

- **Convocatoria:** Orden de 5 de junio de 2018, de la Consejería de Educación, modificada por Orden de 5 de noviembre de 2018.

DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO: COMUNICACIONES, PONENCIAS EN CONGRESOS, PATENTES, TESIS REALIZADAS

1. Título del trabajo: Evaluation of genetic heterogeneity using a NGS custom panel: an approach to enable technologies for personalized and precision medicine in B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) patients.

Nombre del congreso: VIII Simposio del Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica

Tipo de participación: Participativo - Ponencia oral (comunicación oral)

Ciudad de celebración: Virtual,

Fecha de celebración: 20/05/2021

Entidad organizadora: Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH)

Ramírez-Maldonado V; Montañó A; Martín da Silva I; Santos S; Miguel C; Serramito-Gómez I; Lumbreras E; Forero-Castro M; Riesco S; Fuster JL; de las Heras N; García de Coca A; Sierra M; Dávila J; de la Fuente I; Olivier C; Olazábal J; Martínez J; Camos M; Granada I; Ribera J; Ribera Santasusana JM; **González T; Hernández-Rivas JM; Benito R.**



Diploma

El **Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH)**,
a través de la **Fundación Española de Hematología y Hemoterapia (FEHH)**,
concede el **Premio a la Mejor Comunicación** presentada en el

VIII Simposio: Avances de las técnicas citogenéticas y moleculares
en el diagnóstico de las hemopatías malignas

Al proyecto titulado

**EVALUATION OF GENETIC HETEROGENEITY USING A NGS CUSTOM PANEL: AN APPROACH
TO ENABLE TECHNOLOGIES FOR PERSONALIZED AND PRECISION MEDICINE IN B-CELL ACUTE
LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA PATIENTS**

Autores

Ramírez-Maldonado V¹⁰, Montañó A¹¹, Martín da Silva I¹², Santos S¹³, Miguel C¹⁴, Serramito-Gómez I¹⁵, Lumbreras E¹⁶, Forero-Castro M¹⁷,
Riesco S¹⁸, Fuster JL¹⁹, de las Heras N²⁰, García de Coca A²¹, Sierra M²², Dávila J²³, de la Fuente I²⁴, Olivier C²⁵, Olazábal J²⁶,
Martínez J²⁷, Camos M²⁸, Granada I²⁹, Ribera J³⁰, Ribera Santasusana JM³¹, González T³², Hernández-Rivas JM³³, Benito R³⁴

¹⁰IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca, CSIC, Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Salamanca. ¹¹Facultad de Farmacia,
Universidad de Salamanca. ¹²Grupo de Investigación GICBUPTC, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. ¹³Hospital Clínico Universitario
de Salamanca. ¹⁴Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia. ¹⁵Hospital Virgen Blanca, León. ¹⁶Hospital Clínico Universitario de Valladolid.
¹⁷Complejo Asistencial de Zamora. ¹⁸Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid. ¹⁹Complejo Asistencial de Segovia. ²⁰Hospital Universitario de Burgos.
²¹Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid. ²²Instituto de Investigación, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona. ²³Laboratorio de Hematología,
ICO-Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras, Badalona, Barcelona.
²⁴Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona. ²⁵ICO-Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona.

Con la colaboración de 
Diagnostic Solutions for Life

20 de mayo de 2021

2. Título del trabajo: Aplicación de un panel diagnóstico de NGS para mejorar y refinar la estratificación de los pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica B.

Nombre del congreso: LXII Congreso Nacional de la SEHH y el XXXVI Congreso Nacional de la SETH

Fecha: 26/10/2020-30/10/2020

Entidad organizadora: SEHH y SETH

Autores: Adrián Montaña, María Matorra-Miguel, Maribel Forero-Castro, Eva Lumbreras, Sandra Santos, Cristina Miguel, José Luís Fuster, Natalia de Las Heras, Alfonso García-de Coca, Magdalena Sierra, Julio Dávila, Ignacio de la Fuente, Carmen Olivier, Juan Olazabal, Joaquín Martínez, Nerea Vega, Mireia Camos, **Teresa González, Jesús María Hernández-Rivas, Rocío Benito.**



Oral Presentation

la mayoría de las poblaciones de los donantes mayores. Estos resultados sugieren una respuesta molecular a un microambiente con mayor inflamación en dichos pacientes. En línea con una diferenciación menos eficiente durante el envejecimiento, los genes asociados a subpoblaciones más diferenciadas aparecen sub-expresados en los donantes mayores.

Mediante análisis de trayectorias encontramos que los cambios más importantes debido a la edad aparecen en genes relacionados con la diferenciación hacia poblaciones linfoides y monocítica. Para estudiar los

de regulación genica. Nuestros resultados muestran que los donantes jóvenes presentan la activación de factores de transcripción específicos en cada una de las subpoblaciones, mientras que los donantes mayores demuestran una pérdida de activación de dichas redes de regulación, efecto que se asocia a una hematopoyesis menos eficiente de estos individuos.

Conclusiones: Este estudio aporta un nuevo enfoque en el estudio de la hematopoyesis durante el envejecimiento y da evidencia sobre los efectos adquiridos a una resolución de célula única. Nuestros resultados demuestran patrones de expresión aberrantes en la mayoría de los compartimientos celulares y los posibles factores de transcripción cuya activación aberrante regula la diferenciación hematopoyética característica del envejecimiento.

CO-029

APLICACIÓN DE UN PANEL DIAGNÓSTICO DE NGS PARA MEJORAR Y REFINAR LA ESTRATIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA LINFoblástica B

Montaño A¹, Matorra-Miguel M¹, Forero-Castro M², Lumbrreras E¹, Santos S¹, Miguel C¹, Fuster JL³, De las Heras N⁴, García-de Coca A⁵, Sierra M⁶, Dávila J⁷, De la Fuente J⁸, Olivier C⁹, Olazábal J¹⁰, Martínez J¹¹, Vega N¹², Camos M¹², **González T¹, Hernández-Rivas JM¹, Benito R¹**

¹IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca, CSIC, Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Salamanca, España.; ²Escuela de Ciencias Biológicas (Grupo de investigación GICBUPTC), Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia.; ³Departamento de pediatría oncohematológica- Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, España.; ⁴Departamento de Hematología - Hospital Virgen Blanca, León, España.; ⁵Departamento de Hematología - Hospital Clínico de Valladolid, Valladolid, España.; ⁶Complejo Sanitario de Zamora, Zamora, España.; ⁷Departamento de Hematología - Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.; ⁸Departamento de Hematología - Hospital Río Hortega, Valladolid, España.; ⁹Servicio de Hematología y Hemoterapia - Complejo Sanitario de Segovia, Segovia, España.; ¹⁰Departamento de Hematología - Hospital Universitario de Burgos, Burgos, España.; ¹¹Departamento de Hematología - Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España.; ¹²Laboratorio de Hematología, Instituto de Investigación, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, España

Introducción: La presencia de alteraciones genéticas recurrentes (detectadas por cariotipo/FISH) son clave, tanto en la definición de subtipos diagnósticos como en el pronóstico de la LAL-B. El uso de las técnicas de alto rendimiento como la NGS y aCGH ha permitido la detección de un amplio espectro de nuevas alteraciones que podrían establecerse como marcadores pronósticos, ayudando así en el manejo clínico de los enfermos. No obstante, la detección de estas alteraciones requiere la integración de varias metodologías, lo que se traduce en un gran tiempo-coste analítico. El desarrollo de una estrategia, que permita el análisis completo de las diferentes alteraciones genéticas asociadas con la enfermedad en un solo paso, podría ayudar a mejorar la estratificación y el pronóstico de los pacientes, así como en la identificación de dianas terapéuticas y predictores de la respuesta a tratamiento, acercándonos de esta manera a una medicina personalizada de precisión.

Objetivos: Aplicación de un panel de NGS personalizado en pacientes de LAL-B, que incluye el análisis simultáneo de mutaciones, SNPs farmacogenéticos, reordenamientos y CNVs, para mejorar su clasificación, estratificación e identificar nuevos biomarcadores.

Métodos: 200 muestras de médula ósea/sangre periférica de pacientes (pediátricos y adultos) con LAL-B fueron analizadas al diagnóstico. La secuenciación se llevó a cabo mediante un panel de NGS personalizado, que permite el estudio de 150 genes para la detección de: mutaciones somáticas; CNVs (ej. *IKZF1* del e *iAMP21*); reordenamientos génicos (ej. *CRLF2r*) y SNPs farmacogenéticos. A partir de ADN se realizó la secuenciación masiva con SureSelectQXT-Target-Enrichment (Agilent) en

un NextSeq (Illumina). El análisis de los datos se realizó con un pipeline propio, así como la detección de CNVs y aneuploidías. Para la detección de reordenamientos se usó el software MANTA (Illumina).

Resultados: 1. La integración del panel de NGS-LAL B junto con las técnicas clásicas de diagnóstico (cariotipo/FISH) permitió mejorar la estratificación de los pacientes, logrando identificar alteraciones "de novo" y recurrentes (>80% y 12% de los pacientes respectivamente) que no fueron detectadas por técnicas convencionales. 2. El 81% de los pacientes, siendo *NRAS* el gen más recurrentemente mutado (50%), seguido de *KRAS*, *JAK2*, *PAX5* e *IKZF1*. Algunos de ellos fueron predictores de menor RFS como las mutaciones en *NRAS*, *JAK2* y *PAX5* en pacientes adultos ($P=0,03/0,05/0,026$). 3. El análisis de CNVs mostró la pérdida recurrente de *IKZF1* en el grupo Philadelphia y B-others ($P<0,001$) y se asoció con una menor EFS y EMR+33 positiva, acorde a lo descrito ($P=0,034/0,046$). Los pacientes con *IKZF1* del mostraron además una menor EFS cuando eran acompañadas de la pérdida de *BTG1* ($P=0,05$). Dentro del grupo B-others, la pérdida de *PAX5* se asoció con una menor RFS ($P=0,029$). 4. Se identificaron 12 pacientes con *CRLF2r* (6%), lo que permitió su adscripción al grupo Ph-like, asociándose con una menor OS, menor EFS y coocurrencia con mutaciones de *JAK2* ($P=0,014/0,030/<0,001$). 5. El estudio SNPs detectó la presencia de haplotipos en los genes *MTHFR*, *TPMT*, *SLCO1B1* o *SOD2* asociados con respuestas farmacológicas.

Conclusiones: El uso del panel de NGS-LAL B nos permite detectar eficazmente las principales alteraciones genéticas descritas en los pacientes con diagnóstico de LAL-B en un solo ensayo, mejorando su clasificación y estratificación pronóstica. El panel permite además la identificación de dianas terapéuticas, predictores de la respuesta al tratamiento, así como la de nuevos marcadores pronósticos, lo que mejoraría el manejo clínico de los pacientes.

Financiación: SA271P18, GRS 1847/A/18, GRS 2062/A/19, FUCALHH 2017, IBY17/00006 y beca predoctoral de la AECC por parte de la junta provincial de Salamanca.

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

CO-030

EXOMA (WES) O PANEL DE NGS PARA CORRECTO DIAGNOSTICO DE NEOPLASIAS MIELOIDES. VENTAJAS E INCONVENIENTES

Aguilera Diaz Almudena¹, Ariceta Beñat¹, Vazquez Iria¹, Aguirre Paula¹, Mañu Amagoia¹, Larrayoz María José¹, Rifón-Roca José², Alfonso Pierola Ana², Prosper Felipe², Fernández-Mercado Marta¹, Calasanz María José¹

¹Universidad de Navarra; ²Clínica Universidad de Navarra

Los paneles de secuenciación masiva (NGS) interrogan un conjunto de genes clínicamente relevantes para una determinada patología y con valor diagnóstico, pronóstico y terapéutico. Sin embargo, cuando los resultados de un panel no son concluyentes, en ocasiones se plantea la secuenciación de exoma completo (WES). Se secuenció ADN de 24 muestras (16 de médula ósea, MO, y 8 de células T CD3⁺), correspondientes a 8 pacientes con Síndromes Mielodisplásicos (SMD) que sufrieron transformación a Leucemia Mieloide Aguda (LMA), empleando dos tecnologías de secuenciación masiva: el panel de NGS Pan-Mieloide sobre las muestras de MO (PMP, 48 genes relacionados con neoplasia mieloides (NM)), y exoma completo (WES) sobre las 24 muestras (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Con este diseño pretendimos estudiar la eficacia de detección de mutaciones de ambas técnicas en enfermedad mieloides con distintos niveles de infiltración. El panel PMP detectó un total de 58 variantes clínicamente relevantes, y los exomas detectaron un total de 211, 51 de ellas en genes incluidos en el diseño del panel. La profundidad media de secuenciación fue de 4500x para PMP y 250x para WES (Figura 1). Las variantes detectadas por ambas técnicas presentaban frecuencias alélicas (VAF) similares (Figura 2). Las 7 variantes detectadas por el panel que no fueron llamadas por el exoma se caracterizaron por tener VAF <5%. El análisis con PMP de las muestras SMD de los casos 4 y 7, detectó clones a una VAF del 1% de las variantes patogénicas *IDH1* p.Arg132His y *FLT3* p.Asp835Tyr respectivamente, que no fueron detectados por WES; en las muestras LMA las VAF aumentaron a 11% y 47% cada una (9% y 45% en WES). Además, en el caso 6, por PMP fue detectado un clon con la variante patogénica *NRAS* p.Gly60Val a una VAF de 3% en SMD y de 1% en LMA, que tampoco fueron detectados por WES. Por otro lado, WES de-

3. Título del trabajo: One-step approach for the clinical stratification of acute lymphoblastic leukemia patients by a custom NGS panel.

Nombre del congreso: 25 th Congress of European Hematology Association (EHA)

Fecha: 11/06/2020-15/10/2020

Entidad organizadora: EHA

Autores: Adrián Montaña, María Matorra-Miguel, Maribel Forero-Castro, Eva Lumbreras, Cristina Miguel, Sandra Santos, Jose Luís Fuster, Natalia de Las Heras, Alfonso García-de Coca, Magdalena Sierra, Julio Dávila, Ignacio de la Fuente, Carmen Olivier, Juan Olazabal, Joaquín Martínez, Nerea Vega, Mireia Camos, **Teresa González, Jesús María Hernández-Rivas, Rocío Benito.**

Disponible en:

[https://library.ehaweb.org/eha/2020/eha25th/294289/adrian.montao.onestep.](https://library.ehaweb.org/eha/2020/eha25th/294289/adrian.montao.onestep)

[approach.for.the.clinical.stratification.of.acute.html?f=listing%3D0%2Abrowseby%3D8%2Asortby%3D1%2Asearch%3Done-step+approach%2Bclinical+stratification%2Bacute+lymphoblastic+leukemia+patients%2Ba+custom+ngs+panel.](https://library.ehaweb.org/eha/2020/eha25th/294289/adrian.montao.onestep.approach.for.the.clinical.stratification.of.acute.html?f=listing%3D0%2Abrowseby%3D8%2Asortby%3D1%2Asearch%3Done-step+approach%2Bclinical+stratification%2Bacute+lymphoblastic+leukemia+patients%2Ba+custom+ngs+panel)




The screenshot shows the EHA Open Access Library interface. At the top, there is a navigation bar with categories: RECOMENDADO, TEMAS, MATERIALES DE CONGRESOS, EDUCACIÓN & LIBROS DE RESÚMENES, AUTORES / ORADORES, and COVID-19 OUTBREAK. A search bar is present with the query 'a custom ngs panel. acute lymphoblastic leukemia patients clinical stratification one-step approach'. Below the search bar, there are options for 'Educational Items', 'Deep Search', and 'Search display results for "one-step approach+clinical...".

ONE-STEP APPROACH FOR THE CLINICAL STRATIFICATION OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA PATIENTS BY A CUSTOM NGS PANEL

Author(s): [Adrián Montaña](#), [María Matorra-Miguel](#), [Maribel Forero-Castro](#), [Eva Lumbreras](#), [Cristina Miguel](#), [Sandra Santos](#), [Jose Luis Fuster](#), [Natalia de Las Heras](#), [Alfonso García-de Coca](#), [Magdalena Sierra](#), [Julio Dávila](#), [Ignacio de la Fuente](#), [Carmen Olivier](#), [Juan Olazabal](#), [Joaquín Martínez](#), [Nerea Vega](#), [Mireia Camos](#), [Teresa González](#), [Jesus María Hernández-Rivas](#), [Rocío Benito](#)

(Abstract release date: 05/14/20) EHA Library. Montaña A. 06/12/20; 294289; EP370



Mr. Adrian Montaña
Contributions



DOWNLOAD POSTER DOCUMENT



5. Título del trabajo: Validación de un panel de NGS para la detección de las principales alteraciones genéticas presentes en la leucemia aguda linfoblástica B.

Nombre del congreso: LXI CONGRESO NACIONAL DE LA SEHH Y XXXV CONGRESO NACIONAL DE LA SETH

Fecha: 24/10/2019-26/10/2019

Entidad organizadora: SEHH y SETH

Autores: Adrián Montaña; Jesús Hernández Sánchez; Marta Martín; Maribel Forero; Eva Lumbreras; Cristina Miguel; Sandra Santos; Jose Luis Fuster; Natalia de las Heras; Alfonso García de Coca; Magdalena Sierra; Julio Dávila; Ignacio de la Fuente; Carmen Olivier; Juan Olazabal; Joaquin Martínez; Nerea Vega; Mireia Camos; **Teresa González; Jesús María Hernández Rivas; Rocío Benito.**

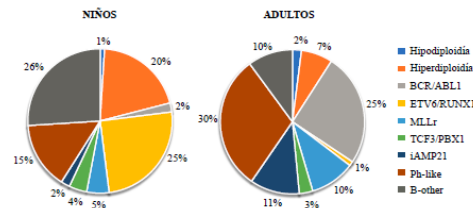
VALIDACIÓN DE UN PANEL DE NGS PARA LA DETECCIÓN DE LAS PRINCIPALES ALTERACIONES GENÉTICAS PRESENTES EN LA LECUEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA B.

Adrián Montaña¹, Jesús Hernández-Sánchez¹, Marta Martín¹, Maribel Forero², Eva Lumbreras¹, Cristina Miguel¹, Sandra Santos¹, Jose Luis Fuster³, Natalia de Las Heras⁴, Alfonso García-de Coca⁵, Magdalena Sierra⁶, Julio Dávila⁷, Ignacio de la Fuente⁸, Carmen Olivier⁹, Juan Olazabal¹⁰, Joaquín Martínez¹¹, Nerea Vega¹², Mireia Camos¹², Teresa González¹³, Jesús María Hernández-Rivas^{1,13}, Rocío Benito¹. Grupo Pethema, Sociedad española de hematología. Comité Biológico del Grupo de Leucemias de la SEHOP.

1 IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca, CSIC, Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Salamanca, España. 2 Colegio de ciencias biológicas (GICBUPTC grupo de investigación), Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia (UPTEC), Colombia. 3 Departamento de pediatría oncohematológica - Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, España. 4 Departamento de Hematología - Hospital Virgen Blanca, León, España. 5 Departamento de Hematología - Hospital Clínico de Valladolid, Valladolid, España. 6 Complejo Sanitario de Zamora, Zamora, España. 7 Departamento de Hematología - Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España. 8 Departamento de Hematología - Hospital Río Hortega, Valladolid, España. 9 Servicio de Hematología y Hemoterapia - Complejo Sanitario de Segovia, Segovia, España. 10 Departamento de Hematología - Hospital Universitario de Burgos, Burgos, España. 11 Departamento de Hematología - Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España. 12 Laboratorio de Hematología, Instituto de Investigación, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, España. 13 Departamento de Hematología - Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

1 INTRODUCCIÓN

La **leucemia aguda linfoblástica B (LAL-B)** es una neoplasia hematológica de la célula stem linfóide de estirpe B, caracterizada por la presencia de **alteraciones genéticas** que determinan el curso de la enfermedad. Su detección es esencial en el diagnóstico para la correcta estratificación de los enfermos.



Convencionalmente se utilizan cariotipo y FISH para analizar cambios numéricos/estructurales y aCGH o MLPA para Copy Number Variations (CNVs) y grandes pérdidas/ganancias.

Hipótesis

La optimización de un panel de NGS que nos permita detectar el mayor número de alteraciones en un solo experimento conseguiría agilizar el diagnóstico de los enfermos.

Objetivo

Diseño y validación de un panel personalizado de NGS para ADN para la detección de las principales alteraciones genéticas asociadas a la LAL-B.

2 MÉTODOS

Diseño del panel de secuenciación masiva personalizado para la detección de:

1. MUTACIONES EN 160 GENES
2. HIPERDIPLOIDÍAS E HIPODIPLOIDÍAS
3. COPY NUMBER VARIATIONS (CNVs)
4. FUSIONES GÉNICAS
5. MICRODELECIONES DE *IKZF1*

Agilent SureDesign 499,842 kbp
57137 sondas

VALIDACIÓN

92 Pacientes LAL-B
Caracterizados mediante cariotipo/FISH.
Datos de MLPA y aCGH de 47 de ellos.

	N	%
Hipodiploidia	2	2.2
Hiperdiploidia	18	19.5
BCR/ABL1	15	16.4
ETV6/RUNX1	11	12
MLLr	5	5.5
TCF3/PBX1	1	1.1
IAMP21	2	2.2
B-other	38	41.3

ANÁLISIS

1. MUTACIONES

Procesamiento de datos

Trimomatic - Fastq - BWA - GATK

Identificación de variantes

VARSCAN - SAMTOOLS

Anotación de variantes

ANNOVAR

Filtrado de variantes

Manualmente

2. HIPODIPLOIDÍAS, HIPERDIPLOIDÍAS Y CNVs

Normalización de la cobertura media de cada región

Normalización a la mediana

Cálculo de ratio en base a la referencia

Representación Log2Ratio

3. FUSIONES Y MICRODELECIONES *IKZF1*

Procesamiento de datos

Manta - Illumina

1. Escaneo del genoma
2. Análisis, puntuación y reporte de variantes

ISSN 0390-6078

Volume 104

OCTOBER
2019 - S3



 **haematologica**

Journal of the Ferrata Storti Foundation

**LXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de
Hematología y Hemoterapia
Valencia, España, 24-26 de octubre, 2019**

ABSTRACT BOOK

www.haematologica.org

PO-140

LEUCEMIA AGUDA ERITROIDE: NUEVOS CRITERIOS DEFINITORIOS REVISIÓN COMPARATIVA DE CASOS DIAGNOSTICADOS EN NUESTRO CENTRO

Pérez Martínez C¹, Bourgeois García M¹, Golvano Guerrero EM¹, Jiménez García MT¹, Peñarrubia Ponce MJ¹

¹Hospital Clínico Universitario Valladolid

Introducción: La clasificación de la Leucemia Mieloide Aguda (LMA) ha ido incorporando nuevos conceptos en cada revisión de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Recientemente ha sido revisada la última versión de la clasificación de la OMS que databa de 2008 en comparación con la nueva versión de 2016, siendo la LEUCEMIA ERITROIDE AGUDA (LEA) una de las entidades que ha sufrido notables cambios.

Se ha eliminado la subcategoría de LEA TIPO ERITROLEUCEMIA O ERITROIDE / MIELOIDE definida anteriormente como >50% de precursores eritroides en la médula ósea y ≥ 20% de mieloblastos entre las células no eritroides, que en la OMS de 2016 se clasificaría como:

- SÍNDROME MIELODISPLÁSICO CON EXCESO DE BLASTOS (SMD-EB) si los mieloblastos suponen < 20% del total de los blastos de la médula ósea.
- LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA CON CAMBIOS RELACIONADOS CON MIELODISPLASIA (LMA-MRC) si los mieloblastos suponen ≥20% del total de blastos de la médula ósea y ≥ 50% de precursores eritroides en la médula ósea.

La LEUCEMIA ERITROIDE PURA se mantiene como subtipo de LMA sin especificar y es el único tipo de LEA.

Métodos: Revisión de los casos de LEUCEMIA ERITROIDE AGUDA (LMA-M6) diagnosticados en nuestro centro desde enero de 2013 hasta diciembre de 2018.

- Establecer un análisis comparativo.
- Verificar si mantendríamos el mismo diagnóstico comparando la clasificación de la OMS de 2008 y la nueva revisión de 2016.
- Determinar si las opciones terapéuticas habrían sido diferentes.

Resultados: De 2013 a 2018 se diagnosticaron un total de 4 pacientes en nuestro hospital, todos ellos varones. La edad media al diagnóstico fue de 63 años.

El análisis comparativo entre la clasificación de la OMS de 2008 y 2016 refleja los siguientes cambios:

- El CASO 1 diagnosticado en el año 2018 como LMA con NPM1 mutado y sin mutación de FLT3, según la clasificación de la OMS de 2016 formaría parte del subtipo de LMA con alteraciones genéticas recurrentes y no como LEA.
- Los CASOS 2 y 3 debutaron con LMA con anterioridad a la revisión de la OMS de 2016, por lo que fueron catalogados dentro del subtipo de LEUCEMIA ERITROIDE AGUDA tipo ERITROLEUCEMIA pasando a formar parte de la entidad de SÍNDROME MIELODISPLÁSICO CON EXCESO DE BLASTOS según la clasificación de la OMS de 2016. Sin embargo, no habrían cambiado su actitud terapéutica al ser estratificados como IPSS de alto riesgo, el CASO 2 un paciente joven menor de 65 años en el que la primera opción terapéutica continuaría siendo una quimioterapia intensiva y el CASO 3, un paciente mayor, mantendría la misma actitud planteándose un régimen de tratamiento no intensivo con tratamiento hipometilante.

Tabla 1. Revisión comparativa de los pacientes diagnosticados de LEUCEMIA ERITROIDE AGUDA según la clasificación de la OMS de 2008 y 2016 en cuanto al diagnóstico morfológico.

REVISIÓN COMPARATIVA DE CASOS DE LEUCEMIA ERITROIDE AGUDA				
CASOS	CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4
Edad y año al diagnóstico	62 Años (2018)	38 Años (2016)	64 Años (2013)	89 Años (2016)
ESTUDIO MEDULAR (CITOMORFOLOGÍA)	-Serie eritroide: 54% -Serie mielóide: 21% mieloblastos del total de la celularidad de la médula ósea (>20% excluyendo la serie eritroide).	-Serie eritroide: 52% -Serie mielóide: 21% mieloblastos excluyendo la serie eritroide (<20% contando la celularidad total)	-Serie eritroide: 52% -Serie mielóide: 20% mieloblastos excluyendo la serie eritroide (<20% contando la celularidad total)	-Serie eritroide: >80% (88% PROERITROBLASTOS) -Serie mielóide: no se observan mieloblastos.
OMS 2008	LEA tipo ERITROLEUCEMIA	LEA tipo ERITROLEUCEMIA	LEA tipo ERITROLEUCEMIA	LEA tipo LEUCEMIA ERITROIDE PURA
OMS 2016	LMA-MRC	SMD-EB	SMD-EB	LEA tipo LEUCEMIA ERITROIDE PURA
¿CAMBIO EN LA CLASIFICACIÓN OMS 2008/2016?	SI LMA NPM1+ CON ALTERACIÓN CITOGENÉTICA RECURRENTE	SI	SI	NO
¿CAMBIO EN LA ACTITUD TERAPÉUTICA?	NO Quimioterapia intensiva (PETHCA LMA-NPM1-17)	NO Quimioterapia intensiva	NO No candidato a tratamiento intensivo	NO Quimioterapia intensiva

Conclusiones: En vista a los resultados obtenidos, objetivamos que pese a existir un cambio importante en los criterios diagnósticos de LEA no reportamos cambios en la actitud terapéutica en nuestra revisión. La dificultad se plantearía en aquellos pacientes no clasificados como SMD de alto riesgo y en cuyo caso la terapéutica cambiaría a tratamientos menos intensivos que podrían a su vez derivar en mayor tasa de recaídas y supervivencia libre de tratamiento más cortas. Debido a la baja incidencia de LEA se necesitaría una muestra más amplia de pacientes para confirmar estos hallazgos.

Referencia

1. Tamamyán G, Kadia T, Ravandi F, Borthakur G, Cortes J, Jabbour E, et al. Frontline treatment of acute myeloid leukemia in adults. Crit Rev Oncol Hematol 2017;110:20-34.
2. Merino A. Clasificación de las leucemias agudas mieloides. Rev Lab Clínico 2010:139-147.
3. American Cancer Society. Cómo se clasifica la leucemia mieloide aguda? 2016.

PO-141

VALIDACIÓN DE UN PANEL DE NGS PARA LA DETECCIÓN DE LAS PRINCIPALES ALTERACIONES GENÉTICAS PRESENTES EN LA LEUCEMIA AGUDA LINFoblástica B.

Montaño A¹, Hernández-Sánchez J¹, Martín M¹, Forero M², Lumbreras E¹, Miguel C¹, Santos S¹, Fuster JL³, De las Heras N⁴, García-de Coca A⁵, Sierra M⁶, Dávila J⁷, De la Fuente I⁸, Olivier C⁹, Olazabal J¹⁰, Martínez J¹¹, Vega N¹², Camos M¹², González T⁷, Hernández-Rivas JM¹, Benito R⁷, Pethema G¹³, Sehop G¹⁴

¹IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca, CSIC, Centro de Investigación del Cáncer CIC, Salamanca, España; ²Colegio de ciencias biológicas GICBUPTC grupo de investigación, Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia UPTC, Colombia.; ³Departamento de pediatría oncohematológica-Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, España.; ⁴Departamento de Hematología - Hospital Virgen Blanca, León, España.; ⁵Departamento de Hematología - Hospital Clínico de Valladolid, Valladolid, España.; ⁶Complejo Sanitario de Zamora, Zamora, España.; ⁷Departamento de Hematología - Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.; ⁸Departamento de Hematología - Hospital Río Hortega, Valladolid, España.; ⁹Servicio de Hematología y Hemoterapia - Complejo Sanitario de Segovia, Segovia, España.; ¹⁰Departamento de Hematología - Hospital Universitario de Burgos, Burgos, España.; ¹¹Departamento de Hematología - Hospital Universitario¹ de Octubre, Madrid, España.; ¹²Laboratorio de Hematología, Instituto de Investigación, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, España.; ¹³IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca, CSIC, Centro de Investigación del Cáncer CIC, Salamanca, España.; ¹⁴Sociedad española de hematología

Introducción: La leucemia aguda linfoblástica B (LAL-B) es una neoplasia hematológica de la célula stem linfóide de estirpe B, caracterizada por la presencia de alteraciones genéticas que determinan el curso de la enfermedad. Su detección es esencial en el diagnóstico para la correcta estratificación de los enfermos. Convencionalmente se utilizan cariotipo y FISH para analizar cambios numéricos/estructurales y aCGH o MLPA para Copy Number Variations (CNVs) y grandes pérdidas/ganancias. Sin embargo, técnicas como la secuenciación masiva (NGS) se están implementando para la detección de un amplio espectro de nuevas alteraciones que incluyen también mutaciones puntuales. La optimización de un panel de NGS que nos permita detectar el mayor número de alteraciones en un solo experimento conseguiría agilizar el diagnóstico de los enfermos.

Objetivos: Diseño y validación de un panel personalizado de NGS para ADN para la detección de las principales alteraciones genéticas asociadas a la LAL-B.

Métodos: Se diseñó un panel personalizado mediante el software SureDesign con el fin de realizar el análisis mutacional de las regiones codificantes de 160 genes con relevancia en la LAL-B; detectar la presencia de CNVs, especialmente las microdeleciones de IKZF1y iAMP21;aneuploidías y translocaciones. El tamaño total del panel fue de 499,842 kbp y se emplearon 57137 sondas para la captura de las regiones diana. Se analizaron un total de 45 muestras con LAL-B caracterizadas previamente por cariotipo/FISH, además en 33 de las muestras disponíamos de datos de aCGH/MLPA. Partiendo de ADN se llevó a cabo la secuenciación masiva con SureSelectQXT-Target-Enrichment (Agilent) en un NextSeq (Illumina). El análisis de los datos se realizó con un pipeline propio, así como la detección de CNVs y aneuploidías. Para la detección

de fusiones génicas se usó el software MANTA (Illumina).

Resultados: 1) Se obtuvo una media de 5×10^6 lecturas/muestra. Debido al diseño, las regiones correspondientes a mutaciones alcanzaron una profundidad de cobertura media de 800X, permitiendo así evaluar la presencia de subclones. Las regiones de CNVs y fusiones obtuvieron la cobertura media mínima de 300X. El análisis mutacional mostró que el 81 % de los pacientes presentaba al menos una mutación en alguno de los genes estudiados. Obtuvimos el 100% de éxito en la validación de las microdeleciones de *IKZF1* observadas por MLPA/PCR (6/6). En cuanto a las fusiones génicas detectaron el 83,3% de las observadas en los pacientes mediante los análisis citogenéticos (10/12). En 4 muestras se identificó la t(12;21); en 3 la t(9;22), en 2 la t(4;11) y en 1 la t(1;19). Por otro lado, se detectó el 100% de los casos con hiperdiploidia en los cromosomas 4,8,10 y 21 que el panel nos permitía analizar (6/6). También detectamos con éxito el único caso hipodiploide de esta serie (1/1). En cuanto a los CNVs, en el 85% de los pacientes se detectaron las pérdidas en genes como *CDKN2A* y *PAX5* (12/14), destacando la detección de un caso con *iAMP21* confirmada por FISH (1/1).

Conclusiones: El uso de este panel personalizado de NGS nos permite la detección rápida y eficaz de las principales alteraciones genéticas presentes en la LAL-B en un solo experimento (mutaciones, CNVs, aneuploidías y traslocaciones). La aplicación del panel permitiría así agilizar el proceso de diagnóstico molecular de los enfermos, ayudando en la estratificación de los pacientes, así como en la toma de decisiones terapéuticas.

Financiación: SA271P18, GRS 1847/A/18, FUCALHH 2017, IBY17/00006 and AECC grant.

Palabras clave: Leucemia aguda linfoblástica (LAL), fusión génica, CNVs, *IKZF1*, NGS.

PO-142

INFLUENCIA DEL TABAQUISMO EN EL PRONÓSTICO DE LOS ADULTOS JÓVENES CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA CON CROMOSOMA FILADELFA TRATADOS CON IMATINIB Y QUIMIOTERAPIA (PROTOCOLO LAL PH08)

Ribera Santasusana JM¹, García-Calduch O¹, Mercadal S², Barba P³, Gil C⁴, Martínez-Carballeira D⁵, López-Jaime F⁶, Serrano J⁷, Cervera M⁸, Bravo P⁹, Abella E¹⁰, García-Belmonte D¹¹, Lavilla E¹², García-Cadenas I¹³, Coll R¹⁴, López-Martínez A¹⁵, Ortín X¹⁶, Hernández-Rivas JM¹⁷

¹ICO-Hospital Germans Trias i Pujol, Josep Carreras Leukemia Research Institute.; ²ICO-Hospital Duran i Reynals; ³Hospital Universitari Vall d'Hebron; ⁴Hospital General Universitario de Alicante; ⁵Hospital Central de Asturias; ⁶Hospital Regional Universitario de Málaga; ⁷Hospital Reina Sofía; ⁸ICO-Hospital Joan XXIII; ⁹Hospital Universitario de Fuenlabrada; ¹⁰Hospital del Mar; ¹¹Hospital La Zarzuela; ¹²Hospital Lucus Augusti; ¹³Hospital Universitari de Sant Pau; ¹⁴ICO-Hospital Doctor Trueta; ¹⁵Hospital Arnau de Vilanova València; ¹⁶Hospital Verge de la Cinta; ¹⁷Hospital Universitario de Salamanca

Fundamento y objetivo: En un estudio efectuado en pacientes con leucemia aguda linfoblástica con cromosoma Filadelfia (LAL Ph+) tratados con inhibidores de tirosinquinasa (ITK) y la quimioterapia HiperCVAD se constató que el tabaquismo era un factor pronóstico desfavorable independiente para la supervivencia. Este efecto fue más evidente en pacientes tratados con ponatinib que en los que recibieron dasatinib o imatinib. En este estudio se evaluó el impacto pronóstico del hábito tabáquico en una serie de adultos jóvenes (15-60 años) tratados con imatinib y quimioterapia (Protocolo PETHEMA LAL Ph08)

Pacientes y método: El protocolo LAL Ph08 (NCT01491763) incluye la combinación de imatinib (600 mg/d) y quimioterapia estándar de inducción (vincristina, daunorubicina y prednisona) y consolidación (metotrexato, ARA-C, mercaptopurina, etopósido) seguidos de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (aloTPH). Se preguntó específicamente a los investigadores sobre el hábito tabáquico de los pacientes (número de paquetes-año). Se analizó la influencia del tabaquismo en la tasa de remisión completa (RC), la respuesta molecular al final de la inducción y antes del TPH, la supervivencia global (SG) y la incidencia acumulada de recaídas (IAR, analizada por riesgos competitivos).

Resultados: Se dispuso de información fiable del hábito tabáquico en 70 pacientes, de los que 20 fumaban más de 1 paquete-año. Hubo mayor predominio de varones entre los fumadores (15/20 vs. 20/50, $p=0,008$), sin diferencias en el resto de variables clínicas y biológicas

entre ambos grupos de pacientes. En la Tabla 1 se comparan los resultados del tratamiento en función del hábito tabáquico. Aunque hubo una tendencia a una mayor tasa de respuesta molecular profunda (RM4) tras la inducción entre los no fumadores (7/33 vs. 0/14, $p=0,08$), no hubo diferencias significativas en el resto de variables de respuesta y supervivencia analizadas. La probabilidad de SG a 5 años fue menor en los fumadores de >1 paquete-año, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (46% [21%, 71%] vs. 66% [52%, 80%], $p=0,371$). Tampoco fue significativamente diferente la IAR (29% [8%-54%] vs. 24% [11%-40%], $p=0,761$). Igualmente no hubo diferencias al comparar los pacientes que fumaban (independientemente del número de paquetes-año) y los no fumadores. En el análisis con el modelo de Cox, solo la edad aumentada tuvo un impacto pronóstico en la supervivencia (HR: 1,04, [IC95%:1.01, 1.07], $p=0,005$).

Conclusiones: En esta serie de pacientes adultos jóvenes con LAL Ph+ tratados uniformemente con imatinib, quimioterapia y alo-TPH el hábito tabáquico no tuvo impacto significativo en la respuesta al tratamiento y la supervivencia.

Subvencionado en parte con las becas PI14/01971 FIS, Instituto Carlos III, SGR 288 (GRC) y Fundación "La Caixa".

Tabla 1. Comparación de la respuesta al tratamiento y la supervivencia entre fumadores y no fumadores.

	No fumador	Fumador (>1 paq-año)	p
Pacientes	50	20	-
Muerte en inducción	1/48* (2%)	1/20 (5%)	
Resistencia	0	1/20 (5%)	
Remisión completa (%)	47/48* (98%)	18/20 (90%)	0.205
Respuesta molecular (RM3) fin inducción (%)	18/33 (55%)	4/14 (29%)	0.103
Respuesta molecular (RM4) fin inducción (%)	7/33 (21%)	0	0.086
Muerte en consolidación	0	1/18	-
Recaída pre-TPH	1/47	1/18	-
Respuesta molecular (RM3) pre-TPH (%)	27/31 (87%)	8/12 (67%)	0.123
Respuesta molecular (RM4) pre-TPH (%)	19/31 (61%)	5/12 (42%)	0.245
Mortalidad relacionada con TPH (%)	10/42 (24%)	3/15 (20%)	0.763
Recaída tras TPH (%)	8/42 (19%)	3/15 (20%)	0.936
Mediana SG (IC95%), años.	NA	3.4 (NE)	0.371
Incidencia acumulada de recaída (IC95%)	24% (11%, 40%)	29% (8%, 54%)	0.761
Mediana seguimiento (límites), años	3.2 (0.01, 9.2)	3.7 (0.2, 6.2)	-

PO-143

LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA B COMÚN, PHILADELPHIA +, CON AFECTACIÓN EXCLUSIVA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. REPORTE DE UN CASO

Tamariz-Amador LE¹, Riego-Repullo V¹, Palacios-Berraquero ML¹, Panizo C¹, Rifón JJ¹

¹Clinica Universidad de Navarra

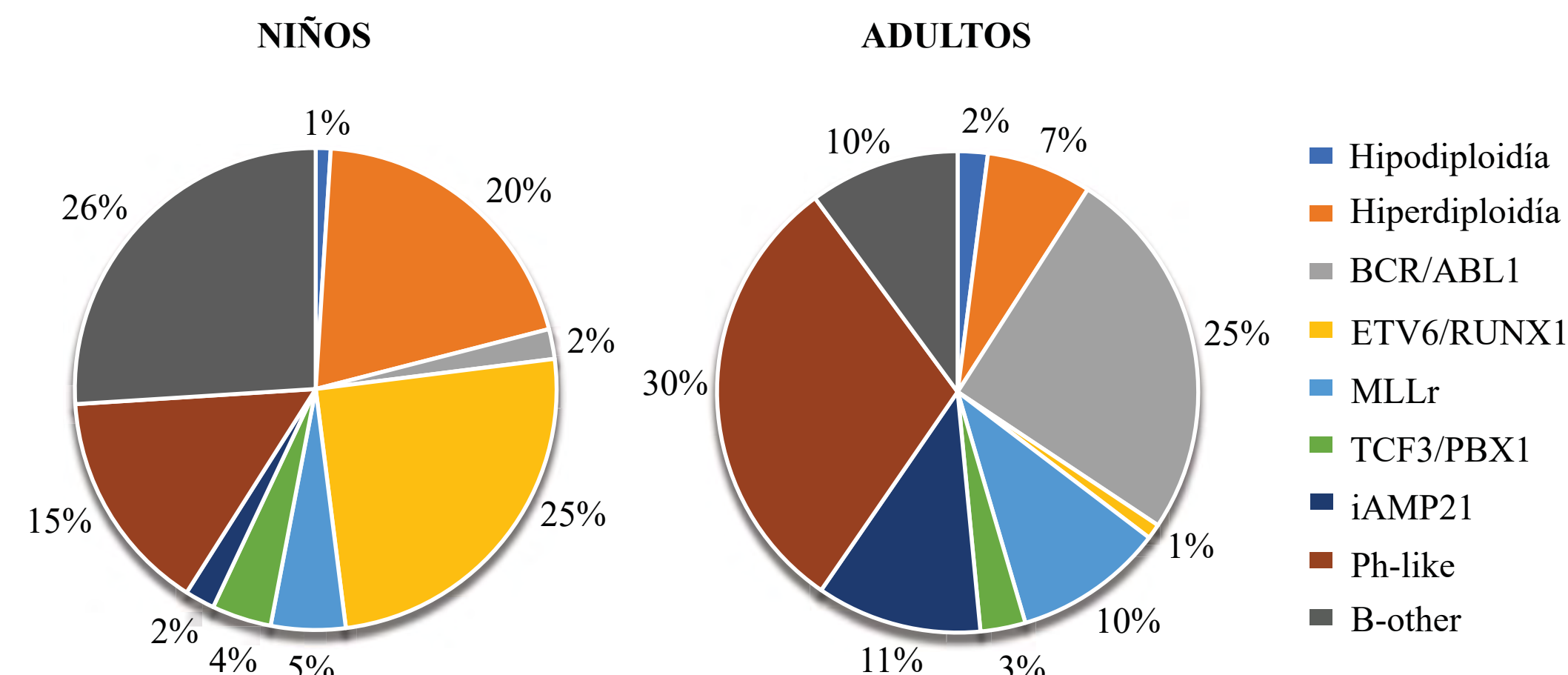
Introducción: La afectación exclusiva del sistema nervioso central (SNC) en la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) se observa con mayor frecuencia en las recaídas, siendo muy infrecuente en el diagnóstico inicial. El correcto y minucioso análisis de las muestras obtenidas tanto de médula ósea como de líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante citometría de flujo multicolor (CFM) es de vital importancia para la correcta caracterización de la enfermedad, así como el estudio citogenético, para

Adrián Montaña¹, Jesús Hernández-Sánchez¹, Marta Martín¹, Maribel Forero², Eva Lumbreras¹, Cristina Miguel¹, Sandra Santos¹, Jose Luís Fuster³, Natalia de Las Heras⁴, Alfonso García-de Coca⁵, Magdalena Sierra⁶, Julio Dávila⁷, Ignacio de la Fuente⁸, Carmen Olivier⁹, Juan Olazabal¹⁰, Joaquín Martínez¹¹, Nerea Vega¹², Mieria Camos¹², Teresa González¹³, Jesús María Hernández-Rivas^{1,13}, Rocío Benito¹. Grupo Pethema, Sociedad española de hematología. Comité Biológico del Grupo de Leucemias de la SEHOP.

1 IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca, CSIC, Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Salamanca, España. 2 Colegio de ciencias biológicas (GICBUPTC grupo de investigación), Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia (UPTC), Colombia. 3 Departamento de pediatría oncohematológica- Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, España. 4 Departamento de Hematología - Hospital Virgen Blanca, León, España. 5 Departamento de Hematología - Hospital Clínico de Valladolid, Valladolid, España. 6 Complejo Sanitario de Zamora, Zamora, España. 7 Departamento de Hematología - Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España. 8 Departamento de Hematología - Hospital Río Hortega, Valladolid, España. 9 Servicio de Hematología y Hemoterapia - Complejo Sanitario de Segovia, Segovia, España. 10 Departamento de Hematología - Hospital Universitario de Burgos, Burgos, España. 11 Departamento de Hematología - Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España. 12 Laboratorio de Hematología, Instituto de Investigación, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, España. 13 Departamento de Hematología - Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

1 INTRODUCCIÓN

La **leucemia aguda linfoblástica B (LAL-B)** es una neoplasia hematológica de la célula stem linfóide de estirpe B, caracterizada por la presencia de **alteraciones genéticas** que determinan el curso de la enfermedad. Su detección es esencial en el diagnóstico para la correcta estratificación de los enfermos.



Convencionalmente se utilizan cariotipo y FISH para analizar cambios numéricos/estructurales y aCGH o MLPA para Copy Number Variations (CNVs) y grandes pérdidas/ganancias.

Hipótesis

La optimización de un panel de NGS que nos permita detectar el mayor número de alteraciones en un solo experimento conseguiría agilizar el diagnóstico de los enfermos.

Objetivo

Diseño y validación de un panel personalizado de NGS para ADN para la detección de las principales alteraciones genéticas asociadas a la LAL-B.

2 MÉTODOS

Diseño del panel de secuenciación masiva personalizado para la detección de:

- MUTACIONES EN 160 GENES
- HIPERDIPLOIDÍAS E HIPODIPLOIDÍAS
- COPY NUMBER VARIATIONS (CNVs)
- FUSIONES GÉNICAS
- MICRODELECCIONES DE *IKZF1*

Agilent SureDesign 499,842 kbp 57137 sondas

VALIDACIÓN

92 Pacientes LAL-B
Caracterizados mediante cariotipo/FISH.
Datos de MLPA y aCGH de 47 de ellos.

	N	%
Hipodiploidía	2	2,2
Hiperdiploidía	18	19,5
BCR/ABL1	15	16,4
ETV6/RUNX1	11	12
MLLr	5	5,3
E2A/PBX1	1	1,1
iAMP21	2	2,2
B-other	38	41,3

1. MUTACIONES

- Procesamiento de datos
Trimomatic- Fastqc - BWA - GATK
- Identificación de variantes
VARSCAN - SAMTOOLS
- Anotación de variantes
ANNOVAR
- Filtrado de variantes
Manualmente

ANÁLISIS

2. HIPODIPLOIDÍAS, HIPERDIPLOIDÍAS Y CNVs

- Normalización de la cobertura media de cada región
- Normalización a la mediana
- Cálculo de ratio en base a la referencia
- Representación Log2Ratio

3. FUSIONES Y MICRODELECCIONES *IKZF1*

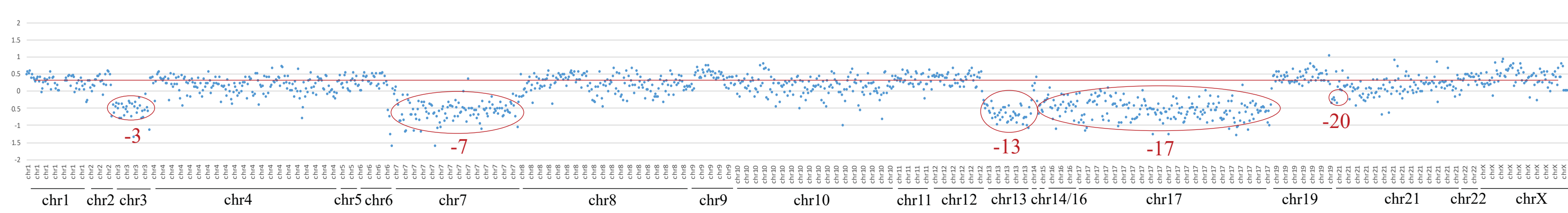
- Procesamiento de datos
- Manta - Illumina**
- Escaneo del genoma
 - Análisis, puntuación y reporte de variantes

3 RESULTADOS

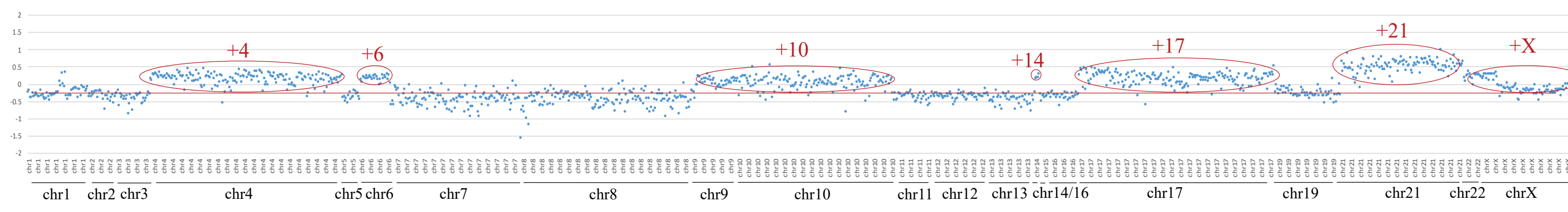
3.1 El análisis mutacional mostró que el 81 % de los pacientes presentaba al menos una mutación en alguno de los genes estudiados. El perfil mutacional fue muy distinto entre los niños y los adultos. En niños, las mutaciones más recurrentes fueron las de la ruta de RAS, mientras que en adultos, los genes más frecuentemente mutados fueron *TP53* y *JAK2*.

3.2 Análisis por NGS de CNVs, hiperdiploidías e hipodiploidías

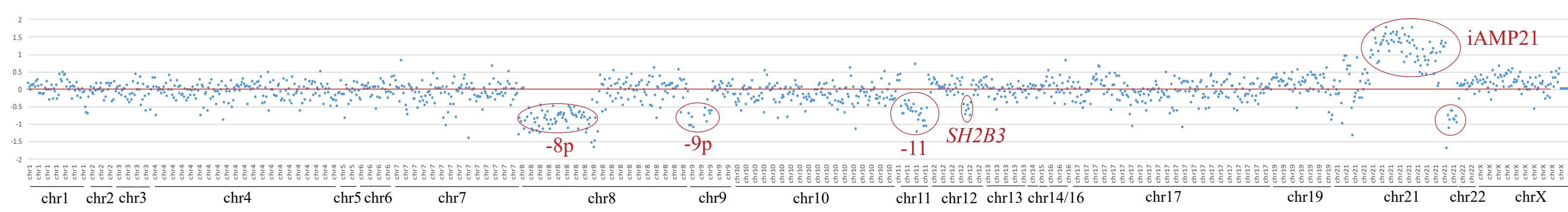
Datos previos → Cariotipo: 39,XX,-7,-13,-15,-16,-17,-20[18]/46,XX[2]



Datos previos → Cariotipo: 46,XY[10] // FISH: Normal // aCGH: arr(10,14,17,18,21,22,X)x3



Datos previos → Cariotipo: NM // FISH: iAMP21

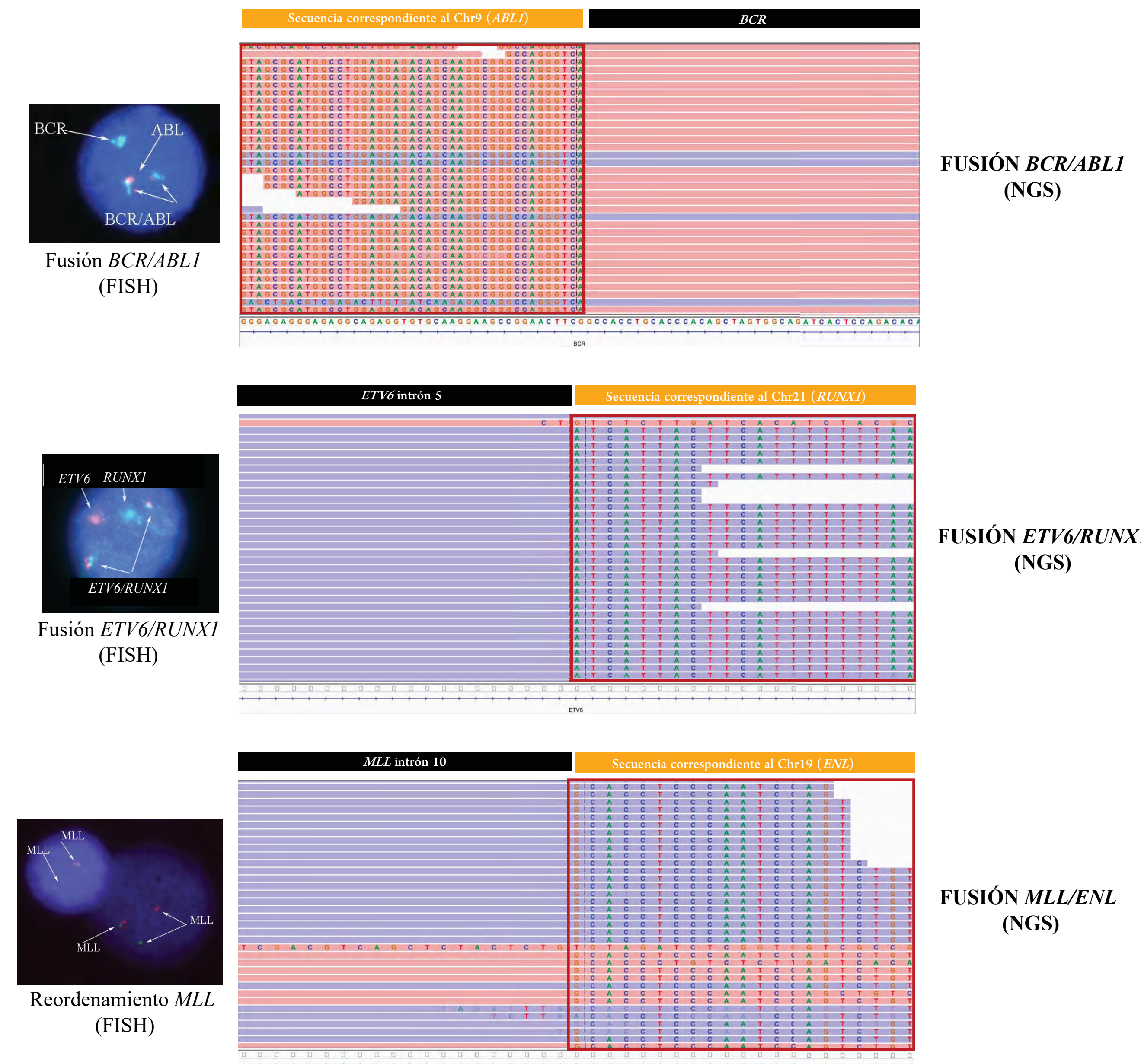


HIPODIPLOIDÍA (NGS)

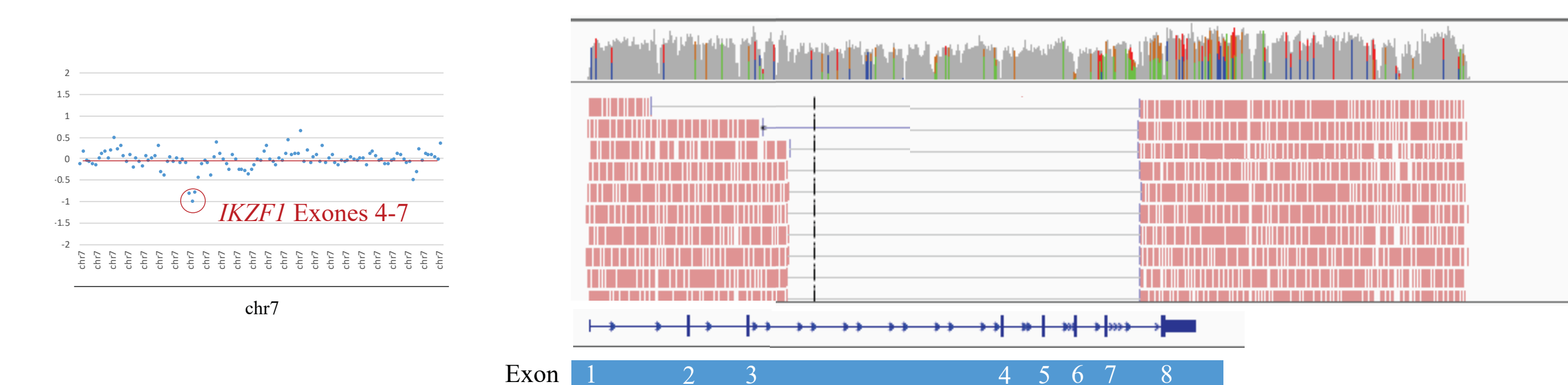
HIPERDIPLOIDÍA (NGS)

iAMP21 (NGS)

3.3 Análisis por NGS de fusiones génicas



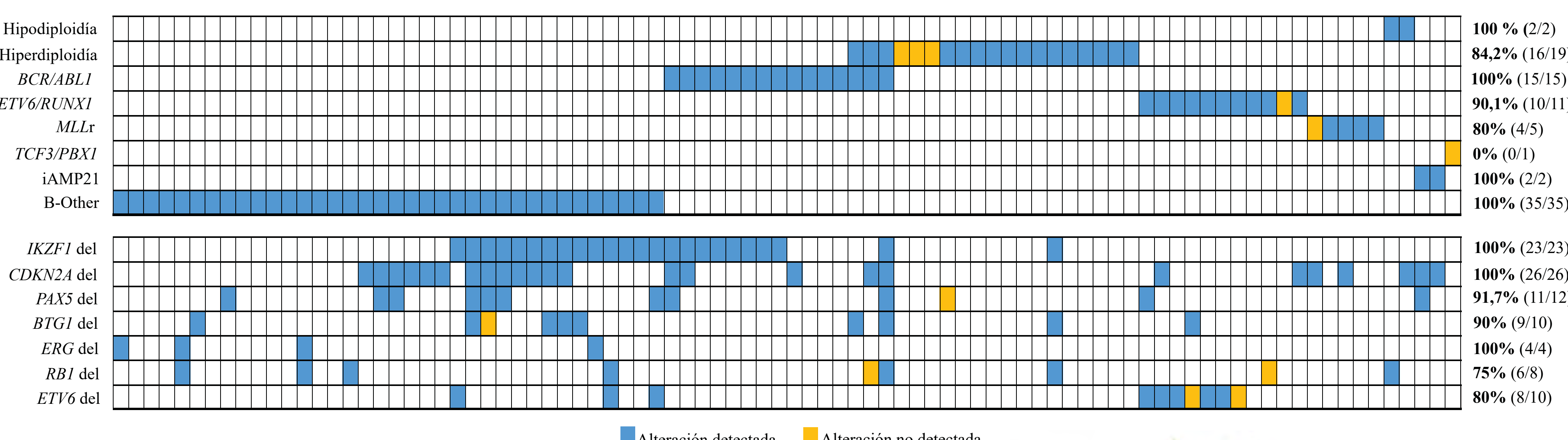
3.4 Análisis por NGS de microdelecciones de *IKZF1*



El **96%** de las muestras cumplió con los criterios mínimos de calidad de secuenciación para ser analizadas. Las principales alteraciones genéticas, que permiten la correcta estratificación de los enfermos según el grupo biológico, fueron detectadas por NGS en el **100%** de las muestras analizadas con **hipodiploidías**; fusión *BCR/ABL1*; *iAMP21* y **B-other**, y en más del **80%** de las muestras con hiperdiploidías; fusión *ETV6/RUNX1*; *MLLr* y fusión *TCF3/PBX1*. Estas alteraciones fueron validadas por cariotipo/FISH. Además, en el **16%** de las muestras se detectó "de novo" la presencia de alguna de estas alteraciones genéticas. El análisis por NGS confirmó la presencia del **100%** de los CNVs observados mediante MLPA y/o aCGH, en los genes *IKZF1*, *CDKN2A* y *ERG* y de más del **75%** de las deleciones de *PAX5*, *BTG1*, *RBI* y *ETV6*.

4 CONCLUSIONES

El uso de este **panel personalizado de NGS** nos permite la detección rápida y eficaz de las principales alteraciones genéticas presentes en la LAL-B en un solo experimento (mutaciones, CNVs, aneuploidías y translocaciones). La aplicación del panel permitiría así **agilizar el proceso de diagnóstico molecular** de los enfermos, ayudando en la estratificación de los pacientes, así como en la toma de **decisiones terapéuticas**.



6. Título del trabajo: *ETV6/RUNX1* fusion gene abrogation decrease the oncogenic potential of tumors cells in a preclinical model of acute lymphoblastic leukemia.

Nombre del congreso: 24 th Congress of European Hematology Association (EHA).

Ciudad de celebración: Amsterdam, Holanda

Fecha: 13/06/2019-16/06/2019

Entidad organizadora: European Hematology Association (EHA)

Autores: Adrián Montaña; Jose Luis Ordóñez; Verónica Alonso Pérez; Rocío Benito; Ignacio García Tuñón; Jesús María Hernández Rivas.

HemaSphere: June 2019 - Volume 3 - Issue S1 - p 36-37

doi: 10.1097/01.HS9.0000558896.19197.4f

24th Congress of the European Hematology Association

its sensitivity to prednisolone (IC₅₀: 321.1 vs. 242.7 nM; $P = 0.018$) and dexamethasone (IC₅₀: 16.2 vs. 13.8 nM; $P = 0.032$). Such difference was not observed for other chemotherapeutic agents, indicating the specific influence of CD9 on glucocorticoid response. The glucocorticoid receptor NR3C1 was ubiquitously expressed in CD9⁺ and CD9⁻ cell lines, and was not significantly altered upon CD9 overexpression/knockout.

Summary/Conclusion: Our results collectively indicate that CD9 negativity was definitively linked to glucocorticoid resistance, which could be partially reversed by CD9 reactivation through a NR3C1-independent mechanism. Comprehensive understanding of the interaction between CD9 and glucocorticoid susceptibility could lead to improved therapeutic strategies for resistant pediatric B-ALL. The findings could also be exploited for other related malignancies (e.g. AML), of which glucocorticoids remain largely inefficient.

PF168 KINASE AND CYTOKINE RECEPTOR SIGNALING PATHWAY ACTIVATING ALTERATIONS IN UNIFORMLY TREATED B-ALL

R. Norvilas^{1,2*}, V. Diršė³, R. Šema Kevičienė¹, O. Mickevičūtė¹, G. Vaiškevičienė⁴, J. Rascon⁴, L. Griškevičius^{1,5}

¹Hematology, Oncology and Transfusion Medicine Center, Vilnius University Hospital Santaros Klinikos, ²Department of experimental, preventive and clinical medicine, State Research Institute Centre for Innovative Medicine, ³Institute of Clinical Medicine, Vilnius University, ⁴Center for Pediatric Oncology and Hematology, Children's Hospital, Affiliate of Vilnius University Hospital Santaros Klinikos, Vilnius, Lithuania

Background: Recent B-acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) studies revealed a new subgroup of patients with ABL-class and JAK-STAT fusions which can be targeted using small-molecule inhibitors (Roberts et al., 2017). Positivity for ABL-class or JAK-STAT fusions was associated with positive post-induction minimal residual disease (MRD) (Pui et al., 2017) and inferior outcome (Boer et al., 2017) but most studies were conducted in non-uniformly treated patient populations.

Aims: To identify kinase and cytokine receptor pathway activating alterations and determine their clinical significance in uniformly treated B-ALL.

Methods: The study includes 160 BCR-ABL1-negative B-ALL (122 pediatric, 38 adults (≥18 y/o)) patients treated according to MRD-driven pediatric-adult NOPHO ALL-2008 protocol. 101 B-ALL cases (including high hyperdiploids and low hypodiploids) without canonical B-ALL aberrations were selected for targeted RNA-Sequencing (RNA-Seq). Sequencing was performed using TruSight Pan-Cancer sequencing panel (Illumina Inc., CA). FISH analysis was used to identify *CRLF2-IGH* gene rearrangements.

Results: Of 101 B-ALL patients (75 pediatric, 26 adults), RNR-Seq and FISH analysis identified three (3%) cases with ABL-class (*ABL1-ETV6*, *ABL2-ZC3H4V1*, *PDGFRB-EBF1*) fusions and four (4%) cases with JAK-STAT fusions (*JAK2-BCR*, $n = 1$; *CRLF2-IGH*, $n = 3$). Five of seven ABL-class and JAK-STAT mutually exclusive fusions were detected in adults. Remaining ten (9.9%) gene fusions were identified in the pediatric group, of which five cases had *PAX5* gene and three had *ZNF384* gene rearrangements.

Gene mutation analysis detected Ras pathway mutations in a total of 48 (47.5%) cases: *NRAS* ($n = 28$), *KRAS* ($n = 17$), *PITPN1* ($n = 7$). Other JAK-STAT and *FLT3-TKD* gene mutations were present in 10 (9.9%) and 8 (7.9%) cases, respectively. Thirty-seven (36.6%) patients harbored other gene variants ($n = 23$) or had no recurrent gene variants/fusions ($n = 14$) detected by RNA-Seq.

ABL-class and JAK-STAT fusions were more frequent among adults than pediatric patients (19.2% vs. 2.7%) while ABL-class fusions were exclusive to adults ($p = 0.032$). The prognostic analysis was restricted to the adult group. More adult patients with ABL-class or JAK-STAT fusions had positive post-induction day 29 MRD values compared to negative patients ($p < 0.001$) and were more frequently assigned to NOPHO-2008 high-risk groups or had induction failure (80% vs 30.3%, $p = 0.05$). 75th percentile event-free (EFS) and overall survival (OS) were 5 vs. 35 ($p = 0.008$) and 15 vs. 37 ($p = 0.07$) months in ABL-class or JAK-STAT fusion positive vs. negative adult groups, respectively.

In multivariate analysis, the positivity for ABL-class or JAK-STAT fusions was an independent risk factor for worse EFS ($p = 0.032$) but not for OS ($p = 0.242$).

Summary/Conclusion: Overall, ABL-class and JAK-STAT fusions were infrequent and were more often detectable in adults compared to children. Adult patients with ABL-class or JAK-STAT fusions had higher

post-induction MRD values and were more frequently assigned to high-risk disease groups or had induction failure resulting in lower event-free survival.

PF169 LONG-TERM INHIBITION OF CHK1/CHK2 KINASES MODIFY ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CELL LINE RESPONSE TO DNA DAMAGING AGENTS

A. Ghelli Luserna Di Rora^{1*}, M. Bocconcelli², A. Padella², M. C. Fontana², A. Ferrari¹, E. Imbrogno¹, C. Baldazzi², N. Testoni², G. Simonetti¹, G. Martinelli¹

¹Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori (IRST) IRCCS, Meldola, ²Department of Experimental, Diagnostic and Specialty Medicine, University of Bologna Institute of Hematology "L. e A. Seragnoli", University of Bologna, Bologna, Italy

Background: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells respond to chemotherapy, or more generally to DNA damages, by activating different DNA Damage Response (DDR) pathways. DDR-pathways regulate cell cycle progression and DNA damages repair. Molecular and functional alterations in key DDR-related genes drastically affect the effectiveness of DNA-damaging treatments in cancer cells. For this reasons selective DDR-inhibitors have been developed in order to sensitize cancer cells against conventional chemotherapy. Despite the proven efficacy of DDR-inhibitors in cancer treatment, only few studies have highlighted the biological consequences the prolonged inhibition of DDR-pathways in cancer cells.

Aims: The aim of the study was to evaluate biological consequences of the prolonged inhibition of two crucial DDR-related kinase, the cell cycle checkpoint kinase 1 (CHK1) and 2 (CHK2), in B-ALL cell lines.

Methods: The resistant cell lines were obtained from B-ALL NALM-6 cell line by prolonged incubation with a CHK1/CHK2 inhibitor, PF-00477736. Parental cells were progressively incubated with increasing concentration of PF-00477736 (from 100 nM to 10μM). The functional characterization of resistant cell lines was evaluated in vitro in term of response to different chemotherapy agents (doxorubicin, methotrexate and clofarabine) in term of reduction of cell viability, induction of apoptosis, cell cycle perturbation and activation of DDR pathways. The molecular characterization of resistant cell lines was evaluated in term of Copy Number Alteration (SNP-array, Affimetrix).

Results: Starting from NALM-6 parental cell lines, we generated two resistant models, N6R-PF4 and N6R-PF8. N6R-PF8 was generated from N6R-PF4 cells after a prolong incubation with increased PF-00477736 concentration. In term of reduction of cell viability and induction of apoptosis the resistant cell lines were not only significantly unresponsive to PF-00477736 (increasing the IC₅₀ up to 8-fold) but also to different DNA damaging agents in comparison to parental NALM-6. The cell cycle profile revealed that the resistant cell lines had a significant reduction in the percentage of cells in S phase and a significant increase of cells in G2/M phase. SNP microarray highlighted different alterations in DDR-related genes and in particular in the ATM/CHK2 pathway. Three regions in copy number LOSS (CN = 1) containing several genes involved in cell cycle checkpoint regulation (*ATM* and *NPAT*) and in the apoptosis (*BIRC2*, *BIRC3*, *CARD17*, *CASP1*, *CASP12* and *CASP5*) were detectable only in NALM-6 parental cell lines and were copy number neutral in the two resistant models. Immunoblotting analysis confirmed that in the resistant cell lines the ATM/CHK2 down-stream pathways was significant over-expressed and activated in comparison to the parental NALM-6. By chromosome binding analysis we identified that NALM-6 cells were composed by a predominant clone with ATM locus CN loss and by a sub-clone (45,X,-Y,t(5;12)(q33;p13),t(7;19)(q11;p13)) with ATM locus in CN neutral. The treatment with PF-00477736 progressively selected the sub-clone, reaching 60% of clones in N6R-PF4 and 100% of clone in N6R-PF8.

Summary/Conclusion: We showed that the higher protein expression of ATM and CHK2 affected not only the sensitivity to PF-00477736 but also compromised the efficacy of conventional chemotherapy. In this scenario the level of expression of these two kinases seems to correlate with the sensitivity to DNA damaging agents and to PF-00477736.

PF170 ETV6/RUNX1 FUSION GENE ABROGATION DECREASE THE ONCOGENIC POTENTIAL OF TUMORS CELLS IN A PRECLINICAL MODEL OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

A. Montaña^{1*}, J. L. Ordóñez², V. Alonso-Pérez², A. Marín-Quilez³, C. Pérez-Carretero³, R. Benito², I. García-Tuñón⁴, J. M. Hernández-Rivas⁵

Amsterdam, The Netherlands, June 13-16, 2019

¹Hematology, IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC, Cancer Research Center; ²Unidad de Diagnóstico Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC (USAL-CSIC); ³IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC, Cancer Research Center; ⁴Unidad de Diagnóstico Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC (USAL-CSIC); ⁵Department of Medicine, Universidad de Salamanca, Spain; and Department of Hematology, Hospital Universitario de Salamanca; Salamanca; Spain., Salamanca, Spain

Background: The gene fusion between *ETV6* and *RUNX1* generated by t(12;21)(p13;q22), is the most frequent chromosomal translocation in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Patients carrying this translocation are associated with a good prognosis and excellent molecular response to treatment. However up to 20% of cases relapse. Furthermore, the response to the treatment of some relapse cases is associated by resistance to treatments such as glucocorticoids, and these patients must be treated with stem cell transplantation. Recent studies suggest that *ETV6/RUNX1* (*E/R*) plays a role in the initiation of leukemia and is also essential for disease progression and maintenance, through the deregulation different molecular pathways that contribute to leukemogenesis, such as the upregulation of *PI3K/AKT/mTOR* pathway.

Aims: To study the "in vitro" and "in vivo" effects of *E/R* fusion gene abrogation by using CRISPR/Cas9, on the oncogenic potential of tumor cells (REH cell line).

Methods: 1) Based on CRISPR/Cas9 system, sgRNAs directed towards the fusion gene were designed to produce indels modifying the oncogene ORF and, therefore, the expression of the protein. Tumor cells (REH cell line expressing *E/R* fusion gene) were electroporated (Amara nucleofector, Basilea, Switzerland) and sorting by flow cytometry. qPCR and Western Blot were used to check *E/R* mRNA expression and downstream targets expression. 2) Cell viability was measured by MTT cell proliferation assays in *E/R*KO cells and *E/R*positive cells treated with copanlisib, a PI3K inhibitor, (10 nM) and prednisolone (250 µM). 3) In a xenograft model, *E/R*positive cells (right flank) and *E/R*KO cells (left flank) were subcutaneously injected in 16 NOD/SCID/IL2 receptor gamma chain null mice. Excised tumors were sampled just after sacrifice and stained with hematoxylin & eosin.

Results: 1) A total loss of *E/R* expression was observed in different *E/R* KO clones established by single cell, demonstrating an effective disruption of the oncogene in REH cells. Moreover, a decrease of downstream targets expression levels such as, phospho-Akt (66%), BCL-XL (48%) and BCL-2 (52%) was observed. 2) Abrogation of *E/R* fusion gene showed a significantly decrease of oncogenic potential "in vivo". Mice injected with *E/R*KO cells did not generated tumors or generated significantly smaller tumors than those generated by *E/R*positive cells. Furthermore, a higher rate of mitotic activity was observed in tumors from *E/R*positive cells (62 vs 20; $p = 0.006$). 3) Tumor cells showed a higher sensitivity to copanlisib and to combination of copanlisib and prednisolone "in vitro" after *E/R* depletion. Treatment with copanlisib raised to decrease the cell viability up to 35% in *E/R* KO cells vs. 55% in *E/R* positive cells ($p < 0.05$). In the same way, combination of copanlisib and prednisolone was more effective in *E/R* KO cells (26 % vs 34% of cell viability, $p < 0.05$).

Summary/Conclusion: Avoiding the *E/R* fusion gene expression reduces significantly the oncogenic potential of ALL cells (REH, *E/R*positive) both "in vivo" and "in vitro". *E/R*KO cells also showed an increased sensitivity to copanlisib alone and in combination with prednisolone, suggesting *E/R* expression could be involved in the prednisolone resistance observed in some patients. These results showed that *E/R* plays an important role in the maintenance of the leukemic phenotype. The fusion gene could therefore become a potential therapeutic target.

PF171 DIFFERENTIAL EXPRESSION PATTERNS OF SPECIFIC LONG NONCODING RNAs AND COMPETING ENDOGENOUS RNA NETWORK IN ACUTE LYMPHOCYTE LEUKEMIA

W. Wang¹, J. Ma¹, S. Gan¹, Z. Jiang¹, L. Sun¹, H. Sun¹

¹the first affiliated hospital of Zhengzhou university, Zhengzhou, China

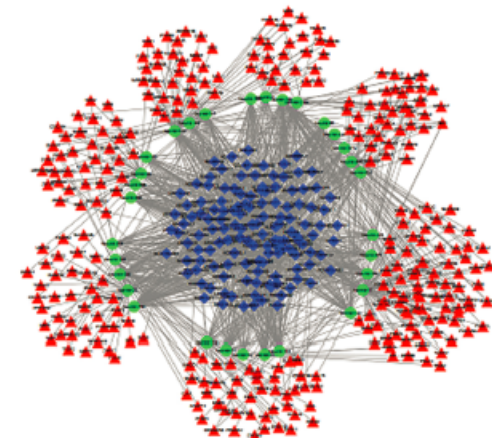
Background: Increasing evidence has demonstrated that long non-coding RNAs (lncRNAs) play an important role in the competitive endogenous RNA (ceRNA) networks in that they regulate protein-coding gene expression by sponging microRNAs (miRNAs). However, the roles of specific lncRNA and its related competing endogenous RNAs (ceRNA) network in acute lymphocyte leukemia (ALL) are not fully understood.

Aims: The aims of this study were to use RNA expression profile bioinformatics data from cases of ALL from the Cancer Genome Atlas (TCGA), the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), and

the Gene Ontology (GO) databases to construct a ceRNA network of mRNAs, lncRNAs, and miRNAs.

Methods: All patient databases were obtained from TCGA database. lncRNA and miRNA expression files included leukemia and corresponding normal samples were also downloaded from TCGA portal. An EdgeR (empirical analysis of digital gene expression data in R) package was used to identify the RNAseq data of acute lymphoblastic leukemia. Only the differential expression genes (DEGs) with $\text{adj.P.Val} < 0.05$ and \log_2 fold change (FC) ≥ 2 were considered as significant. Based on bioinformatics generated from miRcode, starBase, and miRTarBase, we constructed an lncRNA-miRNA-mRNA network (ceRNA network) in ALL. Database for annotation, visualization and integrated discovery (DAVID), was used for GO analysis to understand the functions of targeted genes in terms of biological process (BP), cellular component (CC) and molecular function (MF). In addition, KEGG and an R Package, clusterProfiler, was distinguished pathway enrichment of each targeted gene. Cutoff value was set as P value < 0.05 .

Results: We found 755 differentially expressed lncRNAs and 6131 differentially expressed genes (DEGs). The functional enrichment indicated that the DEGs mainly regulated the pathways of programmed cell death, cell cycle, apoptosis and so on. Through integrated lncRNA-mRNA and miRNA-mRNA pairs, the ceRNA network was constructed. The resulting ceRNA network included 395 mRNAs, 135 lncRNAs and 31 miRNAs. 18 out of the 135 lncRNAs (RP11-497G19.2, LOC339535, LA16c-329F2.1, AK127309, XLOC_006664, RP1-16A9.1, RP11-6918.3, LOC100507254, KB-1183D5.14, LOC100506305, RP11-87C12.5, WASIR1, RP3-523C21.1, RP11-325F22.2, AC002454.1, LOC286367, LOC286367, RP3-523C21.2) were identified and found to be associated with the complete remission rate of ALL patients ($P < 0.05$)



Summary/Conclusion: Our results showed lncRNA expression patterns and a complex ceRNA network in ALL. Furthermore, we identified 18 lncRNAs as novel, potential prognostic biomarkers for ALL. However, further studies on verification of ceRNA network are needed.

Acute lymphoblastic leukemia - Clinical

PF172 PROSPECTIVE COMPARISON OF SANGER SEQUENCING VS NEXT GENERATION SEQUENCING FOR ROUTINE BCR-ABL1 KINASE DOMAIN MUTATION SCREENING IN PHILADELPHIA-POSITIVE ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA PATIENTS

S. Soverini¹, M. Martelli¹, L. Bavaro¹, C. Papayannidis¹, S. Sica², F. Sorà², F. Albano³, S. Gallimberti⁴, C. Barate⁴, M. Rondoni⁵, E. Abruzeze⁶, M. Annunziata⁷, S. Russo⁸, D. Mannina⁹, M. Stulle¹⁰, A. Imovilli¹¹, A. Curti¹, M. Bonifacio¹², D. Ferrero¹³, C. Basilio¹⁴, G. Reddicono¹⁵, G. Mineo¹⁶, M. A. Laginestra¹⁷, S. A. Pileri¹⁸, F. Mignone¹⁹, A. Percepse²⁰, G. Martinelli²¹, M. Cavo¹

7. Título del trabajo: COMPREHENSIVE AND SEQUENTIAL GENETIC ANALYSIS OF B-CELL ALL REVEALS AN ARRAY OF CHANGES WITH A HIGH INCIDENCE OF TP53 MUTATIONS AND IKZF1 DELETIONS. PB1654

Nombre del congreso: 24 th Congress of European Hematology Association (EHA).

Ciudad de celebración: Amsterdam, Holanda

Fecha: 13/06/2019-16/06/2019

Entidad organizadora: European Hematology Association (EHA)

Autores: Montañó, A.; Forero-Castro, M.2; Robledo, C.; Coca, A. García-de4; Fuster, J. L., Heras, N. de las; Olivier, C.; Hernández-Sánchez, M.8; Corchete-Sánchez, L. A.9; Martín-Izquierdo, M.1; Riesco, S.10; González, T.; Ribera, J. Ribera, J. M.; Benito, R.; Hernández-Rivas, J.M.

HemaSphere: June 2019 - Volume 3 - Issue S1 - p 765

doi: 10.1097/01.HS9.0000564864.16004.da

Amsterdam, The Netherlands, June 13-16, 2019

Aims: To examine the expression and clinical significance of RASD1 in adults with B-ALL; to explore effects of RASD1 on biological function of B-ALL.

Methods: Fifty-three consecutive adults with de novo B-ALL were enrolled in this study. The RASD1 transcript levels were determined by TaqMan-based real time quantitative PCR (RQ-PCR) at the time of diagnosis. RASD1-over-expression cell models were constructed to study the biological function of RASD1 in B-ALL. The cell proliferation was detected by CCK-8; cell apoptosis and cell cycle were analyzed by flow cytometry.

Results: Our data suggested that RASD1 was abnormally overexpressed in B-ALL. High RASD1 transcript levels at diagnosis were associated with lower survival probabilities (44% [20%>61%] vs. 79% [60%>97%]; P = 0.037) and were also an independent prognostic factor in adult B-ALL (HR = 4.9 [1.5-15.9]; P = 0.008). Functional in vitro analyses indicated that RASD1 promoted cell proliferation, cell cycle progression and chemotherapy resistance and inhibited cell apoptosis. Bioinformatic analyses also showed that high RASD1 expression in cells correlated with positive regulation of cell proliferation as well as nucleosome assembly and telomere organization.

Summary/Conclusion: These data demonstrated that RASD1 might serve as a novel prognostic biomarker for adult B-ALL and as a potential therapeutic target in adult B-ALL patients.

PB1654 COMPREHENSIVE AND SEQUENTIAL GENETIC ANALYSIS OF B-CELL ALL REVEALS AN ARRAY OF CHANGES WITH A HIGH INCIDENCE OF TP53 MUTATIONS AND IKZF1 DELETIONS

A. Montañó¹, M. Forero-Castro², C. Robledo³, A. García-de Coca⁴, J. L. Fuster⁵, N. de las Heras⁶, C. Olivier⁷, M. Hernández-Sánchez⁸, L. A. Corchete-Sánchez⁹, M. Martín-Izquierdo¹, S. Riesco¹⁰, T. González¹¹, J. Ribera¹², J. M. Ribera¹³, R. Benito¹⁴, J. M. Hernández-Rivas¹⁵

¹IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC, Cancer Research Center; ²IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC, Cancer Research Center and Escuela de Ciencias Biológicas. Grupo de investigación en Ciencias Biomédicas (GICBUPTC). Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia; ³IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC, Cancer Research Center; Salamanca, Salamanca; ⁴Servicio de Hematología, Hospital Clínico de Valladolid, Valladolid; ⁵Servicio de Oncohematología Pediátrica, Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia; ⁶Servicio de Hematología, Hospital Virgen Blanca, León; ⁷Servicio de Hematología, Hospital General de Segovia, Segovia; ⁸IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC, Cancer Research Center and Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA; ⁹IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC, Cancer Research Center; Salamanca; Spain and Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca; Salamanca; Spain; ¹⁰Department of Pediatrics, University Hospital of Salamanca; ¹¹IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC, Cancer Research Center and Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca; ¹²Acute Lymphoblastic Leukemia Group, Josep Carreras Leukemia Research Institute; ¹³Servicio de Hematología, Institut Català d'Oncologia, Cap del Servei d'Hematologia Clínica ICO-Hospital Germans Trias i Pujol, Josep Carreras Research Institute, Barcelona; ¹⁴IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC, Cancer Research Center; Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca and Department of Medicine, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

Background: B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (BCP-ALL) is a disease with specific secondary genetic alterations such as mutations (eg. TP53 mutations) and copy number alterations (CNAs) (eg. IKZF1 deletions) some of which have been associated with drug resistance, treatment failure and relapse. The clonal basis of relapse disease is complex and not yet fully understood.

Aims: To perform an integrated genomic analysis by combining next-generation sequencing (NGS), array comparative genomic hybridization (a-CGH), and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in order to identify the clonal shifts related to BCP-ALL progression.

Methods: NGS, a-CGH, and MLPA were carried out in matched diagnosis-relapse samples from thirteen BCP-ALL patients (four children and nine adults). The mutational status of TP53(E4-E11), JAK2(E12-E16), PAX5(E2-E3), LEP1(E2-E3), CRLF2(E6) and IL7R(E5) genes was performed by applying 454 NGS technology (454 Life Sciences, USA). All samples were tested on an array-CGH 12x135K platform (Roche NimbleGen, USA). In addition, MLPA was performed using SALSA MLPA

P335-B1 ALL-IKZF1-probemix (MRC-Holland, Netherlands) which contains probes for IKZF1, CDKN2A/B, PAX5, EBF1, ETV6, BTG1, RBI genes, as well as genes from the PAR1 region (CRLF2, CSF2RA, IL3RA and P2RY8).

Results: The median age of patients was 31 years (range 4-80). All patients showed at least one genetic alteration at diagnosis and relapse. A significant increase in the frequency of CNAs at the time of relapse (median, 47 alterations per sample) compared to diagnosis (median, 6 alterations) (p = 0.019) was observed. By aCGH, the most recurrent broad and focal CNAs observed at diagnosis and/or relapse were del(7p) (77%) and del(9p) (62%) following of dup(X)(31%), dup(7q)(31%), del(13q)(23%), dup(1q)(23%), dup(21)(15%), del(12p)(15%), and del(17p)(15%). Our integrative MLPA-aCGH analysis showed that the percentages of deleted genes in the following paired diagnosis/relapse BCP-ALL samples were: IKZF1 (54% vs. 62%), CDKN2A/B (54% vs. 23%), PAX5 (38% vs. 23%), EBF1 (23% vs. 15%), BTG1 (23% vs. 23%), ETV6 (15% vs. 15%), RBI (8% vs. 15%) and PAR1 (15% vs. 8%). All patients exhibited heterogeneous changes in the pattern of CNAs from diagnosis to relapse: 8% of patients acquired only new genetic lesions at relapse, 38% of patients acquired new lesions and lost lesions present at diagnosis, and the remaining 54% of the patients simultaneously retained, lost and acquired new lesions at relapse. 71% of patients with IKZF1 del at diagnosis retained this alteration at relapse, while only 42.9% of patients with CDKN2A/B del and/or PAX5 del retained these deletions at relapse. Finally, del(17p) was also identified in two patients at diagnosis, in one of which was retained at relapse. NGS analysis revealed the presence of 6 mutations (5 in TP53 gene and 1 in PAX5 gene) in 4/13 (31%) patients at diagnosis and/or relapse (3 missense mutations, 1 splicing site mutation and 2 deletion-insertions). Two TP53 mutations were only detected at relapse whereas the remaining three showed an increase of their mutational burden at relapse (53% to 71%, 11% to 21% and 3.5% to 26% respectively). One pediatric patient with low risk disease acquired a TP53 mut at relapse.

Summary/Conclusion: The combination of NGS, a-CGH, and MLPA analysis allowed to identify clonal patterns of genetic evolution associated with relapse BCP-ALL. The alterations on IKZF1(7p), TP53(17p) and CDKN2A/B genes were mostly involved in paired diagnostic and relapse samples, being more frequent at relapse.

PB1655 GENOTYPE AND CLINICAL REPERCUSSIONS IN T LINEAGE ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN CHILDREN

S. Totadri¹, M. Singh¹, A. Trehan¹, D. Bansal¹, N. Varma², P. Bhatia¹

¹Pediatric Hematology-Oncology unit, Dept. of Pediatrics, ²Dept. of Hematology, Postgraduate Institute of Medical Education and Research, Chandigarh, India

Background: T lineage acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) accounts for approximately 15% of pediatric ALL. T-ALL has a distinct clinical presentation characterized by high white cell counts, bulky disease and early relapses that are difficult to salvage. Elucidation of the genetic landscape of T-ALL could pave the way for improving outcomes through better risk stratification and targeted therapy.

Aims: To detect common genetic aberrations in children with T-ALL and identify their clinical significance

Methods: Children aged ≤ 12 years, and diagnosed with T-ALL between September 2015 and December 2018 were included. RNA and DNA were isolated from the peripheral blood sample obtained at diagnosis. cDNA was prepared from RNA. Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to detect oncogenic transcripts: TLX-1, TLX-3 and SIL-TALL. RT-PCR followed by bidirectional sequencing was used to detect NOTCH1 mutations. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification was performed with a T-ALL probemix for identifying copy number variations (CNV). Clinical details were obtained retrospectively till September 2016 and prospectively subsequently. Treatment was administered as per the Indian Collaborative Childhood Leukemia protocol (ICICLE). The study was funded by the Council of Scientific and Industrial Research, India.

Results: Thirty-three children with T-ALL were diagnosed in the study period. The mean age was 6.7 ± 2.7 years (range: 1.1-11.5) and 27 (82%) were boys. The mean white cell count was 235.69 x10⁹/mL (range: 1.3 - 785.43). A partial exchange transfusion for hyperleuko-

7. Título del trabajo: *ETV6/RUNX1* fusion gene plays a key role in the maintenance of oncogenic potential of tumor cells in an acute lymphoblastic leukemia preclinical model.

Nombre del congreso: International Conference on Acute Lymphoblastic Leukaemia

Ciudad de celebración: Berlín, Alemania

Fecha: 16/05/2019-19/05/2019

Entidad organizadora: ESH - European School of Haematology

Autores: Adrián Montañó; **Jose Luís Ordóñez**; Maribel Forero Castro; **Verónica Alonso Pérez**; Cristina Robledo; Alfonso García de Coca; Jose Luis Fuster; Natalia de las Heras; Carmen Olivier; **María Hernández Sánchez**; Marta Martín; **Teresa González**; Susana Riesco; Jordi Ribera; Josep María Ribera; **Rocío Benito**; **Ignacio García Tuñón**; **Jesús María Hernández Rivas**.

ETV6/RUNX1 FUSION GENE PLAYS A KEY ROLE IN THE MAINTENANCE OF ONCOGENIC POTENTIAL OF TUMOR CELLS IN AN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA PRECLINICAL MODEL

Montañó A.¹, Ordóñez J.L.², Forero-Castro M.^{1,3}, Alonso-Pérez V.², Robledo C.¹, García de Coca A.⁴, Fuster J.L.⁵, De las Heras N.⁶, Olivier C.⁷, Hernández-Sánchez M.^{1,8}, Martín M.¹, González T.⁹, Riesco S.¹⁰, Ribera-Salas J.M.¹¹, Ribera J.M.¹², Benito R.¹, García-Tuñón I.², Hernández-Rivas J.M.^{13,14}

1. IBSAL, IBSAC, Universidad de Salamanca, CSIC, Centro Biomédico de Salamanca, Spain; 2. Unidad de Diagnóstico Molecular y Citología del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer (IBAC) IISGL-CISG, Salamanca, Spain; 3. Unidad de Diagnóstico Molecular y Citología del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer (IBAC) IISGL-CISG, Salamanca, Spain; 4. Unidad de Diagnóstico Molecular y Citología del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer (IBAC) IISGL-CISG, Salamanca, Spain; 5. Unidad de Diagnóstico Molecular y Citología del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer (IBAC) IISGL-CISG, Salamanca, Spain; 6. Unidad de Diagnóstico Molecular y Citología del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer (IBAC) IISGL-CISG, Salamanca, Spain; 7. Unidad de Diagnóstico Molecular y Citología del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer (IBAC) IISGL-CISG, Salamanca, Spain; 8. Unidad de Diagnóstico Molecular y Citología del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer (IBAC) IISGL-CISG, Salamanca, Spain; 9. Unidad de Diagnóstico Molecular y Citología del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer (IBAC) IISGL-CISG, Salamanca, Spain; 10. Unidad de Diagnóstico Molecular y Citología del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer (IBAC) IISGL-CISG, Salamanca, Spain; 11. Unidad de Diagnóstico Molecular y Citología del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer (IBAC) IISGL-CISG, Salamanca, Spain; 12. Unidad de Diagnóstico Molecular y Citología del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer (IBAC) IISGL-CISG, Salamanca, Spain; 13. Unidad de Diagnóstico Molecular y Citología del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer (IBAC) IISGL-CISG, Salamanca, Spain; 14. Unidad de Diagnóstico Molecular y Citología del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer (IBAC) IISGL-CISG, Salamanca, Spain.

1 BACKGROUND

The gene fusion between *ETV6* and *RUNX1* generated by t(12;21)(p13, q22), is the most frequent chromosomal translocation in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Patients carrying this translocation are associated with a good prognosis and excellent molecular response to treatment. However up to 20% of cases relapse. Furthermore, the response to the treatment of some relapse cases is associated by resistance to treatments such as glucocorticoids, and these patients must be treated with stem cell transplantation. Recent studies suggest that *ETV6/RUNX1* (*E/R*) plays a role in the initiation of leukemia and is also essential for disease progression and maintenance, through deregulation different molecular pathways that contribute to leukemogenesis, such as the upregulation of *PI3K/AKT/mTOR* pathway.

Aim We wonder if the fusion gene itself is responsible for the maintenance of leukemia. For that, we firstly aimed to analyze the genetic background of *E/R*-positive ALL patients and secondly we used CRISPR/Cas9 system to disrupt the *E/R* oncogenic fusion in an ALL cell line to evaluate "in vitro" and "in vivo" its contribution to leukemogenesis.

3 RESULTS

1. Silent mutational landscape in *E/R*-positive ALL patients

E/R-positive ALL patients showed a silent mutational landscape, highlighting that no case showed mutations in *TP53* compared to *E/R*-negative ALL patients group (p<0.034).



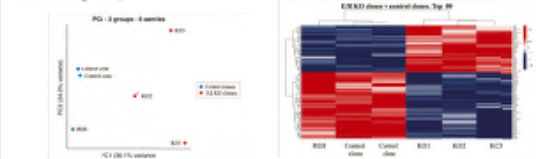
IKZF1 alterations were not found in any of these cases either (p<0.002). Alterations in both genes are commonly associated with ALL relapsed patients. On the other hand, 58.8% of *E/R*-positive ALL patients also showed a loss of *ETV6* wild type allele (p<0.001).

2. Transcriptomic analysis of *ETV6/RUNX1* KO lymphoid cell line generated by CRISPR/Cas9 showed a distinct expression signature and a deregulation of its downstream signaling genes

Single-edited cell derived cell lines were established to obtain clones with a single edition that predicted a KO sequence for the oncogene (KO1, KO2 and KO3). Furthermore, two clones with wild type sequence were established as control clones.



E/R mRNA low expression was checked by qPCR. A total loss of *E/R* expression was observed in KO2 and KO3 clones and a leaky expression was observed in KO1 clone as compared to control clones (p<0.001).



The gene expression profile analyzed by total RNA-seq showed a distinct expression signature in *E/R* KO clones as compared with control clones. The functional annotation and pathway analysis of differentially expressed genes by GSEA revealed some significantly altered pathways. Most of them have been previously associated with the fusion gene (e.g. *PI3K/AKT/mTOR* pathway, NF- κ B pathway and genes involved in apoptosis, immune system and cell cycle).

4 CONCLUSIONS

No gene mutations in the principal driver genes in ALL neither *IKZF1* deletion was observed in our cohort of patients. Avoiding the *E/R* fusion gene expression reduces significantly the oncogenic potential of ALL cells (*E/R*, *E/R* positive) both "in vitro" and "in vivo". These results demonstrate that *E/R* by itself plays an important role in the maintenance of the leukemia phenotype. The fusion gene could therefore become a potential therapeutic target specific for these patients with which obtain better response rates.

2 METHODS

1. Integrative genomic analysis of amplicon-based NOS (*TP53*, *JAK2*, *PAK3*, *IKZF1*, *ORF2* and *IL7R*) and *MLR* (*ALL-1/IC21*-1-probes)

340 E-ALL patients
340 NOS - 219 MLRA

Primary cytogenetic abnormality	Whole genome	Chromosomes	TP53	IKZF1
TP53	50	124	41	20
IKZF1	20	147	1	14
PAK3	13	53	1	3
ORF2	27	148	10	12
IL7R	22	43	0	13
MLR	138	271	16	44
Control	2	24	0	2

FUNCTIONAL STUDIES

- Based on CRISPR/Cas9 system, sgRNAs directed towards the fusion gene were designed (G1 and G2). REH cell line expressing *E/R* fusion gene were electroporated (Amaxa nucleofector, Illkirch, Switzerland) and sorting by flow cytometry. To check *E/R* mRNA expression and downstream signaling gene expression, total RNA-sequencing, qPCR and Western blot were used.
- E/R* KO cells and *E/R* positive cells were treated with copanlisib, a PI3K inhibitor, (10nM) and prednisolone (250 μ M). Cell viability was measured by MTT cell proliferation assays.
- In xenograft model, *E/R* positive cells (right flank) and *E/R* KO cells (left flank) were subcutaneously injected in 16 NOD/SCID β 2 receptor gamma chain null mice. Excised tumors were sampled just after sacrifice and stained with hematoxylin & eosin.

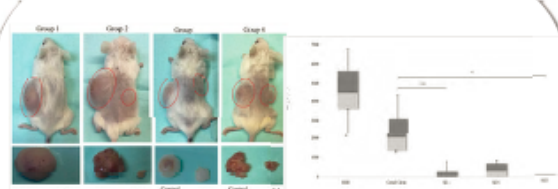
3. Abrogation of *ETV6/RUNX1* expression enhances sensitivity to the PI3K inhibitor copanlisib



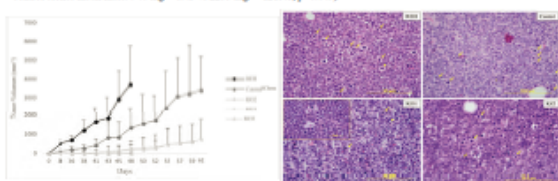
The use of PI3K inhibitors has shown sensitive glucocorticoid-resistant B-ALL cells to prednisolone, a drug widely used in ALL treatment regimens and to which *E/R*-positive relapse cases may become resistant. Tumor cells showed a higher sensitivity to PI3K inhibitor (copanlisib) and to combination of copanlisib and prednisolone "in vitro" after *E/R* depletion.

Treatment with copanlisib failed to decrease the cell viability up to 35% in *E/R* KO cells vs. 55% in *E/R* positive cells (p<0.05). In the same way, combination of copanlisib and prednisolone was more effective in *E/R* KO cells (26% vs 34% of cell viability, p<0.05).

4. *ETV6/RUNX1* expression impairs the tumorigenic capacity in vivo



Mice injected with *E/R* KO cells did not generated tumors or generated significantly smaller tumors than those generated by *E/R* positive cells (KO2 vs control clone mean mass: 355 mg \pm 293.6 vs 2255 mg \pm 1215.6; p<0.029 and KO3 vs control clones mean mass : 40 mg \pm 69.3 vs 2255 mg \pm 1215.6; p<0.049)



In addition, significant differences were observed in the time of appearance of the tumors. Those tumors generated through the KO clones appeared around day 42 (mean: 46.5 \pm 7.8), unlike those generated by the REH cells or the control clone, which appeared around day 29 (mean: 29 \pm 4.2; p<0.001) and day 36 (mean: 36.6 \pm 5.34; p<0.03) respectively.

Histopathological analysis of representative tumors from each group of mice revealed a higher number of mitotic figures (yellow arrow) in tumors from REH (52 vs 20, p<0.017) and control clones (52 vs 20, p<0.006) as compared to tumors from KO clones. In KO tumors, but not in REH and control clone tumors, we also observed the "starry sky" (macrophages containing dead apoptotic tumor cells). No other morphological changes between tumors were observed.

ETV6/RUNX1 FUSION GENE PLAYS A KEY ROLE IN THE MAINTENANCE OF ONCOGENIC POTENTIAL OF TUMOR CELLS IN AN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA PRECLINICAL MODEL.

Authors: Adrián Montaña¹, Jose Luis Ordoñez², Maribel Forero-Castro^{1,3}, Verónica Alonso-Pérez², Cristina Robledo¹, Alfonso García de Coca⁴, José Luis Fuster⁵, Natalia de las Heras⁶, Carmen Olivier⁷, María Hernández-Sánchez^{1,8}, Marta Martín¹, Teresa González⁹, Susana Riesco¹⁰, Jordi Ribera-Salas¹¹, Josep-María Ribera¹², Rocío Benito¹, Ignacio García-Tuñón², Jesús María Hernández-Rivas^{1,2,9,13}.

Affiliations: ¹IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC, Cancer Research Center; Salamanca; Spain. ²Unidad de Diagnóstico Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, Spain. ³Escuela de Ciencias Biológicas. Grupo de investigación en Ciencias Biomédicas (GICBUPTC). Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia; Tunja; Boyacá; Colombia. ⁴Servicio de Hematología, Hospital Clínico de Valladolid, Valladolid, Spain. ⁵Servicio de Oncohematología Pediátrica, Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain. ⁶Servicio de Hematología, Hospital Virgen Blanca, León, Spain. ⁷Servicio de Hematología, Hospital General de Segovia, Spain. ⁸Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA. ⁹Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca; Salamanca; Spain. ¹⁰Department of Pediatrics, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain. ¹¹Acute Lymphoblastic Leukemia Group. Josep Carreras Leukaemia Research Institute. Badalona (Barcelona), Spain. ¹²Servicio de Hematología, Institut Català d'Oncologia. Cap del Servei d'Hematologia Clínica ICO-Hospital Germans Trias i Pujol, Josep Carreras Research Institute, Badalona, Spain. ¹³Department of Medicine, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.

Abstract

Objectives: It is not quite clear the role of *ETV6/RUNX1* (*E/R*) fusion gene in the maintenance of the acute lymphoblastic leukemia (ALL), although *E/R* is well-known as a primary event in the development of the disease. Thus, we firstly aimed to analyze the genetic background of *E/R*-positive ALL patients, in order to find concurrent mutations. Secondly as a further functional analysis, we generated an *E/R* KO model by CRISPR/Cas9 to elucidate the contribution of this gene fusion to the oncogenic potential of ALL.

Methods: **1)** An integrative genomic analysis of NGS (*TP53*, *JAK2*, *PAX5*, *LEF1*, *CRLF2* and *IL7R*) and MLPA (ALL-IKZF1-probemix) was developed in 340 B-ALL patients at diagnosis (43 *E/R* positive). **2)** For the generation of *E/R* KO model, CRISPR/Cas9 editing system was used in REH cell line. qPCR and Western Blot were used to check *E/R* mRNA expression and downstream targets expression. In a xenograft model, *E/R* positive cells (right flank) and *E/R* KO cells (left flank) were subcutaneously injected in 16 NSG mice. Excised tumors were sampled just after sacrifice and stained with hematoxylin & eosin.

Results: 1) *E/R*-positive ALL patients showed a silenced mutational landscape, highlighting that neither *TP53* ($p=0,034$) nor *IKZF1* alterations ($p=0,002$) were found in these cases. Alterations in both genes are commonly associated with ALL relapsed patients. 58,8% of *E/R* ALL patients also showed a loss of *ETV6* wild type allele ($p<0,001$). **2)** In the functional studies, a total loss of *E/R* expression was observed in *E/R* KO clones established by single cell. Moreover, a decrease of downstream targets expression levels such as, phospho-Akt (66%), BCL-XL (48%) and BCL-2 (52%) was observed in these clones. *E/R* fusion gene abrogation revealed a significantly decrease of oncogenic potential “in vivo”. Mice injected with *E/R* KO cells did not generated tumors or generated significantly smaller tumors than those generated by *E/R* positive cells.

Conclusion: No gene mutations in the principal driver genes in ALL neither *IKZF1* deletion was observed in our cohort of patients. Avoiding the *E/R* fusion gene expression reduces significantly the oncogenic potential of ALL cells (REH, *E/R* positive) “in vivo”. These results demonstrate that *E/R* by itself plays an important role in the maintenance of the leukemic phenotype. The fusion gene could therefore become a potential therapeutic target specific for these patients with which obtain better response rates.

Grants: SA085U16, SA271P18, GRS 1847/A/18, FUCALHH 2017, IBY17/00006 and AECC grant.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia, *ETV6/RUNX1*, mutational status, CRISPR/Cas9, Genome edition.

8. Título del trabajo: *ETV6/RUNX1* fusion gene has a key role in the maintenance of the leukemic phenotype in acute lymphoblastic leukemia cells

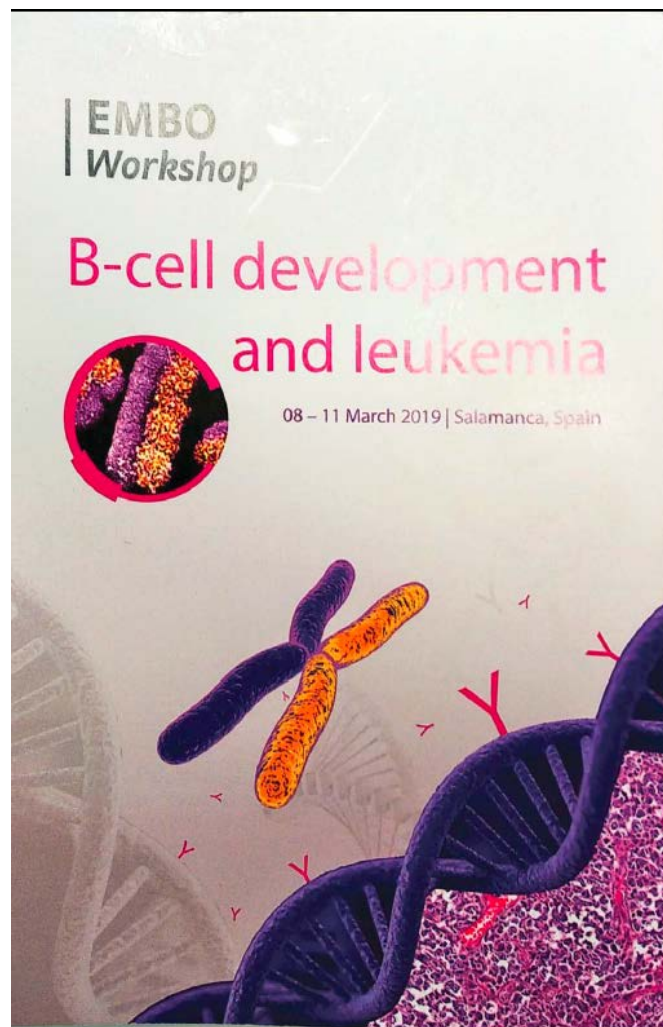
Nombre del congreso: EMBO workshop- B-cell development and leukemia

Ciudad de celebración: Salamanca, Castilla y León, España

Fecha: 08/03/2019-11/03/2019

Entidad organizadora: EMBO

Autores: Adrián Montaña; Jose Luis Ordóñez; Verónica Alonso Pérez; Rocío Benito; Ignacio García Tuñón; Jesús María Hernández Rivas.



ETV6/RUNX1 FUSION GENE HAS A KEY ROLE IN THE MAINTENANCE OF THE LEUKEMIC PHENOTYPE IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CELLS

Adrián Montaña¹, Jose Luis Ordoñez², Verónica Alonso-Pérez², Rocío Benito¹, Ignacio García-Tuñón², Jesús María Hernández-Rivas^{1,2,3,4}

¹ BSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC, Cancer Research Center, Salamanca, Spain

² Unidad de Diagnóstico Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, Spain

³ Dept of Medicine, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

⁴ Dept of Hematology, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

Introduction: The t(12;21)(p13;q22) which fuses ETV6 and RUNX1 genes is the most common genetic abnormality in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL). This fusion is associated with a good prognosis and excellent molecular response to treatment. However, up to twenty per cent of patients will relapse. Recent studies suggest that ETV6/RUNX1 (E/R) plays a role in the initiation of leukemia and is also essential for disease progression and maintenance, through deregulation different molecular pathways that contribute to leukemogenesis, such as the upregulation of PI3K/AKT/mTOR pathway. In this study we used CRISPR/Cas9 system to disrupt the E/R oncogenic fusion in an ALL cell line to evaluated "in vitro" and "in vivo" its contribution to leukemogenesis.

Methods: 1) REH cell line expressing E/R fusion gene was used. Based on CRISPR/Cas9 system, sgRNAs directed towards the fusion gene were designed to produce indels modifying the oncogene ORF and, therefore, the expression of the protein. Cells were electroporated (Amaxa nucleofector, Basilea, Switzerland) and sorting by flow cytometry. 2) E/R mRNA expression and downstream targets expression were checked by qPCR and Western Blot. 3) MTT cell proliferation assays were used to test the cell viability in E/R KO cells and E/R positive cells treated with copanlisib, a PI3K inhibitor, (10nM) and prednisolone (250 µM). 4) In a xenograft model, E/R positive cells (right flank) and E/R KO cells (left flank) were subcutaneously injected in 16 NOD/SCID/IL2 receptor gamma chain null mice. Excised tumors were sampled just after sacrifice and stained with hematoxylin & eosin.

Results: 1) After an effective disruption of the E/R oncogene through genetic editing by CRISPR/Cas9 system, single-edited cell derived cell lines were established to obtain clones with a single mutation that predicted a KO allele for the oncogene. 2) E/R loss of functionality in KO clones was demonstrated. Moreover, a reduction of phospho-Akt (66%), BCL-XL (48%) and BCL-2 (52%) expression levels were observed after E/R depletion 3) Treatment with copanlisib resulted in a cell viability of 35% in E/R KO cells, while E/R positive cells showed a 55% of viable cells (p

Conclusion: Avoiding the E/R fusion gene expression reduces significantly the oncogenic potential of ALL cells (REH, E/R positive) both "in vivo" and "in vitro". E/R KO cells also showed an increased sensitivity to these drugs (copanlisib alone and in combination with prednisolone), suggesting E/R expression could be involved in the prednisolone resistance observed in some patients. These results demonstrating that E/R plays an important role in the maintenance of the leukemic phenotype. The fusion gene could therefore become a potential therapeutic target specific for these patients with which obtain better response rates.

Grants: SA085U16, SA271P18, GRS 1847/A/18, FUCALHH 2017, IBY17/00006 and a grant from the "Junta Provincial de Salamanca - Asociación Española Contra el Cáncer" (AECC).

ETV6/RUNX1 FUSION GENE HAS A KEY ROLE IN THE MAINTENANCE OF THE LEUKEMIC PHENOTYPE IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CELLS

Adrián Montaña¹, Jose Luis Ordoñez², Verónica Alonso-Pérez², Rocio Benito¹, Ignacio García-Tuñón², Jesús María Hernández-Rivas^{1,2,3,4}

¹IBSAL, IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC, Cancer Research Center, Salamanca, Spain; ²Unidad de Diagnóstico Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, Spain; ³Department of Medicine, Universidad de Salamanca, Spain; ⁴Department of Hematology, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain.

1 BACKGROUND

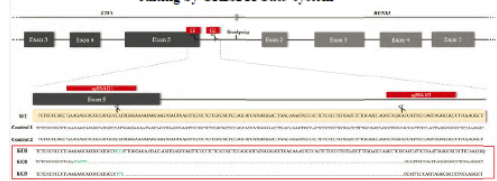
The gene fusion between *ETV6* and *RUNX1* generated by t(12;21)(p13; q22), is the most frequent chromosomal translocation in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Patients carrying this translocation are associated with a good prognosis and excellent molecular response to treatment. However up to 20% of cases relapse. Furthermore, the response to the treatment of some relapse cases is associated by resistance to treatments such as glucocorticoids, and these patients must be treated with stem cell transplantation. Recent studies suggest that *ETV6/RUNX1* (*E/R*) plays a role in the initiation of leukemia and is also essential for disease progression and maintenance, through deregulation different molecular pathways that contribute to leukemogenesis, such as the upregulation of *PI3K/AKT/mTOR* pathway.

Aim

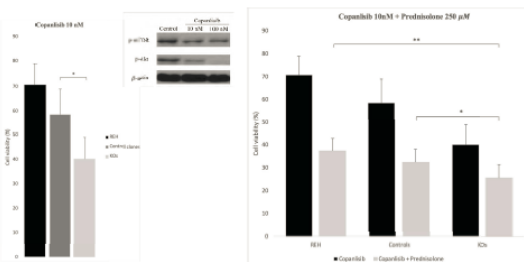
We used CRISPR/Cas9 system to disrupt the *E/R* oncogenic fusion in an ALL cell line to evaluate "in vitro" and "in vivo" its contribution to leukemogenesis.

3 RESULTS

1. Effective disruption of the *ETV6/RUNX1* oncogene through genetic editing by CRISPR/Cas9 system



3. Abrogation of *ETV6/RUNX1* expression enhances sensitivity to the PI3K inhibitor copanlisib

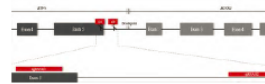


4 CONCLUSIONS

ETV6/RUNX1 fusion gene plays an important role in the maintenance of the leukemic phenotype. The fusion gene could therefore become a potential therapeutic target specific for these patients with which obtain better response rates.

2 METHODS

1. Based on CRISPR/Cas9 system, sgRNAs directed towards the fusion gene were designed (G1 and G2). REH cell line expressing *E/R* fusion gene were electroporated (Amaza nucleofactor, Basilea, Switzerland) and sorting by flow cytometry.

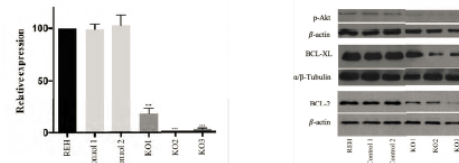


2. qPCR and Western Blot were used to check *E/R* mRNA expression and downstream targets expression.

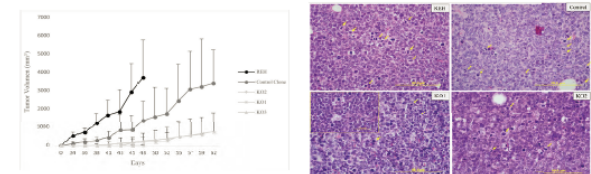
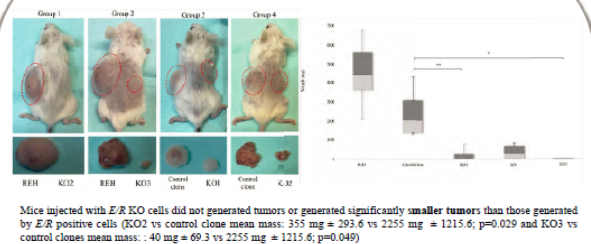
3. *E/R* KO cells and *E/R* positive cells were treated with copanlisib, a PI3K inhibitor, (10nM) and prednisolone (250 µM). Cell viability was measured by MTT cell proliferation assay.

4. In xenograft model, *E/R* positive cells (right flank) and *E/R* KO cells (left flank) were subcutaneously injected in 16 NOD/SCID IL2 receptor gamma chain null mice. Excised tumors were sampled just after sacrifice and stained with hematoxylin & eosin.

2. CRISPR/Cas9 edited lymphoid cell line showed a loss of *ETV6/RUNX1* functionality



4. *ETV6/RUNX1* expression impairs the tumorigenic capacity in vivo



Tesis doctoral “Molecular Characterization of B-Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL): Genomic and functional analysis of Acute Lymphoblastic Leukemia and an *in vitro* model of targeted genetic modification.

Institución: Universidad de Salamanca. **Investigador:** Adrián Montaña Brioso. **Estado:** Finalizado.
fecha de defensa: noviembre 2020.

Department of MEDICINE, HEMATOLOGY
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER-IBMCC
(USAL-CSIC)



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE
Doctoral Dissertation

Molecular Characterization of B-Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL):

Genomic and functional analysis of Acute Lymphoblastic Leukemia and
an *in vitro* model of targeted genetic modification

Promotor:

Prof. Dr. Jesús María Hernández Rivas

Supervisor:

Dra. M del Rocío Benito Sánchez

Dra. Teresa Gonzáles Martínez

Adrián Montaña Brioso

November 2020

This Thesis was performed being Adrián Montaña Brioso fully supported by a predoctoral grant of the "Junta Provincial de la Asociación Española Contra el Cáncer de Salamanca (AECC-JP Salamanca)".

Acknowledgments:

- Asociación Española Contra el Cáncer -Junta Provincial de Salamanca (AECC-JP Salamanca).
 - Consejería de Educación, Junta de Castilla y León, Fondos FEDER (SA085U16, SA271P18).
 - Regional Council of Castilla y León SACYL, (GRS 2062/A/19, GRS 1847/A/18).
 - Fundación Castellano Leonesa de Hematología y Hemoterapia (FUCALHH 2017).
 - Proyectos de investigación en Biomedicina, gestión sanitaria y atención sociosanitaria del IBSAL (IBY17/00006)
 - Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC CB16/12/00233).
 - SYNtherapy. Synthetic Lethality for Personalized Therapy-based Stratification In Acute Leukemia (ERAPERMED2018-275)
-

Certificado de asistencia

A favor de

Rocío Benito Sánchez

Por su asistencia al 2º WORKSHOP LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA,

celebrado en Madrid el día 17 de enero de 2019



Dr. Josep María Ribera Santasusana

Coordinador

CERTIFICADO DE ASISTENCIA

Por la presente certificamos que

ANA EUGENIA RODRIGUEZ VICENTE

ha asistido al

II Congreso Interdisciplinar de Genética Humana

celebrado en el Hotel Novotel Madrid Center de Madrid, los días 2 al 5 de abril de 2019.

Y para que conste donde convenga, se expide el presente certificado en Madrid a 5 de abril de 2019.



CERTIFICADO

a favor de:

DRA. ANA EUGENIA RODRIGUEZ VICENTE

por su asistencia a la

9^a Reunión Anual GELLC

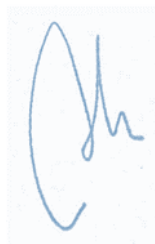
De la investigación básica al tratamiento de la
leucemia linfocítica crónica

celebrado en Madrid, el día 1 de marzo de 2019.

Con una duración de 7 horas.



M.ª José Terol Casterá



Francesc Bosch Albareda

Coordinadores 9^a Reunión Anual GELLC



ESPT

European Society of Pharmacogenomics and Personalised Therapy
A Scientific Society for Individualised Medicine



CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This certificate testifies that

ANA EUGENIA RODRÍGUEZ VICENTE

has proficiently attended the

5th ESPT Congress

on Precision Medicine and Personalised Health

held in Seville

from 16th to 18th October 2019

Prof. Dr. Miquel Taron – President SEFF

Dr. Cristina Rodríguez-Antona – Secretary SEFF

Prof. Dr. Adrián Llerena – Vice-president SEFF, Board ESPT

Prof. Dr. Ron van Schaik – President ESPT



4º WORKSHOP [virtual]
**LEUCEMIA AGUDA
LINFOBLÁSTICA**
26 y 27 de mayo de 2021

Certificado de asistencia

A favor de

M ROCIO BENITO SÁNCHEZ

Por su participación en el
4º WORKSHOP [VIRTUAL] LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA.
(5,30 H. Lectivas)

celebrado los días 26 y 27 de mayo de 2021

Dr. Josep María Ribera Santasusana
Coordinador