

CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER-IBMCC



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

Tesis Doctoral

Caracterización de mutaciones en genes de splicing y las células mesenquimales mediante la secuenciación masiva en pacientes con síndromes mielodisplásicos

Supervisores:

Prof. Dr. Jesús M. Hernández Rivas

Dra. María Díez Campelo

Dra. María Abáigar Alvarado

Kamila Janusz

2019



Índice

Introducción	7
1. Síndromes mielodisplásicos – Visión general	9
1.1 Epidemiología	9
1.2 Etiología	9
1.3 Diagnóstico	9
1.4 Clasificación	10
1.4.1 Clasificación de los SMD en relación con el pronóstico	13
2. SMD: Anomalías genéticas	14
2.1 Citogenética en pacientes con MSD	14
2.2 Perfil molecular de los SMD	15
2.2.1 Mutaciones en la maquinaria de splicing	17
3. SMD: Micromedioambiente	19
3.1 Células mesenquimales en individuos sanos	20
3.2 Células mesenquimales en SMD	21
3.2.1 Células Mesenquimales: Citogenética	21
3.2.2 Células Mesenquimales: Características moleculares	21
4. Aplicación de la secuenciación masiva en los estudios de los SMD	22
Hipótesis	27
Objetivos	31
Resultados:	35
Capítulo 1: La combinación de la secuenciación convencional y la secuenciación masiva de genes de splicing: una herramienta complementaria en el diagnóstico de SMD con sideroblastos en anillo	39
Capítulo 2: Análisis de las mutaciones somáticas concurrentes con <i>SF3B1</i> en los pacientes con Síndromes Mielodisplásicos y su implicación clínica, biológica y pronóstica	47
Capítulo 3: Análisis mutacional de las células mesenquimales (CSM) en pacientes con síndromes mielodisplásicos (SMD)	65
Discusión general	81
Conclusiones	89

Referencias	95
Material suplementario	109
Lista de Tablas y Figuras	119
Abreviaciones	123

Introducción

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) es un conjunto heterogéneo de enfermedades clonales de las células progenitoras hematopoyéticas [1]. Se caracterizan por una hematopoyesis ineficaz, displasia de al menos un linaje hematopoyético, médula ósea (MO) hiper celular y citopenias en sangre periférica (SP), con un mayor riesgo de transformación a leucemia aguda mieloblástica (LAM) [2-6]. La enfermedad suele aparecer en personas mayores de 60 años con prevalencia en varones. [7, 8]

Existen diferentes factores de riesgo que pueden contribuir al desarrollo de los SMD. Entre ellos se incluyen: edad avanzada, sexo masculino y agentes ambientales como el benceno, la radiación ionizante, el exceso de alcohol y el consumo de tabaco [9, 10]. Además, la exposición a la radiación o la quimioterapia puede ser la causa de los SMD secundarios [3]. [1, 11].

Los SMD son un grupo muy heterogéneo de enfermedades, por lo que el diagnóstico suele ser complicado. Sin embargo, generalmente la sospecha de SMD está basada en la presencia de citopenia en un análisis de rutina de SP [12]. Generalmente los SMD presentan anemia (hemoglobina $<10\text{g/dL}$), trombocitopenia (plaquetas $<50 \times 10^9/\text{L}$) y/o neutropenia (neutrófilos $<1.8 \times 10^9/\text{L}$) [13]. Además, para confirmar el diagnóstico de SMD, se realiza una evaluación morfológica de un frotis de SP y aspirado de MO [14]. La MO en los pacientes con SMD es hiper celular con displasia en uno o más linajes y se considera cuando afecta $\geq 10\%$ de las células [15-19]. En pacientes donde las citopenias son moderadas y la displasia medular es leve, se considera los análisis citogenéticos (cariotipo y FISH), la aplicación de citometría de flujo, y los análisis mutacionales para definir mejor los subtipos de SMD y el pronóstico de estos pacientes [12, 20-22]. Además para una clasificación correcta debe evaluarse la proporción de blastos en MO [23].

Existen dos sistemas de clasificación de los pacientes con SMD. La clasificación FAB (French American British) establecida en 1982, está basada en el porcentaje de blastos de la MO y SP, el número de monocitos en la SP y el porcentaje de sideroblastos en anillo. Distingue cinco subtipos [24]. En 2001 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una nueva clasificación para las neoplasias mieloides. Aparte de las características morfológicas consideradas anteriormente, la OMS consideró

características genéticas, inmunofenotípicas, biológicas y clínicas [25]. Un alto número de estudios de investigación realizados posteriormente contribuyó en la actualización EN 2008 de la clasificación de la OMS [26]. La última actualización del sistema de clasificación de los SMD se publicó en el año 2016, permitiendo un diagnóstico y una evaluación de riesgos más precisos. Este nuevo sistema de clasificación se basó, como antes, en las características clínicas, la morfología, y la citogenética, pero incluyeron por primera vez información del análisis mutacional. El estado mutacional de *SF3B1* se incluyó para definir el subgrupo de SMD con sideroblastos en anillo (SMD-SA) [27]. Todos los pacientes incluidos en esta tesis doctoral, fueron clasificados según los criterios de la OMS 2008 con la excepción de los casos con CRDM-SA, que se mantuvieron como una categoría separada de acuerdo con la OMS 2001.

Al momento del diagnóstico el 40-70% de los enfermos presentan alteraciones citogenéticas. Las más frecuentes son la delección de 5q, la monosomía 7 o delección 7q, la trisomía 8 y la delección de 20q. Las pérdidas del brazo largo del cromosoma 5 son los cambios citogenéticos más frecuentes en los SMD y se pueden observar aisladas o acompañadas de otras alteraciones [28].

La aplicación de las técnicas de la secuenciación masiva (genoma completo, exoma completo y secuenciación dirigida) durante la última década en el estudio de un gran número de pacientes con diversas neoplasias hematológicas, incluidos los SMD, permitió la identificación del perfil mutacional de esos pacientes, proporcionando nuevos conocimientos sobre la fisiopatología de los SMD [21]. Aproximadamente el 90% de los enfermos con SMD tienen mutaciones en genes reguladores epigenéticos (*TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *EZH2*), factores de transcripción (*RUNX1*, *TP53*, *ETV6*), genes implicados en la traducción (*NRAS*, *KRAS*, *JAK2*, *CBL*) o genes de splicing (*SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *SRSF2*) [29-31].

La presencia de alguna de estas mutaciones tiene valor pronóstico para los pacientes con SMD. Así, las mutaciones en los genes *TP53*, *ASXL1*, *RUNX1*, *EZH2* y *ETV6* presentan un pronóstico desfavorable, mientras que las mutaciones en *SF3B1* se correlacionan con un mejor pronóstico [31, 32].

El gen *SF3B1* (splicing factor 3b, subunit 1) conocido también como *SF3b155* o *SAP155* está situado en el brazo largo del cromosoma 2 (2q33) y forma parte del complejo del

spliceosoma U2 [33, 34]. Los estudios de secuenciación masiva han revelado que aproximadamente el 30% de los SMD presentan mutación del gen *SF3B1*, con una prevalencia particularmente alta en los pacientes con sideroblastos en anillo (SA) lo que fue reflejado en la nueva clasificación OMS 2016 classification, como se ha comentado previamente [27, 32, 35]. Habitualmente las mutaciones están localizadas en los codones 622, 625, 662, 666 y 700 y todas ellas se relacionan con un buen pronóstico [32, 36].

Actualmente, múltiples grupos están estudiando el papel pronóstico de las mutaciones somáticas en los SMD. Parece ya esclarecido el papel pronóstico favorable o desfavorable de muchas de las mutaciones cuando se presentan de forma aislada, pero actualmente no está aún bien definido el pronóstico cuando estas se presentan de forma conjunta [37, 38]. Este aspecto es importante teniendo en cuenta que más del 40% de los pacientes presentan al menos dos mutaciones al momento del diagnóstico [29].

Se ha demostrado que no solo las células hematopoyéticas, sino también el microambiente son anormales en pacientes con SMD [39-42]. Las células mesenquimales (CM) representan un componente clave del microambiente. Friedenstein fue el primero que identificó estas células multipotentes e indiferenciadas, capaces de auto-renovarse y diferenciarse en distintos linajes celulares, incluidos adipocitos, osteocitos y condrocitos [39, 43-45]. A pesar de su baja frecuencia en la MO, estas participan además en todos los mecanismos relacionados con la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas, contribuyendo así a una correcta hematopoyesis [46, 47]. Sin embargo, su papel en el desarrollo de los SMD no está claro y genera cierta controversia [48-51].

Las técnicas de la secuenciación de masiva o Next Generation Sequencing (NGS) como las aplicadas en esta tesis doctoral se han convertido en los últimos años en una herramienta esencial para el estudio de enfermedades hematológicas y no hematológicas [52-58]. Todas estas tecnologías aplican diferentes estrategias de enriquecimiento y amplificación clonal del ADN que permiten secuenciar millones de cadenas de ADN en paralelo. La secuenciación masiva en paralelo facilita la secuenciación de alto rendimiento con una reducción significativa en los costes [59-

62]. Para analizar regiones seleccionadas del genoma con NGS, hay esencialmente dos estrategias. La primera es la secuenciación masiva a través de amplicones. Se basa en una reacción de PCR y en la purificación de las regiones de interés utilizando conjuntos de oligos multiplexados [63]. Esa estrategia de secuenciación se utilizó en el primer capítulo de esta tesis. El segundo tipo de NGS implica la captura de secuencia y se aplicó en la segunda y tercera parte de esta tesis (Resultados: Capítulo 2 y 3).

Concretamente, los análisis de NGS se han incluido en los últimos años en una gran cantidad de estudios de SMD [56, 64-67]. El descubrimiento del perfil mutacional en los SMD ha permitido una mejor caracterización de estos pacientes [27, 29, 30]. Además ayudó en la mejor estimación del pronóstico y una elección más adecuada del tratamiento [31, 68, 69]. Sin embargo es necesaria la continuación en investigación molecular para proporcionar nuevos conocimientos moleculares que ayuden a comprender y tratar mejor la enfermedad.

Capítulo 1

La combinación de la secuenciación convencional y la secuenciación masiva de genes de splicing: una herramienta complementaria en el diagnóstico de SMD con sideroblastos en anillo

Kamila Janusz^{1,2*}, Mónica del Rey^{1,2*}, María Abáigar^{1,2}, Rosa Collado³, David Ivars³, María Hernández^{1,2}, Alberto Valiente⁴, Cristina Robledo^{1,2}, Rocío Benito^{1,2}, María Díez-Campelo^{2,5}, Fernando Ramos⁶, Alexander Kohlmann⁷, Consuelo del Cañizo^{2,5} and Jesús María Hernández-Rivas^{1,2,5}

* These authors contributed equally to this work.

¹BMCC, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CSIC, Spain.

²IBSAL, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca, Spain.

³Hospital General Universitario de Valencia, Spain.

⁴Complejo Hospitalario de Navarra, Spain. ⁵Hospital Universitario de Salamanca, Spain. ⁶Hospital Virgen Blanca, León, Spain.

⁵Hematología, Hospital Universitario de Salamanca,

⁶Hematología, Hospital Universitario de León,

⁷AstraZeneca, Personalized Healthcare and Biomarkers, Innovative Medicines and Early Development, Cambridge, UK

Objetivo: Analizar la presencia de mutaciones en *SF3B1* y otros genes de *splicing* (*SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*) en los SMD-SA mediante la combinación de la secuenciación convencional Sanger y la secuenciación masiva y determinar la viabilidad de estos métodos en el diagnóstico clínico.

Material y métodos: Se analizaron un total de 122 muestras de médula ósea de pacientes con SMD-SA. Inicialmente, los exones 14 y 15 del gen *SF3B1* se analizaron mediante la secuenciación Sanger. En el segundo paso, aplicando la secuenciación masiva se analizaron, además de *SF3B1*, otros genes de *splicing* (*SRSF2*, *U2AF1* y *ZRSR2*).

Resultados: En el primer paso al analizar los exones más frecuentemente mutados de *SF3B1* (exón 14 y 15) mediante la secuenciación convencional, 99 pacientes presentaron mutaciones (81,1%). La aplicación de la secuenciación masiva permitió detectar 6 casos más. Por tanto, un total de 105 pacientes (86,1%) tenían mutaciones en *SF3B1*. No se observaron diferencias en la incidencia de mutaciones entre ARSA y CRDM-SA. De todas las mutaciones 42,2% estaban localizadas en el exón 14 mientras que el 55% afectaban al exón 15. La mutación más frecuente fue el cambio de lisina al ácido glutámico en el codón 700 (57,1%). Las mutaciones en los codones 623 (p.Tyr623Phe), 658 (p.Trp658Ser), 740 (p.Gly740Glu), 742 (p.Gly740Asp) y 748 (p.Lys748Glu) aparecieron en menos de 5% de casos (Figura 1). Además, al analizar la presencia de mutaciones en otros 3 genes de *splicing* 12 pacientes presentaron alteraciones en *SRSF2* (14,6%), 3 en *U2AF1* y 1 en *ZRSR2* (3,7% y 1,2%, respectivamente), (Tabla 1). Cabe destacar que el 8,7% de pacientes presentaron mutaciones dobles: 2 mutaciones en *SF3B1* (n=4), *SF3B1+SRSF2* (n=5) y *SRSF2+U2AF1* (n=1). Esos pacientes tenían características clínicas similares al resto de los pacientes (datos no incluidos). No se observó mutación en ninguno de los 4 genes de *splicing* en 5,7% de pacientes. Sin embargo, no había diferencias en las características clínicas de esos pacientes en comparación con el resto de los casos.

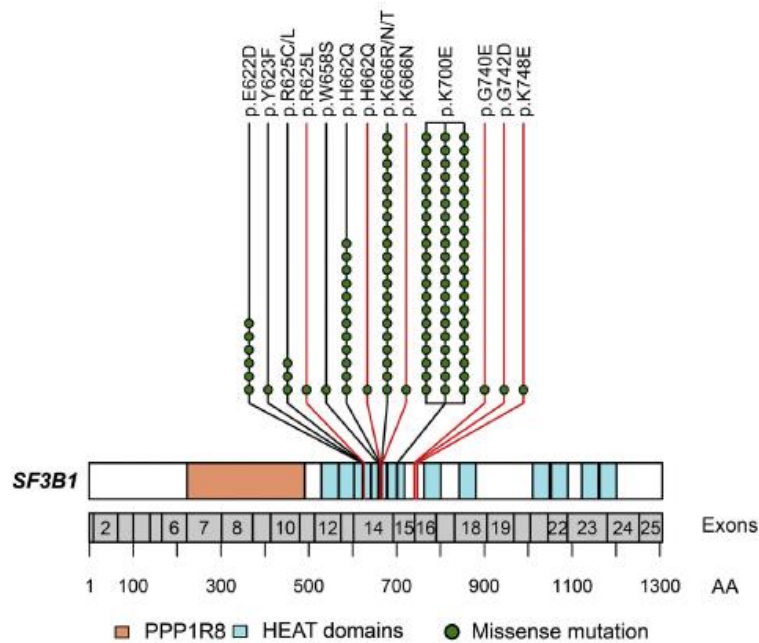


Figura 1. Distribución de las mutaciones en *SF3B1* en los SMD-SA. Se detectaron mutaciones de *SF3B1* en los exones 14, 15 y 16. La mutación más frecuente fue p.Lys700Glu, que representa el 57,1% de todas las alteraciones. Cada mutación detectada por secuenciación de Sanger se muestra con una línea negra. Cada mutación detectada por secuenciación masiva está representada con una línea roja. Cada círculo verde representa una mutación *missense* encontrada en un solo paciente.

Tabla 1. Mutaciones en los genes *SRSF2*, *U2AF1* y *ZRSR2* detectadas en los pacientes con SMD-SA.

Case number	MDS subtype	Affected gene	Amino acid change	VAF by NGS
1	RARS	<i>SRSF2</i>	p.Pro95Arg	33%
2	RARS	<i>SRSF2</i> ^a	p.Pro95Arg	42%
3	RARS	<i>SRSF2</i> ^a	p.Pro95Arg	14%
4	RARS	<i>SRSF2</i>	p.Pro95His	33%
5	RARS	<i>SRSF2</i> ^a	p.Pro95His	35%
6	RARS	<i>SRSF2</i>	p.Pro95Leu	30%
7	RARS	<i>SRSF2</i> ^a	p.Pro95Leu	12%
8	RCMD-RS	<i>SRSF2</i>	p.Pro95_103delinsArg	30%
9	RCMD-RS	<i>SRSF2</i>	p.Pro95His	45%
10	RCMD-RS	<i>SRSF2</i>	p.Pro95His	30%
11	RCMD-RS	<i>SRSF2</i> ^a	p.Pro95His	15%
12	RCMD-RS	<i>SRSF2</i>	p.Pro95Leu	27%
13	RCMD-RS	<i>U2AF1</i> ^a	p.Gln157Arg	40%
14	RCMD-RS	<i>U2AF1</i>	p.Gln157Pro	31%
15	RARS	<i>U2AF1</i>	p.Ser34Phe	49%
16	RARS	<i>ZRSR2</i>	p.Phe287Leufs*18	53%

RARS-> ARSA (anemia refractaria con sideroblastos en anillo); RCMD-RS-> CRDM-SA (citopenia refractaria con displasia multilinea con sideroblastos en anillo). ^apacientes con mutación en *SF3B1*

Capítulo 2

Análisis de las mutaciones somáticas concurrentes con *SF3B1* en los pacientes con Síndromes Mielodisplásicos y su implicación clínica, biológica y pronóstica

Kamila Janusz¹, Marta Martín Izquierdo¹, Félix López Cadenas², Fernando Ramos³, Jesús María Hernández Sánchez¹, Eva Lumbreras¹, Cristina Robledo¹, Javier Sánchez del Real³, Rosa Collado⁴, Teresa Bernal⁵, Carme Pedro⁶, Andrés Insunza⁷, Raquel de Paz⁸, Blanca Xicoy⁹, Eduardo Salido¹⁰, Joaquín Sánchez García¹¹, Sandra Santos Mínguez¹, Cristina Miguel García¹, Ana María Simón Muñoz¹, Jesús María Hernández Rivas^{1,2}, María Abáigar¹, María Díez Campelo²

¹ Unidad de Diagnóstico Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer-Universidad de Salamanca (IBMCC, USAL-CSIC); Genética Molecular en Oncohematología, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL),

² Hematología, Hospital Universitario de Salamanca,

³ Hematología, Hospital Universitario de León,

⁴ Hematología, Hospital Clínico de Valencia, Valencia,

⁵ Hematología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo,

⁶ Hematología, Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM), Barcelona,,

⁷ Hematología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander,

⁸ Hematología, Hospital Universitario de la Paz, Madrid,

⁹ Hematología, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Instituto Catalán de Oncología (ICO), Badalona,

¹⁰ Hospital Universitario de Canarias, Universidad La Laguna

¹¹ Hematología, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba

Objetivo: Analizar la concurrencia de mutaciones en el gen *SF3B1* con otras mutaciones y sus consecuencias en el fenotipo clínico-biológico y pronóstico de la enfermedad en los pacientes SMD de muy bajo, bajo o riesgo intermedio.

Material y métodos: Se analizó el perfil mutacional de un total de 324 muestras de SMD, mediante secuenciación masiva (NGS), con un panel de captura de 117 genes relacionados con neoplasias mieloides (*Nextera Rapid Capture Custom Enrichment, illumina*). Para este estudio, se seleccionaron un total de 135 SMD que presentaban mutación de *SF3B1*.

Resultados: Se analizaron finalmente 102 SMD que presentaron in IPSS-R muy bajo, bajo o intermedio y mutación en *SF3B1*. Las características de la serie se encuentran recogidas en la tabla 1. Veinte (19,6%) presentaron esta mutación de forma aislada, mientras que el resto de los casos (80,4%) presentaron mutaciones adicionales en otros genes, con una mediana de 2 mutaciones adicionales por paciente (rango 0-5). Los genes más frecuentemente mutados concomitantes a *SF3B1* fueron: *TET2* (39,2%), *DNMT3A* (25,5%), *SRSF2* (10,8%), *CDH23* (5,9%) y *ASXL1*, *CUX1*, *KMT2D* (4,9% cada uno).

La mediana de seguimiento fue de 54 meses. Observamos que la presencia de ≥ 2 mutaciones concurrentes tenía un impacto desfavorable en la supervivencia frente a aquellos casos con mutación de *SF3B1* aislado o con < 2 mutaciones ($p=0,007$; medianas de 54 vs. 87, respectivamente) (Fig.1A). De manera similar, con respecto a las mutaciones con impacto en la supervivencia, observamos que la concurrencia de *SF3B1mut* con *SRSF2mut* determinó peor pronóstico que *SF3B1mut* con *SRSF2wt* ($p=0,001$; medianas de 27 vs. 75, respectivamente) (Fig.1B). El efecto adverso similar se observó cuando mutaban *SF3B1* y *IDH2* frente a *SF3B1mut*

y *IDH2wt* (mediana de SG de 11 vs. 75 meses, respectivamente, $p = 0,001$), (Figura 3C) y *SF3B1mut* y *BCORmut* frente *SF3B1wt* y *BCORwt* (mediana de SG de 11 vs. 71 meses, respectivamente, $p = 0,036$) (Figura 3D). Cabe destacar que la combinación de *SF3B1mut* con *NUP98mut* y *SF3B1mut* con *STAG2mut* también tuvieron un efecto negativo en el pronóstico de los pacientes (medianas de 27 y 11 frente a 71 meses, respectivamente, $p = 0,008$ y $p = 0,002$) (Figuras 3E y 3F).

Tabla 1. Características clínicas de la serie incluida en el estudio

	N=102	%	Mediana (rango)
Edad			76 [41-90]
Sexo			
Mujer	45	44,6	
Hombre	56	55,4	
OMS 2008			
ARSA	36	35,3	
CRDU	6	5,9	
CRDM	60	58,8	
IPSS-R			
Muy bajo	33	33	
Bajo	58	58	
Intermedio	5	5	
NA(Muy bajo/Bajo)	2	2	
NA (Bajo/Intermedio)	2	2	
Status			
Vivo	41	40,2	
Exitus	61	59,8	
Nivel de hemoglobina (g/dL)			9,6 [5,4-13]
Recuento de neutrófilos ($\times 10^9/L$)			2,7 [0,6-8,7]
Recuento de plaquetas ($\times 10^9/L$)			251 [34-878]

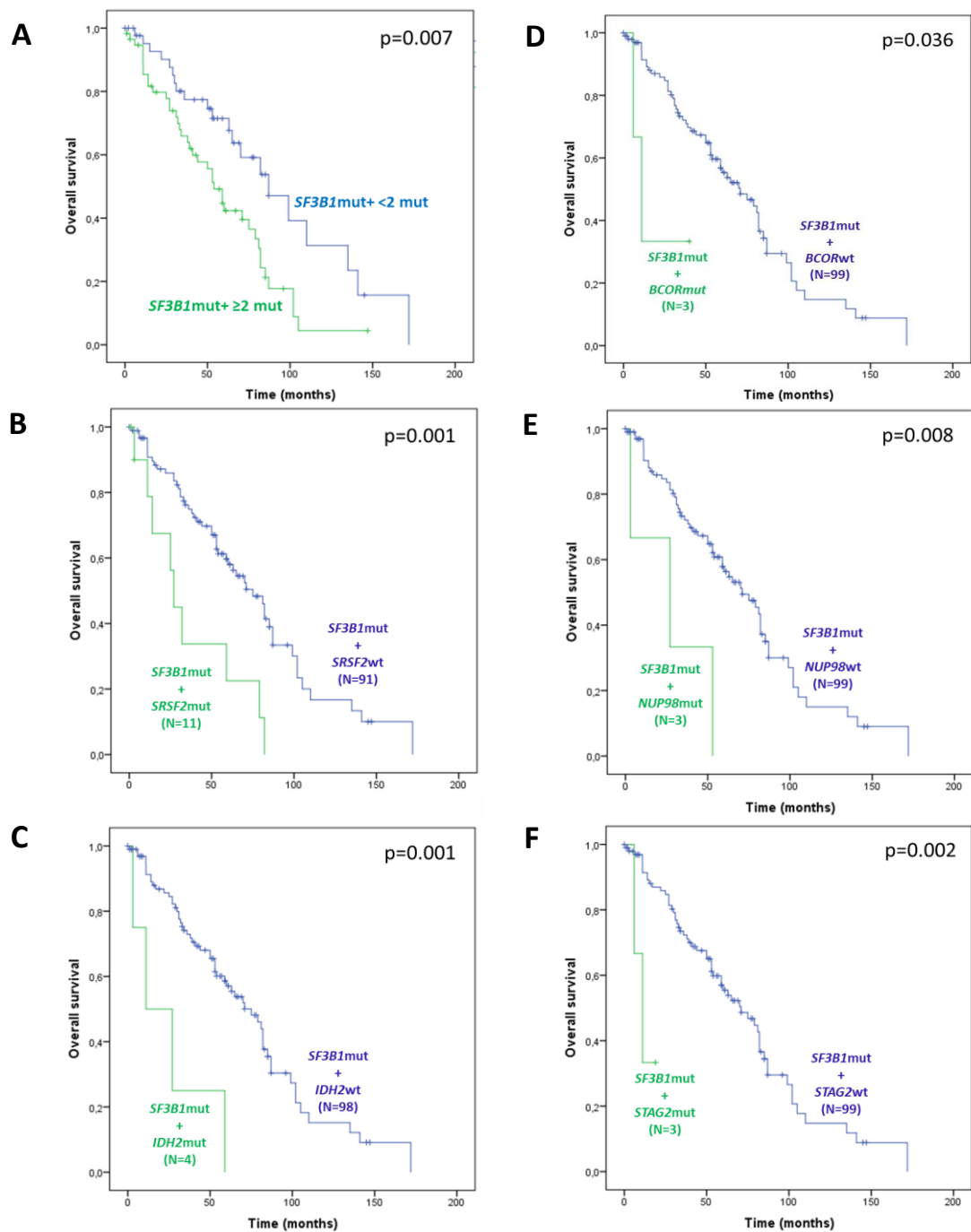


Figura 1. Supervivencia global de pacientes con MDS *SF3B1mut* con respecto al número de mutaciones concomitantes **(A)**, coexistencia de *SRSF2mut* **(B)**, co-ocurrencia de *IDH2mut* **(C)**, co-ocurrencia de *BCORmut* **(D)**, co-ocurrencia de *NUP98mut* **(E)** *STAG2mut* co-ocurrencia **(F)**.

Capítulo 3

Análisis mutacional de las células mesenquimales (CSM) en pacientes con síndromes mielodisplásicos (SMD)

Kamila Janusz^{1,2}, Sandra Muntion^{2,3}, Jesús María Hernández-Sánchez^{1,2}, Marta Martín Izquierdo^{1,2}, María Hernández-Sánchez^{1,2}, María Abáigar^{1,2}, Cristina Robledo^{1,2}, Félix López-Cadenas^{2,3}, Mónica del Rey^{1,2}, Juan Carlos Caballero^{2,3}, Rocío Benito^{1,2}, Alba Redondo Guijo^{2,3}, Tamara Jimenez^{2,3}, David Pescador⁴, Juan Blanco⁴, Fermín Sánchez-Guijo^{2,3}, Consuelo del Cañizo^{2,3}, María Díez-Campelo^{2,3} and Jesús María Hernández-Rivas^{1,2,3}

¹IBMCC, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CSIC.

²IBSAL, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca.

³Hematología, Hospital Universitario de Salamanca.

⁴Traumatología, Hospital Universitario de Salamanca.

Objetivo: Analizar el perfil mutacional de las CSM de 58 pacientes con SMD, aplicando la secuenciación de última generación (NGS), compararla con las alteraciones genéticas en las células mononucleadas (CMN) de los mismos pacientes y evaluar su posible función en los SMD.

Material y métodos: Se ha incluido un total de 58 pacientes con SMD. Las CMN se aislaron de la médula ósea de los pacientes con SMD y se cultivaron en condiciones estándar hasta el tercer pase para obtener las CSM. Se analizó el perfil mutacional de las CSM y de las CMN del mismo paciente mediante secuenciación masiva, con un panel de captura de 117 genes relacionados con neoplasias mieloides (*Nextera Rapid Capture Custom Enrichment, illumina*). La validación de las mutaciones se realizó mediante la secuenciación de Sanger o la re-secuenciación de un producto de PCR independiente con el sistema Illumina utilizando una estrategia de amplicón dirigido.

Resultados: En el análisis mutacional detectó un total de 107 mutaciones en 44 genes en muestras de CSM y CMN de 58 SMD. En las CMN se observó la presencia de 96 mutaciones (89.7%), que afectaban a 40 genes. Los genes más frecuentemente mutados fueron *TET2* (31%), seguido de *SF3B1* (17.2%), *SRSF2* (13.8%), *TP53* (13.8) y *DNMT3A*, *EZH2*, *RUNX1*, *STAG2* (10.3% cada uno), (Figura 1), con un valor medio de VAF del 34,1%. En las CSM se observó la presencia de 11 mutaciones, en un total de 10 genes y un VAF medio de 8.31%. Seis de los diez genes afectados (60%) las CSM fueron comunes con los genes mutados en las CMN, mientras que 4 genes sólo aparecían mutados en las CSM (Figura 1). Ningún enfermo tenía la misma mutación en las CSM y en las CMN (Figura 2). La mediana del número de alteraciones por paciente fue 1 (0-7) en caso de las CMN y 0 (0-4) en las CSM. El 51% de las mutaciones de las CMN se han descrito previamente, siendo el 83.7% de ellas en cáncer hematológico. Por el contrario, todas las mutaciones de las CMS excepto *ETV6* (p.R105G) no se habían descrito previamente. Cabe destacar que no observamos ningún patrón mutacional específico en las CSM. Ningún enfermo con el diagnóstico de citopenia refractaria con displasia multilinea (CRDM) o SMD con del (5q) aislada presentó ninguna alteración en las CMN (Figura 2). Todas las características clínicas, biológicas y la supervivencia global de los pacientes con SMD que tenían mutaciones en las CSM fueron similares al grupo que no tenía mutaciones (Tabla 1, Figura 3).

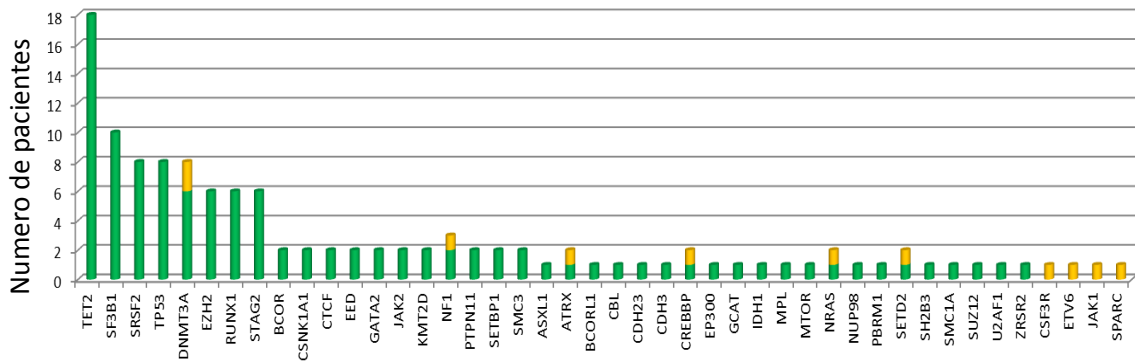


Figura 1. Cuarenta y cuatro genes mutados en cincuenta y ocho pacientes de SMD. La comparación de la frecuencia de genes mutados entre las células mononucleadas (CMN,) y en las células mesenquimales (CSM,)

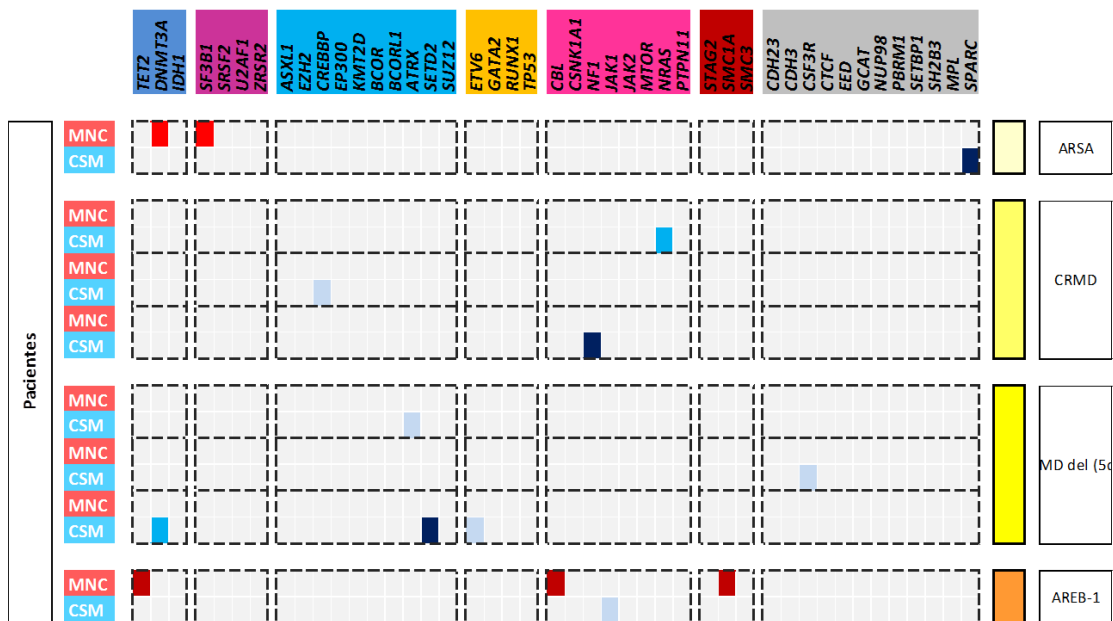


Figura 2. Comparación de las mutaciones en las CSM con las mutaciones en la muestra pareada de las MNC en ocho casos con alteraciones en las CSM. Cada columna corresponde a un gen, cada línea doble corresponde a muestra pareada de un paciente. Los colores dentro de la tabla representan el nivel VAF de las mutaciones: / $\geq 5 < 10\%$; / $\geq 10 < 20\%$; / $\geq 20\%$.

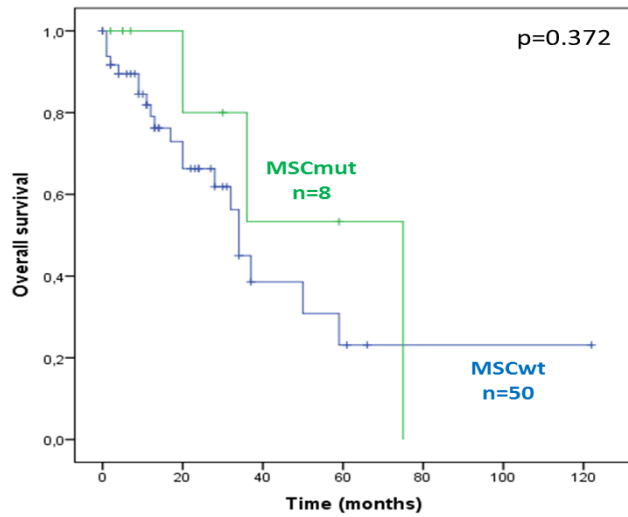


Figura 3. Supervivencia global de pacientes SMD con las CSM mutadas y no mutadas.

Tabla 1. Comparación de los valores medios de varias características clínicas entre pacientes con CSM no mutada (wt) y CSM mutada (mut).

	CSM wt	CSM mut	p
Edad	74.5	74.5	0.703
Hb (g/dL)	9.9	10	0.743
ANC ($\times 10^9/L$)	1.66	2.2	0.05
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	140	196	0.664

Conclusiones

1. La secuenciación masiva puede identificar nuevas mutaciones no detectables por secuenciación convencional. Todas las mutaciones detectadas por secuenciación Sanger fueron identificadas por secuenciación masiva. La presencia de mutaciones en *SRSF2*, *U2AF1* y *ZRSR2* en SMD-SA sugiere la posibilidad de la aparición de mutaciones en genes de *splicing*, distintos a *SF3B1*. Los pacientes que no presentaron ninguna mutación en los genes de *splicing* analizados no tenían características clínicas o biológicas diferentes del resto de los SMD-SA y podrían presentar alteraciones en otros genes de *splicing* no incluidos en el estudio. El uso combinado de la secuenciación convencional y la secuenciación masiva en análisis de genes de *splicing* es asequible y revela mutaciones en casi todos los pacientes con SMD-SA.
2. Los análisis de la secuenciación masiva revelaron que la gran mayoría de los pacientes con mutación en *SF3B1* de riesgo muy bajo, bajo o intermedio (80.4%) tienen al menos una mutación adicional. La existencia de dos o más mutaciones adicionales al *SF3B1* se asocia con un impacto clínico adverso acortando la supervivencia global de los pacientes con SMD de riesgo muy bajo, bajo o intermedio. Del mismo modo, entre la heterogeneidad de las mutaciones genéticas coexistentes con *SF3B1*, la presencia de *SRSF2*, *IDH2*, *BCOR*, *NUP98* o *STAG2*, aunque no influyó en las características clínicas, afectó negativamente la supervivencia de estos pacientes.
3. Más de la mitad de los pacientes con mutación en *SF3B1* de riesgo muy bajo, bajo o intermedio tenían mutaciones en genes CHIP (*DNMT3A*, *TET2* y/o *ASXL1*). Aunque no se observó ningún efecto de la co-ocurrencia de las mutaciones en *SF3B1* con estos genes, su existencia podría ser desempeñar un papel en el inicio de la hematopoyesis clonal que evoluciona hacia un SMD.
4. El estudio mutacional completo en pacientes de SMD de riesgo muy bajo, bajo o intermedio, que tienen sideroblastos en anillo podría permitir una mejor evaluación pronóstica de la enfermedad y podría condicionar la influencia positiva de las mutaciones aisladas de *SF3B1* en estos pacientes. Este enfoque permitiría una mejor estratificación para alcanzar las opciones terapéuticas adecuadas para cada paciente.
5. El análisis del perfil mutacional de las CSM de pacientes con SMD reveló que el 13.8% de los casos presentaron alteraciones en este tipo celular en genes relacionados con las neoplasias mieloides. No se observó ningún patrón mutacional específico. La

mutación de la CSM fue siempre diferente de la mutación de la célula hematopoyética (CH) del mismo paciente, y de las alteraciones en las CSM de otros pacientes.

6. Considerando la presencia de mutaciones en las CSM y las células CH los análisis demostraron la presencia de cuatro grupos de pacientes: casos con mutaciones tanto en CH como en CSM, pacientes con mutaciones en CSM pero no en las CH, grupo con alteraciones solo en CH y pacientes sin mutaciones en ninguna de las células. La gran heterogeneidad observada no permite definir la implicación de las CSM en la patogénesis de SMD.

- [1] N. Gangat, M.M. Patnaik, A. Tefferi, Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat, *American journal of hematology* 91(1) (2016) 76-89.
- [2] S.D. Nimer, Myelodysplastic syndromes, *Blood* 111(10) (2008) 4841-51.
- [3] G. Garcia-Manero, Myelodysplastic syndromes: 2015 Update on diagnosis, risk-stratification and management, *American journal of hematology* 90(9) (2015) 831-41.
- [4] K.I. Mills, A. Kohlmann, P.M. Williams, L. Wieczorek, W.M. Liu, R. Li, W. Wei, D.T. Bowen, H. Loeffler, J.M. Hernandez, W.K. Hofmann, T. Haferlach, Microarray-based classifiers and prognosis models identify subgroups with distinct clinical outcomes and high risk of AML transformation of myelodysplastic syndrome, *Blood* 114(5) (2009) 1063-72.
- [5] J. Flach, F. Dicker, S. Schnittger, S. Schindela, A. Kohlmann, T. Haferlach, W. Kern, C. Haferlach, An accumulation of cytogenetic and molecular genetic events characterizes the progression from MDS to secondary AML: an analysis of 38 paired samples analyzed by cytogenetics, molecular mutation analysis and SNP microarray profiling, *Leukemia* 25(4) (2011) 713-8.
- [6] R. Liao, Y. Xu, M. Chen, X. Chen, X. Zhan, J. Sun, Molecular mechanism of microRNA involvement in genesis of myelodysplastic syndrome and its transformation to acute myeloid leukemia, *Hematology* 18(4) (2013) 191-7.
- [7] V. Visconte, C. Sella, J.P. Maciejewski, R.V. Tiu, Molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes, *Translational medicine @ UniSa* 8 (2014) 19-30.
- [8] X. Ma, M. Does, A. Raza, S.T. Mayne, Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States, *Cancer* 109(8) (2007) 1536-42.
- [9] C. Aul, D.T. Bowen, Y. Yoshida, Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes, *Haematologica* 83(1) (1998) 71-86.
- [10] D.T. Bowen, Occupational and environmental etiology of MDS, *Best practice & research. Clinical haematology* 26(4) (2013) 319-26.
- [11] S.A. Bannon, C.D. DiNardo, Hereditary Predispositions to Myelodysplastic Syndrome, *International journal of molecular sciences* 17(6) (2016).
- [12] G. Garcia-Manero, Myelodysplastic syndromes: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management, *American journal of hematology* 89(1) (2014) 97-108.
- [13] P.L. Greenberg, H. Tuechler, J. Schanz, G. Sanz, G. Garcia-Manero, F. Sole, J.M. Bennett, D. Bowen, P. Fenaux, F. Dreyfus, H. Kantarjian, A. Kuendgen, A. Levis, L. Malcovati, M. Cazzola, J. Cermak, C. Fonatsch, M.M. Le Beau, M.L. Slovak, O. Krieger, M. Luebbert, J. Maciejewski, S.M. Magalhaes, Y. Miyazaki, M. Pfeilstocker, M. Sekeres, W.R. Sperr, R. Stauder, S. Tauro, P. Valent, T. Vallespi, A.A. van de Loosdrecht, U. Germing, D. Haase, Cytopenia levels for aiding establishment of the diagnosis of myelodysplastic syndromes, *Blood* 128(16) (2016) 2096-2097.
- [14] D.P. Steensma, Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Treatment, *Mayo Clinic proceedings* 90(7) (2015) 969-83.
- [15] M.G. Della Porta, L. Malcovati, R. Invernizzi, E. Travaglino, C. Pascutto, M. Maffioli, A. Galli, S. Boggi, D. Pietra, L. Vanelli, C. Marseglia, S. Levi, P. Arosio, M. Lazzarino, M. Cazzola, Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome, *Leukemia* 20(4) (2006) 549-55.
- [16] A. Mazzone, C. Porta, G. Fossati, D. Gritti, I. Mazzucchelli, G. Ricevuti, Granulocyte dysplasia and dysfunction, and CD11/CD18 defects in myelodysplastic syndromes, *Leukemia & lymphoma* 23(3-4) (1996) 267-75.
- [17] G. Feng, R.P. Gale, W. Cui, W. Cai, G. Huang, Z. Xu, T. Qin, Y. Zhang, B. Li, L. Fang, H. Zhang, L. Pan, N. Hu, S. Qu, J. Wang, Y. Cui, Z. Xiao, A systematic classification of megakaryocytic dysplasia and its impact on prognosis for patients with myelodysplastic syndromes, *Experimental hematology & oncology* 5 (2015) 12.
- [18] O.K. Weinberg, R.P. Hasserjian, The current approach to the diagnosis of myelodysplastic syndromes(), *Seminars in hematology* 56(1) (2019) 15-21.
- [19] G. Gupta, R. Singh, D.S. Kotasthane, V.D. Kotasthane, Myelodysplastic syndromes/neoplasms: recent classification system based on World Health Organization

Classification of Tumors - International Agency for Research on Cancer for Hematopoietic and Lymphoid Tissues, *Journal of blood medicine* 1 (2010) 171-82.

[20] R. Bejar, Myelodysplastic Syndromes Diagnosis: What Is the Role of Molecular Testing?, *Current hematologic malignancy reports* 10(3) (2015) 282-91.

[21] E.J. Duncavage, B. Tandon, The utility of next-generation sequencing in diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes, *International journal of laboratory hematology* 37 Suppl 1 (2015) 115-21.

[22] L. Ades, R. Itzykson, P. Fenaux, Myelodysplastic syndromes, *Lancet* 383(9936) (2014) 2239-52.

[23] C.D. DiNardo, G. Garcia-Manero, S. Pierce, A. Nazha, C. Bueso-Ramos, E. Jabbour, F. Ravandi, J. Cortes, H. Kantarjian, Interactions and relevance of blast percentage and treatment strategy among younger and older patients with acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS), *American journal of hematology* 91(2) (2016) 227-32.

[24] J.M. Bennett, A comparative review of classification systems in myelodysplastic syndromes (MDS), *Seminars in oncology* 32(4 Suppl 5) (2005) S3-10.

[25] J.W. Vardiman, N.L. Harris, R.D. Brunning, The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms, *Blood* 100(7) (2002) 2292-302.

[26] J.W. Vardiman, J. Thiele, D.A. Arber, R.D. Brunning, M.J. Borowitz, A. Porwit, N.L. Harris, M.M. Le Beau, E. Hellstrom-Lindberg, A. Tefferi, C.D. Bloomfield, The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes, *Blood* 114(5) (2009) 937-51.

[27] D.A. Arber, A. Orazi, R. Hasserjian, J. Thiele, M.J. Borowitz, M.M. Le Beau, C.D. Bloomfield, M. Cazzola, J.W. Vardiman, The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia, *Blood* 127(20) (2016) 2391-405.

[28] D. Haase, Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes, *Annals of hematology* 87(7) (2008) 515-26.

[29] T. Haferlach, Y. Nagata, V. Grossmann, Y. Okuno, U. Bacher, G. Nagae, S. Schnittger, M. Sanada, A. Kon, T. Alpermann, K. Yoshida, A. Roller, N. Nadarajah, Y. Shiraishi, Y. Shiozawa, K. Chiba, H. Tanaka, H.P. Koefler, H.U. Klein, M. Dugas, H. Aburatani, A. Kohlmann, S. Miyano, C. Haferlach, W. Kern, S. Ogawa, Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes, *Leukemia* 28(2) (2014) 241-7.

[30] E. Papaemmanuil, M. Gerstung, L. Malcovati, S. Tauro, G. Gundem, P. Van Loo, C.J. Yoon, P. Ellis, D.C. Wedge, A. Pellagatti, A. Shlien, M.J. Groves, S.A. Forbes, K. Raine, J. Hinton, L.J. Mudie, S. McLaren, C. Hardy, C. Latimer, M.G. Della Porta, S. O'Meara, I. Ambaglio, A. Galli, A.P. Butler, G. Walldin, J.W. Teague, L. Quek, A. Sternberg, C. Gambacorti-Passerini, N.C. Cross, A.R. Green, J. Boulton, P. Vyas, E. Hellstrom-Lindberg, D. Bowen, M. Cazzola, M.R. Stratton, P.J. Campbell, C. Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome, Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes, *Blood* 122(22) (2013) 3616-27; quiz 3699.

[31] R. Bejar, K. Stevenson, O. Abdel-Wahab, N. Galili, B. Nilsson, G. Garcia-Manero, H. Kantarjian, A. Raza, R.L. Levine, D. Neuberg, B.L. Ebert, Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes, *The New England journal of medicine* 364(26) (2011) 2496-506.

[32] L. Malcovati, M. Karimi, E. Papaemmanuil, I. Ambaglio, M. Jadersten, M. Jansson, C. Elena, A. Galli, G. Walldin, M.G. Della Porta, K. Raaschou-Jensen, E. Travaglino, K. Kallenbach, D. Pietra, V. Ljungstrom, S. Conte, E. Boveri, R. Invernizzi, R. Rosenquist, P.J. Campbell, M. Cazzola, E. Hellstrom Lindberg, SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts, *Blood* 126(2) (2015) 233-41.

[33] F. Damm, F. Thol, O. Kosmider, S. Kade, P. Loffeld, F. Dreyfus, A. Stamatoullas-Bastard, A. Tanguy-Schmidt, O. Beyne-Rauzy, S. de Botton, A. Guerci-Bresler, G. Gohring, B. Schlegelberger, A. Ganser, O.A. Bernard, M. Fontenay, M. Heuser, SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes: clinical associations and prognostic implications, *Leukemia* 26(5) (2012) 1137-40.

- [34] V. Visconte, H. Makishima, A. Jankowska, H. Szpurka, F. Traina, A. Jerez, C. O'Keefe, H.J. Rogers, M.A. Sekeres, J.P. Maciejewski, R.V. Tiu, SF3B1, a splicing factor is frequently mutated in refractory anemia with ring sideroblasts, *Leukemia* 26(3) (2012) 542-5.
- [35] K. Janusz, M. Del Rey, M. Abaigar, R. Collado, D. Ivars, M. Hernandez-Sanchez, A. Valiente, C. Robledo, R. Benito, M. Diez-Campelo, F. Ramos, A. Kohlmann, C.D. Canizo, J.M. Hernandez-Rivas, A two-step approach for sequencing spliceosome-related genes as a complementary diagnostic assay in MDS patients with ringed sideroblasts, *Leukemia research* 56 (2017) 82-87.
- [36] K. Yoshida, M. Sanada, Y. Shiraishi, D. Nowak, Y. Nagata, R. Yamamoto, Y. Sato, A. Sato-Otsubo, A. Kon, M. Nagasaki, G. Chalkidis, Y. Suzuki, M. Shiosaka, R. Kawahata, T. Yamaguchi, M. Otsu, N. Obara, M. Sakata-Yanagimoto, K. Ishiyama, H. Mori, F. Nolte, W.K. Hofmann, S. Miyawaki, S. Sugano, C. Haferlach, H.P. Koeffler, L.Y. Shih, T. Haferlach, S. Chiba, H. Nakauchi, S. Miyano, S. Ogawa, Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia, *Nature* 478(7367) (2011) 64-9.
- [37] I. Martin, E. Such, B. Navarro, E. Villamon, A. Vicente, E. Mora, L. Pedrola, M. Ibanez, M. Lopez-Pavia, M. Tormo, A. Serrano, M.A. Sanz, J. Cervera, G. Sanz, Prognostic impact of gene mutations in myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts, *Blood cancer journal* 7(12) (2017) 630.
- [38] H.A. Hou, C.H. Tsai, C.C. Lin, W.C. Chou, Y.Y. Kuo, C.Y. Liu, M.H. Tseng, Y.L. Peng, M.C. Liu, C.W. Liu, X.W. Liao, L.I. Lin, M. Yao, J.L. Tang, H.F. Tien, Incorporation of mutations in five genes in the revised International Prognostic Scoring System can improve risk stratification in the patients with myelodysplastic syndrome, *Blood cancer journal* 8(4) (2018) 39.
- [39] A.J. Rathnayake, H.W. Goonasekera, V.H. Dissanayake, Phenotypic and Cytogenetic Characterization of Mesenchymal Stromal Cells in De Novo Myelodysplastic Syndromes, *Analytical cellular pathology* 2016 (2016) 8012716.
- [40] E. Kouvidi, A. Stratigi, A. Batsali, I. Mavroudi, S. Mastrodemou, M. Ximeri, H.A. Papadaki, C.G. Pontikoglou, Cytogenetic evaluation of mesenchymal stem/stromal cells from patients with myelodysplastic syndromes at different time-points during ex vivo expansion, *Leukemia research* 43 (2016) 24-32.
- [41] S.D. Mundle, P. Venugopal, J.D. Cartlidge, D.V. Pandav, L. Broady-Robinson, S. Gezer, E.L. Robin, S.R. Rifkin, M. Klein, D.E. Alston, B.M. Hernandez, D. Rosi, S. Alvi, V.T. Shetty, S.A. Gregory, A. Raza, Indication of an involvement of interleukin-1 beta converting enzyme-like protease in intramedullary apoptotic cell death in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes, *Blood* 88(7) (1996) 2640-7.
- [42] N.A. Zambetti, Z. Ping, S. Chen, K.J.G. Kenswil, M.A. Mylona, M.A. Sanders, R.M. Hoogenboezem, E.M.J. Bindels, M.N. Adisty, P.M.H. Van Strien, C.S. van der Leije, T.M. Westers, E.M.P. Cremers, C. Milanese, P.G. Mastroberardino, J. van Leeuwen, B.C.J. van der Eerden, I.P. Touw, T.W. Kuijpers, R. Kanaar, A.A. van de Loosdrecht, T. Vogl, M. Raaijmakers, Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-leukemia, *Cell stem cell* 19(5) (2016) 613-627.
- [43] E. Flores-Figueroa, R.M. Arana-Trejo, G. Gutierrez-Espindola, A. Perez-Cabrera, H. Mayani, Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization, *Leukemia research* 29(2) (2005) 215-24.
- [44] O. Blau, C.D. Baldus, W.K. Hofmann, G. Thiel, F. Nolte, T. Burmeister, S. Turkmen, O. Benlasfer, E. Schumann, A. Sindram, M. Molkentin, S. Mundlos, U. Keilholz, E. Thiel, I.W. Blau, Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts, *Blood* 118(20) (2011) 5583-92.
- [45] F. Dazzi, R. Ramasamy, S. Glennie, S.P. Jones, I. Roberts, The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis, *Blood reviews* 20(3) (2006) 161-71.
- [46] M.K. Majumdar, M.A. Thiede, S.E. Haynesworth, S.P. Bruder, S.L. Gerson, Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages, *Journal of hematology & stem cell research* 9(6) (2000) 841-8.

- [47] N. Van Overstraeten-Schlogel, Y. Beguin, A. Gothot, Role of stromal-derived factor-1 in the hematopoietic-supporting activity of human mesenchymal stem cells, *European journal of haematology* 76(6) (2006) 488-93.
- [48] Z.G. Zhao, W. Xu, H.P. Yu, B.L. Fang, S.H. Wu, F. Li, W.M. Li, Q.B. Li, Z.C. Chen, P. Zou, Functional characteristics of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes, *Cancer letters* 317(2) (2012) 136-43.
- [49] V. Soenen-Cornu, C. Tourino, M.L. Bonnet, M. Guillier, S. Flamant, R. Kotb, A. Bernheim, J.H. Bourhis, C. Preudhomme, P. Fenaux, A.G. Turhan, Mesenchymal cells generated from patients with myelodysplastic syndromes are devoid of chromosomal clonal markers and support short- and long-term hematopoiesis in vitro, *Oncogene* 24(15) (2005) 2441-8.
- [50] M. Klaus, E. Stavroulaki, M.C. Kastrinaki, P. Fragioudaki, K. Giannikou, M. Psyllaki, C. Pontikoglou, D. Tsoukatou, C. Mamalaki, H.A. Papadaki, Reserves, functional, immunoregulatory, and cytogenetic properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with myelodysplastic syndromes, *Stem cells and development* 19(7) (2010) 1043-54.
- [51] Q. Han, Z. Sun, L. Liu, B. Chen, Y. Cao, K. Li, R.C. Zhao, Impairment in immuno-modulatory function of Flk1(+)/CD31(-)/CD34(-) MSCs from MDS-RA patients, *Leukemia research* 31(11) (2007) 1469-78.
- [52] T.J. Ley, E.R. Mardis, L. Ding, B. Fulton, M.D. McLellan, K. Chen, D. Dooling, B.H. Dunford-Shore, S. McGrath, M. Hickenbotham, L. Cook, R. Abbott, D.E. Larson, D.C. Koboldt, C. Pohl, S. Smith, A. Hawkins, S. Abbott, D. Locke, L.W. Hillier, T. Miner, L. Fulton, V. Magrini, T. Wylie, J. Glasscock, J. Conyers, N. Sander, X. Shi, J.R. Osborne, P. Minx, D. Gordon, A. Chinwalla, Y. Zhao, R.E. Ries, J.E. Payton, P. Westervelt, M.H. Tomasson, M. Watson, J. Baty, J. Ivanovich, S. Heath, W.D. Shannon, R. Nagarajan, M.J. Walter, D.C. Link, T.A. Graubert, J.F. DiPersio, R.K. Wilson, DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome, *Nature* 456(7218) (2008) 66-72.
- [53] T. Fujiwara, N. Fukuhara, R. Funayama, N. Nariai, M. Kamata, T. Nagashima, K. Kojima, Y. Onishi, Y. Sasahara, K. Ishizawa, M. Nagasaki, K. Nakayama, H. Harigae, Identification of acquired mutations by whole-genome sequencing in GATA-2 deficiency evolving into myelodysplasia and acute leukemia, *Annals of hematology* 93(9) (2014) 1515-22.
- [54] X.J. Yan, J. Xu, Z.H. Gu, C.M. Pan, G. Lu, Y. Shen, J.Y. Shi, Y.M. Zhu, L. Tang, X.W. Zhang, W.X. Liang, J.Q. Mi, H.D. Song, K.Q. Li, Z. Chen, S.J. Chen, Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia, *Nature genetics* 43(4) (2011) 309-15.
- [55] M. Ruffalo, H. Husseinzadeh, H. Makishima, B. Przychodzen, M. Ashkar, M. Koyuturk, J.P. Maciejewski, T. LaFramboise, Whole-exome sequencing enhances prognostic classification of myeloid malignancies, *Journal of biomedical informatics* 58 (2015) 104-113.
- [56] C.A. Cargo, N. Rowbotham, P.A. Evans, S.L. Barrans, D.T. Bowen, S. Crouch, A.S. Jack, Targeted sequencing identifies patients with preclinical MDS at high risk of disease progression, *Blood* 126(21) (2015) 2362-5.
- [57] X. Liang, S. Vacher, A. Boulai, V. Bernard, S. Baulande, M. Bohec, I. Bieche, F. Lerebours, C. Callens, Targeted next-generation sequencing identifies clinically relevant somatic mutations in a large cohort of inflammatory breast cancer, *Breast cancer research : BCR* 20(1) (2018) 88.
- [58] J.C. Thompson, S.S. Yee, A.B. Troxel, S.L. Savitch, R. Fan, D. Balli, D.B. Lieberman, J.D. Morrisette, T.L. Evans, J. Bauml, C. Aggarwal, J.A. Kosteva, E. Alley, C. Ciunci, R.B. Cohen, S. Bagley, S. Stonehouse-Lee, V.E. Sherry, E. Gilbert, C. Langer, A. Vachani, E.L. Carpenter, Detection of Therapeutically Targetable Driver and Resistance Mutations in Lung Cancer Patients by Next-Generation Sequencing of Cell-Free Circulating Tumor DNA, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 22(23) (2016) 5772-5782.
- [59] S. Goodwin, J.D. McPherson, W.R. McCombie, Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies, *Nature reviews. Genetics* 17(6) (2016) 333-51.
- [60] L. Liu, Y. Li, S. Li, N. Hu, Y. He, R. Pong, D. Lin, L. Lu, M. Law, Comparison of next-generation sequencing systems, *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012 (2012) 251364.

- [61] M.A. Quail, M. Smith, P. Coupland, T.D. Otto, S.R. Harris, T.R. Connor, A. Bertoni, H.P. Swerdlow, Y. Gu, A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers, *BMC genomics* 13 (2012) 341.
- [62] S. Behjati, P.S. Tarpey, What is next generation sequencing?, *Archives of disease in childhood. Education and practice edition* 98(6) (2013) 236-8.
- [63] L. Mamanova, A.J. Coffey, C.E. Scott, I. Kozarewa, E.H. Turner, A. Kumar, E. Howard, J. Shendure, D.J. Turner, Target-enrichment strategies for next-generation sequencing, *Nature methods* 7(2) (2010) 111-8.
- [64] Z. Shi, T. Qin, Z. Xu, B. Li, H. Huang, H. Zhang, L. Fang, L. Pan, N. Hu, S. Qu, G. Huang, R.P. Gale, Z. Xiao, Prognostic mutations in persons with isolated neutropenia myelodysplastic syndrome, *Leukemia & lymphoma* (2019) 1-3.
- [65] S. Jeromin, S. Weissmann, C. Haferlach, F. Dicker, K. Bayer, V. Grossmann, T. Alpermann, A. Roller, A. Kohlmann, T. Haferlach, W. Kern, S. Schnittger, SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients, *Leukemia* 28(1) (2014) 108-17.
- [66] L. Malcovati, M.G. Della Porta, D. Pietra, E. Boveri, A. Pellagatti, A. Galli, E. Travaglino, A. Brisci, E. Rumi, F. Passamonti, R. Invernizzi, L. Cremonesi, J. Boulwood, J.S. Wainscoat, E. Hellstrom-Lindberg, M. Cazzola, Molecular and clinical features of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis, *Blood* 114(17) (2009) 3538-45.
- [67] L. Malcovati, E. Papaemmanuil, D.T. Bowen, J. Boulwood, M.G. Della Porta, C. Pascutto, E. Travaglino, M.J. Groves, A.L. Godfrey, I. Ambaglio, A. Galli, M.C. Da Via, S. Conte, S. Tauro, N. Keenan, A. Hyslop, J. Hinton, L.J. Mudie, J.S. Wainscoat, P.A. Futreal, M.R. Stratton, P.J. Campbell, E. Hellstrom-Lindberg, M. Cazzola, C. Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome, M. of the Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie, Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms, *Blood* 118(24) (2011) 6239-46.
- [68] E.M. Je, N.J. Yoo, Y.J. Kim, M.S. Kim, S.H. Lee, Mutational analysis of splicing machinery genes SF3B1, U2AF1 and SRSF2 in myelodysplasia and other common tumors, *International journal of cancer* 133(1) (2013) 260-5.
- [69] D. Haase, K.E. Stevenson, D. Neuberg, J.P. Maciejewski, A. Nazha, M.A. Sekeres, B.L. Ebert, G. Garcia-Manero, C. Haferlach, T. Haferlach, W. Kern, S. Ogawa, Y. Nagata, K. Yoshida, T.A. Graubert, M.J. Walter, A.F. List, R.S. Komrokji, E. Padron, D. Sallman, E. Papaemmanuil, P.J. Campbell, M.R. Savona, A. Seegmiller, L. Ades, P. Fenaux, L.Y. Shih, D. Bowen, M.J. Groves, S. Tauro, M. Fontenay, O. Kosmider, M. Bar-Natan, D. Steensma, R. Stone, M. Heuser, F. Thol, M. Cazzola, L. Malcovati, A. Karsan, C. Ganster, E. Hellstrom-Lindberg, J. Boulwood, A. Pellagatti, V. Santini, L. Quek, P. Vyas, H. Tuchler, P.L. Greenberg, R. Bejar, M.D.S.M.P.C. International Working Group for, TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with complex karyotypes into distinct prognostic subgroups, *Leukemia* (2019).