax5* obtenidas fueron entonces clonadas en un derivado de un vector de expresión bicistrónico (pMC3), utilizado previamente para la expresión estable de genes en líneas celulares. Este vector fue modificado con el gen de resistencia a higromicina como

segundo cistrón (pMC3-PAX5.HYGRO). La identidad de los respectivos cDNAs fue confirmada mediante *Sanger Sequencing*.

Las células Hek293T fueron transfectadas utilizando el reactivo Attractene Transfection (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, 1,2µg de cada construcción pMC3-PAX5.HYGRO, o el vector vacío, fueron diluidos en 100µl de medio libre de suero. 5,5µl de Attractene fueron añadidos a los 100µl de medio con las construcciones. Tras un periodo de incubación de 15 minutos del DNA con el Attractene se añadieron 6×10^5 células Hek293T en suspensión y se plaqueó en placas de 6 pocillos. Las células que fueron transfectadas con el plásmido fueron seleccionadas utilizando 200µg/ml de higromicina B (Life Technologies).

15.3. Ensayos de Luciferasa

Las células Hek293T que expresaron pMC3-PAX5.HYGRO^{WT}, pMC3-PAX5.HYGRO^{vacio} o pMC3-PAX5.HYGRO^{mutante} fueron transfectadas con 2µg de la construcción luc-CD19 (proporcionada por el profesor M. Busslinger)¹⁴⁴ y 100ng del plásmido pRL-TK *Renilla* luciferasa (Promega) utilizando FuGene6 (Roche Diagnostics). 48 horas después de la transfección, se midieron la lisis celular y la actividad *Renilla* luciferasa y *firefly* luciferasa utilizando el sistema Dual-Glo Luciferase (Promega). La actividad *firefly* luciferasa fue normalizada con la correspondiente actividad *Renilla* luciferasa.

16. Estudios de Western blot

Se realizaron estudios de Western blot en células B220⁺ de médula ósea de ratones pre-leucémicos Sca1-*BCR-ABL*^{p190} y Sca1-*BCR-ABL*^{p190}+Pax5^{+/-} separadas por FACS; en células de bazo de ratones leucémicos Pax5^{+/-}; células de bazo de ratones WT; células Ba/F3 que expresan BCR-ABL^{p190}; células Ba/F3 que expresan Jak3^{WT} y Jak3^{R653H}; y células Ba/F3 transfectadas con vector vacío.

En los casos en los que se utilizó bazo total, las muestras se recogieron utilizando un filtro de 100µm y los eritrocitos fueron eliminados utilizando NH₄Cl.

Las células fueron lisadas con buffer RIPA (50mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 0.5% desoxicolato de sodio, 1% NP-40, 0.1% SDS) que contenía proteasa e inhibidores de fosfatasa (Roche Diagnostics). 20µg de proteína total fueron separados en SDS-PAGE y transferidos a membranas Hybond-C Extra (Amersham Biosciences).

MATERIAL Y MÉTODOS

La inmunotransferencia fue llevada a cabo utilizando los siguientes anticuerpos: anti-c-ABL 1:1000 (Cell Signaling, #2862), anti-fosfo-STAT5 1:1000 (Cell Signaling, mAb #9359), anti-STAT5 1:1000 (Cell Signaling, mAb #9358) y anti β -Actina 1:10000 (Sigma Aldrich, clon AC-74). La detección fue llevada a cabo utilizando anticuerpos anti-conejo o anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology) en un sistema ECL (Thermo Scientific).

17. Cultivos de células pro-B

Los cultivos de células pro-B se realizaron en medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) suplementado con 50 μ M de β -Mercaptoetanol, 1mM de L-glutamina, 2% de FCS inactivado por calor, 1mM de penicilina-estreptomicina (BioWhittaker) y 0.03% (peso/volumen) de primatone RL (Sigma Aldrich). El aislamiento de células pro-B fue realizado por MACS (Milteny Biotec), mediante el marcaje de células B220⁺ de médula ósea. Las células obtenidas mediante la separación por MACS fueron cultivadas sobre *feeders* ST2 tratados con mitomicina C en el medio descrito anteriormente suplementado con IL7 (R&D Systems). Las células pro-B tumorales independientes de IL7 fueron crecidas en el mismo medio en ausencia de IL7.

18. Estudios de apoptosis

Alícuotas de 200 μ l que contenían 10⁶ células en 10mM Hepes/NaOH pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl₂ fueron incubadas con Anexina-V (BD Biosciences) a una concentración final de 1 μ g/ml durante 10 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras esta incubación, fueron marcados con PI a una concentración final de 2 μ g/ml. El estudio de citometría de flujo fue realizado 1 hora tras el marcaje y los datos fueron analizados utilizando el software Flowjo. Las diferencias entre las muestras experimentales fueron calculadas utilizando el test t de Student.

19. Mediciones de glucosa, lactato y ATP

Los niveles de glucosa y lactato fueron medidos utilizando el kit Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay (Invitrogen) y el kit L-Lactate Assay (Cayman Chemical), respectivamente, siguiendo los protocolos aconsejados por los fabricantes. Los niveles de glucosa y lactato fueron medidos en medio fresco y medio usado. Los niveles totales de ATP fueron medidos utilizando el kit ATP bioluminescence Assay CLS

II (Roche) siguiendo el protocolo aconsejado por el fabricante. Un millón de células fueron cultivadas en medio fresco. Se midieron los niveles de consumo de glucosa, producción de lactato y ATP total y los valores fueron normalizados respecto al número de células viables utilizando Trypan Blue, debido a la posibilidad que las células tengan tasas de proliferación y muerte diferentes.

20. Análisis metabólicos

Los perfiles glicolíticos fueron monitorizados en condiciones basales (actividad glicolítica) y en respuesta a oligomicina (un inhibidor de la ATP sintasa) añadida al medio. La actividad glicolítica fue medida mediante la tasa de acidificación extracelular (ECAR, por sus siglas en inglés). La oligomicina suprime la producción de ATP mitocondrial, llevando a una glicolisis incrementada que compensa la demanda de energía de la célula y mantiene la homeostasis de energía. Esta elevada tasa de glicolisis es denominada capacidad glicolítica. La tasa de acidificación extracelular fue medida utilizando un analizador de flujo Seahorse XFe24 (Seahorse Bioscience). Brevemente, se cultivaron 1.5×10^5 células por pocillo utilizando Cell-Tak (BD Biosciences). Antes de las mediciones, las células fueron incubadas en medio base XF suplementado con glucosa 25mM, piruvato de sodio 1mM y GlutaMAX 2mM durante 1 hora a 37°C (en un incubador sin CO₂) para la estabilización del pH. La tasa de acidificación extracelular fue medida en estado de reposo (actividad glicolítica en medio base XF suplementado con glucosa, piruvato de sodio y GlutaMAX) y en respuesta a oligomicina (1μM; capacidad glicolítica). Todos los parámetros fueron normalizados respecto al número de células viables.

21. Análisis de expresión de *Cdkn2a/Arf*

El análisis de expresión de *Cdkn2a/Arf* se realizó mediante qRT-PCR. El cDNA se sintetizó a partir de RNA de muestras de médula ósea total de ratones *Pax5*^{+/-} leucémicos. En la qPCR se utilizaron los siguientes ensayos TaqMan (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems): *Cdkn2a* (Mm.PT. 56a.8388138) y *Gapdh* (Mm.PT. 39a.1).

22. Experimentos con células Ba/F3

La línea celular Ba/F3 fue obtenida del banco de células DMSZ (ACC 300, Heidelberg). Las células fueron mantenidas siguiendo las instrucciones del suministrador, autenticadas por la compañía y utilizadas durante 6 meses tras ser recibidas. Las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 GlutaMAX (Life Technologies) suplementado con 10% FCS inactivado por calor, gentamicina (50µg/ml) e IL3 recombinante de ratón (10µg/m; Life Technologies), a 37°C y 5% de CO₂.

22.1 Generación de *Jak3*^{R653H} murino:

El cDNA que contiene la secuencia codificante del gen murino *Jak3* WT fue obtenida de la secuencia completa del clon de cDNA de RIKEN A130091E14 mediante PCR, utilizando la DNA polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific). El mutante de cDNA del *Jak3*^{R653H} murino fue generado por mutagénesis directa por PCR utilizando los siguientes oligos:

mJak3^{WT}: sentido: GGCGCACGCGTATGGCACCTCCAAGTGAGG
 anti-sentido: CCTCGGGGCCCTCCGGGTCTTCCACGCCAC

mJak3^{R653H}: sentido: CGGAAGGTGCTCCTGGCTCATGAGGGGGGTGAT
 GGGAATC
 anti-sentido: GATTCCCATCACCCCTCATGAGCCAGGAG
 CACCTTCCG

Las secuencias WT y mutante de *Jak3* fueron clonadas en un derivado de vector de expresión bicistrónico (pMC3) utilizado previamente para expresión estable de genes en líneas celulares. Este vector fue modificado con el gen de resistencia a higromicina como segundo cistrón (pMC3-*Jak3*.HYGRO).

Las células Ba/F3 fueron transfectadas utilizando el Nucleofector Amaxa (Lonza), siguiendo el protocolo aconsejado por el fabricante. Las células que contenían los plásmidos fueron seleccionadas utilizando 600µg/ml de higromicina B (Life Technologies). Para examinar el papel potencial de las mutaciones identificadas en *Jak3* en el desarrollo de leucemia independientemente de *Pax5*, se inyectaron células Ba/F3 que expresaban *Jak3*^{V670A} (n=5) o *Jak3*^{R653H} (n=4) en ratones desnudos mediante inyección en la vena de la cola.

23. Estudios de proliferación celular

Las células Ba/F3 (2×10^5) que expresaban $Jak3^{WT}$, $Jak3^{R653H}$ o el vector vacío fueron lavadas 2 veces con medio sin IL3. Previamente, habían sido cultivadas durante 10 días con medio sin IL3.

Las células pro-B $Pax5^{+/-}$ ($Jak3^{V670A}$), $Pax5^{+/-}$ y WT (1×10^4) fueron lavadas 2 veces con medio sin IL7. Previamente, habían sido cultivadas durante 7 días con medio sin IL7.

Los estudios de proliferación celular fueron llevados a cabo contando las células viables cada día utilizando Trypan Blue (Sigma Aldrich).

24. Inhibidores de JAK

Para estos estudios fueron utilizadas células pro-B WT, $Pax5^{+/-}$ y tumorales. Se cultivaron 10^6 células/3ml/pocillo en placas de 6 pocillos y se trataron con o sin (vehículo) TOFACITINIB (inhibidor de JAK1/3; $1 \mu\text{M}$), TG101348 (inhibidor de JAK2; $1 \mu\text{M}$) o RUXOLITINIB (inhibidor de JAK1/2; $1 \mu\text{M}$) durante 24 horas. Tras 24h con el inhibidor se realizaron estudios de viabilidad (apoptosis). Los experimentos fueron realizados a la vez y bajo las mismas condiciones experimentales.

25. Experimentos de trasplante de células de médula ósea

Células mieloides, células pro-B $Pax5^{+/-}$ con $Jak3^{WT}$ y células pro-B $Pax5^{+/-}$ con $Jak3^{R653H}$ de médula ósea fueron inyectadas vía intravenosa en receptores secundarios (ratones singénicos C57BL/6 x CBA de 12 semanas de edad irradiados de forma sub-letal (4Gy)). El desarrollo de enfermedad de los ratones receptores fue monitorizado mediante análisis periódicos de citometría de flujo de sangre periférica hasta que los blastos fueron detectados. Entonces, los ratones fueron sacrificados para analizar el desarrollo de pB-ALL.

26. Tratamiento pre-clínico

Se administraron 180mg/kg de RUXOLITINIB diluido en PBS de forma oral, dos veces al día, cuando los animales habían desarrollado una carga leucémica significativa medida mediante análisis de citometría de flujo de sangre periférica. La evolución de la enfermedad fue evaluada mediante análisis periódicos de citometría de flujo de sangre periférica hasta que el porcentaje de blastos aumentó de forma significativa. Entonces, los animales fueron sacrificados y analizados para determinar el desarrollo de pB-ALL.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* **67**, 7-30, doi:10.3322/caac.21387 (2017).
- 2 Downing, J. R. *et al.* The Pediatric Cancer Genome Project. *Nat Genet* **44**, 619-622, doi:10.1038/ng.2287 (2012).
- 3 Inaba, H., Greaves, M. & Mullighan, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **381**, 1943-1955, doi:10.1016/S0140-6736(12)62187-4 (2013).
- 4 Balduzzi, A. *et al.* Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very-high-risk childhood acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission: comparison by genetic randomisation in an international prospective study. *Lancet* **366**, 635-642, doi:10.1016/S0140-6736(05)66998-X (2005).
- 5 Stock, W. Adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2010**, 21-29, doi:10.1182/asheducation-2010.1.21 (2010).
- 6 Doll, R. & Hill, A. B. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br Med J* **2**, 739-748 (1950).
- 7 Sadowsky, D. A., Gilliam, A. G. & Cornfield, J. The statistical association between smoking and carcinoma of the lung. *J Natl Cancer Inst* **13**, 1237-1258 (1953).
- 8 Frazier, A. L., Colditz, G. A., Fuchs, C. S. & Kuntz, K. M. Cost-effectiveness of screening for colorectal cancer in the general population. *JAMA* **284**, 1954-1961 (2000).
- 9 Mori, H. *et al.* Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8242-8247, doi:10.1073/pnas.112218799 (2002).
- 10 Greaves, M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* **6**, 193-203, doi:10.1038/nrc1816 (2006).
- 11 Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J. & Maley, C. C. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* **6**, 924-935, doi:10.1038/nrc2013 (2006).
- 12 Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23-28 (1976).
- 13 Anderson, K. *et al.* Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* **469**, 356-361, doi:10.1038/nature09650 (2011).
- 14 Notta, F. *et al.* Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. *Nature* **469**, 362-367, doi:10.1038/nature09733 (2011).
- 15 Navin, N. *et al.* Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* **472**, 90-94, doi:10.1038/nature09807 (2011).
- 16 Klein, C. A. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* **9**, 302-312, doi:10.1038/nrc2627 (2009).
- 17 Oosterhuis, J. W. & Looijenga, L. H. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* **5**, 210-222, doi:10.1038/nrc1568 (2005).

- 18 Gorre, M. E. *et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* **293**, 876-880, doi:10.1126/science.1062538 (2001).
- 19 Kobayashi, S. *et al.* EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **352**, 786-792, doi:10.1056/NEJMoa044238 (2005).
- 20 Mullighan, C. G. *et al.* Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* **322**, 1377-1380, doi:10.1126/science.1164266 (2008).
- 21 Preston, D. L. *et al.* Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res* **137**, S68-97 (1994).
- 22 Doll, R. & Wakeford, R. Risk of childhood cancer from fetal irradiation. *Br J Radiol* **70**, 130-139, doi:10.1259/bjr.70.830.9135438 (1997).
- 23 Childhood cancer and residential proximity to power lines. UK Childhood Cancer Study Investigators. *Br J Cancer* **83**, 1573-1580, doi:10.1054/bjoc.2000.1550 (2000).
- 24 Ahlbom, A. *et al.* A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *Br J Cancer* **83**, 692-698, doi:10.1054/bjoc.2000.1376 (2000).
- 25 Dockerty, J. D., Draper, G., Vincent, T., Rowan, S. D. & Bunch, K. J. Case-control study of parental age, parity and socioeconomic level in relation to childhood cancers. *Int J Epidemiol* **30**, 1428-1437 (2001).
- 26 McNally, R. J. & Eden, T. O. An infectious aetiology for childhood acute leukaemia: a review of the evidence. *Br J Haematol* **127**, 243-263, doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05166.x (2004).
- 27 Hjalgrim, L. L. *et al.* Birth weight as a risk factor for childhood leukemia: a meta-analysis of 18 epidemiologic studies. *Am J Epidemiol* **158**, 724-735 (2003).
- 28 Epidemiology of childhood cancer. *IARC Sci Publ*, 1-386 (1999).
- 29 Pui, C. H., Robison, L. L. & Look, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **371**, 1030-1043, doi:10.1016/S0140-6736(08)60457-2 (2008).
- 30 Crouch, S. *et al.* Infectious illness in children subsequently diagnosed with acute lymphoblastic leukemia: modeling the trends from birth to diagnosis. *Am J Epidemiol* **176**, 402-408, doi:10.1093/aje/kws180 (2012).
- 31 Ward, G. The infective theory of acute leukaemia. *Br J Child Dis*, 10-20 (1917).
- 32 Cooke, J. V. The incidence of acute leukemia in children. *JAMA* **119**, 547-550 (1942).
- 33 Kinlen, L. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a Scottish new town with nuclear reprocessing sites in Britain. *Lancet* **2**, 1323-1327 (1988).
- 34 Greaves, M. F. Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2**, 120-125 (1988).
- 35 Weitzman, M. D. & Ornelles, D. A. Inactivating intracellular antiviral responses during adenovirus infection. *Oncogene* **24**, 7686-7696, doi:10.1038/sj.onc.1209063 (2005).

- 36 Wilkinson, D. E. & Weller, S. K. Herpes simplex virus type I disrupts the ATR-dependent DNA-damage response during lytic infection. *J Cell Sci* **119**, 2695-2703, doi:10.1242/jcs.02981 (2006).
- 37 Priftakis, P. *et al.* Human polyomavirus DNA is not detected in Guthrie cards (dried blood spots) from children who developed acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* **40**, 219-223, doi:10.1002/mpo.10246 (2003).
- 38 Bogdanovic, G., Jernberg, A. G., Priftakis, P., Grillner, L. & Gustafsson, B. Human herpes virus 6 or Epstein-Barr virus were not detected in Guthrie cards from children who later developed leukaemia. *Br J Cancer* **91**, 913-915, doi:10.1038/sj.bjc.6602099 (2004).
- 39 Isa, A., Priftakis, P., Broliden, K. & Gustafsson, B. Human parvovirus B19 DNA is not detected in Guthrie cards from children who have developed acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* **42**, 357-360, doi:10.1002/pbc.20001 (2004).
- 40 Gustafsson, B. *et al.* Adenovirus DNA is detected at increased frequency in Guthrie cards from children who develop acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* **97**, 992-994, doi:10.1038/sj.bjc.6603983 (2007).
- 41 Cheeran, M. C., Lokensgard, J. R. & Schleiss, M. R. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev* **22**, 99-126, Table of Contents, doi:10.1128/CMR.00023-08 (2009).
- 42 Francis, S. S. *et al.* In utero cytomegalovirus infection and development of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **129**, 1680-1684, doi:10.1182/blood-2016-07-723148 (2017).
- 43 Gustafsson, B., Jernberg, A. G., Priftakis, P. & Bogdanovic, G. No CMV DNA in Guthrie cards from children who later developed ALL. *Pediatr Hematol Oncol* **23**, 199-205, doi:10.1080/08880010500506677 (2006).
- 44 Guan, H., Miao, H., Ma, N., Lu, W. & Luo, B. Correlations between Epstein-Barr virus and acute leukemia. *J Med Virol*, doi:10.1002/jmv.24797 (2017).
- 45 Lin, J. N. *et al.* Risk of leukaemia in children infected with enterovirus: a nationwide, retrospective, population-based, Taiwanese-registry, cohort study. *Lancet Oncol* **16**, 1335-1343, doi:10.1016/S1470-2045(15)00060-1 (2015).
- 46 Spector, L. G. Enterovirus infection and childhood leukaemia: an association? *Lancet Oncol* **16**, 1278-1279, doi:10.1016/S1470-2045(15)00194-1 (2015).
- 47 Cazzaniga, G. *et al.* Possible role of pandemic AH1N1 swine flu virus in a childhood leukemia cluster. *Leukemia*, doi:10.1038/leu.2017.127 (2017).
- 48 Huang, Y. *et al.* Is Toxoplasma Gondii Infection a Risk Factor for Leukemia? An Evidence-Based Meta-Analysis. *Med Sci Monit* **22**, 1547-1552 (2016).
- 49 MacKenzie, J. *et al.* The putative role of transforming viruses in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **91**, 240-243 (2006).
- 50 Bogdanovic, G. *et al.* Virome characterisation from Guthrie cards in children who later developed acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* **115**, 1008-1014, doi:10.1038/bjc.2016.261 (2016).

- 51 Mullighan, C. G. The genomic landscape of acute lymphoblastic leukemia in children and young adults. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2014**, 174-180, doi:10.1182/asheducation-2014.1.174 (2014).
- 52 Mullighan, C. G. *et al.* Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **446**, 758-764, doi:10.1038/nature05690 (2007).
- 53 Shurtleff, S. A. *et al.* TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* **9**, 1985-1989 (1995).
- 54 Harrison, C. J. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* **144**, 147-156, doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07417.x (2009).
- 55 Mullighan, C. G. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* **122**, 3407-3415, doi:10.1172/JCI61203 (2012).
- 56 Pui, C. H. *et al.* 11q23/MLL rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* **12**, 909-915, doi:10.1200/JCO.1994.12.5.909 (1994).
- 57 Jeha, S. *et al.* Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1. *Leukemia* **23**, 1406-1409, doi:10.1038/leu.2009.42 (2009).
- 58 Harvey, R. C. *et al.* Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **115**, 5312-5321, doi:10.1182/blood-2009-09-245944 (2010).
- 59 Arico, M. *et al.* Clinical outcome of children with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated between 1995 and 2005. *J Clin Oncol* **28**, 4755-4761, doi:10.1200/JCO.2010.30.1325 (2010).
- 60 Nachman, J. B. *et al.* Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **110**, 1112-1115, doi:10.1182/blood-2006-07-038299 (2007).
- 61 Greaves, M. F., Maia, A. T., Wiemels, J. L. & Ford, A. M. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood* **102**, 2321-2333, doi:10.1182/blood-2002-12-3817 (2003).
- 62 Trevino, L. R. *et al.* Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **41**, 1001-1005, doi:10.1038/ng.432 (2009).
- 63 Moriyama, T. *et al.* Germline genetic variation in ETV6 and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: a systematic genetic study. *Lancet Oncol* **16**, 1659-1666, doi:10.1016/S1470-2045(15)00369-1 (2015).
- 64 Noetzli, L. *et al.* Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **47**, 535-538, doi:10.1038/ng.3253 (2015).
- 65 Zhang, M. Y. *et al.* Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. *Nat Genet* **47**, 180-185, doi:10.1038/ng.3177 (2015).
- 66 Waanders, E. *et al.* Germline activating TYK2 mutations in pediatric patients with two primary acute lymphoblastic leukemia occurrences. *Leukemia*, doi:10.1038/leu.2016.277 (2016).

- 67 Auer, F. *et al.* Inherited susceptibility to pre B-ALL caused by germline transmission of PAX5 c.547G>A. *Leukemia* **28**, 1136-1138, doi:10.1038/leu.2013.363 (2014).
- 68 Shah, S. *et al.* A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **45**, 1226-1231, doi:10.1038/ng.2754 (2013).
- 69 Nowell, P. & Hungerford, D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 1497 (1960).
- 70 Rowley, J. D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**, 290-293 (1973).
- 71 Bartram, C. R. *et al.* Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **306**, 277-280 (1983).
- 72 Groffen, J. *et al.* Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* **36**, 93-99 (1984).
- 73 Lugo, T. G., Pendergast, A. M., Muller, A. J. & Witte, O. N. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* **247**, 1079-1082 (1990).
- 74 Deininger, M. W., Goldman, J. M. & Melo, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* **96**, 3343-3356 (2000).
- 75 Melo, J. V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* **88**, 2375-2384 (1996).
- 76 Pendergast, A. M., Muller, A. J., Havlik, M. H., Maru, Y. & Witte, O. N. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell* **66**, 161-171 (1991).
- 77 Cilloni, D. & Saglio, G. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clin Cancer Res* **18**, 930-937, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1613 (2012).
- 78 Zhang, X., Subrahmanyam, R., Wong, R., Gross, A. W. & Ren, R. The NH(2)-terminal coiled-coil domain and tyrosine 177 play important roles in induction of a myeloproliferative disease in mice by Bcr-Abl. *Mol Cell Biol* **21**, 840-853, doi:10.1128/MCB.21.3.840-853.2001 (2001).
- 79 Sattler, M. *et al.* Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell* **1**, 479-492 (2002).
- 80 Skorski, T. *et al.* Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* **86**, 726-736 (1995).
- 81 Varticovski, L., Daley, G. Q., Jackson, P., Baltimore, D. & Cantley, L. C. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants. *Mol Cell Biol* **11**, 1107-1113 (1991).
- 82 Franke, T. F., Kaplan, D. R. & Cantley, L. C. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* **88**, 435-437 (1997).

- 83 Ilaria, R. L., Jr. & 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).
- 84 Gesbert, F. & Griffin, J. D. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood* **96**, 2269-2276 (2000).
- 85 Li, S., Ilaria, R. L., Jr., Million, R. P., Daley, G. Q. & Van Etten, R. A. The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J Exp Med* **189**, 1399-1412 (1999).
- 86 Sawyers, C. L., Callahan, W. & Witte, O. N. Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell* **70**, 901-910 (1992).
- 87 Cutler, J. A. *et al.* Differential signaling through p190 and p210 BCR-ABL fusion proteins revealed by interactome and phosphoproteome analysis. *Leukemia*, doi:10.1038/leu.2017.61 (2017).
- 88 Reckel, S. *et al.* Differential signaling networks of Bcr-Abl p210 and p190 kinases in leukemia cells defined by functional proteomics. *Leukemia*, doi:10.1038/leu.2017.36 (2017).
- 89 Vicente-Duenas, C. *et al.* The age of the target cell affects B-cell leukaemia malignancy. *Aging (Albany NY)* **2**, 908-913, doi:10.18632/aging.100244 (2010).
- 90 Cazzaniga, G. *et al.* Developmental origins and impact of BCR-ABL1 fusion and IKZF1 deletions in monozygotic twins with Ph⁺ acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **118**, 5559-5564, doi:10.1182/blood-2011-07-366542 (2011).
- 91 Bose, S., Deininger, M., Gora-Tybor, J., Goldman, J. M. & Melo, J. V. The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood* **92**, 3362-3367 (1998).
- 92 Greaves, M. F. & Wiemels, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* **3**, 639-649, doi:10.1038/nrc1164 (2003).
- 93 Huntly, B. J. *et al.* MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell* **6**, 587-596, doi:10.1016/j.ccr.2004.10.015 (2004).
- 94 Mullighan, C. G. *et al.* BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* **453**, 110-114, doi:10.1038/nature06866 (2008).
- 95 Martinelli, G. *et al.* IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report. *J Clin Oncol* **27**, 5202-5207, doi:10.1200/JCO.2008.21.6408 (2009).
- 96 Virely, C. *et al.* Haploinsufficiency of the IKZF1 (IKAROS) tumor suppressor gene cooperates with BCR-ABL in a transgenic model of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **24**, 1200-1204, doi:10.1038/leu.2010.63 (2010).
- 97 Tijchon, E., Havinga, J., van Leeuwen, F. N. & Scheijen, B. B-lineage transcription factors and cooperating gene lesions required for leukemia development. *Leukemia* **27**, 541-552, doi:10.1038/leu.2012.293 (2013).
- 98 Harvey, R. C. *et al.* Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling:

- correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood* **116**, 4874-4884, doi:10.1182/blood-2009-08-239681 (2010).
- 99 Waanders, E. *et al.* The origin and nature of tightly clustered BTG1 deletions in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia support a model of multiclonal evolution. *PLoS Genet* **8**, e1002533, doi:10.1371/journal.pgen.1002533 (2012).
- 100 Familiades, J. *et al.* PAX5 mutations occur frequently in adult B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia and PAX5 haploinsufficiency is associated with BCR-ABL1 and TCF3-PBX1 fusion genes: a GRAALL study. *Leukemia* **23**, 1989-1998, doi:10.1038/leu.2009.135 (2009).
- 101 Iacobucci, I. *et al.* The PAX5 gene is frequently rearranged in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia but is not associated with outcome. A report on behalf of the GIMEMA Acute Leukemia Working Party. *Haematologica* **95**, 1683-1690, doi:10.3324/haematol.2009.020792 (2010).
- 102 Kim, M. *et al.* PAX5 deletion is common and concurrently occurs with CDKN2A deletion in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cells Mol Dis* **47**, 62-66, doi:10.1016/j.bcmd.2011.04.003 (2011).
- 103 Wetzler, M. *et al.* Additional cytogenetic abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia: a study of the Cancer and Leukaemia Group B. *Br J Haematol* **124**, 275-288 (2004).
- 104 Ford, A. M. *et al.* Protracted dormancy of pre-leukemic stem cells. *Leukemia* **29**, 2202-2207, doi:10.1038/leu.2015.132 (2015).
- 105 Taberero, M. D. *et al.* Adult precursor B-ALL with BCR/ABL gene rearrangements displays a unique immunophenotype based on the pattern of CD10, CD34, CD13 and CD38 expression. *Leukemia* **15**, 406-414 (2001).
- 106 Santos, E., Tronick, S. R., Aaronson, S. A., Pulciani, S. & Barbacid, M. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* **298**, 343-347 (1982).
- 107 Parada, L. F., Tabin, C. J., Shih, C. & Weinberg, R. A. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* **297**, 474-478 (1982).
- 108 Lane, M. A., Sainten, A. & Cooper, G. M. Stage-specific transforming genes of human and mouse B- and T-lymphocyte neoplasms. *Cell* **28**, 873-880 (1982).
- 109 Goldfarb, M., Shimizu, K., Perucho, M. & Wigler, M. Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. *Nature* **296**, 404-409 (1982).
- 110 Haber, D. & Harlow, E. Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age. *Nat Genet* **16**, 320-322, doi:10.1038/ng0897-320 (1997).
- 111 Knudson, A. G., Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 820-823 (1971).
- 112 Harris, H., Miller, O. J., Klein, G., Worst, P. & Tachibana, T. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* **223**, 363-368 (1969).
- 113 Weinstein, I. B. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* **297**, 63-64, doi:10.1126/science.1073096 (2002).

- 114 Huettner, C. S., Zhang, P., Van Etten, R. A. & Tenen, D. G. Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nat Genet* **24**, 57-60, doi:10.1038/71691 (2000).
- 115 Chin, L. *et al.* Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* **400**, 468-472, doi:10.1038/22788 (1999).
- 116 Graham, S. M. *et al.* Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* **99**, 319-325 (2002).
- 117 Heisterkamp, N. *et al.* Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature* **344**, 251-253, doi:10.1038/344251a0 (1990).
- 118 Voncken, J. W. *et al.* Restricted oncogenicity of BCR/ABL p190 in transgenic mice. *Cancer Res* **52**, 4534-4539 (1992).
- 119 Castellanos, A. *et al.* A BCR-ABL(p190) fusion gene made by homologous recombination causes B-cell acute lymphoblastic leukemias in chimeric mice with independence of the endogenous bcr product. *Blood* **90**, 2168-2174 (1997).
- 120 Gruber, T. A., Chang, M. S., Sposto, R. & Muschen, M. Activation-induced cytidine deaminase accelerates clonal evolution in BCR-ABL1-driven B-cell lineage acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* **70**, 7411-7420, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1438 (2010).
- 121 Perez-Caro, M. *et al.* Sustained leukaemic phenotype after inactivation of BCR-ABLp190 in mice. *Oncogene* **26**, 1702-1713, doi:10.1038/sj.onc.1209968 (2007).
- 122 Czerny, T., Schaffner, G. & Busslinger, M. DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes Dev* **7**, 2048-2061 (1993).
- 123 Urbanek, P., Wang, Z. Q., Fetka, I., Wagner, E. F. & Busslinger, M. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* **79**, 901-912 (1994).
- 124 Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A. & Busslinger, M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* **8**, 463-470, doi:10.1038/ni1454 (2007).
- 125 Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G. & Busslinger, M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* **401**, 556-562, doi:10.1038/44076 (1999).
- 126 Martin-Lorenzo, A. *et al.* Infection Exposure is a Causal Factor in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia as a Result of Pax5-Inherited Susceptibility. *Cancer Discov* **5**, 1328-1343, doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0892 (2015).
- 127 Nutt, S. L. *et al.* Independent regulation of the two Pax5 alleles during B-cell development. *Nat Genet* **21**, 390-395, doi:10.1038/7720 (1999).
- 128 Fuxa, M. & Busslinger, M. Reporter gene insertions reveal a strictly B lymphoid-specific expression pattern of Pax5 in support of its B cell identity function. *J Immunol* **178**, 8222-8228 (2007).
- 129 Delogu, A. *et al.* Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* **24**, 269-281, doi:10.1016/j.immuni.2006.01.012 (2006).

- 130 Schebesta, A. *et al.* Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity* **27**, 49-63, doi:10.1016/j.immuni.2007.05.019 (2007).
- 131 Revilla, I. D. R. *et al.* The B-cell identity factor Pax5 regulates distinct transcriptional programmes in early and late B lymphopoiesis. *EMBO J* **31**, 3130-3146, doi:10.1038/emboj.2012.155 (2012).
- 132 Hesslein, D. G. *et al.* Pax5 is required for recombination of transcribed, acetylated, 5' IgH V gene segments. *Genes Dev* **17**, 37-42, doi:10.1101/gad.1031403 (2003).
- 133 Fuxa, M. *et al.* Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev* **18**, 411-422, doi:10.1101/gad.291504 (2004).
- 134 Cobaleda, C., Jochum, W. & Busslinger, M. Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature* **449**, 473-477, doi:10.1038/nature06159 (2007).
- 135 Heltemes-Harris, L. M. *et al.* Ebf1 or Pax5 haploinsufficiency synergizes with STAT5 activation to initiate acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* **208**, 1135-1149, doi:10.1084/jem.20101947 (2011).
- 136 Liu, G. J. *et al.* Pax5 loss imposes a reversible differentiation block in B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Dev* **28**, 1337-1350, doi:10.1101/gad.240416.114 (2014).
- 137 Simmons, S. *et al.* Biphenotypic B-lymphoid/myeloid cells expressing low levels of Pax5: potential targets of BAL development. *Blood* **120**, 3688-3698, doi:10.1182/blood-2012-03-414821 (2012).
- 138 Miles, C., Sanchez, M. J., Sinclair, A. & Dzierzak, E. Expression of the Ly-6E.1 (Sca-1) transgene in adult hematopoietic stem cells and the developing mouse embryo. *Development* **124**, 537-547 (1997).
- 139 Green, M. R. *et al.* Signatures of murine B-cell development implicate Yy1 as a regulator of the germinal center-specific program. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2873-2878, doi:10.1073/pnas.1019537108 (2011).
- 140 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, doi:10.1073/pnas.0506580102 (2005).
- 141 Hakansson, P. *et al.* Gene expression analysis of BCR/ABL1-dependent transcriptional response reveals enrichment for genes involved in negative feedback regulation. *Genes Chromosomes Cancer* **47**, 267-275, doi:10.1002/gcc.20528 (2008).
- 142 Chiaretti, S. *et al.* Gene expression profiles of B-lineage adult acute lymphocytic leukemia reveal genetic patterns that identify lineage derivation and distinct mechanisms of transformation. *Clin Cancer Res* **11**, 7209-7219, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2165 (2005).
- 143 Kohlmann, A. *et al.* Pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) gene expression signatures classify an independent cohort of adult ALL patients. *Leukemia* **18**, 63-71, doi:10.1038/sj.leu.2403167 (2004).
- 144 Czerny, T. & Busslinger, M. DNA-binding and transactivation properties of Pax-6: three amino acids in the paired domain are responsible for the different

- sequence recognition of Pax-6 and BSAP (Pax-5). *Mol Cell Biol* **15**, 2858-2871 (1995).
- 145 Chan, L. N. *et al.* Metabolic gatekeeper function of B-lymphoid transcription factors. *Nature* **542**, 479-483, doi:10.1038/nature21076 (2017).
- 146 Lane, A. A. *et al.* Triplication of a 21q22 region contributes to B cell transformation through HMGN1 overexpression and loss of histone H3 Lys27 trimethylation. *Nat Genet* **46**, 618-623, doi:10.1038/ng.2949 (2014).
- 147 Choi, Y. L. *et al.* Identification of a constitutively active mutant of JAK3 by retroviral expression screening. *Leuk Res* **31**, 203-209, doi:10.1016/j.leukres.2006.05.006 (2007).
- 148 Sato, T. *et al.* Functional analysis of JAK3 mutations in transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukaemia accompanying Down syndrome. *Br J Haematol* **141**, 681-688, doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07081.x (2008).
- 149 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, doi:10.1182/blood-2014-04-566687 (2014).
- 150 Muschen, M. Rationale for targeting the pre-B-cell receptor signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **125**, 3688-3693, doi:10.1182/blood-2015-01-567842 (2015).
- 151 Kosik, P. *et al.* Low numbers of pre-leukemic fusion genes are frequently present in umbilical cord blood without affecting DNA damage response. *Oncotarget* **8**, 35824-35834, doi:10.18632/oncotarget.16211 (2017).
- 152 An, Q. *et al.* Variable breakpoints target PAX5 in patients with dicentric chromosomes: a model for the basis of unbalanced translocations in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 17050-17054, doi:10.1073/pnas.0803494105 (2008).
- 153 Papaemmanuil, E. *et al.* RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **46**, 116-125, doi:10.1038/ng.2874 (2014).
- 154 Swaminathan, S. *et al.* Mechanisms of clonal evolution in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Immunol* **16**, 766-774, doi:10.1038/ni.3160 (2015).
- 155 Swaminathan, S. & Muschen, M. Infectious origins of childhood leukemia. *Oncotarget* **6**, 16798-16799, doi:10.18632/oncotarget.4630 (2015).
- 156 Robbiani, D. F. *et al.* Plasmodium Infection Promotes Genomic Instability and AID-Dependent B Cell Lymphoma. *Cell* **162**, 727-737, doi:10.1016/j.cell.2015.07.019 (2015).
- 157 Tsai, A. G. *et al.* Human chromosomal translocations at CpG sites and a theoretical basis for their lineage and stage specificity. *Cell* **135**, 1130-1142, doi:10.1016/j.cell.2008.10.035 (2008).
- 158 Gilman, E. A. & Knox, E. G. Childhood cancers: space-time distribution in Britain. *J Epidemiol Community Health* **49**, 158-163 (1995).
- 159 Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Astrand, M. & Speed, T. P. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**, 185-193 (2003).

- 160 Irizarry, R. A. *et al.* Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* **31**, e15 (2003).
- 161 Irizarry, R. A. *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249-264, doi:10.1093/biostatistics/4.2.249 (2003).
- 162 Tusher, V. G., Tibshirani, R. & Chu, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5116-5121, doi:10.1073/pnas.091062498 (2001).
- 163 Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J Roy Stat Soc (Ser B)*, 289-300 (1995).
- 164 R Development Core Team (2011) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria : the R Foundation for Statistical Computing. Available online at <http://www.r-project.org/>.
- 165 Gentleman, R. C. *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**, R80, doi:10.1186/gb-2004-5-10-r80 (2004).
- 166 Edgar, R., Domrachev, M. & Lash, A. E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* **30**, 207-210 (2002).
- 167 Cibulskis, K. *et al.* Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol* **31**, 213-219, doi:10.1038/nbt.2514 (2013).
- 168 Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv:13033997 [q-bioGN], (2013).
- 169 Bartenhagen, C. & Dugas, M. Robust and exact structural variation detection with paired-end and soft-clipped alignments: SoftSV compared with eight algorithms. *Brief Bioinform* **17**, 51-62, doi:10.1093/bib/bbv028 (2016).
- 170 Boeva, V. *et al.* Control-FREEC: a tool for assessing copy number and allelic content using next-generation sequencing data. *Bioinformatics* **28**, 423-425, doi:10.1093/bioinformatics/btr670 (2012).