



Mecanismos moleculares implicados en la génesis de la leucemia linfoblástica aguda B infantil

Guillermo Rodríguez Hernández

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA – CSIC
Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer
Salamanca, 2019

El trabajo recogido en la presente tesis doctoral ha dado lugar a la elaboración de 3 artículos científicos:

Guillermo Rodríguez-Hernández*, Julia Hauer*, Alberto Martín-Lorenzo*, Daniel Schäfer, Christoph Bartenhagen, Idoia García-Ramírez, Franziska Auer, Inés González-Herrero, Lucía Ruiz-Roca, Michael Gombert, Vera Okpanyi, Ute Fischer, Cai Chen, Martin Dugas, Sanil Bhatia, René Martin Linka, Marta García-Suquía, María Victoria Rascón-Trincado, Ángel García-Sánchez, Oscar Blanco, María Begoña García-Cenador, Francisco Javier García-Criado, César Cobaleda, Diego Alonso-López, Javier De Las Rivas, Markus Müschen, Carolina Vicente-Dueñas[#], Isidro Sánchez-García[#], Arndt Borkhardt[#]. *Infection Exposure Promotes ETV6-RUNX1 Precursor B-cell Leukemia via Impaired H3K4 Demethylases*. **Cancer Research**. 2017 Aug 15;77(16):4365-4377. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0701. Epub 2017 Jun 19.

Guillermo Rodríguez-Hernández*, Friederike V. Opitz*, Pilar Delgado*, Carolin Walter, Ángel F. Álvarez-Prado, Inés González-Herrero, Franziska Auer, Ute Fischer, Christoph Bartenhagen, Javier Raboso-Gallego, Ana Casado-García, Alberto Orfao, Oscar Blanco, Diego Alonso-López, Javier De Las Rivas, Sara González de Tena-Dávila, Markus Müschen, Martin Dugas, Francisco Javier García-Criado, María Begoña García-Cenador, Carolina Vicente-Dueñas, Julia Hauer[#], Almudena R. Ramiro, Isidro Sánchez-García[#], Arndt Borkhardt[#]. *Infectious stimuli promote malignant B-cell acute lymphoblastic leukemia in the absence of AID*. **Nature Communications**. REVISED VERSION SUBMITTED.

Guillermo Rodríguez-Hernández*, Friederike V. Opitz*, Inés González-Herrero, Ana Casado-García, Stefan Janssen, Ute Fischer, Alberto Orfao, Oscar Blanco, Francisco Javier García-Criado, María Begoña García-Cenador, Hanno Hock, Tariq Enver, Arndt Borkhardt[#], Isidro Sánchez-García[#], Julia Hauer[#], Carolina Vicente-Dueñas[#]. *Disease phenotype results from the ontogeny-related differential susceptibility to transformation by specific secondary molecular hits in ETV6-RUNX1-infection-driven B-cell leukemia*. MANUSCRIPT IN PREPARATION.

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

Y **Dña. Carolina Vicente Dueñas**, investigadora Miguel Servet del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (CP14/00082) en el Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “**Mecanismos moleculares implicados en la génesis de la leucemia linfoblástica aguda B infantil**”, que presenta el doctorando **D. Guillermo Rodríguez Hernández**, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para ser presentado ante el correspondiente tribunal y optar al título de doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca, a 28 de Junio de 2019.

La investigación en el grupo de Carolina Vicente-Dueñas está parcialmente financiada por FEDER, “Miguel Servet” *Grant* (CP14/00082 - AES 2013-2016) del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía y Competitividad), y por el “Fondo de Investigaciones Sanitarias/Instituto de Salud Carlos III” (PI17/00167). CVD *lab* es un miembro de la *COST ACTION: LEukaemia GENE Discovery by data sharing, mining and collaboration (LEGEND, CA16223)*. La investigación en el grupo de Isidro Sánchez-García está parcialmente financiada por FEDER, por MINECO (SAF2015-64420-R y RTI2018-093314-B-I00), por la Junta de Castilla y León (UIC-017, CSI001U16, and CSI234P18), por *The German Jose Carreras Foundation* (DJCLS R13/26 y DJCLS 02R/2016) y por el *National Institute of Health* (NIH, 1R01CA201380-01A1). ISG *lab* es un miembro de *EuroSyStem* y de *DECIDE Network* financiado por la *European Union under the FP7 program*. CVD e ISG han sido financiados por *The German Federal Office for Radiation Protection (BfS)-Germany* (FKZ: 3618S32274). Guillermo Rodríguez-Hernández ha sido apoyado por la ayuda predoctoral FSE-Conserjería de Educación de la Junta de Castilla y León (CSI001-15).

Quería empezar agradeciendo a todo el mundo que de una manera u otra ha hecho posible este trabajo, ya sea dentro o fuera del laboratorio.

En primer lugar, querría dar las gracias a mis directores de tesis, Isidro Sánchez García y Carolina Vicente Dueñas, por enseñarme que con trabajo duro y constancia se pueden conseguir grandes cosas.

A todos los miembros del laboratorio 13, presentes y los que ya se fueron: Ana, Javi, Sara, Marta, Inés, Idoia, Alberto, Ana, Ester, Isa y Lucía. Por todo ese tiempo que hemos pasado juntos, trabajando y fuera del laboratorio. Por toda vuestra ayuda y los buenos momentos.

Al profesor Arndt Borkhardt y a los miembros de su laboratorio en el Hospital Universitario de Düsseldorf (Alemania): Daniel, Sanil, Ute, Stefan, Friederike y Marina por su gran participación en este proyecto y las reuniones semestrales.

Al laboratorio de la Dra. Julia Hauer de la Universidad de Dresden (Alemania): a Franzi y a la propia Julia, por sus grandes ideas y aportaciones en este trabajo.

A la Dra. Carolin Walter del *Institute of Medical Informatics* de la Universidad de Muenster (Alemania) por sus análisis de los patrones mutacionales.

A la Dra. Almudena R. Ramiro y a los miembros de su laboratorio en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares de Madrid, por su gran implicación en este trabajo y el modelo *Aid-KO*.

Al Dr. Jesús Pérez Losada del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca y a todos los miembros de su laboratorio: Aurora, Milena, Natalia, Rober y Adri. Por las reuniones semanales y las aportaciones científicas.

Al Dr. Rafael Jiménez del departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca y al Dr. Dionisio Martín Zanca del Instituto de Biología Funcional y Genómica de Salamanca, por sus consejos en nuestros seminarios semanales.

Al Dr. Francisco Javier García Criado y a la Dra. M. Begoña García Cenador, del departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, por hacer tan fácil el trabajo con los animales y su buena disposición durante estos años.

A todo el personal de apoyo y gestión del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca.

Al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca, por poner todo de su parte para que nuestro trabajo fuera más sencillo, y en especial a Juan, por tratarnos como sólo él sabe.

Al Servicio de Citometría de la Universidad de Salamanca dirigido por el Dr. Alberto Orfao, especialmente a M^a Luz y Julio, por su paciencia en todas las horas de *Sorting*.

Al Servicio de Genómica del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca por todo el trabajo con los *arrays* de expresión.

Al Dr. Diego Alonso López, del Servicio de Bioinformática del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca, por toda su ayuda y paciencia con los análisis bioinformáticos.

Al Servicio de Anatomía Patológica del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer y del Hospital Universitario de Salamanca. En especial a Dr. Óscar Blanco por el tratamiento de todas las muestras de ratón.

Al Dr. M. Busslinger del *Research Institute of Molecular Pathology* (IMP), Viena (Austria), por cedernos el modelo de ratón *Pax5-het*.

Al Dr. Hanno Hock del *Harvard Stem Cell Institute*, Boston (Estados Unidos), por cedernos el modelo animal *Etv6^{-ETV6-RUNX1}*.

También quiero agradecer su apoyo a toda la gente que he conocido en estos años de laboratorio y ahora es muy cercana a mí. A todos mis amigos de esta etapa que espero sigamos así, en especial a los clandestinos, Ido, Alberto y Adri.

A todos mis amigos de siempre, por soportarme tanto en los buenos ratos como en los malos.

Y sobre todo a mi familia, por su apoyo incondicional. Y la más importante, mi hermana Irene, porque siempre estás ahí para lo que necesite, porque estar contigo es saber que voy a acabar con una sonrisa en la cara.

En Salamanca, a 28 de Junio de 2019.

Guillermo Rodríguez Hernández

ÍNDICE

Índice

ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN.....	11
1. La leucemia linfoblástica aguda	11
1.1. Definición y características de la leucemia linfoblástica aguda (ALL).....	11
1.2. Etiología de la ALL	13
1.3. La teoría de la infección como causante de la ALL.....	14
1.4. Susceptibilidad genética en el desarrollo de la ALL.....	15
1.4.1. Gen de fusión <i>ETV6-RUNX1</i>	16
1.4.2. Predisposición a leucemia asociada a <i>PAX5</i>	18
2. Modelo actual del desarrollo de ALL.....	19
2.1. ALL como proceso multietapa: Modelo del doble <i>hit</i> de la ALL infantil	19
2.2. Papel de <i>RAG</i> en el proceso de transformación tumoral.....	20
2.3. Genes modificadores de la cromatina: <i>KDM5C</i>	21
2.4. Papel de <i>AID</i> en el proceso de transformación tumoral.....	21
3. Modelos animales de B-ALL <i>ETV6-RUNX1+</i>	22
3.1. Modelos transgénicos de pez cebra para B-ALL <i>ETV6-RUNX1+</i> infantil.....	22
3.2. Modelos murinos de leucemia infantil B-ALL <i>ETV6-RUNX1+</i>	23
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	29
OBJETIVOS.....	35
RESULTADOS	41
1. La expresión de la fusión <i>ETV6-RUNX1</i> en el compartimento <i>stem</i> hematopoyético induce al desarrollo de la B-ALL con baja incidencia en condiciones de exposición a patógenos comunes	41
1.1. Desarrollo de un modelo murino cuyos precursores hematopoyéticos expresan <i>ETV6-RUNX1</i> dando lugar a un compartimento preleucémico. Características del modelo murino Sca1- <i>ETV6-RUNX1</i>	41
1.2. La exposición a patógenos comunes induce el desarrollo de B-ALL en los ratones Sca1- <i>ETV6-RUNX1</i>	42
1.3. La combinación de la fusión <i>ETV6-RUNX1</i> y la exposición a infección alteran el correcto desarrollo hematopoyético B e induce un patrón de expresión génica diferencial.....	48
1.4. Identificación de alteraciones secundarias comunes en el modelo murino Sca1- <i>ETV6-RUNX1</i> y en pacientes con leucemia <i>ETV6-RUNX1</i> positiva	52
1.5. La pérdida de función de <i>KDM5C</i> altera el complejo RAG2-H3K4me3.....	55
2. La naturaleza del evento secundario y la célula de origen definen el fenotipo tumoral	56
2.1. La expresión de la fusión <i>ETV6-RUNX1</i> en el compartimento B hematopoyético no es suficiente para desarrollar B-ALL en ambiente de exposición a infección	56
2.2. La combinación de la fusión <i>ETV6-RUNX1</i> en el compartimento <i>stem</i> hematopoyético y la pérdida de función de <i>Kdm5c</i> en las células B no es capaz de inducir B-ALL en condiciones libres de patógenos (SPF).....	59
2.3. La exposición natural a infección es capaz de inducir el desarrollo de leucemia en ratones condicionales <i>Etv6^{ETV6-RUNX1}</i> que expresan <i>ETV6-RUNX1</i> en las HSCs.....	61
2.4. La pérdida de función de <i>Kdm5c</i> en HSCs es el evento necesario para la evolución clonal de un clon preleucémico <i>ETV6-RUNX1</i> hasta B-ALL en condiciones libres de patógenos (SPF)	68

3. Cambios en el modelo actual del desarrollo de B-ALL: AID no es necesario para la evolución clonal de las células premalignas	71
3.1. Caracterización de la expresión de <i>Aid</i> en modelos preleucémicos.....	71
3.2. La exposición natural a infección da lugar al desarrollo de B-ALL en ausencia de <i>Aid</i>	72
3.3. Caracterización genética de las B-ALLs <i>Aid-het</i> y <i>Aid-KO</i>	76
DISCUSIÓN.....	87
Primer modelo de ratón de B-ALL <i>ETV6-RUNX1+</i>	87
La exposición a infección causa B-ALL en portadores <i>ETV6-RUNX1</i> sanos	87
¿Cómo se define la identidad celular en la B-ALL <i>ETV6-RUNX1+</i>?	89
AID y la conversión leucémica en portadores sanos.....	89
CONCLUSIONES	95
MATERIAL Y MÉTODOS	101
1. Modelos de ratón empleados en el estudio	101
2. Genotipado de los ratones mediante PCR.....	102
2.1. Genotipado de los ratones <i>Sca1-ETV6-RUNX1</i>	102
2.2. Genotipado de los ratones <i>Etv6^{ETV6-RUNX1}</i>	102
2.3. Genotipado de los ratones <i>Sca1-Cre</i>	103
2.4. Genotipado de los ratones <i>Mb1-Cre</i>	103
2.5. Genotipado de los ratones <i>Kdm5c</i>	104
2.6. Genotipado de los ratones <i>Pax5-het</i>	104
2.7. Genotipado de los ratones <i>Aid-het</i> y <i>Aid-KO</i>	105
3. Muestras humanas primarias	105
4. Extracción de DNA	105
5. Extracción de RNA.....	106
6. Análisis de la expresión de <i>ETV6-RUNX1</i> mediante PCR	106
7. Identificación de la fusión <i>ETV6-RUNX1</i> mediante <i>Southern blot</i>	106
8. Análisis mediante citometría de flujo (FACS de sus siglas en inglés, <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>).....	107
9. Estudios histológicos.....	108
10. Análisis de la clonalidad de las inmunoglobulinas	108
11. Análisis de la clonalidad del TCR (de sus siglas en inglés <i>T Cell Receptor</i>)	108
12. Preparación de las librerías y secuenciación de DNA	109
13. Secuenciación	110
14. Cultivo de células proB	110
15. Ensayos de apoptosis.....	111
16. Análisis mediante <i>arrays</i> de expresión	111
17. Análisis de enriquecimiento.....	112
18. Experimentos de trasplante.....	112
19. Edición génica mediante CRISPR/Cas9.....	112
20. Análisis por co-inmunoprecipitación y <i>Western Blot</i>	113

21.	Cuantificación por <i>Real-time</i> PCR (Q-PCR) de <i>Rag1</i> , <i>Rag2</i> y <i>Aid</i>	113
22.	Análisis del patrón mutacional en las B-ALL <i>Pax5-het/Aid-het</i> y <i>Pax5-het/Aid-KO</i>	114
ANEXOS		119
BIBLIOGRAFÍA		133

ABBREVIATURAS

ABREVIATURAS

A

- **AID:** *Activation-Induced Cytidine Deaminase*
- **ALL:** *Acute Lymphoblastic Leukemia*
- **APC:** *Aloficocianina*
- **APDS:** *Activated PI3K δ Syndrome*

B

- **B-ALL:** *B cell Acute Lymphoblastic Leukemia*
- **BCP-ALL:** *B Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia*
- **BCR:** *B Cell Receptor*

C

- **cDNA:** *Complementary DNA*
- **CF:** *Conventional Facility*
- **CLP:** *Common Lymphoid Progenitor*
- **CMV:** *Citomegalovirus*
- **CNV:** *Copy Number Variation*
- **COSMIC:** *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*
- **Cr:** *Cromosoma*

D

- **DNA:** *Deoxyribonucleic Acid*

E

- **EDTA:** *Ácido etilendiaminotetraacético*
- **EMMA:** *European Mouse Mutant Archive*
- **Ex:** *Exón*

F

- **FACS:** *Fluorescence Activated Cell Sorting*
- **FCS:** *Suero bovino fetal*
- **FDR:** *False Discovery Rate*
- **FITC:** *Isotiocianato de fluoresceína*

G

- **GSEA:** *Gene Set Enrichment Analysis*

H

- **HDAC:** *Histone Deacetylase*
- **HSC:** *Hematopoietic Stem Cell*
- **HS/PC:** *Hematopoietic Stem/Progenitor Cell*
- **H3K4me3:** Histona H3 trimetilada en la lisina 4

I

- **iAMP21:** Amplificación intracromosómica del cromosoma 21
- **Ig:** Inmunoglobulina

K

- **KDM:** *Lysine-specific demethylase*

L

- **LPS:** *Lipopolysaccharide*
- **LRP:** *Lineage Restricted Progenitor*
- **LT-HSC:** *Long-Term HSC*

M

- **MACS:** *Magnetic Activated Cell Sorting*
- **MHV:** *Mouse Hepatitis Virus*
- **MO:** Médula Ósea
- **mRNA:** *Messenger RNA*

P

- **Pb:** Par de bases
- **PBS:** Tampón fosfato salino
- **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa
- **PE:** Ficoeritrina
- **PI:** *Propidium Iodide*
- **PI3K δ :** Fosfoinositol 3-kinasa isoforma δ
- **PMT:** *Protein Methyltransferase*

Q

- **qPCR:** PCR cuantitativa

R

- **RAG:** *Recombination Activating Genes*
- **RCLB:** *Red Cell Lysis Buffer*
- **RMA:** *Robust Microarray Analysis*
- **RNA:** *Ribonucleic Acid*
- **RSS:** *Recombination Signal Sequences*
- **RT-PCR:** PCR de Transcripción Reversa

S

- **SAM:** *Significance Analysis of Microarray*
- **SDS:** Dodecil Sulfato Sódico
- **SHM:** Mutación Hipersomática
- **SNC:** Sistem Nervioso Central
- **SNP:** *Single Nucleotide Polymorphism*
- **SNV:** *Single Nucleotide Variation*
- **SP:** Sangre Periférica
- **SPF:** *Specific Pathogen Free*
- **ST-HSC:** *Short-Term HSC*

T

- **T-ALL:** *T cell Acute Lymphoblastic Leukemia*
- **TCR:** *T Cell Receptor*

W

- **WES:** *Whole Exome Sequencing*
- **WGS:** *Whole Genome Sequencing*
- **WT:** *Wild Type*

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. La leucemia linfoblástica aguda

1.1. Definición y características de la leucemia linfoblástica aguda (ALL)

La leucemia linfoblástica aguda (**ALL**, de sus siglas en inglés *Acute Lymphoblastic Leukemia*) es una neoplasia hematológica caracterizada por una transformación y proliferación maligna de células precursoras linfoides en la médula ósea¹. Entre los síntomas de la ALL se incluyen la aparición de contusiones o sangrados debido a la trombocitopenia, palidez, fatiga causada por la anemia, e infección por la neutropenia. La infiltración del hígado, bazo, nódulos linfáticos y el mediastino es común en el diagnóstico. Se puede producir también, infiltración del sistema nervioso central (SNC) o de los testículos, que hará necesaria una modificación en la terapia².

La ALL se da tanto en niños como en adultos, pero la distribución de la enfermedad varía en función de la edad, presentando un pico de incidencia entre los 2 y los 5 años^{3,4}. Se estima que durante este año 2019 en Estados Unidos, se diagnosticarán 5930 nuevos casos de ALL, y 1500 personas morirán a causa de esta enfermedad⁵. La ALL infantil es el cáncer pediátrico más común y supone aproximadamente un tercio de los casos de cáncer en las sociedades desarrolladas⁶. Esta variación en función de la edad se da también en otros tipos de tumor. El espectro de tipos de cáncer varía, de manera que los tumores pediátricos más frecuentes son la ALL y distintos tumores del sistema nervioso, como el meduloblastoma o el neuroblastoma. Mientras que en la edad adulta los tipos de cáncer más frecuentes son los tumores epiteliales como los tumores gastrointestinales, del tracto genital masculino, de pulmón o mama. Esta diferencia en la distribución del tipo de tumores no es inesperada, ya que se cree que muchos cánceres pediátricos se inician en tejidos en desarrollo con gran expansión durante la formación temprana de órganos, crecimiento y maduración. Además, el espectro de alteraciones genéticas que dan lugar a la transformación tumoral, también diferirán entre cáncer infantil y adulto³.

De esta manera, los subtipos genéticos específicos de ALL también difieren de manera evidente entre niños y adultos. En la leucemia infantil la alteración genética más frecuente es la translocación cromosómica *ETV6-RUNX1* (20%), mientras la ALL en adultos viene caracterizada en el 25% de los casos por la translocación *BCR-ABL1*^{3,7}.

Actualmente, la ALL es uno de los cánceres con mayor tasa de curación, con una supervivencia total a 5 años en más del 90% de los casos en muchos países desarrollados⁷. Esta alta supervivencia de los pacientes es debida a una mejora de la eficacia de los regímenes de poliquimioterapia y por la estratificación de la intensidad del tratamiento de acuerdo a las características clínicas del paciente, de las características biológicas de las células leucémicas y a la respuesta temprana al tratamiento. En conjunto, todos estos avances han incrementado la tasa de supervivencia desde menos de un 10% en la década de los 60 hasta un 90% en los años 2000 (**Figura 1**)^{2,7}. A todo esto debemos añadir el progreso en el descubrimiento de

anormalidades genéticas con relevancia en pronóstico y tratamiento, así como mejoras en la atención de los pacientes^{7,8}.

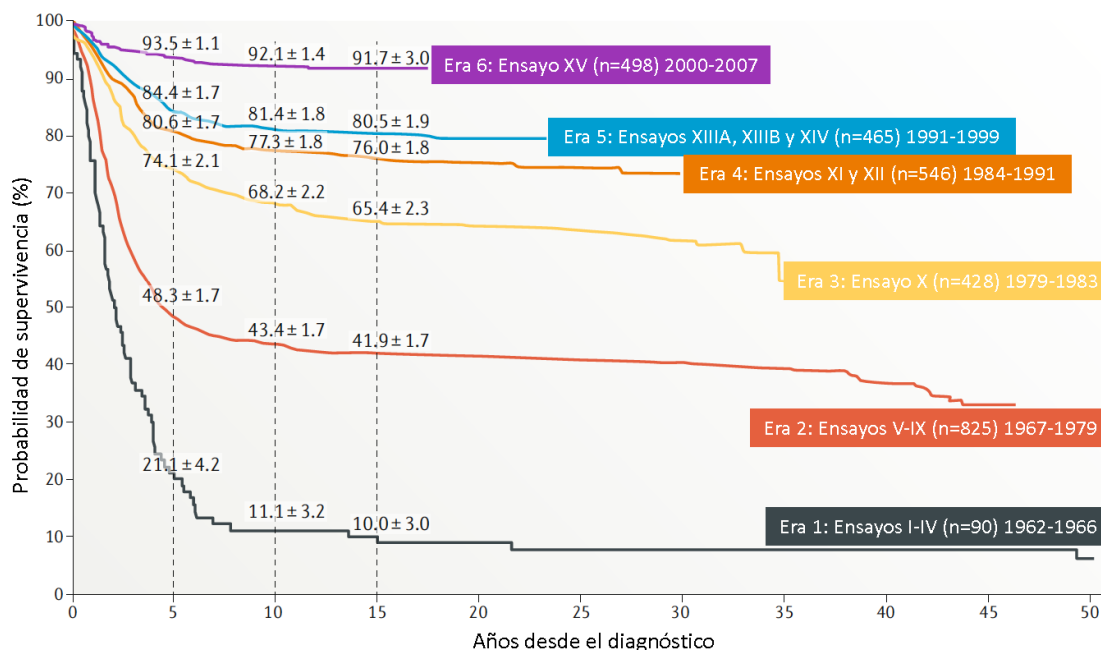


Figura 1. Mejoras en la supervivencia de pacientes pediátricos con ALL con la evolución del tratamiento⁷. Se muestran las curvas de supervivencia total de 6 eras definidas por la introducción de distintas estrategias de tratamiento para 2852 niños diagnosticados de ALL que han sido incluidos en 15 estudios consecutivos de tratamiento (I-XV) en el *St. Jude Children`s Research Hospital* desde 1962 hasta 2007. (Adaptada de Pui, C.-H. *et al. Nature Reviews Clinical Oncology* 2019)

El tratamiento típicamente se extiende durante 2 ó 2,5 años, y comprende 3 fases: inducción de la remisión, intensificación o consolidación, y continuación o mantenimiento^{2,4}. La terapia de inducción dura de 4 a 6 semanas e incluye glucocorticoides (prednisona o dexametasona), vincristina, una preparación de asparaginasa, opcionalmente antraciclinas y quimioterapia intratecal. Se logra la remisión en casi todos los pacientes, pero esto no es una cura, ya que las recaídas ocurren muy frecuentemente sin terapia adicional². Tras la remisión, el tratamiento incluye de 6 a 8 meses de una intensa combinación de quimioterapia que está diseñada para consolidar la remisión y prevenir el desarrollo de leucemia en el Sistema Nervioso Central (SNC). Se administran ciclos repetidos de metotrexato, administrado en infusión intravenosa corta o en altas dosis más de 24 horas, seguido de la administración de ácido folínico para minimizar los efectos tóxicos en los tejidos normales². Después, los pacientes reciben una terapia de mantenimiento de baja intensidad basada en antimetabolitos. Esta terapia dura entre 18 y 30 meses y consiste en mercaptopurina o tioguanina oral diaria y metotrexato oral semanal. Algunos regímenes también incluyen administraciones periódicas entre 5 y 7 días de glucocorticoides y vincristina². El trasplante alogénico es mucho más usado tras la recaída (más del 50% de los casos) que como terapia primaria (5-10% de los pacientes)².

Un problema añadido del tratamiento viene debido a que la terapia de mantenimiento es prolongada en el tiempo y requiere la administración oral de manera diaria. No ser

constantes en el tratamiento está asociado con un riesgo de recaída que llega a ser hasta 4 veces menor en aquellos pacientes con una adherencia al tratamiento del 90% o más⁹.

A pesar de la eficacia del tratamiento comentada se producen recidivas en el 10-20% de los casos de niños con ALL, presentando una tasa de curación más baja en la recaída (50% o menor). Como factores de peor pronóstico en la recaída se incluyen: un menor tiempo de recaída, inmunofenotipo de células T o recaída en la médula ósea en vez de ser una recaída extramedular². Además, tras el tratamiento, el 1-2% de los niños con ALL mueren a causa de los efectos secundarios. Los problemas más comunes asociados al tratamiento suelen ser osteonecrosis, síndromes metabólicos, obesidad, problemas cardiovasculares y afectación del sistema nervioso central y periférico².

Por otra parte, es importante tener presente información del patrón de mutaciones germinales o somáticas adquiridas, ya que pueden influir en la respuesta al tratamiento o en los efectos adversos y la toxicidad asociada⁷. Por ejemplo, en individuos con alteraciones en genes de reparación del DNA el uso de quimioterapia en dosis estándar puede tener graves complicaciones, mientras que dosis más bajas pueden no tener efecto terapéutico⁷. Entre otros casos, se ha visto que mutaciones en *CREBBP* o *IKZF1* están asociadas a la resistencia al tratamiento con glucocorticoides^{2,7}.

1.2. Etiología de la ALL

La leucemia linfoblástica aguda, como el cáncer en general, surge como resultado de la interacción entre exposiciones ambientales y una susceptibilidad genética. El gran reto en la lucha contra esta enfermedad reside en identificar las exposiciones relevantes, variantes genéticas y descifrar cómo y cuándo estos factores contribuyen al desarrollo de la leucemia^{4,10}.

Múltiples estudios han intentado relacionar distintos factores ambientales con el desarrollo de ALL, pero la asociación es débil, inconsistente y con falta de evidencias biológicas⁶. Como factores que pueden aumentar la incidencia de ALL se encuentran el elevado peso en el nacimiento, el uso casero de pesticidas, el tabaco, la dieta, la exposición a productos químicos como disolventes e hidrocarburos y contaminación ambiental^{6,10}. Por el contrario, otros factores pueden disminuir la incidencia de ALL como la exposición temprana a infecciones⁶, que puede darse en edades tempranas en las guarderías¹¹. También el orden en el nacimiento puede influir, siendo los primogénitos los que presentan un mayor riesgo a desarrollar ALL al no estar en contacto a infecciones desde el nacimiento¹². Por otra parte, la lactancia durante la infancia proporciona nutrientes, anticuerpos, moléculas antiinflamatorias y microorganismos (lactobacilli)⁶. Se han publicado distintos meta-análisis con conclusiones concordantes en este sentido. El último de ellos indica una reducción en el riesgo de ALL de un 20% para lactancias de 6 meses o más¹³.

Si la exposición temprana a infección reduce el riesgo de desarrollar ALL, es de esperar que la vacunación tenga un efecto en el desarrollo de ALL. No hay resultados consistentes, salvo por una excepción, la inmunización contra *Haemophilus influenzae*

tipo B en la infancia parece que confiere un grado de protección contra el desarrollo de la leucemia¹⁴.

Existe controversia con otros factores ambientales, como puede ser la exposición a campos electromagnéticos. Se sugiere que altos niveles de radiación electromagnética de muy baja frecuencia están asociados con un riesgo ligeramente mayor de desarrollar ALL. Estos resultados son inciertos al no haber ninguna prueba biológica en modelos *in vitro* o *in vivo*^{4,15}.

En la actualidad, el único agente ambiental reconocido, asociado al desarrollo de ALL es la radiación ionizante, como demuestran tanto estudios relacionados con la incidencia de leucemia de los supervivientes de la bomba atómica en las zonas de Hiroshima y Nagasaki¹⁶, como estudios en niños que han sido expuestos a rayos X durante el embarazo¹⁷, o tras el nacimiento¹⁸.

1.3. La teoría de la infección como causante de la ALL

La idea de que las infecciones pueden tener un papel causal en la ALL infantil se propuso hace ya, aproximadamente, 100 años¹⁹. Más tarde en 1988, se presentaron dos hipótesis que sugerían que la leucemia infantil se da como consecuencia de una respuesta inmune anormal a infecciones comunes⁶. La primera de ellas fue propuesta por el epidemiólogo Leo Kinlen. Esta teoría se basaba en incrementos localizados y transitorios de la incidencia de leucemia infantil que podrían ser atribuidos, epidemiológicamente, a la mezcla entre distintas poblaciones^{20,21}. Esta es la llamada “*population-mixing hypothesis*”. El modelo de Kinlen propone que la leucemia infantil está causada por una reacción rara o anormal a una infección común de baja patogenicidad en una población de riesgo debido a la migración.

El otro modelo, propuesto por Mel Greaves, es el llamado modelo de la “*delayed infection*” y es aplicado específicamente a la *B cell precursor childhood ALL* (BCP-ALL)^{10,22}. Greaves propone que un retraso en la exposición a un ambiente patogénico en la infancia, puede dar lugar a respuestas inmunes desreguladas a infecciones comunes que pueden desencadenar en el desarrollo de BCP-ALL. El aumento de la incidencia de leucemia infantil en sociedades desarrolladas²³⁻²⁵ es, por tanto, una paradoja del progreso. Además, relaciona la exposición a infección con el proceso natural de la enfermedad, de manera que una respuesta inmune anormal a infecciones, indirectamente da lugar a los eventos mutacionales necesarios para el desarrollo de la ALL⁶.

No se ha propuesto un tipo de infección específico como causante del desarrollo de la leucemia, ni en relación con una posible protección en las fases tempranas del desarrollo del niño. Y el mecanismo inmunológico es considerado que es indirecto, y por lo tanto, no es semejante a un virus que cause la transformación⁶.

1.4. Susceptibilidad genética en el desarrollo de la ALL

Los avances en las técnicas de secuenciación masiva de DNA y RNA, han revolucionado el conocimiento de la genómica de la ALL²⁶⁻²⁸. Actualmente, el 90% de las ALL infantiles se pueden clasificar en distintos subtipos genéticos (**Figura 2**)⁷.

Estos subtipos pueden estar definidos por altas hiperdiploidías (50-67 cromosomas); hipodiploidías (44 cromosomas o menos); distintos genes de fusión como *BCR-ABL1* o cromosoma Philadelphia (Ph), *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, o reordenamientos *KMT2A* también conocido como *MLL*⁷. Recientemente se han identificado nuevos subtipos de ALL. Por ejemplo, *BCR-ABL1-like*, *ETV6-RUNX1-like*, *iAMP21* con amplificación del cromosoma 21 y reordenamientos de *DUX4*, *MEF2D* y *ZNF384*.⁷

Muchas de estas alteraciones cromosómicas interrumpen genes que regulan la correcta hematopoesis y el desarrollo linfoide (por ejemplo, *RUNX1* y *ETV6*), activan oncogenes como *MYC*, o activan constitutivamente tirosin-kinasas como *ABL1*. Muchas de estas alteraciones están asociadas con el pronóstico de la enfermedad, sobre todo en leucemias de linaje B. La alta hiperploidía y el reordenamiento *ETV6-RUNX1* están asociados con un pronóstico favorable, mientras que la baja hipodiploidía y los reordenamientos *MLL* están asociados con mal pronóstico, en ambos, niños y adultos⁴.

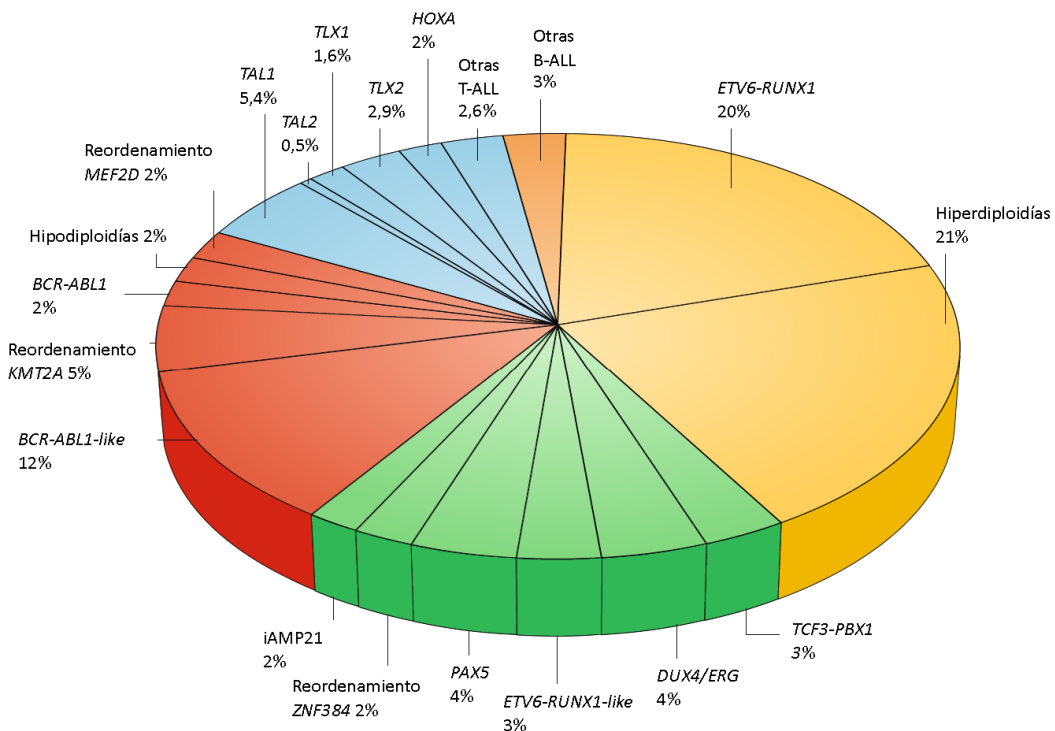


Figura 2. Frecuencia estimada de subtipos genéticos específicos de ALL infantil⁷. Las leucemias de células T están representadas en azul. Entre las leucemias de células B, los subtipos de bajo riesgo aparecen de color amarillo, los de riesgo intermedio en verde y las B-ALL de alto riesgo son de color rojo. (Adaptada de Pui, C.-H. et al. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2019)

Mediante el estudio del genoma completo, se han visto múltiples mutaciones frecuentes en ALL, pero generalmente no son consideradas como eventos iniciales de la leucemia, sino como eventos secundarios o cooperantes. Estas alteraciones incluyen genes implicados en el desarrollo linfóide (*PAX5*, *IKZF1* y *EBF1*), genes supresores de tumores (*CDKN2A/CDKN2B*, *PTEN* y *RB1*), receptores de la señalización de citocinas (*CRLF2*, *IL7R* y *FLT3*), señalización de RAS (*NRAS*, *KRAS* y *PTPN11*), reguladores transcripcionales (*ETV6*, *ERG*, *TBL1XR1* y *CREBBP*) y modificadores epigenéticos (*CREBBP*, *EP300*, *SETD2* y *NSD2* también conocido como *WHSC1*)⁷.

Aunque también se han identificado mutaciones germinales en *PAX5*, *ETV6* e *IKZF1*⁷ que predisponen a desarrollar ALL y en este caso sí que se tratarían de un evento iniciador.

1.4.1. Gen de fusión *ETV6-RUNX1*

La translocación cromosómica *t(12;21)(p13;q22)* da lugar a la fusión *ETV6-RUNX1* como resultado de la unión de dos reguladores críticos de la hematopoyesis, juntando la porción 5' del gen *ETV6* (*TEL*) en el cromosoma 12p13 y prácticamente el gen entero de *RUNX1* (*AML1*) en el cromosoma 21q22²⁹.

ETV6 es un miembro de la familia de factores de transcripción ETS (*E-26 transforming specific*). Todas las proteínas de la familia ETS comparten un dominio proteico muy conservado, el dominio ETS (**Figura 3**). Este dominio ETS es un dominio de unión a DNA, pero también media interacciones proteína-proteína. El otro dominio de *ETV6* es el dominio localizado en el extremo N-terminal llamado *pointed*, *SAM* (*sterile alpha motif*) o dominio HLH, y es incluso, más conservado en la evolución y se encuentra en muchos miembros de la familia ETS. Este dominio se encontró en levaduras, está implicado en la homo y heterodimerización de factores de transcripción y en la transmisión de señales, como por ejemplo en la ruta de las MAPK³⁰.

Los CBFs o *Core-binding factors* son un grupo de factores de transcripción heterodiméricos que consisten en una subunidad *RUNX* de unión a DNA, y su pareja la subunidad *CBFβ*. Hay tres genes *RUNX* en mamíferos, *RUNX1*, *RUNX2* y *RUNX3*, cada uno de los cuales codifica una proteína con un dominio muy conservado N-terminal *RUNT* de unión a DNA y una región C-terminal que contiene dominios de transactivación (TAD) y represión que median la interacción con otros factores reguladores³¹ (**Figura 3**). Los tres miembros de la familia *RUNX* tienen papeles distintos específicos de tejido y restringidos en linaje celular. *RUNX1* es esencial para el desarrollo de la hematopoyesis, *RUNX2* es un regulador de la osteogénesis, mientras que *RUNX3* tiene un papel central en el desarrollo neural y de los linfocitos T³²⁻³⁴.

La ausencia completa de *Etv6* y *Runx1* resulta letal en embriones^{31,35} ocasionando defectos en el desarrollo del sistema nervioso, en la angiogénesis y en la hematopoyesis^{32,36,37}. En adultos, *Etv6* es necesario para la supervivencia de las HSCs (*hematopoietic stem cell*)³⁸ y el establecimiento de la hematopoyesis en la médula ósea³⁹, mientras que *Runx1* es necesario para la maduración de progenitores más diferenciados⁴⁰.

La proteína de fusión ETV6-RUNX1 comprende el dominio *pointed* de ETV6 y el dominio de unión a DNA y transactivación de RUNX1³⁰ (**Figura 3**).

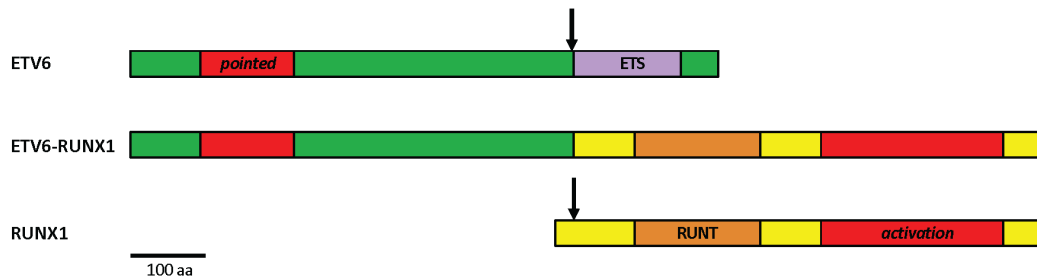


Figura 3. Diagrama de ETV6, RUNX1 y ETV6-RUNX1³⁰. Diagrama esquemático de las proteínas ETV6, RUNX1 y la proteína de fusión ETV6-RUNX1. Los dominios proteicos y los puntos de ruptura aparecen señalados en el esquema. (Adaptada de Bohlander, S. K. *Seminars in Cancer Biology* 2005)

El gen de fusión *ETV6-RUNX1* es la alteración génica más común en el cáncer pediátrico y tiene lugar en aproximadamente el 20% de las ALL infantiles^{3,7}. Este gen de fusión es uno de los ejemplos más característicos de asociación genotipo-fenotipo. Su presencia se asocia sólo con B-ALL y parece que confiere un bajo riesgo de desarrollar leucemia⁴¹. La B-ALL *ETV6-RUNX1+* es una enfermedad maligna clonal que tiene su origen en una célula individual y está caracterizada por una acumulación de células B inmaduras que son fenotípicamente similares a estados normales de la diferenciación de las células B. Esto da lugar finalmente, a la supresión de la hematopoyesis normal y a la infiltración de otros órganos vitales²⁹. Estas células en la B-ALL *ETV6-RUNX1+* son generalmente consideradas como la otra cara de precursores B normales, pero el origen de esta leucemia es todavía un tema de discusión, dado el hecho de que la enfermedad humana se diagnostica en etapas tardías y su evolución no puede ser monitorizada desde la célula de origen^{29,42}.

Estudios evaluando la sangre de cordón umbilical, gemelos monozigóticos y sangre del talón de Aquiles de niños con ALL muestran que la fusión *ETV6-RUNX1* es un evento iniciante que normalmente tiene lugar en el útero, dando lugar a un estado preleucémico, con un periodo de latencia tras el nacimiento de hasta 10-14 años^{6,43-45}. Además, se ha caracterizado que al menos el 5% de los niños que nacen presentan la fusión *ETV6-RUNX1*⁴⁶; sin embargo, la incidencia de la enfermedad es mucho menor ($1/10^5$)⁶. *ETV6-RUNX1* no es suficiente para el desarrollo de la leucemia y son necesarias alteraciones adicionales para la transformación tumoral⁶. Mediante análisis de alta resolución del genoma se han caracterizado múltiples lesiones genéticas adicionales en la leucemias *ETV6-RUNX1+*⁴⁷, como por ejemplo, genes implicados en el ciclo celular y en la diferenciación de linaje B (*CDKN2A* o *PAX5*), o ganancias o pérdidas cromosómicas⁶. Además, la fusión génica *ETV6-RUNX1* a menudo tiene lugar junto a mutaciones somáticas en el alelo intacto de *ETV6*, sugiriendo que la pérdida de función de *ETV6* contribuye al desarrollo de la leucemia⁴⁸⁻⁵⁰. Estos eventos secundarios frecuentemente son mediados por la actividad recombinasa de RAG y de manera poco frecuente, por mutaciones puntuales⁵¹. Por otra parte, mediante la secuenciación de RNA, se ha identificado un nuevo subtipo de ALL, *ETV6-RUNX1-like* con el mismo perfil de expresión

génica que las ALL con *ETV6-RUNX1* y coexistiendo alteraciones en *ETV6* e *IKZF1*, pero sin el transcrito de fusión⁵².

La mayoría de estudios muestran que *ETV6-RUNX1* es un predictor de pronóstico favorable, lo que ha permitido reducir la intensidad del tratamiento en este subgrupo de pacientes⁵³, con la excepción de esos pacientes con enfermedad mínima residual persistente que presentan peor pronóstico⁵⁴. La tasa total de cura es excelente (aproximadamente del 90%); sin embargo, el tratamiento está asociado con efectos adversos muy severos, secuelas a largo plazo y un porcentaje significativo de los niños sufren recaídas⁵⁵. Por lo tanto, las estrategias de prevención son claramente superiores a cualquier mejora en el tratamiento. El prerrequisito para poder desarrollar estas estrategias es descubrir la etiología de la B-ALL *ETV6-RUNX1*²⁹.

1.4.2. Predisposición a leucemia asociada a *PAX5*⁷

PAX5 es un factor de transcripción de las células B que tiene tanto funciones activantes como represoras^{56,57}. Esta proteína se expresa durante el desarrollo linfóide B y tiene distintas dianas, que incluyen importantes genes para el desarrollo B, como por ejemplo *CD19*, *CD79A* y *BLNK* (también conocido como *SLP65*) entre otros⁵⁷.

PAX5 es esencial para el correcto desarrollo de las células B y juega un papel crucial en los tumores linfoides. Se sabe que ratones deficientes en *Pax5* presentan anomalías graves en el desarrollo B debido a un bloqueo temprano en la diferenciación celular⁵⁸⁻⁶⁰, mientras que la delección condicional de *Pax5* en células B maduras da lugar a su conversión a células T y al desarrollo de linfomas T⁶¹.

En humanos, *PAX5* es un locus común para mutaciones somáticas en B-ALL. Este gen se encuentra delecionado, reordenado o alterado de otras maneras en aproximadamente el 30% de los pacientes con B-ALL^{62,63}. Se ha descrito el papel de *PAX5* en la predisposición autosómica dominante al desarrollo de B-ALL en tres familias no relacionadas, cada una de las cuales tienen varios niños que han desarrollado ALL. Todos estos niños presentaban la misma mutación *missense* en línea germinal, *PAX5* p.G183S^{63,64}. Todas las muestras de B-ALL presentaban pérdida somática del alelo *PAX5 wild type*, que ocurría a través de la formación de un isocromosoma 9q o de un cromosoma dicéntrico 9q^{63,64}. Dentro de estas familias, otros muchos individuos eran portadores heterocigotos de la misma mutación de *PAX5* p.G183S pero no desarrollaron la leucemia, sugiriendo que esta mutación confiere susceptibilidad al desarrollo de ALL pero con una penetrancia incompleta^{63,64}. De esta manera, a pesar del modo de herencia autosómica dominante, la inactivación bialélica de *PAX5* parece ser esencial para el desarrollo de leucemias de células B. Además, a pesar del papel esencial en ratón de *Pax5* en el desarrollo linfóide B⁵⁸⁻⁶⁰, ninguno de los portadores de la mutación de *PAX5* p.G183S presentan evidencias de inmunodeficiencias de células B^{63,64}.

Estudios funcionales han revelado que el alelo mutante de *PAX5* G183S tiene una modesta, pero importante reducción de la actividad transcripcional comparado con el alelo *PAX5 wild type*⁶³. Estos descubrimientos y otros, sugieren que la variante G183S

da lugar a una parcial, pero no completa, pérdida de la actividad de PAX5. Por ejemplo, la observación de individuos que son portadores heterocigotos para la mutación de *PAX5* presentan un fenotipo de células B normal, indicando que la variante mutante es capaz de mantener el desarrollo normal de células B en presencia del alelo *PAX5 wild type*; sin embargo en portadores de la mutación, el nivel remanente de actividad funcional no es suficiente para prevenir el desarrollo de B-ALL tras la pérdida del alelo *wild type*⁷.

2. Modelo actual del desarrollo de ALL

2.1. ALL como proceso multietapa: Modelo del doble *hit* de la ALL infantil

Se ha establecido que la ALL infantil es una enfermedad multietapa con la acumulación de alteraciones genéticas que darán lugar al desarrollo de la enfermedad (**Figura 4**). Cada individuo presentará un fondo genético heredado que podrá influir en diversos procesos del desarrollo de la ALL, como por ejemplo la resistencia al tratamiento o que tengan lugar recaídas. En un primer paso se producirá una lesión prenatal, como por ejemplo *ETV6-RUNX1* o distintas hiperploidías. Se ha postulado que estas alteraciones aparecen espontáneamente, como un error en el desarrollo. Esto genera un clon preleucémico que puede permanecer clínicamente silente hasta 14 años y que es común en la población ya que se ha visto que hasta el 5% de los recién nacidos pueden ser portadores de la alteración genética⁴⁶. El segundo paso tiene lugar en una pequeña proporción de pacientes y es menos probable que suceda. En un clon preleucémico silente, una respuesta inmune anormal a una o más infecciones comunes puede dar lugar a la activación de AID (*activation-induced cytidine deaminase*), que junto con la proteína activadora de la recombinación V(D)J RAG1 y/o RAG2, inducen alteraciones genéticas secundarias (predominantemente *copy number alterations* CNAs) responsables del segundo paso que transforma por completo el clon preleucémico⁶.

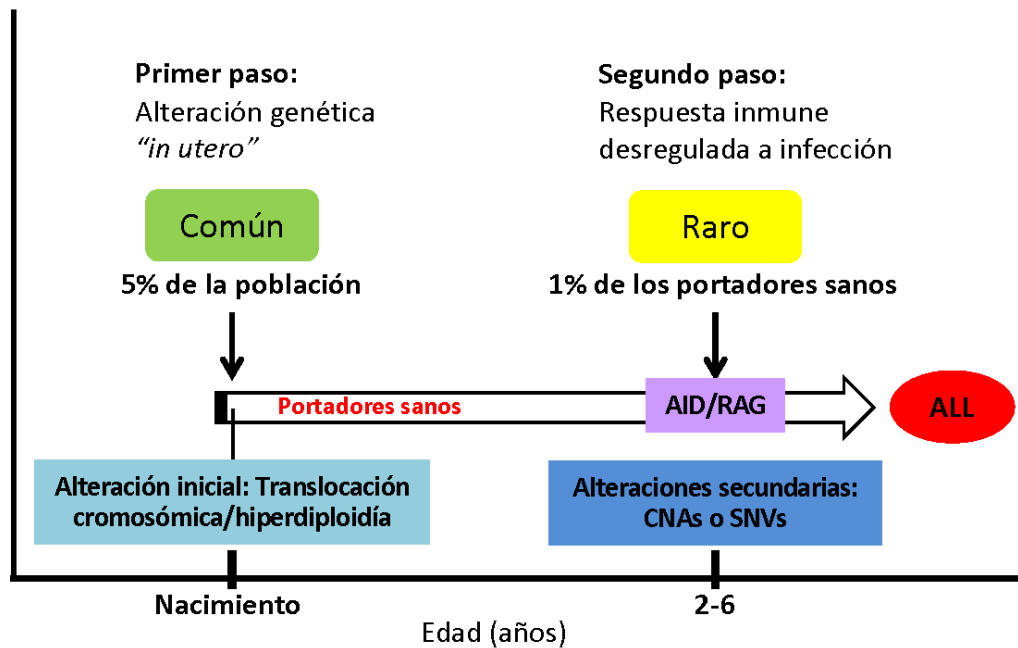


Figura 4. Resumen del modelo del doble hit en la B-ALL y la exposición a infección⁶. Esquema del modelo multietapa del desarrollo de la B-ALL. La acumulación de alteraciones genéticas dará lugar al desarrollo de leucemia. (Adaptado de Greaves, M. *Nature Reviews Cancer* 2018)

2.2. Papel de RAG en el proceso de transformación tumoral

Estudios previos han hipotetizado que muchas de las translocaciones y deleciones que se encuentran comúnmente en tumores linfoides son el resultado del reconocimiento de *cryptic recombination signal sequences* (RSS) por el complejo RAG y los consiguientes eventos de recombinación ilegítimos. Estas RSS se encontrarían cercanas a los puntos de ruptura de los loci afectados⁶⁵⁻⁶⁷. La recombinasa RAG, codificada por los genes *RAG1* y *RAG2* (*recombination activating genes 1 y 2*), es necesaria para el reordenamiento secuencial de los loci *V(D)J* de las inmunoglobulinas y el receptor de las células T, durante el desarrollo de las células B y T, respectivamente. A pesar de que la expresión de estos genes está estrechamente controlada durante la diferenciación B y T, muchas B-ALL expresan ambos genes constitutivamente^{35,68}.

Recientemente, mediante estudios de secuenciación del genoma y del exoma, se ha examinado la asociación entre las RSS y los puntos de ruptura genómicos de las variaciones estructurales encontradas en la ALL t(12;21)⁵¹. De manera interesante, se encontraron RSS canónicas en el 12% de los casos, motivos truncados RSS en el 40%, y secuencias de nucleótidos *non-templated*, características de la actividad *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) normalmente asociada con la recombinación *V(D)J*, en el 70% de estas rupturas genómicas. La mayoría de estas variantes genómicas estructurales se encontraron en las regiones promotoras o *enhancer* de genes activos, incluyendo genes afectados frecuentemente por alteraciones genómicas en B-ALL, como por ejemplo, *ETV6*, *BTG1*, *TBL1XR1*, *RAG2* y *CDKN2A-CDKN2B*³⁵. De hecho, ya se había visto previamente que un gran número de deleciones de *BTG1* asociadas a *ETV6-RUNX1* contenían RSS en ambos lados⁶⁵. Esto sugiere que los eventos secundarios de deleción que dan lugar a la transformación tumoral en presencia de *ETV6-RUNX1*

resultan principalmente de reordenamientos genómicos mediados por actividad aberrante y continua de RAG^{35,51}.

Se ha sugerido que la recombinación V(D)J está regulada por la modulación de la estructura de la cromatina durante el desarrollo linfocítico⁶⁹. RAG2, componente esencial de la recombinasa V(D)J RAG1/2, contiene un dominio PHD (*plant homeodomain finger*) que reconoce específicamente la histona H3 trimetilada en la lisina 4 (H3K4me3)⁷⁰. Errores en el reconocimiento de la H3K4me3 por el complejo RAG, reducen la actividad de la recombinasa de manera importante. De esta manera, el reconocimiento de H3K4me3 de RAG2 es necesaria para la recombinación V(D)J⁷⁰.

2.3. Genes modificadores de la cromatina: *KDM5C*

Los procesos epigenéticos controlan la transcripción de genes dando lugar a los distintos patrones de expresión en diferentes órganos y tejidos. La metilación de las lisinas es una de las modificaciones de las histonas más importantes, y tiene un papel crucial en la formación de la heterocromatina, en la inactivación del cromosoma X y en la regulación de la transcripción. La metilación de las lisinas tiene lugar en las histonas H3 y H4, y su metilación da lugar a tres diferentes estados de metilación (mono-, di-, tri-) que están asociados con diferentes estados transcripcionales^{71,72}.

El gen *KDM5C* (*Lysine-specific demethylase 5C*)⁷² está localizado en el cromosoma X y codifica una proteína expresada ubicuamente, que juega un papel importante en la regulación transcripcional y en el remodelado de la cromatina⁷³. La proteína *KDM5C* pertenece a la subfamilia de proteínas JARID que contienen el dominio JmjC. La función del dominio JmjC es demetilar específicamente lisinas 4 di- y trimetiladas en la histona 3⁷⁴. *KDM5C* actúa como un represor transcripcional y se han descrito mutaciones en el gen *KDM5C* asociadas a retraso mental ligado al cromosoma X (XLMR *X-linked mental retardation*) y al síndrome de Claes-Jensen^{74,75}.

2.4. Papel de *AID* en el proceso de transformación tumoral

Activation induced cytidine deaminase (*AID*) tiene un papel esencial en la inducción de la diversificación secundaria de los genes de las inmunoglobulinas (Ig) en los órganos linfoides secundarios en respuesta a antígeno. *AID* participa en la mutación hipersomática (SHM) y también en el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas en las células B⁷⁶. Además, *AID* puede promover translocaciones cromosómicas y mutaciones que contribuyen a la linfomagénesis de células B⁷⁷⁻⁸⁴. Igualmente, un estudio reciente con un modelo de ratón de linfoma de Burkitt endémico, que es causado por infección crónica, ha identificado a *AID* como evento iniciador o *driver* de la linfomagénesis de células B⁸⁵. En células preB normales, se ha visto que la expresión de *AID* aumenta en el estado de desarrollo asociado con la señalización del BCR mediada por la downregulación de IL7R, simultáneo con un aumento de la expresión de RAG. De manera interesante, la estimulación de células preB con LPS (*inflammatory lipopolysaccharide*) en ausencia de IL-7 inducía la expresión de *AID*. Se ha demostrado

que ciclos de tratamiento de LPS, con la retirada de IL-7, cooperan con ETV6-RUNX1 para inducir B-ALL dependiente de AID y RAG⁸⁰. El estudio de Swaminathan *et al.* sugiere que la exposición a patógenos puede inducir la acumulación de mutaciones secundarias mediadas por AID y la progresión al desarrollo de leucemia^{35,80}.

3. Modelos animales de B-ALL ETV6-RUNX1+

Entender mejor cuál es la causa de las alteraciones iniciales y qué eventos están dando lugar a una transformación tumoral irreversible, pueden permitirnos prevenir el desarrollo de B-ALL en portadores preleucémicos. De esta manera, se podría llegar a hablar de la investigación de la leucemia infantil en términos de prevención de la enfermedad. Esta idea requiere un conocimiento preciso de los factores genéticos y epigenéticos que promueven el desarrollo de B-ALL, y cómo estos factores están influenciados por factores ambientales asociados al desarrollo de la leucemia, tales como la infección, la radiación ionizante de baja dosis, etc. Sin embargo, a día de hoy ha sido particularmente difícil encontrar los eventos moleculares implicados en la génesis temprana de la leucemia ETV6-RUNX1+, ya que normalmente, estos estadios no son detectados en niños y, cuando lo son, el material biológico disponible para investigación es muy limitado. Por lo tanto, son esenciales modelos preclínicos de B-ALL que ayuden a entender los mecanismos de transformación celular con el propósito de prevenir la enfermedad en un futuro²⁹.

3.1. Modelos transgénicos de pez cebra para B-ALL ETV6-RUNX1+ infantil

Este modelo animal se ha utilizado para determinar la célula de origen en la cual el gen de fusión ETV6-RUNX1 podría facilitar el desarrollo de B-ALL. Cuando la expresión de ETV6-RUNX1 está controlada con el promotor de *Rag2*, los peces cebra transgénicos no desarrollan ninguna leucemia, sugiriendo que la célula de origen de B-ALL no es un progenitor linfoide comprometido donde *Rag2* está activo⁸⁶. Por el contrario, la expresión de ETV6-RUNX1 bajo el control de promotores ubicuos da lugar a tumores de precursores de células B, sugiriendo que las leucemias asociadas a ETV6-RUNX1 solamente tienen lugar cuando se expresa ETV6-RUNX1 a un nivel de progenitores no comprometido⁸⁶.

Como en humanos, estas leucemias de células B aparecen con una baja penetrancia y larga latencia sugiriendo la necesidad de un segundo evento. Sin embargo, este modelo transgénico de pez cebra no ha sido capaz de identificar los eventos moleculares implicados en la génesis temprana de la leucemia ETV6-RUNX1+ y de definir si los factores ambientales asociados a la enfermedad humana influyen en el desarrollo de la leucemia²⁹.

3.2. Modelos murinos de leucemia infantil B-ALL *ETV6-RUNX1*⁺

Una aproximación ampliamente usada para intentar entender el desarrollo de la B-ALL infantil *ETV6-RUNX1*⁺ ha sido el trasplante de células B, humanas o murinas, que expresan *ETV6-RUNX1* en ratones inmunodeficientes. Estudios iniciales en líneas celulares de células proB mostraron que *ETV6-RUNX1* por sí mismo no podía conferir crecimiento independiente a factores de citocinas⁸⁷, coincidiendo con las observaciones descritas en pez cebra mencionadas anteriormente. Sin embargo, cuando se transducían con *ETV6-RUNX1* células de médula ósea total de ratones *wild type* aparecían leucemias esporádicas de células B o T, sugiriendo que un progenitor no comprometido podría ser la célula de origen de la leucemia *ETV6-RUNX1*⁺⁸⁸. De manera similar, ratones reconstituidos con progenitores hematopoyéticos transducidos con *ETV6-RUNX1* no desarrollaban leucemia, pero se observaba un sesgo en la diferenciación de los progenitores hacia célula B⁸⁹. En general, el trasplante de células B humanas o murinas que expresan *ETV6-RUNX1* en ratones inmunodeficientes han fallado reproduciendo la leucemia infantil B-ALL *ETV6-RUNX1*⁺^{90,91}. Además, esta aproximación experimental presenta distintas desventajas. Primero, estos modelos carecen de sistema inmunológico, en contraste con los niños donde aparece la leucemia. Segundo, muchos parámetros (sitio de inyección, parámetros de la purificación celular por citometría, pretratamiento de los recipientes con anticuerpos específicos, etc) influyen en la eficiencia del injerto y en la capacidad de las células inyectadas en los animales recipientes y esto se traduce en una falta de reproducibilidad y homogeneidad⁴². Además, otro problema principal es que el ratón recipiente debe ser irradiado con radiación gamma antes de la inyección de las células transducidas, haciendo que estos enfoques no sean prácticos para el estudio de los eventos moleculares implicados en la génesis temprana de la leucemia *ETV6-RUNX1*⁺ y de la contribución de los factores ambientales asociados, ya que la radiación ionizante de por sí produce leucemia. Por consiguiente, para reproducir fielmente todos los aspectos que intervienen en el desarrollo de la B-ALL, es necesario desarrollar experimentos en una aproximación experimental *in vivo* en la cual la leucemia aparezca en el microambiente adecuado²⁹.

Ya que el gen de fusión *ETV6-RUNX1* sólo está asociado a la B-ALL, se han desarrollado muchos modelos de ratón manipulados genéticamente para expresar *ETV6-RUNX1* en una célula B comprometida (**Tabla 1**)^{29,43,87-91}. Estos modelos permiten eludir las limitaciones y la variabilidad experimental de los modelos de xenotrasplante, pero estos ratones no desarrollan enfermedades hematológicas de ningún tipo. Recientemente, se ha generado un nuevo modelo transgénico de ratón *ETV6-RUNX1* con la expresión del gen de fusión restringida a las células B CD19⁺. Este modelo mostró que *ETV6-RUNX1* inducía especies reactivas de oxígeno y daba lugar a la acumulación de daño en el DNA en las células B⁹². Sin embargo, este modelo no daba lugar a leucemia⁹². Aún más, cuando el modelo CD19-*ETV6-RUNX1*⁹² se cruzaba con un modelo transgénico *vav-Bcl2* se generaba linfoma folicular de corta latencia⁹³, pero el ratón doble transgénico no desarrollaba B-ALL (**Tabla 1**). Estos intentos fallidos de modelar la leucemia infantil B-ALL *ETV6-RUNX1*⁺ expresando el gen de fusión en células B comprometidas sugiere que la célula de origen es una célula precursora hematopoyética no diferenciada²⁹.

Tabla 1. Principales modelos experimentales de *ETV6-RUNX1*

Diseño experimental	Fenotipo	Año	Referencia
Promotor/ <i>enhancer</i> de la cadena pesada de las inmunoglobulinas	Los ratones no desarrollan leucemia	2001	87
Transferencia génica con retrovirus	Leucemia de células T y leucemia mieloide	2002	88
HPCs de hígado fetal transducidas con vectores retrovirales	<i>ETV6-RUNX1</i> no induce leucemia en ratones trasplantados	2004	89
Modelo de trasplante de médula ósea	No se observa desarrollo de leucemia	2005	91
Expresión condicional de <i>ETV6-RUNX1</i> desde el promotor endógeno (<i>knock-in</i>)	Leucemia T tras mutagénesis química cuando <i>ETV6-RUNX1</i> se expresa en HSCs, pero no en progenitores linfoides tempranos	2009	94
Expresión constitutiva de <i>ETV6-RUNX1</i> desde el promotor endógeno	No se observa desarrollo de leucemia sin inducir mutagénesis aleatoria	2011	95
Expresión de <i>ETV6-RUNX1</i> desde un promotor de CMV y activado constitutivamente desde el nivel HSC fetal	No se observa el desarrollo de leucemia incluso en condiciones de exposición a irradiación de baja dosis	2013	96
Expresión de <i>ETV6-RUNX1</i> restringida a las células B CD19 ⁺	No se observa desarrollo de leucemia	2013	92
Expresión de <i>ETV6-RUNX1</i> restringida a HS/PCs	Baja incidencia de B-ALL en condiciones de exposición a patógenos comunes	2017	41

La siguiente generación de modelos murinos *ETV6-RUNX1* estaba basada en la expresión condicional del gen *RUNX1* bajo el control del locus endógeno *Etv6* del ratón. Así, *ETV6-RUNX1* es activado de manera específica en el tiempo y en tejido mediante la expresión de una Cre recombinasa⁹⁴. Schindler *et al.* observaron tumores en el linaje linfóide T tras mutagénesis con nitrosourea cuando la proteína ETV6-RUNX1 se expresaba en HSCs⁹⁴. Van der Weyden *et al.* utilizó una aproximación similar utilizando un *knock-in* constitutivo⁹⁵. Estos ratones no desarrollaban B-ALL espontáneamente. Sin embargo, cuando se hacía una mutagénesis insercional cruzando estos ratones con ratones portadores del transposón *Sleeping Beauty*, el 20% de la descendencia desarrollaba B-ALL, pero también desarrollaron leucemias de células T mucho más frecuentemente y aparecieron leucemias mieloides (**Tabla 1**)⁹⁵. De manera similar, la activación constitutiva de *ETV6-RUNX1* en HSCs fetales no dio lugar al desarrollo de leucemia incluso cuando los ratones fueron expuestos a radiación ionizante de baja dosis⁹⁶.

Hasta ahora, ningún modelo experimental de la translocación *t(12;21)(p13;q22)* ha recapitulado el fenotipo completo de la B-ALL, independientemente del modo y del tiempo de la expresión o del tipo de células diana. La incapacidad de generar B-ALL espontáneamente refleja la necesidad de eventos moleculares secundarios específicos, que no son inducidos de manera eficiente por las estrategias de mutagénesis usadas hasta ahora²⁹.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El modelo actual de desarrollo de la ALL infantil propone que la enfermedad tiene lugar en varios pasos. En la población en general, existen individuos con una determinada predisposición genética. Las células portadoras de estas anomalías serán clones preleucémicos que necesitan acumular otras alteraciones genéticas a lo largo del tiempo, como resultado de la acción de AID y RAG1/RAG2 ante una respuesta inmune anormal a infecciones comunes⁶. En algunos casos se transformarán en un clon leucémico que dará lugar al desarrollo completo de la enfermedad⁶. La alteración genética más común en la leucemia infantil es la fusión *ETV6-RUNX1*^{3,7}. Se sabe que al menos el 5% de los niños que nacen son portadores de esta alteración⁴⁶; sin embargo, la incidencia real de la enfermedad ($1/10^5$) es mucho menor que ese 5%⁶. Otro ejemplo de susceptibilidad genética asociada al desarrollo de ALL son las mutaciones en el gen *PAX5*. Estas mutaciones son comunes apareciendo en el 30% de los casos de ALL^{7,62,63}. Además, también se ha determinado que ser portador de mutaciones en *PAX5* no es suficiente para dar lugar al desarrollo de la enfermedad^{63,64}. Por consiguiente, algo más tiene que estar cooperando con esta susceptibilidad genética para dar lugar al desarrollo de ALL.

En un trabajo previo del laboratorio se ha caracterizado el modelo de ratón *Pax5-het*⁵⁸. Los ratones heterocigotos para *Pax5* presentan anomalías en el desarrollo linfocitario B y desarrollan B-ALL con una incidencia del 22% sólo bajo la exposición a patógenos comunes. Además, se han caracterizado las alteraciones secundarias de estas leucemias y se ha encontrado alterada la ruta *JAK-STAT* por mutaciones activantes en el gen *Jak3*. Así, este modelo mimetiza la enfermedad humana en penetrancia, fenotipo y en el evento secundario implicado. Pero no sabemos si estos descubrimientos son generales para la B-ALL infantil.

Por otra parte, se ha propuesto que AID es clave para la transformación tumoral bajo la exposición a infección y teniendo una predisposición genética⁶. Pero hay ciertos datos que no son compatibles con el modelo actual del desarrollo de la ALL infantil. El primero de ellos deriva del hecho de que un porcentaje bajo de los portadores de genes de susceptibilidad desarrollan B-ALL. Este hecho contrasta con los procesos dependientes de AID donde la incidencia de la enfermedad mediada por infección es del 100%⁸⁵. Segundo, recientemente se han identificado los genes diana de AID en el genoma del ratón⁸⁴. Sin embargo, las mutaciones encontradas en las leucemias murinas *Pax5-het* no se encuentran entre las dianas de AID. Así pues, el modelo actual propuesto para el desarrollo de la leucemia linfoblástica aguda no es compatible con dichas evidencias experimentales.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Estudiar si la exposición a infección como causante de la B-ALL es generalizable a otros modelos de susceptibilidad genética que no sean alteraciones en *PAX5*, utilizando el modelo de ratón *Sca1-ETV6-RUNX1*.
2. Determinar la influencia de la célula de origen y de las alteraciones secundarias en el desarrollo de la B-ALL *ETV6-RUNX1+*.
3. Determinar si la acción de AID es necesaria para la acumulación de alteraciones genéticas secundarias en el desarrollo de B-ALL mediada por la exposición a infección.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. La expresión de la fusión *ETV6-RUNX1* en el compartimento *stem* hematopoyético induce al desarrollo de la B-ALL con baja incidencia en condiciones de exposición a patógenos comunes

1.1. Desarrollo de un modelo murino cuyos precursores hematopoyéticos expresan *ETV6-RUNX1* dando lugar a un compartimento preleucémico. Características del modelo murino *Sca1-ETV6-RUNX1*

La expresión del transcrito *ETV6-RUNX1* no se detecta en progenitores de células B de niños sanos portadores del clon preleucémico^{44,97}. Por esta razón, hemos generado una cepa de ratón que mimetiza este escenario, expresando *ETV6-RUNX1* específicamente en las células *stem/progenitoras* hematopoyéticas (HS/PC, de sus siglas en inglés *Hematopoietic Stem/Progenitor Cells*). Con este fin introdujimos el cDNA humano *ETV6-RUNX1* bajo el control del promotor *Sca1* (Figura 5). Este sistema asegura la expresión de *ETV6-RUNX1* en las HS/PCs⁹⁸⁻¹⁰⁰. Así, la expresión del transgén *Sca1-ETV6-RUNX1* se detectaba en HS/PCs pero no en células proB o estadios más tardíos de la diferenciación B gracias a la capacidad de los elementos reguladores de *Sca1* para restringir la expresión del transgén en las células *Sca1*⁺ (Figura 6).

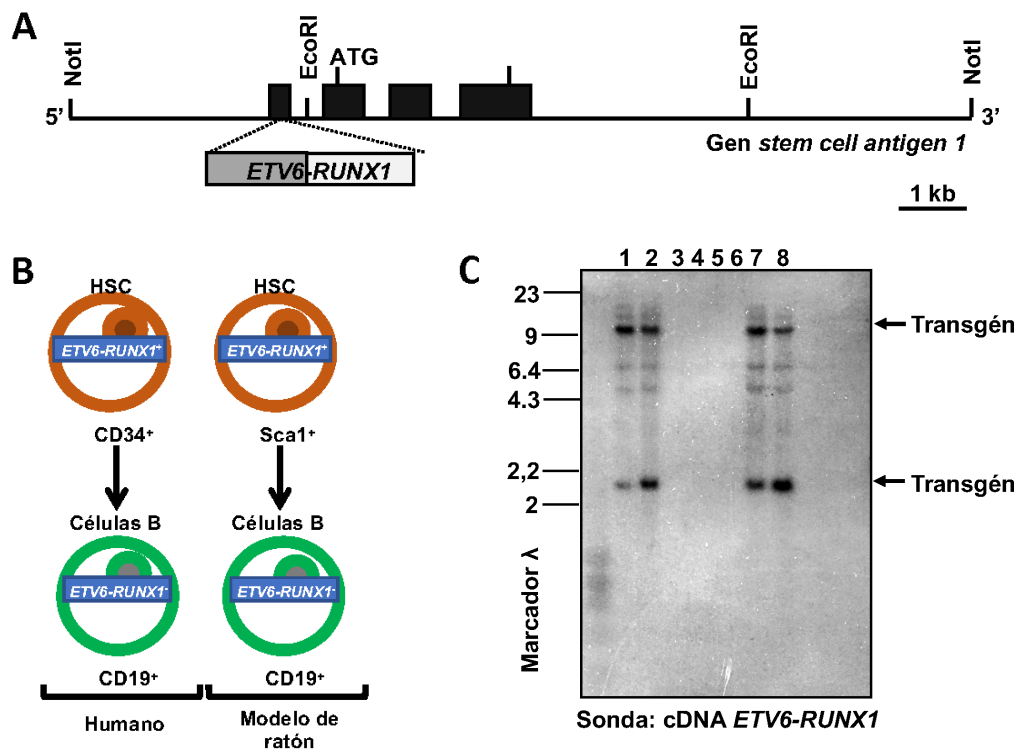


Figura 5. Modelo de la función del primer *hit* *ETV6-RUNX1* en ratón. **A)** Representación esquemática de la estructura genómica del locus *Sca1* de ratón y el sitio de inserción de *ETV6-RUNX1* empleado para generar los animales transgénicos. **B)** Modelo de ratón mimetizando la enfermedad humana. *ETV6-RUNX1* se expresa en HSCs del modelo murino *Sca1-ETV6-RUNX1*, pero no en células diferenciadas B mimetizando el estado preleucémico de la B-ALL humana. **C)** Identificación de los ratones transgénicos mediante *Southern Blot* de DNA de cola tras digestión con *EcoRI*. Se ha utilizado el cDNA de *ETV6-RUNX1* como sonda para detectar el transgén.

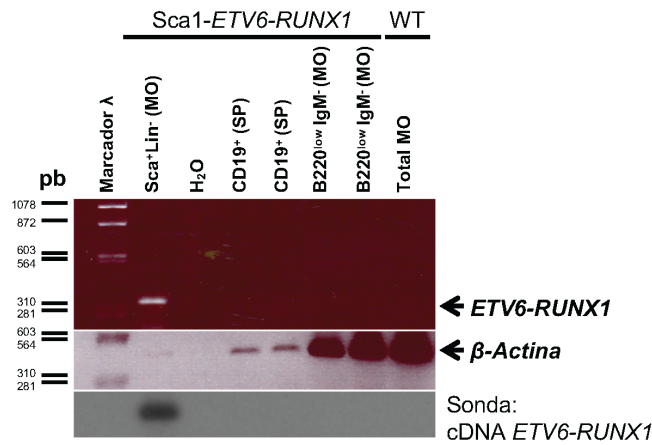


Figura 6. Expresión de ETV6-RUNX1 en los ratones Sca1-ETV6-RUNX1. Se ha comprobado la expresión de ETV6-RUNX1 en células de MO (HSC y proB preB) y células CD19⁺ de SP de ratones Sca1-ETV6-RUNX1 y MO total de ratones WT. ETV6-RUNX1 sólo está expresado en HSCs de MO. Se muestra un experimento representativo de 2 réplicas biológicas. (SP: Sangre Periférica; MO: Médula Ósea).

Por lo tanto, esta expresión limitada de ETV6-RUNX1 durante el desarrollo hematopoyético temprano mimetiza la biología preleucémica humana ETV6-RUNX1^{44,97} y proporciona un modelo preclínico para evaluar factores ambientales que actúen sinérgicamente en el desarrollo de la B-ALL ETV6-RUNX1⁺. Resultados preliminares de este modelo ya fueron presentados en la tesis con referencia TESEO (<https://www.educacion.es/teseo/mostrarRef.do?ref=1113246>) de Marta García Suquía.

1.2. La exposición a patógenos comunes induce el desarrollo de B-ALL en los ratones Sca1-ETV6-RUNX1

Para determinar si la expresión de ETV6-RUNX1 en HS/PCs predispone al desarrollo de leucemia como evento inicial en la B-ALL infantil, hemos establecido y monitorizado cohortes de ratones Sca1-ETV6-RUNX1 y ratones control (*wild type*, WT) nacidos y mantenidos en ambiente libre de patógenos (SPF, de sus siglas en inglés *Specific Pathogen Free*) durante su esperanza de vida (n=37; observados durante 2 años; **Figura 7**).

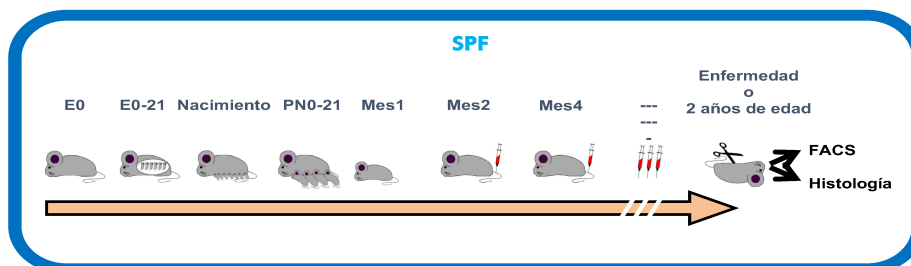


Figura 7. Diseño experimental en SPF. Los animales nacen y son monitorizados en condiciones SPF hasta el momento del sacrificio. (SPF, del inglés *Specific Pathogen Free*).

Para estudiar el impacto a largo plazo de *ETV6-RUNX1* en la hematopoyesis en la médula ósea (MO), hemos caracterizado los diferentes estadios de diferenciación de las células B. Las diferentes poblaciones celulares se analizaron por citometría de flujo en MO, bazo y sangre periférica (SP) de ratones transgénicos *Sca1-ETV6-RUNX1* de 4 meses de edad comparados con ratones control WT de la misma edad. Entre los 4 y los 5 meses de edad, no se ve ningún aumento de las células proB preB ni de las células B inmaduras en MO (**Figura 8A**). Por otra parte, los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* no han perdido gradualmente con la edad las células proB preB de MO (**Figura 8B y 8C**). Estos datos sugieren que la fusión *ETV6-RUNX1* favorece el mantenimiento del compartimento precursor de células B en la MO, aunque la diferenciación a célula B madura en SP no está alterada (**Figura 8D**).

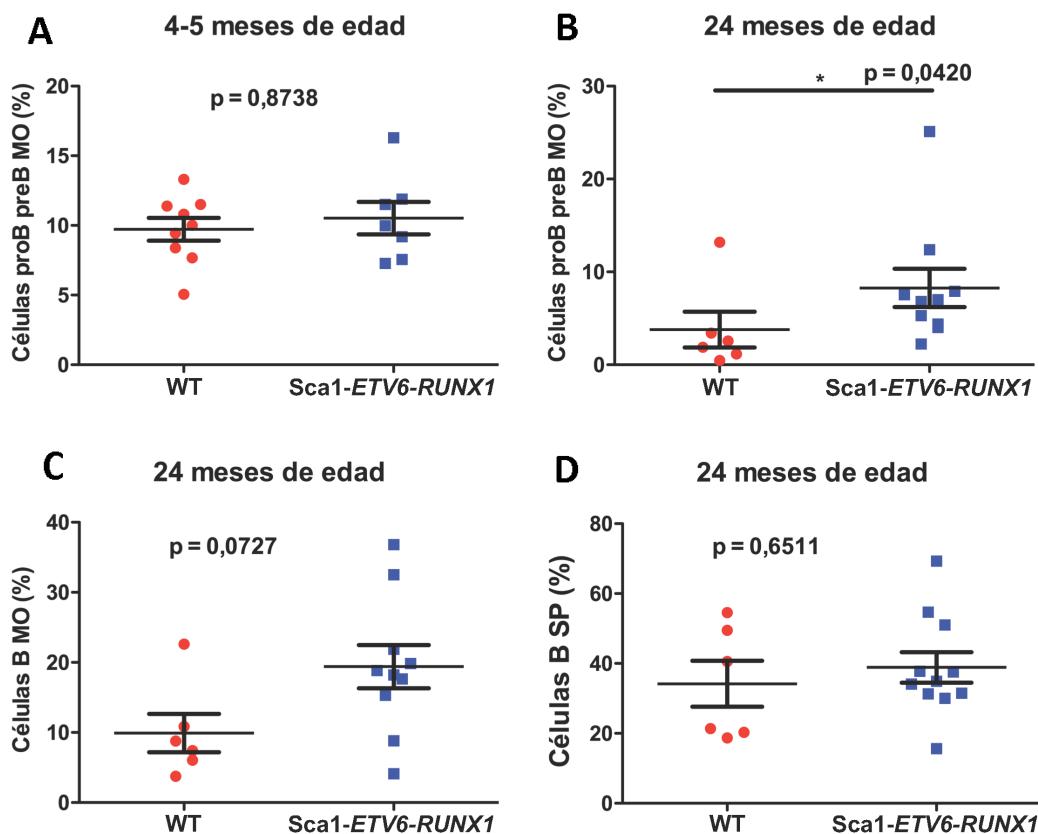


Figura 8. Análisis de las células B de ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* en condiciones SPF. **A)** Porcentaje de células proB preB ($B220^{low}IgM^{-}$) de MO en ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* de 4-5 meses de edad (n=7) comparados con ratones WT de la misma edad (n=9). **B)** Porcentaje de células proB preB ($B220^{low}IgM^{-}$) de MO en ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* de 24 meses de edad (n=10) comparados con ratones WT de la misma edad (n=6). **C)** Porcentaje de células B de MO en ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* de 24 meses de edad (n=10) comparados con ratones WT de la misma edad (n=6). **D)** Porcentaje de células B de SP en ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* de 24 meses de edad (n=10) comparados con ratones WT de la misma edad (n=6). Se ha utilizado el test U de Mann Whitney como test estadístico. Se representa la media y la desviación estándar. Todos los ratones han estado mantenidos en condiciones SPF.

RESULTADOS

Sin embargo, en ausencia del ambiente adecuado, esto no es suficiente para desencadenar el desarrollo de B-ALL, ya que los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* mantenidos en condiciones SPF permanecieron sin evidencias de enfermedad durante todo el estudio.

Así, lo siguiente que nos preguntamos fue si podíamos provocar el desarrollo de leucemia de células B en los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* exponiéndolos a ambientes oncogénicos relevantes para la enfermedad humana. La exposición a infección fue la primera causa sugerida para la B-ALL infantil *ETV6-RUNX1+* y sigue siendo uno de los candidatos más fuertes^{6,43}. Además, se sabe que estímulos inflamatorios y de infección *in vitro* aumentan la expresión de RAG, importante para la evolución clonal de la B-ALL humana *ETV6-RUNX1+*^{80,101,102}. Sin embargo, el papel de la infección en la conversión de los clones preleucémicos *ETV6-RUNX1* en B-ALL es aún desconocido. Para explorar esta hipótesis, hemos monitorizado cohortes de ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* y ratones control WT nacidos y mantenidos en condiciones SPF hasta que se expusieron a un ambiente con patógenos comunes en el que se detectó la presencia de *Mouse Hepatitis Virus* MHV, helmintos (*A. Tetráptera*, *Syphacia spp*), *Helicobacter spp* y *Trichomonas muris* mediante el estudio serológico de animales centinelas estabulados en el mismo ambiente que los animales en estudio (**Figura 9, Anexo 1 y 2**).

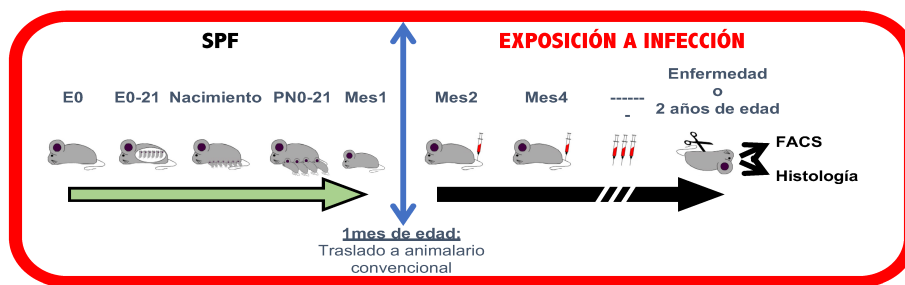


Figura 9. Diseño experimental en animalario convencional. Los animales nacen en condiciones SPF y son trasladados al animalario convencional de exposición a patógenos comunes cuando tienen aproximadamente un mes de edad. (CF, de sus siglas en inglés *Conventional Facility*).

En este escenario, se observó un desarrollo específico de B-ALL, sólo en los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* expuestos al ambiente de patógenos comunes (10,75%; 10 de 93). La baja penetrancia de la B-ALL en el modelo murino se parece mucho a la baja penetrancia del desarrollo de B-ALL en niños que son portadores del clon preleucémico *ETV6-RUNX1*^{43,45}. Debido a la baja incidencia de leucemia, la supervivencia total de los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* no se redujo significativamente comparado con ratones WT ($p=0,9352$; **Figura 10**).

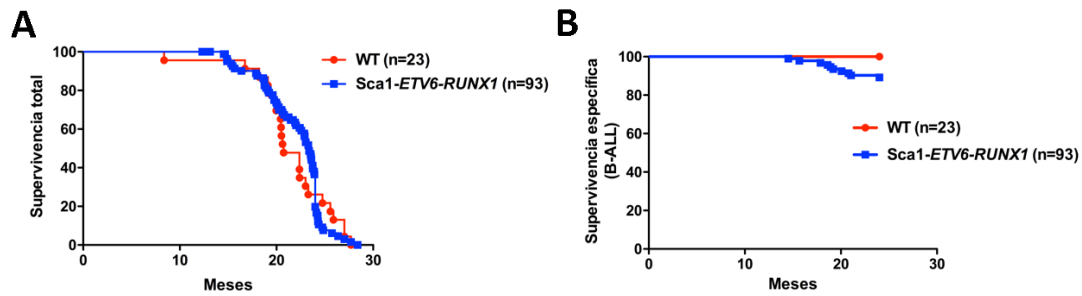


Figura 10. Supervivencia de los ratones Sca1-ETV6-RUNX1 expuestos a infección. A) Supervivencia total de los ratones Sca1-ETV6-RUNX1 (azul; n=93) comparada con ratones control WT (rojo; n=23). Mantel-Cox $p=0,9352$. **B)** Supervivencia específica de B-ALL de los ratones Sca1-ETV6-RUNX1 (azul; n=93) comparada con ratones control WT (rojo; n=23). Mantel-Cox $p=0,0855$. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

La aparición de la leucemia en los ratones Sca1-ETV6-RUNX1 se manifestó con esplenomegalia, pérdida de la estructura del bazo debido a la infiltración de los blastos, y la presencia de células blásticas en SP (**Figura 11A-D**). Las B-ALLs Sca1-ETV6-RUNX1 presentan reordenamientos clonales inmaduros del BCR (**Figura 11E**) y mediante análisis por FACS (de sus siglas en inglés *Fluorescence Activated Cell Sorting*) se pudo ver un fenotipo de marcadores celulares $CD19^+B220^+IgM^-$ de las células tumorales que se extendían a través de la MO, SP y bazo (**Figura 11A**).

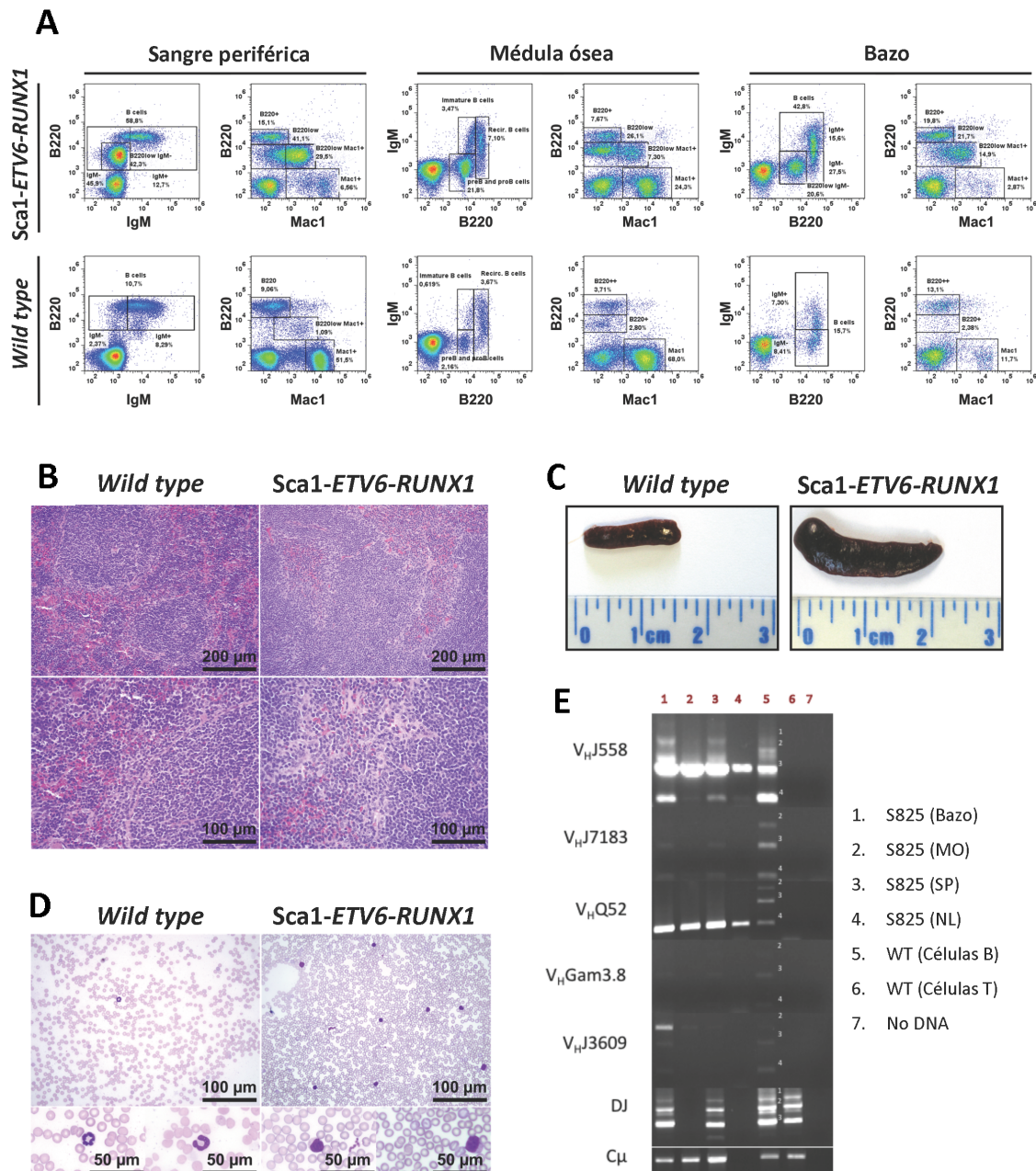


Figura 11. Desarrollo de B-ALL en ratones *Sca1-ETV6-RUNX1*. **A)** Análisis por citometría de flujo de poblaciones hematopoyéticas en ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* enfermos. Se muestran gráficos representativos de SP, MO y bazo. Se aprecia una acumulación de células blásticas B en los ratones enfermos *Sca1-ETV6-RUNX1* (n=10) comparados con ratones *wild type* (n=23). Léase *B cells* = Células B; *Immature B cells* = Células B inmaduras; *preB and proB cells* = Células proB preB. **B)** Tinción hematoxilina-eosina de secciones de bazo de ratones WT y de bazo tumoral *Sca1-ETV6-RUNX1*. Se observa la pérdida de la arquitectura normal del bazo debido a la infiltración de células tumorales. Barra de escala, 100 μ m (x400) y 200 μ m (x200) (n=10). **C)** Esplenomegalia observada en los ratones enfermos *Sca1-ETV6-RUNX1* (representativo de n=10). Bazo de ratón WT como referencia. **D)** Frotis de sangre de ratones WT y ratón tumoral *Sca1-ETV6-RUNX1* mostrando la presencia de células blásticas en la SP de los ratones enfermos. Barra de escala, 100 μ m (x400) y 50 μ m (x400) (n=4). **E)** Clonalidad de las inmunoglobulinas (Igs) en los tejidos *Sca1-ETV6-RUNX1* infiltrados por blastos B. Análisis por PCR de los reordenamientos clonales de los genes de la cadena pesada de las Igs. Como control de reordenamientos policlonales en la población B madura se han incluido células B CD19⁺ de bazo de ratones sanos y células T CD8⁺CD4⁺ sirven como control negativo.

Consecuentemente, las células proB tumorales podían crecer independientes de IL-7 (Figura 12A y B), y eran capaces de propagar la enfermedad al ser trasplantadas en ratones recipientes singénicos subletalmente irradiados (Figura 12C).

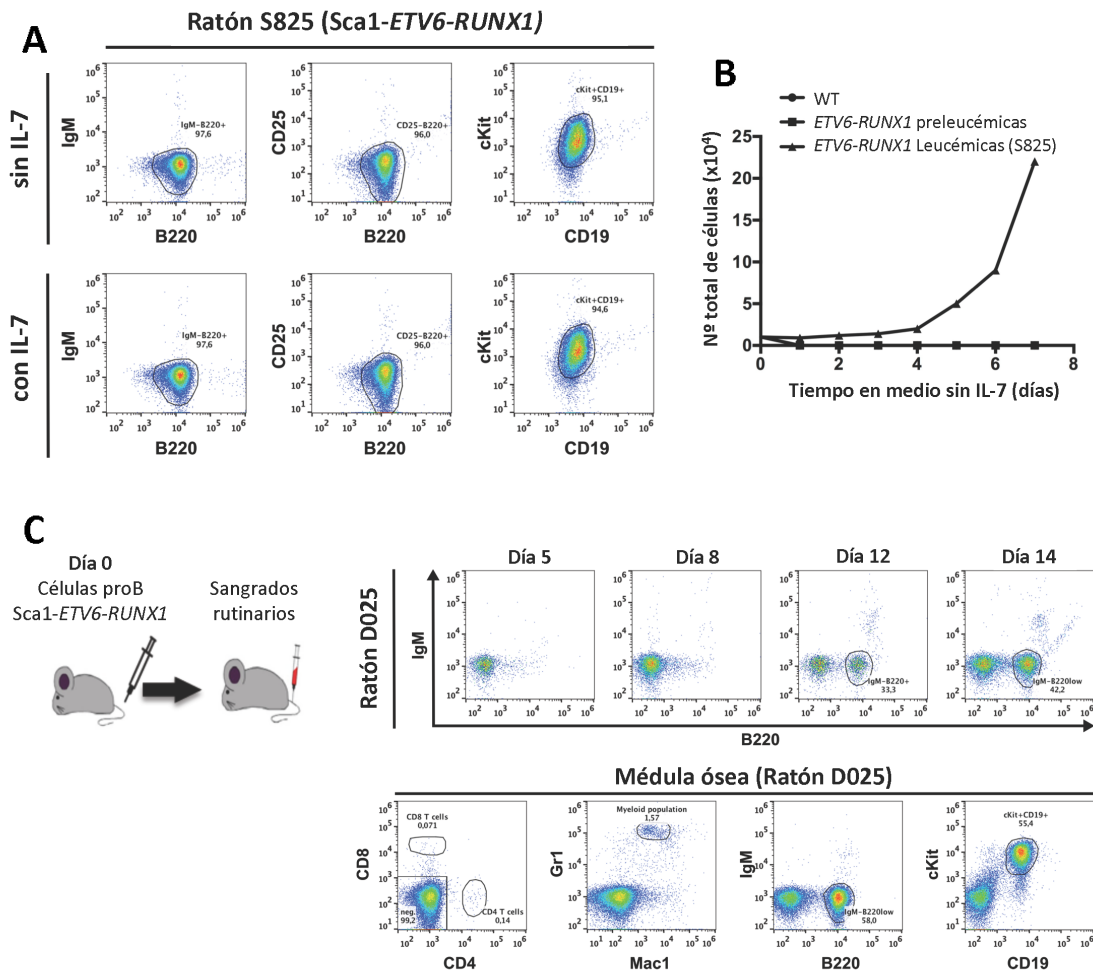


Figura 12. Las células proB leucémicas *Sca1-ETV6-RUNX1* crecen en ausencia de IL-7 y son capaces de propagar la enfermedad en receptores secundarios. **A)** Inmunofenotipo de células proB tumorales *Sca1-ETV6-RUNX1*. Se han puesto en cultivo células B220⁺ purificadas de MO de ratones enfermos *Sca1-ETV6-RUNX1* bajo condiciones que permiten el aislamiento y expansión de una población pura de células proB. Estas células proB tumorales son capaces de crecer en ausencia de IL-7. **B)** Células proB primarias WT, preleucémicas *Sca1-ETV6-RUNX1* y leucémicas *Sca1-ETV6-RUNX1* han sido puestas en cultivo sin IL-7 y se ha medido su proliferación a diario utilizando *Trypan blue*. Los valores representan la media de 3 réplicas. **C)** La leucemia *Sca1-ETV6-RUNX1* es trasplantable a receptores secundarios. Se han inyectado cien mil células proB tumorales *Sca1-ETV6-RUNX1* en ratones singénicos WT subletalmente irradiados. Se han monitorizado los animales para detectar la aparición de B-ALL. Se muestra análisis representativo de citometría de flujo de 4 ratones inyectados con células proB leucémicas *Sca1-ETV6-RUNX1*. Léase *CD8 T cells* = Células T CD8⁺; *CD4 T cells* = Células T CD4⁺; *Myeloid population* = Población mieloide.

Además, los precursores B *ETV6-RUNX1* no son sensibles a la retirada de IL-7 (Figura 13). Estos resultados proporcionan evidencias de que el modelo *Sca1-ETV6-RUNX1* reproduce la enfermedad humana, respecto a que la presencia del gen de fusión está sólo asociado con el desarrollo de B-ALL y confiere un bajo riesgo de desarrollar

leucemia^{43,45}. En general, estos resultados representan la primera prueba de que la exposición a infección puede inducir B-ALL semejante a la enfermedad humana en ratones portadores del clon preleucémico *ETV6-RUNX1*⁴¹.

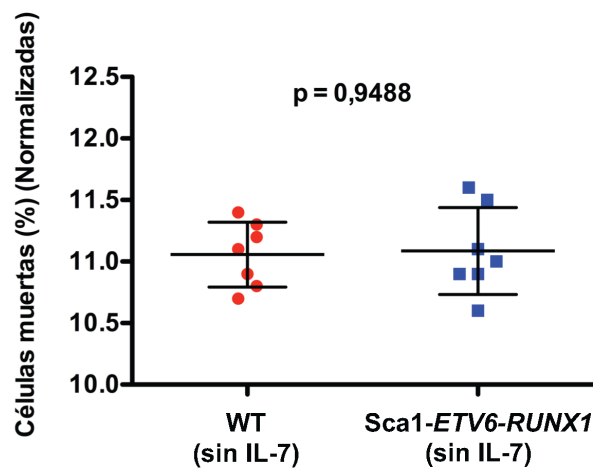


Figura 13. Susceptibilidad a muerte celular mediada por la retirada de IL-7 en células proB Sca1-ETV6-RUNX1. Se han puesto en cultivo células B220⁺ purificadas de MO de ratones jóvenes Sca1-ETV6-RUNX1 y *wild type* (WT) en condiciones que permiten el aislamiento y expansión de una población pura de células proB. Las células proB se han puesto en cultivo con o sin IL-7 durante 24h. La inducción de apoptosis se ha medido mediante citometría de flujo con tinción Anexina-V/PI. Los datos representan la media con desviación estándar de 6 experimentos independientes. Se ha utilizado el test U de Mann Whitney como test estadístico.

1.3. La combinación de la fusión *ETV6-RUNX1* y la exposición a infección alteran el correcto desarrollo hematopoyético B e induce un patrón de expresión génica diferencial

Lo siguiente que nos propusimos fue explicar el mecanismo por el cual los clones susceptibles preleucémicos *ETV6-RUNX1* progresan hacia B-ALL bajo la exposición a infección. Con este propósito, estudiamos los diferentes compartimentos hematopoyéticos utilizando citometría de flujo en WT jóvenes y ratones preleucémicos Sca1-ETV6-RUNX1 de edad pareja después de ser expuestos a infección. No se detectaron anomalías, ni en el compartimento mielóide ni en el linfóide T (utilizando tinciones Gr1, Mac1, CD4 y CD8) en la MO, SP, timo y bazo. Sin embargo, el análisis de los diferentes estadios de desarrollo de las células B mostró un aumento específico y significativo de las células proB preB (B220^{low}IgM⁻) y de las células B inmaduras (B220^{low}IgM⁺) en los ratones Sca1-ETV6-RUNX1 comparado con WT de edad pareja, pero no en las células B recirculantes (B220⁺IgM⁺; **Figura 14A** y **Anexo 3**).

Sin embargo, este aumento de células proB preB (B220^{low}IgM⁻) no se observó en ratones Sca1-ETV6-RUNX1 libres de enfermedad a los 24 meses de edad comparados con ratones WT de la misma edad en condiciones de exposición a infección (**Figura 14B**). Estos datos sugieren que el aumento específico y temporal de las células proB preB en MO es inducido por la exposición a patógenos comunes ya que no podemos observar

este incremento en ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* mantenidos en condiciones SPF (**Figura 8A**).

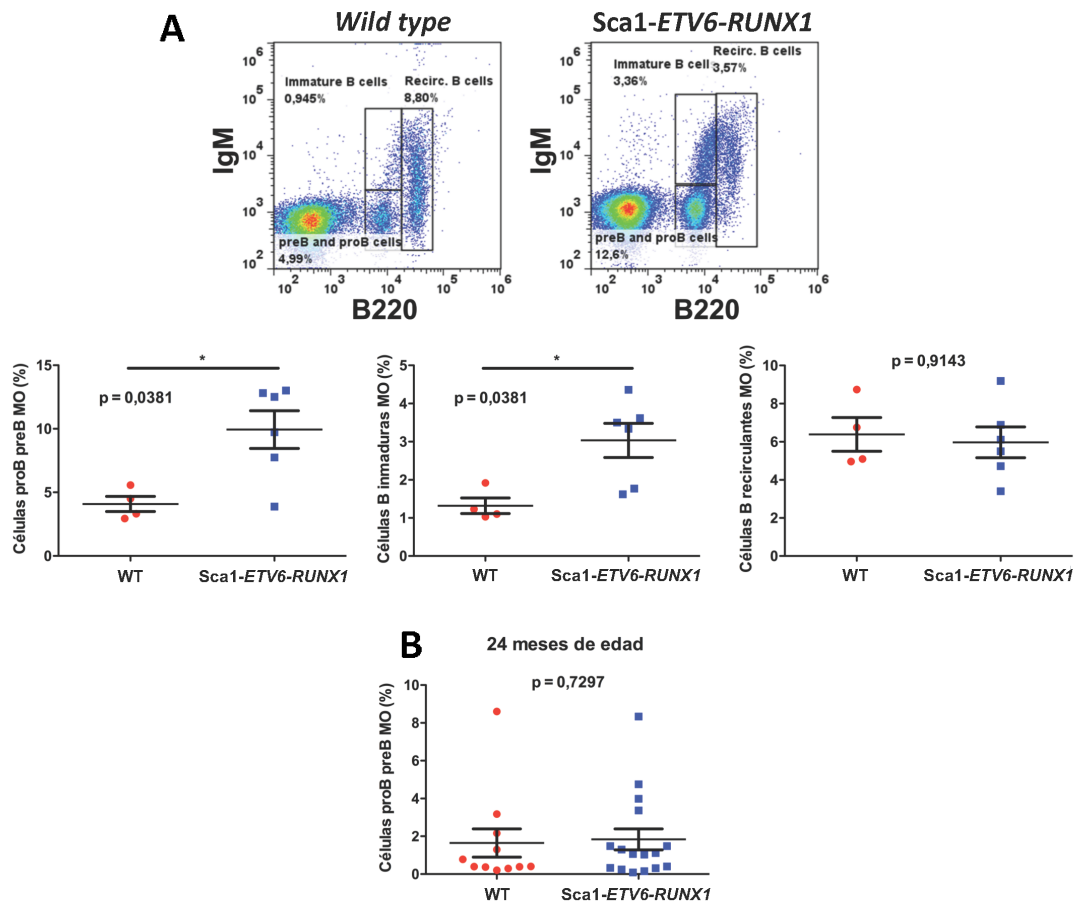


Figura 14. Desarrollo de las células B en ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* en animalario convencional. A) Porcentaje de los distintos compartimentos celulares B de MO en ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* libres de enfermedad a los 7 meses de edad. Los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* ($n=6$) muestran un aumento significativo de células proB preB ($B220^{low}IgM^{-}$) y de células B inmaduras ($B220^{low}IgM^{+}$) comparados con ratones WT de la misma edad ($n=4$), pero no en las células B recirculantes ($B220^{+}IgM^{+}$). Léase *Recirculating B cells* = Células B recirculantes; *Immature B cells* = Células B inmaduras; *preB and proB cells* = Células proB preB. **B)** Porcentaje de células proB preB de MO en ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* libres de enfermedad a los 24 meses de edad en condiciones de exposición a infección. No se observa el aumento de células proB preB ($B220^{low}IgM^{-}$) en los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* de 24 meses de edad ($n=16$) comparados con WT de edad similar ($n=11$). Se ha utilizado el test U de Mann Whitney como test estadístico. Se representa la media y la desviación estándar.

Por el contrario, la expresión de *ETV6-RUNX1* no dio lugar a alteraciones en las células $Lin^{+}Sca^{+}cKit^{+}$ (LSK), en las células *stem* hematopoyéticas *long-term* (LT-HSC), en las células *stem* hematopoyéticas *short-term* (ST-HSC), en los progenitores restringidos en linaje (LRP de sus siglas en inglés, *Lineage Restricted Progenitors*) y en los progenitores comunes linfoides (CLP de sus siglas en inglés, *Common Lymphoid Progenitors*) en los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* comparado con ratones WT (**Figura 15**).

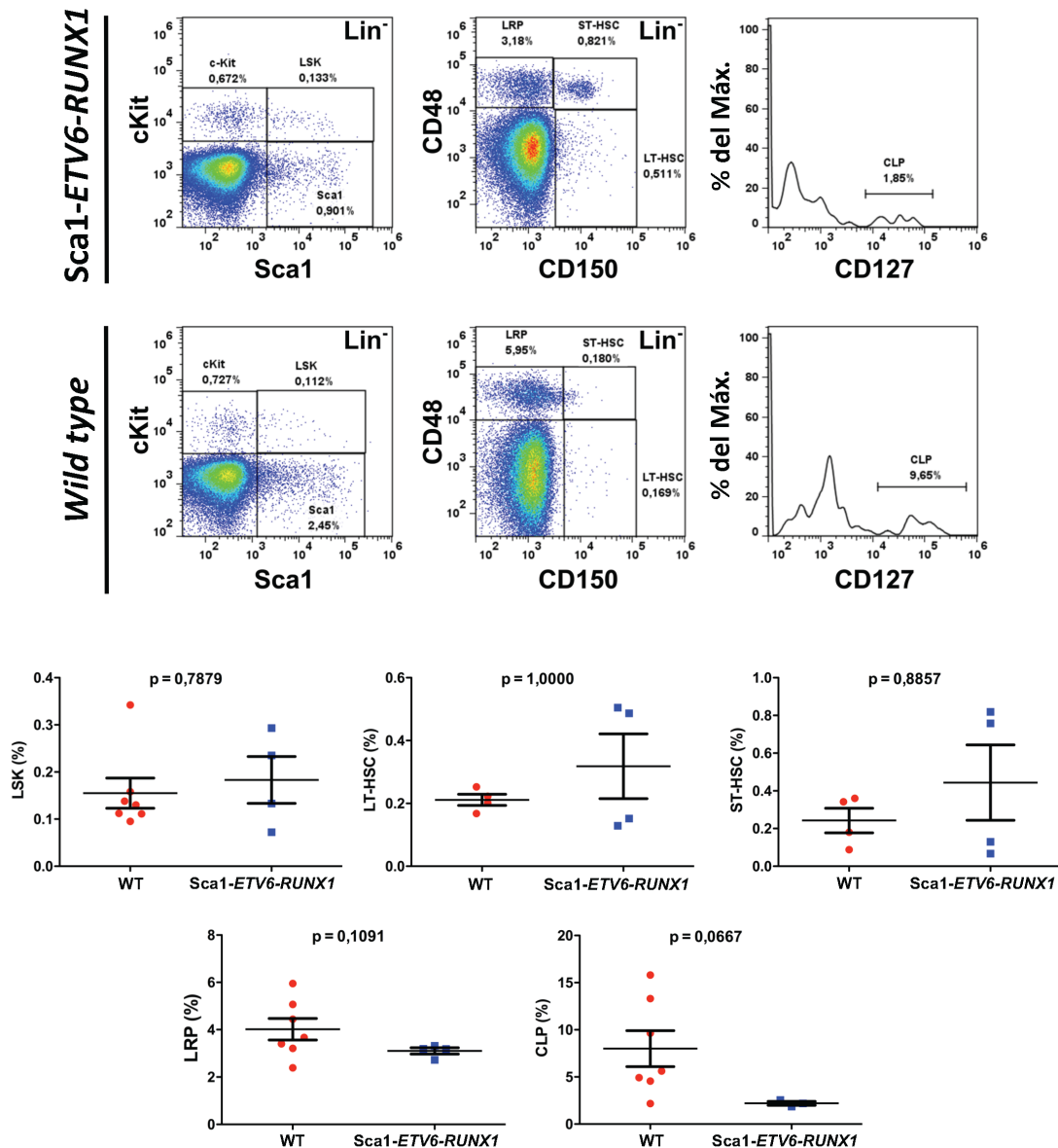


Figura 15. Precursores hematopoyéticos de ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* en animalario convencional. Análisis por citometría de flujo de los diferentes precursores hematopoyéticos en ratones de 4 meses de edad libres de enfermedad. No se pueden ver diferencias en las células LSK (Lin⁻Sca1⁺cKit⁺), LT-HSC, ST-HSC, LRP y CLP en los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* (n=4) comparados con ratones control WT de edad pareada (n=4-7). Se ha utilizado el test U de Mann Whitney. Se representa la media y la desviación estándar.

Por lo tanto, estos datos sugieren que la fusión *ETV6-RUNX1* favorece la aparición de un compartimento celular precursor B aberrante en la MO de ratones jóvenes *Sca1-ETV6-RUNX1* sólo en condiciones de exposición de patógenos comunes, aunque la diferenciación a células B maduras en SP no está alterada.

De acuerdo con estos resultados, el análisis con *arrays* de expresión de células proB preB preleucémicas *ETV6-RUNX1* de ratones mantenidos en CF (n=4, ID: K206 – K209) muestra un patrón de expresión distinto comparado con ratones sanos WT de edad similar (n=4, ID: WT4 – WT7) (**Figura 16A**; datos de los genes diferencialmente

expresados disponibles en el material suplementario de Rodríguez-Hernández G. *et al. Cancer Research* 2017⁴¹). El análisis de los genes expresados diferencialmente reveló una expresión significativa mayor de *Rag1* y *Rag2* (**Figura 16B**), que es representativo de la leucemia humana t(12;21) positiva (estudio MILE; <http://r2.amc.nl>).

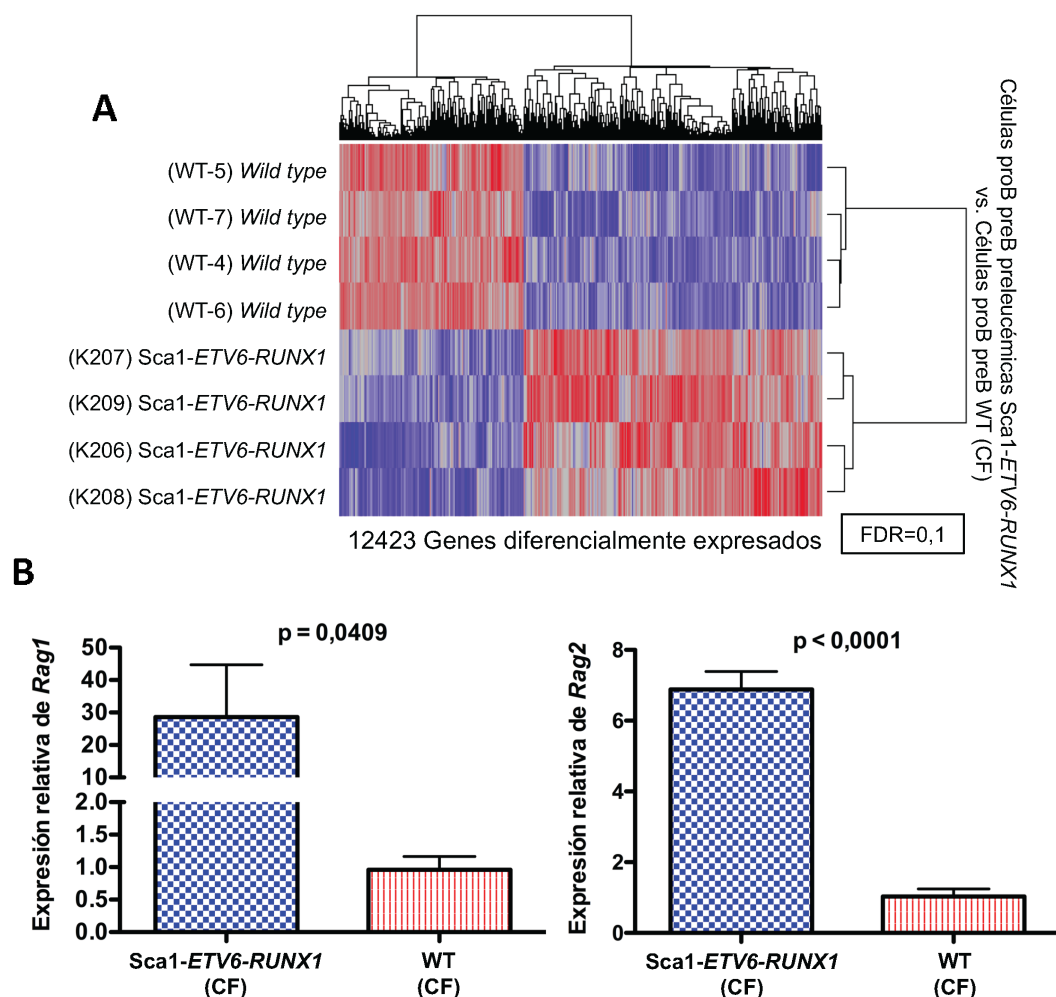


Figura 16. Expresión génica en ratones *Sca1-ETV6-RUNX1*. **A)** Análisis de la expresión diferencial de genes de células proB preB preleucémicas de 4 ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* comparados con células proB preB de 4 ratones WT de edad pareada, todos los animales han estado mantenidos en animalario convencional (CF). **B)** Expresión relativa de *Rag1* y *Rag2* de células proB preB de MO de ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* en condiciones de exposición a infección. Se han utilizado como referencia células proB preB de MO de ratones WT en las mismas condiciones. Se representa la media de expresión relativa y la desviación estándar de 3 réplicas. Se ha utilizado un t-test no pareado. Se representa la media y la desviación estándar.

Células proB preB preleucémicas *ETV6-RUNX1* mostraron una regulación diferencial de genes reguladores epigenéticos de la familia de las *KDM*, incluyendo *KDM2A*, *KDM3A/B*, *KDM4A/C*, *KDM5A/B/C* y *KDM6A/B* (**Tabla 2**), pero no otras familias de genes de reguladores epigenéticos como *HDAC* (*Histone Deacetylase*) o *PMT* (*Protein Methyltransferase*). Sin embargo, no encontramos esta alta proporción de genes reguladores epigenéticos diferencialmente regulados en el modelo murino *Pax5-het* de B-ALL⁵⁸ (**Tabla 2** y **Anexo 4**). Estos datos indican que *ETV6-RUNX1* regula

específicamente la transcripción de genes modificadores de las histonas de la familia KDM y mantiene un papel específico en la modificación de las histonas en las células *ETV6-RUNX1* preleucémicas (**Anexo 4**).

Tabla 2. Genes KDM alterados en B-ALL humana *ETV6-RUNX1*+ y células murinas preleucémicas *Sca1-ETV6-RUNX1*.

Gen	Regulación en ratones preleucémicos <i>Sca1-ETV6-RUNX1</i> vs. WT en CF (proB preB)	MILE t(12;21)	Regulación en ratones leucémicos <i>Pax5-het</i> (proB preB)
<i>KDM2A</i>	1,20	Up	-0,69
<i>KDM3A</i>	1,29	≈	-0,46
<i>KDM3B</i>	1,15	Up	-0,69
<i>KDM4A</i>	1,30	Up	-0,63
<i>KDM4C</i>	1,15	Up	-0,68
<i>KDM5A</i>	1,32	≈	-0,64
<i>KDM5B</i>	1,45	Up	-0,08
<i>KDM5C</i>	1,27	Up	-0,69
<i>KDM6A</i>	1,06	≈	-
<i>KDM6B</i>	1,54	Down	-0,42

Nota: Los números indicados en la tabla corresponden con el R-fold. *Up* = aumentado; *Down* = disminuido.

1.4. Identificación de alteraciones secundarias comunes en el modelo murino *Sca1-ETV6-RUNX1* y en pacientes con leucemia *ETV6-RUNX1* positiva

Para dilucidar cómo la exposición a infección causa el desarrollo de B-ALL en el contexto de una modificación aberrante de las histonas y una expresión elevada de *Rag1* en los clones preleucémicos *ETV6-RUNX1*; realizamos a continuación, *whole exome* y *whole genome sequencing* (WES y WGS, respectivamente) de 6 tumores *Sca1-ETV6-RUNX1* y su correspondiente línea germinal en una plataforma HiSeq 2500 (Illumina) para la detección de aberraciones estructurales (n=3) así como de SNVs (de sus siglas en inglés, *Single Nucleotide Variations*) (n=6) (**Figura 17A**). Las células tumorales *Sca1-ETV6-RUNX1* provenían de MO de ratones enfermos. No observamos aberraciones del locus *Etv6*, que está descrito en el 70% de los pacientes *ETV6-RUNX1*⁴⁷, probablemente porque ambos alelos *Etv6* están intactos en el ratón transgénico.

Sin embargo, identificamos alteraciones genómicas secundarias en genes conocidos que son relevantes para la leucemia humana *ETV6-RUNX1*+, pero con un patrón muy heterogéneo en los tumores, que es una característica común de la B-ALL humana *ETV6-RUNX1*⁵¹ (**Anexo 5**). Entre otros, hemos identificado una delección en el gen *Ebf1*, factor de diferenciación de células B, dando lugar a la pérdida de 3 aminoácidos, que está asociada con la leucemia humana *ETV6-RUNX1*⁴⁷ (**Figura 17B**).

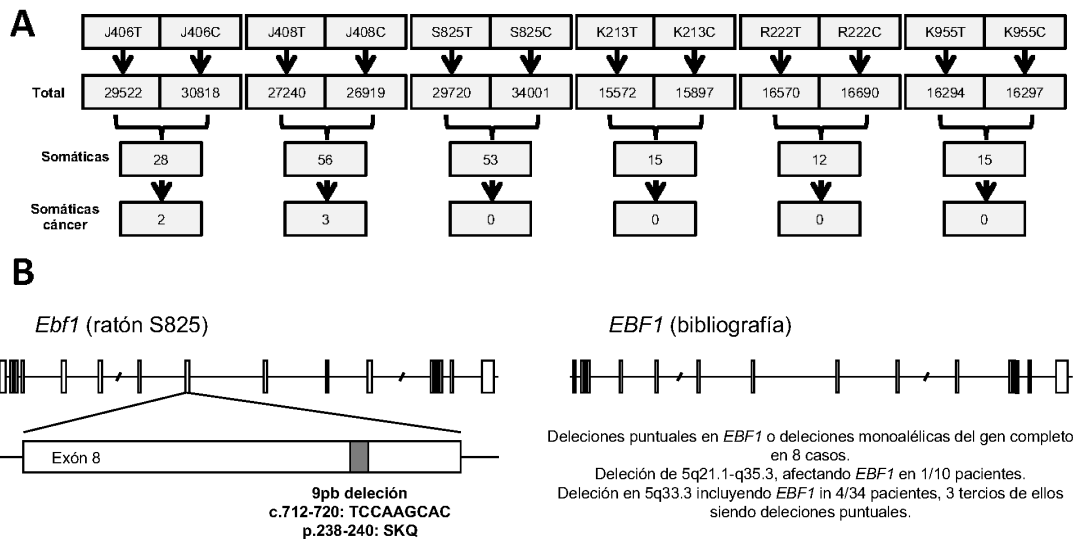


Figura 17. Los datos de secuenciación del exoma de las leucemias identifican genes mutados en ratón y humano. A) El análisis de la secuenciación del exoma encontró alrededor de 30.000 SNVs en todo el genoma. Las mutaciones se consideraron específicas de tumor mediante análisis con MUTECT y VARSCAN. **B)** La secuenciación de muestras tumorales *ETV6-RUNX1* murinas y humanas revelaron mutaciones en *Ebf1*. El ratón S825 portaba una delección de 9pb en *Ebf1* dando lugar a la pérdida de 3 aminoácidos en el exón 8. Las mutaciones de *EBF1* en humanos están descritas^{7,47,103,104}.

Los casos de B-ALL *ETV6-RUNX1* comúnmente exhiben una alta carga de alteraciones en el DNA de CNVs (de sus siglas en inglés, *Copy Number Variations*), pero falta un evento genético secundario unificador conocido. Así, comparamos las alteraciones genómicas encontradas en las B-ALLs murinas causadas por la exposición a infección con los datos genómicos publicados de B-ALLs pediátricas *ETV6-RUNX1*^{47,51} e identificamos múltiples CNVs que están compartidas en B-ALLs *ETV6-RUNX1* murinas causadas por infección y humanas (**Anexo 5**)⁵¹. En uno de los 6 ratones (ID = J408), encontramos un SNV en *Kdm5c*, dando lugar a un codón de parada prematuro, causando la pérdida de función del gen (**Figura 18**). Así mismo, encontramos que un número significativo de genes implicados en la modificación de las histonas están mutados simultáneamente en las B-ALL humanas *ETV6-RUNX1+* de la cohorte de Papaemmanuil y colaboradores, incluyendo *KDM3B*, *KDM4C/D/E*, *KDM5A/C* y *KDM6A/B* (**Anexo 6**)⁵¹.

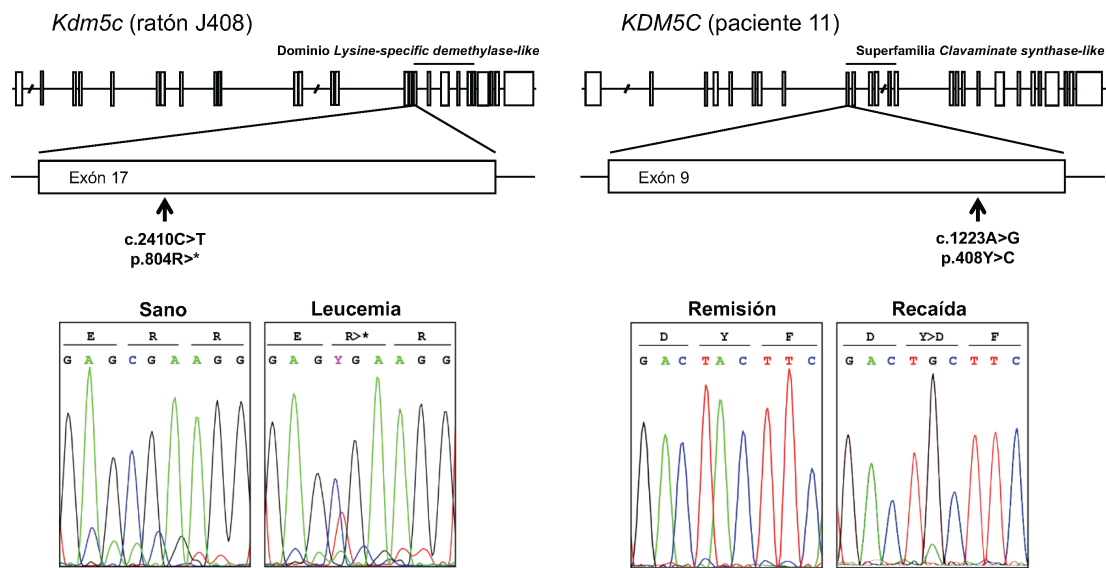


Figura 18. Mutaciones en el gen *Kdm5c/KDM5C* murino y humano. La secuenciación de muestras tumorales *ETV6-RUNX1* murinas y humanas revelaron mutaciones en *Kdm5c*. La sustitución de una base en el exón 17 de *Kdm5c*, presente en el ratón J408, da lugar a un codón de parada prematuro N-terminal del dominio *Lysine-specific demethylase-like*. El mismo gen está afectado en el paciente 11, donde una sustitución A>G en el exón 9 da lugar a un cambio de aminoácido Y>C N-terminal del dominio de la superfamilia *Clavaminatase synthase-like*. Izda, posición de la mutación que genera un codón de parada prematuro en el exón 17 del ratón J408 y el resultado de la secuenciación por Sanger de dicho ratón. Dcha, lo mismo para el paciente 11 y la mutación *missense* en el exón 9.

A continuación, validamos estos resultados de modificación recurrente de las histonas en una cohorte independiente de 11 pacientes *ETV6-RUNX1*. Utilizamos DNA de 11 niños con B-ALL del momento de diagnóstico, recaída y remisión para llevar a cabo WGS y WES (**Figura 19** y **Anexo 7**). Todos los pacientes eran portadores de la translocación *t(12;21)(p13;q22)* (**Figura 19**). Identificamos una media de 10 mutaciones de secuencia (rango entre 0 y 42) por caso (**Anexo 8 y 9**). Mutaciones *missense* (63%) fueron predichas como deletéreas (**Anexo 9**), indicando que muchas de estas variantes estaban implicadas en el proceso tumoral. Sin embargo, hemos observado una alta frecuencia de alteraciones somáticas en genes modificadores de las histonas en B-ALL *ETV6-RUNX1+*. Seis de once casos presentaban alteraciones en genes codificantes componentes de las familias de proteínas epigenéticas KDM, HDAC y PMT, incluyendo mutaciones en *KDM6A*, *KDM5C*, *KDM6B* y *KDM2B*, así como delecciones, incluyendo genes relacionados (*KDM2A/B*, *KDM3A*, *KDM4A* y *KDM5B*). Ocho de estos genes (*KDM6A/B*, *KDM5B/C*, *KDM4A*, *KDM3A* y *KDM2A/B*) estaban diferencialmente regulados en células proB preB *ETV6-RUNX1* (**Tabla 2** y **Anexo 4**). En conjunto, 26 casos (42%) de B-ALL *ETV6-RUNX1+*, incluyendo nuestros pacientes (n=11) y la cohorte de Papaemmanuil y colaboradores (n=51)⁵¹, presentaron mutaciones que afectaban a la regulación epigenética y que involucraban múltiples genes en 14 casos.

A

Nº	Rotura <i>ETV6</i>	Rotura <i>RUNX1</i>	Secuencia de unión 5' (<i>ETV6</i>)	Inserción (N-Nucleótidos)	Secuencia de unión 3' (<i>RUNX1</i>)
1	12:12,030,752	21:36,266,982	GTAAATTTGAGAATAGTAATA	---	AGAGAGAGCATGCAAGCTA
2	12:12,038,290	21:36,268,551	CAAGGCCCCACTGACAG	CA	TGGAAACAGTCTCTGAAA
3	12:12,031,207	21:36,302,680	AGGAGGAAGTTTCAGGACAA	---	TCCTCTAGTCAATGTCATCAG
4	12:12,029,375	21:36,295,742	CAAACCTAAGCTCCTGCTTTAA	ACCCCCAAAACA	TCACAACCTTAAAAAGGTGCA
5	12:12,033,313	21:36,396,634	ACAAATGTTCTTGAAGCTGAT	---	GCATGGCATCTTCACAATC
6	12:12,031,597	21:36,327,573	CACCTTCCCTCCCCCAGC	---	GAACAATCATCCTCCAACCT
7	12:12,027,897	21:36,264,201	TAAATGACGAGTTAATGGGT	---	TACTGTTTTCCAATGAAATTA
8	12:12,032,589	21:36,265,121	CTCATGGAAAGAAAATCCA	---	AATTTAACCAAAATAAATTAAG
9	12:12,033,086	21:36,268,577	ATAATGTTATAAAAGCCACTT	T	CCAGAACCTGAGAATGGTCT
10	12:12,033,079	21:36,304,719	CAATCAATAATGTTATAAAAG	---	TAGGTTTGAAGAGGACTGG
11	no definible de manera exacta	no definible de manera exacta			
11	12:12,025,708	21:36,265,111	TAAATTGCTGGGATTACAGG	---	AATAATTAAGGCTGTTTCTG

B

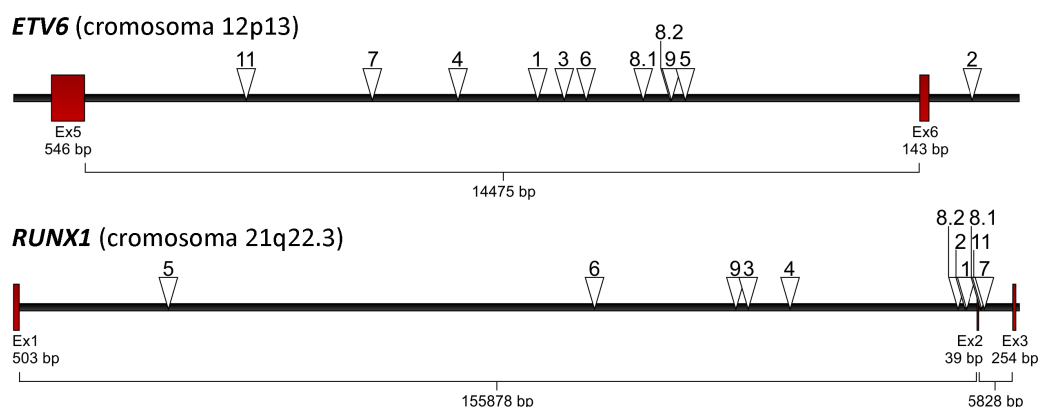


Figura 19. Distribución de las roturas genómicas *ETV6-RUNX1* entre los pacientes. A) Descripción de las características de los pacientes. B) Róturas genómicas en *ETV6* y *RUNX1*. Léase bp = pb (de sus siglas en inglés, *base pairs*).

Herramientas de predicción *in silico* clasifican las mutaciones observadas en B-ALL *ETV6-RUNX1*+ como pérdida de función. Genes de la familia KDM estaban específicamente afectados en muestras de recaídas de pacientes *ETV6-RUNX1* (71,45%) comparado con las muestras en el diagnóstico inicial y también en otros tipos de B-ALL como recaídas en B-ALL con hiperdiploidías (33,33% n=6). Las funciones de los genes modificadores de las histonas más afectadas en ambas cohortes se encontraron en la metilación/demetilación de H3K9me3 y en la demetilación de H3K4me2/3. *KDM2B* y *KDM5C*, que catalizan la demetilación de la histona 3 en la lisina 4 (H3K4me3), fueron genes afectados de manera recurrente. El caso UKD11 presentaba una mutación focal *missense* de *KDM5C* (Figura 18), y un caso adicional PD4021a⁵¹ presentó una delección completa del locus genómico (Anexo 6). Adicionalmente, el paciente UKD06 tenía una mutación *missense* en *KDM2B* y el paciente PD4036a y UKD09 albergaban aberraciones estructurales que afectaban al mismo gen. Por lo tanto, podemos concluir que la familia de genes *KDM* está implicada en la evolución clonal de la B-ALL *ETV6-RUNX1*+.

1.5. La pérdida de función de *KDM5C* altera el complejo RAG2-H3K4me3

Se sabe que la pérdida de función de *KDM5C* tiene como consecuencia la acumulación de H3K4me3, que es un requisito necesario para la unión de RAG al DNA y el inicio de la actividad recombinasa⁷⁰. Para apoyar este mecanismo de que la acción de RAG induce la evolución clonal de la B-ALL *ETV6-RUNX1*+, hemos eliminado *KDM5C* en una línea

celular humana de B-ALL utilizando la técnica de CRISPR/Cas9. Mediante el análisis por *Western Blot*, se pudo confirmar una fuerte disminución de la expresión de *KDM5C* junto con elevados niveles globales de H3K4me3 (**Figura 20A**). Como se esperaba⁷⁰, niveles más altos de H3K4me3 co-inmunoprecipitan con RAG2, indicando una relación mayor de H3K4me3 unido a RAG2 en el ambiente deficiente para *KDM5C*, sentando las bases para la unión de RAG y la actividad potencial de recombinación en sitios incorrectos (**Figura 20B**). En conjunto, estos resultados sugieren que la exposición a infección, acompañado de un aumento de la expresión de *Rag1/2* contribuyen a la evolución clonal de B-ALL *ETV6-RUNX1*⁺ teniendo como base una modificación aberrante de las histonas, facilitando el reclutamiento de Rag a las RSS.

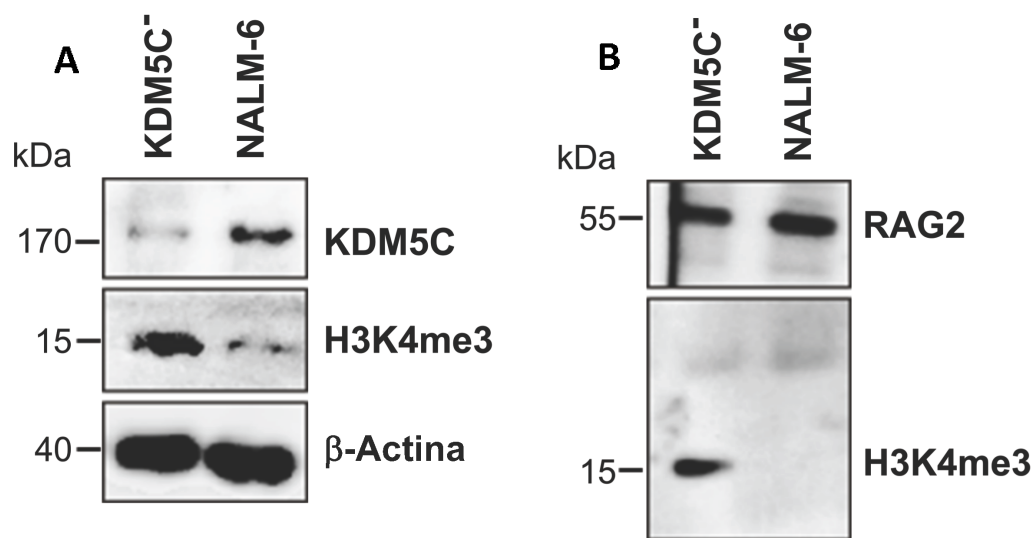


Figura 20. La pérdida de función de KDM5C altera el complejo RAG2-H3K4me3. A) Eliminación de *KDM5C* mediante CRISPR/Cas9 en línea células de B-ALL, NALM-6, y nombrada como KDM5C⁻. Las células NALM-6 normales y KDM5C⁻ se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos anti-KDM5C y anti-H3K4me3. **B)** Se ha llevado a cabo la co-inmunoprecipitación con *beads* anti-c-myc tras introducir un plásmido de RAG2 etiquetado con c-myc en las células NALM-6 y KDM5C⁻, y un posterior *Western Blot* con anti-RAG2 y anti-H3K4me3.

2. La naturaleza del evento secundario y la célula de origen definen el fenotipo tumoral

2.1. La expresión de la fusión *ETV6-RUNX1* en el compartimento B hematopoyético no es suficiente para desarrollar B-ALL en ambiente de exposición a infección

Está bien establecido que los eventos genéticos secundarios son necesarios para el desarrollo de B-ALL desde un clon preleucémico *ETV6-RUNX1*^{41,51}. A día de hoy, es ampliamente aceptado que las células precursoras B son el compartimento celular donde tiene lugar la acumulación de alteraciones secundarias adicionales para dar lugar al proceso tumoral. Por esta razón, el trasplante de precursores B, humanos o murinos, que expresen *ETV6-RUNX1* en ratones inmunodeficientes ha sido una de las principales aproximaciones utilizadas para intentar entender el desarrollo de la B-ALL infantil *ETV6-RUNX1*⁺^{43,80,90,91,105,106}. Generalmente las células de origen de la B-ALL son consideradas

como el equivalente maligno de los precursores celulares B normales, pero a día de hoy no se ha comprobado experimentalmente. Lo ideal sería poder monitorizar la evolución natural de estas células tumorales desde su célula de origen, pero no es posible debido a que la enfermedad humana se diagnostica en fases tardías.

Para determinar si la célula de origen de la ALL es un precursor B, primero hemos querido comprobar si se produce la conversión leucémica de células B que expresan *ETV6-RUNX1* en condiciones de exposición natural a infección⁴¹. Para este propósito, hemos empleado ratones *Etv6-^{ETV6-RUNX1}* condicionales que tienen el gen *RUNX1* insertado en el locus endógeno *Etv6* del ratón. De esta manera el gen de fusión *ETV6-RUNX1* es activado de manera específica en tejido y tiempo mediante la expresión conjunta de una Cre-recombinasa⁹⁴. Dirigimos la expresión de *ETV6-RUNX1* al linaje celular B cruzando los ratones *Etv6-^{ETV6-RUNX1}* con una cepa de ratón *Mb1-Cre*¹⁰⁷. La cepa resultante (*Etv6-^{ETV6-RUNX1}* + *Mb1-Cre*) expresa *ETV6-RUNX1* en el linaje celular B comprometido a nivel de las células proB por la acción de la Cre-recombinasa y es mantenida en estadios posteriores de diferenciación B. Esta expresión esta dirigida por el promotor del locus *Mb1* que codifica la cadena alfa de las inmunoglobulinas Cd79a. Lo siguiente que nos preguntamos fue si podíamos provocar el desarrollo de B-ALL en los ratones *Etv6-^{ETV6-RUNX1}* + *Mb1-Cre* mediante la exposición natural a infección. Para probar esta hipótesis, hemos monitorizado cohortes de ratones *Etv6-^{ETV6-RUNX1}* + *Mb1-Cre* y ratones control *wyld type* (WT) nacidos y mantenidos en condiciones SPF hasta la exposición a un ambiente de infecciones comunes (*Mouse Hepatitis Virus* MHV, helmintos (*A. Tetráptera*, *Syphacia spp*), *Helicobacter spp* y *Trichomonas muris*)^{41,58} (**Anexo 1 y 2**) durante un período de observación de 2 años (n=31). En este escenario, no se observó el desarrollo de leucemia en los ratones *Etv6-^{ETV6-RUNX1}* + *Mb1-Cre* expuestos a condiciones de exposición a patógenos (**Figura 21**).

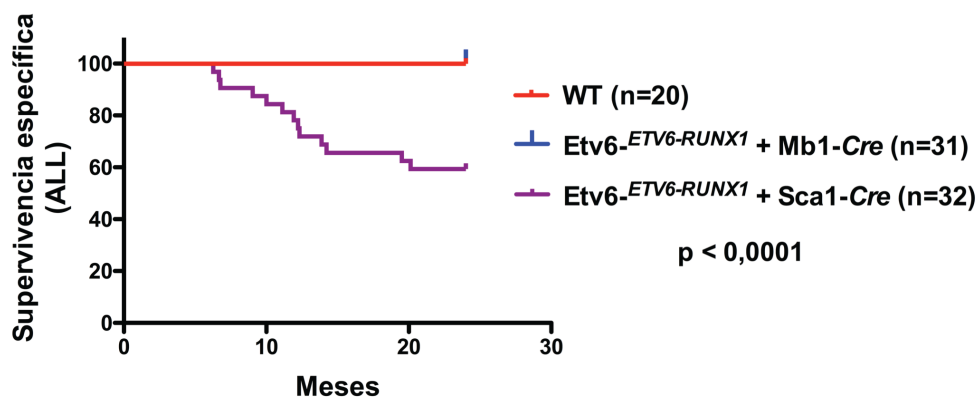


Figura 21. Supervivencia específica de ALL de los ratones condicionales *Etv6-^{ETV6-RUNX1}* expuestos a infección. Supervivencia específica de ALL de los ratones *Etv6-^{ETV6-RUNX1}* + *Mb1-Cre* (azul, n=31) y *Etv6-^{ETV6-RUNX1}* + *Sca1-Cre* (morado, n=32). Los ratones *Etv6-^{ETV6-RUNX1}* + *Sca1-Cre* muestran una supervivencia significativamente más corta (Mantel-Cox $p < 0,0001$) comparados con ratones control WT (rojo, n=20) debido al desarrollo de B-ALL y T-ALL.

Para estudiar el impacto a largo plazo de *ETV6-RUNX1* en la linfopoyesis de la MO, hemos caracterizado los diferentes estadios celulares de desarrollo B. Las diferentes poblaciones celulares se analizaron por citometría de flujo en MO y SP de ratones

RESULTADOS

transgénicos $Etv6^{-ETV6-RUNX1}$ + Mb1-Cre de 4 meses de edad comparados con controles WT de edad similar. Las células B de los ratones $Etv6^{-ETV6-RUNX1}$ + Mb1-Cre mostraron un patrón de desarrollo comparable al de las células B de los ratones control (**Figura 22**), lo que indica que la inducción de *ETV6-RUNX1* a nivel de la célula proB tiene un efecto mínimo en el desarrollo celular B. De manera importante, la incapacidad de generar B-ALL espontánea en los ratones $Etv6^{-ETV6-RUNX1}$ + Mb1-Cre puede reflejar la necesidad de eventos moleculares secundarios específicos, que no están inducidos de manera eficiente en las células B por las condiciones de exposición a infecciones utilizadas o no son capaces de inducir una transformación oncogénica en las células B.

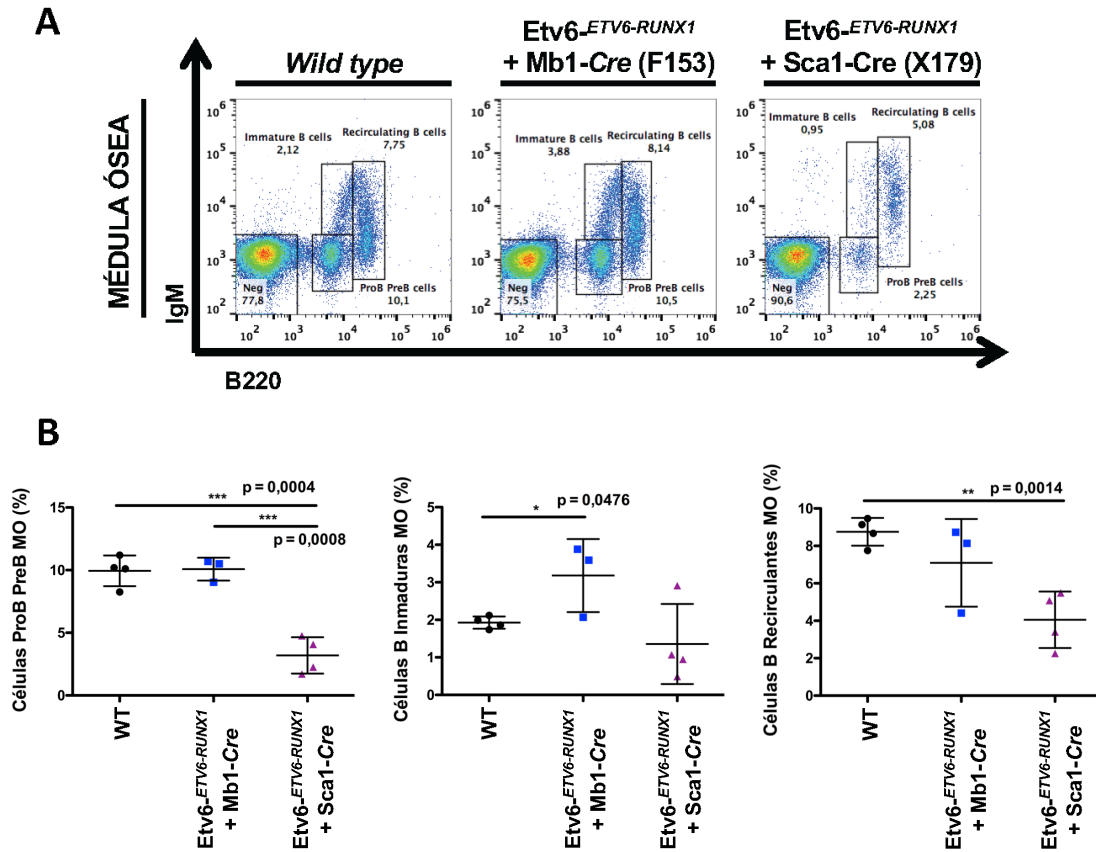


Figura 22. Desarrollo celular B en MO de ratones $Etv6^{-ETV6-RUNX1}$ + Mb1-Cre y $Etv6^{-ETV6-RUNX1}$ + Sca1-Cre. **A)** Desarrollo de las células B en ratones jóvenes (4 meses de edad) $Etv6^{-ETV6-RUNX1}$ + Mb1-Cre (n=3) y $Etv6^{-ETV6-RUNX1}$ + Sca1-Cre (n=4) comparados con ratones WT de edad pareja (n=4) analizado mediante citometría de flujo. Léase *Recirculating B cells* = Células B recirculantes; *Immature B cells* = Células B inmaduras; *proB preB cells* = Células proB preB. **B)** Los ratones $Etv6^{-ETV6-RUNX1}$ + Sca1-Cre muestran una disminución significativa de las células proB preB ($B220^{low}IgM^{-}$) y de las células B recirculantes ($B220^{+}IgM^{+}$), pero no en las células B inmaduras ($B220^{low}IgM^{+}$). Se muestra el p-valor significativo de un t-test no pareado y las barras de error representan la desviación estándar.

2.2. La combinación de la fusión *ETV6-RUNX1* en el compartimento *stem* hematopoyético y la pérdida de función de *Kdm5c* en las células B no es capaz de inducir B-ALL en condiciones libres de patógenos (SPF)

Previamente hemos identificado que mutaciones de pérdida de función en el gen modificador de las histonas *Kdm5c* es un factor que contribuye a la evolución clonal de un clon preleucémico *ETV6-RUNX1* hacia B-ALL en humano y también en el ratón *Sca1-ETV6-RUNX1*^{41,51}. Así, lo siguiente que hemos querido estudiar son los efectos oncogénicos de la pérdida de función de *Kdm5c* en la transformación de las células B dependiente de *ETV6-RUNX1*^{41,51}. Para este propósito, hemos utilizado los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1*, que expresan *ETV6-RUNX1* en los progenitores hematopoyéticos y no desarrollan B-ALL en condiciones SPF⁴¹. Esta cepa de ratón se ha cruzado con una línea de ratón *Kdm5c*^{wt/f} obtenido del repositorio público EMMA (de sus siglas en inglés *European Mouse Mutant Archive*). De esta manera se consigue la pérdida de función de *Kdm5c* por la delección de los exones 15-17 en el linaje de precursores celulares B cruzando los animales con una cepa de ratón *Mb1-Cre*.

Para determinar si la expresión de *ETV6-RUNX1* en precursores hematopoyéticos coopera con la pérdida de función específica en las células B de *Kdm5c* en el desarrollo de B-ALL, hemos monitorizado cohortes de ratones *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c*^{wt/f} + *Mb1-Cre* y ratones control WT nacidos y mantenidos en condiciones SPF durante toda su vida (n=22; observados durante 2 años) (**Figura 23, Tabla 3**).

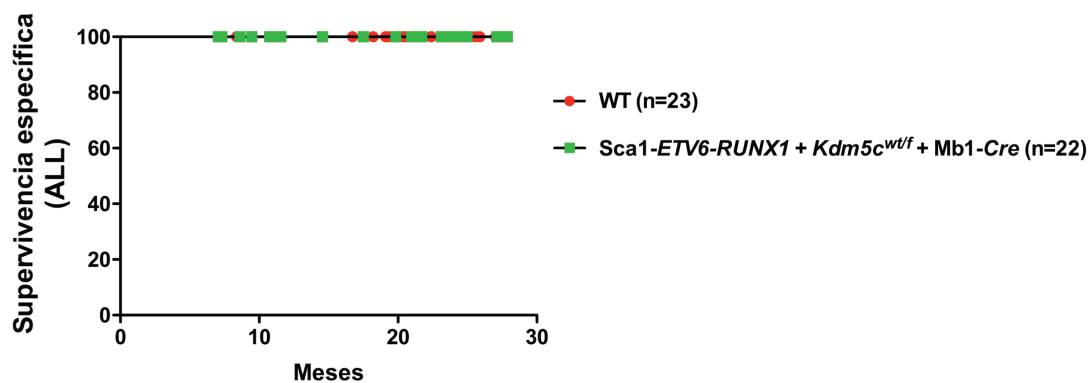


Figura 23. Supervivencia específica de ALL de ratones *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c*^{wt/f} + *Mb1-Cre* en SPF. Supervivencia específica de leucemia de los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c*^{wt/f} + *Mb1-Cre* (verde, n=22) comparados con ratones control WT (rojo, n=23). No se observa el desarrollo de ALL en los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c*^{wt/f} + *Mb1-Cre* en SPF.

Sin embargo, aunque ninguno de los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c*^{wt/f} + *Mb1-Cre* desarrollaron B-ALL, la pérdida específica de *Kdm5c* en las células B resultó tóxica, porque las células B se perdieron en una proporción importante de los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c*^{wt/f} + *Mb1-Cre* (4 de 11; 36,4%) (**Figura 24A y B**). Así, la incapacidad de generar B-ALL de manera espontánea en los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c*^{wt/f} + *Mb1-Cre* sugiere que la pérdida de función específica de *Kdm5c* en las células B no es un factor que contribuye a la evolución clonal de un clon preleucémico *ETV6-RUNX1* hasta B-ALL.

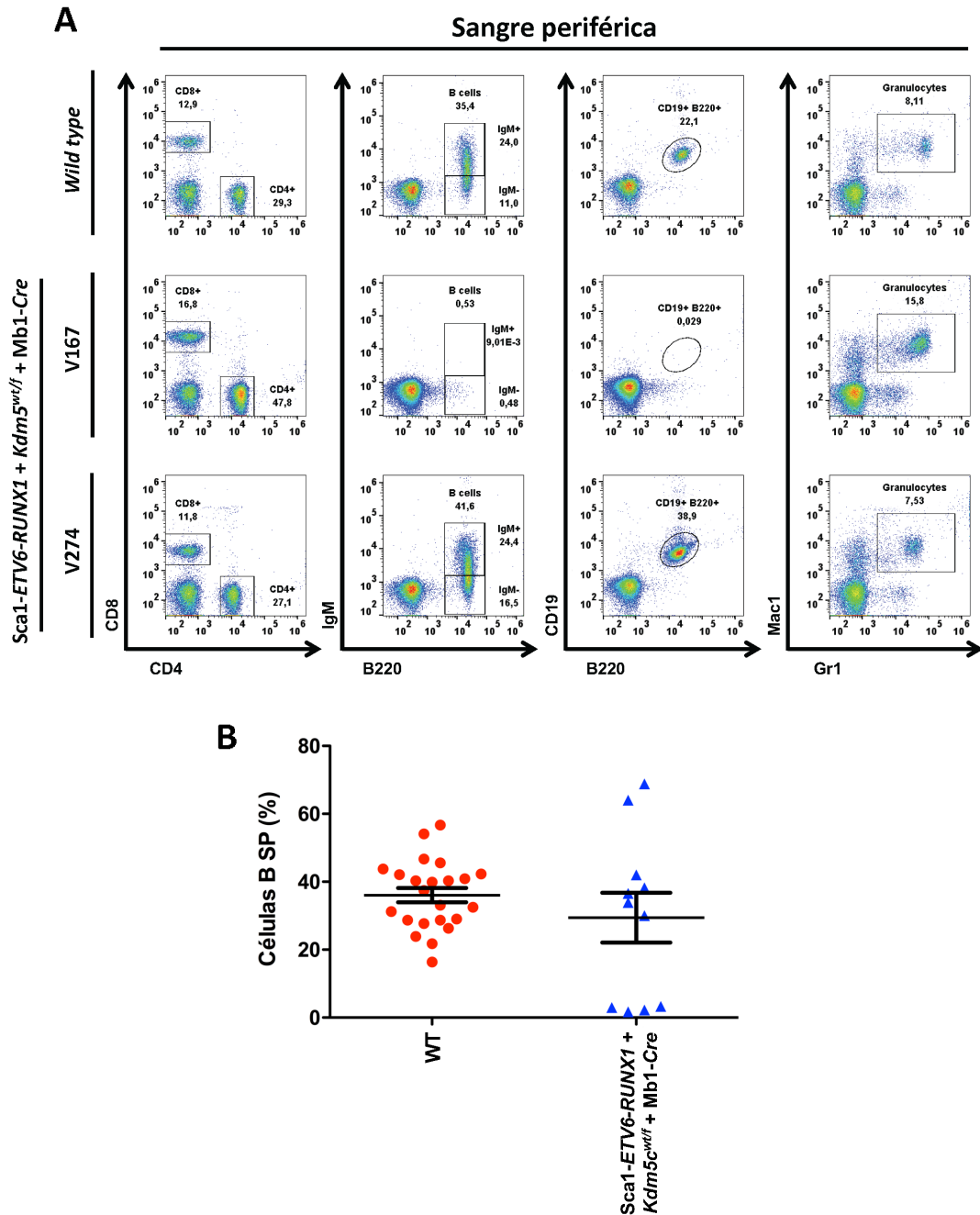


Figura 24. La ausencia de *Kdm5c* a nivel de las células proB altera el desarrollo de las células B. A) Análisis representativo de citometría de flujo de sangre periférica de ratones *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c^{wt/f} + Mb1-Cre* con (V274) y sin (V167) células B. Léase *B cells* = Células B; *Granulocytes* = Granulocitos. **B)** Análisis mediante citometría de flujo de sangre periférica de ratones *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c^{wt/f} + Mb1-Cre* (n=11) comparado con ratones control WT (n=23) de edad pareada (6 meses de edad). El defecto de células B no presenta una penetrancia completa en los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c^{wt/f} + Mb1-Cre*.

Tabla 3. Resumen de los ratones condicionales utilizados y su fenotipo.

GENOTIPO	TOTAL	ALL	T-ALL	B-ALL
Etv6- <i>ETV6-RUNX1</i> + Mb1- <i>Cre</i>	31	0	0	0
Etv6- <i>ETV6-RUNX1</i> + Sca1- <i>Cre</i>	32	13 (40,63%)	11 (34,38%)	2 (6,25%)
Sca1- <i>ETV6-RUNX1</i> + <i>Kdm5c^{wt/f}</i> + Mb1- <i>Cre</i>	22	0	0	0
Sca1- <i>ETV6-RUNX1</i> + <i>Kdm5c^{wt/f}</i> + Sca1- <i>Cre</i>	9	2(22,2%)	0	2 (22,2%)

2.3. La exposición natural a infección es capaz de inducir el desarrollo de leucemia en ratones condicionales Etv6-*ETV6-RUNX1* que expresan *ETV6-RUNX1* en las HSCs

Aunque las células en la B-ALL *ETV6-RUNX1*+ son generalmente consideradas como el equivalente maligno de las células precursoras B normales, nuestros resultados previos indican que los precursores de células B no son propensos a la transformación por ambientes oncogénicos que contribuyen al desarrollo de B-ALL. Lo siguiente que quisimos hacer fue modelar la capacidad de *ETV6-RUNX1* para transformar las HS/PCs. Por lo tanto, inicialmente cruzamos los ratones Etv6-*ETV6-RUNX1* con una cepa de ratón Sca1-*Cre*¹⁰⁸, con el fin de iniciar la expresión de *ETV6-RUNX1* en las HS/PCs y mantener su expresión en todas las células hematopoyéticas.

La expresión de *ETV6-RUNX1* dio lugar a alteraciones importantes en el compartimento celular B. El análisis de los diferentes estadios de desarrollo celular B mostró una disminución específica y significativa de las células proB preB (B220^{low}IgM⁻) y de las células B recirculantes (B220⁺IgM⁺) en los ratones Etv6-*ETV6-RUNX1* + Sca1-*Cre* en comparación con ratones WT de edad pareada (**Figura 22**). Igualmente, el porcentaje de células B en SP es reducido de manera significativa en los ratones Etv6-*ETV6-RUNX1* + Sca1-*Cre* (**Figura 25**).

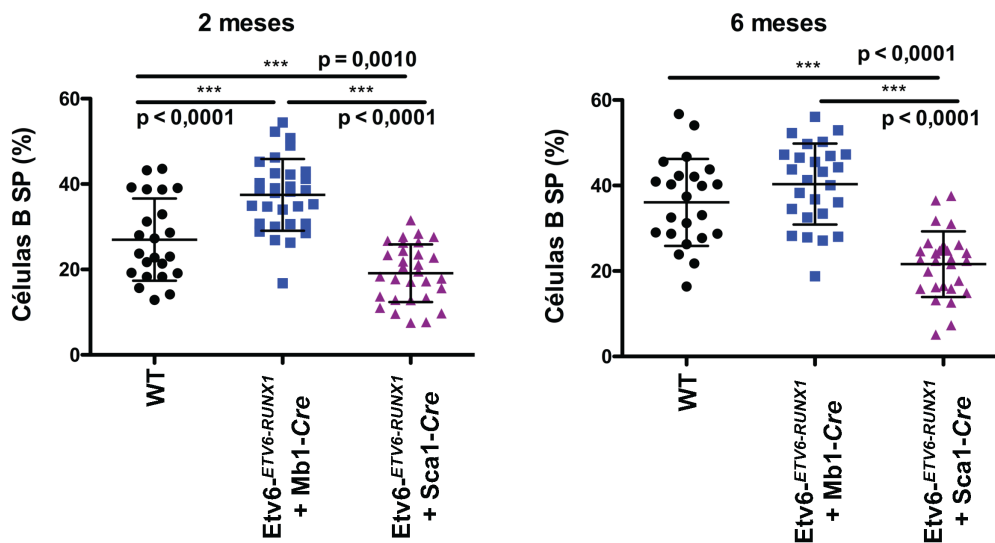


Figura 25. Niveles de células B en SP de los ratones $Etv6^{ETV6-RUNX1} + Mb1-Cre$ y $Etv6^{ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre$. Análisis mediante citometría de flujo de las células B de sangre periférica en ratones jóvenes $Etv6^{ETV6-RUNX1} + Mb1-Cre$ (n=26-31), $Etv6^{ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre$ (n=28-30) y ratones control WT (n=23) de edad pareada (2 y 6 meses de edad). Los ratones $Etv6^{ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre$ muestran un descenso significativo en los niveles de células B ($B220^{+}IgM^{+/-}$) de SP. Se ha utilizado un t-test no pareado. Se representa la media y la desviación estándar.

Los ratones $Etv6^{ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre$ mostraron una supervivencia reducida en comparación con ratones WT (**Figura 21**; $p < 0,0001$ y **Tabla 3**) debido al desarrollo específico de leucemias linfoides, T-ALL (11 de 32; 34,4%) y B-ALL (2 de 32; 6,3%) en condiciones de exposición natural a infección. De manera importante, los ratones $Etv6^{ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre$ no desarrollaron neoplasias mieloides. Las T-ALLs se manifestaron con el desarrollo de timomas, esplenomegalia, y con pérdida de la arquitectura de timo, bazo e hígado entre otros tejidos (**Figura 26**). El análisis mediante FACS de las células leucémicas reveló un inmunofenotipo $CD8^{+}CD4^{+/-}$ (**Figura 27**), con reordenamiento clonal del TCR (de sus siglas en inglés *T Cell Receptor*) (**Figura 28**).

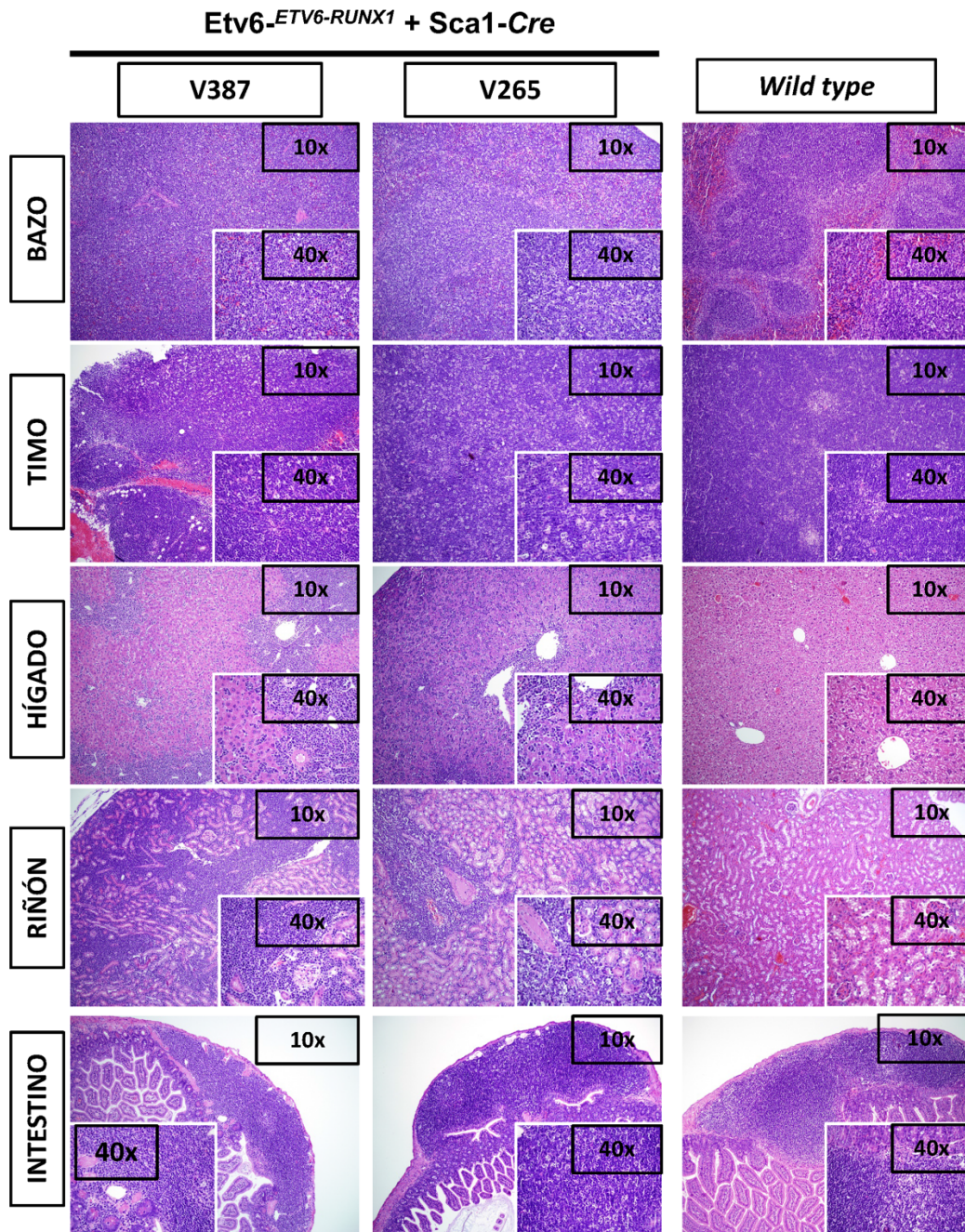


Figura 26. Imágenes histológicas de ratones **Etv6-*ETV6-RUNX1* + Sca1-Cre** con T-ALL. Mediante tinción de hematoxilina-eosina de bazo, timo, hígado, riñón e intestino delgado se puede ver una pérdida de la arquitectura normal del tejido debido a la infiltración de células que morfológicamente parecen linfoblastos. Se muestran tejidos de un animal control *wild type* como referencia.

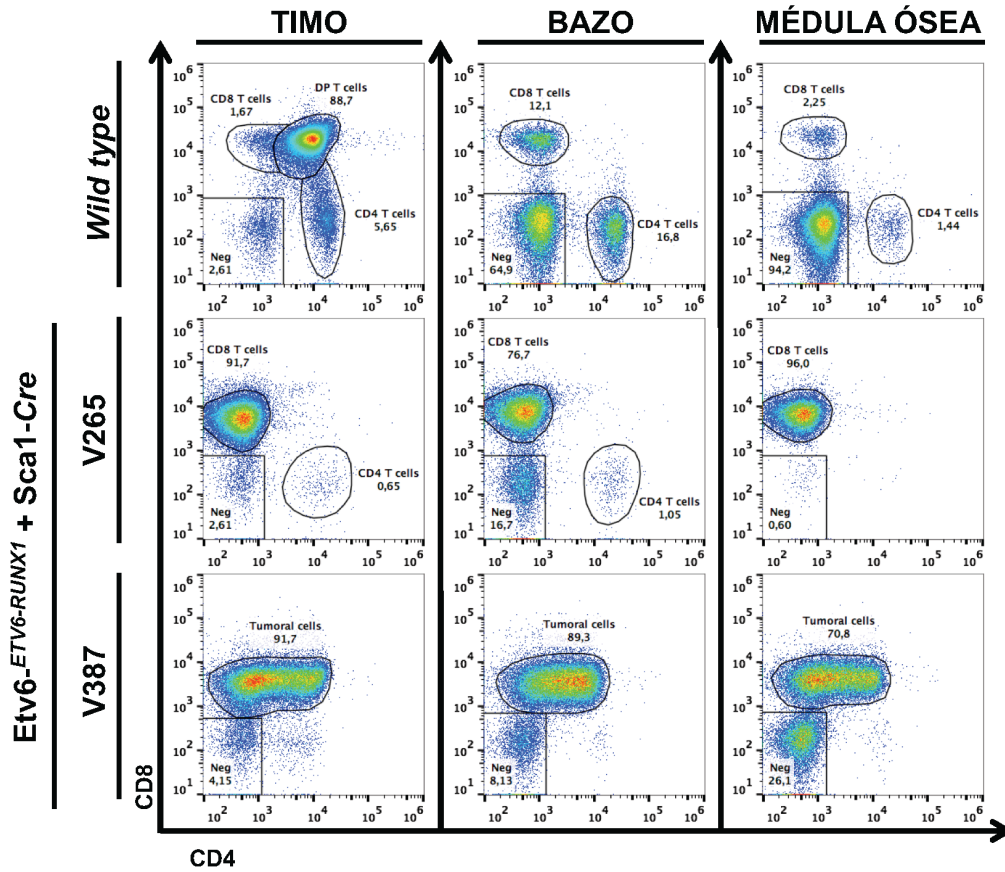


Figura 27. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares T en ratones *Etv6-ETV6-RUNX1* + *Sca1-Cre* con T-ALL. Imágenes representativas de citometría de flujo de los 32 ratones analizados. Se observa una acumulación de células T tumorales CD8⁺CD4⁺. Se muestra timo, bazo y médula ósea de ratón WT como referencia. Léase *T cells* = Células T; *Tumoral cells* = Células tumorales.

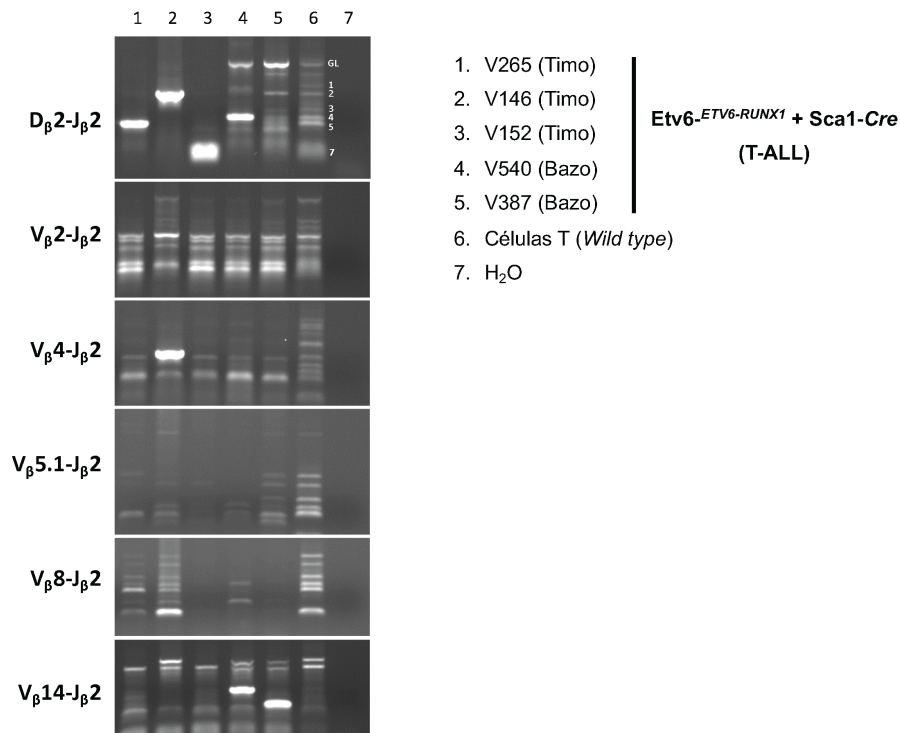


Figura 28. Clonalidad del T Cell Receptor (TCR) de ratones *Etv6-^{ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre* con T-ALL. Análisis por PCR del reordenamiento de los genes del TCR en timos y bazo de ratones leucémicos *Etv6-^{ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre*. Se han utilizado células T CD8⁺CD4⁺ de timo de ratones WT purificadas mediante separación celular por citometría como control de los reordenamientos policlonales del TCR. Los ratones con T-ALL muestran un aumento de la clonalidad de las inmunoglobulinas.

Por el contrario, la aparición de las B-ALL en los ratones *Etv6-^{ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre* se caracterizaba por la pérdida de la arquitectura del bazo debido a la infiltración de los blastos y a la aparición de células blásticas en otros tejidos (**Figura 29**). También, las B-ALL de los ratones *Etv6-^{ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre* mostraron un reordenamiento clonal del BCR (de sus siglas en inglés, *B Cell Receptor*) (**Figura 30**). El análisis por FACS reveló un inmunofenotipo CD19⁺B220⁺IgM⁺ para las células tumorales que se extienden por MO, SP y bazo (**Figura 31**).

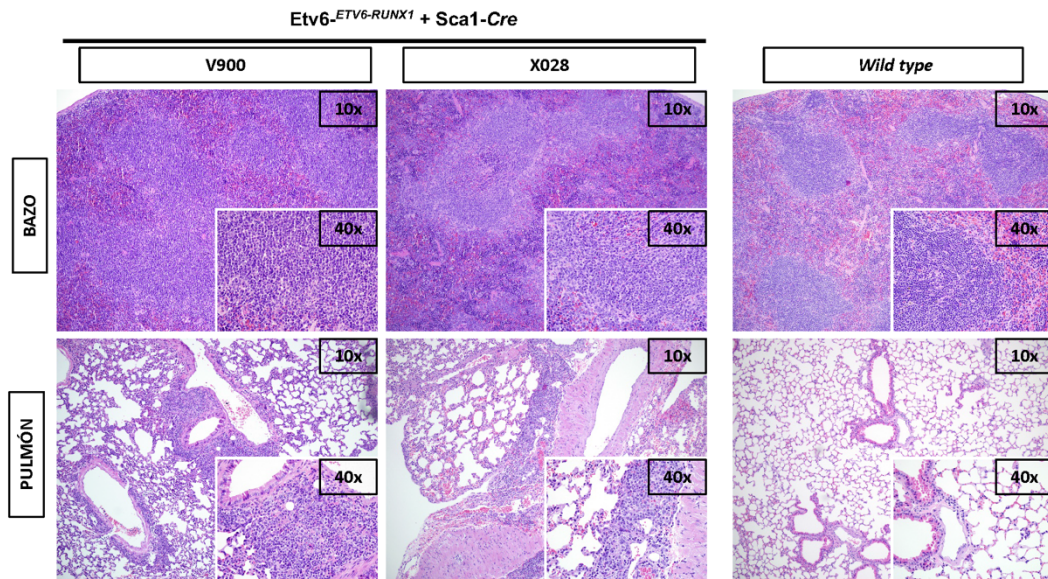


Figura 29. Imágenes histológicas de ratones $Etv6^{ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre$ con B-ALL. Tinciones de hematoxilina-eosina de bazo y pulmón. Se puede observar que los ratones $Etv6^{ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre$ con B-ALL presentan una pérdida de la arquitectura normal debido a la infiltración por células que morfológicamente parecen linfoblastos. Tejidos de un animal control *wild type* se muestran como referencia.

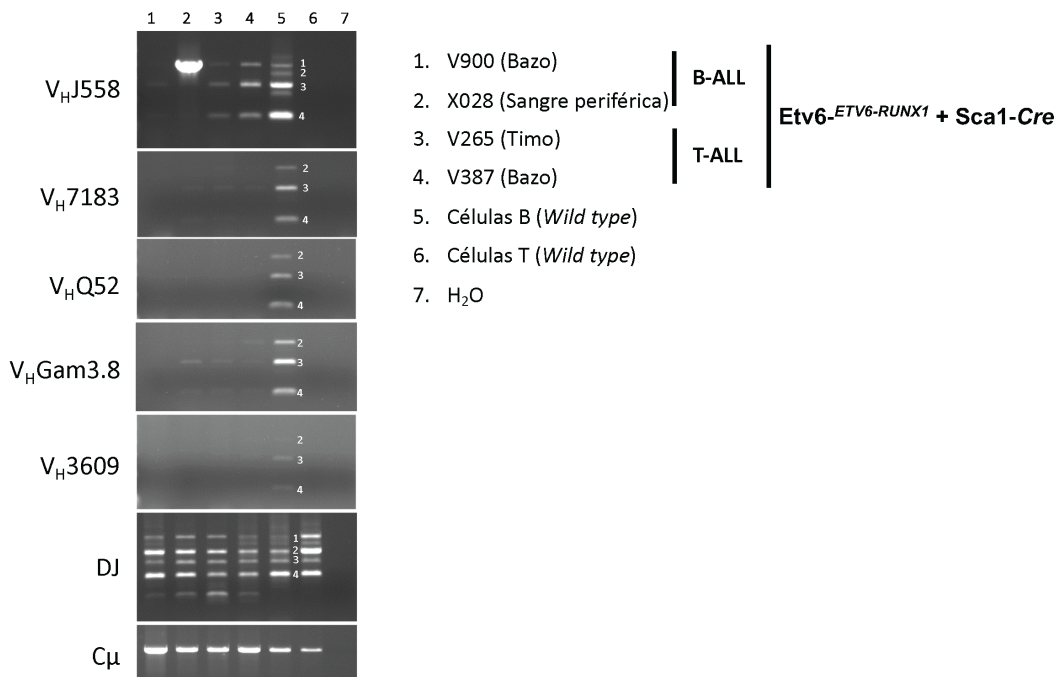


Figura 30. Clonalidad del B Cell Receptor (BCR) en ratones $Etv6^{ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre$ con B-ALL y T-ALL. Análisis mediante PCR del reordenamiento de los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en tejidos infiltrados (sangre periférica, timo y bazo) de ratones $Etv6^{ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre$ enfermos. Como control de los reordenamientos policlonales de las inmunoglobulinas se han utilizado células B de bazo ($CD19^+$) purificadas mediante separación celular por citometría de ratón WT. Células T $CD8^+CD4^+$ de timo de ratón WT han servido como control negativo. Los tejidos infiltrados muestran un aumento de la clonalidad de las inmunoglobulinas.

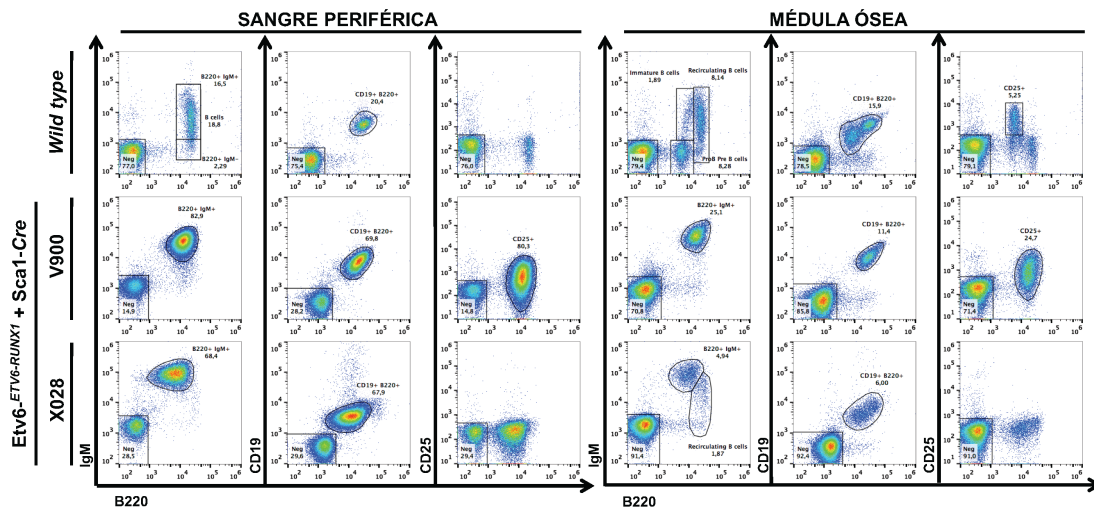


Figura 31. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares B en ratones *Etv6-ETV6-RUNX1 + Sca1-Cre* con B-ALL. Imágenes representativas de citometría de flujo de los 32 ratones analizados. Se observa una acumulación de células B tumorales CD19⁺B220⁺CD25⁺. Se muestra sangre periférica y médula ósea de ratón WT como referencia. Léase *B cells* = Células B; *Recirculating B cells* = Células B recirculantes; *Immature B cells* = Células B inmaduras; *preB and proB cells* = Células proB preB.

Debido a que en el modelo *Etv6-ETV6-RUNX1 + Sca1-Cre*, la expresión de *ETV6-RUNX1* se mantiene constitutivamente no sólo en las HS/PCs y en el linaje celular B, sino también en el linaje T, estos resultados sugieren que la naturaleza del segundo evento dicta la identidad celular del tumor *ETV6-RUNX1*. Para confirmar esta hipótesis, llevamos a cabo WES de estas T-ALL (n=10) y B-ALL (n=2) (**Figura 32 y Anexo 10**) de los ratones *Etv6-ETV6-RUNX1 + Sca1-Cre*. Las mutaciones de las leucemias T de los ratones *Etv6-ETV6-RUNX1 + Sca1-Cre* mostraron una importante similitud con las T-ALL humanas a nivel genómico¹⁰⁹ debido a la presencia de mutaciones recurrentes de *Notch1* (2/10) e *Ikzf1* (2/10). Además, estas mutaciones de *Notch1* e *Ikzf1* no están presentes en las leucemias B de los ratones *Etv6-ETV6-RUNX1 + Sca1-Cre*. Las mutaciones de *Notch1* no tienen lugar en las leucemias *ETV6-RUNX1* humanas⁵¹, explicando que *ETV6-RUNX1* no esté asociado a la T-ALL infantil. Sin embargo, la célula de origen en niños parece tener un potencial celular T ya que se han identificado clones comunes ancestrales que contienen reordenamientos parciales de *IGH* o *TCR* por secuenciación en células individualizadas de gemelos monocoriónicos con ALL infantil *ETV6-RUNX1*¹¹⁰.

		Etv6 ^{ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre																											
		T-ALL																											
		V265		V387		V147		V152		V146		V386		V151		V540		X177		V899									
		Timo				Bazo				Timo				Timo				Bazo				Timo				Timo			
		T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C						
Total Somáticas Somáticas Cáncer		42754	45864	39439	38931	47256	47030	35714	35419	45661	45794	35489	35010	45178	45467	50133	49964	22822	21740	48219	48581								
		10		40		54		19		28		28		17		18		22		41									
		0		1		2		1		4		4		0		1		2		1									

		Etv6 ^{ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre				Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c ^{wt/f} + Sca1-Cre			
		B-ALL				Neoplasia B			
		V900		X028		I989		V120	
		Bazo				Nódulo linfático			
		T	C	T	C	T	C	T	C
Total Somáticas Somáticas Cáncer		43630	45112	47910	47868	41509	41825	45185	46508
		26		24		21		276	
		2		1		2		18	

Figura 32. Análisis mediante *whole exome sequencing*. Mediante *exome sequencing* de los tumores murinos se han identificado las alteraciones secundarias en las leucemias de los ratones Etv6-*ETV6-RUNX1* + Sca1-Cre y Sca1-*ETV6-RUNX1* + *Kdm5c*^{wt/f} + Sca1-Cre. Se muestra el número calculado de genes afectados relacionados con cáncer usando la lista consenso de genes relacionados con cáncer¹¹¹.

2.4. La pérdida de función de *Kdm5c* en HSCs es el evento necesario para la evolución clonal de un clon preleucémico *ETV6-RUNX1* hasta B-ALL en condiciones libres de patógenos (SPF)

Nuestras observaciones previas indican que la naturaleza del segundo evento dicta la identidad celular del tumor *ETV6-RUNX1*. Para determinar si la expresión de *ETV6-RUNX1* en precursores hematopoyéticos coopera con la pérdida de función específica de *Kdm5c* en HS/PCs en el desarrollo de B-ALL, hemos utilizado ratones Sca1-*ETV6-RUNX1*, que no desarrollan B-ALL en condiciones SPF⁴¹, junto con la pérdida de función de *Kdm5c* en HS/PCs cruzando la línea *Kdm5c*^{wt/f} con la cepa de ratón Sca1-Cre. La pérdida de función específica de *Kdm5c* en las HS/PCs no afectó al desarrollo celular B en los ratones Sca1-*ETV6-RUNX1* + *Kdm5c*^{wt/f} + Sca1-Cre (**Figura 33A**). Igualmente, en estas condiciones SPF, se observó el desarrollo de B-ALL (2 de 9; 22%) en ratones Sca1-*ETV6-RUNX1* + *Kdm5c*^{wt/f} + Sca1-Cre nacidos y mantenidos en condiciones SPF durante toda su vida (n=9; observados durante 2 años) (**Figura 33B, Tabla 3**). Debido a la baja incidencia de B-ALL, la supervivencia global de los ratones Sca1-*ETV6-RUNX1* + *Kdm5c*^{wt/f} + Sca1-Cre no se redujo de manera significativa en comparación con ratones WT (p=0,1695; **Figura 33B**).

Las leucemias de células B de los ratones Sca1-*ETV6-RUNX1* + *Kdm5c*^{wt/f} + Sca1-Cre presentaron reordenamientos clonales del BCR (**Figura 34**), y el análisis por FACS reveló un inmunofenotipo CD19⁺B220⁺IgM⁺ para las células tumorales que se extendían a través de la MO, SP y bazo (**Figura 35**) con la capacidad de infiltrar otros tejidos (**Figura 36**).

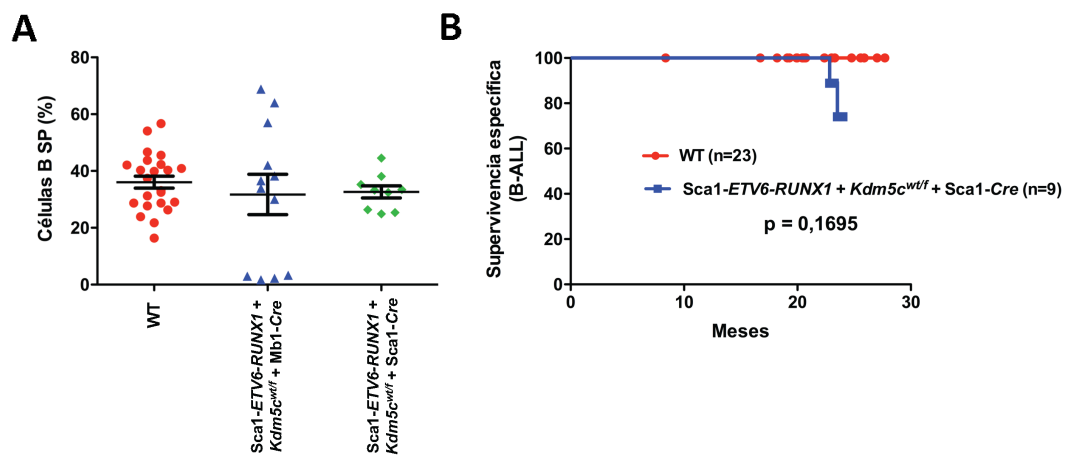


Figura 33. Influencia de la pérdida de *Kdm5c* en HSCs. A) La pérdida de función específica de *Kdm5c* en HS/PCs no afecta al desarrollo celular B en los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c^{wt/f} + Sca1-Cre*. Se muestra el análisis por citometría de flujo de las células B en sangre periférica de ratones *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c^{wt/f} + Sca1-Cre* (n=9) comparado con *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c^{wt/f} + Mb1-Cre* (n=11) y ratones control WT (n=23) de edad pareada (6 meses de edad). **B)** Supervivencia específica de B-ALL de los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c^{wt/f} + Sca1-Cre* (azul, n=9), que muestra una supervivencia reducida (pero no significativa, Mantel-Cox p=0,1695) comparados con ratones control WT (rojo, n=23) como resultado del desarrollo de B-ALL.

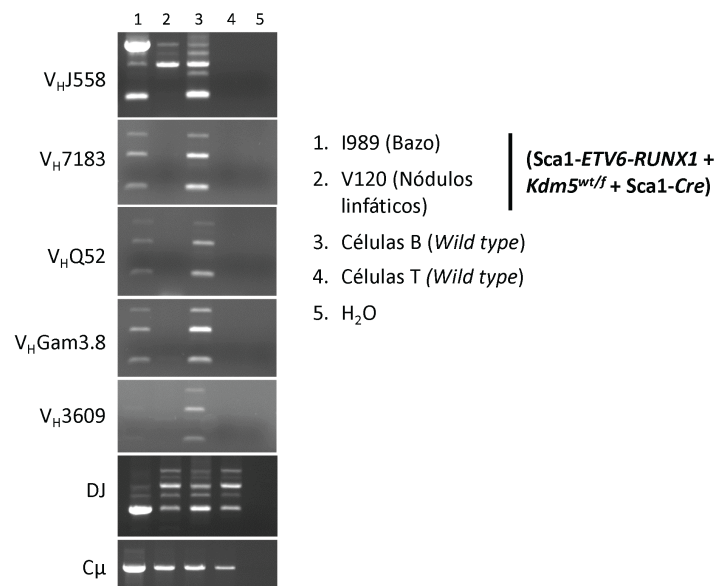


Figura 34. Clonalidad del B Cell Receptor (BCR) en ratones *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c^{wt/f} + Sca1-Cre* con B-ALL. Análisis mediante PCR del reordenamiento de los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en tejidos infiltrados (bazo y nódulos linfáticos) de ratones *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c^{wt/f} + Sca1-Cre* enfermos. Como control de los reordenamientos policlonales de las inmunoglobulinas se han utilizado células B de bazo (CD19⁺) purificadas mediante separación celular por citometría de ratón WT. Células T CD8⁺CD4⁺ de timo de ratón WT han servido como control negativo. Los tejidos infiltrados muestran un aumento de la clonalidad de las inmunoglobulinas.

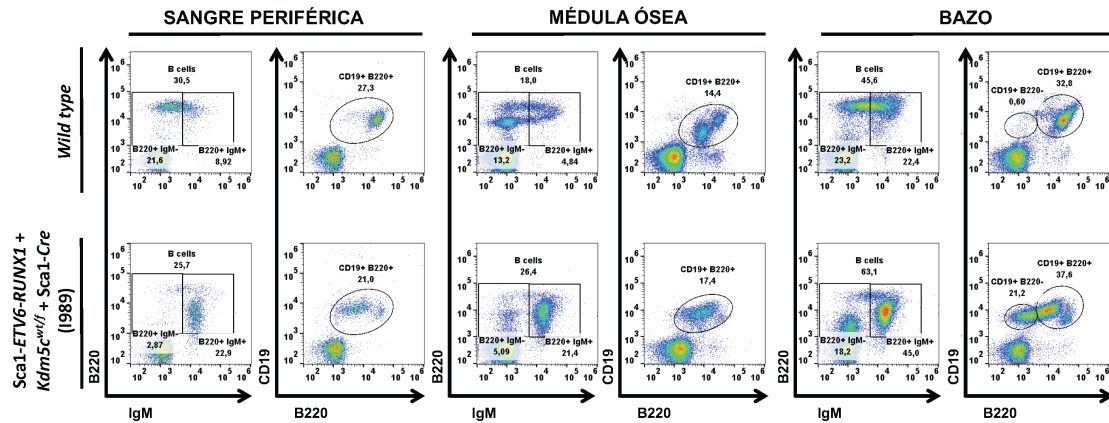


Figura 35. Neoplasia de células B en ratones *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c^{wt/f} + Sca1-Cre*. Análisis por citometría de flujo de poblaciones celulares B en ratones enfermos *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c^{wt/f} + Sca1-Cre*. Se muestran imágenes representativas de sangre periférica, médula ósea y bazo con una acumulación de células B en comparación con un ratón control WT de edad pareada (22 meses de edad).

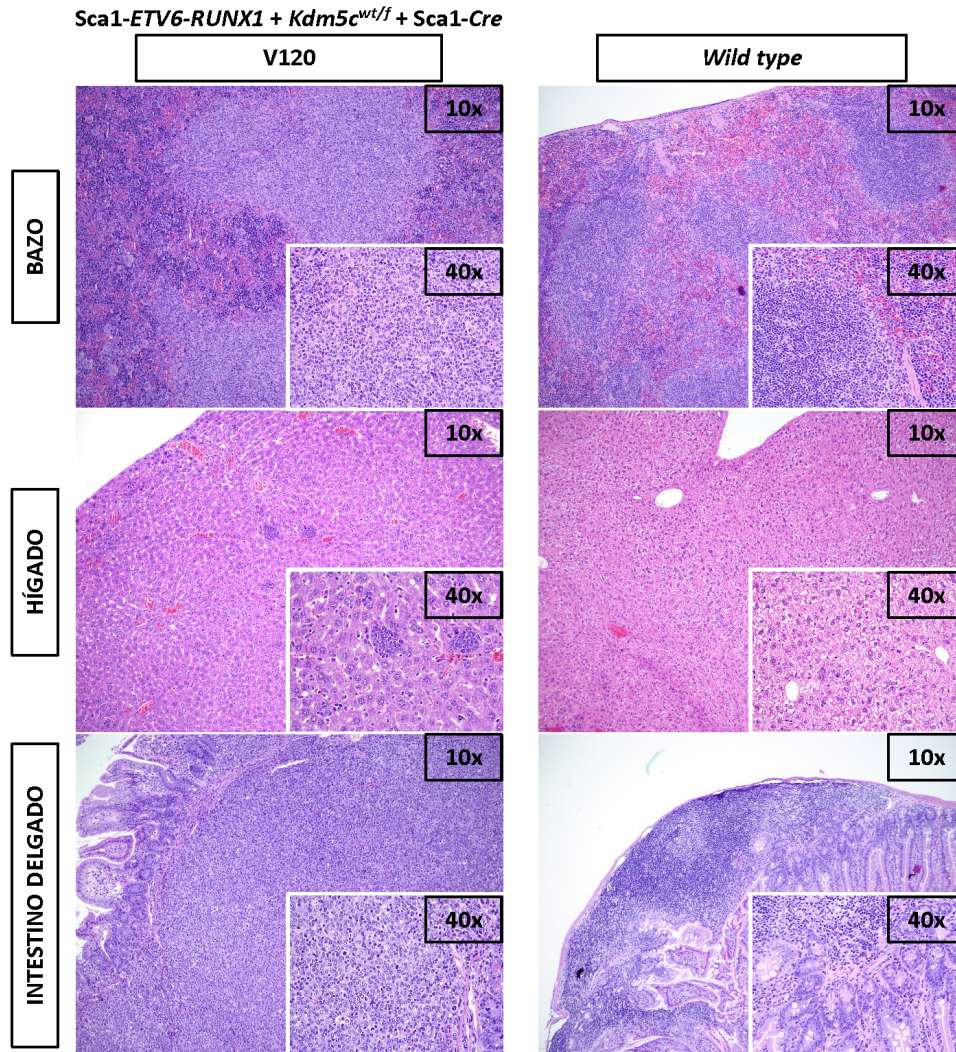


Figura 36. Imágenes histológicas de ratón *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c^{wt/f} + Sca1-Cre* con B-ALL. Tinción hematoxilina-eosina de bazo, hígado e intestino delgado que muestra como los tejidos del ratón *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c^{wt/f} + Sca1-Cre* pierden la arquitectura normal debido a la infiltración de células tumorales B. Tejidos de un ratón control *wild type* se muestran como referencia.

Mediante WES de las B-ALL de los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c^{wt/f} + Sca1-Cre* (n=2; **Figura 32, Anexo 10**) se pudo confirmar la similitud a nivel genómico con las B-ALL de los ratones *Etv6-^{ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre*. Estos resultados proporcionan evidencias de que la naturaleza del segundo evento en las HS/PCs confiere la identidad celular tumoral al clon preleucémico *ETV6-RUNX1*.

3. Cambios en el modelo actual del desarrollo de B-ALL: AID no es necesario para la evolución clonal de las células premalignas

3.1. Caracterización de la expresión de *Aid* en modelos preleucémicos

AID (*Activation induced cytidine deaminase*) es responsable de la inducción de la diversificación secundaria de los genes de las inmunoglobulinas en órganos linfoides secundarios en respuesta al antígeno. AID inicia la mutación hipersomática y también el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas, pero también puede promover translocaciones cromosómicas y mutaciones con un papel etiológico en el desarrollo de linfomas de células B^{77,78,81-84}. En el presente trabajo y en estudios previos hemos demostrado que la exposición natural a infección provoca la evolución clonal hacia B-ALL^{41,58}. Basándonos en estos datos nos preguntamos si AID es necesario para la evolución clonal de precursores celulares B premalignos en la etiología de la B-ALL asociada a infección.

En primer lugar, hemos investigado si niveles altos de AID están presentes en precursores celulares B preleucémicos *in vivo* purificados de ratones portadores de una susceptibilidad genética desarrollar B-ALL (heterocigosidad de *Pax5* o la presencia del gen de fusión *ETV6-RUNX1*), que están expuestos a infecciones naturales (**Figura 37**). Ambos modelos de ratón sólo desarrollan B-ALL en condiciones de exposición natural a infección^{41,58}. Los niveles de expresión de AID no estaban aumentados en precursores celulares B preleucémicos de MO, independientemente de si los ratones se mantuvieron en condiciones SPF o en el animalario convencional (infección natural) (**Figura 37**).

En un estudio previo⁸⁰, la retirada de IL-7 y la exposición repetida *ex vivo* de células preB a estrés inflamatorio (LPS) dio lugar a altos niveles de expresión de mRNA y proteína de AID. Sin embargo, la exposición a infección natural no aumenta significativamente la expresión de AID en precursores celulares B preleucémicos (**Figura 37**).

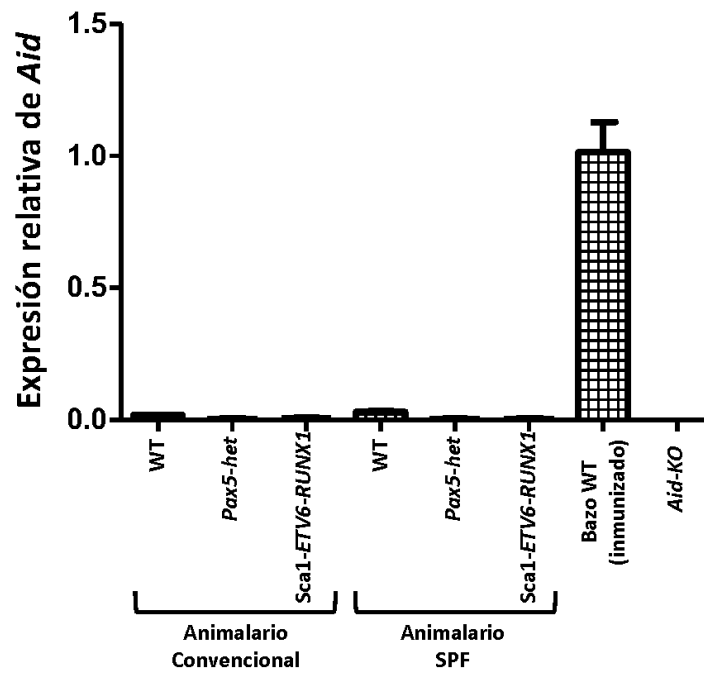


Figura 37. Expresión de *Aid* durante la exposición natural a infección. Expresión relativa de *Aid* en precursores preleucémicos de MO. Se han purificado células proB preB de MO mediante separación celular por citometría de ratones control WT, *Pax5-het* y *Sca1-ETV6-RUNX1* de ratones mantenidos en condiciones SPF y ratones expuestos a infección natural en el animalario convencional. Se ha utilizado bazo total de ratón WT inmunizado como control positivo. Como control negativo se han utilizado células proB preB purificadas por separación celular por citometría de ratones *Aid-KO*. Se muestra la media con la desviación estándar de 3 replicados.

3.2. La exposición natural a infección da lugar al desarrollo de B-ALL en ausencia de *Aid*

Dada la naturaleza clonal de la leucemia, no podemos excluir la posibilidad de que *Aid* pudiera estar sobreexpresado en una célula precursora B individual preleucémica en nuestro modelo *in vivo* de exposición natural a infección. Para probar un papel causal de AID en el desarrollo de B-ALL asociada a infección, hemos utilizado ratones *Aid-KO* para estudiar la pérdida de función de AID en la evolución clonal de células B premalignas en la etiología de la B-ALL asociada a infección. *PAX5* es un gen comúnmente mutado en B-ALL¹¹². Ratones *Pax5-het* son propensos a desarrollar B-ALL sólo en condiciones de exposición natural a infección⁵⁸. Los ratones *Pax5-het* mantenidos en condiciones SPF no desarrollan B-ALL espontáneamente a no ser que sean expuestos a condiciones de exposición natural a infección, corroborando resultados previos⁵⁸. Así, los ratones *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO* fueron expuestos al mismo ambiente natural de infección (**Figura 9; Anexos 1 y 2**) y el desarrollo de B-ALL se monitorizó y se analizó en estas líneas de ratón como se ha descrito previamente⁵⁸. En este estudio hemos elegido el modelo *Pax5-het* debido a la mayor incidencia de B-ALL en el mismo, facilitando así los análisis posteriores.

Sorprendentemente, en este escenario, el desarrollo de B-ALL se observó en el 30,4% (7 de 23) de los ratones *Pax5-het/Aid-het* y en el 30% (9 de 30) de los ratones *Pax5-het/Aid-*

KO (Figura 38), con una penetrancia de desarrollo de B-ALL muy parecida, en ambos casos, al grupo *Pax5-het*⁵⁸ y a las familias con la mutación de *PAX5* c.547G>A en heterocigosis⁶⁴.

La aparición de la leucemia en los ratones *Pax5-het/Aid-het* o *Pax5-het/Aid-KO* en condiciones de exposición a infección tenía lugar entre los 7 y los 20 meses de edad (Figura 38), de manera similar al grupo *Pax5-het*⁵⁸. Estas B-ALLs *Aid-het* o *Aid-KO* se manifestaban con infiltración de blastos y aparición de células blásticas en SP (Figura 39). El análisis mediante FACS reveló un inmunofenotipo CD19⁺/B220⁺IgM⁻cKit⁺/-CD25⁺/- para las células tumorales que se extendían a través de MO, SP, bazo y nódulos linfáticos (Figura 39 y 40) e infiltraban tejidos no hematopoyéticos como hígado y pulmón (Figura 40).

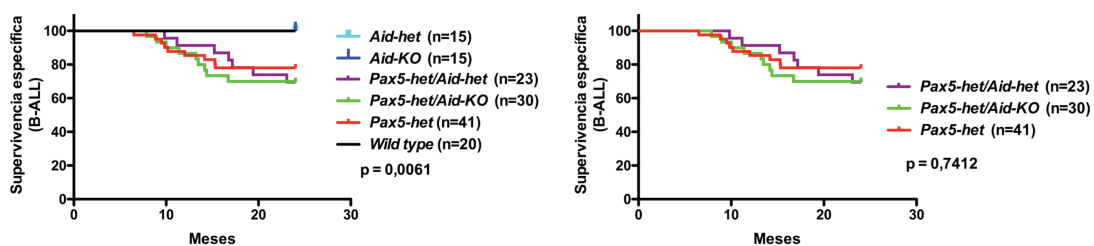


Figura 38. Supervivencia específica de B-ALL para los ratones con o sin *Aid*. Supervivencia específica de B-ALL de los ratones *Aid-het* (azul claro, n=15), *Aid-KO* (azul oscuro, n=15), *Pax5-het/Aid-het* (morado, n=23), *Pax5-het/Aid-KO* (verde, n=30) y *Pax5-het* (rojo, n=41) comparados con ratones control WT (negro, n=20). Los ratones *Pax5-het/Aid-het* o *Pax5-het/Aid-KO* presentan una supervivencia más corta (Mantel-Cox p=0,0061) (panel izquierdo), que es similar a la supervivencia del grupo *Pax5-het* (panel derecho).

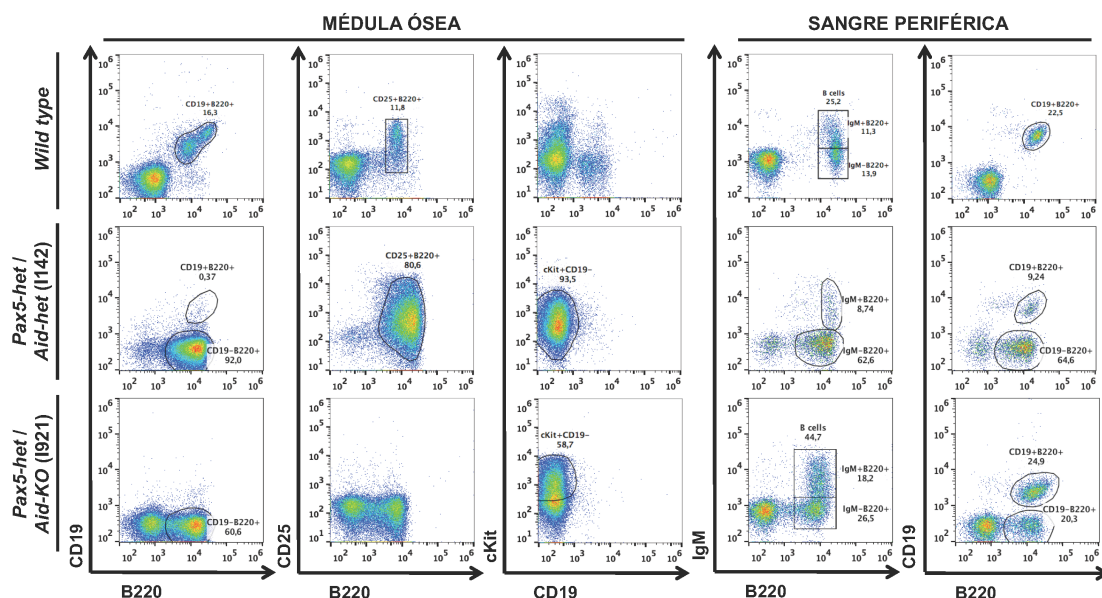


Figura 39. Análisis por citometría de flujo de ratones *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO* con B-ALL. Se muestran gráficos representativos de MO y SP de ratones enfermos comparados con un ratón control WT. Léase *B cells* = Células B.

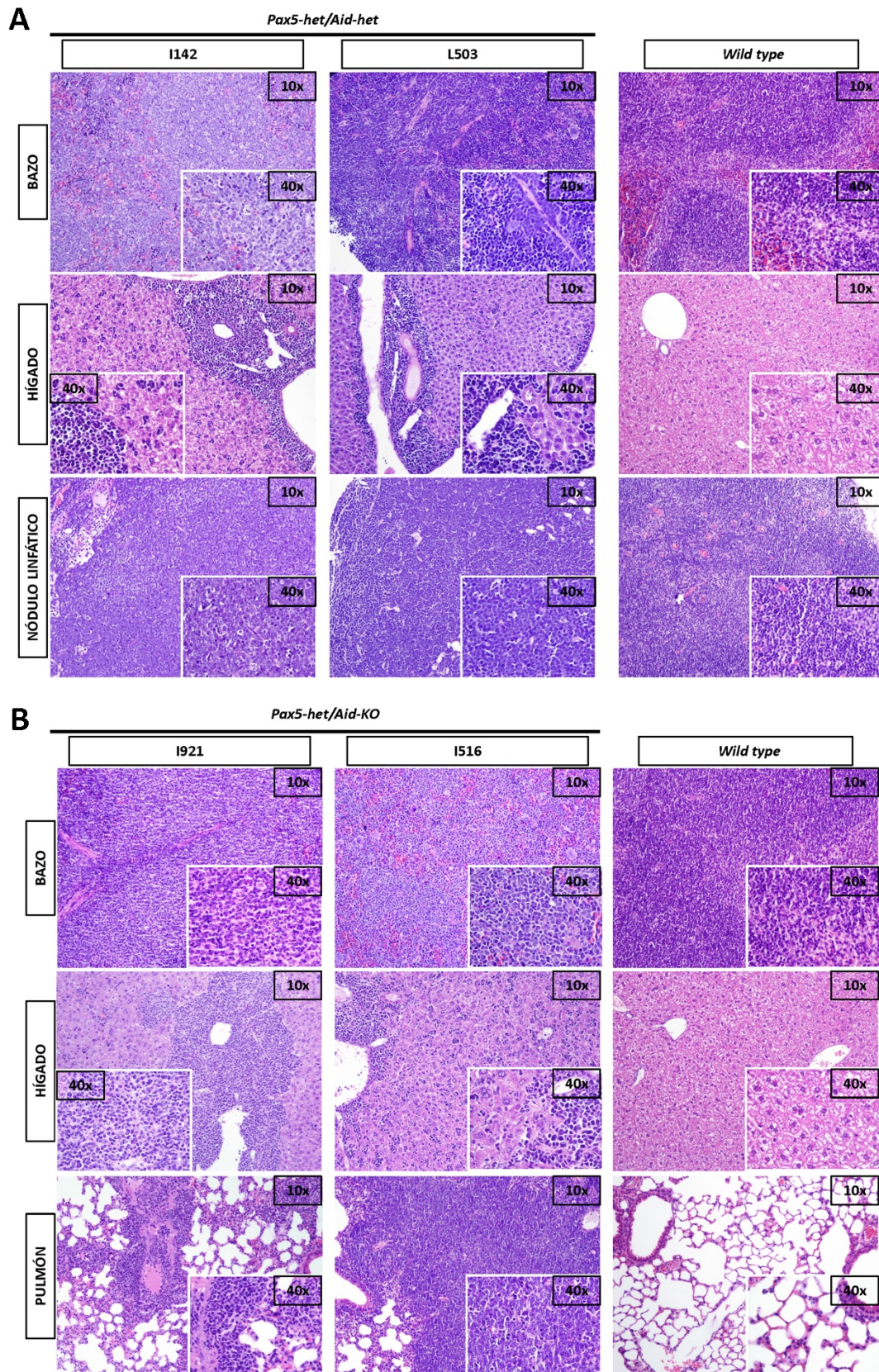


Figura 40. Imágenes histológicas de ratones *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO* con B-ALL. Tinciones hematoxilina-eosina de ratones *Pax5-het/Aid-het* (A) y *Pax5-het/Aid-KO* (B) con B-ALL comparados con un ratón control WT. Se puede ver la pérdida de la arquitectura normal del tejido debido a la infiltración por células que morfológicamente parecen linfoblastos. Se muestra imagen representativa de 3 réplicas.

Igualmente, ambos grupos de B-ALL, *Pax5-het/Aid-Het* y *Pax5-het/Aid-KO*, también presentaron un porcentaje similar de células blásticas infiltrando MO, bazo y SP (**Figura 41A**). De manera similar al grupo *Pax5-het*, todas las B-ALLs *Pax5-het/Aid-het* o *Pax5-het/Aid-KO* mostraron reordenamientos clonales de los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas V_H-DJ_H y D-J_H consistente con un origen celular proB o preB (**Figura 41B**).

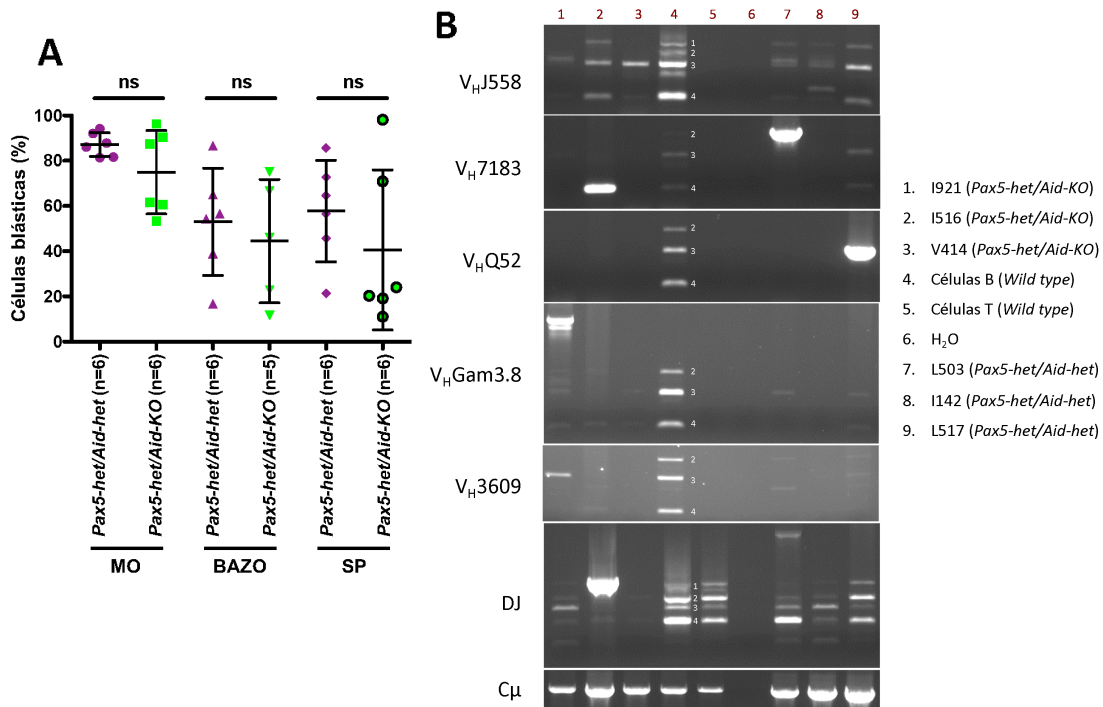


Figura 41. Análisis del porcentaje de blastos B y de la clonalidad de las inmunoglobulinas en ratones *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO* con B-ALL. A) Comparación de los porcentajes de las células blásticas en MO, bazo y SP entre los ratones enfermos *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO*. Los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Test U de Mann Whitney). **B)** Análisis mediante PCR del reordenamiento de los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en la MO de ratones *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO* enfermos. Como control de los reordenamientos policlonales de las inmunoglobulinas se han utilizado células B de bazo (CD19⁺) purificadas mediante separación celular por citometría de ratón WT. Células T CD8⁺CD4⁺ de timo de ratón WT han servido como control negativo. Los tejidos infiltrados muestran un aumento de la clonalidad de las inmunoglobulinas.

De manera consistente, las células proB tumorales *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO* crecieron independientes para IL-7 y podían iniciar la leucemia en recipientes secundarios trasplantados (**Figura 42**).

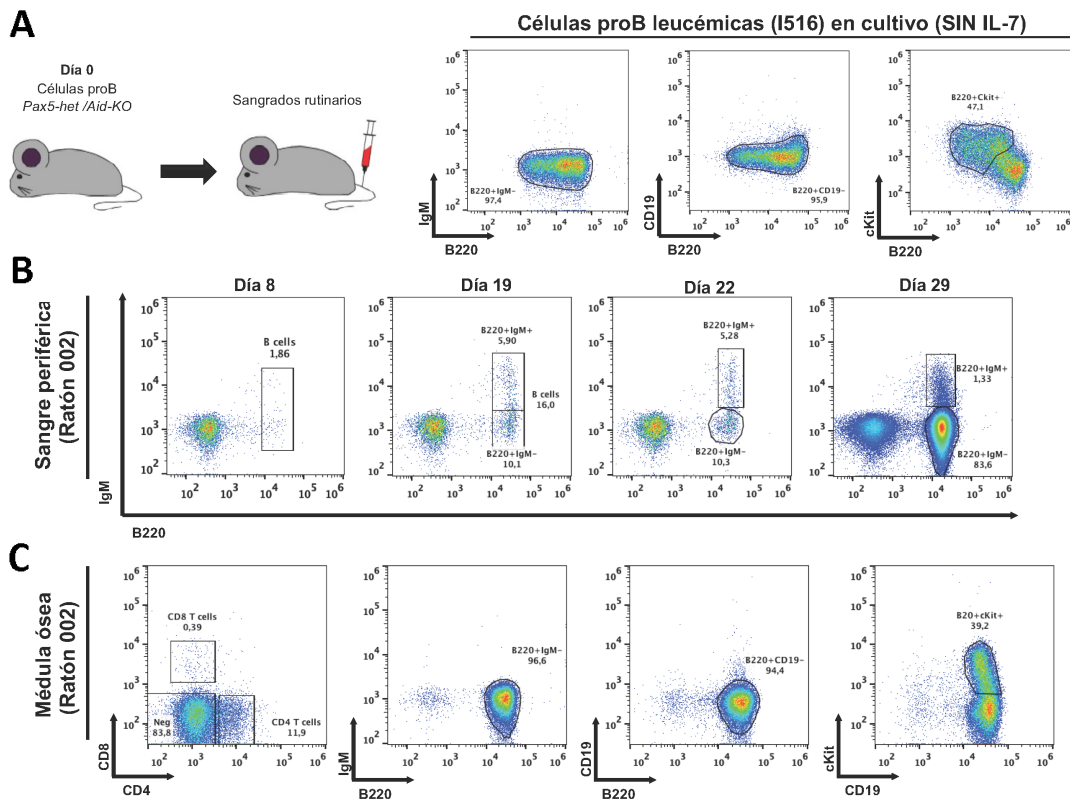


Figura 42. La B-ALL *Pax5-het/Aid-KO* es trasplantable en receptores secundarios. **A)** Diseño experimental. Se han inyectado un total de 100.000 células proB leucémicas *Pax5-het/Aid-KO* mantenidas en cultivo sin IL-7, en ratones WT singénicos subletalmente irradiados. Se han llevado a cabo sangrados rutinarios para monitorizar el desarrollo de B-ALL. **B)** Análisis representativo por citometría de flujo de los ratones inyectados con células proB leucémicas *Pax5-het/Aid-KO*. El análisis a diferentes tiempos muestra que las células leucémicas ($B220^{low}IgM^{-}$) son capaces de crecer en receptores secundarios. **C)** Análisis representativo por citometría de flujo de los ratones inyectados con células proB leucémicas *Pax5-het/Aid-KO* que muestra una acumulación de células tumorales ($B220^{low}IgM^{-}$) en MO. Lease *B cells* = Células B; *T cells* = Células T.

3.3. Caracterización genética de las B-ALLs *Aid-het* y *Aid-KO*

Igualmente, a continuación, identificamos genes diferencialmente expresados (FDR=0,01) en médulas óseas tumorales de ratones *Pax5-het/Aid-het* (**Figura 43**) y *Pax5-het/Aid-KO* (**Figura 43**) comparado con precursores celulares B de MO de ratones WT. Se vio que las B-ALLs deficientes para AID muestran un patrón de expresión génica similar a la B-ALL *Aid-het* (**Figura 44**). Para explorar la relevancia de estos descubrimientos en la leucemia humana, hemos comparado el papel de la actividad de AID en la expresión de mRNA derivada de células tumorales de pacientes con B-ALL que expresaban o no AID^{113,114}. Aunque las B-ALL deficientes para AID mostraron un patrón de expresión génica similar a estas leucemias humanas¹¹⁴ (FDR=0,005; FDR=0,002) (**Figura 45A**), los perfiles de expresión génica entre las B-ALL *Pax5-het/Aid-KO* y las B-ALL *Pax5-het/Aid-het* no mostraron diferencias entre ellas cuando las comparamos con el perfil de expresión génica de células tumorales derivadas de pacientes con B-ALL

expresando o no AID^{113,114} (FDR=0,290; FDR=0,505) (**Figura 45B**), mostrando que AID no está contribuyendo al perfil de expresión leucémico de la B-ALL asociada a infección.

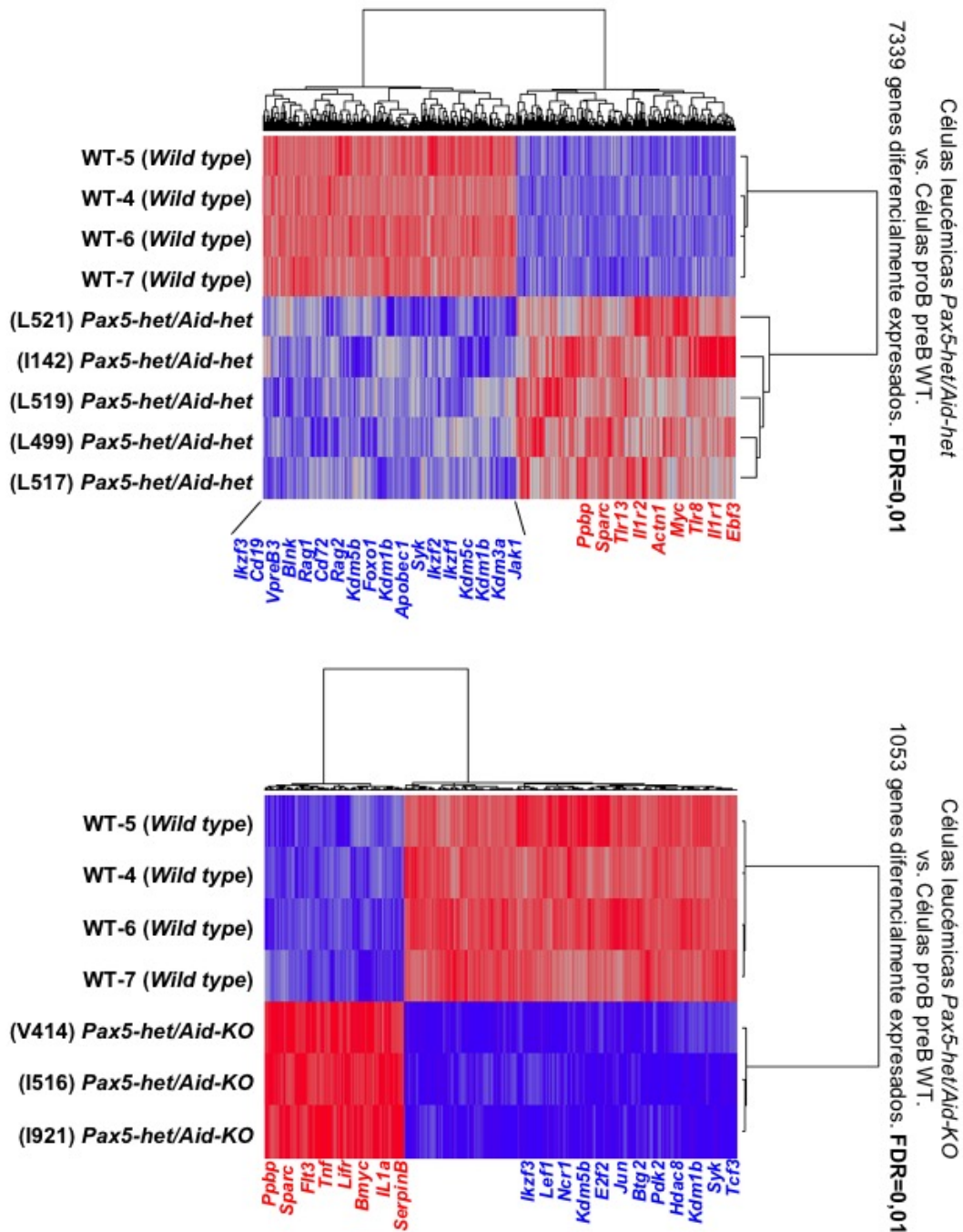


Figura 43. Representación gráfica de los genes diferencialmente expresados en las B-ALL de ratones Pax5-het/Aid-het o Pax5-het/Aid-KO. Genes significativamente inducidos o reprimidos en las células tumorales B de ratones Pax5-het/Aid-het (L521, I142, L519, L499 y L517) o Pax5-het/Aid-KO (V414, I516 y I921) comparados con células proB preB de MO de ratones control WT (WT-5, WT-4, WT-6 y WT-7), usando un FDR=0,01. Los genes inducidos se muestran en rojo y los genes reprimidos aparecen en azul. Los genes resaltados han sido seleccionados por su relevancia en el desarrollo de B-ALL.

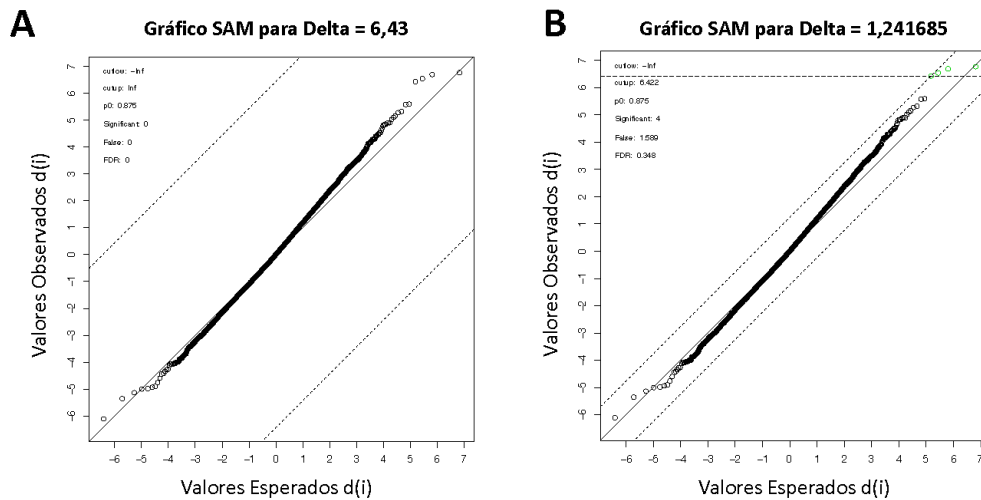


Figura 44. Comparación del perfil de expresión génica entre la B-ALL *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-KO/Aid-KO*. **A)** Gráfico SAM (de sus siglas en inglés, *Significance Analysis of Microarray*) representando la estadística observada frente a la distribución nula. La ausencia de una típica forma de “S” indica que no hay diferencias significativas entre los patrones de expresión de la B-ALL *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO*. **B)** El primer corte que nos proporciona un conjunto de genes sobreexpresados corresponde con un valor delta de 1,241685 y un FDR de 0,348 que, claramente, no es un error estadístico aceptable. Léase *cut low* = corte inferior; *cut up* = corte superior; *significant* = significativo; *false* = falso.

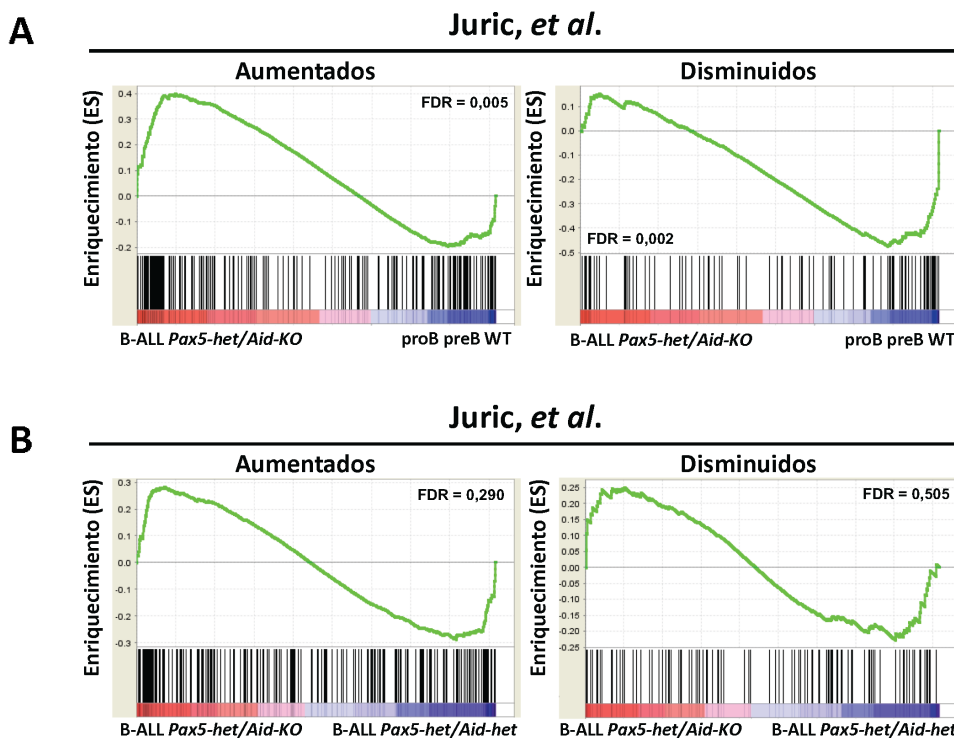


Figura 45. Análisis de enriquecimiento de genes de la B-ALL *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO*. **A)** Análisis mediante GSEA (de sus siglas en inglés, *Gene Set Enrichment Analysis*) de células B leucémicas *Pax5-het/Aid-KO*. Mediante GSEA se ha identificado un enriquecimiento significativo de un conjunto de genes específicos¹¹⁴ de B-ALL *BCR-ABL+* humana en las MO tumorales de los ratones *Pax5-het/Aid-KO* comparados con células proB preB de MO de ratones control WT (FDR = 0,005 y FDR = 0,002). **B)** El análisis mediante GSEA no ha encontrado un enriquecimiento significativo (FDR > 0,25) en un conjunto de genes específicos¹¹⁴ de B-ALL *BCR-ABL+* humana entre las leucemias *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO*.

Para identificar alteraciones secundarias adquiridas de manera somática en las B-ALLs *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO*, llevamos a cabo WES de 6 tumores *Pax5-het/Aid-het* y 6 tumores *Pax5-het/Aid-KO*, con muestras pareadas de DNA germinal (DNA de cola del mismo ratón) como referencia. Pudimos identificar entre 15522 y 35381 SNVs en las muestras tumorales de los ratones *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO*, así como entre 13634 y 39254 SNVs en las muestras germinales control. Estas SNVs acabaron entre 0 y 38 SNVs por ratón, que eran las que estaban identificadas en la base de datos consenso de genes relacionados con cáncer (Figura 46). Además, analizando estas SNVs relacionadas con cáncer, pudimos mostrar que los tumores de los ratones *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO* portaban mutaciones en los mismos genes, así como mutaciones específicas para cada genotipo (Figura 47; Tabla 4).

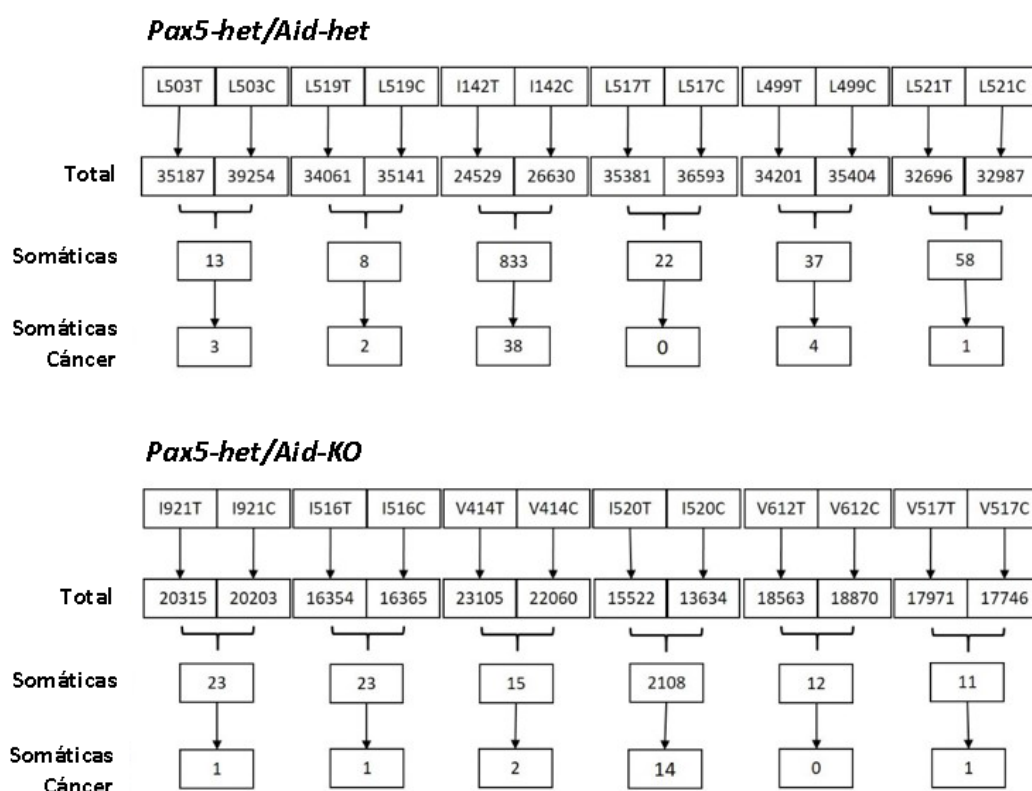


Figura 46. Secuenciación de exomas completos de las leucemias *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO*. Los datos de secuenciación del exoma de los tumores murinos han identificado alteraciones secundarias en la vía de señalización IL7R/JAK3/STAT5 en los ratones enfermos *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO*. Se muestra esquema de las muestras tumorales y control. Las mutaciones somáticas específicas de tumor se han determinado mediante análisis con MUTECT y VARSCAN. El número de mutaciones somáticas relacionadas con cáncer se han calculado utilizando la lista consenso de genes relacionados con cáncer.

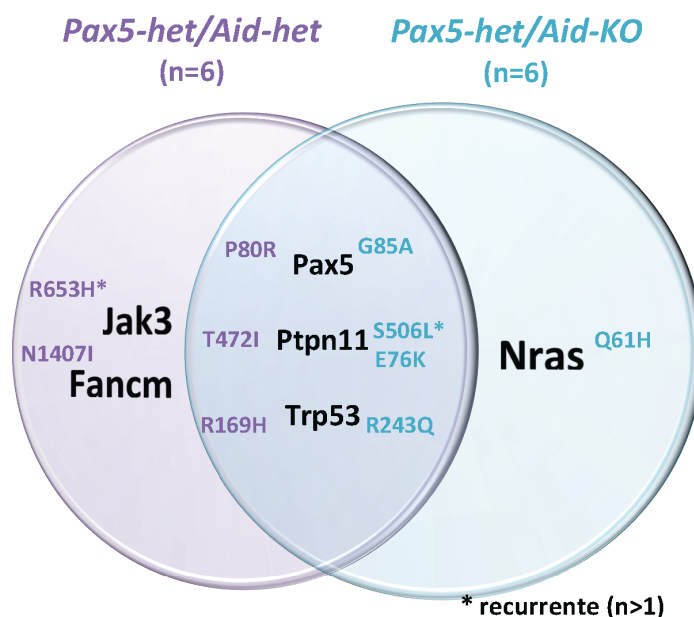


Figura 47. Comparación genómica de las B-ALL con o sin *Aid*. Comparación entre las mutaciones de la B-ALL en los ratones *Pax5-het/Aid-het* (morado) y *Pax5-het/Aid-KO* (azul) que muestra que hay eventos secundarios similares recurrentes en ambos genotipos

Tabla 4. Características genéticas de la B-ALL en ratones *Pax5-het/Aid-het* (1-6) y *Pax5-het/Aid-KO* (7-12).

	Nº de ratón	Edad del ratón (meses)	Mutación de <i>Jak3</i> en ratón*	Homólogo humano de <i>Jak3</i>	Mutación de <i>Pax5</i> en ratón*	Homólogo humano de <i>Pax5</i>	Mutación de <i>Trp53</i> en ratón*	Homólogo humano de <i>Trp53</i>	Mutación de <i>Nras</i> en ratón*	Homólogo humano de <i>Nras</i>	Mutación de <i>Ptpn11</i> en ratón*	Homólogo humano de <i>Ptpn11</i>	Mutación de <i>Fancm</i> en ratón*	Homólogo humano de <i>Fancm</i>
1	L503	10	R653H	R657Q	P80R	P80R	-	-	-	-	-	-	-	-
2	L519	15,4	-	-	-	-	R169H	R175H	-	-	-	-	-	-
3	I142	11,3	R653H	R657Q	-	-	-	-	-	-	-	-	N1407I	No descrito
4	L517	17,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	L499	17	-	-	-	-	-	-	-	T472I	No descrito	-	-	-
6	L521	19,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	I921	9,1	-	-	G85A	G85R	-	-	-	-	-	-	-	-
8	I516	13,4	-	-	-	-	-	-	-	S506L	S506L	-	-	-
9	V414	8	-	-	-	-	R243Q	R249Q	-	-	E76K	E76K	-	-
10	I520	14,6	-	-	-	-	-	-	-	S506L	S506L	-	-	-
11	V612	10,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	V517	11,5	-	-	-	-	-	-	Q61H	Q61K	-	-	-	-

(*) mutaciones confirmadas mediante secuenciación por Sanger.

Detectamos mutaciones en los genes *Pax5*, *Trp53* y *Ptpn11* en ambos genotipos. Sin embargo, los ratones *Pax5-het/Aid-het* mostraron mutaciones en *Jak3* (n=2) y *Fancm* (n=1), que estaban ausentes en los ratones *Pax5-het/Aid-KO*. Además, analizamos el patrón mutacional específico para AID y se pudo ver una prevalencia general de transiciones entre pirimidinas en las muestras tumorales (**Figura 48A**). Las firmas genéticas 1, 3 y 12 de la base de datos COSMIC tenían la mayor contribución relativa global¹¹⁵, pero no había una firma específica para los grupos tumorales (**Figura 48B**). La base de datos COSMIC (del inglés, *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) es una base de datos que recoge la información de mutaciones somáticas en un repositorio estandarizado¹¹⁵.

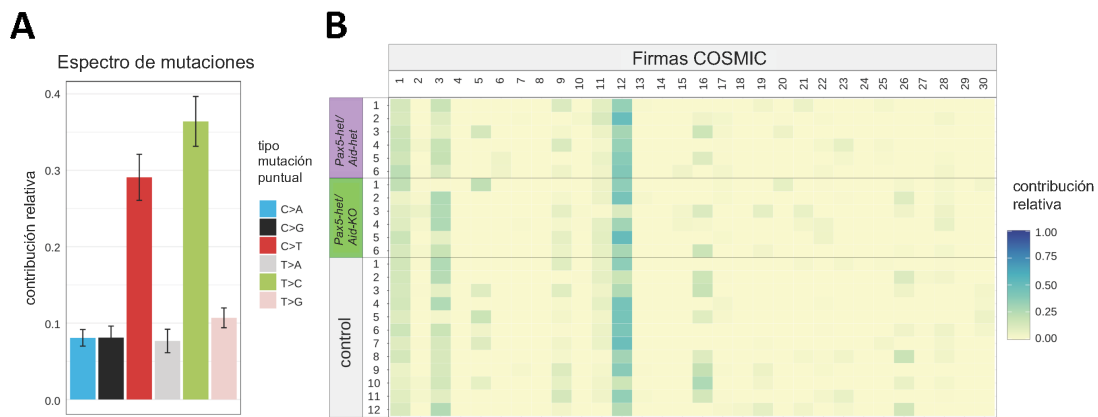


Figura 48. Patrones mutacionales de la B-ALL *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO*. A) Espectro mutacional de todos los SNPs identificados (mediana: 592 SNPs por muestra). B) Análisis de las firmas COSMIC. Ninguna firma indicó un enriquecimiento específico de tumor; sin embargo, las firmas 1, 3 y 12 mostraron una mayor contribución.

Estas observaciones revelaron que la evolución clonal de precursores celulares B premalignos hacia B-ALL como resultado *in vivo* de la exposición natural a infección tiene lugar a través de la adquisición de eventos genéticos secundarios no relacionados con la actividad de AID en este modelo de ratón que mimetiza la predisposición genética humana a desarrollar B-ALL.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Primer modelo de ratón de B-ALL *ETV6-RUNX1*+

El gen de fusión *ETV6-RUNX1* está asociado con el subtipo más común de leucemia infantil. Sin embargo, la presencia de la fusión *ETV6-RUNX1* es unas 100 veces mayor que la incidencia de la B-ALL *ETV6-RUNX1*+ en niños^{45,46}, consistente con la noción de que un ambiente específico es necesario para que se desarrolle la leucemia a partir de un clon preleucémico.

La falta de modelos de ratón genéticamente modificados que desarrollen leucemia similar a la enfermedad humana^{87-89,91,92,94} ha dificultado el entendimiento de la biología de las B-ALL *ETV6-RUNX1*+. Esta enfermedad presenta una remarcable diversidad de alteraciones genéticas identificadas en estudios previos⁵¹. Sin embargo, la uniformidad de las características clínicas, inmunofenotípicas, perfiles transcripcionales y de la respuesta terapéutica, sugiere una alteración genética subyacente común en el desarrollo de la B-ALL *ETV6-RUNX1*+. Limitando la expresión de *ETV6-RUNX1* en el compartimento HS/PC somos capaces de reproducir la biología preleucémica humana. Estas células preleucémicas permanecen silentes hasta que el ratón se expone a infección.

La presencia del gen de fusión *ETV6-RUNX1* sólo está asociada con el desarrollo de B-ALL, y confiere una muy baja penetrancia de la enfermedad^{43,45}. Las B-ALL causadas por infección que desarrollan los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* presentan un gran parecido con la enfermedad humana en la baja penetrancia, en la patología y en las lesiones genómicas. Además, nuestros resultados muestran la prevalencia de mutaciones de pérdida de función en genes involucrados en la modificación de las histonas, especialmente de la familia KDM. Esto sugiere un proceso común para el establecimiento de la B-ALL *ETV6-RUNX1*+ e indica fuertemente que la alteración de estos genes es un evento clave en el desarrollo de dichas leucemias. Por lo tanto, los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* mimetizan la biología preleucémica humana *ETV6-RUNX1*^{44,97} y proporciona un medio ideal para evaluar el potencial de ambientes oncogénicos que contribuyen al desarrollo de B-ALL^{41,116}.

La exposición a infección causa B-ALL en portadores *ETV6-RUNX1* sanos

Nuestro laboratorio ha explorado previamente la hipótesis de la infección de Ward de 1917 en un modelo murino *Pax5* haploinsuficiente⁵⁸, que ahora puede ser extensible al subtipo de leucemia infantil más común. La fusión *ETV6-RUNX1* está presente en un gran número de recién nacidos, muchos de los cuales nunca llegarán a sufrir la enfermedad. Por ello, es de gran interés conocer si esta alteración genética tan común actúa de manera cooperativa con la infección para entender los mecanismos que desencadenan el desarrollo de la leucemia.

En el modelo *Sca1-ETV6-RUNX1*, la exposición a infección causa el ambiente oncogénico que confiere una presión selectiva en un compartimento celular hematopoyético/precursor B alterado. Sin embargo, el mecanismo es distinto del observado en el modelo haploinsuficiente de *Pax5*. Los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* muestran una acumulación de células precursoras B en MO sólo cuando son expuestos a infección, pero nunca muestran deficiencia en células B periféricas. Por lo tanto, durante la exposición a infección la presión selectiva para las mutaciones activantes de la ruta de señalización Jak3/Stat5 es menos profunda en comparación a lo que se observó en el modelo *Pax5*⁵⁸. Así, el mecanismo para la selección de las células tumorales en el modelo *ETV6-RUNX1* es diferente del modelo *Pax5-het*. No hemos encontrado mutaciones activantes de *Jak3* en este modelo de ratón o mutaciones que activen la ruta de señalización IL7/IL7R/JAK/STAT. Sin embargo, hemos observado alteraciones genómicas compartidas en B-ALL *ETV6-RUNX1+* humana y en nuestro modelo murino *ETV6-RUNX1* implicando mutaciones deletéreas en genes modificadores de las histonas (por ejemplo, *Kdm5c*). Se sabe que estas mutaciones de pérdida de función en los genes modificadores de las histonas facilitan la accesibilidad de la cromatina de las proteínas Rag dando lugar a roturas incorrectas del DNA⁷⁰. Así, la adquisición de mutaciones secundarias en B-ALL con un enriquecimiento significativo de genes modificadores de las histonas de la familia *KDM* confiere el segundo evento para la conversión de un clon preleucémico *ETV6-RUNX1+* en B-ALL, pero el mecanismo molecular que vincula la pérdida de KDM al proceso tumoral está aún por dilucidar.

De esta manera, hemos presentado evidencias genéticas *in vivo* que muestran la evolución clonal de un clon preleucémico *ETV6-RUNX1* hasta un estado transformado de manera irreversible tras la exposición natural a infección⁴¹. Todos estos descubrimientos han llevado a la propuesta de que el desarrollo de la B-ALL puede ser potencialmente prevenible en portadores preleucémicos^{6,29,41,58}. Para llegar a conseguir esto, es necesario descifrar todos los eventos que tienen lugar durante la evolución tumoral de las células *ETV6-RUNX1*. Sin embargo, los eventos moleculares implicados en la génesis temprana de la leucemia *ETV6-RUNX1+* han sido particularmente elusivos debido a que estos estadios no son usualmente detectados en niños^{6,29,41,58}.

El modelo actual del doble “hit” de la leucemia *ETV6-RUNX1* propone que este gen de fusión crea un compartimento preleucémico, pero son necesarios eventos secundarios cooperantes para transformar las células B⁶. En realidad, cuando el gen de fusión *ETV6-RUNX1* es introducido en células humanas de sangre del cordón umbilical⁴⁴ o HSCs murinas⁹⁴ se crea un *pool* preleucémico, pero este gen de fusión en solitario no es suficiente para causar la transformación tumoral completa. Un trabajo reciente muestra que estas células preleucémicas también pueden ser generadas introduciendo *ETV6-RUNX1* en un progenitor B comprometido exclusivo de la vida embrionaria temprana¹¹⁷. Por lo tanto, la lesión oncogénica preleucémica es mantenida de manera estable como una alteración individual en una población celular aberrante, y sólo progresará hacia el desarrollo de leucemia cuando tienen lugar eventos secundarios. Sin embargo, descifrar los eventos secuenciales de la evolución de la leucemia es casi imposible debido a la acumulación clonal y subclonal de alteraciones genéticas en el momento de la presentación clínica de la B-ALL *ETV6-RUNX1+*.

¿Cómo se define la identidad celular en la B-ALL *ETV6-RUNX1*+

Con estos precedentes se sabe que la célula de origen y la naturaleza de los eventos secundarios son clave para el desarrollo de B-ALL. En este estudio, proporcionamos evidencias experimentales ilustrando que la expresión de *ETV6-RUNX1* en las células B en condiciones de exposición natural a infección y la expresión simultánea de *ETV6-RUNX1* en progenitores hematopoyéticos junto a la pérdida de *Kdm5c* en el compartimento B no es capaz de inducir B-ALL, en concordancia con datos previos que muestran que la B-ALL no es inducida cuando la expresión de *ETV6-RUNX1* se inicia en las células B^{87,92}. Por el contrario, la inducción de *ETV6-RUNX1* en progenitores hematopoyéticos es necesario para inducir la leucemia en condiciones de exposición natural a patógenos comunes. Así, el fenotipo de la leucemia viene definido por la naturaleza del segundo evento. Igualmente, la pérdida de *Kdm5c* en HSCs confiere identidad celular tumoral B al clon preleucémico *ETV6-RUNX1* sin que sea necesaria la exposición ambiental a infección.

Estos resultados sugieren que la presencia de *ETV6-RUNX1* es necesaria para los estadios tempranos de la transformación, pero el fenotipo final del tumor es determinado por el segundo evento a nivel de los precursores celulares hematopoyéticos. Estos hallazgos que demuestran la contribución tanto del gen de fusión *ETV6-RUNX1* como del segundo evento en el establecimiento de la identidad celular tumoral, tienen implicaciones importantes para el entendimiento y la prevención terapéutica de la transformación irreversible en portadores preleucémicos sanos.

AID y la conversión leucémica en portadores sanos

Volviendo de nuevo al modelo actual del doble “*hit*” para el desarrollo de B-ALL, se considera que AID es clave para la transformación tumoral al promover la adquisición de alteraciones secundarias⁶. La principal aproximación experimental empleada para descifrar el proceso de desarrollo de B-ALL asociada a infección han sido ensayos funcionales *ex vivo* incluyendo técnicas de trasplante y ha estado centrada en un estadio específico del desarrollo celular B, las células preB tardías en el momento del reordenamiento de la cadena ligera κ ⁸⁰. La estimulación repetida y forzada *in vitro* con la retirada de IL-7 para conducir al reordenamiento del gen de la cadena ligera κ y el estímulo inflamatorio con LPS (de sus siglas en inglés, *inflammatory lipopolysaccharide*) de estas células preB tardías en el momento de la expresión de la cadena ligera κ dio lugar a un aumento de los niveles de la proteína de AID en más de 100 veces⁸⁰. La disminución de la señalización de IL7R con la activación concomitante de RAG1 eran ambas necesarias para promover la transformación maligna⁸⁰. De acuerdo con esta observación, la combinación de la expresión desregulada de AID junto con la pérdida de p53 en células preB tardías en el momento de la expresión de la cadena ligera κ daba lugar a la transformación de las células B¹¹⁸. Sin embargo, no se conoce en qué medida se comparte este mecanismo por las células proB o preB, estadio del desarrollo celular B que conduce a la ALL de precursores celulares comunes B en el contexto de la infección^{6,41,58}. Los datos presentados en este trabajo proporcionan evidencias de que

AID no es necesario para la evolución clonal de precursores celulares premalignos preB o proB hasta B-ALL como resultado de una exposición natural a infección *in vivo*.

En contraposición con el desarrollo de linfomas de células B asociados a AID, donde la penetrancia de la enfermedad es muy alta⁸⁵, el descubrimiento de que la B-ALL espontánea asociada a infección tiene lugar sin la contribución de AID es consistente con el hecho de que sólo una minoría de los niños sanos que nacen siendo portadores de un clon preleucémico evolucionan hasta el desarrollo de B-ALL⁴⁶. Este hecho hace más plausible que este proceso de desarrollo de la leucemia asociada a infección pueda ser prevenible^{6,29,41,58}.

Además, estos descubrimientos tienen también implicaciones potenciales para el uso clínico de los inhibidores tirosina kinasa PI3K δ o inhibidores Bruton en el tratamiento de las leucemias de células B^{119,120}. La introducción de estos inhibidores en la clínica, podrían cambiar la manera de tratar las leucemias de células B¹¹⁹. Sin embargo, el aumento de los niveles de AID inducidos por estos inhibidores sólo tras el tratamiento *in vitro* y en líneas celulares tumorales, ha sido considerado una de sus mayores limitaciones debido a que podría afectar a la estabilidad genómica en precursores celulares B^{121,122}. Además, sólo ha sido demostrado una actividad significativa de AID en el DNA de pacientes tratados con PI3K δ (inhibidor selectivo de la isoforma δ de la fosfoinositol 3-kinasa). Sin embargo, no se ha reportado ningún caso de B-ALL por el uso actual de la terapia con inhibidores de PI3K δ en pacientes con el síndrome de PI3K δ activada (APDS, de sus siglas en inglés *Activated PI3K δ Syndrome*)¹²³, lo que concuerda con nuestros resultados sugiriendo que AID no interviene en la transformación tumoral. En este aspecto y en contraste con datos recientes derivados de estudios basados en líneas celulares tumorales *in vitro*¹²¹, observaciones recientes han demostrado que la terapia con ibrutinib (inhibidor de la tirosina kinasa de Bruton) resulta en una reducción de la expresión de AID en fracciones leucémicas de pacientes tratados¹²⁴.

En general, este trabajo resalta el potencial único de la aplicación de este ensayo *in vivo*, en el que la B-ALL surge de manera espontánea, para identificar la importancia de “drivers” de la ALL de precursores celulares B en el contexto de la exposición a infección o de otros factores ambientales.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La conversión del clon preleucémico *ETV6-RUNX1* está mediada por la exposición a infección que promueve la aparición de las alteraciones secundarias en genes modificadores de las histonas, principalmente de la familia *KDM*.
2. La presencia de *ETV6-RUNX1* es necesaria en los estadios tempranos de la transformación maligna, pero la identidad final de la célula tumoral es definida por el segundo evento a nivel de los precursores celulares hematopoyéticos.
3. El desarrollo de la leucemia linfoblástica aguda de células B asociada a infección tiene lugar sin la contribución de AID, de manera consistente con el hecho de que sólo una minoría de los niños sanos que nacen siendo portadores de un clon preleucémico evolucionan hasta el desarrollo de la enfermedad.
4. Nuestros resultados ponen de manifiesto que el desarrollo de la leucemia linfoblástica aguda B infantil es potencialmente prevenible.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Modelos de ratón empleados en el estudio

El vector *ETV6-RUNX1* fue generado insertando el cDNA humano de *ETV6-RUNX1* en el sitio ClaI del vector pLy6¹²⁵. El fragmento del trasgén se escindió del vector mediante digestión con la enzima de restricción (NotI), fue purificado e inyectado (2ng/mL) en cigotos fertilizados CBAxC57BL/6J. Los ratones transgénicos se identificaron por *Southern Blot* de DNA de cola digerido con EcoRI, empleando el cDNA de *ETV6-RUNX1* como sonda para detectar el trasgén. Se generaron y analizaron 2 líneas transgénicas independientes. Las 2 líneas fundadoras independientes *Sca1-ETV6-RUNX1* presentaron una gestación normal, fueron viables, se desarrollaron de manera normal y posteriormente fueron utilizadas para examinar el fenotipo.

El modelo de ratón *Etv6^{-ETV6-RUNX1}* fue cedido por el laboratorio de Hanno Hock. Los ratones *Etv6^{-ETV6-RUNX1}*⁹⁴, *Mb1-Cre*¹⁰⁷ y *Sca1-Cre*¹⁰⁸ han sido descritos previamente. Los modelos *Etv6^{-ETV6-RUNX1}* + *Mb1-Cre* y *Etv6^{-ETV6-RUNX1}* + *Sca1-Cre* fueron generados gracias al cruce de las dos líneas de ratón anteriores.

La cepa de ratón *Kdm5c^{wt/f}* se ha obtenido del repositorio público EMMA (de sus siglas en inglés *European Mouse Mutant Archive*), con nombre de cepa: C57BL/6N-A<tm1Brd>Kdm5c<tm1c(EUCOMM)Hmgu>/lcs (ID de cepa: EM:06928). Se cruzaron las correspondientes líneas para obtener los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* + *Kdm5c^{wt/f}* + *Mb1-Cre* y *Sca1-ETV6-RUNX1* + *Kdm5c^{wt/f}* + *Sca1-Cre*.

El modelo de ratón *Pax5-het* fue cedido por el laboratorio de M. Busslinger y su generación⁶⁰ y caracterización⁵⁸ ha sido descrita previamente. Mediante el cruce de ratones *Pax5-het* y ratones *Aid-KO*⁷⁶ se han generado las líneas de ratón *Pax5-het/Aid-Het* y *Pax5-het/Aid-KO*.

Todos los ratones utilizados en este estudio presentan un fondo genético mixto CBAxC57BL/6J.

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

Los animales se monitorizaron diariamente y cuando se detectaron signos de enfermedad, se sacrificaron los animales y se les realizaron procedimientos estándar de necropsia. Los análisis de supervivencia fueron realizados con el test estadístico log-rank (Mantel-Cox) utilizando el programa GraphPad Prism v.5.

2. Genotipado de los ratones mediante PCR

El genotipado de los animales se realizó mediante PCR de DNA total extraído de un fragmento de cola de los animales (Extracción de DNA apartado 4).

2.1. Genotipado de los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1*

Los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* se genotiparon mediante PCR de la fusión *ETV6-RUNX1*. Para la PCR de *ETV6-RUNX1* se preparó una mezcla de reacción conteniendo 2,5µL del oligo ETV6-RUNX1-F 10µM; 2,5µL del oligo ETV6-RUNX1-B 10µM; 2,5µL de un buffer comercial (Ref. 2900162, 5PRIME); 2,5µL dNTPs 2mM; 2,5µL MgCl₂ 25mM (Ref. 2900154, 5PRIME); 0,2µL del enzima Taq DNA polimerasa (Ref. 2900163, 5PRIME); 11,3µL MPW y 1µL de DNA. Se usaron los siguientes oligos:

ETV6-RUNX1-F: (5'-GCCCCATGGAGAATAATCACTG-3')

ETV6-RUNX1-B: (5'-GCGTCTCTAGAAGGATTCATTC-3')

La mezcla de reacción se amplificó usando un termociclador de gradiente (Mastercycler, Eppendorf) con las siguientes condiciones: 94°C 10min; (94°C 1min; 54°C 1min; 72°C 1min) x 40 ciclos; 72°C 10min. El producto de la amplificación tenía un tamaño de 372pb.

2.2. Genotipado de los ratones *Etv6-ETV6-RUNX1*

Los ratones *Etv6-ETV6-RUNX1* se genotiparon mediante PCR. Se preparó una mezcla de reacción conteniendo 2,5µL del oligo TAEx1 10µM; 2,5µL del oligo TAEx2 10µM; 2,5µL del oligo TAEx3 10µM; 2,5µL de un buffer comercial (Ref. 2900162, 5PRIME); 2,5µL dNTPs 2mM; 2,5µL MgCl₂ 25mM (Ref. 2900154, 5PRIME); 0,2µL del enzima Taq DNA polimerasa (Ref. 2900163, 5PRIME); 8,8µL MPW y 1µL de DNA. Se usaron los siguientes oligos:

TAEx1: (5'-TCCAAAAGTAGTCACCGCGGTGGC-3')

TAEx2: (5'-CACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGT-3')

TAEx3: (5'-CCAAGCGGCCGATAAGCTTGATATCG-3')

La mezcla de reacción se amplificó usando un termociclador de gradiente (Mastercycler, Eppendorf) con las siguientes condiciones: 95°C 15min; (94°C 1min; 60°C 1min; 72°C 1,5min) x 30 ciclos; 72°C 3min. Los productos de amplificación tienen un tamaño de 100pb (escindido) y 200pb (sin escindir).

2.3. Genotipado de los ratones *Sca1-Cre*

Los ratones *Sca1-Cre* se genotiparon mediante PCR de *Cre*. Para la PCR se preparó una mezcla de reacción conteniendo 2,5µL del oligo CRE-F 10µM; 2,5µL del oligo CRE-B 10µM; 2,5µL de un buffer comercial (Ref. 2900162, 5PRIME); 2,5µL dNTPs 2mM; 2,5µL MgCl₂ 25mM (Ref. 2900154, 5PRIME); 0,2µL del enzima Taq DNA polimerasa (Ref. 2900163, 5PRIME); 11,3µL MPW y 1µL de DNA. Se usaron los siguientes oligos:

CRE-F: (5'-GCCGATGCAACGAGTGATGA-3')

CRE-B: (5'-GCTATCCTGGCAGCGATCGC-3')

La mezcla de reacción se amplificó usando un termociclador de gradiente (Mastercycler, Eppendorf) con las siguientes condiciones: 94°C 10min; (94°C 30seg; 50°C 1min; 72°C 30seg) x 35 ciclos; 72°C 2min. El producto de la amplificación tenía un tamaño de 376pb.

2.4. Genotipado de los ratones *Mb1-Cre*

Los ratones *Mb1-Cre* se genotiparon mediante dos reacciones de PCR independientes para *Mb-1* y *h-Cre*. Cada reacción contenía 2,5µL del oligo "sen" 10µM; 2,5µL del oligo "antisen" 10µM; 2,5µL de un buffer comercial (Ref. 2900162, 5PRIME); 2,5µL dNTPs 2mM; 2,5µL MgCl₂ 25mM (Ref. 2900154, 5PRIME); 0,2µL del enzima Taq DNA polimerasa (Ref. 2900163, 5PRIME); 11,3µL MPW y 1µL de DNA. Se usaron los siguientes oligos:

Mb-1 sen: (5'-CTGCGGGTAGAAGGGGGTC-3')

Mb-1 antisen: (5'-CCTTGCGAGGTCAGGGAGCC-3')

hCre sen: (5'-CCCTGTGGATGCCACCTC-3')

hCre antisen: (5'-GTCCTGGCATCTGTCAGAG-3')

La mezcla de reacción se amplificó usando un termociclador de gradiente (Mastercycler, Eppendorf) mediante el siguiente programa: 95°C 4,5min; (95°C 30seg; 65°C 45seg; 72°C 30seg) x 36 ciclos; 72°C 2min. El producto de la amplificación usando los oligos *Mb-1* tenía un tamaño de 420pb, mientras que el resultante del uso de los oligonucleótidos *hCre* tenía uno de 430pb. Sólo la presencia de los dos productos de amplificación indicaba un genotipo *Mb1-Cre*. La presencia de una única banda de 420pb determinaba un genotipo *wyld type* (WT).

2.5. Genotipado de los ratones *Kdm5c*

Los ratones *Kdm5c^{wt/f}* se genotiparon mediante PCR. Se preparó una mezcla de reacción conteniendo 2,5µL del oligo Ef² 10µM; 2,5µL del oligo Er o L3r² 10µM; 2,5µL de un buffer comercial (Ref. 2900162, 5PRIME); 2,5µL dNTPs 2mM; 2,5µL MgCl₂ 25mM (Ref. 2900154, 5PRIME); 0,2µL del enzima Taq DNA polimerasa (Ref. 2900163, 5PRIME); 11,3µL MPW y 1µL de DNA. Se usaron los siguientes oligos:

Ef²: (5'-TGTGTGGTGCATGTACAATAGTGAGCCT-3')

Er: (5'-CATTCAGAAGGATGAGGCAGGGTT-3')

L3r²: (5'-CATGGAGTTGGAGAGAGAACCCCA-3')

La mezcla de reacción se amplificó usando un termociclador de gradiente (Mastercycler, Eppendorf) con las siguientes condiciones: 95°C 4min; (94°C 30seg; 62°C 30seg; 72°C 1min) x 34 ciclos; 72°C 7min; 20°C 5min. En ratones sin Cre recombinasa se hará la PCR utilizando Ef²/Er y se podrá obtener el fragmento *wyld type* (WT) de 243pb o el alelo condicional de 340pb. En el caso de los ratones con Cre recombinasa se hará la PCR usando Ef²/Er y Ef²/L3r² y se podrá obtener un fragmento de 360pb (escindido), de 1379pb (WT) o de 1701pb (sin escindir).

2.6. Genotipado de los ratones *Pax5-het*

Los ratones *Pax5-het* se genotiparon mediante PCR. Para cada ratón se hicieron dos PCRs en paralelo. Se preparó una mezcla de reacción conteniendo 2,5µL del oligo Pax5-1 10µM; 2,5µL del oligo Pax5-2 10µM ó 2,5µL del oligo Pax5-3 10µM; 2,5µL de un buffer comercial (Ref. 2900162, 5PRIME); 2,5µL dNTPs 2mM; 2,5µL MgCl₂ 25mM (Ref. 2900154, 5PRIME); 0,5µL del enzima Taq DNA polimerasa (Ref. 2900163, 5PRIME); 10µL MPW y 2µL de DNA. Se usaron los siguientes oligos:

Pax5-1: (5'-ACAGTCCCCTTACCCCTTCCCCAAATGAA-3')

Pax5-2: (5'-GTCCCTCCTAACAAAGTCTCCCTATTCCAC-3')

Pax5-3: (5'-GAGCGAGTAACAACCCGTCGGATTCTCC-3')

La mezcla de reacción se amplificó usando un termociclador de gradiente (Mastercycler, Eppendorf) con las siguientes condiciones: 94°C 4min; (94°C 1min; 64°C 1min; 72°C 2min) x 40 ciclos; 72°C 7min. El producto de la amplificación tenía un tamaño de 693pb (alelo WT) o 783pb (alelo nulo).

2.7. Genotipado de los ratones *Aid-het* y *Aid-KO*

Los ratones *Aid-het* y *Aid-KO* se genotiparon mediante dos PCRs en paralelo. Se preparó una mezcla de reacción conteniendo 2,5µL del oligo 13 ó 15 10µM; 2,5µL del oligo 593 10µM; 2,5µL de un buffer comercial (Ref. 2900162, 5PRIME); 2,5µL dNTPs 2mM; 2,5µL MgCl₂ 25mM (Ref. 2900154, 5PRIME); 0,2µL del enzima Taq DNA polimerasa (Ref. 2900163, 5PRIME); 10,3µL MPW y 2µL de DNA. Se usaron los siguientes oligos:

Oligo 13: (5'-GGGCCAGCTCATTCTCCACTC-3')

Oligo 593: (5'-AGCCCTGCCAACTTCTATCTCTC-3')

Oligo 15: (5'-CTGAGATGGAACCCTAACCTCAGCC-3')

La mezcla de reacción se amplificó usando un termociclador de gradiente (Mastercycler, Eppendorf) con las siguientes condiciones: 94°C 5min; (94°C 1min; 65°C 1min; 72°C 1min) x 30 ciclos; 72°C 10min. El producto de la amplificación tenía un tamaño de 400pb (alelo WT) ó 500pb (alelo nulo).

3. Muestras humanas primarias

Las muestras humanas (**Figura 19** y **Anexo 7**) se obtuvieron con el consentimiento informado en cumplimiento de la junta de revisión institucional de la Universidad de Düsseldorf, Alemania.

4. Extracción de DNA

Los tejidos se disgregaron con 500µl o 5ml, en función de la celularidad de cada tejido, de tampón proteinasa K (0,25M de sacarosa, 50mM Tris pH 7,4, 25mM KCl, 5mM MgCl₂; 1% SDS; 20mM EDTA pH 8; 1µg de proteinasa K (Roche)) durante 16h a 55°C. Tras este período de incubación, se realizó una extracción fenol-cloroformo para limpiar el DNA de restos celulares. Brevemente, se añadió a la muestra incubada un volumen de fenol (Gibco BRL), se centrifugó 5 minutos a máxima rpm y temperatura ambiente y nos quedamos con la fase superior. Después, se añadió la fase superior en medio volumen de fenol (Gibco BRL) y medio volumen de cloroformo (Merk), realizándose otra centrifugación similar a la anterior, y quedándonos con la fase superior. Posteriormente, se añadió la fase superior a un volumen de cloroformo (Merk), realizándose el mismo protocolo de centrifugación. La fase superior obtenida se precipitó en 2 volúmenes de etanol 100% (Merk). El precipitado de DNA obtenido se lavó con etanol 70%.

Posteriormente, se resuspendió el DNA en agua bidestilada (ddH₂O), cuantificándose la concentración de DNA mediante la medida de absorción a 260nm con el espectrofotómetro Nanodrop-1000 (THERMO Scientific).

5. Extracción de RNA

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

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

Los restos de fenol procedentes del uso del reactivo TRIzol fueron eliminados para evitar posibles interferencias del mismo en aplicaciones posteriores. Para ello, se usó el kit comercial “Rneasy Mini Kit” (Ref. 74104, Qiagen) y el protocolo de limpieza del RNA del mismo.

6. Análisis de la expresión de *ETV6-RUNX1* mediante PCR

Para la cuantificación de los niveles transcripcionales de *ETV6-RUNX1* en HSCs (células Sca1⁺Lin⁻) y en células B (B220^{low}IgM⁻ y células CD19⁺) de ratones Sca1-*ETV6-RUNX1*, se purificó RNA de poblaciones separadas mediante citometría de flujo. También se comprobó la expresión de *ETV6-RUNX1* en MO total de ratones *wild type*. Las secuencias de los *primers* para el análisis por RT-PCR para la amplificación de *ETV6-RUNX1* (amplificón de 372pb) son los siguientes:

ETV6-RUNX1-F: (5'-GCCCCATGGAGAATAATCACTG-3')

ETV6-RUNX1-B: (5'-GCGTCTCTAGAAGGATTCATTC-3')

Y para la amplificación de la *β-actina*:

MACFOR: (5'-TAGGAATCCATGGCCACTGCCGCATCCTCTTCC-3')

MACTR: (5'-CACGATGGAGGGGCCGACTCATC-3')

Las condiciones usadas para la expresión de *ETV6-RUNX1* fueron (94°C 1min; 54°C 1min; 72°C 1min) x 40 ciclos; 72°C 10min. Los productos de PCR se confirmaron por hibridación con cDNA de *ETV6-RUNX1* como sonda (*Southern Blot* Apartado 7). Se utilizó *β-actina* como control para comprobar la integridad del cDNA.

7. Identificación de la fusión *ETV6-RUNX1* mediante *Southern blot*

La expresión de *ETV6-RUNX1* en los ratones Sca1-*ETV6-RUNX1* se confirmó mediante la técnica de *Southern Blot*. Se incubaron 10µg de DNA a 37°C con 20U de la endonucleasa de restricción EcoRI. Tras 5 horas de digestión, los fragmentos de DNA separados

mediante electroforesis se desnaturalizaron mediante la inmersión del gel en una solución alcalina desnaturalizante (1,5M NaCl, 0,5M NaOH) y agitación continua a temperatura ambiente durante 45 minutos, con el objetivo de romper los enlaces de hidrógeno que unen las dos cadenas y obtener fragmentos de DNA monocatenario. Acto seguido, se neutralizó la reacción de desnaturalización con una solución neutralizante (1,5M NaCl; 1M Tris-HCl pH 7,5) durante 45 minutos a temperatura ambiente y agitación continuada. A continuación, se realizó la transferencia del DNA a una membrana de nylon (Ref. RPN 303-N, GE Healthcare) durante 16 horas, utilizando como tampón de transferencia, 20X SSC (6M NaCl, 0,6M citrato sódico dibásico, pH 7). Tras la transferencia, y con el fin de conseguir una unión covalente del DNA a la membrana, ésta fue sometida a una fuente de luz UV de 312nm durante 20s. (UV Stratalinker 2400, Stratagene).

Por último, se llevó a cabo la hibridación del DNA unido a la membrana. El cDNA de *ETV6-RUNX1* se marcó radiactivamente con [α^{32} P] dCTP y se usó como sonda para hibridar con el DNA genómico unido a la membrana.

8. Análisis mediante citometría de flujo (FACS de sus siglas en inglés, *Fluorescence Activated Cell Sorting*)

Se obtuvieron células nucleadas de médula ósea total (haciendo *flushing* de los huesos largos), sangre periférica, timo, bazo y nódulos linfáticos de los ratones. Los eritrocitos fueron eliminados mediante la lisis de los mismos con buffer de lisis a 4°C (RCLB, de sus siglas en inglés *Red Cell Lysis Buffer*) (0,155M NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 10mM EDTA, pH 7,4) y las células restantes fueron lavadas con PBS con 1% de FCS (PBS-1%FCS). Tras ser teñidas, las células se lavaron una vez más con PBS-1%FCS y resuspendieron en PBS-1%FCS que contenía 10µg/mL de yoduro de propidio (PI, de sus siglas en inglés *Propidium Iodide*), permitiendo así excluir las células muertas en los análisis posteriores. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro Accuri C6 y analizadas utilizando el software informático Flowjo versión X.0.7.

La fluorescencia específica para los fluorocromos FITC, PE, PI y APC, excitados a 488nm (0,4W) y 633nm (30mW), así como las propiedades conocidas de dispersión de la luz directa y ortogonal de las células de ratón fueron utilizadas para establecer los *gates*. En cada análisis fue examinado un mínimo de 50.000 células viables (negativas para PI). La posible unión inespecífica de los anticuerpos utilizados fue suprimida mediante la incubación previa de las muestras con anti-CD16/CD32 Fc-block (2.4G2; 1:100).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos en los análisis de citometría de flujo: anti-B220 (RA3-6B2; 1:100), anti CD3 ϵ (145-2C11; 1:100), anti-CD4 (RM4-5; 1:250), anti-CD8a (53-6.7; 1:250), anti-CD11b/Mac1 (M1/70; 1:200), anti-CD19 (1D3; 1:100), anti-CD117/c-Kit (2B8; 1:200), anti-CD127/IL7R α (A7R34; 1:50), anti-Ly-6G/Gr1 (RB6-8C5; 1:100), anti-IgM (R6-60.2; 1:100), anti-Sca1/Ly-6A/E (E13-161.7; 1:50), anti-CD25 (PC61; 1:500), anti-CD48 (HM48-1; 1:100), anti-CD150 (TC15-12F12.2; 1:100) y anti-Ter119 (TER119; 1:100). Todos los anticuerpos fueron adquiridos de BD Biosciences o Biolegend.

9. Estudios histológicos

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

10. Análisis de la clonalidad de las inmunoglobulinas

Los reordenamientos de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas fueron amplificados por PCR. Las condiciones de la PCR consistieron en una activación inicial a 95°C seguida por 31-37 ciclos de desnaturalización (95°C 1min), anillamiento (65°C 1min), y elongación (72°C 1min 45seg). Este paso fue seguido por una elongación final 72°C 10min. Para determinar las secuencias de DNA de cada reordenamiento V(D)J individual, los fragmentos de PCR fueron aislados del gel de agarosa 0,8% y secuenciados para chequear su clonalidad.

Se utilizaron los oligos:

V _H J558:	sentido	(5'-CGAGCTCTCCARCACAGCCTWCATGCARCTCARC-3')
	anti-sentido	(5'-GTCTAGATTCTCACAAGAGTCCGATAGACCCTGG-3')
V _H 7183:	sentido	(5'-CGGTACCAAGAASAMCCTGTWCCTGCAAATGASC-3')
	anti-sentido	(5'-GTCTAGATTCTCACAAGAGTCCGATAGACCCTGG-3')
V _H Q52:	sentido	(5'-CGGTACCAGACTGARCATCASCAAGGACAAAYTCC-3')
	anti-sentido	(5'-GTCTAGATTCTCACAAGAGTCCGATAGACCCTGG-3')
DH:	sentido	(5'-TTCAAAGCACAATGCCTGGCT-3')
	anti-sentido	(5'-GTCTAGATTCTCACAAGAGTCCGATAGACCCTGG-3')
C _μ :	sentido	(5'-TGGCCATGGGCTGCCTAGCCCGGGACTT-3')
	anti-sentido	(5'-GCCTGACTGAGCTCACACAAGGAGGA-3')

11. Análisis de la clonalidad del TCR (de sus siglas en inglés *T Cell Receptor*)

Los reordenamientos del gen del receptor de células T (*TCR*) fueron amplificados por PCR. Las condiciones de la PCR consistieron en una activación inicial a 95°C seguida por 35 ciclos de desnaturalización (95°C 1min), anillamiento (57°C 1min), y elongación (72°C 1min 45seg). Este paso fue seguido por una elongación final de 72°C 10min.

Los oligos utilizados fueron:

D β 2:	sentido	(5'-GTAGGCACCTGTGGGGAAGAACT-3')
	anti-sentido	(5'-TGAGAGCTGTCTCCTACTATCGATT-3')
V β 2:	sentido	(5'-GGGTCACTGATACGGAGCTG-3')
	anti-sentido	(5'-TGAGAGCTGTCTCCTACTATCGATT-3')
V β 4:	sentido	(5'-GGACAATCAGACTGCCTCAAGT-3')
	anti-sentido	(5'-TGAGAGCTGTCTCCTACTATCGATT-3')
V β 5.1:	sentido	(5'-GTCCAACAGTTTGATGACTATCAC-3')
	anti-sentido	(5'-TGAGAGCTGTCTCCTACTATCGATT-3')
V β 8:	sentido	(5'-GATGACATCATCAGGTTTTGTC-3')
	anti-sentido	(5'-TGAGAGCTGTCTCCTACTATCGATT-3')
V β 14:	sentido	(5'-CTTCTACCTCTGTGCCTGGAGT-3')
	anti-sentido	(5'-TGAGAGCTGTCTCCTACTATCGATT-3')

12. Preparación de las librerías y secuenciación de DNA

El DNA fue purificado siguiendo los métodos detallados en el apartado 4 (Extracción de DNA). La preparación de la librería del exoma fue realizada utilizando el kit Agilent SureSelectXT *Mouse All Exon* con modificaciones adaptadas de Fisher y colaboradores¹²⁶. Brevemente, hemos añadido *beads* SPRI al protocolo original y reducido el tamaño de la reacción a 0,5 μ L para poder usar tubos de PCR en los pasos siguientes. Además, redujimos también el volumen de lavado. Minimizamos la pérdida de muestra y optimizamos el procesamiento reduciendo el manejo de la muestra. Por lo tanto, simplemente añadimos un preparado fresco 20%PEG y 2,5M NaCl (Sigma) en vez de eluir las muestras de las *beads* SPRI para la preparación de la librería. Se realizó la captura dirigida por la hibridación con una librería de RNA, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. La purificación y el enriquecimiento de la librería capturada fue conseguida mediante la unión a “*MyOne Streptavidin T1 Dynabeads*” (Life Technologies) y la amplificación de los elementos no unidos a los *beads* por PCR en un rango lineal. La secuenciación de 2x10² pares de bases (pb) con un índice de lectura de 6pb fue realizada utilizando el kit TruSeq SBS kit v3 en el secuenciador HiSeq 2500 (Illumina).

Los archivos fastq fueron generados utilizando BcltoFastq 1.8.4 (Illumina). Se utilizó la versión 0.7.4. de BWA¹²⁷ para alinear los datos secuenciados con el genoma referencia de ratón (GRCm38.71). Los pasos de conversión fueron llevados a cabo utilizando Samtools^{128,129}, seguidos por la retirada de las lecturas duplicadas (<http://broadinstitute.github.io/picard>).

El reordenamiento local alrededor de los *indels*, la denominación de los SNP, la anotación y la recalibración fueron facilitados por GATK 2.4.9¹³⁰. Los SNPs de ratón dbSNP138 y dbSNP fueron utilizados como conjuntos de datos de prueba para las cepas de ratón utilizadas. Las variaciones resultantes entre los datos secuenciados y la secuencia referencia fueron anotadas por el programa *Variant Effect Predictor*¹³¹ utilizando la base de datos de Ensembl (v70) e importadas a una base de datos propia (servidor MySQL interno), para facilitar la anotación automática y manual, y el análisis de los datos mediante consultas complejas de bases de datos. Las puntuaciones de predicción de pérdida de función para PolyPhen2¹³² y SIFT¹³³ se extrajeron de Ensembl.

Las anotaciones somáticas fueron realizadas utilizando MuTect¹³⁴ y VarScan¹³⁵. Sólo las entradas con al menos un 9% de diferencia en la frecuencia alélica entre la muestra tumor y control se han utilizado para análisis posteriores. Los genes relacionados con cáncer se han determinado traduciendo la lista “*cancer gene consensus*” de COSMIC¹¹¹, utilizando la aplicación Biomart de Ensembl¹³⁶.

13. Secuenciación

Las mutaciones fueron validadas por *Sanger Sequencing* en un analizador genético 3130 (Applied Biosystems) y *primers* específicos:

KDM5C:	sentido	(5'-CTTCTCCCTCCCTACCCCTTAT-3')
	anti-sentido	(5'-ATTTACCAGCCTCCAGAACTCC-3')
Ebf1:	sentido	(5'-GTCGTGGTGTCTACCACAG-3')
	anti-sentido	(5'-ATGATTCGCCTACCATGTTCC-3')
Kdm5c:	sentido	(5'-AGGTTAGAGGGACTCTTCAG-3')
	anti-sentido	(5'-CCTCACATCAACATACCCAG-3')
Kdm2b:	sentido	(5'-CCTGCCAAGCGGAGAAGTGAGTG-3')
	anti-sentido	(5'-CCAGGCCTCCAGTTCGTAATC-3')
Jak3:	sentido	(5'-CGGGATGTGGGGCTTTAACT-3')
	anti-sentido	(5'-GCAGACACGGGGTATAGTGG-3')
Pax5:	sentido	(5'-CTCGTACATGCACGGAGACA-3')
	anti-sentido	(5'-GGACCCTTCAGTACACCAGC-3')

14. Cultivo de células proB

Los cultivos de células proB se realizaron en medio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) suplementado con 50µM de β-Mercaptoetanol, 1mM de L-glutamina, 2% de FCS inactivado por calor, 1mM de penicilina-estreptomina (BioWhittaker) y 0,03% (peso/volumen) de primatone RL (Sigma). El aislamiento de células proB fue realizado

por MACS (del inglés, *Magnetic Activated Cell Sorting*), mediante el marcaje de células B220⁺ de médula ósea (CD45R-*Microbeads* 130-097-152 Milteny Biotec).

Las células obtenidas mediante la separación por MACS fueron cultivadas sobre células estromales ST2 tratados con mitomicina C en el medio descrito anteriormente suplementado con IL-7 (R&D Systems). Las células proB tumorales independientes de IL-7 fueron crecidas en el mismo medio en ausencia de IL-7.

15. Ensayos de apoptosis

Alícuotas de 200µl que contenían 10⁶ células en 10mM Hepes/NaOH pH 7,4, 140mM NaCl, 2,5mM CaCl₂ fueron incubadas con Anexina-V (BD Biosciences) a una concentración final de 1µg/mL durante 10 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras esta incubación, fueron marcados con PI a una concentración final de 2µg/mL. El estudio de citometría de flujo fue realizado 1 hora tras el marcaje y los datos fueron analizados utilizando el software Flowjo versión X.0.7. Las diferencias entre las muestras experimentales fueron calculadas utilizando el test *t* de *Student* utilizando el programa GraphPad Prism v.5.

16. Análisis mediante *arrays* de expresión

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

Brevemente, se utilizó el algoritmo “*robust microarray analysis*” (RMA) para la corrección del *background*, la normalización intra- e inter-*microarray*, y el cálculo de la expresión de la señal¹³⁷⁻¹³⁹. Una vez fue calculada la señal de expresión absoluta para cada gen (por ejemplo, el valor de cada *probe set*) en cada *microarray*, un método denominado “*significance analysis of microarray*” (SAM)¹⁴⁰ fue utilizado para calcular la expresión diferencial significativa y encontrar los *probe sets* de genes que caracterizan las muestras problema comparadas con las muestras control. Este método utiliza permutaciones para calcular de forma robusta la inferencia estadística de la mayoría de los genes y proporciona p-valores ajustados a múltiples test utilizando el “*false discovery rate*” (FDR)¹⁴¹. Un corte al menos entre FDR<0,1 y FDR<0,01 fue utilizado para los cálculos de expresión diferencial. Todos estos métodos fueron aplicados utilizando R¹⁴² y Bioconductor¹⁴³.

Los datos discutidos en este trabajo se han publicado y depositado en la plataforma Gene Expression Omnibus (GEO)¹⁴⁴ y son accesibles a través de los números de acceso de GEO GSE70492 y GSE122105.

17. Análisis de enriquecimiento

El análisis de enriquecimiento de los genes expresados diferencialmente fue realizado utilizando la plataforma GSEA de MSigDB¹⁴⁵ (<http://www.broad.mit.edu/gsea/>). El enriquecimiento para la firma genética de las *KDM* se hizo utilizando la nomenclatura de los genes del comité HUGO.

También, para los tumores *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO* se ha comparado la firma de expresión génica que está específicamente aumentada o disminuida con conjuntos de genes específicos de B-ALL humana^{114,146,147} utilizando GSEA.

18. Experimentos de trasplante

Para determinar la naturaleza de las células tumorales se llevaron a cabo experimentos de trasplante. Células proB tumorales de médula ósea fueron inyectadas vía intravenosa en receptores secundarios (ratones singénicos C57BL/6 x CBA de 12 semanas de edad irradiados de forma subletal 4Gy). Se monitorizó el desarrollo de enfermedad de los ratones receptores mediante análisis periódicos de citometría de flujo de sangre periférica hasta que los blastos fueron detectados. Entonces, los ratones fueron sacrificados para analizar el desarrollo de B-ALL.

19. Edición génica mediante CRISPR/Cas9

La interrupción del gen *KDM5C* se ha realizado por la técnica de CRISPR/Cas9 mediante un *cassette* de selección seguido de la estrategia de doble rotura descrita por Ran y colaboradores¹⁴⁸. Se diseñó RNA guía que detecta el exón 1 del gen *KDM5C* junto a su inicio de la transcripción con la ayuda de la herramienta de diseño para CRISPR (<http://crispr.mit.edu/>)¹⁴⁹. Los *cassettes* de expresión de Cas9^{D10A} (*Casn*) y los RNAs guía se tomaron de pX335 (Addgene #42335)¹⁵⁰ y fueron transferidos a una estructura más pequeña pUC19 mediante clonación basada en PCR. La edición génica se consiguió ofreciendo una plantilla de reparación que aborde la vía de reparación de recombinación homóloga: la secuencia codificante para el *low-affinity nerve growth factor receptor* truncado humano (LNGFR, pMACS LNGFR, Miltenyi Biotech) seguido de un Poly A de SV40 se alojó entre 0,9 y 1kb de la secuencia homóloga para *KDM5C* flanqueando los sitios esperados de rotura. Los 4 plásmidos (*Casn*, 2 x gRNA y la plantilla de reparación) fueron introducidos en células NALM-6 (Kit V, T-001, Lonza). La plantilla de reparación se circularizó para disminuir la integración aleatoria. Se llevó a cabo una selección de las células positivas por 3 rondas secuenciales de enriquecimiento usando el sistema MACSelect LNGFR (Miltenyi).

20. Análisis por co-inmunoprecipitación y *Western Blot*

Se introdujo un plásmido de RAG2 etiquetado con c-myc en células *wyld type* (WT) y NALM-6 KDM5C⁻ (Lonza). Tras 48 horas, se realizó la co-inmunoprecipitación con micropartículas Anti-c-myc siguiendo las indicaciones del fabricante (Miltenyi), y después se llevo a cabo un *Western Blot* con las proteínas precipitadas usando anticuerpos anti-RAG2 (Abcam) y anti-H3K4me3 (Merck Millipore).

21. Cuantificación por *Real-time* PCR (Q-PCR) de *Rag1*, *Rag2* y *Aid*

Se ha utilizado RNA de células proB preB de MO de ratones preleucémicos *Sca1-ETV6-RUNX1* para medir la expresión de *Rag1* y *Rag2*. La expresión de *Aid* se ha analizado en precursores celulares B (B220^{low}IgM⁻) de MO purificados mediante separación celular por citometría de flujo de ratones *wild type*, *Pax5-het* y *Sca1-ETV6-RUNX1* en 2 condiciones ambientales distintas (ratones mantenidos en animalario convencional de exposición al ambiente y animales mantenidos en condiciones SPF) mediante Q-PCR.

El cDNA usado en estudios de PCR cuantitativa se ha sintetizado utilizando la transcriptasa reversa (Access RT-PCR System; Promega, Madison, WI). Las reacciones de *Real-time* PCR se han llevado a cabo en un equipo Eppendorf MasterCycler Realplex. Las sondas utilizadas para la PCR cuantitativa están disponibles comercialmente *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems): *Rag1* (Mm.PT.58.6440291), *Rag2* (Mm.PT.58.15986013) y en Integrated DNA Technologies: *AID* (Mm.PT.58.42247522) y *GAPDH* (Mm.PT.39a.1). Además, las sondas han sido diseñadas de manera que el DNA genómico no debería ser detectado durante la PCR. La medida del producto de expresión génica del gen *GAPDH* se ha utilizado como control endógeno. Se ha utilizado bazo total de ratones inmunizados con sangre de cordero como control positivo de la expresión de *Aid* y como control negativo se han usado las células proB PreB de MO purificadas mediante separación celular por citometría de flujo de ratones *Aid-KO*. Todas las muestras se han corrido por triplicado.

Se ha usado el método comparativo CT ($\Delta\Delta Ct$) para calcular la expresión relativa del transcrito de interés y un control positivo. El cambio en el ciclo umbral (ΔCt) de cada muestra se ha calculado como el valor Ct del gen de interés (*target*) menos el valor Ct de *GAPDH* (control endógeno). El $\Delta\Delta Ct$ de cada muestra se ha obtenido sustrayendo el valor ΔCt de la referencia del valor ΔCt de la muestra. El valor ΔCt de referencia utilizado ha sido el ΔCt obtenido del bazo total del ratón *wild type* inmunizado. Se ha comparado la diferencia de expresión en cada grupo, calculada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

22. Análisis del patrón mutacional en las B-ALL *Pax5-het/Aid-het* y *Pax5-het/Aid-KO*

Las muestras se han sometido a un alineamiento estandarizado con [BWA-mem] y a un paso previo al procesamiento que consiste en un realineamiento GATK, recalibración y *trimming tool*. Las variantes de nucleótido único se han identificado para las muestras de tumor y control con Platypus, versión 0.8.1 y los parámetros por defecto¹⁵¹. Las variantes de los controles fueron agrupadas y retiradas de cada lista de variantes de las muestras tumorales, y viceversa. Además, se han descartado todas las variantes con una calidad de puntuación menor de 100. A continuación, los análisis de la firma mutacional se realizaron con el paquete de R/Bioconductor "*MutationalPatterns*", versión 1.6.1¹⁵².

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Informe del control sanitario del animalario SPF (de sus siglas en inglés, *Specific Pathogen Free*).

ANIMALARIO SPF - INFORME CONTROL SANITARIO					
AÑO	2015	2016	2017	2018	2019
VIRUS					
MAD (Adenovirus type 1 and 2)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
MCMV (Mouse cytomegalovirus)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
LCMV (Lymph choriomeningitis)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Ectromelia	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
EDIM	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Hantaan virus	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
MHV (Mouse hepatitis virus)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
MVM (Minute virus)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
MPV (Parvovirus type 1 and 2)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
PVM (Pneumonia virus)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Reovirus type 3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Sendai	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
TMEV (Theiler's murine encephalomyel)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
K virus	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Polyoma virus	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
BACTERIAS					
Bordetella bronchiseptica	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Car-bacillus	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Citrobacter rodentium	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Clostridium pilliforme (Tyzzer' disease)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Corynebacterium kutscheri	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Mycoplasma pulmonis	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Pasteurella pneumotropica	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Pasteurella multocida	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Salmonella spp	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Streptobacillus moniliformis	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Streptococci beta hemolíticos (A,G)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Streptococcus pneumoniae	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Helicobacter spp	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
PARÁSITOS					
Ectoparasites	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Helminth (A.tetraptrera, Syphacia spp)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Cestods (Hymenolepis spp)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Eimeria spp	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Giardia spp	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Trichomonas muris	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Spirochete spp	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Encephalitozoon cuniculi	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
NECROPSIA	No se observan lesiones macroscópicas.	No se observan lesiones macroscópicas.	No se observan lesiones macroscópicas.	No se observan lesiones macroscópicas.	No se observan lesiones macroscópicas.
NEG: Negativo					
POS: Positivo					
SPF: Specific Pathogen Free					

Anexo 2. Informe del control sanitario del animalario convencional CF (de sus siglas en inglés, *Conventional Facility*).

ANIMALARIO CONVENCIONAL - INFORME CONTROL SANITARIO					
AÑO	2015	2016	2017	2018	2019
VIRUS					
MAD (Adenovirus type 1 and 2)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
MCMV (Mouse cytomegalovirus)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
LCMV (Lymph choriomeningitis)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Ectromelia	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
EDIM	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Hantaan virus	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
MHV (Mouse hepatitis virus)	POS	POS	POS	POS	POS
MVM (Minute virus)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
MPV (Parvovirus type 1 and 2)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
PVM (Pneumonia virus)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Reovirus type 3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Sendai	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
TMEV (Theiler's murine encephalomyel)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
K virus	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Polyoma virus	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
BACTERIAS					
Bordetella bronchiseptica	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Car-bacillus	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Citrobacter rodentium	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Clostridium piliforme (Tyzzer' disease)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Corynebacterium kutscheri	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Mycoplasma pulmonis	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Pasteurella pneumotropica	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Pasteurella multocida	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Salmonella spp	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Streptobacillus moniliformis	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Streptococci beta hemolíticos (A,G)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Streptococcus pneumoniae	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Helicobacter spp	POS	POS	POS	POS	POS
PARÁSITOS					
Ectoparasites	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Helminth (A.tetraptrera, Syphacia spp)	POS	POS	POS	POS	POS
Cestods (Hymenolepis spp)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Eimeria spp	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Giardia spp	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Trichomonas muris	POS	POS	POS	POS	POS
Spirochete spp	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Encephalitozoon cuniculi	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
NECROPSIA	No se observan lesiones macroscópicas.	No se observan lesiones macroscópicas.	No se observan lesiones macroscópicas.	No se observan lesiones macroscópicas.	No se observan lesiones macroscópicas.
NEG: Negativo					
POS: Positivo					

Anexo 3. Porcentaje de las distintas poblaciones celulares hematopoyéticas en ratones jóvenes Sca1-ETV6-RUNX1 y WT mantenidos en animalario convencional.

Tejido	Población	Marcadores	Porcentaje \pm SD		Unpaired t-test p valor
			Wild type (n=6)	Sca1-ETV6-RUNX1 (n=6)	
Sangre periférica	Células T CD4	CD4+	17,78 \pm 6,64	23,56 \pm 5,05	0,1457
	Células T CD8	CD8+	13,52 \pm 3,95	14,12 \pm 4,32	0,8153
	Células B	IgM ⁺ -B220+	33,7 \pm 8,47	33,52 \pm 6,71	0,9702
	Granulocitos	Gr1 ⁺ Mac1 ⁺	22,03 \pm 5,57	8,03 \pm 4,25	0,0013 (**)
Médulo ósea	Células T CD4	CD4+	0,95 \pm 0,30	1,11 \pm 0,23	0,3355
	Células T CD8	CD8+	0,99 \pm 0,67	0,88 \pm 0,45	0,7287
	Células B inmaduras	IgM ⁺ B220 ^{low}	0,76 \pm 0,28	2,38 \pm 1,35	0,0284 (*)
	Células proB preB	IgM ⁻ B220 ^{low}	4,79 \pm 2,32	9,94 \pm 3,62	0,0151 (*)
	Células B recirculantes	IgM ⁺ B220 ^{high}	5,99 \pm 1,50	5,96 \pm 1,98	0,09809
	Células B	IgM ⁺ -B220+	11,42 \pm 3,09	18,29 \pm 5,86	0,0294 (*)
	Granulocitos	Gr1 ⁺ Mac1 ⁺	39,98 \pm 15,11	41,65 \pm 8,83	0,8201
	HSCs	Sca1 ⁺ Lin ⁻ cKit ⁺	0,70 \pm 0,42	0,30 \pm 0,21	0,0643
Bazo	Células T CD4	CD4+	10,45 \pm 6,85	17,26 \pm 6,73	0,0938
	Células T CD8	CD8+	6,85 \pm 4,41	12,22 \pm 4,76	0,0705
	Células B	IgM ⁺ -B220+	28,56 \pm 14,15	33,97 \pm 13,29	0,5107
	Granulocitos	Gr1 ⁺ Mac1 ⁺	2,34 \pm 1,44	2,26 \pm 1,02	0,9176
	Células B foliculares	CD21 ^{low} CD23 ⁺ B220 ⁺	18,88 \pm 8,29	47,57 \pm 29,38	0,0723
Timo	Células B zona marginal	CD21 ^{high} CD23 ⁻ B220 ⁺	2,70 \pm 2,13	6,95 \pm 3,06	0,0435 (*)
	Células T CD4	CD4+	3,57 \pm 0,98	4,39 \pm 0,51	0,1000
	Células T CD8	CD8+	1,19 \pm 0,45	1,22 \pm 0,37	0,9301
	Células T dobles positivas	CD4 ⁺ CD8 ⁺	68,06 \pm 20,09	84,88 \pm 5,38	0,0759
	Células T dobles negativas	CD4 ⁻ CD8 ⁻	23,97 \pm 19,30	7,50 \pm 6,05	0,0742

Anexo 4. Regulación diferencial de los genes modificadores de las histonas en los ratones Sca1-ETV6-RUNX1 comparados con la B-ALL humana ETV6-RUNX1+. Los números indicados en la tabla corresponden con el R-fold.

Gen	Regulación en ratones preleucémicos Sca1-ETV6-RUNX1 vs. WT en SPF (proB preB)	Regulación en ratones preleucémicos Sca1-ETV6-RUNX1 vs. WT en CF (proB preB)	MILE t(12:21)	Regulación en ratones leucémicos Pox5-het (proB preB)	Regulación en ratones WT en CF vs. SPF (proB preB)	Regulación en ratones Sca1-ETV6-RUNX1 en CF vs. SPF (proB preB)
ATF7IP	-	1,39	Up	-0,55	-0,83	1,23
H2AFJ	-	-	N	-	-0,88	-
H2AFX	-	-0,36	N	-	-	-0,50
H2AFY	-	-0,83	N	1,49	1,17	-
HDAC1	-	1,17	Up	-	-	-
HDAC3	-	-	Down	-	1,15	1,18
HDAC6	-	-0,87	N	1,46	-	-
HDAC7	-0,67	1,42	Up	-	-0,63	1,34
HDAC8	-	1,12	Down	-0,29	-	-
KDM2A	-	1,20	Up	-0,69	-0,84	-
KDM3A	-	1,29	N	-0,46	-0,84	1,25
KDM3B	-	1,15	Up	-0,69	-	1,10
KDM4A	-	1,30	Up	-0,63	-0,83	-
KDM4C	-	1,15	Up	-0,68	-	-
KDM5A	-	1,32	N	-0,64	-	1,26
KDM5B	-	1,45	Up	-0,08	-0,73	1,27
KDM5C	-	1,27	Up	-0,69	-	1,57
KDM6A	-	1,06	N	-	1,33	1,75
KDM6B	-	1,54	Down	-0,42	-0,60	-
SETD2	-	1,21	Up	-0,70	-0,88	-
SETD5	-0,84	1,19	Up	-	-0,83	1,17

Anexo 5. Alteraciones genómicas compartidas en B-ALL *ETV6-RUNX1* murina y humana.

Cr.	Región	Copy number (Ratón)	Ratón afectado	Muestras humanas		Genes en esta región
				Nº de muestras afectadas (nuestra cohorte)	Duplicada (dup) o delecionada (del) en Papaemmanuil et al.	
1	1-8.130.000	3	S825	7	dup	<i>Lyp1a1, Tcea1, Atp6v1h, Oprk1, Rb1cc1, Fam150a, St18, Pcmtd1, Xkr4, Rp1, Sox17, Mrpl15, Rgs20</i>
1	109.800.001-117.850.000	3	S825	1	dup	<i>Cdh7, Cntnap5a, Cdh19, Dsel</i>
2	18.110.001-18.490.000	3	J408	0	dup	<i>Milt10, Dnajc1</i>
2	22.390.001-22.580.000	1	S825	1	del	<i>Myo3a</i>
3	8.200.001-8.290.000	4	S825	0	dup	
3	40.520.001-40.680.000	1	S825	0	del	<i>Intu, 1700017G19Rik</i>
3	131.340.001-131.500.000	1	S825	0	del	<i>Sgms2</i>
4	89.260.001-89.400.000	1	S825	0	del	<i>Cdkn2a, Cdkn2b</i>
5	124.660.001-124.710.000	3	J406	2	dup	<i>Atp6v0a2</i>
6	133.550.001-133.940.000	3	S825	0	dup	<i>Gm5886, Kap</i>
9	24.500.001-24.590.000	3	J408	1	dup	<i>Dpy19l1, Dpy19l2</i>
9	13.280.001-13.440.000	1	S825	1	del	<i>Ccdc82</i>
9	24.500.001-24.590.000	4	S825	1	dup	<i>Dpy19l1, Dpy19l2</i>
9	108.820.001-108.940.000	1	S825	0	del	<i>Celsr3, Slc26a6, Tmem89, Uqcrc1</i>
9	123.840.001-123.930.000	1	S825	0	del	<i>Fyco1, Xcr1</i>
10	7.470.001-7.610.000	1	S825	0	del	<i>Lrp11, Ulbp1</i>
10	100.290.001-100.420.000	4	S825	3	dup	
11	54.100.001-54.190.000	4	S825	3	dup	<i>P4ha2, 4933405E24Rik</i>
12	68.890.001-68.990.000	3	S825	0	dup	
14	14.090.001-14.600.000	4	S825	2	dup	<i>Atxn7, Il3ra, Psmid6</i>
14	88.130.001-97.120.000	3	S825	0	dup	<i>4930474H20Rik, 4921530L21Rik, Pcdh20, Pcdh9, Kih1</i>
15	96.380.001-96.490.000	3	J406	0	dup	<i>Arid2, Scaf11</i>
15	6.570.001-6.960.000	3	J408	3	dup	<i>Fyb, Rictor, Osmr</i>
15	12.090.001-12.300.000	3	J408	3	dup	<i>Zfr, Mtmr12</i>
15	54.970.001-55.320.000	3	J408	0	dup	<i>Deptor, Col14a1, Taf2, Dscc1, Gm9920</i>
15	57.860.001-58.250.000	3	J408	0	dup	<i>Tbc1d31, Fam83a, Wdyhv1, Derl1, 9130401M01Rik, Zhx1, Atad2, Fbxo32</i>
15	96.140.001-96.500.000	3	J408	0	dup	<i>Gm4371, Arid2, 2610037D02Rik, Scaf11</i>
15	100.230.001-100.350.000	3	J408	0	dup	<i>Atf1, Trmprs12, Mettl7a1, Mettl7a3</i>
15	74.940.001-74.990.000	4	S825	0	dup	<i>Ly6e, Ly6i</i>
15	103.710.001-104.043.686	3	S825	0	dup	<i>Muc11, Spt1</i>
16	15.960.001-16.220.000	3	S825	2	dup	<i>Pkp2, Spidr</i>
16	16.380.001-16.490.000	3	S825	6	dup	<i>Fgd4</i>

Anexo 6. Alteraciones en genes relacionados con la modificación de las histonas en muestras de B-ALL humanas.

SNVs		Deleciones					
Gen	Paciente (UKD)	Paciente ID	Cr.	5'	3'	Mutación	Genes en la región
KDM6A	UKD-05 Diagnóstico/ Recalda	Papaemmanuil et al. PD3954a	12	233827	19257786	Delección	KDM5A, HIST4H4, H2AFY, ATF7IP
			5	103321431	141722866	Duplicación en tandem	KDM3B, HDAC3, H2AFY
			17	30130363	2456103	Inversión	KDM6B
			11	101335608	122475886	Delección intracromosómica	H2AFX
			12	11416000	18252434	Delección	HIST4H4, H2AFJ, ATF7IP
			12	11441739	14738198	Delección	HIST4H4, H2AFJ, ATF7IP
			3	46980792	50018051	Delección	SETD2
			X	12779767	52792606	Duplicación en tandem	KDM6A, HDAC6
			12	9587821	117607518	Delección	HDAC7, H1FNT, H3F3C, H2AFJ, ATF7IP
			12	10613519	14366444	Delección	ATF7IP
			X	6751594	108107171	Duplicación en tandem	KDM6A, KDM5C, HDAC6, HDAC8
			X	51389390	75013398	Delección	KDM5C, HDAC8
			X	63491761	105543681	Delección	HDAC8
			12	8637963	15102210	Delección	HIST4H4, H2AFJ, ATF7IP
			12	8913190	16018835	Delección	HIST4H4, H2AFJ, ATF7IP
			11	93784108	99697061	Delección	KDM4D, KDM4E
			9	2829313	27538401	Delección	KDM4C
			6	113953122	159160389	Delección	HDAC2
			12	14367286	14644542	Delección	ATF7IP
			12	1045031	27905152	Delección	HIST4H4, H2AFJ, ATF7IP
			4	92738002	154319641	Delección	H2AFZ, SETD7
			12	31983253	125873960	Duplicación en tandem	HDAC7, H1FNT, KDM2B
			12	9724748	19742174	Delección	HIST4H4, H2AFJ, ATF7IP
			10	70075392	70076000	Duplicación	H2AFY2
			6	27889980	27891013	Delección	HIST1H3J
			5	135342515	135343322	Delección	H2AFY
			16	31130802	31131913	Delección	KAT8
			2	86449898	86450186	Delección	KDM3A
			12	121549465	121549760	Duplicación	KDM2B
			1	202758035	202759189	Delección	KDM5B
			11	67206526	67207576	Delección	KDM2A
			5	135369987	135371097	Delección	H2AFY
			3	129549050	129549326	Delección	HF100
			12	14367482	14436408	Delección	ATF7IP
			5	141634616	141635985	Delección	HDAC3
			1	43694420	43695739	Delección	KDM4A
			1	202807993	202809056	Delección	KDM5B
			12	14367484	14499521	Delección	ATF7IP

SNVs		SNV (Papaemmanuil et al.)	
Gen	Paciente (UKD)	SNV humano (UKD)	SNV (Papaemmanuil et al.)
KDM6A	UKD-05 Diagnóstico/ Recalda	X:45107510: c.3979C>G p.P1327A X:45107510: c.4000C>G p.P1334A	X:45085959: c.3528_3529insAGGT p.L1177fs*4
KDM5C	UKD-11 Recalda	X:53211806: c.1223A>G p.Y408C	
KDM6B	UKD-05 Diagnóstico	17:7848213: c.1925C>T p.P642L	
KDM6B	UKD-05 Recalda/ Remisión	17:7848541-7848543 c.2253-2255CAC>Del p.VT751-752V	
KDM2B	UKD-06 Recalda	12:121443757: c.2488C>T p.H830Y	
HIST1H2BG	PD3972a	6:26217028: c.288G>C p.Q96H	
HDAC1	PD4028a	1:32330868: c.939-940AT>Del p.Y314fs>nonsense	
SETD5	PD4024a	3:9447906: c.2003C>T p.S668L	
ATF2	PD4031a	2:175114896: c.476C>G p.P159R	
ATF7IP	PD4023a	12:14425002 c.1087C>T p.R363*	
ATF7IP	PD3972a	12:14436172 c.1712G>A p.R571Q	

Anexo 7. Características de los pacientes pediátricos participantes en el estudio de *whole genome* y *whole exome sequencing*. (M: mujer; H: hombre).

Paciente ID	Sexo	Edad en el diagnóstico (años)	Tiempo de recaída (años)	Cariotipo [G-banding/NGS]
UKD01	M	2	-	Diagnóstico: 46,XX,del(12)(p12)[5]/46,XX[6]
UKD02	H	2	-	Diagnóstico: 47,XY,+21[2]/47,idem,del(12)(p13)[2]/46,XY[8]
UKD03	M	3	-	No disponible
UKD04	H	14	-	Diagnóstico: 47,XY,der(6)(q21),+21,inc[cp8]/46,XY[2]
UKD05	M	3	3	Diagnóstico: 46-49,XX,+1-3mar[cp4]/46,XX[12]
UKD06	H	5	4	Recaída: 46,XY,del(12)(p13)[8]/47,idem,+der(21)t(12;21)(p13;q22)[2]/46,XY[4]
UKD07	H	6	3	Recaída: 46,Y,-X,del(1)(q2?5),add(3)(q2?8),add(5)(q3?7),del(6)(q21),?der(10)(q),?add(12)(p13),mar,+mar,inc[cp8]/46,XX[5]
UKD08	H	4	1	Diagnóstico: 49,XY,+X,der(4)t(4;5)(q32;q12),der(6)t(5;6)(p13;q1?4),+der(6),der(12)(12qter->12p12::5?:21q22->qter),?der(12)t(6;12)(p1?;?),+21,inc[cp4]/46,XY[6]
UKD09	H	6 (R)	6	No disponible
UKD10	M	5 (R)	5	No disponible
UKD11	M	9 (R)	9	Diagnóstico: 46,XX[10]

Anexo 8. Resumen de las estadísticas del *whole genome sequencing* y del *exome sequencing*. GAIIX; Illumina Genome Analyzer IIX, longitud de lectura 2x 36pb; HS2000, Illumina HiSeq 2000, longitud de lectura 2x 50pb; PE, librería *paired-end*; MP, librería *mate-pair*; a) número de lecturas generadas sin duplicados; b) número de lecturas mapeadas sin duplicados; c) cobertura de la secuencia basada en pares donde los dos finales mapean. El *exome sequencing* se ha llevado a cabo en Illumina HiSeq 2000 con un carril (*lane*) por muestra y una longitud de lectura de 1x 100pb; a) número de lecturas generadas sin duplicados; b) número de lecturas mapeadas sin duplicados; c) basado en 35.977.907 bases mapeadas (SeqCap EZ Exome Library 2.0 kit, Roche/Nimblegen).

Muestra	Momento	Librería	Illumina	Lanes	Raw reads ^a	Mapped reads ^b	Coverage ^c (fold)
UKD01	Inicial	PE	GAIIX	3	297.962.306 (100%)	230.969.943 (78%)	2.67 (83%)
	Remisión R1	PE	GAIIX	3	128.458.732 (100%)	116.154.310 (90%)	1.34 (60%)
UKD02	Inicial	PE	GAIIX	3	208.082.830 (100%)	190.414.294 (92%)	2.2 (76%)
	Remisión R1	PE	GAIIX	3	159.843.152 (100%)	140.948.715 (88%)	1.62 (76%)
UKD03	Inicial	PE	HS2000	2	714.790.231 (100%)	600.258.247 (84%)	9.72 (91%)
	Remisión R1	PE	HS2000	2	439.416.538 (100%)	422.006.689 (96%)	6.9 (90%)
UKD04	Inicial	PE	HS2000	2	475.020.286 (100%)	460.876.103 (97%)	7.59 (92%)
	Remisión R1	PE	HS2000	2	470.438.142 (100%)	456.696.792 (97%)	7.59 (92%)
UKD05	Inicial	PE	HS2000	2	569.884.819 (100%)	500.370.862 (88%)	8.18 (91%)
	Remisión R1	PE	HS2000	2	401.432.933 (100%)	361.265.110 (90%)	5.86 (90%)
	Recaída	PE	HS2000	2	499.345.310 (100%)	462.460.227 (93%)	7.54 (90%)
UKD06	Inicial	PE	HS2000	2	367.293.017 (100%)	341.386.136 (93%)	5.57 (90%)
	Remisión R2	PE	HS2000	2	335.843.498 (100%)	320.871.844 (96%)	5.26 (90%)
	Recaída	PE	HS2000	2	419.311.906 (100%)	397.559.114 (95%)	6.53 (90%)
UKD07	Inicial	MP	GAIIX	3	115.014.213 (100%)	53.809.763 (46.79%)	0.59 (37%)
	Remisión R2	MP	GAIIX	3	47.956.518 (100%)	18.992.716 (39.60%)	0.21 (17%)
	Recaída	MP	GAIIX	3	99.130.039 (100%)	47.870.754 (48.29%)	0.53 (34%)
	Recaída	PE	GAIIX	3	167.584.717 (100%)	144.300.328 (86.11%)	1.65 (67.24%)
UKD08	Inicial	MP	GAIIX	4	123.330.113 (100%)	79.857.610 (64.75%)	1.02 (59%)
	Remisión R2	MP	GAIIX	3	70.164.939 (100%)	24.747.672 (35.27%)	0.34 (25%)
	Recaída	MP	GAIIX	3	46.797.868 (100%)	16.064.666 (34.33%)	0.21 (14%)
UKD09	Inicial	PE	HS2000	2	369.577.323 (100%)	357.084.311 (97%)	5.88 (92%)
	Remisión R1	PE	HS2000	2	482.977.092 (100%)	467.223.892 (97%)	7.69 (92%)
	Recaída	PE	HS2000	2	497.390.990 (100%)	480.787.812 (97%)	7.91 (92%)
UKD10	Inicial	PE	HS2000	2	491.531.801 (100%)	475.742.376 (97%)	7.83 (91%)
	Remisión R1	PE	HS2000	2	482.538.527 (100%)	468.862.587 (97%)	7.72 (91%)
	Recaída	PE	HS2000	2	522.464.631 (100%)	507.359.933 (97%)	8.35 (91%)
UKD11	Inicial	PE	HS2000	2	499.380.283 (100%)	486.935.163 (98%)	8.01 (91%)
	Remisión R1	PE	HS2000	2	740.650.346 (100%)	715.748.058 (97%)	11.75 (92%)
	Recaída	PE	HS2000	2	588.148.218 (100%)	566.077.618 (96%)	9.27 (91%)

Anexo 9. SNVs validadas en la cohorte de pacientes.

Paciente	Dgs	Rm	Ra	Cr	Posición	Tipo de mutación	Allele VIT	Allele Mutado	Gen	CCDS	c	p	Etiqueta
5	Hat			10	43387256	substitución	T	C	HNRPVF	CCDS7204.1	c.629A>G	p.Y210C	missense
5	Hat			15	54014713	substitución	C	T	UNC13C	CCDS45264.1	c.1810C>T	p.G604*	stop gained
6	Hat			2	247037712	substitución	G	C	ZNF670	CCDS31087.1	c.970C>G	p.H303D	missense
6	Hat			1	169487854	substitución	C	G	RPI1-724016.1.1		c.257C>G	p.S86C	missense
6	Hat			2	134887571	substitución	C	G	AGMSD	CCDS2173.2	c.3488C>T; c.3165C>T	p.H1591; p.I1055I	splice site
6	Hat			5	240744059	substitución	G	A	RIF1A	CCDS59197.1; CCDS4656.1.1	c.88C>T	p.D30Y	splice site
6	Hat			5	109341818	substitución	G	C	FAM53C	CCDS4204.1	c.1951G>A	p.D651N	missense
6	Hat			5	26881555	substitución	C	T	CDH9	CCDS3993.1	c.5971C>G; c.2479C>G	p.L1991V; p.L627V	missense
6	Hat			7	75103949	substitución	G	C	COL12A1	CCDS43482.1; CCDS43481.1	c.2635C>G	p.L878V	splice site
6	Hat			7	100692269	substitución	C	T	GIGYF1	CCDS34708.1	c.1957C>T; c.1876C>T; c.1801C>T	p.R659*; p.R628*; p.R601*	missense
6	Hat			8	76707590	substitución	C	G	ZFXH4	CCDS47878.2	c.1237A>G; c.1210A>G	p.H419E; p.K404E	missense
6	Hat			8	119570921	substitución	G	A	ENPP2	CCDS63298.1; CCDS47914.1; CCDS44836.1	c.4095>A	p.E137K	missense
6	Hat			8	115604752	substitución	T	C	TRPS1	CCDS3198.2; CCDS64957.1	c.437C>T	p.S146C	missense
6	Hat			9	129633904	substitución	C	T	ASB6	CCDS75916.1; CCDS6924.1	c.1481C>G; c.1532C>G	p.S494*; p.S511*	stop gained
6	Hat			9	496310826	substitución	G	A	ERCC6-FG6D3	CCDS53029.1	c.3403>A	p.R114G	missense
6	Hat			10	21713910	substitución	G	A	MLL10	CCDS60529.1	c.2498C>T	p.H830Y	missense
6	Hat			10	11463447	substitución	C	G	LSP9NL	CCDS7135.1; CCDS65708.1	c.1378C>T	p.P460W	missense
6	Hat			10	59854901	substitución	C	T	GLYTL1	CCDS53692.1; CCDS4357.1	c.1298G>C; c.1215G>C	p.Q430H; p.407H	missense
6	Hat			11	134144324	substitución	C	T	JAK3	CCDS3195.1; CCDS55186.1	c.2385G>A	p.E799K	missense
6	Hat			12	121443757	substitución	G	A	KOZMB	CCDS8494.2	c.1428C>A	p.H476N	missense
6	Hat			15	39599126	substitución	C	T	THBS1	CCDS41850.1	c.1234G>A; c.589G>A	p.C419R; p.G300R	essential splice site; missense; splice site
6	Hat			18	9354555	substitución	G	C	ANKRD12	CCDS11843.1; CCDS42411.1	c.1976G>A; c.2102G>A	p.G658E; p.G701E	missense
6	Hat			19	33793797	substitución	G	T	ASXL3	CCDS49947.1	c.3064C>T	p.R1021C	missense
6	Hat			20	57826756	substitución	G	T	ZNF48	CCDS4242.1	c.2218G>C	p.E470Q	missense
6	Hat			20	16049832	substitución	G	A	MACROD2	CCDS13120.2; CCDS33443.1	c.6465C>T	p.S1351L	missense
6	Hat			22	17542186	substitución	G	A	CECR2	CCDS54807.1	c.986G>A	p.V613A	missense
7	Hat			1	29635098	substitución	G	T	MYO9B	CCDS1069.2	c.2218G>C	p.R329Q	missense
7	Hat			1	240207030	substitución	C	T	FAM2	CCDS30676.1	c.189T>C	p.G608E	missense
7	Hat			1	7798952	substitución	C	T	CAMTA1	CCDS30676.1	c.1089C>A	p.R383Q	missense
7	Hat			1	10106373	substitución	G	A	UBE1B	CCDS41245.1	c.647G>C	p.D283H	missense
7	Hat			1	160134494	substitución	T	C	ATPIA2	CCDS1196.1	c.631C>T	p.R211*	stop gained
7	Hat			2	227273013	substitución	G	A	COL4A3	CCDS1196.1; CCDS41243.1	c.546A>G	p.I182M	missense
8	Hat			10	103693210	substitución	G	T	RT5C2	CCDS7544.1	c.329G>A	p.S110N	missense
9	Hat			6	10957270	substitución	C	C	GON7	CCDS4512.1	c.591G>A	p.D311N	missense
9	Hat			6	72179734	substitución	C	T	RIIMS1	CCDS47449.1	c.7608C>T; c.7164C>T; c.6883C>T; c.4948C>T; c.4826C>T; c.4882C>T	p.P5536C; p.R3722C; p.R22785C; p.R1640C; p.R18443C; p.R16296C	missense
9	Hat			1	8359738	substitución	G	A	REFE	CCDS995.1; CCDS41243.1	c.1793C>G	p.P598R	missense
9	Hat			10	37962952	substitución	T	C	ZNF25	CCDS7195.1	c.1793C>G	p.P304*	splice site
9	Hat			14	39209719	substitución	G	A	SS7R1	CCDS9666.1	c.610C>T	p.R304*	stop gained
9	Hat			17	6106869	substitución	G	A	WSCD1	CCDS32938.1	c.2254C>T	p.R762W	missense
11	Hat			2	17857046	substitución	G	A	ITN	CCDS54935.1; CCDS74610.1; CCDS54424.1; CCDS54422.1; c.4948C>T; c.4826C>T; c.4882C>T	c.1022A>G; c.1228A>G; c.1229A>G; c.1229A>G	p.Y341C; p.Y408C; p.Y407C	missense
11	Hat			3	1373610	substitución	C	G	ONTN6	CCDS2597.1	c.1793C>G	p.P598R	missense
11	Hat			3	141591182	substitución	C	G	RASA2	CCDS3117.1	c.610C>T	p.R304*	splice site
11	Hat			5	1541028169	substitución	G	A	FAM714A2	CCDS4323.1	c.2254C>T	p.R762W	missense
11	Hat			7	12370552	substitución	G	A	VMOE	CCDS47944.1	c.367G>T	p.D123Y	missense
11	Hat			11	5441148	substitución	C	A	OR51F1	CCDS1382.1	c.3326T>G; c.3293T>G	p.Y110G; c.V108G	missense
11	Hat			12	112250363	substitución	A	C	HECTD4	CCDS1297.1	c.3348C>T	p.R117C	missense
11	Hat			19	19236951	substitución	C	T	NGAN	CCDS54417.1; CCDS14351.1; CCDS6268.1	c.1022A>G; c.1228A>G; c.1229A>G	p.Y341C; p.Y408C; p.Y407C	missense
11	Hat			X	53211806	substitución	T	C	KOZMB	CCDS41850.1	c.1234G>A; c.589G>A	p.C419R; p.G300R	essential splice site; missense; splice site

Anexo 10. Lista de mutaciones identificadas mediante *whole exome sequencing* en ratones enfermos $Etv6^{-ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre$ y $ETV6-RUNX1 + Kdm5c^{wt/f} + Sca1-Cre$. Las mutaciones somáticas específicas de los tumores se han determinado mediante el análisis con MUTECT Y VARSCAN.

Etv6 ^{-ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre									
T-ALL									
V265	V387	V147	V152	V146	V386	V151	V540	X177	V899
Timo	Bazo	Timo	Timo	Timo	Timo	Bazo	Bazo	Timo	Timo
		Notch1 p.Arg2361Pro	Ikzf1 p.Arg242*	Ikzf1 p.His191Glu	Notch1 p.Arg2361Pro				
								Kras p.Ala146Val	Kras p.Gly12Asp
	Cdh11 p.Gly86Val			Thrap3 p.Gly892Ser					
					Bcl11b p.Lys828Thr				
					Lcp1 p.Asn565Ser				
							Sf3b1 p.Thr56Ile		
									Smarcae1 p.Lys409Glu

Lista de susceptibilidad a cáncer (ratón)

Etv6 ^{-ETV6-RUNX1} + Sca1-Cre		Sca1-ETV6-RUNX1 + Kdm5c ^{wt/f} + Sca1-Cre	
B-ALL		Neoplasia B	
V900	X028	V120	V120
Bazo	Sangre periférica	Bazo	Nódulo linfático
Trp53 p.Glu255Asp			
Csf3r p.Pro821Ser		Csf3r p.Asn807Ser	
		Mlf1 p.Arg141Lys	
			PI3ca p.Asp538Gly
			Ein p.Gly143Ala
			Brc2 p.Asn1518Thr
			Bcl3 p.Pro366Ser
			Mak2l1 p.Val60Gly
			Arid2 p.Phe152Leu
			Ctla p.Tyr104Cys
			Citap.Ser115Thr
			Pren p.Ser10Arg
	Hoxc11 p.A165V		

Lista de susceptibilidad a cáncer (ratón)

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Terwilliger, T. & Abdul-Hay, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal* **7**, e577 (2017).
2. Hunger, S. P. & Mullighan, C. G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *New England Journal of Medicine* **373**, 1541–1552 (2015).
3. Downing, J. R. *et al.* The Pediatric Cancer Genome Project. *Nature Genetics* **44**, 619–622 (2012).
4. Inaba, H., Greaves, M. & Mullighan, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* **381**, 1943–1955 (2013).
5. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2019: Cancer Statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **69**, 7–34 (2019).
6. Greaves, M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews Cancer* **18**, 471–484 (2018).
7. Pui, C.-H., Nichols, K. E. & Yang, J. J. Somatic and germline genomics in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews Clinical Oncology* **16**, 227–240 (2019).
8. Pui, C.-H., Yang, J. J., Bhakta, N. & Rodriguez-Galindo, C. Global efforts toward the cure of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet Child & Adolescent Health* **2**, 440–454 (2018).
9. Bhatia, S. *et al.* 6MP adherence in a multiracial cohort of children with acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood* **124**, 2345–2353 (2014).
10. Greaves, M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nature Reviews Cancer* **6**, 193–203 (2006).
11. Metayer, C. *et al.* The Childhood Leukemia International Consortium. *Cancer Epidemiology* **37**, 336–347 (2013).
12. Dockerty, J. D., Draper, G., Vincent, T., Rowan, S. D. & Bunch, K. J. Case-control study of parental age, parity and socioeconomic level in relation to childhood cancers. *Int J Epidemiol* **30**, 1428–1437 (2001).
13. Amitay, E. L. & Keinan-Boker, L. Breastfeeding and Childhood Leukemia Incidence: A Meta-analysis and Systematic Review. *JAMA Pediatrics* **169**, e151025 (2015).
14. Ma, X. *et al.* Vaccination history and risk of childhood leukaemia. *International Journal of Epidemiology* **34**, 1100–1109 (2005).
15. Schüz, J. Exposure to extremely low-frequency magnetic fields and the risk of childhood cancer: Update of the epidemiological evidence. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **107**, 339–342 (2011).
16. Preston, D. L. *et al.* Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat. Res.* **137**, S68-97 (1994).
17. Doll, R. & Wakeford, R. Risk of childhood cancer from fetal irradiation. *The British Journal of Radiology* **70**, 130–139 (1997).
18. Bartley, K., Metayer, C., Selvin, S., Ducore, J. & Buffler, P. Diagnostic X-rays and risk of childhood leukaemia. *International Journal of Epidemiology* **39**, 1628–1637 (2010).
19. Ward, G. The infective theory of acute leukaemia. *Br. J. Child Dis* **14**, 10–20 (1917).
20. Kinlen, L. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison

- of a Scottish new town with nuclear reprocessing sites in Britain. *Lancet* **2**, 1323–1327 (1988).
21. Kinlen, L. Childhood leukaemia, nuclear sites and population mixing. *British Journal of Cancer* **104**, 12–18 (2011).
 22. Greaves, M. F. Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2**, 120–125 (1988).
 23. Shah, A. & Coleman, M. P. Increasing incidence of childhood leukaemia: a controversy re-examined. *Br J Cancer* **97**, 1009–1012 (2007).
 24. Spix, C., Eletr, D., Blettner, M. & Kaatsch, P. Temporal trends in the incidence rate of childhood cancer in Germany 1987-2004. *Int. J. Cancer* **122**, 1859–1867 (2007).
 25. Steliarova-Foucher, E., Stiller, C., Kaatsch, P., Berrino, F. & Coebergh, J.-W. Trends in childhood cancer incidence in Europe, 1970–99. *The Lancet* **365**, 2088 (2005).
 26. Zehir, A. *et al.* Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nature Medicine* **23**, 703–713 (2017).
 27. ICGC PedBrain-Seq Project *et al.* The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature* **555**, 321–327 (2018).
 28. Ma, X. *et al.* Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours. *Nature* **555**, 371–376 (2018).
 29. Rodríguez-Hernández, G. *et al.* Modeling the process of childhood ETV6-RUNX1 B-cell leukemias. *Oncotarget* **8**, 102674–102680 (2017).
 30. Bohlander, S. K. ETV6: A versatile player in leukemogenesis. *Seminars in Cancer Biology* **15**, 162–174 (2005).
 31. Deltcheva, E. & Nimmo, R. RUNX transcription factors at the interface of stem cells and cancer. *Biochemical Journal* **474**, 1755–1768 (2017).
 32. Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S. W., Grosveld, G. & Downing, J. R. AML1, the Target of Multiple Chromosomal Translocations in Human Leukemia, Is Essential for Normal Fetal Liver Hematopoiesis. *Cell* **84**, 321–330 (1996).
 33. Levanon, D. The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons. *The EMBO Journal* **21**, 3454–3463 (2002).
 34. Wang, Q. *et al.* The CBF β Subunit Is Essential for CBF α 2 (AML1) Function In Vivo. *Cell* **87**, 697–708 (1996).
 35. Sundaresh, A. & Williams, O. Mechanism of ETV6-RUNX1 Leukemia. in *RUNX Proteins in Development and Cancer* (eds. Groner, Y. *et al.*) **962**, 201–216 (Springer Singapore, 2017).
 36. Wang, Q. *et al.* Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 3444–3449 (1996).
 37. Wang, L. C. Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *The EMBO Journal* **16**, 4374–4383 (1997).
 38. Hock, H. *et al.* Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev.* **18**, 2336–2341 (2004).
 39. Wang, L. C. *et al.* The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev.* **12**, 2392–2402 (1998).
 40. Ichikawa, M. *et al.* AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nature Medicine* **10**, 299–304 (2004).
 41. Rodríguez-Hernández, G. *et al.* Infection Exposure Promotes ETV6-RUNX1 Precursor B-cell Leukemia via Impaired H3K4 Demethylases. *Cancer Research* **77**, 4365–4377 (2017).
 42. Cobaleda, C. & Sánchez-García, I. B-cell acute lymphoblastic leukaemia: towards

- understanding its cellular origin. *BioEssays* **31**, 600–609 (2009).
43. Ford, A. M. *et al.* The TEL-AML1 leukemia fusion gene dysregulates the TGF- β pathway in early B lineage progenitor cells. *Journal of Clinical Investigation* JCI36428 (2009). doi:10.1172/JCI36428
 44. Hong, D. *et al.* Initiating and Cancer-Propagating Cells in TEL-AML1-Associated Childhood Leukemia. *Science* **319**, 336–339 (2008).
 45. Mori, H. *et al.* Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 8242–8247 (2002).
 46. Schäfer, D. *et al.* Five percent of healthy newborns have an *ETV6-RUNX1* fusion as revealed by DNA-based GIPFEL screening. *Blood* **131**, 821–826 (2018).
 47. Mullighan, C. G. *et al.* Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **446**, 758–764 (2007).
 48. Romana, S. P. *et al.* Deletion of the short arm of chromosome 12 is a secondary event in acute lymphoblastic leukemia with t(12;21). *Leukemia* **10**, 167–170 (1996).
 49. Patel, N. *et al.* Expression profile of wild-type ETV6 in childhood acute leukaemia. *Br. J. Haematol.* **122**, 94–98 (2003).
 50. Noetzli, L. *et al.* Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics* **47**, 535–538 (2015).
 51. Papaemmanuil, E. *et al.* RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics* **46**, 116–125 (2014).
 52. Lilljebjörn, H. *et al.* Identification of ETV6-RUNX1-like and DUX4-rearranged subtypes in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Communications* **7**, 11790 (2016).
 53. Harrison, C. J. *et al.* Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfurt-Münster study group: Annotation. *British Journal of Haematology* **151**, 132–142 (2010).
 54. Borowitz, M. J. *et al.* Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children’s Oncology Group study. *Blood* **111**, 5477–5485 (2008).
 55. Eckert, C. *et al.* Monitoring minimal residual disease in children with high-risk relapses of acute lymphoblastic leukemia: prognostic relevance of early and late assessment. *Leukemia* **29**, 1648–1655 (2015).
 56. Busslinger, M. Transcriptional Control of Early B Cell Development. *Annual Review of Immunology* **22**, 55–79 (2004).
 57. Matthias, P. & Rolink, A. G. Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nature Reviews Immunology* **5**, 497–508 (2005).
 58. Martin-Lorenzo, A. *et al.* Infection Exposure Is a Causal Factor in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia as a Result of Pax5-Inherited Susceptibility. *Cancer Discovery* **5**, 1328–1343 (2015).
 59. Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G. & Busslinger, M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* **401**, 556–562 (1999).
 60. Urbanek, P. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* **79**, 901–912 (1994).
 61. Cobaleda, C., Jochum, W. & Busslinger, M. Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature* **449**, 473–477 (2007).
 62. Nebral, K. *et al.* Incidence and diversity of PAX5 fusion genes in childhood acute

- lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **23**, 134–143 (2009).
63. Shah, S. *et al.* A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics* **45**, 1226–1231 (2013).
 64. Auer, F. *et al.* Inherited susceptibility to pre B-ALL caused by germline transmission of PAX5 c.547G>A. *Leukemia* **28**, 1136–1138 (2014).
 65. Waanders, E. *et al.* The Origin and Nature of Tightly Clustered BTG1 Deletions in Precursor B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Support a Model of Multiclonal Evolution. *PLoS Genetics* **8**, e1002533 (2012).
 66. Numata, M., Saito, S. & Nagata, K. RAG-dependent recombination at cryptic RSSs within TEL–AML1 t(12;21)(p13;q22) chromosomal translocation region. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **402**, 718–724 (2010).
 67. Mullighan, C. G. *et al.* BCR–ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* **453**, 110–114 (2008).
 68. Bories, J. C., Cayuela, J. M., Loiseau, P. & Sigaux, F. Expression of human recombination activating genes (RAG1 and RAG2) in neoplastic lymphoid cells: correlation with cell differentiation and antigen receptor expression. *Blood* **78**, 2053–2061 (1991).
 69. Oettinger, M. A. How to keep V(D)J recombination under control. *Immunological Reviews* **200**, 165–181 (2004).
 70. Matthews, A. G. W. *et al.* RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature* **450**, 1106–1110 (2007).
 71. Martin, C. & Zhang, Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 838–849 (2005).
 72. Peng, Y. & Alexov, E. Cofactors-loaded quaternary structure of lysine-specific demethylase 5C (KDM5C) protein: Computational model: KDM5C Quaternary Structure. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **84**, 1797–1809 (2016).
 73. Tahiliani, M. *et al.* The histone H3K4 demethylase SMCX links REST target genes to X-linked mental retardation. *Nature* **447**, 601–605 (2007).
 74. Iwase, S. *et al.* The X-Linked Mental Retardation Gene SMCX/JARID1C Defines a Family of Histone H3 Lysine 4 Demethylases. *Cell* **128**, 1077–1088 (2007).
 75. Peng, Y. *et al.* Mutations in the KDM5C ARID Domain and Their Plausible Association with Syndromic Claes-Jensen-Type Disease. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 27270–27287 (2015).
 76. Muramatsu, M. *et al.* Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. *Cell* **102**, 553–563 (2000).
 77. Ramiro, A. R. *et al.* AID Is Required for c-myc/IgH Chromosome Translocations In Vivo. *Cell* **118**, 431–438 (2004).
 78. Pasqualucci, L. *et al.* AID is required for germinal center–derived lymphomagenesis. *Nature Genetics* **40**, 108–112 (2008).
 79. Tsai, A. G. *et al.* Human Chromosomal Translocations at CpG Sites and a Theoretical Basis for Their Lineage and Stage Specificity. *Cell* **135**, 1130–1142 (2008).
 80. Swaminathan, S. *et al.* Mechanisms of clonal evolution in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nature Immunology* **16**, 766–774 (2015).
 81. Pasqualucci, L. *et al.* Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* **412**, 341–346 (2001).
 82. Robbiani, D. F. *et al.* AID Is Required for the Chromosomal Breaks in c-myc that Lead to c-myc/IgH Translocations. *Cell* **135**, 1028–1038 (2008).
 83. Casellas, R. *et al.* Mutations, kataegis and translocations in B cells: understanding AID promiscuous activity. *Nature Reviews Immunology* **16**, 164–176 (2016).

84. Álvarez-Prado, Á. F. *et al.* A broad atlas of somatic hypermutation allows prediction of activation-induced deaminase targets. *The Journal of Experimental Medicine* **215**, 761–771 (2018).
85. Robbiani, D. F. *et al.* Plasmodium Infection Promotes Genomic Instability and AID-Dependent B Cell Lymphoma. *Cell* **162**, 727–737 (2015).
86. Sabaawy, H. E. *et al.* TEL-AML1 transgenic zebrafish model of precursor B cell acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 15166–15171 (2006).
87. Andreasson, P., Schwaller, J., Anastasiadou, E., Aster, J. & Gilliland, D. G. The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **130**, 93–104 (2001).
88. Bernardin, F. *et al.* TEL-AML1, expressed from t(12;21) in human acute lymphocytic leukemia, induces acute leukemia in mice. *Cancer Res.* **62**, 3904–3908 (2002).
89. Morrow, M. TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity. *Blood* **103**, 3890–3896 (2004).
90. Tsuzuki, S., Seto, M., Greaves, M. & Enver, T. Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 8443–8448 (2004).
91. Fischer, M. *et al.* Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model. *Oncogene* **24**, 7579–7591 (2005).
92. Kantner, H.-P. *et al.* ETV6/RUNX1 Induces Reactive Oxygen Species and Drives the Accumulation of DNA Damage in B Cells. *Neoplasia* **15**, 1292-IN28 (2013).
93. Bauer, E. *et al.* Cooperation of ETV6/RUNX1 and BCL2 enhances immunoglobulin production and accelerates glomerulonephritis in transgenic mice. *Oncotarget* **7**, (2016).
94. Schindler, J. W. *et al.* TEL-AML1 Corrupts Hematopoietic Stem Cells to Persist in the Bone Marrow and Initiate Leukemia. *Cell Stem Cell* **5**, 43–53 (2009).
95. van der Weyden, L. *et al.* Somatic drivers of B-ALL in a model of ETV6-RUNX1; Pax5 +/- leukemia. *BMC Cancer* **15**, 585 (2015).
96. Li, M. *et al.* Initially disadvantaged, TEL-AML1 cells expand and initiate leukemia in response to irradiation and cooperating mutations. *Leukemia* **27**, 1570–1573 (2013).
97. Lausten-Thomsen, U. *et al.* Prevalence of t(12;21)[ETV6-RUNX1]-positive cells in healthy neonates. *Blood* **117**, 186–189 (2011).
98. Pérez-Caro, M. *et al.* Cancer induction by restriction of oncogene expression to the stem cell compartment. *EMBO J.* **28**, 8–20 (2009).
99. Vicente-Dueñas, C. *et al.* Tumoral stem cell reprogramming as a driver of cancer: Theory, biological models, implications in cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology* **32**, 3–9 (2015).
100. Vicente-Dueñas, C., Romero-Camarero, I., Cobaleda, C. & Sánchez-García, I. Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm. *EMBO J.* **32**, 1502–1513 (2013).
101. Kumar, S. *et al.* Flexible ordering of antibody class switch and V(D)J joining during B-cell ontogeny. *Genes & Development* **27**, 2439–2444 (2013).
102. Yu, W. *et al.* Continued RAG expression in late stages of B cell development and no apparent re-induction after immunization. *Nature* **400**, 682–687 (1999).
103. Bateman, C. M. *et al.* Acquisition of genome-wide copy number alterations in monozygotic twins with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **115**, 3553–3558 (2010).

104. Kuiper, R. P. *et al.* IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. *Leukemia* **24**, 1258–1264 (2010).
105. Adamiak, M., Abdelbaset-Ismail, A., Kucia, M., Ratajczak, J. & Ratajczak, M. Z. Toll-like receptor signaling-deficient mice are easy mobilizers: evidence that TLR signaling prevents mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells in HO-1-dependent manner. *Leukemia* **30**, 2416–2419 (2016).
106. Fidanza, M. *et al.* Inhibition of precursor B-cell malignancy progression by toll-like receptor ligand-induced immune responses. *Leukemia* **30**, 2116–2119 (2016).
107. Hobeika, E. *et al.* Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 13789–13794 (2006).
108. Mainardi, S. *et al.* Identification of cancer initiating cells in K-Ras driven lung adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 255–260 (2014).
109. Liu, Y. *et al.* The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **49**, 1211–1218 (2017).
110. Alpar, D. *et al.* Clonal origins of ETV6-RUNX1+ acute lymphoblastic leukemia: studies in monozygotic twins. *Leukemia* **29**, 839–846 (2015).
111. Forbes, S. A. *et al.* COSMIC: exploring the world’s knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Research* **43**, D805–D811 (2015).
112. Gu, Z. *et al.* PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics* **51**, 296–307 (2019).
113. Zhou, G. *et al.* The clinical characteristics and prognostic significance of AID, miR-181b, and miR-155 expression in adult patients with *de novo* B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **58**, 2118–2126 (2017).
114. Juric, D. *et al.* Differential Gene Expression Patterns and Interaction Networks in BCR-ABL –Positive and –Negative Adult Acute Lymphoblastic Leukemias. *JCO* **25**, 1341–1349 (2007).
115. Forbes, S. A. *et al.* COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res* **45**, D777–D783 (2017).
116. Campos-Sanchez, E. *et al.* Novel ETV6-RUNX1 Mouse Model to Study the Role of ELF-MF in Childhood B-Acute Lymphoblastic Leukemia: a Pilot Study. *Bioelectromagnetics* bem.22193 (2019). doi:10.1002/bem.22193
117. Böiers, C. *et al.* A Human IPS Model Implicates Embryonic B-Myeloid Fate Restriction as Developmental Susceptibility to B Acute Lymphoblastic Leukemia-Associated ETV6-RUNX1. *Developmental Cell* **44**, 362–377.e7 (2018).
118. Jankovic, M. *et al.* 53BP1 Alters the Landscape of DNA Rearrangements and Suppresses AID-Induced B Cell Lymphoma. *Molecular Cell* **49**, 623–631 (2013).
119. Burger, J. A. & Wiestner, A. Targeting B cell receptor signalling in cancer: preclinical and clinical advances. *Nat Rev Cancer* **18**, 148–167 (2018).
120. Kim, E. *et al.* Ibrutinib inhibits pre-BCR + B-cell acute lymphoblastic leukemia progression by targeting BTK and BLK. *Blood* **129**, 1155–1165 (2017).
121. Compagno, M. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase δ blockade increases genomic instability in B cells. *Nature* **542**, 489–493 (2017).
122. Yun, S. *et al.* Transformation of chronic lymphocytic leukemia into B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **131**, 1258–1261 (2018).
123. Rao, V. K. *et al.* Effective “activated PI3K δ syndrome”-targeted therapy with the PI3K δ inhibitor leniolisib. *Blood* **130**, 2307–2316 (2017).
124. Morande, P. E. *et al.* Ibrutinib therapy downregulates AID enzyme and proliferative fractions in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **133**, 2056–2068 (2019).
125. Miles, C., Sanchez, M. J., Sinclair, A. & Dzierzak, E. Expression of the Ly-6E.1 (Sca-1) transgene in adult hematopoietic stem cells and the developing mouse embryo.

- Development* **124**, 537–547 (1997).
126. Fisher, S. *et al.* A scalable, fully automated process for construction of sequence-ready human exome targeted capture libraries. *Genome Biol* **12**, R1 (2011).
 127. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **26**, 589–595 (2010).
 128. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760 (2009).
 129. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
 130. DePristo, M. A. *et al.* A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* **43**, 491–498 (2011).
 131. McLaren, W. *et al.* Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics* **26**, 2069–2070 (2010).
 132. Adzhubei, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* **7**, 248–249 (2010).
 133. Kumar, P., Henikoff, S. & Ng, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* **4**, 1073–1081 (2009).
 134. Cibulskis, K. *et al.* Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol* **31**, 213–219 (2013).
 135. Koboldt, D. C. *et al.* VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Research* **22**, 568–576 (2012).
 136. Smedley, D. *et al.* The BioMart community portal: an innovative alternative to large, centralized data repositories. *Nucleic Acids Res* **43**, W589–W598 (2015).
 137. Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Astrand, M. & Speed, T. P. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**, 185–193 (2003).
 138. Irizarry, R. A. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Research* **31**, 15e–115 (2003).
 139. Irizarry, R. A. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249–264 (2003).
 140. Tusher, V. G., Tibshirani, R. & Chu, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 5116–5121 (2001).
 141. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**, 289–300 (1995).
 142. Team RDC. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria ISBN 3-900051-07-0, URL <https://www.r-project.org/>. (2010).
 143. Gentleman, R. C. *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**, R80 (2004).
 144. Edgar, R. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research* **30**, 207–210 (2002).
 145. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 15545–15550 (2005).
 146. Chiaretti, S. Gene Expression Profiles of B-lineage Adult Acute Lymphocytic Leukemia Reveal Genetic Patterns that Identify Lineage Derivation and Distinct Mechanisms of Transformation. *Clinical Cancer Research* **11**, 7209–7219 (2005).

147. Kohlmann, A. *et al.* Pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) gene expression signatures classify an independent cohort of adult ALL patients. *Leukemia* **18**, 63–71 (2004).
148. Ran, F. A. *et al.* Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell* **154**, 1380–1389 (2013).
149. Hsu, P. D. *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* **31**, 827–832 (2013).
150. Cong, L. *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* **339**, 819–823 (2013).
151. WGS500 Consortium *et al.* Integrating mapping-, assembly- and haplotype-based approaches for calling variants in clinical sequencing applications. *Nat Genet* **46**, 912–918 (2014).
152. Blokzijl, F., Janssen, R., van Boxtel, R. & Cuppen, E. MutationalPatterns: comprehensive genome-wide analysis of mutational processes. *Genome Med* **10**, 33 (2018).