



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudi del perfil d'expressió de les histones deacetilasa (HDAC) en pacients pediàtrics amb leucèmia aguda

Nerea Vega García

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

# **Estudi del perfil d'expressió de les histones deacetilasa (HDAC) en pacients pediàtrics amb leucèmia aguda**

Nerea Vega García



**Estudi del perfil d'expressió de les histones deacetilasa (HDAC)  
en pacients pediàtrics amb leucèmia aguda**

Tesi presentada per

**Nerea Vega García**

Per aspirar al

**Doctorat de Medicina i Recerca Translacional**

Facultat de Medicina

Directora de Tesi

Dra. Mireia Camós Guijosa

Tutora de Tesi

Dra. Ofelia Cruz Martínez

Barcelona, juny de 2018



Als meus pares,  
a l'Àgueda i al Jose



## **AGRAÏMENTS**





Durant aquests anys de tesi, he sortit moltes vegades del l'hospital pensant en com d'afortunada sóc i a quanta gent! havia d'agrair que avui estigui aquí, al lab, escrivint aquestes línies. Probablement em donaria per una altra tesi, però intentaré ser breu, cosa que els que em coneixeu sabeu que no serà fàcil per mi.

En primer lloc voldria donar les gràcies a la meva directora de tesi, la Dra. Mireia Camós.

Mireia, aquesta tesi també és teva. Gràcies per la teva incommensurable ajuda, el teu compromís, constància i dedicació. Gràcies per ensenyar-me tant, per tots els consells, per transmetre'm les ganes de no deixar d'aprendre mai, per preocupar-te per mi, per ensenyar-me a ser millor jugant al penjat..., però sobretot, gràcies per tota la confiança que has dipositat sempre en mi. Moltes gràcies per tot!

Aquesta tesi tampoc hauria estat possible sense tot el suport dels meus companys i amics de l'Hospital Sant Joan de Déu, als que agraeixo enormement tot el que han fet per mi en aquest temps:

Als clínics, a qui admiro per la seva feina i dedicació. Gràcies per tenir-nos sempre presents en el vostre dia a dia, fer-nos visibles i així fer possible aquesta recerca.

Al Dr. Estella i la Dra. Toll, moltes gràcies per donar-me l'oportunitat de formar part d'aquest equip i família.

A la Susana Rives, un referent per mi. Moltes gràcies per tots els teus consells i aportacions, però sobretot per valorar sempre la meva feina.

A l'Albert Català, company de tesi, sens dubte participar de tan aprop en el teu treball m'ha permès aprendre moltíssim. Gràcies per comptar sempre amb mi i ajudar-me!

Al Rubén Berruero i l'Anna Ruiz, moltes gràcies per baixar a veure'ns sempre que podeu amb un somriure ben gran!

Gràcies a les companyes de transplantament: Dra. Isabel Badell, Dra. Júlia Marsal, Dra. Izascun Elorza.

Gràcies també a tots els màsters amb els que he coincidit durant aquesta etapa, pels vostres ànims i suport, en especial a la Montse Mesegué, Maria Trabazo, Anna Alonso, Maria Solsona, Georgina Moron, Nacho Isola i Ignacio Muñoz-Seca.

Als meus companys i amics de laboratori, per fer-me sentir una més des del primer dia. Venir a treballar feliç és el més important, i vosaltres ho feu possible.

A la Montse, per aquell treball de màster, en el que em vas transmetre la teva passió per la leucèmia i vas aconseguir contagiar-me! Gràcies per pensar en mi (aleshores i sempre), per la teva ajuda en aquesta tesi i pel somriure que ens regales cada dia. Ets fantàstica!

A la Susanna, per estar sempre atenta i pendent, per tots els teus consells i ànims durant aquesta tesi. Però sobretot, pel teu sentit de l'humor, que tants moments divertits provoca! Ets una crack!

Als veterans, Justo, Rosa, Seli, Camino i Emili, gràcies per ensenyar-me que el treball en equip és la millor fórmula de l'èxit. Sou un gran exemple!

A l' Emili i el Justo, gràcies per les boniques paraules que sempre m'heu dedicat.

A la Camino, la Rosa i l'Araceli, milions de gràcies per cuidar-me des del primer dia i fer-me sentir com a casa.

Rosa, moltes gràcies per la teva generositat, els teus savis consells i experiència. Tot i que sens dubte em quedo amb els atacs de riure que hem compartit juntes!

Seli, moltes gràcies per preocupar-te sempre per mi i tractar-me com una filla! Però sobretot gràcies per escoltar-me quan no callo mentre estic a la poiata! No hi ha cap dubte que és molt millor quan tu hi ets!

Camino, millones de gracias por tus manos y tu tiempo, sin ellas todo esto no habría sido tan fácil, de verdad! También gracias por los refranes, consejos y calma que transmites. Pero sobretodo, nunca dejes de tararear canciones de charanga (Na, nana, nanananana, NA! Nananananananana...), siempre estaré ahí para hacerte los coros!

A la Lidia, la Sandra, l'Elena i la Cèlia, companyes i amigues, infinites gràcies!!

A mesura que heu anat arribant, tot el que he après aquest temps, com m'han fet sentir els que hi era quan vaig arribar i tot el que he gaudit fent aquesta tesi, sento que ara em toca regalar-vos-ho a vosaltres. Espero aconseguir-ho! Però la veritat, és que el regal, sou vosaltres.

Lidia, gracias por estar siempre ahí. Por tu entusiasmo y tu ayuda, y sobretodo por tus abrazos! Eres muy buena, pequeña saltimbanqui!

Sandra, gràcies per ser com ets, per portar unicornis i sirenes al lab, i fer-nos riure com mai. No canviis!!

Elena, moltíssimes gràcies per convertir-me en pop i haver-me deixat les teves mans sempre que ho he necessitat. Gràcies per fer aquesta recta final tan fàcil i per omplir el despatx de tanta alegria! Sóc molt afortunada de tenir-te com a companya, i amiga!

Cèlia, moltes gràcies pels teus ànims, però sobretot per l'alegria que contagies sempre.

Gràcies, la vida al lab és molt millor desde que hi sou!

Moltes gràcies també a tots els companys de laboratori, en especial a la Cristina, el Carles i l'Amaresh. Gràcies pels vostres ànims, l'ajuda i les nostres xerrades de passadís!

A la Teresa Marquès, per acollir-me des del primer dia, per la teva paciència, pels teus consells i i ajuda i per fer del despatx un lloc molt acollidor i divertit!

Tampoc vull oblidar-me del laboratori de citogenètica, on vaig aterrar quan vaig arribar per primera vegada a l'hospital.

Moltes gràcies Mar i Isabel, per acollir-me a casa vostra. Durant un temps va aconseguir que els cariotips (en paper!) es convertissin en el meu *sudoku* particular!

A la Teresa, la Lluïsa i la Patri, moltes gràcies per aquells sis mesos, en els que vaig aprendre realment a estar en un lab. Però sobretot, per fer-los tan i tan divertits!

Moltes gràcies al Dr. Jaume Mora i a tots els companys que formen part del Grup de Recerca del Càncer del Desenvolupament, que m'han ajudat amb els seus consells i aportacions durant aquest camí.

A la Sara Pérez, per tot el temps que t'he robat amb aquesta tesi. Moltes gràcies per acostar-me al món de la bioestadística, i fer-ho tan fàcil!

A la Nagore, per tenir sempre un somriure per mi i ser tan genial com ets!

Gràcies a la Dra. Ofelia Cruz, per acceptar la tutoria d'aquesta tesi i els seus ànims!

A tots els companys que he conegut en diferents congressos i reunions, i que, d'una manera o altra, heu posat el vostre granet de sorra en aquest treball. Moltes gràcies pels vostres consells i empenta!

A les associacions, famílies i pacients, perquè sense ells aquesta recerca no hauria estat possible.

A la meva família i amics:

Als meus amics, que tanta estona els ha robat aquesta tesi i que, dia a dia, em demostren com d'especial sóc per ells. Tinc molta sort de tenir-vos!

A la meva família, per estar sempre pendents i donar-me tot el seu suport. Estic molt orgullosa de la família que tinc. Sou genials i imprescindibles per mi!

Als meus pares, perquè sense ells no hauria arribat fins aquí. Moltes gràcies per confiar en mi i estar sempre al meu costat, incondicionalment. Mama, papa, sou l'equip de la meua vida. Gràcies per ensenyar-me les coses més importants. Tos estimo molt.

A la meva germana, la revolució de la meua vida. És molt guai tenir una germana, però si és com tu, és lo millor del món! Esta tesis tamé t'ha robat molt temps a tu, pero sempre estarem juntes!, quan comencem a recuperar-lo? T'estimo moltíssim.

I a tu, Jose. Aunque parezca imposible, es aquí cuando emmudezco. Por suerte, tengo una vida entera para decirte y demostrarte todo lo que no cabria en esta tesis. Gracias por hacerlo fácil, pero sobretodo, por hacerme TAN feliz!

## **INDEX**



## INDEX

ABREVIATURES .....	17
GLOSSARI DE GENS.....	21
RESUM DE LA TESI .....	29
INTRODUCCIÓ .....	33
1. HEMATOPOESI.....	35
2. LEUCÈMIA AGUDA PEDIÀTRICA.....	37
2.1. Concepte/Definició.....	37
2.2. Epidemiologia/Incidència .....	37
2.3. Etiologia.....	38
2.4. Mecanismes de leucemogènesi .....	39
2.5. Diagnòstic .....	44
2.6. Classificació .....	48
2.7. Subtipus citogenètics i moleculars .....	51
2.8. Pronòstic.....	69
2.9. Supervivència .....	74
2.10. Tractament .....	76
3. HISTONES DEACETILASES .....	86
3.1. Epigenètica .....	86
3.2. Histones deacetilasa (HDAC).....	88
3.3. HDACs en l'hematopoesi.....	97
3.4. HDACs en càncer .....	99
3.5. HDACs en leucèmia .....	100
HIPÒTESI.....	111
OBJECTIUS .....	115
MATERIAL I MÈTODES.....	119
1. MATERIAL .....	121
2. MÈTODES.....	123
RESULTATS .....	129
DISCUSSIÓ .....	153
CONCLUSIONS .....	167



REFERÈNCIES .....	171
ANNEX I .....	187
ANNEX II .....	195

## **ABREVIATURES**



**ABREVIATURES****ADN:** àcid desoxiribonucleic**ADP:** adenosina difosfat**Ara-C:** citarabina**ARN:** àcid ribonucleic**ALAL:** *ambiguous lineage acute leukemia***CAR:** *chimeric antigen receptor***CART:** *chimeric antigen receptor T-cell***CNA:** *copy number alteration***COG:** *Children's Oncology Group***CTCL:** *cutaneous T cell lymphoma*; limfoma cutani de cèl·lula T**EICH:** enfermedad de injerto contra huésped; malaltia de l'empelt contra l'hoste**EGIL:** *European Group of Immunological classification of Leukemias***FDA:** *Food Drug Administration***FISH:** *fluorescence in situ hybridization***GRAAL:** *Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia***HAT:** histona acetiltransferasa**HDAC:** histona deacetilasa**HDACi:** inhibidor d'histona deacetilasa**HSC:** *hematopoietic stem cells***I-BFM SG:** *International Berlin-Frankfurt-Münster Study Group***IG/TR:** Immunoglobulina/ Receptor de cèl·lules T**KO:** *knockout***LAIP:** *leukemia-associated aberrant immunophenotype***LCR:** líquid cefaloraquidi**LLA:** leucèmia limfoblàstica aguda**LMA:** leucèmia mieloide aguda**LPA:** leucèmia promielocítica aguda**LSC:** *leukemic stem cells***LT-HSC:** *long-term hematopoietic stem cells***MAPK:** *Mitogen-Activated Protein Kinases***MLPA:** *multiplex ligation-dependent probe amplification***MM:** mieloma múltiple**MPAL:** *mixed phenotype acute leukemia***MPP:** *multipotent progenitors***MRM:** malaltia residual mínima/measurable**NOPHO:** *Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology***US NCI:** *United States National Cancer Institute***NGS:** *next generation sequencing*

**NOS:** *not otherwise specified*

**OMS:** Organització Mundial de la Salut

**PETHEMA:** Programa Español de Tratamientos en Hematología

**Ph:** cromosoma Philadelphia

**RC:** remissió completa

**PTCL:** *peripheral T-cell Lymphoma*, limfoma de cèl·lules T perifèric

**ROS:** *reactive oxygen species*; espècies reactives a l'oxigen

**RT-PCR:** reacció en cadena de la polimerasa amb retrotranscripció o transcripció inversa

**SAHA:** àcid suberoilànidid hidroxàmic; vorinostat

**SEHOP:** Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica

**SNC:** sistema nerviós central

**SNP:** *single nucleotide polymorphism*

**TKI:** *tyrosin-kinase inhibitor*; inhibidor tirosina-cinasa

**TPH:** transplantament de progenitors hematopoètics

**TRM:** *treatment related mortality*; mortalitat relacionada amb el tractament

**TSA:** tricostatin A

**WHO:** *World Health Organization*

## **GLOSSARI DE GENS**



## GLOSSARI DE GENS

Gen	Nom <sup>a</sup>	Localització genoma	Altres símbols
<b>ABL1</b>	<i>v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>	9q34.1	<i>ABL, JTK7, C-ABL, p150, v-abl</i>
<b>ABL2</b>	<i>ABL proto-oncogene 2</i>	1q25.2	<i>ARG</i>
<b>AFF4</b>	<i>AF4/FMR2 family member 4</i>	5q31.1	<i>AF5Q31, MCEF</i>
<b>AFF9</b>	<i>MLLT3, super elongation complex subunit</i>	9p21.3	<i>AF-9, AF9, YEATS3</i>
<b>AKT1</b>	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>	14q32.32-q32.33	<i>AKT</i>
<b>ARID1B</b>	<i>AT-rich interaction domain 1B</i>	6q25.3	<i>6A3-5, BAF250b, DAN15, ELD/OSA1, KIAA1235, p250R</i>
<b>ARID5B</b>	<i>AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)</i>	10q11.22	<i>FLJ21150, MRF2</i>
<b>BCL11B</b>	<i>B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger)</i>	14q32	<i>CTIP-2, CTIP2, hRIT1-alpha</i>
<b>BCL2</b>	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	18q21.3	<i>Bcl-2, PPP1R50</i>
<b>BCL9</b>	<i>B-cell CLL/lymphoma 9</i>	1q21	-
<b>BCR</b>	<i>Breakpoint cluster region</i>	22q11	<i>ALL, CML, D22S662, PHL</i>
<b>BMI1</b>	<i>BMI1 polycomb ring finger oncogene</i>	10p13	<i>RNF51</i>
<b>BLK</b>	<i>BLK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase</i>	8p23.1	<i>MGC10442</i>
<b>BRCA1</b>	<i>BRCA1, DNA repair associated</i>	17q21.31	<i>BRCC1, FANCS, PPP1R53, RNF53</i>
<b>BRD4</b>	<i>bromodomain containing 4</i>	19p13.12	<i>CAP, HUNK1, HUNKI, MCAP</i>
<b>BTG1</b>	<i>BTG anti-proliferation factor 1</i>	12q21.33	<i>APRO2</i>
<b>BTK</b>	<i>Bruton tyrosine kinase</i>	Xq22.1	<i>ATK, PSCTK1, XLA</i>
<b>CBS</b>	<i>cystathionine-beta-synthase</i>	21q22.3	<i>HIP4</i>
<b>CBFA2T3</b>	<i>CBFA2/RUNX1 translocation partner 3</i>	16q24.3	<i>ETO2, MTG16, MTGR2, RUNX1T3, ZMYND4</i>
<b>CBFB</b>	<i>core-binding factor subunit beta</i>	16q22.1	<i>PEBP2B</i>
<b>CBL</b>	<i>Cbl proto-oncogene</i>	11q23.3	<i>c-Cbl, "oncogene CBL2", RNF55</i>
<b>CDKN1B</b>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>	12p13.1-p12	<i>KIP1, P27KIP1</i>
<b>CDKN2A</b>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>	9p21	<i>CDK4 inhibitor p16<sup>INK4</sup>, ARF, p14<sup>ARF</sup></i>
<b>CDKN2B</b>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)</i>	9p21	<i>CDK4 inhibitor p15<sup>INK4b</sup>, p15<sup>INK4</sup></i>



Gen	Nom <sup>a</sup>	Localització genoma	Altres símbols
<b>CEBPA</b>	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha</i>	19q13.1	<i>C/EBP-alpha</i>
<b>CREBBP</b>	<i>CREB binding protein</i>	16p13.3	<i>CBP, KAT3A, RTS</i>
<b>CSF1R</b>	<i>colony stimulating factor 1 receptor</i>	5q32	<i>C-FMS, CD115, CSFR</i>
<b>CRLF2</b>	<i>cytokine receptor-like factor 2</i>	Xp22.3 Yp11.3	<i>CRL2, TSLPR</i>
<b>C-KIT</b>	<i>KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase</i>	4q12	<i>SCFR, C-Kit, CD117</i>
<b>DEK</b>	<i>DEK proto-oncogene</i>	6p22.3	<i>D6S231E</i>
<b>DOT1L</b>	<i>DOT1 like histone lysine methyltransferase</i>	19p13.3	<i>DOT1, KIAA1814, KMT4</i>
<b>DUX4</b>	<i>double homeobox 4</i>	4q35.2	-
<b>EB-1</b>	<i>microtubule associated protein RP/EB family member 1</i>	20q11.21	<i>MAPRE1</i>
<b>EBF1</b>	<i>connective tissue growth factor</i>	5q34	<i>EBF</i>
<b>EED</b>	<i>embryonic ectoderm development</i>	11q14.2-q22.3	-
<b>ENL</b>	<i>MLLT1, super elongation complex subunit</i>	19p13.3	<i>MLLT1, LTG19, YEATS1</i>
<b>EPOR</b>	<i>Erythropoietin receptor</i>	19p13.2	-
<b>ERG</b>	<i>v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (avian)</i>	21q22.3	-
<b>ERK1</b>	<i>mitogen-activated protein kinase 3</i>	16p11.2	<i>MAPK3, p44erk1, p44mapk</i>
<b>ERK2</b>	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>	22q11.22	<i>MAPK, MAPK2, p41mapk</i>
<b>ETV6</b>	<i>ets variant 6</i>	12p13	<i>TEL</i>
<b>EVI1</b>	<i>ecotropic viral integration site 1</i>	3q26.2	<i>MECOM, KMT8E, MDS1-EVI1, "PR domain 3", PRDM3</i>
<b>EWSR1</b>	<i>Ewing sarcoma breakpoint region 1</i>	22q12.2	<i>EWS</i>
<b>EZH2</b>	<i>enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)</i>	7q35-q36	<i>ENX-1, EZH1, KMT6, KMT6A</i>
<b>FAS</b>	<i>Fas cell surface death receptor</i>	10q23.31	<i>APO-1, CD95</i>
<b>FASL</b>	<i>Fas ligand</i>	1q24.3	<i>FASLG, CD178 FasL</i>
<b>FBXW7</b>	<i>F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase</i>	4q31.23	<i>AGO, CDC4, FBW7, FBX30, FBXW6, FLJ11071, SEL-10 SEL10</i>
<b>FLT3</b>	<i>fms-related tyrosine kinase 3</i>	13q12	<i>CD135, FLK2, STK1</i>
<b>GATA1</b>	<i>GATA binding protein 1</i>	Xp11.23	<i>ERYF1, GATA-1, NFE1, NFE1</i>
<b>GATA2</b>	<i>GATA binding protein 2</i>	3q21.3	<i>NFE1B</i>

Gen	Nom <sup>a</sup>	Localització genoma	Altres símbols
<b>GDH</b>	<i>glucose dehydrogenase</i>	1p36.22	<i>H6PD</i>
<b>GLIS2</b>	<i>GLIS family zinc finger 2</i>	16p13.3	<i>NPHP7</i>
<b>GSK3A</b>	<i>glycogen synthase kinase 3 alpha</i>	19q13.2	-
<b>HLF</b>	<i>hepatic leukemia factor</i>	17q22	<i>MGC33822</i>
<b>HLXB9</b>	<i>homeo box HB9</i>	7q36.3	<i>MXN1, HB9, HOXHB9, SCRA1</i>
<b>ID4</b>	<i>inhibitor of DNA binding 4, HLH protein</i>	6p22.3	<i>bHLHb27</i>
<b>IGH</b>	<i>immunoglobulin heavy locus</i>	14q32.33	-
<b>IKZF1</b>	<i>IKAROS family zinc finger 1 (Ikaros)</i>	7p12.2	<i>hIk-1, Hs.54452, IKAROS, LyF-1, PPP1R92</i>
<b>HIF1A</b>	<i>hypoxia inducible factor 1 subunit alpha</i>	14q23.2	<i>bHLHe78, HIF-1alpha, HIF1, MOP1, PASD8</i>
<b>HOXA11</b>	<i>homeobox A11</i>	7p15.2	<i>HOX1, HOX1I</i>
<b>HOX11L2</b>	<i>homeo box 11-like 2</i>	5q35.1	<i>TLX3, RNX</i>
<b>IL3</b>	<i>interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)</i>	5q23-q31	<i>IL-3, MCGF, MGC79398, MGC79399, MULTI-CSF,</i>
<b>IL7R</b>	<i>interleukin 7 receptor</i>	5p13	<i>CD127</i>
<b>JAK1</b>	<i>Janus kinase 1</i>	1p32.3-p31.3	<i>JAK1A, JTK3</i>
<b>JAK2</b>	<i>Janus kinase 2</i>	9p24	<i>JTK10</i>
<b>JAK3</b>	<i>Janus kinase 3</i>	19p13-p12	<i>JAK-3, JAK3_HUMAN, JAKL, L-JAK</i>
<b>JARID1A</b>	<i>jumonji, AT rich interactive domain 1A</i>	12p13.33	<i>KDM5A</i>
<b>LEF1</b>	<i>lymphoid enhancer-binding factor 1</i>	4q23-q25	<i>TCF10, TCF1ALPHA, TCF7L3</i>
<b>LMO1</b>	<i>LIM domain only 1 (rhombotin 1)</i>	11p15	<i>RHOM1, TTG1</i>
<b>LMO2</b>	<i>LIM domain only 1 (rhombotin like-2)</i>	11p13	<i>RBTN2, RHOM2</i>
<b>LMO3</b>	<i>LIM domain only 1 (rhombotin like-1)</i>	12p13	<i>DAT1, Rhom-3</i>
<b>LYL1</b>	<i>lymphoblastic leukemia derived sequence 1</i>	19p13.2	<i>bHLHa18</i>
<b>MEF2C</b>	<i>myocyte enhancer factor 2C</i>	5q14.3	-
<b>MEF2D</b>	<i>myocyte enhancer factor 2D</i>	1q22	-
<b>MERTK</b>	<i>MER proto-oncogene, tyrosine kinase</i>	2q13	<i>c-Eyk, mer, RP38,</i>
<b>MKL1</b>	<i>megakaryoblastic leukemia (translocation) 1</i>	22q13.1-q13.2	<i>BSAC, KIAA1438, MAL, MKL, MRTF-A</i>
<b>MLL</b>	<i>myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)</i>	11q23	<i>KMT2A, ALL-1, TRX1, HTRX1, CXX7, MLL1A,</i>
<b>MLLT1</b>	<i>myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 1</i>	19p13.3	<i>ENL, LTG19, YEATS1</i>

Gen	Nom <sup>a</sup>	Localització genoma	Altres símbols
<b>MLLT3</b>	<i>myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3</i>	9p21	AF9, YEAST3
<b>MLLT4</b>	<i>myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 4</i>	6q27	AFF1, AF4, PBM1
<b>MLLT10</b>	<i>myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 10</i>	10p12	AFF10
<b>MX1</b>	<i>MX dynamin like GTPase 1</i>	21q22.3	IFI-78K, MxA
<b>MYC</b>	<i>v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)</i>	8q24	C-MYC
<b>MYH11</b>	<i>myosin heavy chain 11</i>	16p13.11	SMHC, SMMHC
<b>NF1</b>	<i>neurofibromin 1</i>	17q11.2	
<b>NF-kB</b>	<i>nuclear factor kappa B</i>	4q24-10q24.32	KBF1, p105, NFKB-p50, p50, NF-kappaB, NFKappaB, NF-kB1
<b>NKX2.1</b>	<i>NK2 homeobox 1</i>	14q13.3	NKX2-1-AS1
<b>NKX2.2</b>	<i>NK2 homeobox 2</i>	20p11.22	NKX2-2-AS1
<b>NOTCH1</b>	<i>NOTCH1</i>	9q34.3	TAN1, hN1
<b>NPM1</b>	<i>nucleophosmin 1</i>	5q35.1	B23, NPM
<b>NRAS</b>	<i>neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>	1p13.2	N-ras, ALPS4
<b>NSD1</b>	<i>nuclear receptor binding SET domain protein 1</i>	5q35.3	ARA267, FLJ22263, KMT3B
<b>NT5C2</b>	<i>5'-nucleotidase, cytosolic II</i>	10q24.32-q24.33	cN-II, GMP, PNT5, SPG65
<b>NUP98</b>	<i>nucleoporin 98</i>	11p15.4	NUP96
<b>NUP214</b>	<i>nucleoporin 214kDa</i>	9q34	CAIN, CAN, D9S46E, N214
<b>P2RY8</b>	<i>purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8</i>	Xp22.33 Yp11.3	Xp22.33/Yp11.3
<b>PAX5</b>	<i>paired box 5</i>	9p13.2	BSAP
<b>PBX1</b>	<i>pre-B-cell leukemia homeobox 1</i>	1q23.3	-
<b>PDGFRA</b>	<i>platelet derived growth factor receptor alpha</i>	4q12	CD140a, GAS9, PDGFR2
<b>PDGFRB</b>	<i>platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide</i>	5q33.1	PDGFR1
<b>PHF6</b>	<i>PHD finger protein 6</i>	Xq26.3	CENP-31, KIAA1823, MGC14797

Gen	Nom <sup>a</sup>	Localització genoma	Altres símbols
<b>PIK3CA</b>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha	3q26.3	PI3K
<b>PICALM</b>	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	11q14	CALM
<b>PIP4K2A</b>	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, alpha	10p12.2	PIPK
<b>PML</b>	promyelocytic leukemia	15q24.1	MYL, RNF71, TRIM19
<b>PRMT1</b>	protein arginine methyltransferase 1	19q13.33	ANM1, HCP1
<b>PRKCZ</b>	protein kinase C zeta	1p36.33	PKC2
<b>PTEN</b>	phosphatase and tensin homolog	10q23	MMAC1
<b>PTPN11</b>	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	12q24.13	BPTP3, PTP2C, SH-PTP2, SHP-2, SHP2
<b>RAD51</b>	RAD51 recombinase	15q15.1	BRCC5, FANCR, HsRad51, HsT16930
<b>RAG1</b>	recombination activating 1	11p12	MGC43321, RNF74
<b>RAG2</b>	recombination activating 2	11p13	-
<b>RARα</b>	retinoic acid receptor alpha	17q21.2	RARA
<b>RBM15</b>	RNA binding motif protein 15	1p13.3	OTT, OTT1
<b>RB1</b>	retinoblastoma 1	13q14.2	PPP1R130, RB
<b>RPN1</b>	ribophorin I	3q21.3	OST1
<b>RUNX1</b>	runt-related transcription factor 1	21q22.3	AML1, CBFA2
<b>RUNX2</b>	runt related transcription factor 2	6p21.1	AML3, PEBP2A1, PEBP2aA1
<b>RUNX1T1</b>	RUNX1 translocation partner 1	8q21.3	CDR, ETO, MTG8, ZMYND2
<b>SET</b>	SET nuclear oncogene	9q34	-
<b>STAT3</b>	signal transducer and activator of transcription 3	17q21.2	APRF
<b>STIL</b>	SCL/TAL1 interrupting locus	1p32	MCPH7
<b>SUZ12</b>	SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit	17q21	CHET9, JAZ1, KIAA0160
<b>TAL1</b>	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	1p32	SCL, TCL5, bHLHa17
<b>TAF15</b>	TATA-box binding protein assoc factor 15	17q12	hTAFII68, Npl3, RBP56
<b>TCF3</b>	transcription factor 3	19p13.3	E2A
<b>TCRA</b>	T cell receptor alpha locus	14q11.2	-
<b>TCRB</b>	T cell receptor beta locus	7q34	-
<b>TCRD</b>	T cell receptor delta locus	14q11.2	-
<b>TCRG</b>	T cell receptor gamma locus	7p14	-

<b>Gen</b>	<b>Nom<sup>a</sup></b>	<b>Localització genoma</b>	<b>Altres símbols</b>
<b>TLX3</b>	<i>T-cell leukemia homeobox 3</i>	5q35.1	<i>HOX11L2</i>
<b>TP53</b>	<i>tumor protein p53</i>	17p13.1	<i>P53</i>
<b>TRAIL</b>	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>	3q26	<i>TNFSF10, Apo-2L, CD253, TL2</i>
<b>VPREB1</b>	<i>V-set pre-B cell surrogate light chain 1</i>	22q11.22	<i>CD179A, VpreB</i>
<b>WT1</b>	<i>Wilms tumor 1</i>	11p13	<i>AWT1, NPHS4, WAGR, WIT-2</i>
<b>WNT16</b>	<i>Wnt family member 16</i>	7q31.31	-

<sup>a</sup> Segons nomenclatura HUGO (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>).

## **RESUM DE LA TESI**



## **Estudi del perfil d'expressió de les histones deacetilasa (HDAC) en pacients pediàtrics amb leucèmia aguda**

**Antecedents:** els inhibidors d'histona deacetilasa (HDACi) han emergit els últims anys com potencials tractaments dirigits, amb la finalitat de revertir els canvis epigenètics associats a diferents tipus de càncer, incloent les neoplàsies hematològiques. La falta d'especificitat dels HDACi, però, dificulta la predicció dels seus efectes biològics i provoca una toxicitat no menyspreable, el que ha limitat el seu ús en la pràctica clínica. L'expressió de les *HDACs* no ha estat estudiada en les leucèmies agudes pediàtriques més que de manera parcial i en sèries amb un limitat número de pacients; per tant, són necessaris estudis que ajudin a aclarir el paper de cadascuna de les *HDACs* com a possibles biomarcadors i com a dianes terapèutiques, de cara a dirigir el tractament específic i personalitzat amb HDACi.

**Hipòtesi:** en aquest context, l'estudi global del perfil transcripcional de les *HDACs* en una sèrie àmplia i representativa de pacients pediàtrics amb diferents subtipus de leucèmia aguda permetria definir millor el seu impacte pronòstic i definir el seu rol com a dianes terapèutiques, ajudant a dirigir el tractament específic amb HDACi de forma més racional i individualitzada.

**Objectius:** estudiar de forma global el perfil d'expressió de les *HDAC1-11*, *SIRT1*, *SIRT7* i d'altres gens co-reguladors, *MEF2C* i *MEF2D*, en una sèrie de pacients pediàtrics amb leucèmia aguda diagnosticats i tractats en un sol centre.

**Metodologia:** anàlisi de l'expressió de l'mRNA de les *HDAC1-11*, *SIRT1*, *SIRT7*, *MEF2C* i *MEF2D* mitjançant PCR quantitativa en 211 pacients pediàtrics (0-18 anys), diagnosticats de leucèmia *de novo* des de l'any 2003 al 2017 en el nostre centre. Els pacients es van tractar uniformement d'acord als protocols consecutius de la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica (SEHOP). Es va emprar un *pool* de pacients no-neoplàsics com a calibrador i també es va analitzar l'expressió dels diferents gens en cèl·lules CD34+ normals de moll d'os i a cèl·lules B CD19+ madures i limfòcits T madurs de sang perifèrica.



**Resultats:** l'expressió de les *HDACs* va diferir en els diferents subtipus de cèl·lules hematopoètiques normals d'acord amb el grau de maduració i el llinatge. En els pacients amb leucèmia es va observar, en general, una sobreexpressió de les *HDACs*, amb perfils específics que correlacionaven amb característiques clíniques i biològiques i, fins i tot en algunes ocasions, amb la supervivència dels pacients. Així, alguns perfils d'expressió d'*HDAC* i el perfil de *MEF2C* semblaven reflectir, probablement, el llinatge i la maduresa dels blasts, mentre que d'altres identificaven la via oncogènica activa en les cèl·lules leucèmiques. Concretament, es va identificar un perfil d'expressió distintiu pels pacients amb reordenament del gen *KMT2A* (*MLL*), amb nivells elevats d'*HDAC9* i *MEF2D*, independentment de l'edat, el *partner* del gen de fusió i el llinatge. A més, es va observar en els pacients amb LLA-B un pronòstic advers de la sobreexpressió de l'*HDAC9*, independentment de l'estat del gen *KMT2A*.

**Conclusions:** en aquest treball s'han observat diferents perfils d'expressió segons els diferents subtipus de leucèmia aguda pediàtrica. Concretament, s'ha identificat un perfil distintiu dels pacients amb reordenament del gen *KMT2A*, amb la sobreexpressió de l' *HDAC9* i *MEF2D*, independentment del llinatge, de l'edat i del *partner* del gen de fusió.

Aquests resultats aporten una imatge global de l'expressió de les *HDACs* en els pacients pediàtrics amb leucèmia aguda i recolzen el tractament dirigit amb HDACi més específics en seleccionats grups de pacients d'alt risc, com els pacients amb reordenament del gen *KMT2A*.

# **INTRODUCCIÓ**



## HEMATOPOESI

L'hematopoesi és un procés complex a partir del qual un reservori de progenitors hematopoètics (*hematopoietic stem cells, HSCs*) madura per donar lloc a les diferents cèl·lules madures de la sang (Figura 1).

L'hematopoesi s'inicia durant el desenvolupament embrionari i té lloc en diferents òrgans i/o teixits al llarg dels primers mesos de vida embrionària. Concretament, comença a produir-se en el sac vitel·lí (hematopoesi primitiva) i es desplaça al fetge i la melsa durant el segon trimestre. Posteriorment, s'instaura principalment en el moll de l'os, que constituirà l'òrgan responsable de l'hematopoesi durant la vida adulta de l'individu (hematopoesi definitiva). En l'etapa infantil, predomina en el moll de l'os dels ossos llargs, mentre que en l'adult passarà a produir-se principalment en els ossos plans, com el crani, la pelvis o l'estèrnum.

La vida mitjana de les cèl·lules que conformen el sistema hematopoètic és molt variable, oscil·lant entre els 120 dies de vida que pot tenir un hematíe fins a les 8 hores de vida d'un granulòcit. Per tant, per a un funcionament normal, és imprescindible que el sistema hematopoètic segueixi un procés continu d'auto-renovació, proliferació i diferenciació<sup>1</sup>.

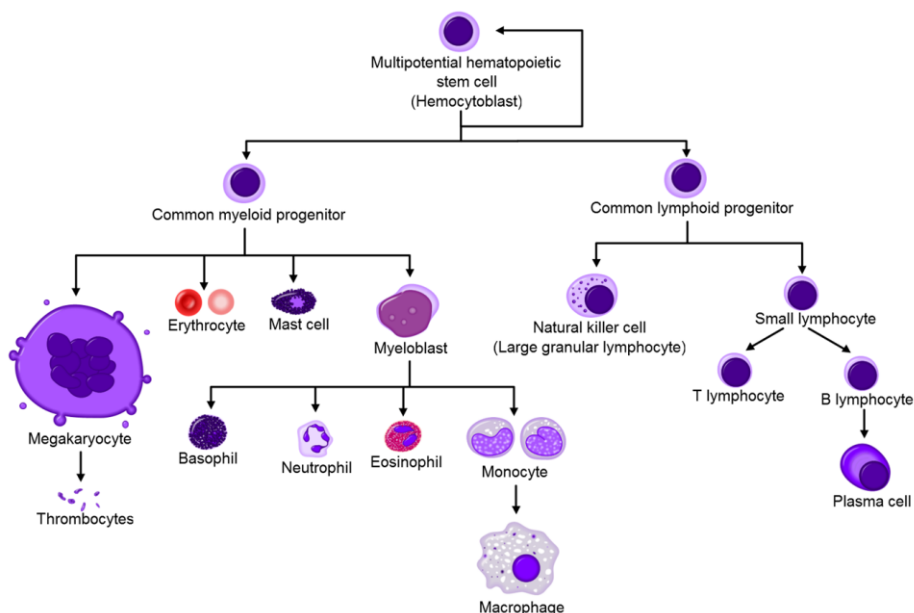
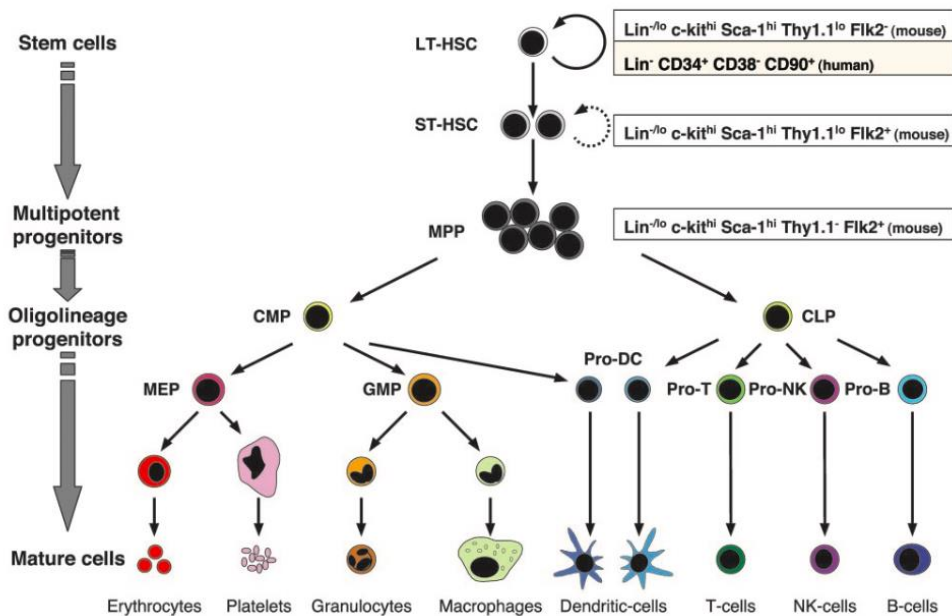


Figura 1 | Hematopoesi fisiològica. Adaptat de<sup>2</sup>.

La capacitat d'auto-renovació (*self-renewal*) és inherent als progenitors hematopoètics més immadurs i es va perdent a mesura que la cèl·lula madura i es diferencia. Així, a partir d'una cèl·lula mare hematopoètica pluripotent (*long term progenitor HSCs*, LT-HSC) s'origina una cèl·lula filla més madura (*multipotent progenitor*, MPP) i una cèl·lula idèntica, que manté la potencialitat i característiques d'*stem cell* de la cèl·lula mare tot esdevenint un altre progenitor hematopoètic (Figura 2). Aquest procés permet mantenir el reservori de progenitors hematopoètics al llarg de tota la vida. A partir d'aquí s'inicia un procés jeràrquic a partir del qual els diferents progenitors hematopoètics van madurant i donant lloc als diferents llinatges cel·lulars<sup>3</sup>.



**Figura 2| Progenitors i llinatges hematopoètics.** L'hematopoesi constitueix un procés jeràrquic de maduració a partir del qual els diferents progenitors hematopoètics es diferencien i van donant lloc als diferents llinatges cel·lulars<sup>3</sup>.

Entre les vies de senyalització que regulen l'hematopoesi es troben la via de *NOTCH*, *WNT/beta-catenina*, *Hedgehog*, *HOX*, *FLT3*, i els reguladors de la família *MEF2*, entre d'altres. Aquestes vies regulen la transcripció de gens relacionats amb proliferació, diferenciació, capacitat d'auto-renovació i supervivència de les HSC, i es troben interrelacionades entre elles. Així, no es d'estranyar que s'hagin relacionat amb el procés de leucemogènesi i que diversos subtipus de leucèmia presentin perfils d'expressió que reflecteixen alteracions en aquestes vies<sup>4-6</sup>.

## 1. LEUCÈMIA AGUDA PEDIÀTRICA

### 2.1. Concepte/Definició

La leucèmia aguda és una neoplàsia hematològica clonal que es caracteritza per un bloqueig prematur en la maduració d'un precursor hematopoètic. Aquest bloqueig de la diferenciació s'acompanya d'una proliferació aberrant d'aquesta cèl·lula tumoral (blast), donant lloc a la seva expansió clonal. Els blasts s'acumulen en la medul·la òssia, sang perifèrica i altres òrgans amb capacitat hematopoètica (fetge, melsa o ganglis limfàtics) i desplacen l'hematopoesi sana. Tot aquest procés condueix a una insuficiència medul·lar i a la disminució de les cèl·lules hematopoètiques normals, produint citopènies, que sovint són la manifestació clínica de presentació de les leucèmies agudes.

Depenent del progenitor transformat i del compromís d'aquesta cèl·lula cap a un llinatge determinat, podem distingir entre leucèmia limfoblàstica aguda (LLA) o leucèmia mieloide aguda (LMA) si el precursor hematopoètic estava compromès cap a la línia limfoide o mieloide, respectivament. Tot i que amb molta menys freqüència (2-5% dels casos), s'han descrit una sèrie de leucèmies agudes que presenten un llinatge ambigu (*ambiguous lineage acute leukemia*, ALAL), que inclouen: (1) leucèmies bifenotípiques, que comparteixen característiques de línia limfoide i mieloide en els mateixos blasts (*mixed phenotype acute leukemia*, MPAL); (2) bilineals, on coexisteixen dos clons separats de diferents llinatges; (3) indiferenciades, en les que els blasts no compleixen criteris concloents per cap de les línies limfoide o mieloide i (4) *early switch leukemia*, leucèmies en les que es produeix un canvi de llinatge durant les fases inicials del tractament<sup>7</sup>.

### 2.2. Epidemiologia/Incidència

Les leucèmies agudes són la forma més comú de càncer pediàtric. Representen un terç de les neoplàsies en nens i la primera causa de mortalitat pediàtrica relacionada amb càncer. La incidència anual en l'edat pediàtrica de la LLA i la LMA és de 39,9 i 8,1 casos

per milió d'habitants, respectivament<sup>8</sup>. A diferència del que succeeix en la població adulta, en nens la LLA és molt més freqüent que la LMA. A més, en les LLA existeix un pic d'incidència entre el 2-5 anys, mentre que la LMA és més freqüent per sota dels dos anys i després es manté estable en l'edat pediàtrica i augmenta progressivament amb l'edat. En general, predomina en el sexe masculí i presenta una distribució desigual entre les diferents ètnies<sup>9</sup>. Globalment, observem una tendència lleugerament a l'alça en la incidència de la leucèmia pediàtrica, però afortunadament la taxa de mortalitat presenta una tendència inversa.

### **2.3. Etiologia**

Donada la gran diversitat biològica que presenten les leucèmies pediàtriques, és molt improbable que tots els casos tinguin una única etiologia. Resulta més plausible que el desenvolupament de la malaltia sigui conseqüència d'una combinació de factors genètics (predisposició genètica i susceptibilitat genètica) i factors ambientals.

Pel que fa als **factors genètics** trobem la predisposició genètica heretada, que relaciona l'increment de risc que té un individu de desenvolupar la malaltia amb l'existència de variant genètiques germinals. Diferents estudis han permès la identificació de variables genètiques o polimorfismes (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) en gens implicats en la patogènia de la leucèmia aguda, que augmentarien la probabilitat de desenvolupar la malaltia, com per exemple en *CDKN2A*, *IKZF1*, *ETV6*, *GATA3*, *ARID5B*, *RUNX1* o *CEBPA*. Només una petita part dels casos de leucèmia s'associa directament a síndromes hereditaris, com el Síndrome de Down, el Síndrome de Li Fraumeni i el síndrome de Nijmegen, entre d'altres<sup>10</sup>. Per contra, la predisposició genètica adquirida estableix una relació directa entre el desenvolupament de la malaltia i l'aparició espontània d'alteracions oncogèniques (*drivers*) en el genoma de l'individu<sup>11</sup>. Aquestes alteracions poden donar lloc per si mateixes a la malaltia o necessitar d'un segon esdeveniment per desenvolupar-la.

D'altra banda, s'han proposat molts **factors ambientals** com a possibles desencadenants de la leucèmia; no obstant això, només s'ha pogut demostrar la relació directa amb l'exposició a radiacions ionitzants<sup>12</sup>. En relació a aquest punt

d'exposició a agents genotòxics és important destacar les leucèmies secundàries al tractament amb quimioteràpics<sup>13</sup>. L'ordre de naixement, la lactància perllongada, el sobrepès en el naixement, el consum de drogues i la dieta són alguns dels factors ambientals proposats. Finalment, les infeccions, sobretot en la LLA, s'han associat com a possibles causants del desenvolupament de la malaltia. Concretament, s'han proposat dues hipòtesis al respecte: (1) La hipòtesi de la "mescla de poblacions de Leo Kinlen" i (2) la hipòtesi de l'exposició tardana de Mel Greaves<sup>14</sup>. La hipòtesi de Kinlen argumenta que el flux de poblacions portadores de virus cap a les regions amb poblacions pediàtriques poc exposades a aquestes infeccions desencadenaria una resposta aberrant del sistema immunitari i l'aparició de la malaltia<sup>15</sup>. En la segona, Mel Greaves proposa que el desenvolupament de LLA és degut, com a mínim, a la presència de dues mutacions independents. La primera (*first hit*) tindria lloc *in utero* o en una etapa molt precoç post-natal. Posteriorment, aquells nens que han crescut en ambients molt asèptics, davant d'una exposició tardana a una infecció desencadenarien una excessiva proliferació limfocitària que facilitaria l'aparició de la segona mutació (*second hit*)<sup>16</sup>. Tot i les diferències, ambdues teories coincideixen en que la leucèmia ocorre com a conseqüència d'una resposta immune anormal a infeccions comunes<sup>17</sup>.

#### **2.4. Mecanismes de leucemogènesi**

Tot i que el nostre coneixement sobre l'etiologia de la leucèmia és encara limitat, el coneixement sobre la cèl·lula leucèmica i els mecanismes de leucemogènesi ha avançat molt en les últimes dècades<sup>18</sup>. En general, en el procés de **leucemogènesi**, l'acumulació de múltiples anormalitats genètiques i epigenètiques en un progenitor hematopoètic normal amb capacitat inherent d'auto-renovació condueix a la formació d'una població de cèl·lules tumorals conegudes com *leukemic stem cells* (LSC). Alternativament, els esdeveniments leucemogènics poden afectar a progenitors en estadis més diferenciats, els quals adquireixen de forma aberrant la capacitat d'auto-renovació cel·lular. No obstant, tot i l'heterogeneïtat fenotípica de les leucèmies, existeixen mecanismes i característiques comuns en el procés leucemogènic: es



produeix un augment de la supervivència cel·lular, l'increment de la capacitat de proliferació, l'augment o l'adquisició de la capacitat d'auto-renovació, la inestabilitat genòmica i el bloqueig de la diferenciació; en definitiva, es produeix una pèrdua de control dels processos cel·lulars<sup>19,20</sup>.

En els últims anys, s'han pogut identificar les alteracions genètiques i moleculars recurrents que participen en aquest procés clonal de leucemogènesi, i que alhora sovint permeten definir els subtipus biològics de leucèmia aguda amb importància pronòstica i terapèutica. Podem classificar-les en:

#### **2.4.1. Leucemogènesi: suma d'alteracions primàries i secundàries**

##### **2.4.1.1. Alteracions primàries (*founding, first hit*)**

Les **translocacions** es produeixen per la recombinació anormal de gens normalment situats en cromosomes diferents, potenciant així l'expressió d'oncogens (per exemple, fusió d'un oncogen amb el gen de la cadena pesada de les immunoglobulines) o donant lloc a la construcció de proteïnes quimèriques aberrants (*BCR-ABL1, ETV6-RUNX1, RUNX1-RUNX1T1...*). Les translocacions en la leucèmia aguda acostumen a ser balancejades o recíproques i sovint defineixen subtipus de leucèmia que presenten característiques biològiques pròpies amb patrons genòmics distintius<sup>21</sup>.

Les **aneuploïdies** involucren tot el set de cromosomes i impliquen el guany o pèrdua de cromosomes individuals, donant lloc a cariotips amb un nombre cromosòmic diferent de 46. Destaquen la hiperdiploïdia (>46 cromosomes), que inclou de forma específica el subgrup de leucèmies amb alta hiperdiploïdia (51-67 cromosomes) i l'hipodiploïdia (<46 cromosomes)<sup>22</sup>.

##### **2.4.1.2. Alteracions secundàries (*second hit*)**

Els esdeveniments secundaris sovint són necessaris per tal que es desenvolupi la leucèmia una vegada s'ha produït l'alteració primària. Aquestes alteracions no són exclusives d'un subtipus genètic de leucèmia i tot i que poden associar-se amb més o menys freqüència a una alteració primària, es presenten en diferents subgrups

genètics. Entre aquestes alteracions trobem principalment les **mutacions** genètiques i les **alteracions en el número de còpies** gèniques (*copy number alteration*, CNA). La majoria d'aquestes alteracions en la LLA-B afecten gens implicats en la maduració limfoide (*PAX5*, *IKZF1*, *EBF1*, *LEF1*...), gens reguladors del cicle cel·lular i supressors de tumors (*CDKN2A/B*, *PTEN*, *RB1*, *P53*...), gens de vies moleculars relacionades amb proliferació (*JAK*, *FLT3*, *NRAS*, *KRAS*...) i diversos factors de transcripció (*ETV6*, *ERG*...) <sup>23</sup> (Figura 3).

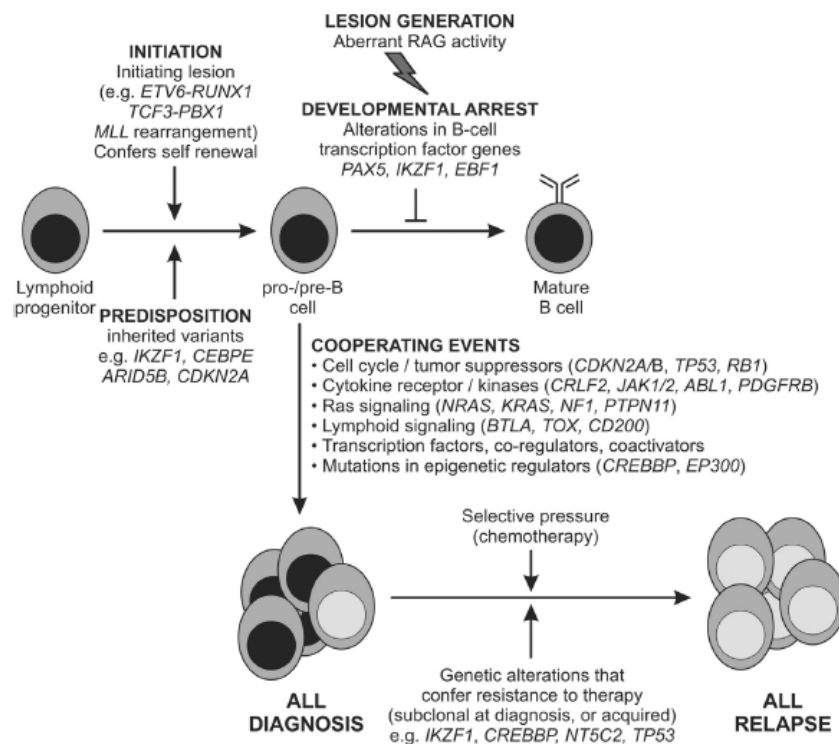


Figura 3| Esquema de l'adquisició d'alteracions genètiques en la patogènia de la LLA-B<sup>24</sup>.

#### 2.4.2. Leucemogènesi: Evolució clonal i latència

L'evolució clonal i la seqüència temporal (latència) en la que s'adquireixen aquestes alteracions encara s'està estudiant; tot i així, s'han proposat diferents episodis seqüencials depenent de si es tracta d'una LLA o d'una LMA.

#### 2.4.2.1. Evolució clonal i latència en les LLA

En la LLA, l'estudi de les cartes de Guthrie de bessons va demostrar que tot i que ambdós compartien un clon pre-leucèmic amb una alteració primària degut al traspàs transplacentari *in utero*, el bessó que adquiria noves lesions desenvolupava la leucèmia, mentre que l'altre germà podia no adquirir anomalies secundàries i per tant aturar-se la trajectòria evolutiva del clon pre-leucèmic<sup>25</sup>. Aquests estudis van permetre inferir la història natural d'aquest subtipus de leucèmia, de manera que el model més acceptat suggereix que la primera alteració ocorre en una cèl·lula progenitora, bé amb capacitat d'auto-renovació o bé la pròpia alteració la confereix a una cèl·lula més diferenciada. Aquest clon pre-leucèmic es va mantenint fins que succeeix el segon esdeveniment, el qual acaba de transformar la HSC en una LSC<sup>26,27</sup>.

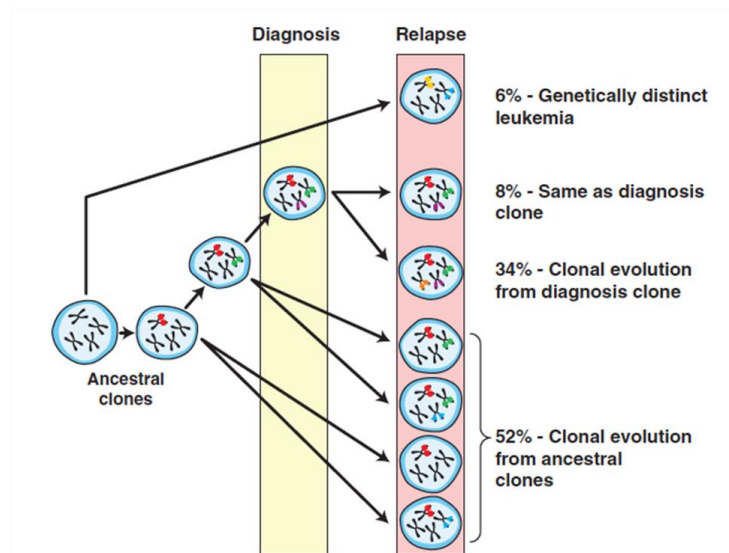
#### 2.4.2.2. Evolució clonal i latència en les LMA

Pel que fa a la LMA, tradicionalment s'havia suggerit que aquestes leucèmies s'originarien a partir d'almenys dos esdeveniments genètics somàtics: un d'ells conferiria al progenitor hematopoètic un avantatge proliferatiu (mutacions tipus I), mentre que l'altre donaria lloc a un bloqueig de la diferenciació (mutacions tipus II)<sup>28</sup>. Les mutacions tipus I inclouen mutacions activadores de vies de senyalització on participen *FLT3*, *C-KIT*, *NRAS*, *KRAS* i *PTPN11*, mentre que les mutacions tipus II inclourien principalment translocacions cromosòmiques (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBF-MYH11*, *PML-RARalfa*) o mutacions en *RUNX1*, *CEBPA* i *NPM1*<sup>29</sup>. Tot i això, amb el desenvolupament de la seqüenciació massiva, s'ha vist que aquest procés és molt més complex i fins a un 40% de les LMA no seguirien aquest patró<sup>30</sup>.

#### 1.4.3 Leucemogènesi: un procés no tan lineal (subclons)

Recentment, s'han revisat aquests conceptes de leucemogènesi i la linealitat de la seva evolució<sup>31</sup>. Així, l'organització jeràrquica clonal a la que s'associa el desenvolupament d'una leucèmia a partir d'un únic clon leucèmic que va originant **subclons** a partir de

noves alteracions genètiques, es va substituint per una evolució d'arquitectura ramificada. D'aquesta manera, al diagnòstic de la leucèmia ja existiren diversos subclons de LSC amb diverses alteracions genotípiques (Figura 4).



**Figura 4| Relació clonal entre el diagnòstic i la recaiguda en mostres de pacients recaiguts amb LLA.** Les recaigudes poden relacionar-se amb el clon majoritari al diagnòstic, amb evolucions clonals d'aquests, amb subclons ja presents al diagnòstic que s'han mantingut per selecció o amb clons ancestrals presents abans del diagnòstic<sup>32</sup>.

D'una manera darwiniana, els subclons amb característiques favorables per la supervivència s'anirien seleccionant i evolucionant donant lloc a la leucèmia i conferint resistència als diferents tractaments<sup>33,34</sup> (Figura 5). Així mateix, s'han pogut detectar mutacions en gens com *CREBBP* i *NT5C2*, que donarien resistència a glucocorticoides i anàlegs de nucleòsids, respectivament<sup>35</sup>. Així doncs, els diferents subclons de LSC no només són els responsables de l'inici i manteniment de la malaltia sinó també de les recaigudes, essent el seu estudi important en el seguiment i tractament dirigit contra diferents dianes terapèutiques<sup>23,32</sup>.

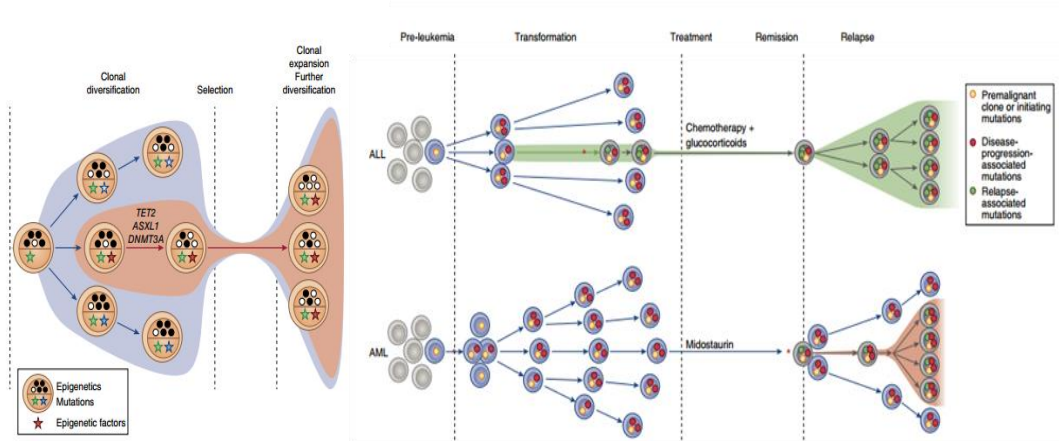


Figura 5| Contribució de la genètica, epigenètica i teràpia a l'evolució clonal de la leucèmia. Adaptada de<sup>23</sup>.

## 2.5. Diagnòstic

### 2.5.1. Clínic

La presentació clínic de la leucèmia aguda pediàtrica és variable i generalment els símptomes i signes al diagnòstic són secundaris a la infiltració de les cèl·lules leucèmiques en el moll de l'os i altres òrgans secundaris. Normalment, la presentació és de caire agut, amb una història de menys de tres mesos d'inici de la clínica fins que es diagnostica.

Un dels **signes** més freqüents és l'aparició de febre, que pot ser deguda a una infecció concomitant, però sovint és causada per la pròpia leucèmia. Normalment es resol en 24-72 hores després del tractament amb glucocorticoids i/o quimioteràpia.

Entre els **símptomes** més freqüents de presentació destaquen el malestar general, l'astènia i les hemorràgies per plaquetopènia. A més, en una tercera part dels casos, el principal símptoma és el dolor ossi o articular, que pot ser migratori o localitzat en una extremitat. En nens petits aquest dolor pot manifestar-se únicament en forma de coixesa. En alguns subtipus de leucèmia amb càrrega tumoral més elevada es poden observar masses mediastíniques, acompanyades de dispnea i ortopnea, i hepato-esplenomegàlia. En l'**exploració física** normalment s'observa pal·lidesa, equimosis, petèquies i adenopaties i/o hepato-esplenomegàlia. En els nens també pot detectar-se

infiltració en els testicles. En alguns casos també pot aparèixer hipertensió endocranial amb paràlisi d'un parell cranial com a conseqüència de la infiltració de sistema nerviós central (SNC). Tot i que és molt menys freqüent, també podrien observar-se manifestacions secundàries a la infiltració extramedul·lar com hemorràgia a la retina o en el nervi òptic, nòduls subcutanis, priapisme o compressió de la medul·la espinal, aquestes últimes molt més freqüents en la LMA que en la LLA<sup>36-38</sup>.

### 2.5.2. Biològic

A més de l'estudi clínic del pacient, són necessàries una sèrie de proves complementàries d'imatge i laboratori per diagnosticar la malaltia. L'estudi del moll de l'os és essencial, ja que en un 10% dels pacients amb leucèmia aguda no es detecten blasts en la sang perifèrica al diagnòstic.

#### ▪ Hemograma

La progressiva disfunció de la medul·la òssia també es tradueix a l'hemograma. Així, en la majoria de casos de LLA es detecta anèmia i/o leucocitosi i/o trombocitopènia, que reflecteixen el grau en el que la medul·la ha estat reemplaçada per cèl·lules immadures. En un 10% dels casos l'hemograma al diagnòstic és normal o presenta alteracions mínimes.

#### ▪ Morfologia

El diagnòstic de la leucèmia aguda es basa en l'observació morfològica al microscopi òptic. Per visualitzar les cèl·lules d'interès és necessari fer la tinció May-Grünwald-Giemsa. La presència de **≥25% i 30% d'infiltració de blasts** confirma el diagnòstic de LLA i LMA, respectivament, en pacients pediàtrics. Tot i que es pot fer el recompte en una mostra de sang perifèrica, es recomana realitzar un aspirat de medul·la òssia o biòpsia.

La citocentrifugació i posterior examen morfològic permet l'estudi del **líquid cefalorraquidi (LCR)** per descartar la infiltració del SNC.

- **Citometria de flux**

La citometria de flux permet l'estudi de l'**immunofenotip** a través dels antígens de membrana i intracel·lulars dels blasts. D'aquesta manera, la citometria permet establir el llinatge de la leucèmia i el punt de maduració en el que es troben els blasts. Així, la identificació del fenotip aberrant dels blasts, el LAIP (*leukemia-associated aberrant immunophenotype*), permet el seguiment de la malaltia residual mínima/mesurable (MRM o *minimal/mesurable residual disease*). D'altra banda, la citometria també permet estimar la ploïdia cel·lular mitjançant el càlcul de l'**índex d'ADN** dels blasts. Aquest mètode suposa un complement en l'estudi de la ploïdia i permet una millor identificació i distinció entre la hiperdiploïdia real i els clons hiperdiploïds que emmascaren una quasi-haploïdia.

- **Citogenètica**

La citogenètica convencional permet l'obtenció del **cariotip**: una representació del patró cromosòmic del pacient que permet la ordenació i comparació crítica dels cromosomes. L'estudi del cariotip permet la detecció d'alteracions numèriques (aneuploïdies) i estructurals (translocacions, delecions...) en les cèl·lules leucèmiques. Complementàriament s'utilitza la tècnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*), la qual permet la detecció d'anomalies genètiques que no poden detectar-se per cariotip.

- **Biologia molecular**

Algunes lesions genètiques només poden ser detectades per tècniques moleculars. La tècnica molecular bàsica pel diagnòstic de la leucèmia és la reacció quantitativa en cadena de la polimerasa amb retrotranscriptasa inversa (*reverse transcription quantitative-polymerase chain reaction*, RT-qPCR), que permet la detecció de productes del reordenament de diferents gens a causa de translocacions, tant en la LLA com en la LMA. Aquesta tècnica també permet l'estudi de la clonalitat mitjançant la detecció dels reordenaments específics dels gens de les immunoglobulines o del receptor de cèl·lules T (IG/TR PCR). Així, aquesta tècnica permet la identificació de subtipus genètics amb implicació pronòstica, així com el seguiment de la MRM.

Cada vegada més, es recomana la implementació de noves tècniques moleculars d'alt rendiment (*high throughput*) d'anàlisi massiu del genoma en el diagnòstic integrat dels pacients amb leucèmia per tal d'ampliar la informació relacionada amb la biologia de la leucèmia, el seu pronòstic i possibles dianes terapèutiques personalitzades. Entre elles destaquen la seqüenciació de gens amb tècniques de seqüenciació massiva (*next generation sequencing, NGS*)<sup>39</sup> que permeten la detecció d'SNPs o mutacions; la *multiplex-independent ligation probe amplification* (MLPA, *MRC-Holland*), o els SNP arrays (*Single Nucleotide Polymorphism Arrays*)<sup>40</sup>, per a la detecció de canvis en el número de còpies gèniques (*copy number variation, CNV*). La introducció d'aquestes tècniques en l'estudi de les leucèmies no només ha permès un millor diagnòstic diferencial, sinó un millor coneixement de la biologia d'aquestes leucèmies. En les LLA, els nous subtipus i aquells amb valor pronòstic han estat identificats per la signatura diferencial d'expressió gènica, per l'estudi de CNVs o pel descobriment de noves mutacions o reordenaments, mentre que en les LMA, les tècniques de NGS han permès la identificació de mutacions i fusions específiques dels pacients pediàtrics que difereixen de les LMA de l'adult<sup>41</sup>.

Per tant, degut a la complexitat del diagnòstic biològic dels diferents subtipus de leucèmia aguda, és important seguir les guies estandarditzades dels diferents grups cooperatius, que utilitzen algorismes de diagnòstic que combinen tècniques clàssiques i tecnologies més complexes<sup>42,43</sup>.

Actualment, doncs, les alteracions genètiques presents en la leucèmia tenen grans implicacions pronòstiques, ja que cada vegada més formen part dels criteris d'estratificació dels pacients en els diferents protocols de tractament adaptat al risc de recaiguda. Així, una bona caracterització de la leucèmia és molt important durant el procés de diagnòstic de la malaltia. Les principals alteracions genètiques i moleculars es troben detallades per llinatge en l'apartat 5.



## 2.6. Classificació

La classificació oficial actual de les leucèmies integra la morfologia, l'immunofenotip i les alteracions genètiques i moleculars. Així, segons els criteris emprats per definir les leucèmies trobem diferents classificacions:

- Classificació morfològica de les leucèmies agudes segons els criteris del grup cooperatiu **FAB** (French-American-British), basada fonamentalment en les troballes morfològiques en els blasts<sup>44</sup>.

- Classificació de la **WHO** (*World Health Organization*; també Organització Mundial de la Salut, OMS) 2016 de les neoplàsies de precursors hematopoètics, on s'integren les dades morfològiques, fenotípiques, citogenètiques i moleculars<sup>45,46</sup>.

-Classificació immunològica de la leucèmia aguda segons el grup **EGIL** (*European Group of Immunologic classification of Leukemias*), que es fonamenta en l'estudi immunofenotípic<sup>47</sup>.

### ▪ **Classificació de les LLA**

La classificació morfològica de la FAB (Taula 1) no s'utilitza actualment en l'estratificació dels pacients amb LLA. Les més emprades i de major utilitat són la immunològica segons el grup EGIL<sup>47</sup> i la de la WHO<sup>45</sup>.

<b>Classificació morfològica de la LLA segons el grup FAB</b>
<b>LLA-L1:</b> blasts petits i homogenis, amb cromatina homogènia i nucli regular.
<b>LLA-L2:</b> blasts de mida heterogènia, amb cromatina heterogènia i nucli irregular.
<b>LLA-L3:</b> blasts de mida gran i homogenis, amb cromatina fina i presència de vacuoles.

Taula 1| Classificació morfològica (FAB) de les LLA<sup>44</sup>.

En la classificació EGIL (Taula 2) s'utilitza el grau de maduresa de la cèl·lula leucèmica per sistematitzar la classificació. En canvi, la classificació de la WHO (Taula 3) integra aspectes clínics, morfològics, immunofenotípics i genètics i reconeix com a entitats diferents subgrups de LLA.

<b>Classificació immunològica de la LLA segons grup EGIL</b>
<b>LLA de línia B:</b> CD22+ i/o CD79a+ i/o CD19+
<b>Pro-B (B-I):</b> TdT+, CD10-, Ig citoplasma-, Ig membrana-, CD38+.
<b>Comú (B-II):</b> TdT+, CD10+, Ig citoplasma-, Ig membrana-, CD38+
<b>Pre-B (B-III):</b> TdT+, CD10+/-, Ig citoplasma +, Ig membrana-, CD38+/-
<b>B madura (B-IV):</b> CD20+, TdT-, CD10-, Ig citoplasma-, cadenes lleugeres de superfície o citoplasmàtiques +, CD38-
<b>LLA de línia T:</b> CD3 de citoplasma +
<b>Pro-T (T-I):</b> CD7+, CD2-, CD5-, CD8-, CD1a-
<b>Pre-T (T-II):</b> CD2+ i/o CD5+ i/o CD8+, CD1a-, CD71+
<b>T cortical:</b> CD1a+, CD3 de superfície + o -, CD71-
<b>T madura:</b> CD3 de superfície+, CD1a-, CD2+, CD5+, CD4/8+

Taula 2| Classificació immunològica (EGIL) de les LLA<sup>47</sup>.

<b>Classificació de la WHO de les neoplàsies de precursors limfoides</b>
Leucèmia/limfoma limfoblàstic B
Leucèmia/limfoma limfoblàstic B, no especificat
Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb alteracions genètiques recurrents: Leucèmia limfoblàstica B amb t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> Leucèmia limfoblàstica B amb t(v;11q23); reordenament del gen <i>KMT2A (MLL)</i> Leucèmia limfoblàstica B amb t(12;21)(p13;q22); <i>ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)</i> Leucèmia limfoblàstica B amb hiperdiploïdia Leucèmia limfoblàstica B amb hipodiploïdia Leucèmia limfoblàstica B amb t(5;14)(q31;q32); <i>IL3-IGH</i> Leucèmia limfoblàstica B amb t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
<i>Entitats provisionals:</i> Leucèmia/limfoma limfoblàstic B, <i>BCR-ABL1 like</i> Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb <i>iAMP21</i>
Leucèmia/limfoma limfoblàstic T
<i>Entitats provisionals:</i> Leucèmia limfoblàstica <i>Early T-cell precursor</i> Leucèmia/limfoma limfoblàstic Natural Killer (NK)

Taula 3| Classificació de la WHO 2016 de les neoplàsies precursors limfoides<sup>45</sup>.

- **Classificació de les LMA**

La classificació clàssica de la FAB (Taula 4) està sent substituïda cada vegada més per la de la WHO (Taula 5), que intenta incorporar també els aspectes genètics, immunofenotípics i clínics. Així, la classificació FAB només es manté per aquells casos que no poden classificar-se segons la WHO.

<b>FAB</b>	<b>Nom</b>	<b>Freqüència</b>	<b>Associació a alteracions citogenètiques</b>
M0	LMA amb poca diferenciació	2-5	
M1	LMA sense maduració	10-15	t(8;21)(q22;q22)
M2	LMA amb maduració	25-30	t(15;17)(q22;q12)
M3	Leucèmia promielocítica aguda	5-10	
M4	Leucèmia mielomonocítica aguda	15-25	inv(16)(p13;q22)/t(16;16)(p13;q22)
M4Eo	M4 + eosinofília al moll de l'os	10	
M5	Leucèmia monoblàstica/monocítica	15-25	<i>KMT2A (MLL)</i> reordenat
M6	Leucèmia eritroid	1-3	
M7	Leucèmia aguda megacarioblàstica	5-10	t(1;22)(p13;q13)

**Taula 4| Classificació de les LMA segons la classificació FAB, freqüència en LMA pediàtrica i associació a alteracions citogenètiques recurrents.**

<b>Classificació WHO de LMA i neoplàsies relacionades</b>
LMA amb alteracions genètiques recurrents: LMA amb t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> LMA amb inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> LMA amb t(15;17)(q24;q21); <i>PML-RARA</i> LMA amb t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>KMT2A-MLLT3</i> LMA amb t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> LMA amb inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2-MECOM (EVI1)</i> LMA (megacarioblàstica) amb t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i> LMA amb mutació a <i>NPM1</i> LMA amb mutació bial·lèlica a <i>CEBPA</i>
<i>Entitats provisionals:</i> LMA amb <i>BCR-ABL1</i> LMA amb mutació a <i>RUNX1</i>
LMA amb canvis en relació a mielodisplàsia
LMA en relació a tractament
LMA no específica (NOS): LMA amb poca diferenciació LMA sense maduració LMA amb maduració Leucèmia mielomonocítica aguda Leucèmia monoblàstica/monocítica Leucèmia eritroid Leucèmia aguda megacarioblàstica Leucèmia aguda basofílica Panmielosi amb mielofibrosi aguda
Sarcoma mieloide
Proliferació mieloide en relació a la Síndrome de Down: Mielopoesi anòmala transitòria Leucèmia mieloide associada a la Síndrome de Down
Leucèmies agudes de llinatge ambigu: Leucèmia aguda indiferenciada Leucèmia aguda de fenotip mixt (MPAL) amb t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> MPAL amb t(v;11q23.3); reordenament de <i>KMT2A (MLL)</i> MPAL, B/mieloide, NOS MPAL, T/mieloide, NOS

**Taula 5| Taula adaptada de la classificació de la WHO 2016<sup>48</sup>. NOS: not otherwise specified**

## **2.7. Subtipus citogenètics i moleculars**

En els últims anys, els avenços de les tècniques moleculars han permès identificar noves alteracions genètiques que permeten una subclassificació de les leucèmies. Això permet un refinament en l'estratificació en grups de risc i la identificació de dianes terapèutiques. En definitiva, totes aquestes eines permeten identificar subtipus biològics específics amb una evolució i comportament determinats.

### **2.7.1. Subtipus genètics i moleculars en les LLA: LLA-B**

La LLA precursora de línia B (LLA-B) representa un 85% de les LLA pediàtriques i presenta un pic d'incidència entre els 2 i 6 anys. Les diferents aberràncies cromosòmiques que defineixen els diferents subtipus constitueixen l'esdeveniment primari en el procés de leucemogènesi. Tot i que les estratègies d'intensificació del tractament, la millor combinació dels esquemes quimioteràpics i el seguiment més precís de la MRM han augmentat significativament la supervivència dels pacients, encara hi ha subtipus de LLA-B amb pronòstic desfavorable<sup>49</sup>.

#### **2.7.1.1 Alteracions primàries recollides a la WHO 2016**

##### **a. Hiperdiploïdia (51-67 cromosomes)**

Els cariotips hiperdiploïds presenten trisomies i tetrasomies en entre 5 i 19 cromosomes, donant lloc a cariotips entre 51 i 67 cromosomes. Els guanys cromosòmics no són a l'atzar, sinó que els cromosomes X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 i 21 són clarament els més recurrents<sup>50</sup>. La LLA-B amb alta hiperdiploïdia és el subtipus genètic més comú en la LLA (30%) i el pronòstic és molt favorable, amb una supervivència global del 80-90%<sup>51,52</sup>.

Podem diferenciar entre l'**alta hiperdiploïdia**, amb presència de més de 51 i menys de 68 cromosomes, amb un patró de guany de cromosomes recurrent: trisomia dels cromosomes X, 4, 10 i 17, tetrasomia del 14, 18 i 21 i diploïdia de l'1, 2 i 3 i un pronòstic favorable; i d'altra banda la **baixa hiperdiploïdia**, de 47 a 50 cromosomes, i pronòstic desfavorable<sup>53</sup>.

## b. Hipodiploïdia

Podem distingir entre:

- **Alta hipodiploïdia:** els pacients amb aquest subtipus citogenètic presenten cariotips entre 40 i 44 cromosomes<sup>54</sup>.

- **Baixa hipodiploïdia:** es caracteritza per la presència d'entre 30 i 39 cromosomes. Aquests pacients presenten un pronòstic desfavorable i sovint presenten de forma concomitants mutacions en la via de RAS, gens de la família d'*IKAROS* i en un 90% dels casos mutacions de *TP53*, amb freqüència germinals (manifestació del síndrome de Li-Fraumeni)<sup>55-57</sup>. Aquest cariotip s'observa en un 2-3% de les LLA pediàtriques. És important destacar que en aquest subtipus citogenètic podem observar el fenomen d'endoduplicació cromosòmica, de manera que alguns subclons hipodiploïds dupliquen el seu material cromosòmic, donant lloc a clons casi triploïdes (60-78 cromosomes). En aquests casos, és important no confondre'ls amb una alta hiperdiploïdia, que s'associaria a un millor pronòstic i comportaria una classificació errònia del pacient. Per distingir una hipodiploïdia d'una falsa hiperdiploïdia pot utilitzar-se el patró de guany de cromosomes: mentre que en l'alta hiperdiploïdia s'observa guany dels cromosomes X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 i 21 (esmentats en l'apartat anterior), una hipodiploïdia endoduplicada presenta disomia pels cromosomes 3, 7, 15, 16 i 17 i tetrasomia pels cromosomes 1, 6, 11 i 18<sup>51,57</sup>.

- **Casi haploïdia:** aquestes leucèmies presenten cariotips amb menys de 30 cromosomes, típicament entre 25 i 28, on la majoria de cromosomes es troben en forma monosòmica (una còpia). La pèrdua cromosòmica, de la mateixa manera que en les hipodiploïdies, no és atzarosa, i els cromosomes que acostumen a mantenir-se en forma diploide són els sexuals (X/Y) i els cromosomes 10, 14, 18 i 21. En aquest tipus de leucèmies també és freqüent trobar el fenomen d'endoduplicació cromosòmica (50-58 cromosomes). Així doncs, és important no confondre aquests casos amb una alta hiperdiploïdia, doncs els pacients amb casi haploïdia tenen un pronòstic molt advers<sup>51</sup>. Aquest subtipus s'associa a delecions en *IKZF3* i gens de la via RAS com *FLT3*, *NF1*, *N/KRAS* i *PTPN11*<sup>56</sup>.

Aproximadament un 1% dels nens amb LLA-B presenten aquest cariotip. No obstant, no hi ha evidències reportades de la presència d'aquest cariotip ni en lactants ni en adults.

**c. t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)**

La translocació críptica t(12;21)(p13;q22), que dóna lloc al gen de fusió *ETV6-RUNX1*, és la translocació més freqüent en LLA pediàtrica (25% de les LLA-B). El pronòstic dels pacients amb aquesta translocació és molt favorable. Les alteracions secundàries que s'associen amb més freqüència a aquesta alteració són delecions de gens com *ETV6* (al·lel no translocat), *IKZF1*, *CDKN2A/B*, i *PAX5*, entre d'altres<sup>51</sup>. Les alteracions estructurals afegides no semblen empitjorar el pronòstic.

**d. t(1;19)(q23;p13.3)/TCF3-PBX1 (E2A-PBX1)**

En la majoria dels casos, la translocació t(1;19)(q23;p13.3) dóna lloc al gen de fusió *TCF3-PBX1*, però en alguns casos només s'observa el der(19)t(1;19). Representen un 1-5% de tots els casos i sovint s'associa a fenotip pre-B<sup>58</sup>. Aquestes leucèmies presenten un perfil d'expressió característic amb sobreexpressió de cinases com *PRKCZ*, *EB-1*, *WNT16*, *BLK* i *MERTK* entre d'altres. Tot i que el pronòstic històric era desfavorable, en els protocols pediàtrics actuals es considera una alteració amb pronòstic intermig-favorable<sup>59</sup>.

La translocació t(17;19)(q22;p13.3)/*TCF3-HLF* s'associa a hipercalcèmia i a un pronòstic molt desfavorable. És molt important la seva detecció ja que els pacients són tributaris de tractaments experimentals.

**e. t(9;22)(q34;q11.2)/BCR-ABL1**

La translocació t(9;22)(q34;q11.2), produeix el cromosoma *Philadelphia* (Ph) i el gen de fusió *BCR-ABL1*. Depenent del punt de trencament en el gen *BCR* trobem diferents isoformes (p190 o p210), sent la p190 la més freqüent en la LLA-B pediàtrica. Excepcionalment també poden presentar aquesta alteració algunes LMA. El gen de fusió provoca l'activació constitutiva del gen *ABL1*, provocant l'activació aberrant de vies de proliferació i una inhibició de l'apoptosi controlades per proteïnes tirosina-

cinasa, com *PI3K*, *MYC*, *BTK*, *STAT*, *ERK1/2*, entre d'altres. Mentre que en l'edat adulta té una incidència del 25-30%, en l'edat pediàtrica representa un 3-5% de les LLA<sup>60</sup>. Acostumen a associar-se a cariotips complexos i a monosomia del cromosoma 7.

Tot i que inicialment el pronòstic de les LLA-B Ph era molt dolent, la introducció dels inhibidors tirosina-cinasa (*Tyrosin kinase inhibitors*, TKI) ha permès millorar notablement les expectatives d'aquests pacients<sup>61-63</sup>. Actualment, s'està avaluant la incorporació d'altres inhibidors d'altres vies, com els inhibidors de JAK/STAT<sup>63</sup>.

#### **f. t(v;11q23); reordenaments de *KMT2A* (*MLL*)**

Les translocacions que impliquen al gen *KMT2A* (*MLL*) defineixen un subgrup de leucèmies que presenten unes característiques clíniques i biològiques específiques. S'han descrit més de 70 translocacions del gen *KMT2A* amb més de 50 gens diferents, tot i que en el 80% dels casos es reordena amb *AFF1* (*AF4*), t(4;11); *MLLT3* (*AF9*), t(9;11) i *MLLT1* (*ENL*), t(11;19)<sup>64</sup>. Aquestes translocacions fusionen l'extrem N-terminal del gen *KMT2A* amb un gen diferent (*partner*) donant lloc a la pèrdua del domini C-terminal SET, i per tant de l'activitat metil·ladora i acetil·ladora d'histones. I, alhora, s'adquireix una funció aberrant que aporta el *partner* a la nova proteïna quimèrica. La majoria d'aquests *partners* s'associen a diversos complexos multiproteics (*DOT1L*, *PMRT1*, *BRD4*...) implicats en el control epigenètic dels gens diana de *KMT2A*, el que condueix a l'expressió constitutiva aberrant d'aquests<sup>65</sup>. L'anàlisi d'expressió de gens de la població de LSC en leucèmies *KMT2A* mostra l'augment de l'expressió de gens presents en els progenitors hematopoètics més immadurs (*self-renewal-associated signature*); això suggeriria l'adquisició aberrant de característiques de HSC, com la capacitat d'auto-renovació de les cèl·lules transformades<sup>66</sup>. A diferència de la resta de subtipus, les leucèmies amb reordenament del gen *KMT2A* acostumen a presentar poques alteracions secundàries, suggerint que la desregulació epigenètica seria suficient per desenvolupar la leucèmia<sup>67,68</sup>.

La incidència d'aquestes leucèmies es correlaciona amb l'edat, de manera que el 70-80% dels lactants (< 1 any) presenten aquesta translocació, mentre que la freqüència en nens més grans cau fins un 3-5%. El pronòstic d'aquestes leucèmies és advers tant en nens com en adults i empitjora en els lactants<sup>69</sup>.

### g. Translocacions del locus *IGH*

La presència d'aquestes alteracions provoca la desregulació de l'oncogen fusionat de forma anòmala al gen de la immunoglobulina (*IGH*), el que es tradueix en una sobreexpressió d'aquest oncogen. Els *partners* de la translocació que més destaquen són *CRLF2*, membres de la família *CEBP*, *ID4*, *miR-125b-1*, *EPOR* i *DUX4*.

La translocació  $t(5;14(q31;q32))//IL3-IGH$  representa menys d'un 1% de LLA, tant en nens com en adults. Es presenta amb eosinofília asimptomàtica i poden no detectar-se blasts en sang perifèrica.

Tot i que aquestes translocacions són més típiques de les leucèmies de fenotip madur o limfomes, recentment s'han descrit com un subtipus rellevant en el 5% de les LLA-B<sup>70</sup>. Els estudis que hi ha sobre el pronòstic que confereix aquesta alteració suggereixen una evolució desfavorable per aquests pacients<sup>71</sup>.

Els casos que no presenten cap de les anomalies més rellevants descrites anteriorment s'agrupen en el grup anomenat "**B-other**", que representa un terç de les LLA-B<sup>72-74</sup> (Figura 6).

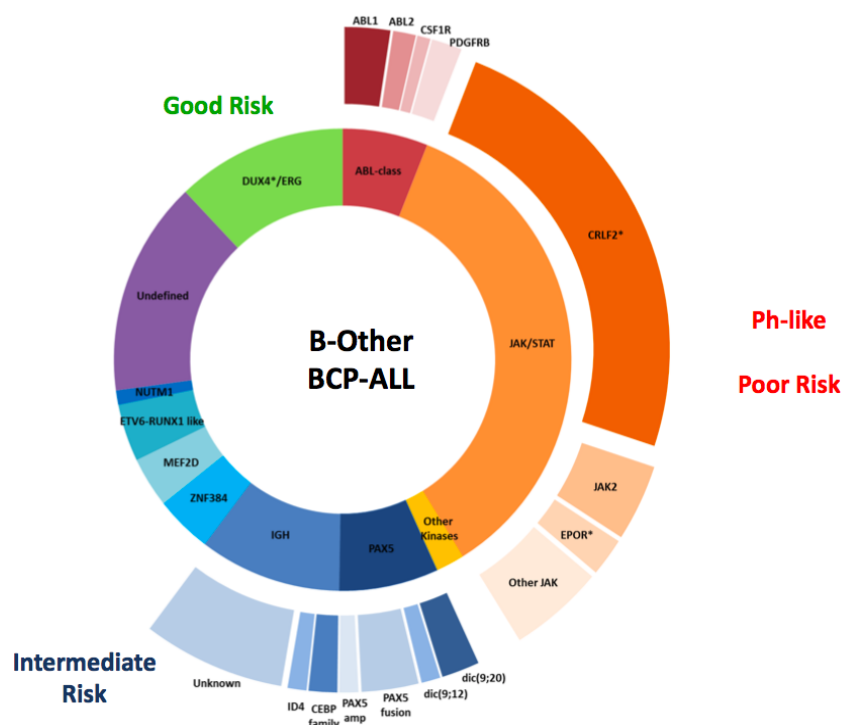


Figura 6| Subtipus de leucèmia identificats en el subgrup de les LLA *B-other*, segons el risc associat. Dra. Christine Harrison, comunicació personal.



### **2.7.1.2 Entitats provisionals en la classificació de la WHO 2016**

#### **a. Amplificació intracromosòmica del cromosoma 21 (iAMP21)**

Aquest subtipus citogenètic es caracteritza per la presència d'un cromosoma 21 anormal amb múltiples inversions, delecions, duplicacions i amplificacions en el braç llarg del cromosoma. No obstant, entre les posicions 21q22.11 i 21q22.12 hi ha una regió que es veu sempre duplicada i que inclou el gen *RUNX1*. Així doncs, aquest cariotip es defineix per la presència de tres o més còpies extra del gen *RUNX1* (en total, >5 còpies de *RUNX1*). Com a alteracions secundàries associades a aquest subgrup citogenètic trobem les delecions d'*ETV6* i *RB1*<sup>75,76</sup>.

Aproximadament un 3-5% dels pacients pediàtrics amb LLA presenten amplificació intracromosòmica del cromosoma 21 (iAMP21), amb una mediana de presentació als 10 anys. Els pacients tractats amb protocols de risc intermig presentaven una supervivència lliure d'event (SLE) inferior al 10%, mentre que la supervivència ha augmentat significativament en els pacients tractats amb protocols més intensius<sup>77</sup>.

#### **b. LLA-B Philadelphia-like (*Ph-like*)**

Aquest subtipus de LLA-B es defineix per la presència d'un perfil d'expressió similar al de les leucèmies amb reordenament *BCR-ABL1* (leucèmies Philadelphia positives o Ph+), en absència del reordenament *BCR-ABL1*<sup>78</sup>. En la majoria dels casos, les alteracions genètiques que presenten aquests pacients resulten en l'activació constitutiva de receptors de citocines i cinases que indueixen la proliferació cel·lular. Les alteracions més freqüents són: sobreexpressió del receptor *CRLF2* (50% dels casos), translocacions de gens amb activitat tirosin-cinasa com *ABL1*, *ABL2*, *CSFR1*, *PDGFRA* o *PDGFRB* (12%), mutacions puntuals a la via JAK/STAT (*JAK1/2/3*, *IL7R*) (11%), reordenaments de *JAK2* (7%), reordenaments d'EPOR (3%), mutacions en la via RAS (*FLT3*, *K/NRAS*, *PTPN11*, *NF1*) (6%) i mutacions d'altres cinases com *BLNK*, *TYK2*, *PTK2B*<sup>79,80</sup>. Aquestes alteracions són concomitants a la presència de delecions d'altres gens de diferenciació limfoide (*IKZF1*, *EBF1*, *PAX5*, *RAG1/2* i *VPREB1*), així com

delecions de *CDKN2A/B* o *BTG1*. Típicament, en la meitat dels casos, els pacients amb reordenament de *CRLF2* presenten mutacions puntuals a *JAK2*<sup>81</sup>.

La incidència de la LLA *Ph-like* varia en funció de l'edat. Així, la seva incidència augmenta a partir de l'edat adolescent, amb una incidència d'un 12% en nens menors de 18 anys i 28% en adults joves, i determina un pronòstic desfavorable en aquests pacients<sup>73</sup>.

### **2.7.1.3 Alteracions primàries no recollides a la WHO amb utilitat diagnòstica**

#### **a. Cariotip complex**

En les LLA es considera cariotip complex aquells que tenen més de 3 o 5 alteracions, sempre i quan no siguin alteracions cromosòmiques que constitueixen un subtipus citogenètic establert<sup>82</sup>.

Es presenta aproximadament en un 5-10% dels casos Philadelphia negatius i hi ha evidències que suggereixen un augment d'incidència amb l'edat.

#### **b. Sobreexpressió de *CRLF2***

La desregulació de l'expressió de *CRLF2* pot venir donada per diverses alteracions genètiques: (1) translocacions críptiques de *CRLF2* amb el gen IGH: (t(X;14)(p22;q32) o t(Y;14)(p11;q32)); (2) delecions críptiques a la regió X/Y *PAR1* que donen lloc a la fusió *P2RY8-CRLF2*, i menys freqüentment (3) mutacions activadores a *CRLF2* (F232C)<sup>83</sup>. En la majoria de pacients la sobreexpressió de *CRLF2* ve donada per translocacions cromosòmiques. El perfil d'expressió gènica d'aquest subtipus genètic s'assembla a la dels pacients amb translocació *BCR-ABL1*, i acostumen a tenir mutacions a la via JAK/STAT, sobretot a *JAK2*, així com delecions d'*IKZF1*, *CDKN2A/B* i *PAX5*. Aquesta sobreexpressió també s'ha detectat en pacients amb LLA-T<sup>71,84</sup>. Curiosament, aquestes translocacions poden coexistir amb altres alteracions recurrents de la LLA-B<sup>85</sup>.

Les translocacions de *CRLF2* s'observen en un 5-10% de LLA-B pediàtriques, excepte en els pacients amb LLA i Síndrome de Down, on s'observa en el 50-60% dels casos. La proporció en nens de *P2RY8-CRLF2:IGH-CRLF2* és de 5:1, mentre que en adults és 1:2.

El pronòstic d'aquestes alteracions és controvertit, tot i que la majoria d'estudis correlacionen la presència de l'alteració amb pronòstic desfavorable, particularment en els casos amb delecions concomitants d'*IKZF1*<sup>51,55</sup>.

#### **c. Alteracions de *PAX5* (reordenaments de *PAX5*, *PAX5*<sup>AMP</sup>, *PAX5* del/mut)**

Les delecions de *PAX5* són freqüents en la LLA-B, però també s'han descrit amplifacions associades a factors d'alt risc i amb pronòstic aparentment desfavorable<sup>86</sup>. També s'han identificat diferents translocacions de *PAX5*, que resulten en la pèrdua del domini de transactivació del propi gen, el que comporta una pèrdua de funció del gen en la majoria dels casos<sup>87</sup>. El gen *PAX5* participa en la diferenciació del limfòcit B, però recentment s'ha descrit que també podria jugar un paper com a gen supressor de tumors, de manera que la seva pèrdua de funció provocaria un bloqueig en la diferenciació i alhora un augment de la inestabilitat genètica de la cèl·lula. Algunes fusions descrites són *PAX5-CRLF2*, *PAX5-ETV6* i *PAX5-JAK2*, entre d'altres<sup>88</sup>. Aquestes translocacions ocorren en un 2-3% de les LLA-B, essent superior en les leucèmies amb fenotip més immadur (pre-B), i l'impacte pronòstic està per determinar<sup>55</sup>.

#### **d. Translocacions de *MEF2D***

Recentment s'han identificat translocacions que impliquen el gen *MEF2D*. La majoria d'aquestes translocacions, críptiques a nivell citogenètic, fusionen el gen *MEF2D* amb *BCL9*. Aquesta translocació s'associa a fenotip pre-B i a la presència concomitant de delecions d'*IKZF1*, mutacions en la via RAS, sobreexpressió de la histona deacetilasa 9 (*HDAC9*) i resistència a la quimioteràpia.

La incidència d'aquests reordenaments és d'un 3-5% en les LLA-B pediàtriques i possiblement s'associïn a mal pronòstic<sup>89,90</sup>.

#### **e. Translocacions de *ZNF384***

Les translocacions de *ZNF384* resulten en gens de fusió amb activitat modificadora de la cromatina o factors de transcripció com *EP300*, *CREBBP*, *TAF15*, *EWSR1*, *TCF3* i *ARID1B*. Aquestes LLA es caracteritzen per presentar un fenotip pro-B CD10- amb coexpressió d'antígens mieloides i mutacions concomitants a la via RAS.

Representen un 3-4% de les LLA-B pediàtriques i el pronòstic podria variar en funció del *partner* del reordenament, ja que s'han obtingut resultats dispars entre diferents estudis<sup>91,92</sup>. Així, la translocació *EP300-ZNF384* es correlacionaria amb bon pronòstic, mentre que la presència del gen de fusió *TCF3-ZNF384* s'ha associat amb pitjor supervivència.

#### **f. Translocacions de *DUX4***

El gen *DUX4* es reordena amb el gen de les *IGH* donant lloc a la sobreexpressió d'una isoforma truncada del gen *DUX4*, perdent així l'activitat pro-apoptòtica. Tot i que són menys freqüents, també s'han descrit reordenaments amb el gen *ERG*. La inserció de *DUX4* en el gen *IGH* provoca la sobreexpressió de *DUX4*, el que provocarà la formació d'un gen *ERG* alterat (*ERGalt*). Aquest gen *ERGalt* és leucemogènic i, en un 60% de casos, provoca la deleció de l'al·lel d'*ERG* normal<sup>73,93</sup>. S'ha demostrat que els pacients amb delecions intragèniques d'*ERG* s'associen a bon pronòstic, independentment de la presència de delecions d'*IKZF1*<sup>94,95</sup>. Aquestes leucèmies representen el 4-7% dels casos de LLA-B, i un 25% dels casos de LLA amb reordenaments no recollits per la WHO<sup>93,96</sup>. Per al seu diagnòstic és necessari l'estudi del transcriptoma, però molt recentment s'ha apuntat a l'*screening* d'aquest subtipus mitjançant l'estudi de CD371 per citometria de flux.

#### **g. *ETV6-RUNX1-like***

Aquest subtipus està present en un 1-3% dels pacients pediàtrics amb LLA-B. La seva identificació s'ha dut a terme per la signatura d'expressió gènica diferencial observada per RNA-seq, similar a la dels casos *ETV6-RUNX1*, i la coexistència d'anomalies en els gens *ETV6* i *IKZF1*, delecions en *ARPP21* i fenotip típic CD27+/CD44-. El pronòstic encara no està definit<sup>97</sup>.

### 2.7.1.4 Alteracions secundàries

Sovint, però, els esdeveniments primaris en la LLA són insuficients per desenvolupar la leucèmia, i és necessària l'addició d'alteracions genètiques o epigenètiques cooperants que indueixin la transformació final leucèmica. Les noves tecnologies com els *arrays* i la seqüenciació massiva han permès identificar un gran nombre d'aquestes alteracions secundàries concomitants a les primàries, que afegeixen complexitat a la biologia de les LLA-B i posen de manifest l'heterogeneïtat de la malaltia. Aquestes alteracions sovint afecten gens i vies importants en la diferenciació limfoide, control cel·lular i regulació de l'apoptosi. Tot i que no són específiques de cada subtipus, algunes s'associen amb més freqüència a determinades alteracions primàries<sup>98</sup> (Figura 7).



**Figura 7 | Visió global dels esdeveniments cooperatius en el procés de leucemogènesi en els diferents subtipus de LLA-B segons el risc.** Els punts indiquen el grup de risc: en verd clar, bon pronòstic; en verd fosc, risc intermig i en vermell, alt risc<sup>98</sup>.

A continuació, es mostra la taula 6, amb alguns dels gens més rellevants en la patogènia de la LLA-B segons la seva incidència i l'interès pel seu possible valor pronòstic:

Gen	Tipus d'alteració	Via senyalització afectada	Freqüència	Implicació clínica
<b>PAX5</b>	Delecions, translocacions i mutacions	Pèrdua de funció; gen de diferenciació limfoide	32% LLA-B	Important en el procés de leucemogènesi, però no s'associa clarament a pronòstic advers
<b>IKZF1</b>	Delecions i mutacions	Pèrdua de funció; gen implicat en la diferenciació limfoide	15% de les LLA-B pediàtriques	Pronòstic desfavorable
<b>JAK1/2</b>	Mutacions	Activació constitutiva de la via JAK-STAT	18-35% dels pacients amb LLA i Síndrome de Down. 11% dels pacients d'alt risc Ph-	Possible diana terapèutica: inhibidors de JAK
<b>CRLF2</b>	Sobreexpressió provocada per reordenaments com <i>IGH-CRLF2</i> o <i>P2RY8-CRLF2</i>	Activació constitutiva de la via JAK/STAT	12% de les LLA-B pediàtriques	Possible diana terapèutica: inhibidors de JAK
<b>Alteracions en l'activació de cinases</b>	Reordenaments en <i>ABL1</i> , <i>ABL2</i> , <i>CSF1R</i> , <i>EPOR</i> , <i>JAK2</i> , <i>PDGFRB</i> ; mutacions en <i>IL7R</i> i <i>FLT3</i> ; delecions de <i>SH2B3</i>	Activació constitutiva de vies de senyalització per cinases	10% de les LLA-B pediàtriques; s'associen a les <i>Ph-like</i>	S'associen a característiques de mal pronòstic i augmenten el risc de recaiguda
<b>CREBBP</b>	Delecions i mutacions	Pèrdua d'acetilació d'histones i regulació transcripcional	19% de les LLA recaigudes; s'associen a hipodiploïdies	S'associen a resistència a glucocorticoides
<b>NT5C2</b>	Mutacions	Les mutacions confereixen resistència als anàlegs de nucleòsids	Fins un 20% de les LLA recaigudes	Mutacions seleccionades en la recaiguda
<b>TP53</b>	Mutacions	Augmenten el risc de desenvolupar hipodiploïdies i recaure	50% acostumen a ser heretades	Tret característic de les hipodiploïdes; s'associen a recaiguda

Taula 6| Algunes de les alteracions genètiques secundàries recurrents en la LLA-B. Adaptada de<sup>55</sup>.

L'impacte pronòstic de les alteracions secundàries encara està per definir en molts casos, mentre que en d'altres, el seu impacte advers independentment de la MRM s'ha demostrat en múltiples estudis. No obstant, el seu ús en protocols clínics és controvertit, ja que el l'impacte pronòstic podria dependre dels protocols terapèutics o de la cooperació amb altres esdeveniments genètics. Cada vegada més, però, aquestes

alteracions o la combinació entre elles estan guanyant pes en l'estratificació dels pacients<sup>99</sup>. Tant és així, que recentment, s'ha descrit el subtipus ***IKZF1-plus***, que representa el 6% de les LLA-B i inclou aquells casos amb alteracions en l'*IKZF1* i almenys una de les següents: deleció de *PAX5*, deleció de *CDKN2A/B*, deleció de la regió *PAR* que inclou *CRLF2*; sense presentar deleció d'*ERG*. Tot i que els pacients són considerats d'alt risc de recaiguda, el pronòstic advers no és independent de la MRM<sup>100-102</sup>.

### **2.7.2. LLA-T**

Les LLA-T representen el 10-15% de les leucèmies limfoblàstiques en edat infantil. La incidència d'aparició augmenta amb l'edat, sent més freqüents en nens a partir de 9 anys. Tot i que cada vegada coneixem més la seva biologia, la falta de translació clínica, l'alevada probabilitat de recaiguda i la falta de tractaments de rescat fan d'aquest subtipus de leucèmia una entitat de pronòstic desfavorable<sup>103</sup>.

La LLA-T constitueix un tipus de leucèmia particularment heterogeni i complex amb múltiples combinacions de lesions genètiques que impliquen oncogens i gens supressors de tumors, així com alteracions en la regulació epigenètica.

#### **2.7.2.1. Alteracions que defineixen subtipus genètics-moleculars**

L'estudi del perfil d'expressió de les diferents LLA-T ha permès la identificació dels diferents subgrups de LLA-T, caracteritzats per un perfil transcripcional específic i per l'expressió ectòpica de determinats factors de transcripció, normalment com a conseqüència d'un defecte cromosòmic. Aquests perfils d'expressió reflecteixen el punt de bloqueig de la diferenciació del limfòcit T i, per tant, el grau d'immaduresa de la leucèmia. Així doncs, no és d'estranyar que hagi una certa correlació amb l'immunofenotip<sup>104</sup> (Figura 8).

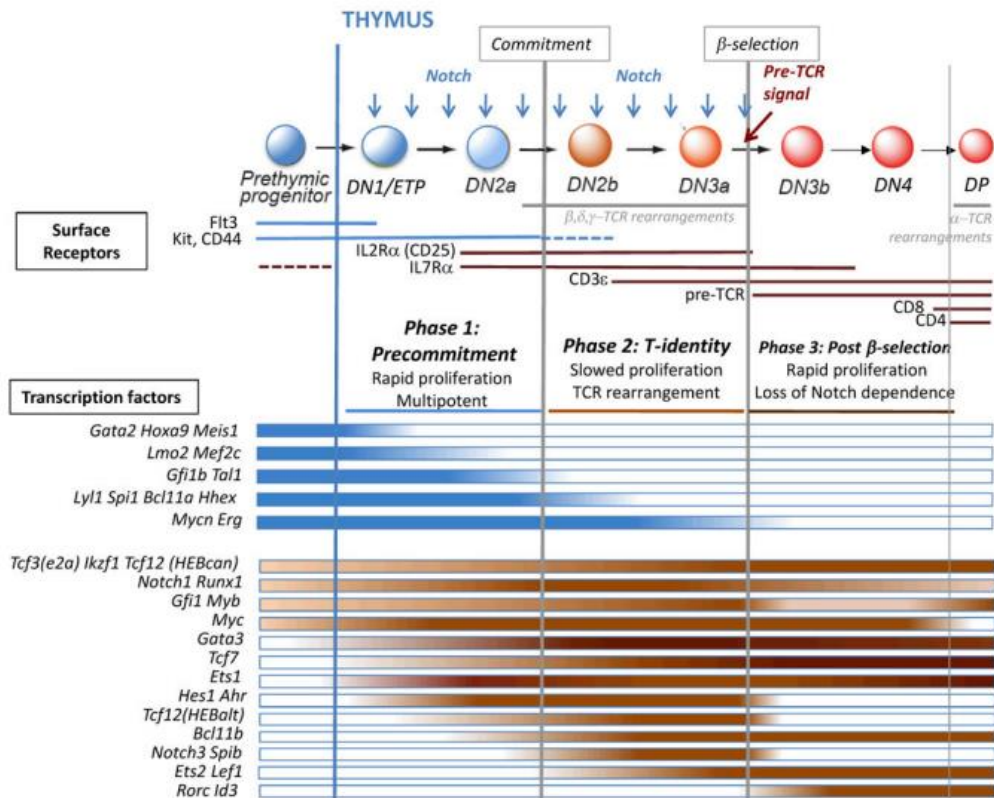


Figura 8| Desenvolupament del limfòcit T: estadi, marcadors de superfície i expressió de factors de transcripció<sup>104</sup>.

Actualment, es coneixen 4 mecanismes principals que causen l'expressió aberrant de factors de transcripció en les LLA-T: (1) translocacions cromosòmiques que involucren el gen del receptor de les cèl·lules T (*T cell receptor, TCR*); (2) reordenaments cromosòmics amb altres seqüències reguladores; (3) duplicacions/amplificacions de factors de transcripció; i (4) mutacions o petites insercions generant noves seqüències reguladores que actuen com activadors de promotors<sup>105</sup>. Aproximadament el 50% dels pacients amb LLA-T presenta translocacions cromosòmiques que juxtaposen els gens que codifiquen pels receptors de les cèl·lules T (*TCR* alfa, *TRA*; delta, *TRD*; beta, *TRB*) juntament amb factors de transcripció oncogènics, el que propicia la seva expressió aberrant en els progenitors T. Entre aquests factors sobreexpressats trobem gens de la família bHLH (*basic helix-loop-helix*) com *TAL1* o *LYL1*, gens de la família homeobox com *HOXA*, *TLX1/HOX11*, *TLX3/HOX11L2* i gens *LMO* (*LIM only domain*) com *LMO2*. Normalment aquestes alteracions són excloents entre elles i defineixen subtipus genètics-moleculars en la LLA-T<sup>106</sup> (Taula 7).



<b>Categoria genètica</b>	<b>Gen fusió</b>	<b>Reordenament genètic</b>	<b>Freqüència<sup>1</sup></b>	<b>Pronòstic</b>	
<b>Gens de la família bHLH</b>		t(1;14)(p32;q11)	3%		
	<i>TAL1</i>	t(1;7)(p32;q34)	3%	Favorable	
		deleció 1p32	16-30%		
	<i>TAL2</i>	t(7;9)(q33;q32)	1%	Indeterminat	
	<i>LYL1</i>	t(7;19)(q34;p13)	1%	Indeterminat	
	<i>BHLHB1</i>	t(14;21)(q11.2;q22)	1%	Indeterminat	
<b>Gens de la família LMO</b>		t(11;14)(p15;q11)	1%	Indeterminat	
	<i>LMO1</i>	t(7;11)(q34;p15)	1%	Indeterminat	
		t(11;14)(p13;q11)	6%		
	<i>LMO2</i>	t(7;11)(q34;p13)	6%	Indeterminat	
		deleció 11p13	3%		
	<i>LMO3</i>	t(7;12)(q34;p12)	<1%	Indeterminat	
<b>Gens de la família Homeobox</b>	<i>TLX1</i>	t(11;14)(p15;q11)	5-10-30%	Favorable	
	<i>TLX3</i>	t(11;14)(p13;q11)	5-20%	Controvertit	
	<i>HOXA</i>	Inv(7)(p15;q34)	3%	Indeterminat	
		t(7;7)(p15;q34)	3%	Indeterminat	
	<i>HOXA (CALM-AF10)</i>	t(10;11)(p13;q14)	5-10%	Desfavorable	
	<i>HOXA (MLL-ENL)</i>	t(11;19)(q23;p13)	1%	Indeterminat	
	<i>HOXA</i>	deleció 9q34		Sense impacte	
		( <i>SET-NUP214</i> )	inv14(q11.2;q13)	3%	Indeterminat
			inv14(q11.2;q13)	5%	Indeterminat
		<i>NKK2.1</i>	t(7;14)(q11;p11)		
	<i>NKK2.2</i>	t(14;20)(p13;q11)	1%	Indeterminat	
<b>Proto-oncogens</b>	<i>c-MYB</i>	t(6;7)(q23;q34)	3%	Indeterminat	
	<i>MEF2C</i>	del(5q)(q14;q14)	-	Indeterminat	
	<i>SPI1</i>	t(11;14)(p11;q32)	-	Indeterminat	

<sup>1</sup>Freqüències globals en la LLA-T

**Taula 7 | Alteracions genètiques recurrents en la LLA-T, incidència i implicació clínica.** Adaptada de<sup>105,106</sup>.

### 2.7.2.2. Altres alteracions recurrents

Diferents estudis confirmen que l'expressió ectòpica de factors de transcripció són esdeveniments iniciadors en el desenvolupament de les LLA-T, però és necessària l'addició d'altres alteracions com mutacions i/o delecions per a una transformació

completa dels limfòcits T normals a cèl·lules leucèmiques. Aquestes alteracions recurrents es presenten en els diferents subtipus i alteren els mecanismes normals de control del cicle cel·lular, proliferació, supervivència i diferenciació del limfòcit durant el seu desenvolupament (Taula 8 i Figura 8). Diferents estudis de seqüenciació massiva han permès la identificació >100 gens que poden mutar-se en la LLA-T. Dos d'aquests gens ja estan presents en >50% de les LLA-T: les mutacions de *NOTCH1* i les delecions de *CDKN2A/B*<sup>105,107</sup>.

Categoria genètica	Gen	Alteració genètica	Freqüència <sup>1</sup>	Pronòstic
<b>Via de NOTCH1</b>	<i>NOTCH1</i>	t(7;9)(q34;p13) Mutacions activadores	<1% >50%	Desconegut Controvertit
	<i>FBXW7</i>	Mutacions inactivadores	14%	Favorable o sense impacte
	<i>CDKN2A/B</i>	Deleció 9p21	61%	Favorable
<b>Defectes en el cicle cel·lular</b>	<i>CCND2</i>	t(7;12)(q34;p13) deleció 11p13	1%	Indeterminat
	<i>RB1</i>	Deleció 13q14	4-12%	Sense impacte
	<i>CDKN1B</i>	Deleció 12p13	2%	Indeterminat
	<i>MYC</i>	t(8;14)(q24;q11)	1%	Indeterminat
<b>Factors de transcripció/ creixement cel·lular i supressors de tumors</b>	<i>WT1</i>	Mutació o deleció inactivadora	10%	Sense impacte
	<i>LEF1</i>	Mutació o deleció inactivadora	10%	Indeterminat
	<i>ETV6</i>	Mutació o deleció inactivadora	8%	Sense impacte
	<i>BCL11B</i>	Mutació o deleció inactivadora	10%	Sense impacte
	<i>RUNX1</i>	Mutació o deleció inactivadora	8%	Sense impacte
	<i>GATA3</i>	Mutació o deleció inactivadora	5%	Desfavorable
	<i>PTEN</i>	Mutació inactivadora Deleció 10q23	19%	Desfavorable
<b>Transducció de senyals</b>	<i>NUP214-ABL1</i>	Amplificació 9q34	8%	Desfavorable
	<i>EML1-ABL1</i>	t(9;14)(q34;q32)	<1%	Indeterminat
	<i>ETV6-ABL1</i>	t(9;12)(q34;p13)	<1%	Indeterminat
	<i>BCR-ABL1</i>	t(9;22)(q34;q11)	<1%	Desfavorable
	<i>NRAS</i>	Mutació activadora	14%	Desfavorable
	<i>KRAS</i>	Mutació activadora	6%	Desfavorable
	<i>NF1</i>	Mutació i deleció inactivadora	4%	Sense impacte
	<i>JAK1</i>	Mutació activadora	5-18%	Sense impacte
	<i>ETV6-JAK2</i>	t(9;12)(p24;p13)	<1%	Indeterminat
	<i>JAK3</i>	Mutació activadora	8%	Indeterminat
	<i>FLT3</i>	Mutació activadora	6%	Sense impacte
	<i>IL7R</i>	Mutació activadora	10%	Sense impacte
	<b>Remodelació de la cromatina</b>	<i>EZH2</i>	Mutació o deleció inactivadora	12%
<i>SUZ12</i>		Mutació o deleció inactivadora	11%	Sense impacte
<i>EED</i>		Mutació o deleció inactivadora	5%	Sense impacte
<i>PHF6</i>		Mutació o deleció inactivadora	19%	Sense impacte

<sup>1</sup>Freqüència en LLA-T pediàtrica<sup>107</sup>

**Taula 8 | Altres alteracions genètiques recurrents en la LLA-T. Adaptada de<sup>106,107</sup>**

La via de senyalització de *NOTCH1* és essencial per a la determinació dels progenitors hematopoètics cap al llinatge T i pel posterior desenvolupament dels timòcits. L'activació constitutiva de la via de *NOTCH* per mutacions activadores en el gen *NOTCH1* constitueix un dels esdeveniments oncogènics primaris present en més de la meitat de les LLA-T. La pèrdua de funció d'alguns reguladors de la via de *NOTCH1*, com *FBXW7*, és un mecanisme alternatiu que també condueix a l'activació aberrant de la via. Les mutacions inactivadores d'*FBXW7* estan presents en un 15% de les LLA-T, i augmenten l'estabilitat de la proteïna *NOTCH1*. El paper pronòstic d'aquestes mutacions ha estat motiu d'estudi en diferents protocols europeus, i actualment el grup francès GRAAL utilitza les mutacions de *NOTCH1/FBXW7/PTEN/K-RAS/N-RAS* com a estratificador oncogenètic per les LLA-T en pacients adults<sup>108</sup>. El pronòstic d'aquestes mutacions en els pacients pediàtrics encara és controvertit<sup>109,110</sup>.

D'altra banda, la LLA-T és un dels tumors pediàtrics amb més incidència de lesions epigenètiques; així, un 56% dels casos presenta mutacions en gens d'aquest tipus. El gen *PHF6* i gens del complex PRC2 com *EZH2*, *SUZ12* i *EED*, formen part d'aquest grup.

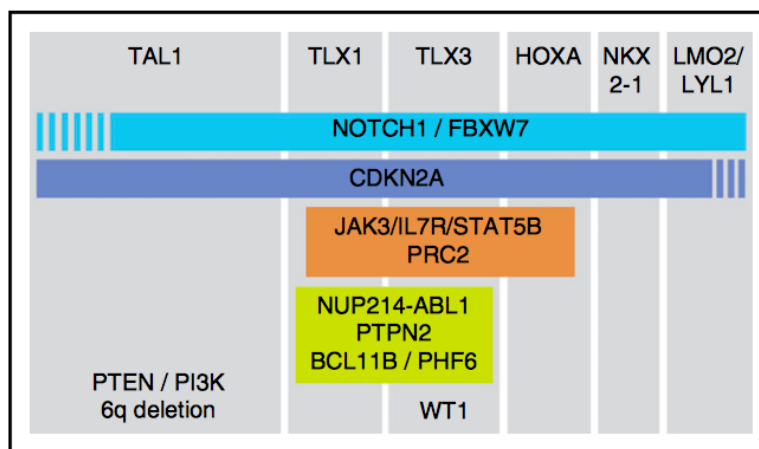


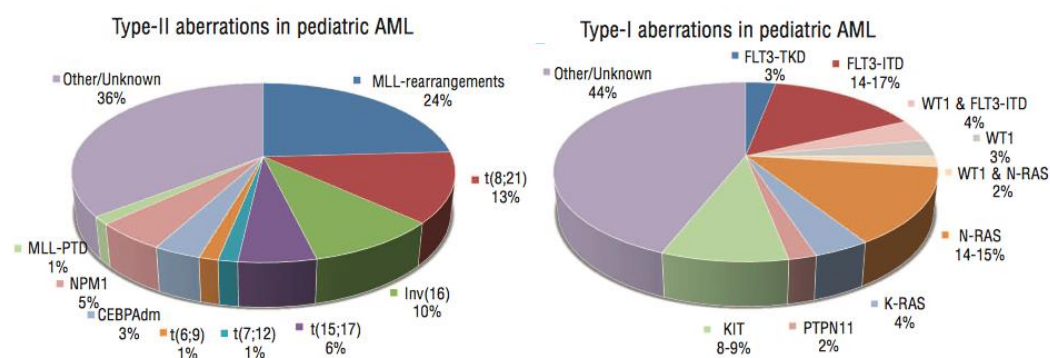
Figura 9| Representació gràfica dels esdeveniments cooperatius en les LLA-T<sup>105</sup>.

### 2.7.3. LMA

La LMA representa un 15-20% de les leucèmies pediàtriques. Tot i la intensificació de la quimioteràpia en les últimes dècades, només un 60-70% dels nens amb LMA es curen. L'heterogeneïtat de les LMA s'observa en les diferències en la morfologia, immunofenotip, així com en les aberràncies citogenètiques i moleculars, que cada vegada són més emprades per estratificar els pacients en grups de risc<sup>29,43</sup>.

#### 2.7.3.1. Subtipus genètics i moleculars en la LMA

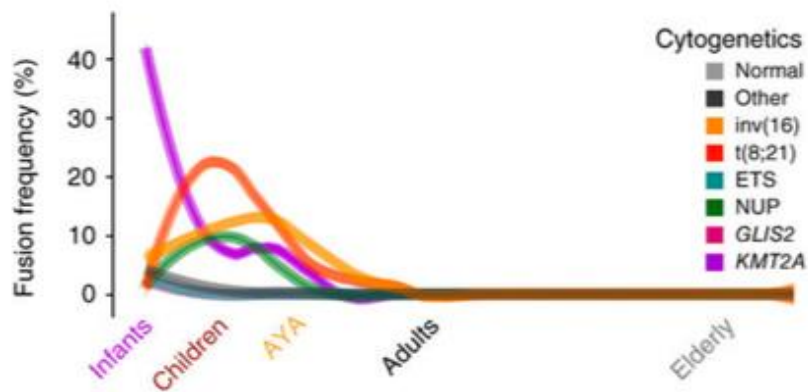
En els últims anys, les tècniques de seqüenciació massiva han permès determinar un espectre complert de les alteracions en la LMA. L'heterogeneïtat citogenètica i molecular de les LMA es reflexa per la presència de diferents **alteracions de tipus-I i tipus-II**, tot i que, com s'ha esmentat anteriorment, un 40% dels casos presenten altres alteracions (Figura 10).



**Figura 10| Distribució de les diferents aberràncies genètiques de tipus-I i tipus-II en la LMA pediàtrica.** No obstant, en un elevat percentatge de casos l'alteració genètica encara està per identificar<sup>29</sup>.

Amb l'anàlisi integrat d'aquestes alteracions s'ha observat que l'associació entre aquestes no és aleatòria i afecta la seva rellevància clínica<sup>29</sup>. De la mateixa manera que en les LLA, per algunes d'aquestes alteracions hi ha un impacte pronòstic ben establert, mentre que per altres, el valor pronòstic és incert o està per definir. La incidència d'aquestes alteracions també varia en funció de l'edat. Així, en els lactants predominen les alteracions del gen *KMT2A* (el 50% lactants amb LMA presenten aquesta alteració); s'observen de forma específica algunes translocacions com la

t(1;22)(p13;q13)/*OTT-MAL*, la t(11;15)(p15;q35)/*NUP98-JARID1A* o la inv(16)(p13.3-q24.3)/*CBFA2T3-GLIS2*, associades a leucèmia megacarioblàstica; o les translocacions críptiques t(7;12)(q36;p13)/*ETV6-HLXB9* i t(5;11)(q35;p15)/*NUP98-NSD1*. En nens, les alteracions desfavorables són menys freqüents que en adults; per contra, les translocacions de bon pronòstic que afecten al *core binding factor* (CBF), com la t(8;21)(q22;q22)/*RUNX1-RUNX1T1* o la inv(16)(p13.1;q22)/ *CBFB-MYH11*, són més freqüents en la població pediàtrica<sup>30,111,112</sup> (Figura 11).



**Figura 11** | Representació de les principals alteracions citogenètiques en LMA en funció de l'edat<sup>41</sup>.

Les alteracions en els gens *RAS*, *KIT* i *FLT3*, incloent les mutacions pediàtriques específiques en *FLT3* (*FLT3.N*), són les més freqüents en nens. La taxa de mutacions augmenta amb l'edat, mentre que els nens més grans presenten relativament menys alteracions citogenètiques recurrents. Per alguns gens com *CBL*, *GATA2*, *WT1*, *MYC* i *FLT3*, la freqüència i la localització de les mutacions també difereix entre nens i adults. Les alteracions en la via de *RAS* (en *KRAS*, *NRAS*, *PTPN11* o *NF1*) s'associen freqüentment a reordenaments del gen *KMT2A*. A més, algunes mutacions, com les que es donen en el gen *WT1*, s'observen amb més freqüència en el clon original, mentre que d'altres són més freqüents en subclons<sup>41</sup>.

La taula 9 resumeix les principals alteracions genètiques amb implicació pronòstica en la LMA pediàtrica.

Gen	Alteració	Freqüència	Implicació clínica
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	t(8;21)(q22;q22)	15%	Favorable
<i>CBFB-MYH11</i>	inv(16)(p13.1;q22) t(16;16)(p13.1;q22)	10%	Favorable
<i>PML-RARA</i>	t(15;17)(q22;q21)	6-10%	Favorable
<i>MLLT3-MLL</i>	t(9;11)(p22;q23)	7%	Intermig-favorable
<i>MLLT10-MLL</i>	t(10;11)(p12;q23)	3%	Desfavorable
<i>DEK-NUP214</i>	t(6;9)(p23;q34)	<2%	Desfavorable
<i>RPN1-EVI1</i>	inv(3)(q21q26.2) t(3;3)(q21;q26.2)	<1%	Desfavorable
Desconegut	-7	1%	Desfavorable
Reordenaments <i>KMT2A (MLL)</i>	11q23	20%	Desfavorable; depèn del <i>partner</i>
<i>RBM15-MKL1</i>	t(1;22)(p13;q13)		Intermig
<i>NPM1</i>	LMA amb mutació a <i>NPM1</i>	5-10%	Favorable
<i>CEBPA</i>	LMA amb mutació bial·lèlica a <i>CEBPA</i>	5%	Favorable
<i>FLT3</i>	FLT3-ITD	10%	Depenent del context mutacional
<i>MXX1/ETV6</i>	t(7;12)(q36;p13)/t(7;12)(q32;p13)	Lactants	Desfavorable
<i>NUP98/NSD1</i>	t(5;11)(q35;p15.5)		Desfavorable
<i>CBFA2T3-GLIS2</i>	inv(16)(p13.3q24.3)		Desfavorable
<i>NUP98/KDM5A</i>	t(11;12)(p15;p13)		Desfavorable

Taula 9| Altres alteracions genètiques recurrents en la LMA. Adaptada de<sup>41,43</sup>.

## 2.8. Pronòstic

### 2.8.1. Factors pronòstic

Actualment, el pronòstic de la leucèmia pediàtrica ha millorat de forma significativa en les últimes dècades. Aquesta millora ve donada per una millor estratificació dels pacients en grups, en funció del risc de recaiguda de cada pacient. Això permet aplicar estratègies terapèutiques adaptades al risc diferents per a cada pacient, de manera

que s'intensificarà el tractament en aquells pacients d'alt risc i es reduirà en els de baix risc de recaiguda.

Per determinar el grup de cada pacient és necessari tenir en compte els factors pronòstic, que venen determinats per les característiques del pacient, de la malaltia i del tractament *per se*. D'altra banda, cal tenir en compte que els diferents factors de risc biològics o clínics no es reproduïxen de la mateixa manera en tots els protocols de tractament, posant de manifest la importància del tractament en sí mateix.

### **2.8.1.1 Factors pronòstic propis del pacient**

#### **▪ Edat**

L'edat és el principal factor pronòstic. En general, la leucèmia pediàtrica presenta millors taxes de supervivència que la leucèmia en l'edat adulta. Dins dels casos pediàtrics, els nens entre 1 i 9 anys presenten millor pronòstic respecte el lactants i els adolescents. Aquests dos últims grups tenen un risc de recaiguda més elevat, presenten els subtipus genètics amb pitjor pronòstic i el maneig clínic resulta més difícil en ambdós casos<sup>113</sup>.

### **2.8.1.2 Factors pronòstic propis de la malaltia**

#### **▪ Xifra de leucòcits al diagnòstic**

La xifra de leucòcits al diagnòstic confereix millor pronòstic si és inferior a  $50 \times 10^9/L$ , i encara millor si és per sota de  $20 \times 10^9/L$ . En alguns protocols s'utilitza una classificació que agrupa l'edat i la xifra de leucòcits, i que resulta útil per a la comparació de resultats entre diferents protocols de tractaments. Aquesta classificació del US NCI (*United States National Cancer Institute*) distingeix un grup de baix risc definit per edat entre 1 i 9 anys i leucòcits al diagnòstic per sota de  $50 \times 10^9/L$ <sup>114</sup>.

#### **▪ Immunofenotip de la cèl·lula leucèmica**

L'immunofenotip de la cèl·lula defineix el llinatge i el grau de maduresa dels blasts leucèmics; en general, un fenotip més immadur s'associaria a un pronòstic més

desfavorable. Així, la determinació immunofenotípica permet detectar fenotips d'alt risc com el pro-B i l'*early-T*.

### ▪ Citogenètica

Les alteracions cromosòmiques, com ja hem comentat anteriorment, són esdeveniments primaris iniciadors del procés de leucemogènesi que sovint ocorren en un estat prenatal, però *per se* són insuficients per desenvolupar una leucèmia<sup>115,116</sup>. Normalment, els reordenaments cromosòmics es mantenen en totes les cèl·lules leucèmiques i perduren en la recaiguda<sup>23,98,117</sup>. La freqüència de les alteracions citogenètiques varien significativament en funció de l'edat<sup>51</sup> (Figura 12). La presència de cariotips i alteracions de mal pronòstic és significativament superior en el subgrups de major edat. En la LLA, el reordenament del gen *KMT2A*, per exemple, és més freqüent en lactants, mentre que la presència de la translocació t(9;22) augmenta amb l'edat. Per contra, els cariotips de bon pronòstic, com l'alta hiperdiploïdia i la translocació t(12;21), s'associen significativament a l'edat pediàtrica de bon pronòstic, entre 1 i 9 anys. Encara no es coneixen els motius d'aquesta distribució desigual; no gensmenys, juguen un paper decisiu en la diferència de pronòstic entre els pacients de diferents edats.

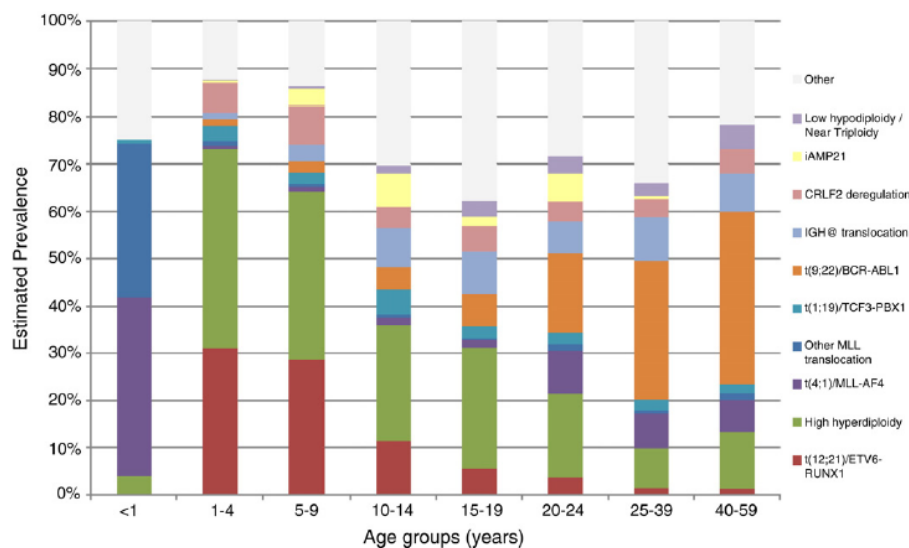


Figura 12| Freqüències de les alteracions genètiques en funció de l'edat en les LLA<sup>51</sup>.



En la taula 10 podem observar les alteracions genètiques en la LLA-B pediàtrica i el pronòstic que confereixen segons el protocol actual de tractament:

Pronòstic	Alteració cromosòmica	Especificacions	Freqüència	Ref.
FAVORABLE	t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1	2/3 presenten pèrdua de l' al·lel normal del gen <i>ETV6</i> 20-25% trisomia 21 15-20% duplicació der(21)	25 %	118,119
	Alta hiperdiploïdia (HeH) 51 a 65/67 cromosomes	Trisomies X, 4, 6, 10, 17, 18/ Tetrasomies 14 i 21 Índex de DNA 1,11-1,48	25-30%	53,120
INTERMIG	t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX1	50% desequilibrada der(19)t(1;19)	2-6%	121,122
	t11q23/KMT2A reordenat <i>Excloent la t(4;11), que és de mal pronòstic</i>	t(11;19)(q23;p13.3) / <i>KMT2A-MLLT1</i> Altres <i>partners</i> : 6q27 ( <i>MLLT4/AF6</i> ), 9p21 ( <i>MLLT3/AF9</i> ), 10p12 ( <i>MLLT10/AF10</i> ), 1p32 ( <i>EPS15</i> )	9%	123-125
	iAMP21	Amplificació de 21q22.11-21q22.12	2-5%	77,126
	Cariotip normal	Mínim 20 metafases analitzades	15%	52
	Altres	Alteracions estructurals, 45 cromosomes, no creixement, etc.		52
DESFAVORABLE	Alta hipodiploïdia 40-44 cromosomes		<1%	51
	HIPODIPLOÏDIA <45 cromosomes Índex de DNA <0,8	Baixa hipodiploïdia 30-39 cr. / quasi triploïdia 60-78 cr.	3-5%	51
		Casi haploïdia <30 cromosomes	1%	51
		t(4;11)(q21;q23) / <i>KMT2A-AFF1 (AF4)</i>	2-3%	126
		t(17;19)(q22;p13)/ <i>TCF3-HLF</i>	<1%	127

**Taula 10| Alteracions genètiques en la LLA pediàtrica i pronòstic associat segons el protocol actual SEHOP-PETHEMA 2013.** Gentilesa de la Dra. Ortega i Dra. Camós.

- **Infiltració del sistema nerviós central (SNC)**

Els blasts leucèmics poden infiltrar el líquid cefalorraquidi, fet que s'associa clàssicament a mal pronòstic en totes les edats. Actualment s'ha reduït molt l'impacte negatiu de la infiltració del SNC gràcies al tractament intratecal i a la quimioteràpia a altes dosis de fàrmacs com el metrotexat, capaç de travessar la barrera hematoencefàlica<sup>128,129</sup>.

### **2.8.1.3 Factors pronòstic que depenen del tractament**

- **Resposta al tractament**

Un dels factors pronòstic més importants en la leucèmia aguda pediàtrica és l'avaluació de la **resposta al tractament**. En la LLA, aquesta resposta es pot avaluar de forma precoç mitjançant el recompte del número absolut de blasts en l'estudi morfològic en sang perifèrica després d'una setmana de tractament amb prednisona (dia +8) o als 15 dies del tractament quimioteràpic en moll d'os<sup>130,131</sup>.

Més enllà de l'avaluació morfològica, que té una sensibilitat limitada, es pot avaluar la resposta al tractament i fer un seguiment de l'evolució de la malaltia a través dels nivells de **Malaltia Residual Mínima** o mesurable (*MRM*). La MRM suposa el factor pronòstic evolutiu més important, ja que permet avaluar la sensibilitat de les cèl·lules leucèmiques al tractament. Així, a banda del seu valor pronòstic, la MRM ha permès dirigir la intensitat del tractament i augmentar la taxa de curació dels pacients<sup>132,133</sup>. Actualment, la determinació de la MRM s'utilitza en la majoria de protocols de tractament per a l'estratificació dels pacients.

Existeixen múltiples tècniques per mesurar els nivells de MRM en els diferents subtipus de leucèmia, amb diferent sensibilitat i especificitat. Així, es disposa de tècniques com la **citometria de flux** i tècniques genètiques i moleculars, tant per la LLA<sup>132</sup> com per la LMA<sup>134</sup>. La citometria de flux analitza el perfil proteic d'antígens dels blasts i permet seguir la MRM en funció dels perfils aberrants en cada cas i les diferències fenotípiques respecte les cèl·lules normals. El nivell de sensibilitat de la citometria de flux és molt elevat, però a vegades les aberràncies fenotípiques són mínimes, parcials o poden modular-se i canviar durant el tractament, el que dificulta el seu seguiment, sobretot

en la LMA<sup>135</sup>. D'altra banda, l'estudi de la **clonalitat dels limfòcits B/T** mitjançant l'anàlisi de les immunoglobulines o el receptor de cèl·lules T (IG/TCR PCR) està molt estandarditzat i és la tècnica *gold standard* en la majoria de protocols internacionals per mesurar la MRM, però únicament serveix per leucèmies de línia limfoide<sup>136-138</sup>. L'anàlisi dels transcrits dels **gens de fusió per RT-PCR quantitativa** (qRT-PCR) permet l'obtenció de sensibilitats elevades; no obstant, en ser un mètode basat en RNA, el número de transcrits no reflexa de forma exacta el número de blasts residuals. Finalment, l'estudi dels reordenaments a nivell de DNA genòmic permetria la quantificació de forma exacta de la MRM en els pacients amb gens de fusió, però requereix la identificació de la seqüència específica en cada cas i això pot resultar complex tècnicament. En aquest aspecte, les noves tècniques de seqüenciació massiva juguen un paper important en la implementació d'aquests nous mètodes<sup>139</sup>.

- **Farmacogenòmica**

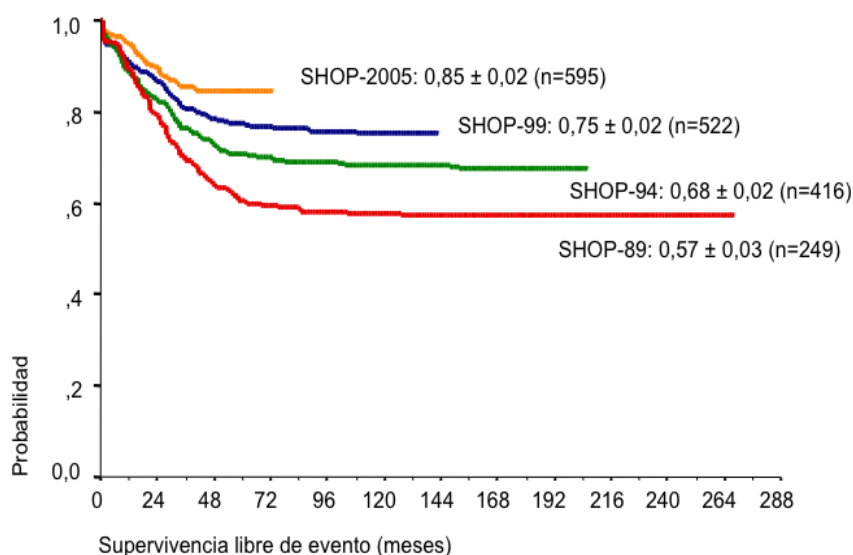
La resposta al tractament ve determinada per (1) la farmacocinètica dels fàrmacs citostàtics, és a dir, com s'absorbeixen, distribueixen, metabolitzen i excreten; i (2) la farmacodinàmia, que és l'efecte farmacològic en funció de la farmacocinètica. Aquestes variables presenten una gran variabilitat interpersonal, determinada per la farmacogenètica. La farmacogenètica és el conjunt de factors constitutius de l'individu que expliquen les variacions en la farmacocinètica i farmacodinàmia durant el tractament del pacient. Dins la farmacogenètica trobem els polimorfismes o mutacions d'enzims que participen en el metabolisme dels fàrmacs<sup>140</sup>.

## **2.9. Supervivència**

### **2.9.1. Supervivència en la LLA**

La supervivència global (SG) i la SLE de la LLA és superior en nens respecte els adults (SG als 5 anys del 85-90% vs. 40-50%, respectivament). En els últims anys és on més ha augmentat la supervivència degut a una millora en l'estratificació dels pacients en grups de risc i l'adaptació del tractament a cada pacient tenint en compte la resposta i els nivells de MRM (Figura 13).

D'altra banda, la creació de grans grups cooperatius ha permès la millora i l'aplicació de nous protocols de tractament en el context d'assaigs clínics<sup>141</sup>. A Espanya, l'aplicació de protocols terapèutics consecutius dins el context de la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica (SEHOP) s'ha traduït en un increment progressiu de la supervivència dels pacients.



**Figura 13| Supervivència lliure d'event dels pacients pediàtrics amb LLA en protocols consecutius de la SEHOP.** SLE de pacients pediàtrics amb LLA segons l'any de tractament en protocols SHOP consecutius. Gentilesa de la Dra. Badell i Dra. Rives, en representació del grup de leucèmies de la SEHOP.

### 2.9.2. Supervivència en la LMA

Tot i que els resultats es troben lluny dels aconseguits en la LLA pediàtrica, la supervivència dels nens amb LMA ha millorat notablement en els últims anys. Aquesta millora ha estat possible gràcies a una millor estratificació dels pacients en grups de risc, l'increment de la intensitat en el tractament quimioteràpic, la implementació de mesures de suport més eficaces i una millora notable en la selecció de donants per la realització del transplantament al·logènic de progenitors hematopoètics (al·lo-TPH). Tot i així, fins un 30-40% dels pacients recauen, i la recaiguda continua sent la principal causa de mort en aquests pacients<sup>142,143</sup>.

Tot i els avenços en les últimes dècades, que han conduït a una millora considerable de la supervivència, encara hi ha alguns subgrups de pacients pediàtrics amb leucèmia aguda amb pronòstic molt desfavorable, com les LLA-T, les leucèmies amb reordenament del gen *KMT2A* o els lactants.

## **2.10. Tractament**

La tendència actual és realitzar un tractament adaptat al risc de cada pacient basat en els factors pronòstic esmentats anteriorment.

A Espanya, els pacients amb LLA pediàtrica es tracten actualment segons la guia terapèutica SEHOP-PETHEMA 2013, iniciada després de la fusió dels grups cooperatius SEHOP i PETHEMA (Programa Español de Tratamientos en Hematología), que es basa en l'esquema I-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster), mentre que els pacients amb LMA pediàtrica reben el protocol NOPHO-DBH-AML-2012 del grup NOPHO (Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology).

### **2.10.1 Tractament de la LLA**

El tractament de la LLA pediàtrica segueix un esquema general que inclou la inducció a la remissió, seguit de tractament de consolidació o intensificació per eliminar la leucèmia residual, la prevenció de la leucèmia a nivell del SNC i el tractament de manteniment per assegurar la persistència de la remissió.

Abans però, de començar l'esquema de tractament específic segons el grup de risc, pot haver-hi una **pre-fase** de tractament amb glucocorticoides, com la prednisona. El grau de resposta a la pre-fase és un reflex de la quimiosensibilitat de la leucèmia i constitueix, com ja hem comentat anteriorment, un factor predictiu de resposta al tractament<sup>130</sup>.

**Inducció:** l'objectiu d'aquest tractament és induir una remissió completa (RC) en un període de 4-5 setmanes mitjançant l'eradicació de més del 99% de la població inicial de cèl·lules leucèmiques, conduint així a la restauració de l'hematopoesi normal. Així, la RC post-inducció es confirma per la presència de <5% de blasts a la medul·la òssia,

que actualment s'assoleix en el 97-99% dels casos. Els pacients que no assoleixen una RC o presenten una MRM alta (>1%) post-inducció són candidats a tractaments més intensius, com el al·lo-TPH<sup>144</sup>.

Les pautes d'inducció estan constituïdes per glucocorticoides (prednisona, prednisolona o dexametasona), vincristina, asparaginasa i un antraciclínic (normalment daunorubicina). Alguns protocols per pacients d'alt risc afegeixen ciclofosfamida, metotrexat, arabinòsid de citosina (Ara-C) o etopòsid. Per a la profilaxi del SNC s'afegeixen dosis intratecals de metotrexat, sol o combinat amb Ara-C i prednisona.

La mortalitat en inducció és relativament baixa (1%, aproximadament) i es deu principalment a infeccions.

**Consolidació o intensificació:** l'objectiu de la consolidació és eliminar la malaltia residual, mentre que la intensificació busca la RC en aquells pacients que no l'han assolit durant la inducció. La intensitat i durada del tractament estan ajustades en funció del risc de recaiguda del pacient segons el protocol assistencial i s'administren fàrmacs com el metotrexat, la mercaptopurina, l'Ara-C i l'asparaginasa.

En aquest punt és clau l'avaluació de la MRM, ja que determina des d'un canvi de grup de risc del pacient fins a la selecció dels pacients candidats a rebre un al·lo-TPH un cop finalitzada la consolidació.

**Reinducció:** aquesta fase s'inicia dues setmanes després de la consolidació. Inclou l'ús de vincristina, doxorubicina, asparaginasa, entre d'altres, així com la disminució progressiva de l'ús de dexametasona.

**Manteniment:** aquesta fase comença després de recuperar l'hematopoesi i amb el pacient amb bon estat general, aproximadament dues setmanes després d'acabar l'última dosi de tractament quimioteràpic intensiu. Durant el manteniment s'administren dosis orals diàries de 6-mercaptopurina juntament amb dosis setmanals de metotrexat. Aquest tractament té una durada llarga, fins a completar 2 anys després del diagnòstic, i en cas d'interrupcions de tractament, s'han de recuperar el mateix número de setmanes que s'ha interromput el tractament.

### **2.10.2 Tractament de la LMA**

De la mateixa manera que en la LLA, el tractament de la LMA inclou en la majoria de protocols un o dos cicles d'inducció seguits de dos a tres cicles de consolidació o post-remissió. A diferència de la LLA, la majoria de grups han abandonat el tractament de manteniment, exceptuant el subgrup de la leucèmia promielocítica (LPA)<sup>145</sup>.

**Inducció:** l'esquema general "3+7", que inclou daunorubicina durant 3 dies i citarabina durant 7 dies, ja des de 1980, va demostrar un augment en la taxa de remissió, actualment assolida aproximadament en un 90% dels pacients pediàtrics amb LMA.

**Post-remissió:** diferents estudis de grups cooperatius com el *Children Oncology Group* (COG) i el *International I-BFM Study Group* (I-BFM SG) van demostrar el benefici de l'administració d'altres dosis de citarabina com a tractament post-remissió en nens amb LMA<sup>146-148</sup>.

### **2.10.3 Pacients amb abordatge diferencial**

Hi ha alguns subgrups de pacients que requereixen un abordatge diferent, com els lactants, els pacients Ph+ o els pacients amb Síndrome de Down, que segueixen **protocols adaptats**.

A més a més, el grup de pacients en **recaiguda** segueixen també un protocol diferent, que té en compte la localització de la recaiguda, l'immunofenotip i la presència o no de determinades alteracions genètiques establertes com a factors pronòstic en aquest subgrup de pacients.

La majoria de nens amb LLA recaiguda pot assolir una segona RC; no obstant, en molts d'aquests pacients la quimioteràpia convencional no és suficient per mantenir aquesta remissió. Per tant, tant el al·lo-TPH com les noves aproximacions terapèutiques són actualment oportunitats per rescatar aquests pacients.

A continuació es descriuen dos d'aquests subgrups de pacients que requereixen aproximacions terapèutiques diferencials: els lactants i els pacients amb reordenament *KMT2A*.

#### a. Lactants

Tot i que la leucèmia és el càncer més freqüent en la infància, la freqüència és encara més infreqüent en nens menors d'un any d'edat (0,5-1/100.000 habitants/any). En els lactants, a diferència de nens més grans, la freqüència de la LMA és similar a la de la LLA, i dins d'aquesta gairebé totes són de llinatge B. La leucèmia del lactant es presenta freqüentment de forma explosiva i amb una important càrrega tumoral: hiperleucocitosi, grans visceromegàlies i extensió extra-hematològica, especialment en el SNC i la pell.

Independentment del llinatge, la cèl·lula leucèmica és sovint molt immadura citològicament i immunològicament i presenta unes característiques genètiques distintives de la leucèmia del nen més gran. Així, un 80% dels lactants amb LLA i un 50% dels casos de LMA presenta com esdeveniment genètic el reordenament del gen *KMT2A*. A nivell transcripcional també presenten una signatura particular, de manera que hi ha diferències entre els lactants de menys i de més de 3 mesos d'edat, independentment de les diferències per la presència del reordenament del gen *KMT2A*<sup>149</sup>.

Aquests pacients tenen pitjor pronòstic, amb taxes de curació entre el 50 i 60% en el cas de les LMA, però un pronòstic pèssim, per sota del 20%, en cas dels lactants menors de 3 mesos amb LLA i reordenament del gen *KMT2A*<sup>150</sup>. En gran mesura, el mal pronòstic d'aquests nens es deu a la presència del reordenament del gen *KMT2A*.

Els aspectes farmacogenètics i farmacodinàmics de la quimioteràpia que s'administra a aquest grup d'edat són molt més desconeguts que en nens més grans, i poden influir de forma significativa en l'eficàcia o la toxicitat aguda o crònica en aquests pacients. L'edat inferior a sis mesos, la mala resposta a la prednisona, la hiperleucocitosi superior a  $300 \times 10^9/L$ , la presència del reordenament del gen *KMT2A* i la MRM elevada són factors pronòstic adversos<sup>150-152</sup>. Des del punt de vista de tractament, aquests pacients presenten bona sensibilitat als anàlegs de nucleòsids, com la citarabina, i una



resistència *in vitro* als corticoides i l'asparaginasa. L'al·lo-TPH pot indicar-se en el subgrup de pacients amb reordenament del gen *KMT2A* que, a més, tenen altres factors de risc<sup>150</sup>. La immaduresa immunològica pròpia del lactant, sumada als efectes immunosupressors del tractament, fan d'aquest grup de pacients un grup vulnerable a les infeccions, amb una elevada morbiditat infecciosa, que impacta de forma negativa en la supervivència global. Per tant, poder disposar de tractaments més dirigits en front a dianes moleculars podria disminuir la toxicitat i augmentar l'eficàcia dels tractaments convencionals i, per tant, augmentar-ne la supervivència.

#### **b. Pacients amb reordenament del gen *KMT2A***

El subgrup de pacients amb reordenament del gen *KMT2A* (*MLL*, *LA-MLL+*) representa el 10% de tots els casos de leucèmia aguda i pot presentar-se a qualsevol edat, bé *de novo* o bé de forma secundària al tractament amb inhibidors de la topoisomerasa-II. En l'edat pediàtrica s'observa en un 6-10% de les LLA i en un 15-25% de les LMA, tot i que representa més del 80% de casos de leucèmia en lactants menors de 12 mesos d'edat<sup>64</sup>.

Tot i els avenços en quant a la biologia d'aquesta entitat (revisats en l'apartat 2.7.1.1.f i 2.7.3.1), aquests no s'han traslladat en una millora en la supervivència. En les últimes dècades, s'han desenvolupat diversos fàrmacs amb potencial terapèutic per aquest subtipus de pacients. Entre aquests s'inclouen bloquejadors de les proteïnes ENL i AF9, de taspasa 1, oligonucleòtids antisentit, inhibidors de DOT1L, BET, SET i MEN1/LEDGF<sup>68</sup>. Moltes d'aquestes aproximacions, com els inhibidors de DOT1L, que semblaven els més prometedors segons la literatura, han fracassat per l'aparició de resistència a la teràpia. Per contra, encara no hi ha prou dades a partir d'assajos clínics respecte els inhibidors de MEN1 o del domini SET, però sembla previsible que puguin aparèixer el mateix tipus de problemes<sup>68</sup>. Una de les possible explicacions d'aquest fracàs és que tots aquests inhibidors tenen com a diana algun domini crític per la funció del gen *KMT2A*, no només el domini de la proteïna oncogènica de fusió, sinó també la forma *wild-type*. Per tant, és necessari el desenvolupament d'estratègies terapèutiques més selectives que mantinguin la funcionalitat del gen *KMT2A* i

desplacin, tant mecanísticament com funcionalment, la proteïna de fusió aberrant. D'altra banda, totes les estructures associades a la proteïna representen dianes moleculars importants en l'origen i manteniment de la malaltia; d'acord a les dades obtingudes en diferents estudis, el programa epigenètic juga un paper important en les leucèmies *KMT2A*<sup>68</sup>. Així, la cerca de noves estratègies terapèutiques per aquests subtipus de pacients d'alt risc roman com un dels principals objectius de la leucèmia pediàtrica aguda.

## 2.12 Efectes secundaris, seqüeles i segones neoplàsies

Degut a que les taxes de supervivència són cada vegada millors en els pacients amb leucèmia aguda, els efectes secundaris i la qualitat de vida en els supervivents de la malaltia són aspectes que estan guanyant importància en els últims anys. Els efectes secundaris poden aparèixer mesos o fins i tot anys després d'acabar el tractaments<sup>153,154</sup>.

Entre els efectes secundaris més comuns en els pacients de leucèmia pediàtrica destaquen:

- **Cardiotoxicitat:** donada per l'ús d'antraciclínics durant el tractament. A llarg termini pot augmentar el risc de mortalitat . Tot i la limitació de l'ús d'altres dosis d'antraciclínics, també baixes dosis acumulades s'associen a canvis en l'electrocardiograma.
- **Neurotoxicitat:** el tractament intratecal afecta directament el SNC, de manera que poden aparèixer dèficits neurocognitius com alteracions en la mobilitat, la parla o l'atenció, així com un augment a llarg termini de dolors neurològics focals, disminució de la sensibilitat i alteracions en l'oïda o la vista.
- **Desregulació endocrina:** l'alteració hormonal més freqüent en nens és la de l'hormona de creixement com a conseqüència de l'afectació de l'hipotàlem i la glàndula pituïtària. Aquest desordre és freqüent en els pacients que han rebut irradiació cranial.

- **Obesitat:** bé per l'ús prolongat de corticoides com per la irradiació sobre la hipòfisi.
- **Reproductius i desenvolupament sexual:** tant la quimioteràpia com la irradiació sobre les gònades pot donar lloc a problemes de desenvolupament durant la pubertat, així com problemes d'infertilitat.
- **Aspectes psico-socials i emocionals:** inclou dificultats cognitives en processos d'aprenentatge i memòria, angoixa, depressió, por, etc., que poden comprometre la interacció del nen amb l'entorn.
- **Segones neoplàsies:** és un dels efectes secundaris més rellevants al tractament amb quimioteràpia i radioteràpia. La irradiació, especialment cranial, s'ha associat amb un augment de l'aparició de segones neoplàsies.

### 2.13 Altres teràpies i nous tractaments

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'heterogeneïtat clonal està relacionada amb la resistència al tractament i amb l'aparició de recaigudes, de manera que com més heterogeneïtat clonal existeixi al diagnòstic, més probabilitats de tenir un clon resistent<sup>155</sup>. Així, la identificació d'alteracions genètiques i epigenètiques en el diagnòstic responsables de la progressió de la malaltia ha permès el disseny de noves estratègies terapèutiques.

#### ▪ **Transplantament de progenitors hematopoètics**

El al·lo-TPH consisteix en la substitució dels progenitors del moll de l'os per uns progenitors sans, després d'una ablació dels progenitors aberrants. El transplant pot ser al·logènic (d'un donant) o bé autòleg (del propi pacient), i poden obtenir-se progenitors de medul·la òssia, cordó umbilical o sang perifèrica.

L'ús del TPH és un tema en constant revisió. Les indicacions d'al·lo-TPH en pacients en primera RC en LMA són controvertides, i en general els grups nord-americans recomanen aquesta indicació més sovint que els grups europeus<sup>156</sup>. Els grups europeus es basen en estudis que conclouen que l'eventual benefici de reduir el risc de recaiguda en els pacients que reben TPH en primera RC és inferior al potencial risc de

mortalitat relacionada amb el tractament (*Treatment Related Mortality*, TRM), greus complicacions a llarg termini (malaltia d'empelt contra l'hoste (EICH), infertilitat, alteracions en el creixement, etc.) i reduïdes taxes de rescat en recaiguda post-TPH. No obstant, les millores en el TPH estan disminuint notablement aquests inconvenients i la majoria de pacients en segona RC són candidats a TPH<sup>157,158</sup>.

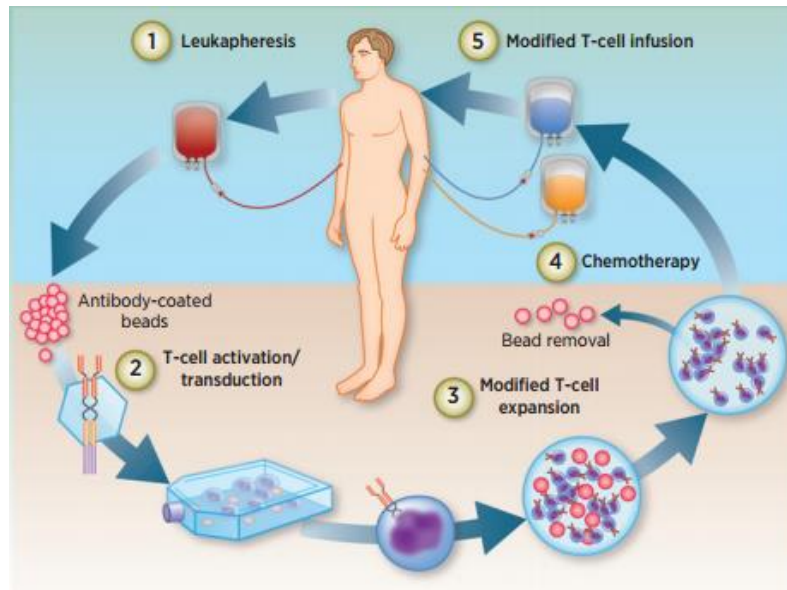
- **Immunoteràpia basada en anticossos**

L'ús d'anticossos ha començat a proporcionar resultats interessants en la LLA. Aquest tractament consisteix en el disseny d'anticossos monoclonals dirigits contra antígens propis de la diferenciació limfoide (sobretot de línia B) conjugats amb immunotoxines o quimioteràpics, com el rituximab (CD20) i l'ilotuzumab (CD22).

D'altra banda, trobem els anticossos biespecífics, els quals estan formats per dues molècules d'immunoglobulina que permeten el reconeixement de dos antígens diferents: l'un de la cèl·lula leucèmica i l'altre dels limfòcits T. Així es fa possible la unió i el reconeixement directe per part de la cèl·lula citotòxica de la cèl·lula tumoral. El blinatumomab n'és un bon exemple, el qual reconeix d'una banda l'antigen CD3 dels limfòcits T i per l'altra l'antigen CD19 dels blasts de línia B<sup>159</sup>.

- **CARTs**

Els CAR (*Chimeric Antigen Receptor*) són constructes sintètiques formats per un domini extracel·lular dirigit contra un antígen determinat, una regió bisagra, un domini transmembrana i un domini de senyalització intracel·lular. El principi d'aquesta immunoteràpia radica en l'enginyeria genètica que es duu a terme *in vitro* en les cèl·lules T del pacient, de manera que s'indueix l'expressió d'un CART (*CAR T-cell*) dirigit contra les cèl·lules tumorals, en aquest cas CD19. Així, s'extreuen els limfòcits T del pacient i es cultiven *in vitro* per tal d'integrar en el genoma mitjançant lentivirus o retrovirus la seqüència genètica que codifica pel receptor CAR<sup>160-162</sup> (Figura 14).



**Figura 14| Procediment d'immunoteràpia amb CART.** Els limfòcits T del pacient es recullen pel mitjançant una leucafèresi i una posterior selecció amb boles magnètiques. Seguidament, els limfòcits T s'activen i *ex vivo* es reprogramen genèticament mitjançant la transducció d'un constructe sintètic que codifica pel CAR. Posteriorment els limfòcits T amb CAR s'expandeixen *in vitro*. Finalment, quan el producte de CAR-T ha passat els controls de qualitat, el pacient rep una quimioteràpia limfodepletora i s'infon el CAR-T<sup>160</sup>.

El disseny dels CARTs ha evolucionat molt en els últims anys, i tot i que el CART anti-CD19 és el més evolucionat i emprat, diferents estudis han demostrat la seva potent activitat antileucèmica en pacients amb LLA-B. Concretament, durant aquest any 2018, s'han publicat els resultats del primer assaig clínic pediàtric europeu amb CART-19, (ClinicalTrials.gov number NCT02435849), el qual ha permès amb una única infusió de CART la remissió completa i perllongada en pacients amb LLA-B recaiguts o refractaris, amb efectes secundaris greus però transitoris, com el síndrome d'alliberació de citocines, la neurotoxicitat i la hipogammaglobulinèmia<sup>163</sup>.

- **Inhibidors moleculars**

La incorporació en el tractament de primera línia d'inhibidors de rutes metabòliques essencials per les cèl·lules neoplàsiques ha permès l'inici de la medicina personalitzada. En general, els inhibidors moleculars són més específics, ja que van dirigits contra una diana concreta.

Els primers en aparèixer i revolucionar el tractament de les LLA Ph+ van ser els **inhibidors tirosina-cinases (tyrosin kinase inhibitors, TKI)**, concretament l'imatinib, el que va permetre una millora significativa en la supervivència d'aquests pacients<sup>61,62</sup>. Actualment s'estan desenvolupant altres TKI dirigits contra altres molècules rellevants per la supervivència de les cèl·lules neoplàsiques, com FLT3 (ex. quizartinib, midostaurin, sorafenib), PI3K, RAS, etc. També estan augmentant el nombre d'assajos clínics que inclouen **inhibidors serina/treonina cinases** que tenen per objectiu inhibir vies com JAK/STAT (ex. ruxolitinib) o mTOR (ex. rapamicina). Els **inhibidors del proteasoma** (ex. bortezomib) també estan en vies de desenvolupament. Aquests inhibidors inhibeixen el creixement tumoral a través de diferents mecanismes i finalment inactiven el factor NF-κB, el qual representa un factor clau en la supervivència de les cèl·lules malignes degut a les seves funcions anti-apoptòtiques. Finalment, entre els nous tractaments es troben les **dianes epigenètiques**. Les modificacions epigenètiques en promotors gènics juguen un paper important en l'expressió dels gens, de manera que poden donar lloc al silenciament transcripcional de gens supressors de tumors, conduint a la transformació maligna de les cèl·lules. Aquestes modificacions poden tractar-se amb inhibidors de DNA metiltransferases (DNMT) o d'histones deacetilases (HDAC), així com inhibidors específics de molècules amb funcions epigenètiques com DOT1L<sup>159</sup>.

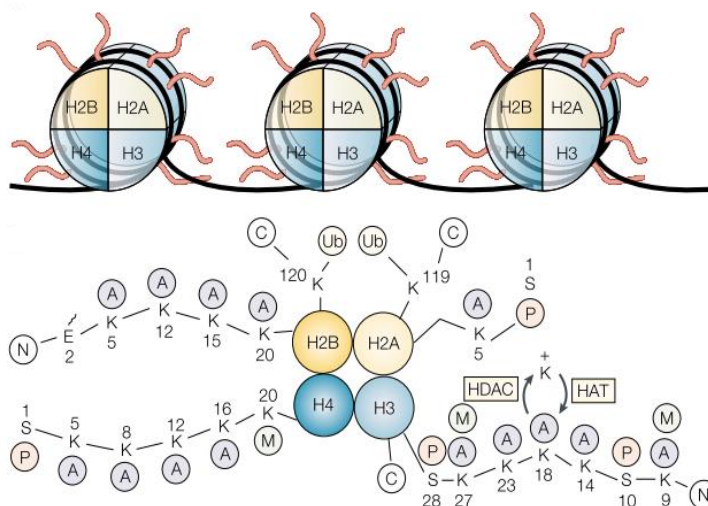
Degut al baix nombre de *hits* o alteracions acumulades necessàries per a la transformació maligna de la leucèmia pediàtrica, resulta necessari continuar amb la cerca i la implementació de nous agents terapèutics dirigits contra dianes terapèutiques específiques. Així, un dels objectius del tractament de la leucèmia aguda és proporcionar una teràpia dirigida i personalitzada contra aberràncies pròpies de la leucèmia que permetin una millora en la supervivència alhora que una reducció de la quimioteràpia convencional, la disminució de la toxicitat associada i finalment de l'aparició d'efectes secundaris.

### 3. HISTONES DEACETILASES

#### 3.1. Epigenètica

En els organismes eucariotes, la compactació de l'ADN és essencial tant per l'organització de grans genomes com pel control de l'expressió gènica. Així, l'ADN s'organitza en nucleosomes: un complex multiproteic format per un octàmer de proteïnes histones (H2A, H2B, H3 i H4) que permet enrotllar 146 parells de bases. Progressivament l'ADN es va enrotllant sobre sí mateix en els nucleosomes donant lloc a l'estructura compacta que coneixem com a cromatina<sup>164</sup>.

En aquesta estructura, les cues N-terminals de les histones i les C-terminals de les H2A queden exposades a l'exterior del nucleosoma, permetent l'accés a enzims que modifiquen de forma covalent i reversible els residus de les cues de les histones (Figura 15).

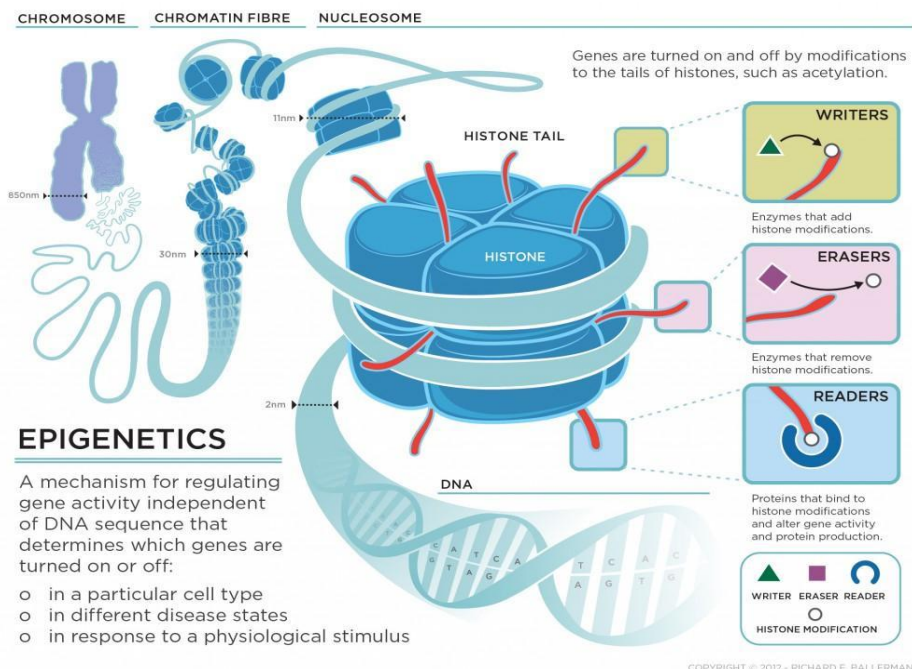


**Figura 15|** Figura esquemàtica de l'estructura de les histones en els nucleosomes i dels residus en les seves cues<sup>178</sup>.

Podem classificar els enzims modificadors postraduccionals en:

- *Writers* o escriptors: afegeixen les modificacions postraduccionalment a l'ADN. Inclouen enzims com KMT2A (MLL), DOT1L, PRMT1, p300, KAT6A (MYST3, MOZ), PCAF, EZH2 i DNMT3.
- *Readers* o lectors: reconeixen les modificacions postraduccionalment i interpreten aquest "codi d'histones" per tal de mediar una resposta cel·lular adequada a través de molècules efectores. Inclou proteïnes amb dominis Bromo, Chromo, PHD o repeticions WD40.
- *Erasers* o esborradors: eliminen les modificacions en les cues d'histones, ja que com hem comentat abans aquest procés és reversible. En aquest grup trobem enzims com HDAC, KDM1A (LSD1), KDM5A (JARID1A), TET i AID.

Així, amb aquestes modificacions de la cromatina es permet canviar d'un estat basal compacte i tancat de la cromatina i per tant de repressió gènica a un estat obert que permet l'acoblament de la maquinària de transcripció i factors de transcripció, donant lloc a la transcripció gènica dels gens diana. Aquests canvis que es produeixen en l'expressió dels gens sense alterar la seqüència de l'ADN és el que es coneix com **epigenètica**<sup>163</sup> (Figura 16).



**Figura 16| Compactació de l'ADN i modificacions epigenètiques.** L'ADN es compacta en l'estructura de la cromatina i interacciona amb enzims que modifiquen covalentment les cues d'histones. La figura mostra els diferents tipus d'enzims modificadors de les cues d'histones. Adaptada de<sup>162</sup>.



Tradicionalment, el càncer s'ha considerat una malaltia genètica per la presència de mutacions i delecions així com anomalies cromosòmiques que resulten en pèrdua de funció de gens supressors de tumors o bé guany de funció o hiperactivació d'oncogens. No obstant, cada vegada hi ha més evidències de que l'expressió gènica mediada pels canvis epigenètics també juga un paper important en l'inici i progressió del càncer.

### 3.2. Histones deacetilasa (HDAC)

Les modificacions d'histones per acetilació (HAT, *histone acetyl-transferase*) i deacetilació (HDAC, *histone deacetyl-transferase*) juguen un paper crucial en la regulació de l'expressió gènica modificant l'estructura de la cromatina i modulant així l'accessibilitat dels factors de transcripció a les regions de l'ADN diana.

L'acetilació és un procés dinàmic i reversible que consisteix en l'addició de grups acetil a les lisines de les cues d'histones, dut a terme per les HAT. Aquest grup acetil neutralitza la càrrega positiva de les lisines i propicia una cromatina oberta que permet l'accessibilitat i reclutament de factors de transcripció, promovent la transcripció gènica. Per contra, la **funció deacetiladora de les HDACs**, elimina el grup acetil i restaura la càrrega positiva de la lisina, tot provocant la interacció entre la cua d'histona (càrrega positiva) i l'ADN (carrega negativa). Aquesta deacetilació condueix a un estat tancat de la cromatina i per tant a la repressió de la transcripció<sup>164</sup>. Així doncs, en general, l'acetilació de proteïnes s'associa a l'activació gènica, mentre que la deacetilació a repressió de la transcripció (Figura 17).

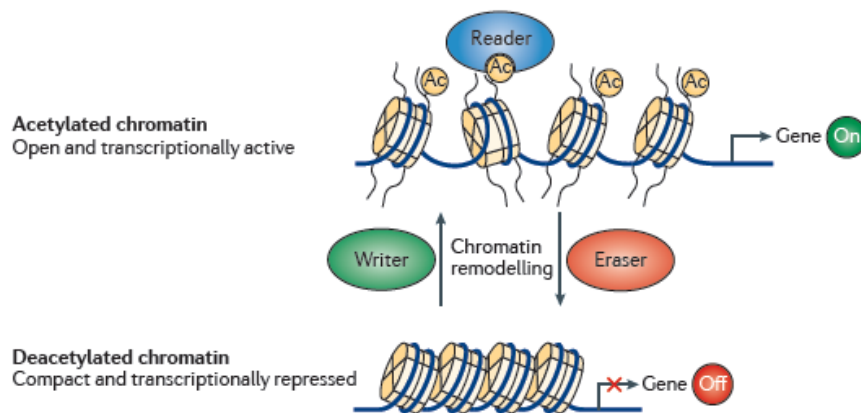


Figura 17| Procés d'acetilació i deacetilació d'histones, estructura de la cromatina i expressió gènica<sup>165</sup>.

Aquest procés d'acetilació i deacetilació no només es dona en histones, sinó que també ocorre en **proteïnes no-histones**. La modulació entre l'estat acetilat i no acetilat de proteïnes no-histones modifica molts processos cel·lulars com l'*splicing* de mRNA, transport i integritat, localització cel·lular, estabilitat i interacció de proteïnes. Algunes de les proteïnes que es veuen modulades per les HDACs són p53, RUNX3, STAT3, MYC, GATA i NF- $\kappa$ B, entre d'altres<sup>166,167</sup>.

A més a més, la majoria d'HDACs clàssiques formen **grans complexos multiproteïcs** amb diferents repressors transcripcionals com Sin3, NuRD, NcoR, CoREST i SMRT, entre d'altres, amb funcions remodeladores de la cromatina (Figura 18). Aquests complexos poden actuar o bé interaccionant directament sobre la cromatina o actuant sobre proteïnes repressores<sup>168</sup>.

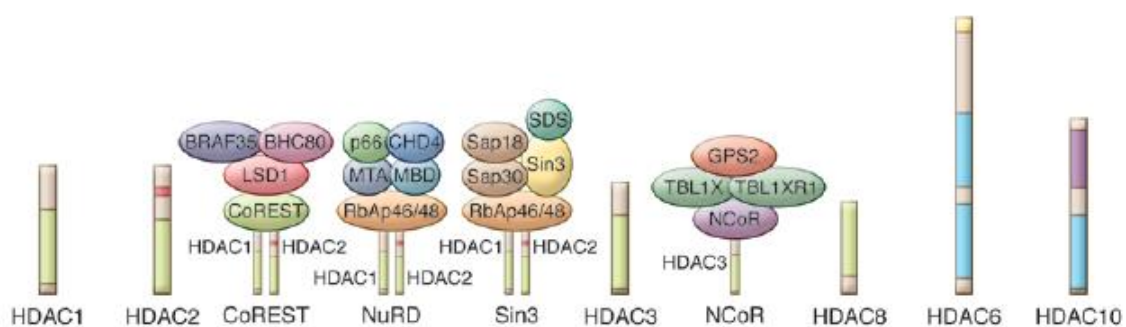


Figura 18| HDACs i els complexos proteïcs als que s'associen<sup>168</sup>.

### 3.2.1 Família d'HDACs

La família d'HDACs és molt heterogènia en quant a fisiologia i patologia. En mamífers, s'han identificat un total de 18 HDACs i classificat en quatre classes segons l'homologia en llevat (Figura 19 i Taula 11). Les HDACs de classe I es localitzen en el nucli i s'hi inclouen les HDAC1, 2, 3 i 8. Les HDAC4, 5, 7 i 9 pertanyen a la classe IIa, mentre que l'HDAC6 i HDAC10 formen la classe IIb, i es troben tant en nucli com en citoplasma. Finalment l'HDAC11 representa la classe IV. Mentre que l'activitat enzimàtica de les HDACs clàssiques (classe I, II i IV) és dependent de Zinc<sup>2+</sup>, les HDACs de classe III, les sirtuïnes (*SIRT1-7*), realitzen la seva funció catalítica a expenses de NAD<sup>+</sup><sup>169</sup>.

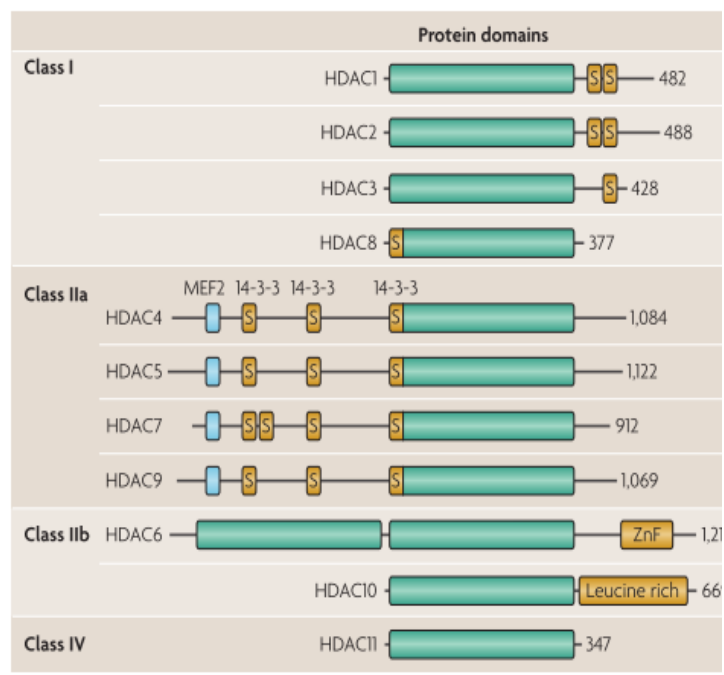


Figura 19| Estructura de les HDACs clàssiques <sup>170</sup>.

### 3.2.1.1 Classe I

Les HDACs de classe I es caracteritzen per tenir una estructura molt conservada, són les més abundants, s'expressen en tots els teixits i es localitzen principalment en el nucli, exercint la seva activitat catalítica sobre les histones.

L'HDAC1 i HDAC2 són semblants en quant a funció i estructura i estan involucrades en molts processos cel·lulars importants, com la proliferació, el cicle cel·lular i l'apoptosi. L'HDAC3 participa en processos de cicle cel·lular i resposta a dany de l'ADN, i finalment l'HDAC8 es localitza principalment en el citosol i s'expressa en cèl·lules amb diferenciació de múscul llis. Les HDACs de classe I també es troben formant part de complexos multiproteics que són reclutats pels gens diana per tal de mediar la repressió transcripcional. Així, l'HDAC1 i l'HDAC2 són les subunitats catalítiques dels complexos Sin3, Mi-2/NurD i CoREST, mentre l'HDAC3 és reclutat principalment pel complex N-CoR/SMRT (Figura 18). Actualment no s'ha descrit cap complex multiproteic que recluti HDAC<sup>169,170</sup>.

### 3.2.1.2 Classe IIa

Les HDAC4, 5, 7 i 9 pertanyen a aquesta classe de la família d'HDACs i a diferència de les HDACs de classe I, la seva expressió és teixit-depenent, i poden trobar-se tant en el nucli com en el citoplasma. L'HDAC5 i l'HDAC9 es troben altament expressades en teixit muscular, cor i cervell; l'HDAC4 s'expressa sobretot en esquelet i l'HDAC7 s'expressa principalment en cèl·lules endotelials i en cèl·lules T precursors derivades del timus. Sobretot estan involucrades en processos de diferenciació i desenvolupament.

Es caracteritzen per presentar llargues extensions N-terminal conservades com a llocs d'unió per factors de transcripció de la família MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*) i a la xaperona 14-3-3. A més, en aquesta regió també es troben residus serina susceptibles de fosforil·lar-se. La fosforil·lació i la unió a la proteïna 14-3-3 permeten el canvi de localització d'aquestes HDACs entre el nucli i el citoplasma. D'altra banda, la dissociació de les HDACs dels llocs d'unió de MEF2 permeten l'associació de HATs com p300 a aquests factors de transcripció, transformant la seva activitat repressora en activadora. Així doncs, sembla que l'activitat repressora d'aquestes HDACs no resideix únicament en la seva activitat enzimàtica deacetiladora, sinó que són co-repressors en funció de la senyalització cel·lular. A més, s'ha descrit que els dominis reguladors de les HDACs de classe IIa poden reclutar HDACs de classe I, de manera que part de la seva activitat catalítica vindria donada per aquestes. De fet, recentment s'ha pogut definir la base bioquímica de l'activitat catalítica de les HDAC de classe I i IIa. Així, les HDAC de classe I presenten en el domini catalític una tirosina altament conservada que actua d'estabilitzador durant la reacció de deacetilació, mentre que les HDACs de classe IIa presenten una histidina. Aquest canvi redueix a 1000 vegades menys l'activitat catalítica de les HDACs de classe IIa. No obstant, aquests estudis s'han realitzat *in vitro* i la rellevància d'aquesta troballa *in vivo* és incerta ja que, com s'ha comentat anteriorment, la major part d'activitat repressora de les HDACs de classe IIa es duu a terme a través de la interacció amb factors de transcripció<sup>169-171</sup>.

### 3.2.1.3 Classe IIb

L'HDAC6 i l'HDAC10 formen aquesta classe. L'HDAC6 és la principal HDAC que es localitza en el citoplasma i es diferencia de la resta en la presència de dos dominis

catalítics en la seva estructura. Els gens diana d'aquesta histona deacetilasa són proteïnes del citoesquelet i proteïnes transmembrana, com l'alfa-tubulina i les xaperones. Pel que fa a l'HDAC10, té una estructura i propietats similar a l'HDAC6. A diferència de la primera, però, el segon domini catalític no és funcional. En el nucli s'uneix específicament a l'HDAC2, HDAC3 i SMRT i més recentment s'ha descrit la seva unió a metaloproteïnases (MPP)<sup>172</sup>.

### 3.2.1.4 Classe III

La classe III d'HDACs està formada per les sirtuïnes. Aquestes HDACs tenen funció deacetilasa, però a diferència de la resta d'isoformes, tenen activitat catalítica dependent de NAD<sup>+</sup> i, per tant, estan relacionades amb consum energètic cel·lular. És per això que en aquest sentit s'associen a regulació de processos en condicions d'estrés oxidatiu, homeostasi, inflamació, envelliment i càncer<sup>173</sup>.

En mamífers, hi ha 7 sirtuïnes (SIRT1-SIRT7) que conserven un domini catalític que duu a terme funcions de deacetilació i ADP-ribosilació (Figura 20).

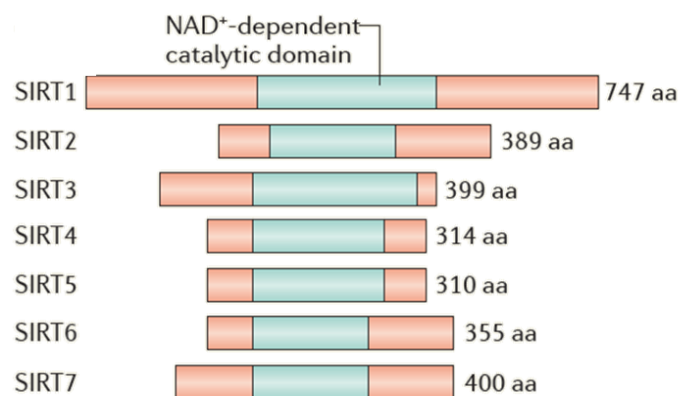


Figura 20| Estructura de les sirtuïnes<sup>174</sup>.

De la mateixa manera que les HDACs clàssiques, les sirtuïnes participen en diferents processos biològics, amb especial implicació en la resposta cel·lular a inestabilitat genòmica a través de la regulació del cicle cel·lular, la reparació de l'ADN i processos de supervivència i apoptosi<sup>175</sup>.

La SIRT1 es localitza principalment en el nucli, de manera que té com a substrats factors de transcripció, proteïnes de reparació de dany a l'ADN i enzims de metabolisme cel·lular. La SIRT2 es troba majoritàriament en el citoplasma, tot i que

durant la mitosi accedeix al nucli per regular diferents punts de control del procés. Les SIRT3, SIRT4 i SIRT5 són sirtuines mitocondrials i regulen principalment enzims que participen en processos com l'oxidació d'àcids grassos, el cicle de Krebs o de l'urea i la producció d'espècies reactives a l'oxigen (*reactive oxygen species*, ROS). Finalment, les sirtuines SIRT6 i SIRT7 són proteïnes unides a la cromatina, pel que es localitzen en el nucli, i regulen processos de senescència, entre d'altres<sup>174</sup>.

### 3.2.1.5 Classe IV

L'HDAC11 és l'únic component d'aquesta classe. La seva expressió està enriquida en cervell, cor, teixit muscular i testes, però no es coneix gaire la seva funció. L'estructura, però, conserva semblances amb les HDAC de classe I i II, amb un domini catalític i petits extrems N- i C-terminal. L'HDAC11 participa principalment en la immunosupressió, la replicació de l'ADN i el desenvolupament neuronal<sup>176</sup>.

Classificació	HDAC	Localització citogenètica	Localització subcel·lular	Substrats no-histona (parcialment coneguts)
Classe I	HDAC1	1p35.1	nucli	RB1, SHP, p53. MyoD, E2F1, STAT3, NF-kB, CtIP, AMPK
	HDAC2	6q21	nucli	GCCR, BCL6, STAT3, YY1
	HDAC3	5q31.3	nucli	SHP, YY1, GATA1, p65, STAT3, MEF2D
	HDAC8	Xq13.1	nucli	SMC3, actina
Classe IIa	HDAC4	2q37.3	nucli/citoplasma	GATA1, HP1
	HDAC5	17q21.31	nucli/citoplasma	SMAD7, HP1
	HDAC7	12q13.11	nucli/citoplasma	PLAG1, PLAG2
	HDAC9	7p21.1	nucli/citoplasma	-
Classe IIb	HDAC6	Xp11.23	majoritàriament citoplasma	$\alpha$ -tubulina, HSP90, SHP, SMAD
	HDAC10	22q13.31-q13.33	nucli/citoplasma	-
Classe III	SIRT1	10q21.3	nucli/citoplasma	p53, $\beta$ -catenina, Ku70, E2F1, Rb, NF-Kb, PGC1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , MyoD, PCAF, FOXO3, HIF1 $\alpha$
	SIRT2	19q13.2	Citoplasma	$\alpha$ -tubulina, FOXO1
	SIRT3	11p15.5	nucli/citoplasma	IDH2, SDH, CypD, p53, FOXO3A, MRPL10, GDH, LCAD, Ku70, LKB1, NDUFA9
	SIRT4	12q24.31	mitocondris	IDE, ANT2/3, GDH
	SIRT5	6p23	mitocondris	CPS1, Cytochrome C
	SIRT6	19p13.3	nucli	NF-kB, CtBP, DNA, PK, PARP1, HIF1 $\alpha$
	SIRT7	17q25.2	nucli	p53
Classe IV	HDAC11	3p25.2	nucli/citoplasma	-

**Taula 11| Classificació de les diferents HDACs segons la seva posició cromosòmica, la localització subcel·lular i els seus substrats no histona coneguts.** Adaptada de<sup>177</sup>.

### **3.2.2 Funció de les HDACs**

Tradicionalment, les HDACs s'han considerat repressors transcripcionals, en tant que d'una banda estableixen la cromatina en una estructura tancada, fent-la menys accessible als factors de transcripció, i de l'altra, com a components de grans complexes repressors. A més, també regulen l'expressió gènica indirectament, modulant l'activitat de diferents factors de transcripció. Així doncs, no és d'estranyar que les HDACs participin en diferents processos cel·lulars com l'apoptosi, mecanismes de reparació de l'ADN, control del cicle cel·lular, autofàgia, metabolisme i senescència, funcions de les xaperones i angiogènesi, entre d'altres<sup>177</sup>.

#### **3.2.2.1 Deacetilació d'histones**

Les modificacions d'histones poden afectar a la cromatina en diferents sentits. Com ja hem comentat anteriorment, la deacetilació de les lisines de les cues d'histones condueix a la interacció electrostàtica de la càrrega positiva de la lisina i la càrrega negativa de l'ADN, provocant el tancament de la cromatina (veure figura 14).

En concret, l'HDAC1 deacetila la H3K9, l'HDAC2 deacetila la H3K56 i l'HDAC3 l'H4K5 i l'H4K12<sup>179</sup>. Pel que fa a les HDACs de classe IIa, només mostren activitat histona deacetilasa quan interaccionen amb l'HDAC3, i l'HDAC6 és el principal deacetilador de proteïnes no-histona en el citoplasma. Entre les sirtuïnes, només la SIRT1, SIRT2 i SIRT6 tenen funció deacetiladora, concretament la SIRT1 i SIRT2 deacetilen H3K56, una marca recurrent en diferents tipus de càncer. Finalment, l'HDAC11 deacetila específicament la H3K9/K14<sup>180</sup>.

Així, una de les principals funcions de les HDACs és la **regulació de la transcripció**.

#### **3.2.2.2 Deacetilació de proteïnes no-histona**

Diferents estudis genealògics demostren que la deacetilació de proteïnes no-histones és una funció primària de les HDACs. En aquest context, trobem diferents substrats per aquesta funció, com factors de transcripció i co-reguladors, com p53 i STAT3, NF-κB i també proteïnes citoplasmàtiques, com l'alfa-tubulina i PTEN<sup>177</sup>.

Un dels principals substrats no-histona és p53, que esdevé modificat per diferents HDACs, especialment per la SIRT1<sup>181</sup>. L'acetilació de la K685 d'STAT3 és crítica per la seva fosforil·lació, dimerització i transactivació. La deacetilació d'aquesta lisina per l'HDAC3 i la SIRT1 resulten en la inhibició dels gens diana d'STAT3. PTEN és una altra de les proteïnes no-histones modulada per HDACs, de manera que l'acetilació de PTEN per la HAT p300/CBP reprimeix la seva activitat, mentre que la deacetilació per l'HDAC1 i la SIRT1 l'estimulen. Altres proteïnes reguladores de cicle oxidatiu com GSK3b, GDH i TCA, així com factors de transcripció com GATA-1 i NF-κB són modulades per HDACs<sup>180</sup>.

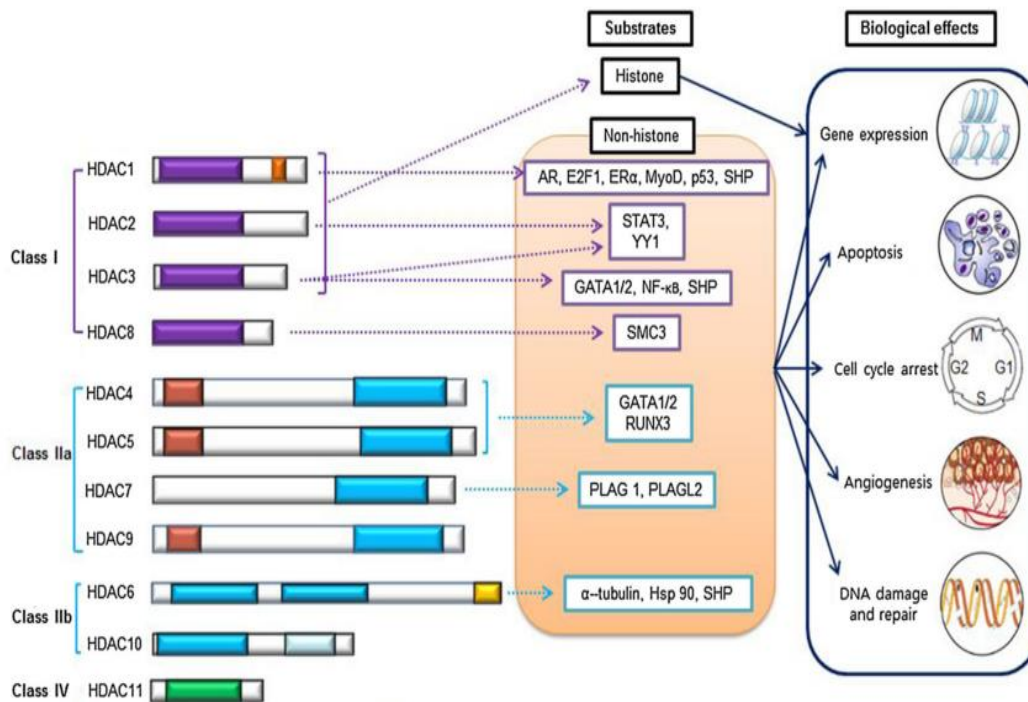
### 3.2.3 Fisiologia de les HDACs

Havent vist que les HDACs presenten diferents mecanismes d'acció i interaccionen amb múltiples complexes, no és d'estranyar que siguin moltes i molt variades les funcions fisiològiques cel·lulars en les que participen, i alhora alternatives en funció del context.

A part doncs, de la **regulació de la transcripció** i remodelació de la cromatina (veure a dalt), les HDACs regulen l'**apoptosi** a través de diferents complexes. Per exemple, la sobreexpressió de l'HDAC1 augmenta l'activitat proapoptòtica de TGF-β1, mentre que l'HDAC2 actua com un regulador negatiu<sup>177</sup>. En el moment en que hi ha un **dany a l'ADN**, s'activen diferents mecanismes que inclouen HDACs. Per exemple, l'HDAC1 i l'HDAC2 són reclutades ràpidament per tal de promoure l'hipoacetilació de la H3K56 i l'HDAC4 es recluta conjuntament amb la proteïna 53BP1. A més, s'ha demostrat que la inhibició de l'HDAC6 promou la mort cel·lular a través de la inducció de dany a l'ADN. Durant el **cicle cel·lular** el material genètic es duplica i la cromatina necessita reconstruir-se, de manera que les HDACs són efectors important d'aquesta maquinària interactuant també amb els seus reguladors, com ciclins i factors de transcripció. En quant al **metabolisme** cel·lular, el paper de les sirtuïnes està molt ben caracteritzat, tot i que les HDACs clàssiques també hi estan implicades, com per exemple l'HDAC1, el qual regula l'AMPK, un sensor i regulador crític del metabolisme. Les HDACs també modulen l'**activitat de les xaperones**, que faciliten la maduració estructural de les proteïnes, un exemple n'és l'HDAC6, que regula l'HSP90. D'altra banda, la sobreexpressió d'HDAC1 estimula l'**angiogènesi** i l'HDAC4, l'HDAC6 i l'HDAC7



interaccionen directament amb HIF-1alfa, un potent factor estimulador de l'angiogènesi en condicions d'hipòxia. L'**estrés oxidatiu**, la regulació de les proteïnes del **citoesquelet**, la **migració cel·lular** i la **resposta immune** són altres funcions fisiològiques que es veuen modulades per les HDACs<sup>177</sup> (Figura 21).



**Figura 21 | Dianes moleculars de les diferents HDACs i els seus efectes biològics<sup>182</sup>.**

Així, l'expressió ubiqua, l'activitat deacetilasa sobre els mateixos substrats i l'elevada homologia entre les HDACs, suggereixen funcions redundants *in vivo* entre les diferents HDACs. No obstant, diferents estudis demostren com la deleció de les HDACs de classe I en ratolins resulten letals per l'embrió, mentre que la deleció d'una única HDAC provoca conseqüències diferents en el desenvolupament i maduració cel·lular, demostrant un únic rol per cada HDAC i un control específic per part de cada una d'elles dels diferents programes d'expressió gènica en funció del context.

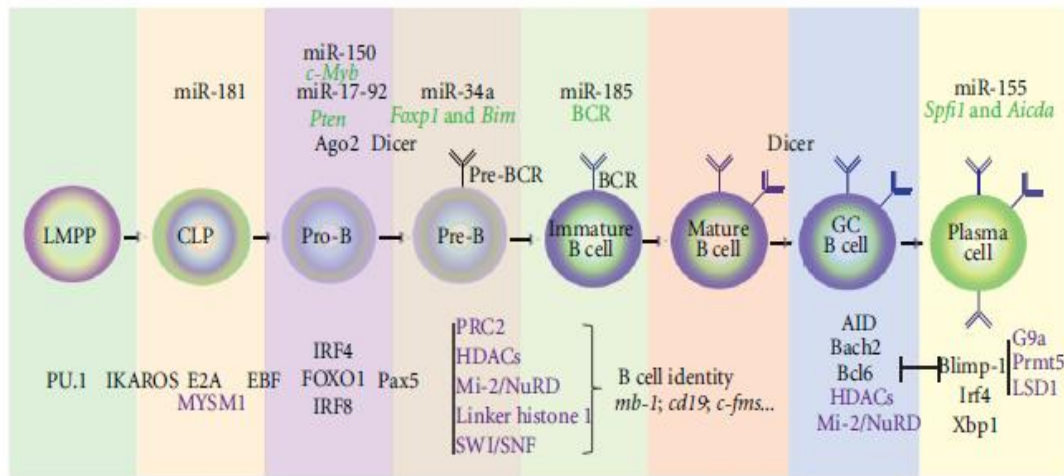
### 3.3. HDACs en l'hematopoesi

El desenvolupament i diferent maduració dels limfòcits B i T es basa en un control estricte de l'expressió gènica en diferents estadis, que finalment donarà lloc a la diversitat cel·lular. Aquests estadis maduratius estan estretament regulats per factors de transcripció i altres factors que coordinen l'accessibilitat a l'ADN. D'aquesta manera, les HATs i les HDACs juguen un paper important en el desenvolupament normal dels limfòcits B i T, tot interaccionant amb reguladors hematopoètics i factors de transcripció, alhora que modifiquen l'estructura de la cromatina en zones importants durant aquests processos.

La majoria d'informació que tenim sobre el paper de les HATs i les HDACs en el desenvolupament dels limfòcits B i T s'ha obtingut d'estudis *knockout* (KO) en ratolins de diferents HATs o HDACs en teixits específics. En general, els KO en HATs com CBP o p300 provoquen defectes en el manteniment i la diferenciació dels progenitors hematopoètics (*hematopoietic stem cells*, HSCs). En quant a les HDACs, la deleció de l'HDAC1 o de l'HDAC2 provoca fenotips moderats, mentre que la deleció simultània d'ambdues provoca la pèrdua total de progenitors hematopoètics, suggerint un rol important i sinèrgic d'aquestes HDACs en el manteniment i homeòstasi de l'hematopoesi precoç a través del complex repressor SIN3A/HDAC1-2<sup>183</sup>.

Pel que fa al desenvolupament dels limfòcits B, un dels factors de transcripció importants és BCL6, el qual és reclutat en un gran complex repressor que inclou l'HDAC4, l'HDAC5 i l'HDAC7 i localitza en el nucli per tal de regular els gens diana<sup>184</sup> (Figura 22). A més, durant l'activació del receptor de cèl·lules B (*B-cell receptor*, BCR) també hi participen diferents HDAC, com l'HDAC5 i l'HDAC7, que són fosforil·lades durant l'activació del BCR per proteïnes cinasa D per ser exportades del nucli.

Aquesta observació suggereix una relació entre la funció del BCR i la regulació epigenètica de la cromatina<sup>185</sup>.



**Figura 22| Esquema del desenvolupament del limfòcit B.** Els successius estadis de la diferenciació i maduració del limfòcit B amb els principals factors de transcripció i reguladors epigenètics (en lila) de cada etapa<sup>186</sup>.

En el desenvolupament dels limfòcits T, l'equilibri entre les HATs i HDACs és important. Per exemple, el KO en cèl·lules T de l'HDAC1 i l'HDAC2 provoca el bloqueig del desenvolupament del limfòcits T.

Durant la diferenciació de les cèl·lules T efectores, l'HDAC1 inhibeix la producció de citokines (IL-4, IL-5 i IL-19) en les cèl·lules activades i l'HDAC6 s'ha associat a la migració dels limfòcits T. En els limfòcits T en desenvolupament, la interacció de les HDACs de classe II amb el factor de transcripció MEF2D és crucial en el procés de selecció negativa d'aquells receptors de cèl·lula T (TCR) que tenen auto-reactivitat. A més, l'HDAC7 regula l'expressió de gens implicats en la selecció positiva en el timus.

Donat l'ampli espectre d'activitats de les HDACs durant l'hematopoesi, no és sorprenent que la desregulació d'aquests processos s'observi en diferents tipus de neoplàsies hematològiques.

### 3.4. HDACs en càncer

La desregulació de l'activitat de les HATs i HDACs s'ha associat a diferents tipus de càncer, entre ells les neoplàsies hematològiques. Degut al pleiotropisme funcional de les HDACs, no es coneix específicament quin paper juguen en cada context determinat, però sí que s'han descrit alguns mecanismes generals a través dels quals les diferents HDACs poden regular l'expressió i l'activitat de diferents proteïnes implicades tant en la iniciació com la progressió del càncer:

- **Reclutament aberrant en promotors:** el reclutament aberrant d'HDACs en promotors transcripcionals condueix a una conformació tancada de la cromatina, inaccessible per la maquinària de transcripció o mediadors, resultant en una repressió aberrant de la transcripció, per exemple, de gens supressors de tumors. En aquest sentit, s'han detectat canvis en el patró d'acetilació d'histones en el desenvolupament del càncer. Concretament, la pèrdua global de la monoacetilació de la lisina 16 i la trimetilació de la lisina 20 de la histona H4 (H4K16ac i H4K20me3) són *hallmarks* de càncer.
- **Expressió aberrant:** s'ha descrit expressió aberrant d'HDACs en diferents tipus de càncer. D'una banda, la sobreexpressió d'HDACs en concret s'associat significativament a mal pronòstic<sup>187,188</sup>.

A més, la sobreexpressió també s'ha correlacionat amb agressivitat, invasió i migració de les cèl·lules tumorals, de manera que en algunes malalties constitueix un indicador de pronòstic independent. No obstant, la implicació pronòstica de la sobreexpressió de les HDACs és controvertida, ja que en algunes malalties s'ha associat a pronòstic favorable. D'altra banda, la sobreexpressió també constitueix un marcador biològic en algunes neoplàsies.

- **Inactivació o guany de funció per mutacions:** a diferència de les HATs, les HDACs no presenten una taxa de mutació elevada. No obstant això, les HDACs de classe II presenten mutacions amb més freqüència. Tot i que s'han descrit

mutacions al llarg de tot el gen, només aquelles que afecten la regió catalítica poden alterar potencialment la funció enzimàtica de les HDACs. La presència de mutacions en HDACs s'ha associat al procés de tumorigènesi en alguns contextos o a la resposta al tractament<sup>189</sup>.

Així doncs, el paper de la desregulació de les HDACs en càncer és complex i context dependent, ja que la seva alteració pot venir donada a través de diversos mecanismes.

### 3.5. HDACs en leucèmia

Les leucèmies agudes es caracteritzen per aberràncies genètiques, com les translocacions cromosòmiques i mutacions, que són crucials en el desenvolupament de la patogènesi de la leucèmia. En els últims anys, però, s'ha descrit com les modificacions i/o aberràncies epigenètiques també contribueixen al fenotip de les cèl·lules leucèmiques. En aquesta línia, diverses translocacions cromosòmiques, principalment en LMA, resulten en la generació de proteïnes de fusió quimèriques que funcionen com a repressors transcripcionals reclutant complexes co-repressors que inclouen HDACs. És el cas de les translocacions *RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO)*, *CBFB-MYH11* o *PML-RARA*, que recluten NCOR1, NCOR2 i SIN3A i reprimeixen l'expressió de gens<sup>190</sup> (Figura 23).

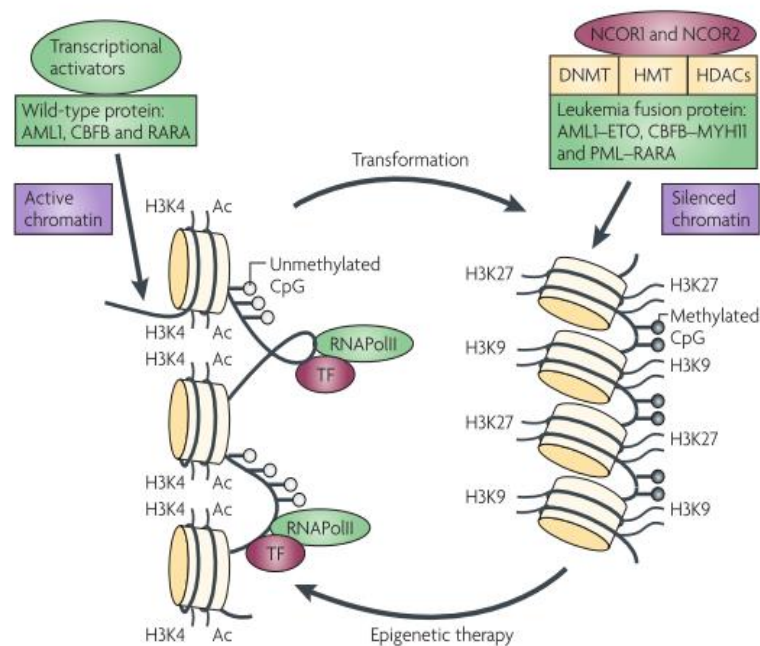
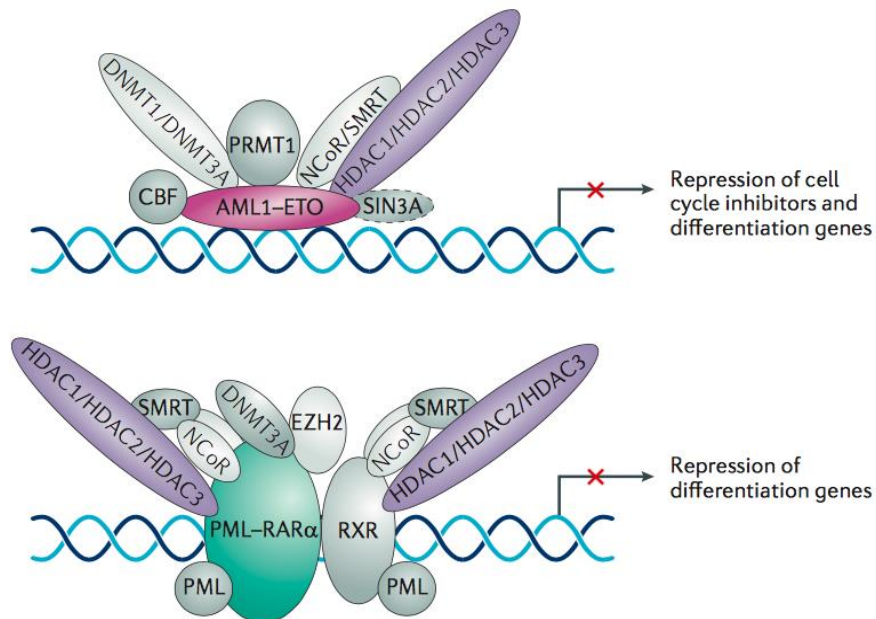


Figura 23 | Proteïnes de fusió leucemogèniques i la desregulació epigenètica que provoquen<sup>190</sup>.

Concretament, la proteïna de fusió RUNX1-RUNX1T1 es troba en els pacients amb LMA i translocació t(8;21) i recluta l'HDAC1, l'HDAC2 i l'HDAC3 per reprimir els gens diana d'RUNX1, tot provocant el bloqueig de la diferenciació mieloide i la transformació leucèmica. Pel que fa a la proteïna de fusió PML-RARA, el reclutament d'HDACs silencia els gens diana de RARA<sup>191</sup> (Figura 24).



**Figura 24| Diferents proteïnes de fusió associades a leucèmia recluten HDACs<sup>191</sup>.**

La sobreexpressió de diferents *HDACs* s'ha associat a diferents tipus de càncer, incloent les leucèmies agudes<sup>182</sup>. Tot i que són pocs els estudis que estudien l'estat global de les *HDACs* en leucèmia aguda, en general, s'observa sobreexpressió de les diferents *HDACs*, sobretot de classe I, en pacients amb leucèmia aguda comparat amb controls sans<sup>188,192,193</sup>. En l'estudi de Gruhn *et al.*, s'observa una sobreexpressió de les *HDACs* de classe I en detriment de l'acetilació d'histones. A més, nivells elevats d'*HDAC1* i d'*HDAC2* s'associen a factors pronòstic d'alt risc, com xifra elevada de leucòcits al diagnòstic, adolescents i fenotip T<sup>165</sup>. A més, els pacients amb LLA-T i elevada expressió d'*HDAC4* són identificats com els responedors lents al tractament amb prednisona. Moreno *et al.*, descriuen nivells elevats d'*HDAC2*, *HDAC3*, *HDAC8*, *HDAC6* i *HDAC7* en les mostres neoplàsiques, elevada expressió d'*HDAC1* i *HDAC4* en pacients amb LLA-T i d'*HDAC5* en pacients amb LLA-B. A més, l'expressió elevada

d'*HDAC3*, *HDAC7* i *HDAC9* s'associa en el seu estudi amb pitjor pronòstic i supervivència<sup>166</sup>.

La identificació dels complexos repressors reclutats i un millor coneixement de la biologia i desregulació de l'expressió de les *HDACs*, i estudis d'inhibició de les *HDACs* aporten evidències que confirmen un paper important de les *HDACs* en la patogènesi de la leucèmia aguda.

### **3.5. Inhibidors d'histona deacetilasa**

Els inhibidors d'histona deacetilasa (*HDACi*) són compostos dissenyats amb l'objectiu de bloquejar les activitats de les *HDACs* i, per tant, promoure l'acetilació de proteïnes histones i no-histones, revertint la repressió gènica provocada per les *HDACs*.

Degut al pleiotropisme funcional i a la participació en molts processos essencials per la cèl·lula, inicialment les *HDACs* no es van considerar dianes terapèutiques atractives pel disseny de noves teràpies. No obstant, de seguida van obtenir-se resultats en els que es demostrava una important activitat antitumoral.

Així, l'any 2006 el SAHA (Vorinostat) va ser el primer *HDACi* aprovat per la FDA (*Food Drug Administration*) per al tractament avançat o en recaiguda del limfoma T cutani (*cutaneous T cell lymphoma*, CTCL). A partir d'aquí s'han desenvolupat un gran nombre de nous *HDACi* per malalties neoplàsiques hematològiques.

Tot i el potent efecte antitumoral *per se* dels *HDACi*, diferents estudis i assajos clínics recolzen l'efecte sinèrgic d'aquests en combinació amb altres quimioteràpies convencionals<sup>194</sup>. D'una banda, els *HDACi* no només modulen l'expressió gènica, sinó que el procés d'acetilació promou una conformació de la cromatina oberta, el que la fa més accessible per altres agents d'acció sobre l'ADN, com els demetilants, que podrien beneficiar-se d'una administració conjunta. D'altra banda, la resistència als *HDACi* podria estar associada al tractament quimioteràpic previ, el qual podria modificar l'expressió de les *HDACs*, així com mecanismes de transport de fàrmacs<sup>195</sup>. D'aquesta manera, els *HDACi* actuarien sensibilitzant les cèl·lules tumorals.

La resistència de les cèl·lules tumorals esdevé una limitació pel desenvolupament exitós de nous tractaments amb HDACi. En aquest sentit, l'elevada expressió de proteïnes del cicle cel·lular i p21, el control dels nivells de les ROS que modulen la resposta a dany de l'ADN, l'activació constitutiva de NF-κB a través de l'acetilació de p65 i l'expressió elevada de proteïnes de senyalització com MAPK, PI3K o STAT3, s'han suggerit com a mecanismes que contribueixen a la resistència als HDACi<sup>196</sup>.

### 3.6.1 Mecanisme d'acció i efectes biològics dels HDACi

Els HDACi presenten efectes biològics pleiotròpics que inclouen diferenciació i migració cel·lular, control del cicle cel·lular i apoptosi, és per això que el seu desenvolupament s'ha centrat en aplicacions antitumorals. A més, alguns estudis suggereixen que també podrien promoure la resposta immune<sup>198</sup>. De fet, resulta impossible pensar que els efectes biològics i terapèutics del HDACi puguin dependre d'un únic mecanisme, alhora que les lesions genètiques de les cèl·lules neoplàsiques també hi jugaran un paper important. A continuació es presenten els principals mecanismes d'acció dels HDACi<sup>199</sup>, que es troben resumits en la figura 24:

- **Efectes en el cicle cel·lular:** els HDACi provoquen l'arrest del cicle cel·lular per inducció de l'expressió de *CDKN1A*, *p21*, *ciclina D* i *ciclina A*. Aquests events condueixen a la fosforil·lació i detriment de l'activitat de la proteïna Retinoblastoma (Rb). Una altra causa d'aturada de cicle cel·lular és l'acetilació que es produeix de la cromatina pericentromèrica que causa defectes durant la mitosi<sup>200</sup>.
- **Producció d'espècies reactives a l'oxigen (ROS):** la producció de ROS, seguida de la generació de ceramida, comporta dany mitocondrial, activació de caspases i finalment apoptosi.
- **Acetilació de proteïnes no-histones:** en general, l'acetilació de la proteïna Hsp90 provoca la disrupció de la interacció entre les xaperones i les proteïnes diana, moltes de les quals estan implicades en el manteniment del fenotip aberrant, com



*EGFR2* o *BCR-ABL1*. També, l'acetilació de proteïnes com p53 després del tractament amb HDACi provoca una disminució de la degradació proteosomal d'aquesta i s'indueix l'expressió de *p21*.

- **Inhibició de processos de reparació de dany a l'ADN:** aquests processos són inhibits mitjançant l'acetilació de proteïnes com Ku70, Ku86, BRCA1 i RAD51. Aquest efecte és la base de la teràpia combinada amb quimioteràpia o radiació.
- **Inducció de l'apoptosi:** es pot produir tant per la via extrínseca (mediada pel receptor de mort cel·lular) o la via intrínseca (via mitocondrial). Molts HDACi augmenten l'expressió de gens de la via extrínseca com *TRAIL*, *DR-5*, *DR-4*, *Fas* i *Fas-L*, mentre que per altra banda augmenten l'activitat de proteïnes anti-apoptòtiques de la via intrínseca com Bcl-2, Mcl-1 i Bcl-X<sub>L</sub> i disminueixen l'activitat de proteïnes apoptòtiques com Bim, Bax, Puma i Noxa.
- **Efecte antiangiogènic:** els HDACi inhibeixen l'expressió de gens implicats en l'angiogènesi com VEGF i eNOS.
- **Disrupció de la formació d'agregats del proteosoma:** la formació d'agregats proteics i eliminació a través del proteosoma és un dels sistemes emprats per les cèl·lules malignes per tal d'eliminar les proteïnes amb conformació anòmala deguda a l'aberrant i elevada taxa de recanvi. La formació d'aquests agregats depèn de l'acetilació de l' $\alpha$ -tubulina mediada per l'HDAC6. Així, els HDACi provoquen l'acumulació intracel·lular de proteïnes anòmales i com a conseqüència l'activació de mecanismes pro-apoptòtics<sup>201</sup>.

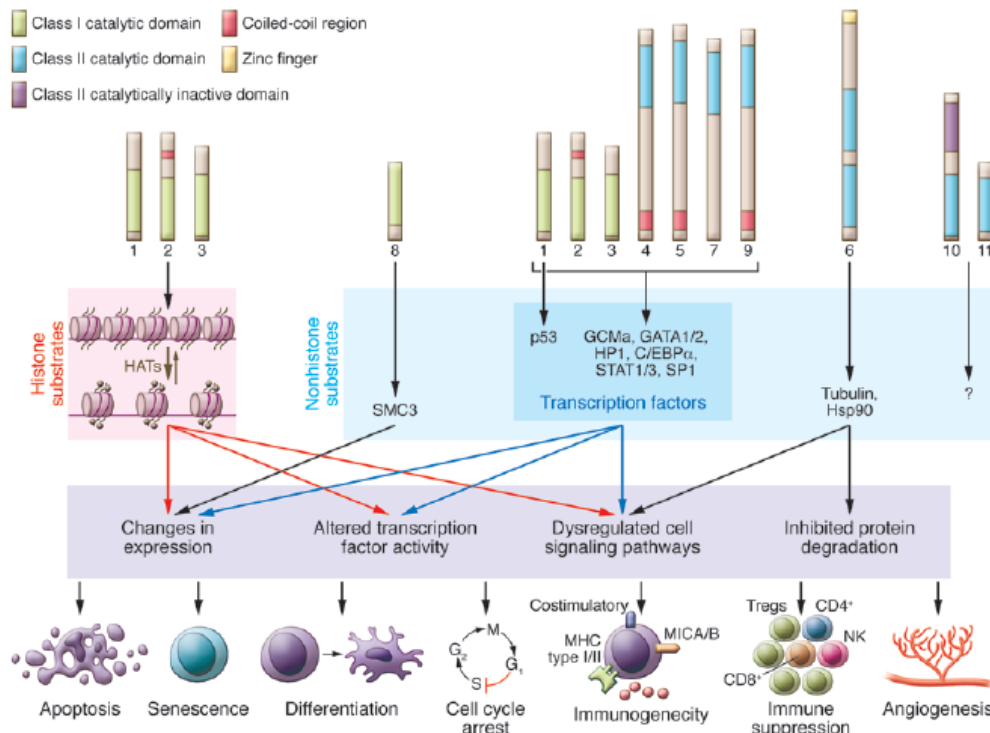
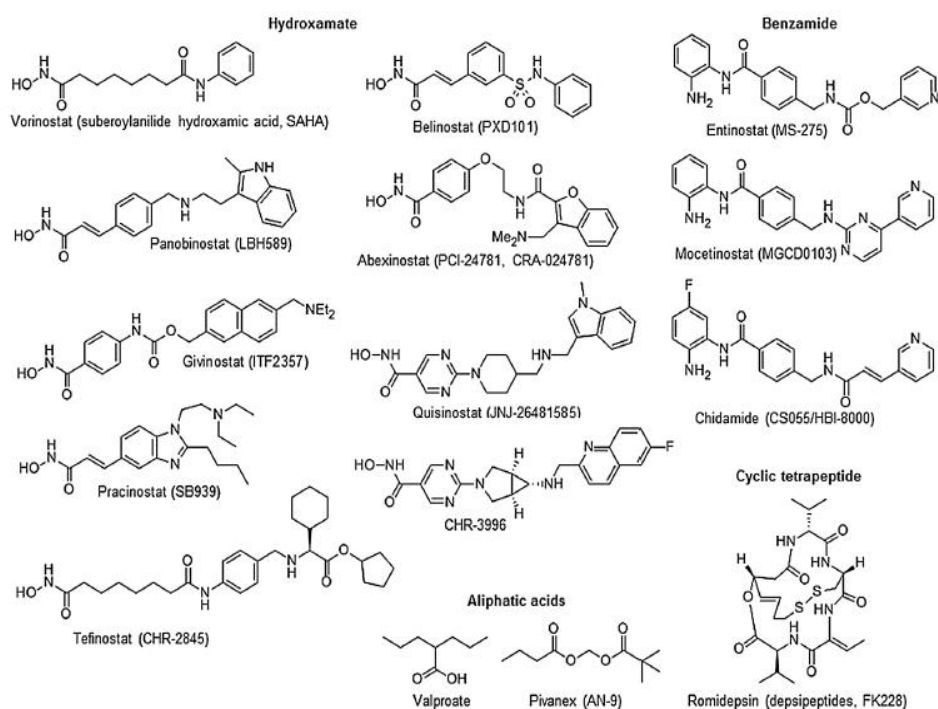


Figura 25| Molècules diana de les HDACs, les vies moleculars que modulen i les conseqüències que se'n deriven<sup>168</sup>.

### 3.6.2 Estructura dels HDACi

Els inhibidors actuals es classifiquen en quatre famílies segons la seva estructura química (Figura 26):

- **Àcids alifàtics:** aquests compostos inhibeixen específicament les HDACs de classe I i IIa. Es requereixen concentracions de l'ordre de milimolar per exercir el seu efecte i s'estan estudiant en combinació amb altres fàrmacs. Pertanyen a aquest grup el butirat sòdic, el fenilbutirat i l'àcid valproic (VPA).
- **Àcids hidroxàmics:** en general, aquests inhibidors tenen activitat no-selectiva respecte les HDACs, de manera que afecten a totes les classes. No obstant, l'activitat envers cada HDAC pot variar en funció de la concentració del compost. El Tricostatin A (TSA), Vorinostat, Panobinostat i Belinostat són alguns dels fàrmacs que s'inclouen en aquest grup.
- **Tetrapèptids cíclics:** en aquest grup s'inclou el Romidepsin.
- **Benzamides:** aquests compostos inhibeixen selectivament les HDACs de classe I.



**Figura 26| Estructures químiques dels quatre grups principals d'inhibidors d'HDAC (HDACi) i alguns dels compostos més avaluats en diferents assajos clínics<sup>182</sup>.**

### 3.6.3 Fàrmacs registrats i estudis clínics

Actualment, la investigació en el disseny de nous HDACi és força intensa com a teràpia dirigida en càncer. Desenes de diferents estructures d'HDACi s'estan avaluant en assajos clínics i pre-clínics, especialment en neoplàsies hematològiques (Taula 12).

La FDA ha aprovat diferents HDACi en les últimes dècades per al tractament de diverses neoplàsies hematològiques. L'any 2006 es va aprovar el SAHA (Vorinostat, Zolinza™, Merck & Co, Inc., USA) per al tractament del CTCL<sup>202</sup> i posteriorment, l'any 2009 es va aprovar el FK228 (Romidepsin, Istodax™, Celgene Corp., USA) pel tractament d'aquells pacients amb CTCL que ja havien rebut com a mínim un cicle de quimioteràpia sistèmica<sup>203</sup>. Més recentment, l'any 2014 el belinostat (PXD101, BELEODAQ™, Spectrum Pharmaceuticals, Inc.) va ser aprovat per al tractament del limfoma de cèl·lules T perifèric (*peripheral T cell lymphoma*, PTCL)<sup>204</sup> i el panobinostat (Farydak, LB-589, Novartis Pharmaceuticals) l'any 2016 per al tractament del mieloma multiple (MM)<sup>205</sup>.

<b>Estructura química</b>	<b>Nom</b>	<b>Especificitat HDAC</b>	<b>Fase d'estudi</b>
<b>Àcid hidroxàmic</b>	Trichostatin A (TSA)	pan	preclínica
	Vorinostat (SAHA)	pan	Aprovat per limfoma T cutani
	Belinostat (PXD101)	pan	Aprovat per limfoma T cutani
	Panobinostat (LBH589)	pan	Aprovat per mieloma múltiple
	Givinostat (ITF2357)	pan	Fase II – leucèmia recaiguda i mieloma múltiple
	Quisinostat	pan	Fase I – mieloma múltiple
	Rocilnostat	classe II	Fase I – mieloma múltiple
	Practinostat	classe I, II i IV	Fase II – càncer de pròstata
<b>Àcids alifàtics</b>	Àcid valproic	classe I, IIa	Aprovat per epilèpsia, desordres bipolars i migranya i en fase II per diferents patologies
	Àcid butíric	classe I, II	Fase II – diferents patologies
	Àcid fenilbutíric	classe I, II	Fase I – diferents patologies
<b>Benzamides</b>	Entinostat (MS-275)	classe I	Fase II – càncer de mama, limfoma Hodgkin
	Mocetinostat (MGCD103)	classe I, IV	Fase II – limfoma de Hodgkin
<b>Tetrapèptids cíclics</b>	Romidepsin (Depsipeptide/FK228)	classe I	Aprovat per limfoma T cutani
<b>Inhibidors de sirtuïnes</b>	Nicotinamida	classe III	Fase III – càncer de laringe
	Sirtinol	SIRT 1 i 2	Estudis preclínics
	Cambinol	SIRT1 i 2	Estudis preclínics

Taula 12| HDACi segons la seva estructura, especificitat i presència en assaigs clínics. Adaptada de<sup>177</sup>.

L'ús de la teràpia combinada d'HDACi amb altres agents antitumorals sembla l'estratègia més adient per aconseguir el potencial terapèutic esperat dels HDACi (Taula 13). Així, ens els últims anys s'han iniciat un seguit d'assaigs clínics que combinen HDACi i una varietat de compostos químics amb funcions molt diverses, com modificadors dels processos de reparació a dany de l'ADN, inhibidors de topoisomerasa, quimioteràpies amb platí, teràpies hormonals, inhibidors de tirosinasa, radioteràpia i immunoteràpia<sup>194</sup>.

HDACi	Combinació	Neoplàsia hematològica	Fase assaig clínic
<b>Vorinostat (SAHA)</b>	Olaparib, gemcitabina, busulfan i melfalan	Limfoma Hodgkin i no-Hodgkin	I/II
	Doxorubicina pegilada liposomal	Limfoma recaigut/refractari	I/II
	Doxorubicina hidrocloàridrica liposomal i bortezomib	Mieloma múltiple recaigut/refractari	I
	Rituximab	Limfoma/leucèmia	II
<b>Àcid valproic</b>	Decitabina	Leucèmia	I/II
<b>Panobinostat (LBH589)</b>	Carfilzomib	Mieloma múltiple recaigut/refractari	I/II
	Bortezomib	Limfoma de cèl·lules T (TCL) recaigut/refractari	II
	Everolimus	Mieloma múltiple, limfoma Hodgkin i no-Hodgkin	I/II
<b>Romidepsin (FK288)</b>	Carfilzomib	PTCL recaigut/refractari	I/II
	Gemcitabina, dexametasona i cisplatí	PTCL i limfoma difús de cèl·lules B	I
	5-azacitidina	Neoplàsies limfoides recaigudes/refractàries	I/II
<b>Fenilbutirat sòdic (4-PBA)</b>	Azacitidina	LMA i síndrome mielodisplàsic (SMD)	I
<b>Mocetinostat (MGCD0103)</b>	Brentuximab vedotin (SGN-35)	Limfoma Hodgkin recaigut/refractari	I/II
	Azacitidina	SMD d'alt risc i LMA	I/II
<b>AR42</b>	Decitabina	LMA	I
	Pomalidomida	Mieloma múltiple recaigut	I

Taula 13 | HDACi en combinació amb altres agents antitumorals actualment en assaig clínic (fase I/II/III). Adaptada de<sup>194</sup>.

### 3.6.4 Selectivitat dels HDACi

Actualment, la majoria dels HDACi disponibles són **pan-inhibidors**. Els pan-inhibidors inhibeixen múltiples isoformes d'HDACs de classe I, II i IV, en diferents graus. Les HDACs de classe III, les sirtuines, són estructuralment diferents i no s'inhibeixen pels inhibidors d'unió a Zn<sup>2+</sup> (pel que no es consideraran d'ara en endavant).

La majoria dels pan-inhibidors són hidroxamats, com el SAHA, panobinostat i el belinostat, els quals són eficients quelants del Zn<sup>2+</sup>, de manera que interfereixen en el mecanisme d'acció de les HDAC clàssiques. Possiblement la seva estructura relativament petita i lineal no permet la generació de suficients contactes secundaris que permetin distingir les variacions estructurals de les diferents isoformes d'HDAC<sup>206</sup>. Aquests compostos inhibeixen les HDACs amb una potència de l'orde de nanomols, exceptuant l'HDAC8, el qual no s'inhibeix amb la mateixa potència, fet que suggereix la presència d'alguna peculiaritat estructural en el domini actiu. Degut a la pleiotropicitat i l'àmplia presència de les HDACs en processos fisiològics, l'administració d'aquests fàrmacs no només provoca canvis desitjables en vies moleculars que estan afavorint la progressió de les cèl·lules malignes, sinó que pertorben activitats fisiològiques. De fet, en la literatura, diferents experiments de transcriptoma reporten canvis en l'expressió gènica entre un 4-20% després de l'administració de pan-inhibidors i, de la mateixa manera, el nombre de proteïnes acetilades es troba en un rang entre 10 i centenars<sup>206</sup>. No obstant, s'ha suggerit que les cèl·lules normals són aparentment més resistents als efectes apoptòtics dels HDACi, el que podria explicar l'ús d'alguns pan-inhibidors en la pràctica clínica<sup>195</sup>. Així doncs, la principal limitació en l'ús dels HDACi en la clínica és l'aparició d'efectes secundaris degut a la toxicitat que exerceixen sobre les cèl·lules normals de l'hoste. Els efectes secundaris més comuns són trombocitopènia, nàusees, vòmits, anorèxia i cansament, entre d'altres. Cal destacar la toxicitat cardíaca observada en forma d'arítmies ventriculars<sup>194</sup>. Aquesta toxicitat posa de manifest la necessitat de desenvolupar **HDACi isoforma-selectius** en funció del context cel·lular.

Aquests inhibidors permetrien mantenir la funcionalitat d'aquelles isoformes essencials i fisiològiques per la cèl·lula mentre que inhibirien aquella isoforma d'HDAC amb activitat aberrant, permetent un tractament individualitzat. Els inhibidors

isoforma-selectius pretenen limitar les seves accions a una classe i/o isoforma d'HDAC determinats amb els objectius de: (1) evitar l'aparició de toxicitats provocades per l'ús de pan-inhibidors; (2) aplicar d'una teràpia personalitzada probablement més efectiva, i (3) millorar el coneixement de la biologia de les diferents isoformes d'HDACs. El disseny d'aquests inhibidors es duu a terme en funció de la interacció entre l'inhibidor i la HDAC d'interès, tot i que les diferències estructurals del domini catalític entre les diferents isoformes són subtils. És per això que només algunes isoformes d'HDACs determinades disposen d'un HDACi específic, el qual pot unir-se a residus externs determinats que permeten aquesta selectivitat<sup>198</sup>.

En l'actualitat, el que coneixem com HDACi isoforma-específic, estrictament són inhibidors selectius de classe I. En aquest grup s'inclouen el romidepsin, l'entinostat i el mocetinostat (MGCD0103), entre d'altres. De fet, s'ha demostrat que aquests inhibidors de classe I augmenten considerablement l'acetilació de la histona H3, mentre que no la de l' $\alpha$ -tubulina, el substrat de l'HDAC6<sup>207</sup>. La qüestió és: aquests inhibidors selectius es toleren millor comparats amb els pan-inhibidors a dosis terapèutiques? Fins al moment, amb els resultats de diferents assajos clínics, s'ha pogut observar que les toxicitats a dosis terapèutiques en pacients amb neoplàsies hematològiques dels inhibidors de classe I, com el romidepsin i el mocetinostat, són manejables (grau 3 o 4), amb excepció de la cardíaca. Aquests resultats recolzen la recerca en aquesta via. Pel que fa a la toxicitat cardíaca, s'ha comprovat com els inhibidors amb estructura hidroxàmica i les benzamides disminueixen l'aparició de QT prolongats, i que els compostos que no inhibeixen l'HDAC3, 5 i 9 són els més desitjables des del punt de vista de seguretat cardíaca<sup>206</sup>.

En un escenari ideal, un millor coneixement de la biologia de les diferents isoformes d'HDAC i la identificació de biomarcadors clínics i biològics del seu estat permetria la selecció dels pacients candidats al tractament amb HDACi isoforma-selectius i ajudaria a predir la resposta a aquests, limitant l'aparició d'efectes adversos i limitant l'ús a aquells que puguin beneficiar-se de la teràpia. En aquest sentit s'han publicat diferents estudis que correlacionen els nivells d'HDAC amb la sensibilitat al tractament amb HDACi<sup>194</sup>.

**HIPÒTESI**





Donat que:

- Malgrat l'augment en la supervivència dels pacients pediàtrics amb leucèmia aguda, encara hi ha alguns subtipus de **pacients de molt alt risc**, com els lactants, els pacients amb reordenament del gen *KMT2A* i els pacients amb LLA-T, per als quals és necessari el desenvolupament de noves teràpies dirigides i personalitzades, per tal de millorar la supervivència i disminuir els possibles efectes secundaris de la quimioteràpia.
- Els **inhibidors d'HDAC** han emergit en els últims anys com una prometedora diana terapèutica en diferents tipus de càncer, i ja estan aprovats per algunes neoplàsies hematològiques, tot i que el seu ús a la pràctica clínica està limitat per la seva inespecificitat i toxicitat.
- **L'expressió de les HDACs** en els pacients pediàtrics amb leucèmia aguda no ha estat estudiada fins al moment en profunditat.

En aquest context, **l'estudi global del perfil transcripcional de les HDACs** en pacients pediàtrics amb leucèmia aguda i la identificació de signatures d'*HDACs* específiques podria aportar dades útils per a valorar l'ús de les *HDACs* com a biomarcadors i així:

- definir el seu **impacte pronòstic** en pacients pediàtrics amb leucèmia aguda i
- definir la seva utilitat com a **dianes terapèutiques** i identificar els millors candidats a rebre **tractament dirigit amb HDACi**.



## **OBJECTIUS**



**OBJECTIU GENERAL:**

L'objectiu d'aquest treball és estudiar de forma global l'expressió de les diferents isoformes d'*HDACs* en pacients pediàtrics amb diferents subtipus de leucèmia aguda, per tal d'identificar possibles biomarcadors pronòstics i/o dianes terapèutiques.

**OBJECTIUS ESPECÍFICS:**

1. Determinar el perfil d'expressió dels pacients pediàtrics amb leucèmia aguda de les *HDAC1-11*, *SIRT1*, *SIRT7* i d'altres gens co-reguladors, *MEF2C* i *MEF2D*.
2. Correlacionar les dades obtingudes amb variables clíniques i biològiques al diagnòstic i durant el seguiment de la malaltia i analitzar el seu valor pronòstic mitjançant anàlisi de supervivència.



## **MATERIAL I MÈTODES**





## 1. MATERIAL

### 1.1 Pacients

Es tracta d'un estudi retrospectiu en el que s'han analitzat tots els pacients pediàtrics (0-18 anys) dels que es disposava mostra, diagnosticats d'una leucèmia *de-novo* entre l'any 2003 i 2017 a l'Hospital Sant Joan de Déu.

L'estudi inclou un total de 211 pacients, incloent 134 diagnosticats de LLA-B, 33 de LLA-T i 44 LMA, amb els principals subtipus citogenètics representats. Les característiques clínico-biològiques al diagnòstic es presenten a la Taula 14.

Els pacients es van tractar uniformement segons els protocols de la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica (SEHOP): SHOP-LAL-1999, SHOP-LAL-2005 i SEHOP-PETHEMA 2013 per les LLA i SHOP-LAM-96, SHOP-LAM-2001 i SHOP-LAM-2007 per les LMA. Els pacients amb leucèmia promielocítica aguda (LPA) van ser tractats amb el protocol PETHEMA LPA 2005 i els lactants amb LLA es van tractar segons els protocols SHOP-LAL INFANTS 2001 i INTERFANT-06.

El grup de risc dels pacients va assignar-se en funció de cada protocol, basant-se en les variables clínico-biològiques al diagnòstic i posteriorment segons el nivell de malaltia residual mínima (MRM). En els pacients amb LLA, seguint les guies dels protocols, els nivells de MRM van determinar-se per citometria de flux multiparamètrica (4 i 8 colors) en tots els casos i també per PCR quantitativa (RQ-PCR) en aquells pacients amb presència del gen de fusió *BCR-ABL1*<sup>167</sup>. En les LMA, el seguiment també es va dur a terme a través de citometria de flux i per RQ-PCR en les leucèmies *core-binding factor* i els pacients amb el gen de fusió *PML-RAR $\alpha$* .

Pacients	Total no. (%) 211
<b>Sexe</b>	
Masculí	121 (57)
Femení	90 (43)
<b>Edat, anys</b>	
Mediana (extrems)	5,8 (0-17,1)
< 1 any	15 (7)
1-9 anys	147 (70)
>10 anys	49 (23)
<b>Leucòcits, x10<sup>9</sup>/L, mediana (extrems)</b>	52,8 (0,6-741,0)
<b>Blasts, mediana (extrems)</b>	
Moll de l'os	84,9 (13-100)
Sang perifèrica	47,5 (0-100)
<b>SNC (n=209)</b>	
SNC-1	165 (78)
SNC-2	27 (12)
SNC-3	16 (8)
<b>Llinatge i Immunofenotip</b>	
<b>LLA-B (n=134)</b>	
Comú CD10+	125
Pro-B CD10-	9
<b>LLA-T (n=33)</b>	
Pro-T	1
Pre-T	4
Early T-cell Precursor	4
Cortical	21
Madura	3
<b>LMA (n=44)</b>	
<b>Citogenètica</b>	
<b>LLA-B (n=134)</b>	
Alta hiperdiploidia	47
t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1	25
t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX1	6
t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1	7
KMT2A-reordenat <sup>a</sup>	11
B-other	38
<b>LLA-T (n=33)</b>	
Normal	16
Anormal	8
No metafases	4
<b>LMA (n=44)</b>	
Leucèmia aguda promielocítica	3
CBF-AML <sup>b</sup>	6
KMT2A-reordenat <sup>c</sup>	12
Altres <sup>d</sup>	23
<b>Protocol</b>	
<b>LLA-B</b>	
INTERFANT-06	4
SHOP-INFANT 2001	1
SHOP-1999	13
SHOP-2005	62
SEHOP-PETHEMA 2013	54
<b>LLA-T</b>	
SHOP-2005	17
SEHOP-PETHEMA 2013	16
<b>AML</b>	
SHOP-LAM-1996	1
SHOP-LAM-2001	11
SHOP-LAM-2007	28
PETHEMA LPA 2005	3
LAM DOWN 2006	1
<b>Mediana de seguiment, anys (extrems)</b>	4,84 (0,01-16,0)
<b>Supervivència global als 5 anys, estimació ± SE, %</b>	
LLA-B	96±2%
LLA-T	82±7%
LMA	66±8%
<b>Supervivència lliure d'event als 5 anys, estimació ± SE, %</b>	
LLA-B	84,3±4%
LLA-T	82,1±7%
LMA	50,3±8%

**Taula 14 | Pacients i principals característiques clínico-biològiques al diagnòstic.** SNC: Sistema Nervios Central. CBF: core-binding factor. SE: *Standard Error*. <sup>a</sup>KMT2A reordenat en LLA-B: t(4;11)(q21;q23), n=3; t(11;19)(q23;p13), n=1; t(9;11)(p22;q23), n=1; t(7;11)(p22;q23), n=1; altres reordenaments del gen KMT2A amb *partner* desconegut (FISH positiu), n=5. <sup>b</sup>CBF-LMA: t(8;21)(q22;q22), n=3; inv(16)(p13;q22)/t(16;16)(p13;q22), n=3. <sup>c</sup>KMT2A reordenat en LMA: t(9;11)(p22;q23), n=4; t(11;19)(q23;p13), n=3; t(10;11)(q11.2;q23), n=2; altres reordenaments del gen KMT2A amb *partner* desconegut (FISH positiu), n=3. <sup>d</sup>Altres LMA: cariotip complex i altres reordenaments.

## 1.2 Controls: Pacients no-neoplàsics i calibradors

Com a calibrador i contrapartida normal de les leucèmies, va emprar-se una cohort d'11 pacients no-neoplàsics, diagnosticats de púrpura trombocitopènica idiopàtica (PTI).

Per contra, trobar una contrapartida normal dels blasts és difícil, en tant que el moll de l'os sà no representa la composició de cèl·lules d'una leucèmia ni la seva immaduresa. Així doncs, per a tenir una referència amb la que comparar cada subtipus de leucèmia en funció del llinatge, van emprar-se cèl·lules comercials normals: cèl·lules CD34+ de moll d'os com a contrapartida d'immaduresa, cèl·lules B madures CD19+ de sang perifèrica com a contrapartida de les LLA-B, i cèl·lules Pan-T madures de sang perifèrica per les LLA-T (STEMCELL Technologies, Canadà).

## 2. MÈTODES

### 2.1 Descongelació cèl·lules criopreservades

Per a la descongelació de les cèl·lules comercials criopreservades van emprar-se 10 mL de la solució de descongelació (9 mL RPMI i 1mL de sèrum fetal prèviament inactivat al bany Maria a 65°C 30 minuts). Les cèl·lules es van descongelar poc a poc al bany Maria a 37 °C i després d'una centrifugació i rentat, es van resuspendre en RPMI.

### 2.2 Extracció d'àcids nucleics i transcripció reversa

Pel diagnòstic molecular i posteriors estudis van emprar-se mostres de moll d'os i sang perifèrica obtingudes al diagnòstic.

La separació de les cèl·lules mononuclears va fer-se mitjançant un gradient de densitat amb Ficoll-Hypaque (Sigma, St Louis MO, USA). L'extracció de l'ADN genòmic es va dur a terme mitjançant els productes comercials Qiaquick i Gentrage DNA (Qiagen, Hilden, Alemanya). Per l'extracció de l'ARN va seguir-se el procediment habitual amb TriPure (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) i la síntesi de cDNA es va fer a partir de

50-100 ng totals d'ARN mitjançant el Qiagen QuantiTect Whole Transcriptome cDNA *kit* (Qiagen, Hilden, Alemanya), seguint les instruccions del proveïdor.

### **2.3 Identificació de les alteracions genètiques recurrents**

El diagnòstic dels pacients es va dur a terme segons l'estudi de la citomorfologia dels blasts, immunofenotip i les alteracions citogenètiques i moleculars, seguint els criteris prèviament descrits<sup>42,136</sup>. La determinació de l'alteració en el número de còpies gèniques (CNA) es va realitzar per MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, MRC, Holanda) mitjançant els kits SALSA P-335 i SALSA P-383, per les LLA-B i LLA-T respectivament. L'estudi de la presència de mutacions en els gens *NOTCH1* i *FBXW7* es va dur a terme en ADN mitjançant PCR i seqüenciació Sanger, segons la bibliografia<sup>168</sup>. Les duplicacions internes en tàndem del gen *FLT3* (FLT3-ITD) i les mutacions en *NPM1* es van analitzar per PCR fluorescent<sup>169</sup> i les mutacions en *CEBPA* per PCR i seqüenciació Sanger<sup>170</sup>.

### **2.4 Anàlisi mutacional d'*HDAC9***

L'estudi de l'estat mutacional d'*HDAC9* va dur-se a terme mitjançant PCR i seqüenciació Sanger. Es van dissenyar oligonucleòtids per estudiar les regions *hot-spot* del domini catalític del gen, localitzades en l'exó 13 (F: 5'-tcttgcctgtattccctgtc-3'; R: 5'- cccaaatgaataactggcctct-3'), exó 19 (F: 5'-cgtctgttttcattccctgta-3'; R: 5'-aacaccagcaaaggacaagaa-3') i exó 20 (F: 5'-agagctcccatgtgctt-3'; R: 5'-tccaattgccactttcaga-3').

### **2.5 Anàlisi d'expressió a nivell d'ARN**

La quantificació dels nivells d'expressió d'ARN missatger (ARNm) dels gens d'interès s'ha realitzat per PCR quantitativa a partir de transcripció reversa (RT-qPCR) en un termociclador ABI7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Els gens estudiats en aquest treball són *HDAC1*, *2*, *3*, *4*, *5*, *6*, *7*, *8*, *9*, *10* i *11*, *SIRT1*, *SIRT7*, *MEF2C* i *MEF2D*, utilitzant els assaigs d'expressió comercials TaqMan® Gene Expression Assays *HDAC1* (Hs02621185\_s1), *HDAC2* (Hs00231032\_m1), *HDAC3* (Hs00187320\_m1), *HDAC4* (Hs00195814\_m1), *HDAC5* (Hs00608366\_m1), *HDAC6* (Hs00195869\_m1), *HDAC7* (Hs00248789\_m1), *HDAC8* (Hs00218503\_m1), *HDAC9* (Hs00206843\_m1), *HDAC10* (Hs00368899\_m1), *HDAC11* (Hs00227335\_m1), *SIRT1* (Hs01009006\_m1), *SIRT7* (Hs01034735\_m1), *MEF2C* (Hs\_00231149\_m1) and *MEF2D* (Hs\_00954735\_m1).

La quantificació relativa s'ha calculat amb el mètode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilitzant el gen  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) com a control endogen, i com a calibrador un *pool* de mostres d'11 pacients no-neoplàsics. A més, també es va dur a terme la quantificació de l'expressió gènica dels diferents gens en la contrapartida de cèl·lules normals equivalents als diferents subtipus de leucèmies: cèl·lules de moll d'os CD34+, cèl·lules madures B CD19+ i cèl·lules T madures de sang perifèrica (STEMCELL Technologies, Canadà).

## 2.6 Anàlisi estadístic

L'anàlisi dels resultats s'ha dut a terme mitjançant el programes SPSS 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), R software versió 3.4.2 ([www.R-project.org](http://www.R-project.org))<sup>171</sup> i el programa GraphPad Prism versió 7.00 (GraphPad Software, California, USA).

S'han emprat els valors normalitzats amb el  $\log_2$  per una millor representació gràfica i s'han considerat significatius els valors de *p* inferior a 0.05.

L'associació entre les diferents variables categòriques s'ha evaluat mitjançant els tests  $\chi^2$  o l'exacte de Fisher, depenent de l'aplicabilitat del mètode en funció de les condicions de la prova. Per les variables quantitatives s'han emprat el test T Student i el test U de Mann–Whitney per proves no paramètriques. A més, per comparar els nivells d'expressió gènica entre diferents variables categòriques s'ha emprat el test de Kruskal-Wallis. Finalment, per determinar l'associació entre variables quantitatives s'ha calculat el coeficient de correlació d'Spearman.

En l'anàlisi d'expressió de les nostres mostres, hem volgut tenir en compte aquells pacients que no presenten gens d'expressió d'alguns gens, en comptes de descartar-los i tractar la mostra com a no-valorable. És per això que es van tractar els nivells d'expressió com (1) variable quantitativa, incloent únicament aquells pacients amb nivells d'expressió quantificables; i (2) variable qualitativa, considerant dos grups de pacients: els que expressen un determinat gen i els que no expressen, és a dir, Ct >40. La supervivència s'ha determinat mitjançant l'estimador Kaplan-Meier<sup>172</sup> i les diferències en la supervivència entre diferents grups s'han determinat mitjançant el test log-rank<sup>172</sup>.

La supervivència global (SG) s'ha calculat com el temps que transcorre des del diagnòstic fins la mort o l'última data de seguiment. D'altra banda, la supervivència lliure d'event (SLE) s'ha considerat com el temps que transcorre des del diagnòstic fins el primer event (refractarietat, recaiguda, mort o última data de seguiment, censurant en el moment del transplantament al·logènic de progenitors hematopoètics (alo-TPH), per tal d'evitar l'efecte d'altres events competitiu post-TPH). Els anàlisis, però, s'han repetit també sense censorar en el moment del transplantament, sense haver-hi canvis significatius en els resultats.

En l'anàlisi univariat s'han inclòs els principals factors pronòstics clínic-biològics al diagnòstic com l'edat, el recompte leucocitari, la infiltració del SNC, la presència del reordenament del gen *KMT2A*, la MRM post-inducció i els diferents punts de tall pels nivells d'expressió de les HDACs. Aquells factors significatius en l'anàlisi univariat s'han inclòs en l'anàlisi multivariat, el qual s'ha dut a terme mitjançant el model proporcional de Cox, incloent els hazard ratios i el corresponent interval de confiança derivats del model<sup>173</sup>.

Finalment, s'ha realitzat una estimació del punt de tall que millor discrimina en grups de pacients segons els nivells d'expressió d'un determinat gen i la seva supervivència. Així, aquesta estimació permet dividir-los segons si presenten una alta o baixa expressió i determinar si aquesta defineix el pronòstic dels diferents grups de pacients. Per estimar el punt de tall s'ha emprat el mètode Contal i O'Quigley<sup>174</sup>.

## **2.7 Aspectes ètics**

Aquest estudi ha seguit els estàndards ètics i la Declaració de Helsinki segons les recomanacions de les guies nacionals i internacionals; a més, l'estudi ha rebut l'aprovació del Comitè d'Ètica de la nostra institució. Totes les mostres s'han emmagatzemat degudament en el Biobanc de l'hospital després de l'aprovació del consentiment informat per part dels pacients, pares o tutors legals.



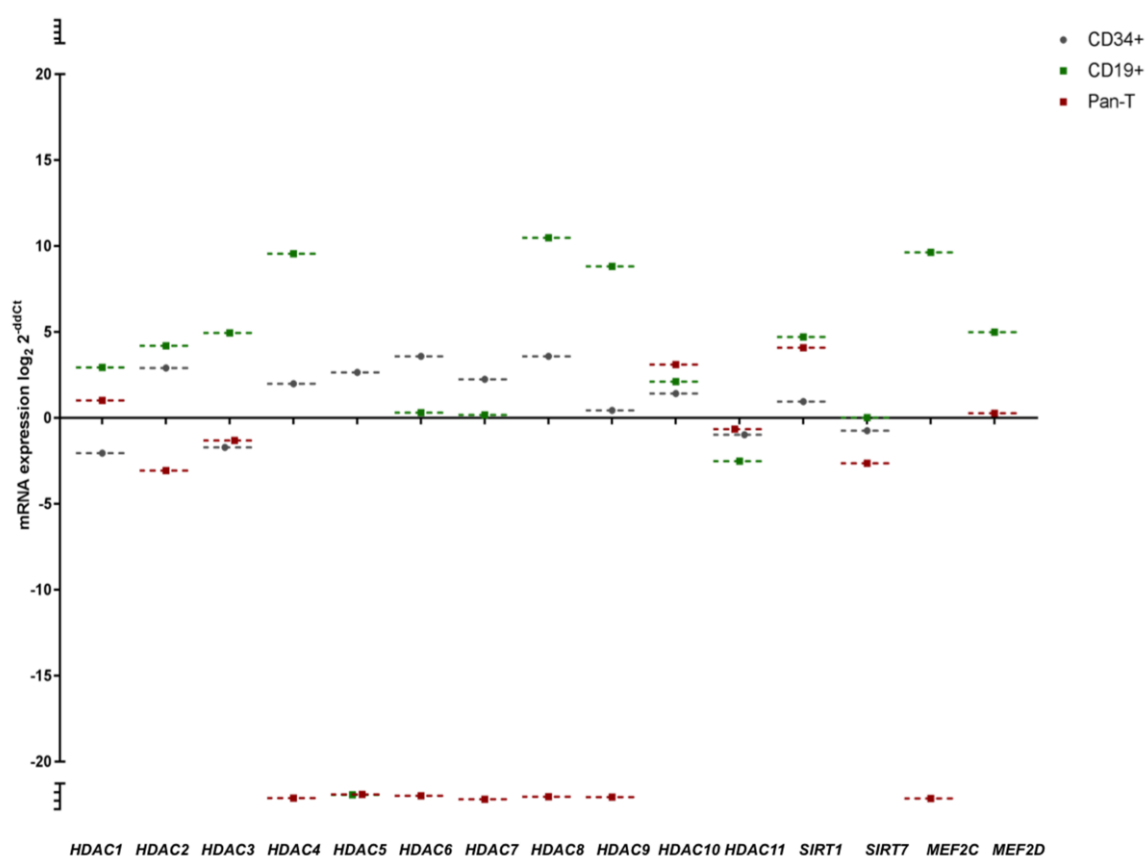


## **RESULTATS**



### Expressió global de les HDACs en les cèl·lules hematopoètiques normals

Primer, per tal de tenir una referència del que podríem considerar la contrapartida normal dels diferents subtipus de leucèmies, vam analitzar el perfil d'expressió de les *HDACs*, *SIRT1*, *SIRT7*, *MEF2D* i *MEF2C* en diferents cèl·lules hematopoètiques normals: les CD34+ de moll d'os, les cèl·lules B madures CD19+ i les cèl·lules pan-T de sang perifèrica, utilitzant el pacients no-neoplàsics com a calibrador (Figura 27).



**Figura 27| Perfil d'expressió de les *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D* en cèl·lules hematopoètiques normals.** La mitjana dels pacients no-neoplàsics s'ha emprat com a calibrador (eix X) i les línies discontinuïques representen la mediana dels valors de les cèl·lules normals. Es mostren en gris la mitjana per les CD34+, en verd per les CD19+ i en vermell per les cèl·lules pan-T. Les mostres sense expressió d'un determinat gen estan representades fora dels límits de l'eix Y (abaix del gràfic, sense escala).

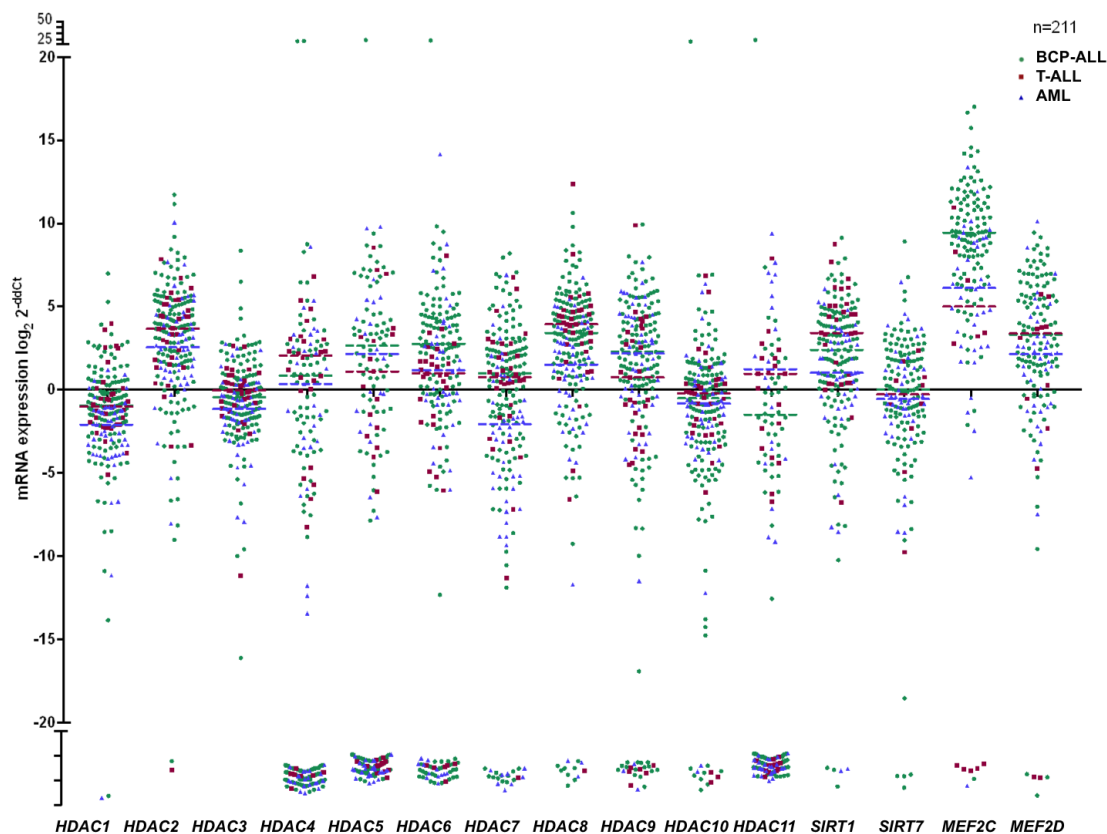
En general, el perfil d'expressió de les CD34+ va ser el més semblant als calibradors (pacients no-neoplàsics), presentant expressió de tots els gens analitzats.

Les cèl·lules B madures CD19+ van presentar, en general, els nivells d'expressió més alts per les diferents *HDACs*, concretament per les *HDACs* de classe I (*HDAC1-3*, *HDAC8*), *HDAC4* i *HDAC9*, tot i que també per la *SIRT1*, *SIRT7*, *MEF2C* i *MEF2D*. D'altra banda, no es va observar expressió de l'*HDAC5*. Pel que fa a les cèl·lules T, no es va observar expressió de la majoria d'*HDACs* de classe II (*HDAC4-HDAC9*) ni tampoc de *MEF2C*.

### **Expressió global de les HDACs, MEF2C i MEF2D en els pacients amb leucèmia aguda**

En els 211 pacients amb leucèmia es va observar una sobreexpressió global de les *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D*, excepte per l'*HDAC1*, *HDAC3*, *HDAC10* i *SIRT7*, que presentaven una mediana al voltant o inferior als valors del calibrador (veure figura 28).

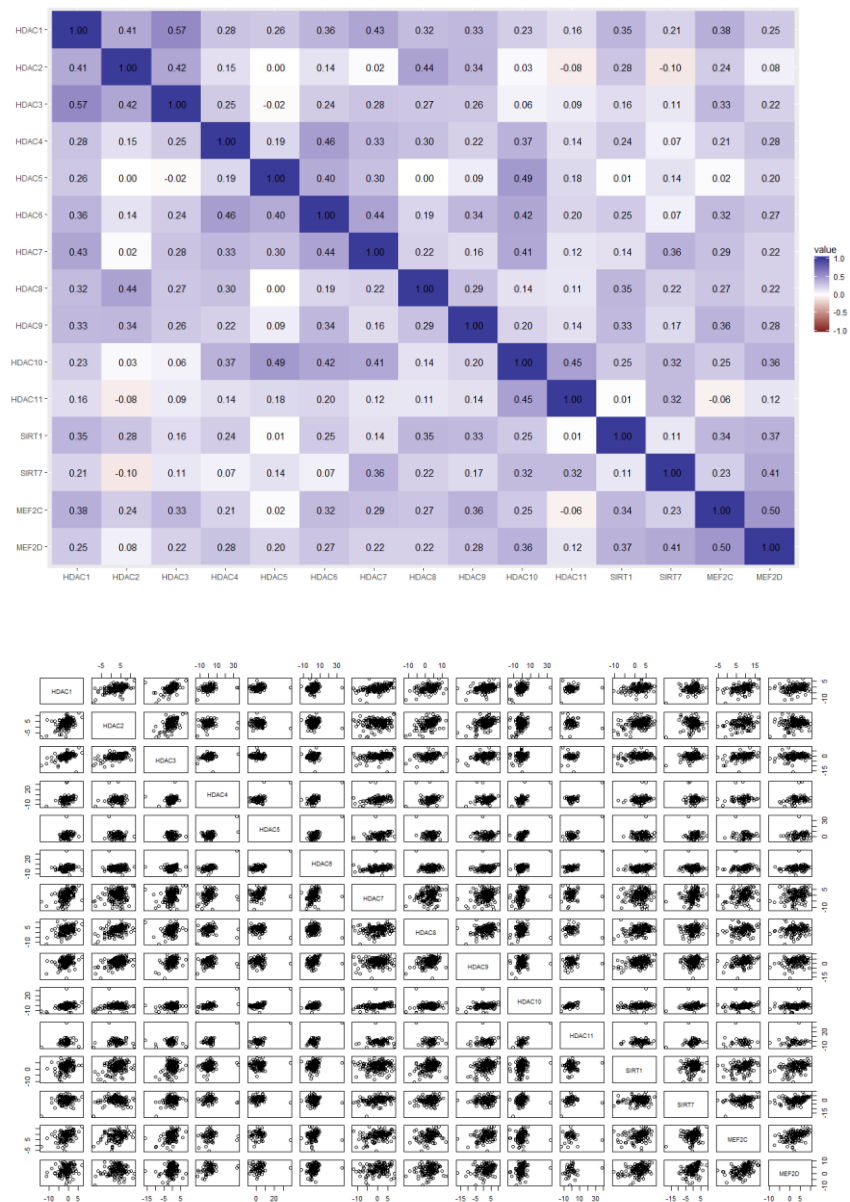
Les *HDACs* de classe I van presentar una expressió homogènia en els diferents pacients, a diferència de les altres isoformes d'*HDACs*, que van presentar una expressió més heterogènia entre els diferents subtipus de leucèmia. De la mateixa manera, tots els pacients van presentar expressió de l'*HDAC1*, l'*HDAC2* i l'*HDAC3*, mentre que alguns pacients no van expressar algunes de les altres isoformes. També les *HDACs* de classe III, *SIRT1* i *SIRT7*, van expressar-se en gairebé tots els pacients. D'altra banda, els nivells d'expressió dels gens *MEF2C* i *MEF2D* van ser elevats, essent *MEF2C* el gen amb la mediana d'expressió més alta en els pacients amb leucèmia, comparat amb les mostres no-neoplàsiques.



**Figura 28| Perfil d'expressió de les HDACs, MEF2C i MEF2D en els 211 pacients pediàtrics amb leucèmia aguda.** La mitjana dels pacients no-neoplàsics s'ha emprat com a calibrador (eix X) i les línies discontinües representen la mediana dels pacients amb expressió. Es mostren en verd les LLA-B, en vermell les LLA-T i en blau les LMA. Les mostres sense expressió d'un determinat gen estan representades fora dels límits de l'eix Y (abaix del gràfic, sense escala).

### **Correlació dels nivells d'expressió entre les HDACs, MEF2C i MEF2D**

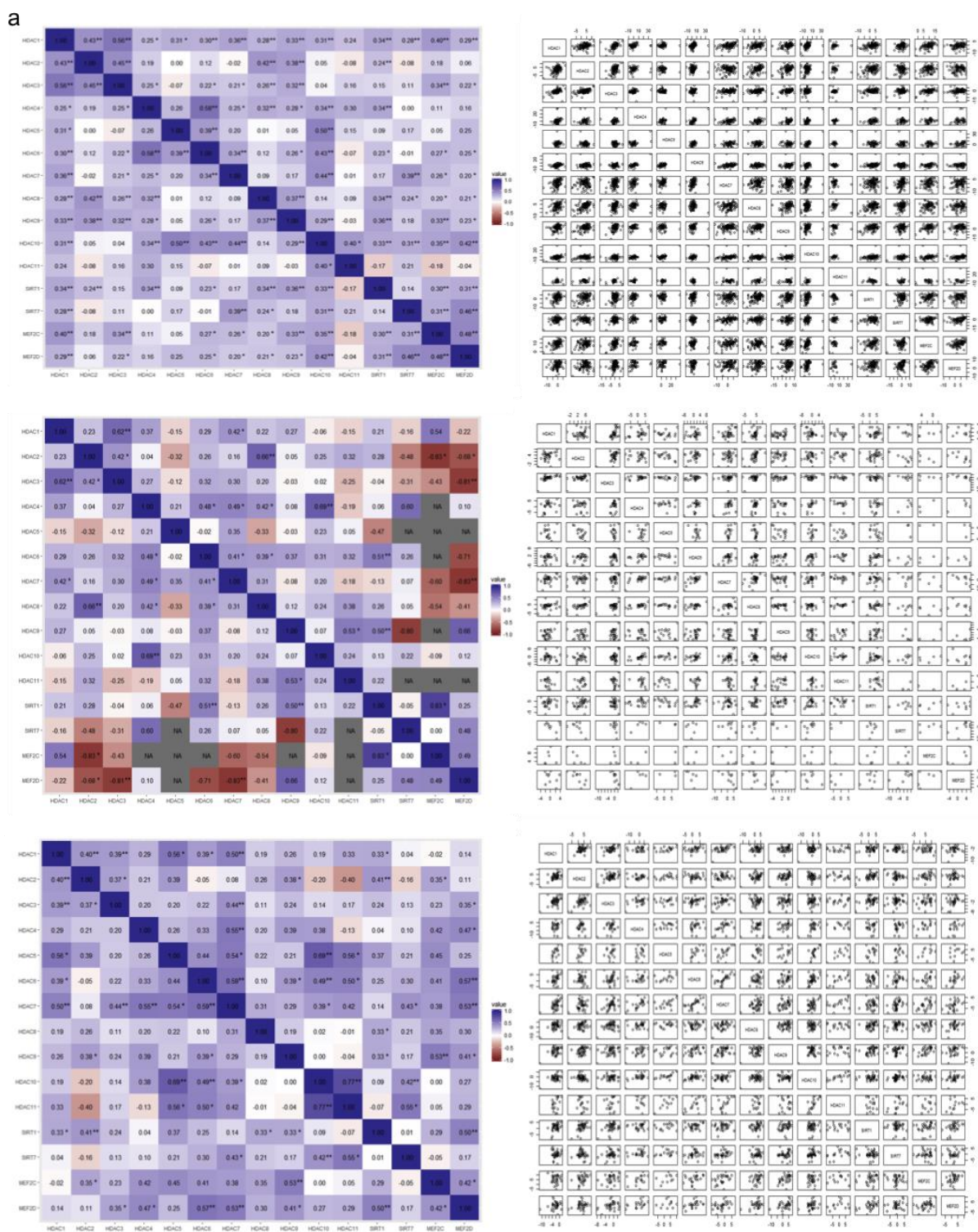
En general, per tota la cohort de pacients en conjunt, es va observar una correlació positiva d'Spearman entre els diferents gens, denotant una certa relació directa entre ells (Figura 29). Concretament, les HDACs de classe I *HDAC1* i *HDAC3* presentaven la correlació més potent ( $r=0,57$ ). També es va observar una correlació directa entre els membres de les HDACs de classe II, concretament entre l'*HDAC4* i l'*HDAC5*, i entre les HDACs de classe IIa i IIb (*HDAC4*, *HDAC5* i *HDAC7* correlacionen amb *HDAC6* i *HDAC10*). Alhora, els gens de la família MEF2, *MEF2C* i *MEF2D*, mostraren una forta correlació directa entre ells.



**Figura 29 |** Matriu de correlacions entre les *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D* en els 211 pacients pediàtrics amb leucèmia aguda. S'han emprat només aquells pacients amb expressió del gen i s'ha calculat mitjançant el mètode d'Spearman.

D'acord amb el llinatge de la leucèmia, es mantenia el mateix resultat que en la cohort global, tot i que amb algunes diferències a destacar (Figura 30). En les LLA-B i les LMA, l'*HDAC9* correlacionava directament amb *SIRT1*, *MEF2C* i *MEF2D*, mentre que no va ser així per les LLA-T. D'altra banda, en les LLA-T, tot i que el nombre de mostres amb dades per l'expressió dels gens *MEF2* era baix, es va observar una correlació inversa entre aquests gens i algunes *HDACs*.

Pel que fa a les *HDACs* de classe III, *SIRT1* i *SIRT7*, i la de classe IV, l'*HDAC11*, es van observar perfils de correlació més heterogenis i diferents en funció del llinatge.



**Figura 30|** Matriu de correlacions entre les *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D* en els 211 pacients pediàtrics amb leucèmia aguda segons llinatge. S'han emprat només aquells pacients amb expressió del gen i s'ha calculat mitjançant el mètode d'Spearman. a) LLA-B, b) LLA-T i c) LMA.



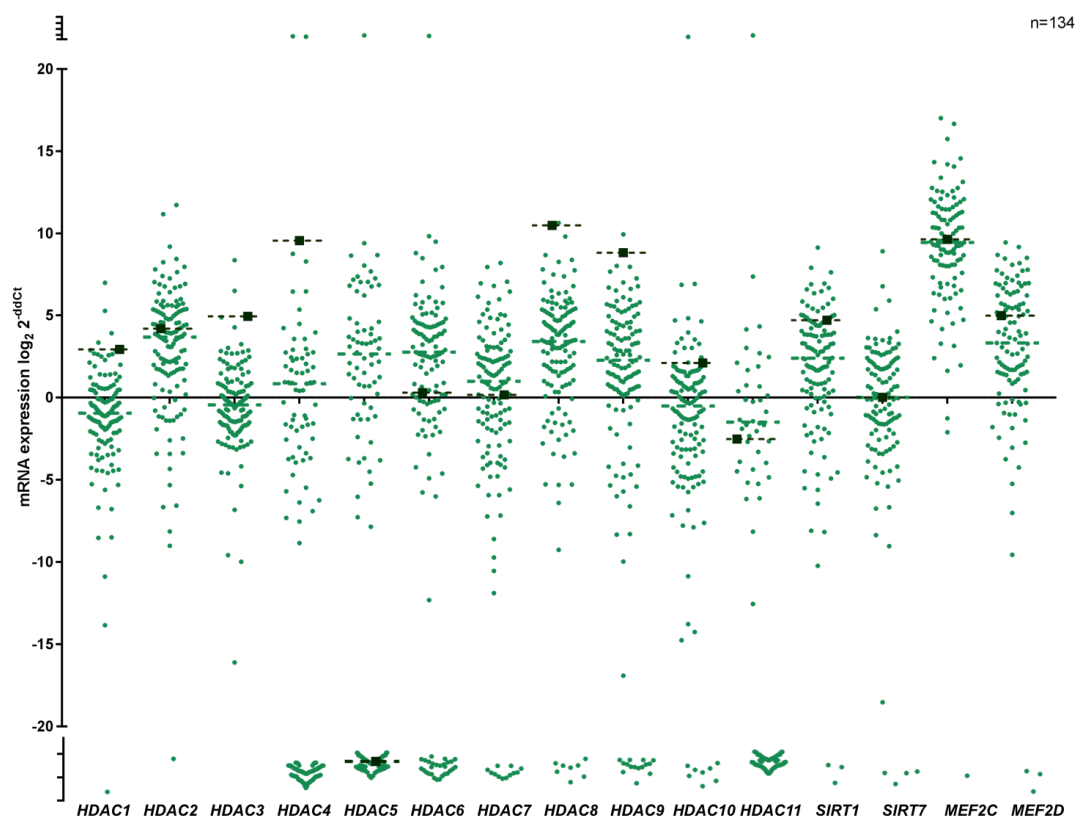
### **Correlació de l'expressió de les HDACs, MEF2C i MEF2D i variables clíniques i biològiques**

En l'estudi de correlacions amb variables clíniques i biològiques al diagnòstic, es va poder observar menor expressió de l'*HDAC3* en nens respecte les nenes ( $p=0,015$ ). Pel que fa a l'edat, es van observar tendències: els nivells més alts de *MEF2D* s'associaven a nens més petits ( $p=0,056$ ), i nivells elevats d'*HDAC9* s'associaven amb lactants i pacients >10 anys, comparat amb pacients d'entre 1-9 anys ( $p=0,057$ ). La hiperleucocitosi per sobre de  $50 \times 10^9/L$  al diagnòstic va correlacionar-se amb nivells baixos d'*HDAC1* i *HDAC3* ( $p=0,017$  i  $p=0,029$ , respectivament), mentre que els pacients amb infiltració del SNC (SNC-3) van presentar els nivells més baixos d'*HDAC2*, tot i que no significativament ( $p=0,052$ ).

### **Perfil d'expressió de les HDACs, MEF2C i MEF2D segons el llinatge: LLA-B**

En general, en quasi tots els pacients amb LLA-B es va observar expressió de les *HDACs* de classe I, exceptuant l'*HDAC8*, així com de *SIRT1*, *SIRT7*, *MEF2C* i *MEF2D*. En comparació amb la resta de llinatges (LLA-T i LMA), els pacients amb LLA-B van presentar més expressió de l'*HDAC6* i *MEF2C* ( $p=0,005$  i  $p<0,001$ , respectivament). En general, el perfil d'expressió de les *HDACs* de classe I, II i IV s'assemblava més al perfil d'expressió de les CD34+ normals que a les cèl·lules madures CD19+ (Figura 31).

En aquest anàlisi, es va observar la falta d'expressió d'alguns gens en un nombre elevat de pacients, pel que les leucèmies LLA-B no van reproduir exactament el patró de les cèl·lules B madures CD19+. Així, mentre en les cèl·lules CD19+ només hi mancava l'expressió de l'*HDAC5*, el 70% de les LLA-B no expressaven *HDAC11*, i l'*HDAC4* i l'*HDAC5* eren absents en aproximadament la meitat dels pacients. En un percentatge més baix, entre el 5-20% dels pacients amb LLA-B, tampoc s'expressaven l'*HDAC7*, *HDAC8*, *HDAC9* i *HDAC10*. A més, la manca d'expressió de diferents *HDACs* era simultània en un mateix pacient, de manera que un mateix pacient va presentar absència de més d'un *HDAC*, tant de la mateixa classe o bé de classes diferents. Una de les combinacions més freqüents va ser la no expressió simultània de l'*HDAC4*, *HDAC5*, *HDAC6* i *HDAC11* en cinc pacients.

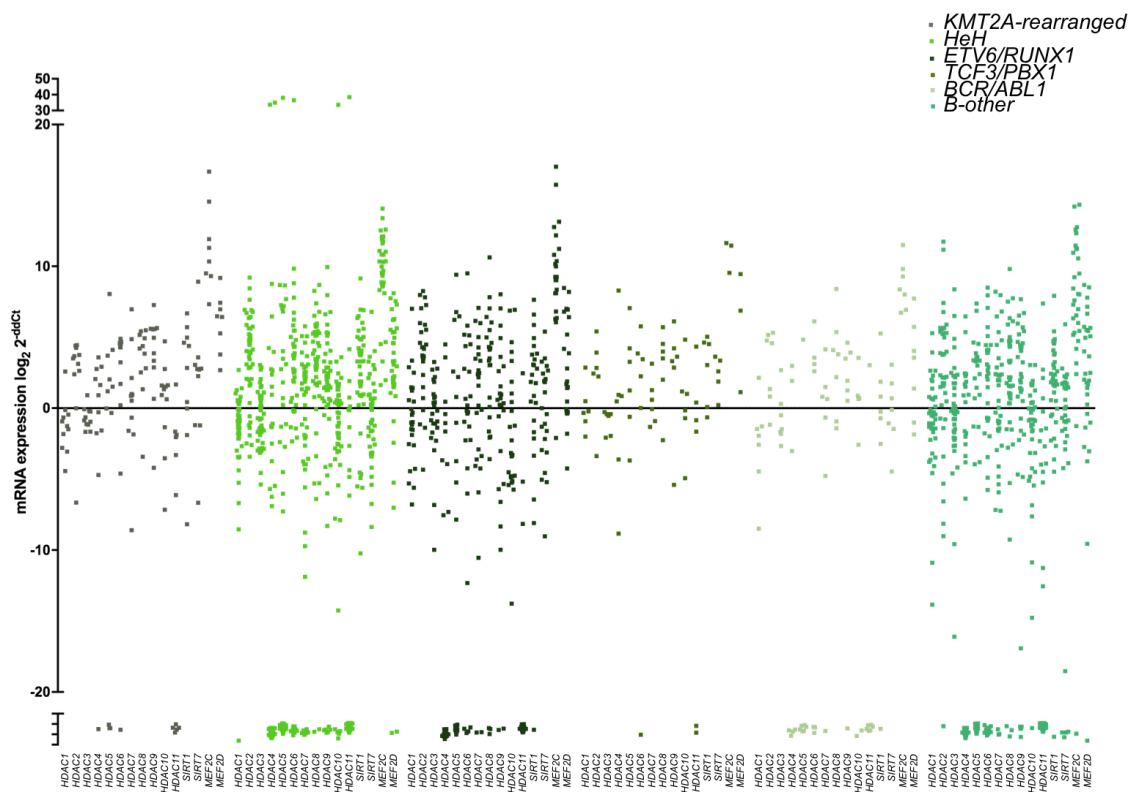


**Figura 31| Perfil d'expressió de les HDACs, MEF2C i MEF2D en els 134 pacients pediàtrics amb LLA-B i en les cèl·lules B madures CD19+.** La mitjana dels pacients no-neoplàsics s'ha emprat com a calibrador (eix X) i les línies discontinües representen la mediana dels pacients amb expressió. Es mostren en verd fluix les LLA-B i en verd fosc les cèl·lules CD19+ madures normals. Les mostres sense expressió d'un determinat gen estan representades fora dels límits de l'eix Y (abaix del gràfic, sense escala).

Així doncs, vam analitzar si l'absència o presència d'alguns gens podia correlacionar amb variables clíniques o biològiques al diagnòstic. Pel que fa a l'absència, la falta d'*HDAC8* en les LLA-B va correlacionar amb nivells alts de MRM al dia +15 del tractament d'inducció (MRM>10%,  $p=0,03$ ). D'altra banda, l'elevada expressió d'*HDAC5* va correlacionar amb sexe masculí ( $p=0,021$ ); els nivells alts d'*HDAC9*, *HDAC11*, *SIRT1* i *MEF2D* van correlacions amb hiperleucocitosi ( $p=0,031$ ;  $p=0,024$ ;  $p=0,014$  i  $p=0,005$ , respectivament).

Pel que fa al fenotip, els pacients amb fenotip pro-B ( $n=9$ ) van presentar significativament menor edat (lactants,  $p<0,001$ ), hiperleucocitosi ( $p=0,002$ ) i s'associaven a la presència de reordenaments del gen *KMT2A* ( $p<0,001$ ), però no vam observar cap associació entre el fenotip i un perfil d'expressió específic d'*HDACs*. Sí que es van observar, però, diferents perfils d'expressió en funció del subtipus

citogenètic (Figura 32). Els pacients amb reordenament del gen *KMT2A* i els pacients amb translocació *t(1;19)/TCF3-PBX1* presentaven expressió de pràcticament tots els gens, mentre que en els pacients inclosos en altres categories moleculars s'observava absència d'algunes *HDACs* de classe II i IV. L'absència d'*HDAC11* va ser particularment freqüent, amb absència en més d'un 80% dels pacients amb *t(9;22)/BCR-ABL1* i en pacients amb *t(12;21)/ETV6-RUNX1*. A més, vam identificar un perfil d'expressió específic dels pacients amb reordenament del gen *KMT2A*: tots, exceptuant un cas, van presentar expressió d'*HDAC4* ( $p=0,009$ ), i una expressió significativament més elevada d'*HDAC9*, *SIRT7* i *MEF2D* ( $p=0,033$ ,  $p=0,039$  i  $p=0,016$ , respectivament), comparada amb la resta de subtipus citogenètics.



**Figura 32| Perfil d'expressió de les *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D* en els 134 pacients pediàtrics amb LLA-B segons els subtipus genètics.** La mitjana dels pacients no-neoplàsics s'ha emprat com a calibrador (eix X) i les línies discontinües representen la mediana dels pacients amb expressió. Les mostres sense expressió d'un determinat gen estan representades fora dels límits de l'eix Y (abaix del gràfic, sense escala).

El grup de pacients *B-other*, és a dir, sense cap de les alteracions genètiques principals, va presentar una expressió heterogènia de les *HDACs*. Dins aquest subgrup, vam observar que un pacient presentava característiques similars a les descrites a la

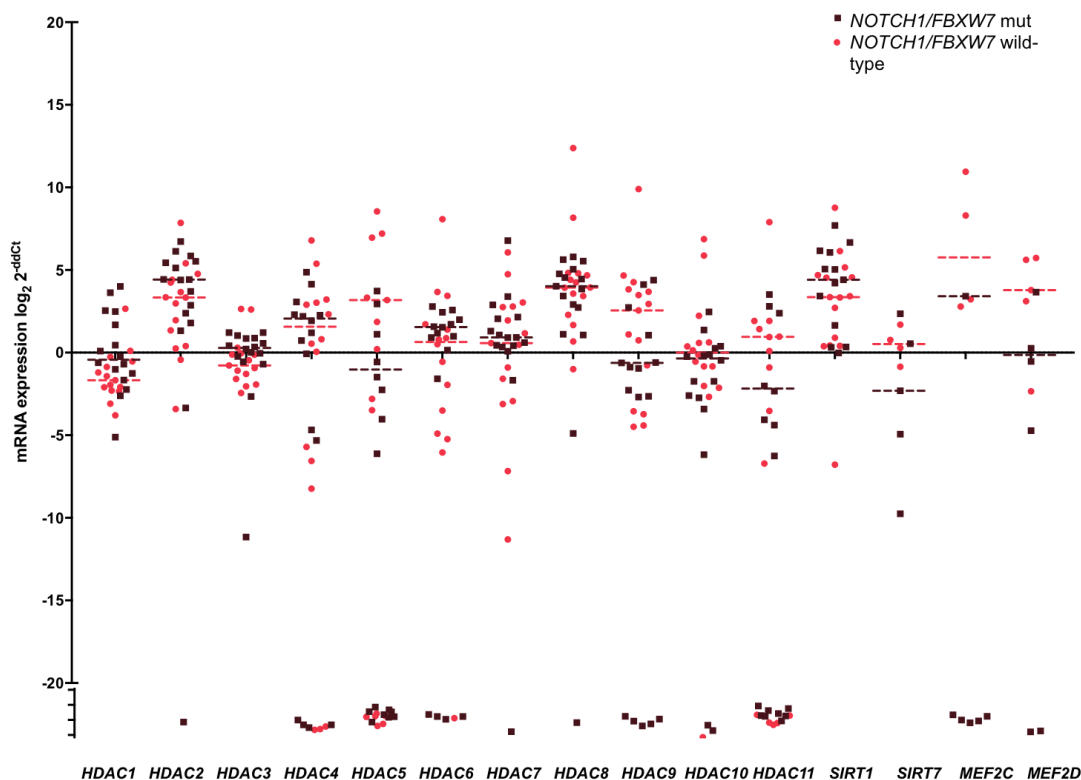
literatura per als pacients amb reordenaments de *MEF2D*: adolescent, fenotip pro-B i elevada expressió d'*HDAC9*. A més, presentava marcadors mieloides. Els estudis de FISH i PCR, però, realitzats pels Dr. Oskar Haas i Dra. Karin Nebral del St. Anna Kinderspital de Viena, van descartar els reordenaments de *MEF2D* i finalment es va poder identificar en reordenament *EP300-ZNF384* en la nostra pacient.

### **Perfil d'expressió de les HDACs, MEF2C i MEF2D segons el llinatge: LLA-T**

En la mateixa línia que per les LLA-B, quasi tots els pacients amb LLA-T van expressar l'*HDAC1*, l'*HDAC2*, l'*HDAC3*, *SIRT1*, *SIRT7*, *MEF2C* i *MEF2D*. En comparació amb la resta de llinatges, LLA-B i LMA, els pacients amb LLA-T van presentar els nivells més alts de *SIRT1* ( $p=0,036$ ). En la comparativa amb la contrapartida normal, es va observar que la majoria dels pacients presentaven expressió de les *HDAC4-HDAC9* i el gen *MEF2C* a diferents nivells, a diferència de les cèl·lules pan-T.

Pel que fa a l'associació amb variables clíniques i biològiques al diagnòstic, els nens presentaven nivell més alts d'*HDAC10* que les nenes ( $p=0,053$ ). Cal destacar que vam observar també una associació entre nivells elevats d'*HDAC4* i mala resposta a la prednisona el dia +8 del tractament d'inducció, tot i que el resultat no va ser estadísticament significatiu ( $p=0,053$ ).

Segons l'estat mutacional dels gens *NOTCH1* i *FBXW7*, es van observar diferències en el perfil d'expressió dels pacients (Figura 33). Així, de la mateixa manera que la seva contrapartida normal, l'absència d'expressió de les *HDAC4*, *HDAC5*, *HDAC6*, *HDAC9*, *HDAC11* i *MEF2C* es presentava majoritàriament en els pacients amb mutacions en *NOTCH1/FBXW7* ( $n=14$ ). Tots els pacients amb manca d'expressió de *MEF2C* tenien mutacions en *NOTCH1/FBXW7*, mentre que tots els pacients, excepte un, amb expressió de *MEF2C* no tenien aquests gens mutats. No obstant, el baix nombre de casos no va permetre l'obtenció de resultats significatius. Curiosament, l'únic pacient amb expressió de *MEF2C* i presència de mutacions en *NOTCH1/FBXW7* tenia un fenotip immadur pre-T.

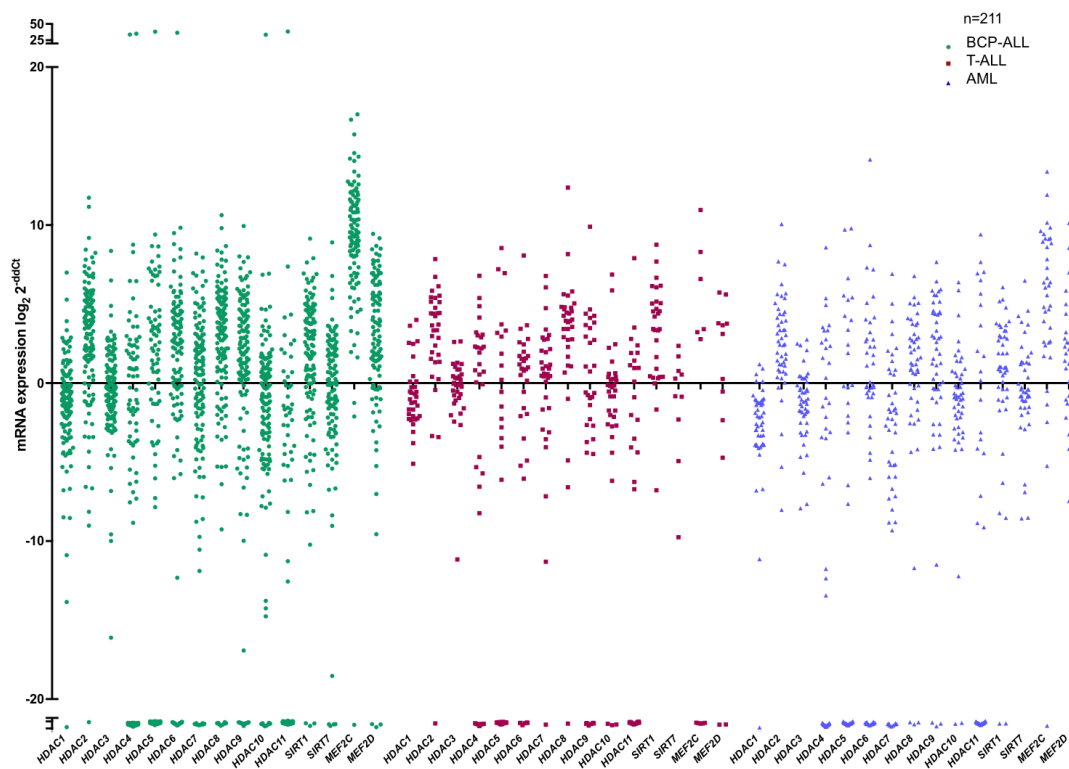


**Figura 33 | Perfil d'expressió de les HDACs, MEF2C i MEF2D en els 33 pacients pediàtrics amb LLA-T segons l'estat mutacional de NOTCH1/FBXW7.** La mitjana dels pacients no-neoplàstics s'ha emprat com a calibrador (eix X) i les línies discontinües representen la mediana dels pacients amb expressió. Les mostres sense expressió d'un determinat gen estan representades fora dels límits de l'eix Y (abaix del gràfic, sense escala). En granat els pacients mutats per NOTCH1/FBXW7 i en vermell els *wild-type* per aquests gens.

### **Perfil d'expressió de les HDACs, MEF2C i MEF2D segons el llinatge: LMA**

En els pacients amb LMA, igual que en les altres leucèmies, les HDACs de classe I i III, MEF2C i MEF2D s'expressaven pràcticament en totes les mostres. Cal destacar que els nivells d'expressió de l'HDAC1, l'HDAC3, l'HDAC8 i l'HDAC7 eren significativament més baixos en aquests pacients comparat amb les leucèmies limfoides ( $p < 0,001$ ;  $p = 0,008$ ;  $p = 0,001$  i  $p = 0,001$ ; respectivament) (veure Figura 34).

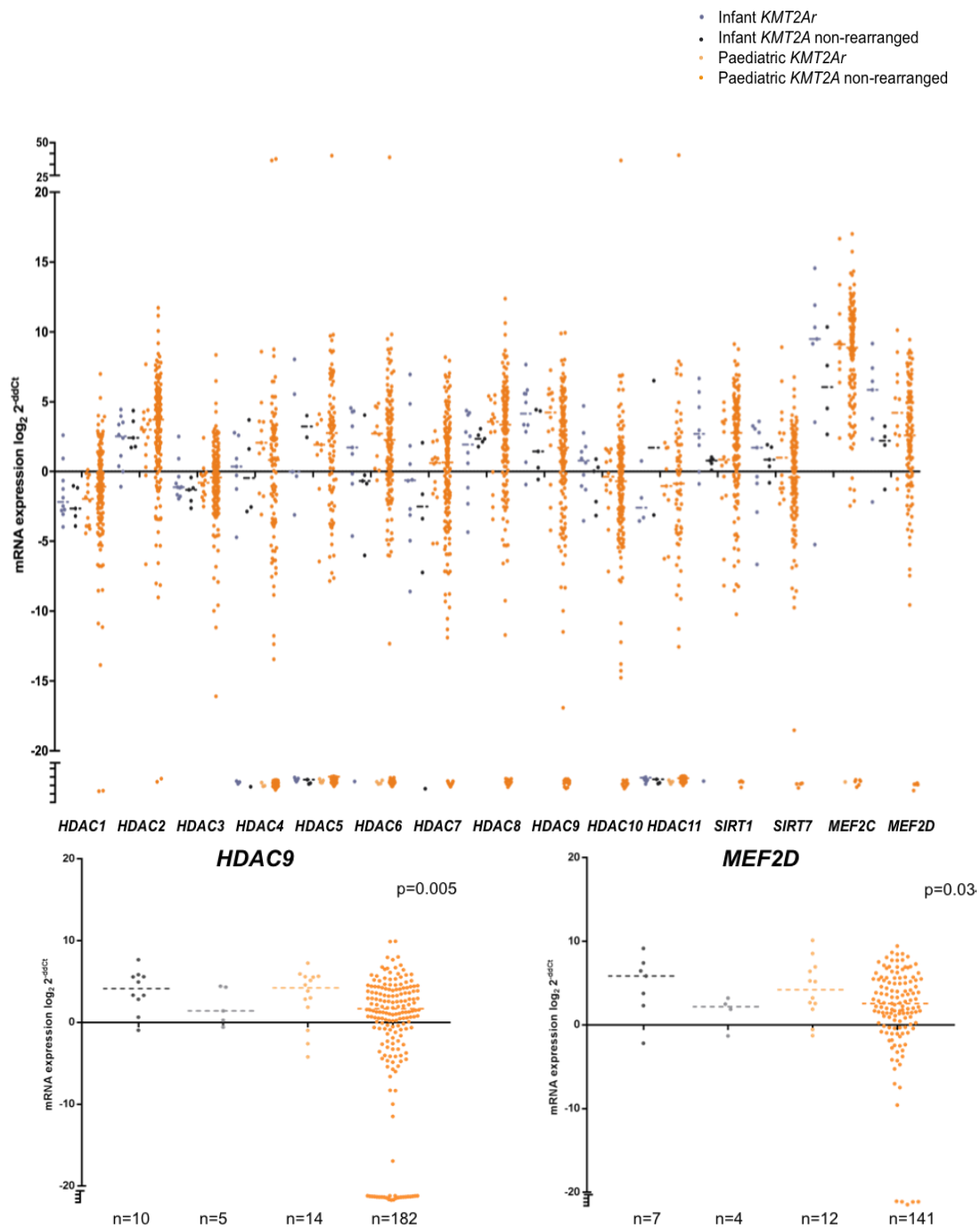
També vam observar que la baixa expressió de l'HDAC1, SIRT1 o l'absència d'expressió d'HDAC10 i HDAC7 correlacionen amb hiperleucocitosi  $> 50 \times 10^9/L$  ( $p = 0,028$ ;  $p = 0,008$ ;  $p < 0,001$  i  $p = 0,034$ ; respectivament). A més, nivells baixos de SIRT1 van correlacionar amb infiltració al SNC (SNC-3) ( $p = 0,048$ ). De forma interessant i de la mateixa manera que en les LLA-B, vam observar que nivells elevats d'HDAC9 i MEF2D s'associaven a la presència del reordenament del gen KMT2A ( $p = 0,034$  i  $p = 0,042$ ; respectivament).



**Figura 34|** Perfil d'expressió de les *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D* en els pacients pediàtrics amb leucèmia aguda segons el llinatge (LLA-B, LLA-T i LMA). La mitjana dels pacients no-neoplàstics s'ha emprat com a calibrador (eix X) i les línies discontinües representen la mediana dels pacients amb expressió. Les mostres sense expressió d'un determinat gen estan representades fora dels límits de l'eix Y (abaix del gràfic, sense escala). En verd les LLA-B, en vermell les LLA-T i en blau les LMA.

***Les pacients amb reordenament del gen *KMT2A* sobreexpressen l'*HDAC9* i *MEF2D*, independentment de l'edat i llinatge***

Havíem observat com en la cohort general de pacients, la sobreexpressió d'*HDAC9* i *MEF2D* s'associava significativament a la presència de reordenaments del gen *KMT2A* ( $p=0,005$  i  $p=0,034$ ; respectivament). Com que la presència del reordenament del gen *KMT2A* va ser significativament més freqüent en lactants (edat <1 any) ( $p<0,001$ ), vam analitzar l'expressió dels diferents gens, *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D*, en diferents grups en funció de l'edat (lactants vs. pediàtrics) i en funció de la presència o no de reordenaments del gen *KMT2A* (Figura 35).



**Figura 35| Perfil d'expressió de les *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D* en els pacients pediàtrics amb leucèmia aguda en funció de l'edat i de la presència del reordenament del gen *KMT2A*.** La mitjana dels pacients no-neoplàsics s'ha emprat com a calibrador (eix X) i les línies discontinües representen la mediana dels pacients amb expressió. Les mostres sense expressió d'un determinat gen estan representades fora dels límits de l'eix Y (abaix del gràfic, sense escala). En gris els lactants i en taronja els pacient pediàtrics; el color més fort indica reordenament del gen *KMT2A*. A dalt, perfil global d'expressió de les *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D*; abaix expressió pels gens *HDAC9* i *MEF2D*.

En aquest anàlisi vam poder observar com els pacients, tant lactants com pediàtrics, amb reordenament del gen *KMT2A*, presentaven sobreexpressió de l'*HDAC9* i *MEF2D*, comparat amb els pacients amb el gen *KMT2A* no-reordenat ( $p=0,005$  i  $p=0,034$ ; respectivament).

Per tant, vam veure que els pacients amb reordenament del gen *KMT2A* presentaven una firma d'expressió diferent del pacients *wild-type*, independentment de l'edat, llinatge o *partner*, caracteritzada per la sobreexpressió dels gens *HDAC9* i *MEF2D*. Per la resta de gens analitzats, no es van observar diferències significatives en funció de l'edat i/o la presència del reordenament del gen *KMT2A*.

### **Estudis de mecanismes de sobreexpressió d'HDAC9:**

#### 1) Anàlisi de mutacions d'HDAC9

En aquest punt, vam voler analitzar la presència de mutacions en el gen *HDAC9* com un dels possibles mecanismes de sobreexpressió. Entre els pacients estudiats (aquells amb els nivells més elevats d'*HDAC9*, amb expressió per sobre del *cut-off* 3.62, significativament pitjor supervivència i mostra disponible, n=31), no es van identificar mutacions en les regions *hot-spot* del domini catalític. Només es va identificar un polimorfisme en un pacient a l'exó 19 d'*HDAC9*, que consistia en una variant sinònima prèviament descrita: rs370099772; c.2472A>T; p.Gly783=.

#### 2) HDAC9 amplificació gènica

Degut a que l'amplificació gènica podria ser una de les causes de sobreexpressió de l'*HDAC9*, es van revisar els cariotips dels pacients amb nivells més alts d'*HDAC9* de la nostra sèrie. Quatre dels 8 casos amb els nivells més elevats tenien hiperdiploidia, però no es va observar cap trisomia o grans anomalies cromosòmiques en les regions 7p21.1 o 1p22, on es localitzen els gens *HDAC9* i *MEF2D*, respectivament (Taula 15). No obstant, per tal de descartar l'amplificació gènica com un possible mecanisme de sobreexpressió de l'*HDAC9* en els pacients amb leucèmia aguda caldria confirmar aquests resultats amb metodologies més sensibles.



Pacient	Log2 expressió HDAC9	Citogenètica
1	7,675	<i>B-other</i> . Reordenament EP300-ZNF384
2	7,959	46,XY[15]/hiperdiploïdia,51+[10]
3	9,942	61,XXY,der(1),+5,+6,+8,+9,+10,+14,+15+16+17+18,+19+20+21+22 [20]
4	9,899	45/46,XY,del(5)(q),del(7)(q),-5?,-7? [18]
5	6,776	54,XX,+X,dup(1)(q21;q32)?,+4,+6,+10,+14,+17,+18,+21[20]/46,XX[7]
6	6,705	46,XX [20]
7	6,520	44, XX,-4 der(9), t(9;13)(p13;q12),-13
8	6,619	51,XY,+X,+10,+18,+21,+mar[9]/46,XY[11]

Taula 15| Cariotip dels pacients amb els nivells d'expressió d'*HDAC9* més elevats.

### **Impacte de l'expressió de les HDACs en la supervivència dels pacients pediàtrics amb leucèmia aguda**

Després d'una mediana de seguiment global de 4,8 anys (extrems 0,1-16 anys), 25 dels 211 pacients havien mort. Tant la SG com la SLE va ser significativament diferent en funció del llinatge, tal i com s'esperava.

En el subgrup de les LLA-B (n=134), vam analitzar mitjançant log-rank tests l'evolució dels pacients. Vam observar com la infiltració al SNC (SNC-3) predia pitjor SG ( $p=0,019$ ) i que els pacients entre 0 i 9 anys tenien millor SG que els lactants i adolescents ( $p=0,046$ ). Entre els gens analitzats, només nivells baixos d'*HDAC2* i nivells elevats d'*HDAC9* van predir la supervivència. Així, els pacients amb expressió baixa d'*HDAC2* (per sota del *cut-off* 3,29 al voltant de la mediana o percentil 50, p50); els pacients amb elevada expressió d'*HDAC9* (per sobre del *cut-off* 3,62, que correspon al voltant del percentil 65); i els pacients amb nivells alts de *SIRT1* (per sobre del *cut-off* 4,08, per sobre del percentil 70), van presentar pitjor SG ( $p=0,008$ ;  $p=0,007$  i  $p=0,027$ ; respectivament). Entre els diferents factors clínics i biològics analitzats, alguns van ser predictius per la SLE: l'edat (tant categoritzada com a lactants *versus* pediàtric, com categoritzada en 3 grups: lactants, entre 1-9 anys i >10 anys), la infiltració del SNC, el subgrup citogenètic, la presència del reordenament del gen *KMT2A* i la MRM post-

inducció (MRM<0,01%, detectada per citometria de flux). També els pacients amb baixa expressió d'*HDAC2* i alta d'*HDAC9* van presentar pitjor SLE ( $p=0,002$  i  $p<0,001$ ; respectivament, figura 36). En els models de regressió de Cox per l'estudi multivariat, la baixa expressió d'*HDAC2* i l'elevada d'*HDAC9* es van mantenir com a factors pronòstic independents per la SLE (HR 0,12; 95%IC 0,03-0,50;  $p=0,003$ ; i HR 42,48; 95%IC 3,80-473,97;  $p=0,002$ ; respectivament) (Taules 16-18).

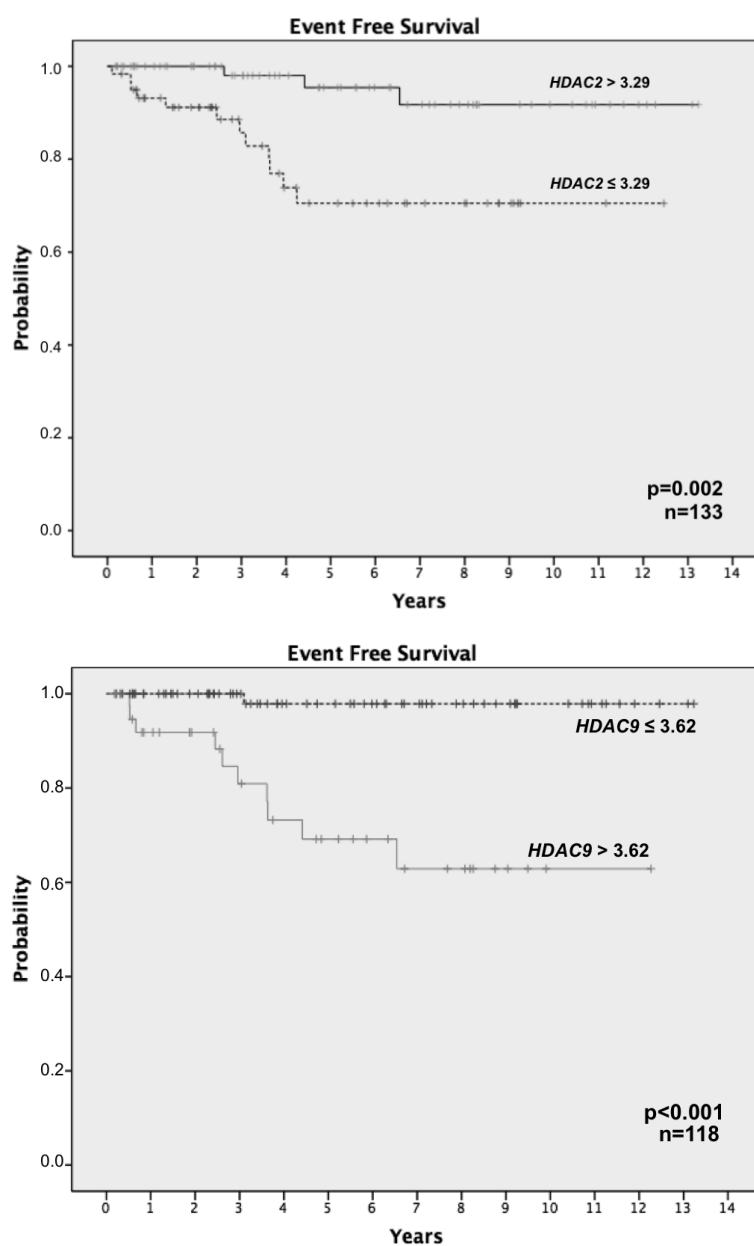


Figura 36| Supervivència lliure d'event (SLE) dels 134 pacients amb LLA-B segons l'expressió de l'*HDAC2* i l'*HDAC9*.

	HR	95% CI		P-value	Global p-value
Sexe=1	1,156	0,192	6,958	0,87	-
Edat*	1,136	0,948	1,360	0,17	-
Edat=[1, 10)	0,155	0,014	1,714	0,13	0,19
Edat=[10, 18)	0,734	0,065	8,255	0,80	
Edat=[1, 18)	0,254	0,028	2,283	0,22	-
Leucòcits*	1,002	0,997	1,008	0,43	-
Leucòcits $\geq$ 20x10 <sup>9</sup> /L	0,373	0,042	3,342	0,38	-
Leucòcits $\geq$ 50x10 <sup>9</sup> /L	1,091	0,122	9,782	0,94	-
Leucòcits $\geq$ 100x10 <sup>9</sup> /L	2,053	0,229	18,434	0,52	-
Leucòcits $\geq$ 200x10 <sup>9</sup> /L	6,228	0,686	56,523	0,10	-
SNC=2/3	2,092	0,228	19,225	0,51	-
KMT2A=1	2,322	0,258	20,868	0,45	-
MRM al final d'inducció $\geq$ 0,01%=1	0,764	0,085	6,885	0,81	-

\*variable contínua

**Taula 16 | Resultat de l'anàlisi univariat per la SG en les LLA-B.**

	HR	95% CI		p-value	Global p-value
Sexe=1	1,659	0,567	4,857	0,36	-
Edat*	1,091	0,970	1,226	0,15	-
Edat=[1, 10)	0,124	0,026	0,591	0,0088	0,054
Edat=[10, 18)	0,312	0,056	1,721	0,18	
Edat=[1, 18)	0,155	0,034	0,702	0,016	-
Leucòcits*	1,007	1,003	1,011	<0,001	-
Leucòcits $\geq$ 20x10 <sup>9</sup> /L	2,195	0,795	6,058	0,13	-
Leucòcits $\geq$ 50x10 <sup>9</sup> /L	1,523	0,429	5,406	0,51	-
Leucòcits $\geq$ 100x10 <sup>9</sup> /L	2,218	0,497	9,894	0,30	-
Leucòcits $\geq$ 200x10 <sup>9</sup> /L	9,349	2,039	42,878	0,0040	-
SNC=2/3	2,168	0,606	7,753	0,23	-
KMT2A=1	6,887	2,149	22,070	0,0012	-
MRM al final d'inducció $\geq$ 0,01%=1	0,963	0,268	3,459	0,95	-
HDAC2 $\geq$ 3,29	0,185	0,051	0,664	0,0097	-
HDAC9 $\geq$ 3,62	21,377	2,736	167,052	0,0035	-

\*variable contínua

**Taula 17 | Resultat de l'anàlisi univariat per la SLE en les LLA-B.**

	HR	95% CI		p-value
Edat=[1, 18)	0,082	0,003	2,344	0,14
Leucòcits*	1,002	0,994	1,010	0,62
<i>KMT2A</i> =1	1,963	0,411	9,368	0,40
<i>HDAC2</i> ≥3,29	0,123	0,030	0,499	0,0034
<i>HDAC9</i> ≥3,62	42,479	3,807	473,971	0,0023

\*variable contínua

**Taula 18| Resultat de l'anàlisi multivariat per la SLE en les LLA-B.**

Pel que fa a les LLA-T (n=33), no es van identificar factors predictius significatius per la SG. No obstant, la hiperleucocitosi  $>100 \times 10^9/L$  i la MRM post-inducció (MRM $>0,01\%$ , detectada per citometria de flux), van obtenir-se com a factors pronòstics advers per la SLE (log rank test; p=0,04 i p=0,004; respectivament). Segurament relacionat amb la mida de la mostra, no es van trobar factors predictius significatius en l'anàlisi multivariat (Taules 19-20 ).

	HR	95% CI		p-value
Edat*	1,030	0,824	1,288	0,79
Edat=[10, 18)	0,866	0,144	5,199	0,88
Leucòcits*	1,000	0,995	1,005	0,96
Leucòcits $\geq 20 \times 10^9/L$	1,674	0,187	14,983	0,64
Leucòcits $\geq 50 \times 10^9/L$	0,847	0,141	5,080	0,86
Leucòcits $\geq 100 \times 10^9/L$	2,050	0,341	12,339	0,43
Leucòcits $\geq 200 \times 10^9/L$	1,072	0,120	9,604	0,95
SNC=2/3	0,652	0,073	5,852	0,70
MRM al final d'inducció $\geq 0,01\%=1$	3,902	0,425	35,793	0,23

\*variable contínua

**Taula 19| Resultat de l'anàlisi univariat per la SG en les LLA-T.**

	HR	95% CI		p-value
Edat*	0,905	0,704	1,163	0,43
Edat=[10, 18)	0,318	0,035	2,851	0,31
Leucòcits*	1,003	0,999	1,006	0,12
Leucòcits $\geq 50 \times 10^9/L$	2,135	0,355	12,825	0,41
Leucòcits $\geq 100 \times 10^9/L$	5,414	0,895	32,745	0,066
Leucòcits $\geq 200 \times 10^9/L$	3,414	0,569	20,479	0,18
SNC=2/3	0,542	0,061	4,852	0,58
MRM al final d'inducció $\geq 0,01\%=1$	3,858	0,421	35,363	0,23

\*variable contínua

**Taula 20 | Resultat de l'anàlisi univariat per la SLE en les LLA-T.**

Finalment, en el subgrup de les LMA (n=44), en general els pacients amb nivells d'expressió elevats per les diferents isoformes d'*HDACs* presentaven pitjor evolució. Concretament, els pacients amb els nivells més alts d'*HDAC9* presentaven pitjor SG (p=0,011). Tot i el nombre baix de pacients que expressaven *HDAC5* (n=18), vam observar que els pacients amb nivells elevats d'aquest gen presentaven pitjor SG i SLE, i això es mantenia significatiu en l'anàlisi multivariat per la SG (HR 10,92; 95%IC 1,16-103,29; p=0,034) (Taulas 21-24).

D'acord amb el subtipus citogenètic, agrupat en tres subtipus: 1) leucèmies agudes promielocítiques i leucèmies *core-binding factor*; 2) leucèmies amb reordenament del gen *KMT2A* i 3) leucèmies sense reordenament del gen *KMT2A*, es van observar diferències significatives en la SLE (p=0,002). També la hiperleucocitosi  $>50 \times 10^9/L$  i nivells alts d'*HDAC8* van impactar significativament sobre la SLE (p=0,027 i p=0,015, respectivament, Figura 37). Finalment, el pacients amb nivells alts d'*HDAC1* i nivells baixos d'*HDAC9* van presentar una tendència a tenir pitjor SLE (p=0,052 i p=0,074, respectivament).

	HR	95% CI		p-value	Global p-value
Sexe=1	0,744	0,270	2,055	0,57	-
Edat*	0,990	0,900	1,089	0,84	-
Edat=[1, 10)	0,375	0,108	1,300	0,12	0,33
Edat=[10, 18)	0,568	0,141	2,288	0,43	
Edat=[1, 18)	0,429	0,135	1,365	0,15	
Leucòcits*	0,991	0,978	1,005	0,21	-
Leucòcits $\geq 20 \times 10^9/L$	0,740	0,235	2,335	0,61	-
Leucòcits $\geq 50 \times 10^9/L$	0,194	0,025	1,475	0,11	-
SNC=2	1,394	0,374	5,199	0,62	0,76
SNC=3	1,579	0,425	5,871	0,50	
KMT2A=1	0,745	0,210	2,649	0,65	-
MRM al final d'inducció $\geq 0,01\%=1$	2,788	0,897	8,666	0,076	-
HDAC1 $\geq -2,96$	2,757	0,775	9,803	0,12	-
HDAC5 $\geq 2,43$	10,665	1,234	92,145	0,031	-
HDAC8 $\geq 2,34$	2,371	0,851	6,610	0,10	-
HDAC9 $\geq 5,11$	3,702	1,271	10,780	0,016	-

\*variable contínua

**Taula 21| Resultat de l'anàlisi univariat per la SG en les LMA.**

	HR	95% CI		p-value
HDAC5 $\geq 2,43$	10,923	1,155	103,287	0,034
HDAC9 $\geq 5,11$	3,466	0,733	16,377	0,12

**Taula 22| Resultat de l'anàlisi multivariat per la SG en les LMA.**

	HR	95% CI	p-value	Global p-value
Sexe=1	0,487	0,196 1,210	0,12	
Edat*	0,981	0,901 1,067	0,65	
Edat [1, 10)	0,488	0,163 1,461	0,20	0,46
Edat [10, 18)	0,645	0,186 2,236	0,49	
Edat=[1, 18)	0,534	0,192 1,488	0,23	
Leucòcits*	0,989	0,974 1,003	0,12	
Leucòcits $\geq 20 \times 10^9/L$	0,487	0,162 1,470	0,20	
Leucòcits $\geq 50 \times 10^9/L$	0,140	0,019 1,054	0,06	
SNC2	1,330	0,376 4,709	0,66	0,91
SNC3	1,011	0,287 3,560	0,99	
KMT2A=1	0,428	0,124 1,469	0,18	
MRM al final d'inducció $\geq 0,01\%=1$	3,258	1,215 8,738	0,019	
HDAC1 $\geq -2,96$	3,152	0,909 10,923	0,070	
HDAC5 $\geq 2,43$	4,277	0,902 20,278	0,067	
HDAC8 $\geq 1,52$	3,044	1,078 8,589	0,035	
HDAC9 $\geq 5,11$	2,350	0,879 6,284	0,089	

\*variable contínua

**Taula 23 | Resultat de l'anàlisi univariat per la SLE en les LMA.**

	HR	95% CI	p-value
MRM al final d'inducció $\geq 0,01\%=1$	2,514	0,867 7,289	0,090
HDAC8 $\geq 1,52$	2,841	0,755 10,699	0,12

**Taula 24 | Resultat de l'anàlisi multivariat per la SLE en les LMA.**

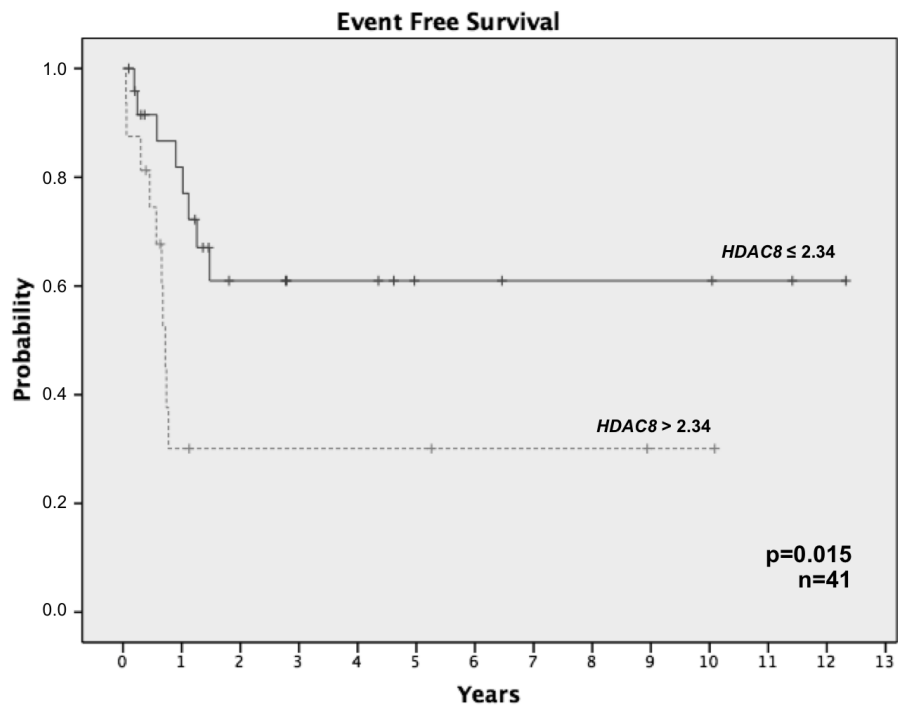


Figura 37| Supervivència lliure d'event (SLE) dels 44 pacients amb LMA segons l'expressió de l'*HDAC8*.





## **DISCUSSIÓ**



La hipoacetilació, així com la sobreexpressió dels diferents *HDACs*, s'ha descrit en els últims anys com una troballa recurrent en diferents tipus de càncer, incloent la leucèmia<sup>175–177</sup>. Actualment, hi ha més de 40 HDACi en assaigs clínics<sup>176,178–182</sup>, però l'aparició de toxicitat en els pacients ha limitat la seva implementació de forma efectiva en la pràctica clínica. Així, l'ús d'inhibidors d'*HDACs* més selectius podria millorar l'eficàcia i tolerància d'aquests fàrmacs en un enfocament de tractament més individualitzat per a cada pacient. Per a fer-ho, un millor coneixement del paper de les *HDACs* en el context de les leucèmies pediàtriques podria aportar guies per al disseny del tractament més adequat amb HDACi de forma personalitzada. Fins ara, però, hi ha pocs estudis<sup>165,166,183</sup>, tots ells amb cohorts petites, que recullin el perfil d'expressió de les *HDACs* en leucèmia pediàtrica. En el present treball s'ha analitzat una sèrie àmplia de pacients, incloent-hi leucèmies de tots els llinatges, i s'han obtingut correlacions entre les diferents *HDACs* i característiques específiques al diagnòstic, així com amb la supervivència dels pacients. Específicament, hem pogut identificar un perfil d'expressió de les *HDACs* que s'associa a la presència del reordenament del gen *KMT2A*, independentment de l'edat, el *partner* i el llinatge de la leucèmia. Altres troballes del perfil d'expressió de les *HDACs* i el gen *MEF2C* són probablement el reflex del llinatge i el grau de maduració dels blasts, i d'altres identifiquen la via oncogènica específica que ha adquirit la cèl·lula per la seva transformació leucèmica.

#### Perfil global d'expressió de les HDACs

En l'anàlisi global, en primer lloc, vam observar com algunes *HDACs* s'expressaven sempre en tots els pacients, mentre que d'altres isoformes semblaven no ser essencials pels blasts i estaven absents. Fins ara, cap dels treballs que han analitzat l'expressió de les *HDACs* en els pacients amb leucèmia recollia aquests valors i es desestimava la informació que podia aportar.

En el nostre treball, hem pogut observar com les *HDACs* de classe I, especialment l'*HDAC1*, l'*HDAC2* i l'*HDAC3*, i amb menys freqüència l'*HDAC8*, s'expressaven quasi bé en tots els pacients, independentment del llinatge. Aquestes isoformes són les que es troben sempre en el nucli, s'expressen en tots els teixits i deacetilen exclusivament

histones. A més, es coneix que l'*HDAC1*, l'*HDAC2* i l'*HDAC3* són essencials pel manteniment de les HSC i les seves propietats d'auto-renovació<sup>182,184</sup>. Per tant, sembla comprensible que tots els nostres pacients, independentment del llinatge de la leucèmia, expressin contínuament aquestes *HDACs* de classe I, i de forma homogènia, com podem apreciar en la Figura 28. També vam observar una correlació directa estadísticament significativa entre les *HDACs* de classe I, especialment entre l'*HDAC1* i l'*HDAC3*. I, tot i que s'han suggerit funcions redundants entre les diferents *HDACs* de classe I, cada membre tindria un paper específic i diferent en el control de l'expressió de determinats gens<sup>177</sup>. Per exemple, l'*HDAC1* i l'*HDAC2* estan implicades en processos de proliferació, cicle cel·lular i apoptosi, mentre que l'*HDAC3* també participa en resposta a dany a l'ADN<sup>184</sup>. Així, les *HDAC1*, *HDAC2* i *HDAC3* semblen indispensables, posant de relleu la importància de les *HDACs* de classe I tant en cèl·lules normals com en les cèl·lules leucèmiques. L'*HDAC8* va presentar una expressió més heterogènia, però també es va observar una correlació amb l'expressió de la resta de les *HDACs* de classe I, especialment amb l'*HDAC2*, en els pacients amb LLA-B i LLA-T. No s'ha descrit que l'*HDAC8* formi part de cap complex multiproteic i la seva expressió sembla més específica segons el tipus de càncer<sup>184</sup>. En quant als nivells d'expressió, es van observar nivells més baixos per l'*HDAC1* i en canvi sobreexpressió de l'*HDAC2* i l'*HDAC8* respecte l'expressió en moll de l'os de les mostres no-neoplàsiques. Aquests resultats concorden amb els perfils prèviament descrits en la literatura, tant per cohorts més petites de pacients pediàtrics amb leucèmia aguda<sup>165,166</sup> com en diferents tipus de càncer<sup>179</sup>.

Per contra, l'expressió de les *HDACs* de classe II va ser més heterogènia i diferent segons el llinatge de la leucèmia. Aquesta expressió heterogènia està en línia amb el que prèviament s'havia descrit en altres estudis<sup>166</sup>.

Pel que fa a les *HDACs* de classe III, les *SIRT1* i *SIRT7*, van presentar una expressió heterogènia, i en general es va observar una sobreexpressió de la *SIRT1*, especialment en els pacients amb LLA-T. Les sirtuines sembla que poden ser una arma de doble tall, en tant que s'han descrit com a gens supressors de tumors i com a proto-oncogens, segons els tipus de càncer<sup>184</sup>. S'ha descrit la importància de la *SIRT1* en la patogènesi dels tumors sòlids i leucèmies, així com en els mecanismes de resistència a fàrmacs,

mitjançant la regulació de l'acetilació de diferents factors de transcripció com P53, C-MYC, N-MYC i NF-KB, entre d'altres<sup>180</sup>. Així, per exemple, en leucèmia mieloide crònica, la inhibició de la *SIRT1* per HDACi condueix a l'acetilació de P53 i augmenta l'apoptosi de les LSC<sup>180,185</sup>.

La sobreexpressió de la *SIRT1* s'ha descrit en pacients adults amb LMA<sup>186</sup> i alguns autors proposen la combinació d'inhibidors tirosina-cinasa amb inhibidors de SIRT1 per a superar els mecanismes de resistència de les LSC en LMA i mutació FLT3-ITD mediat per la deacetilació de C-MYC<sup>187</sup>.

#### Perfil d'expressió de les HDACs segons les cèl·lules normals

En general, tots els pacients van presentar un perfil d'expressió més semblant al de les cèl·lules normals CD34+ que al de les cèl·lules madures de la seva contrapartida normal segons el llinatge (CD19+ o pan-T), especialment els pacients amb LLA-T. Per tant, podríem associar, en part, el perfil d'expressió d'algunes HDACs a l'estat d'immaduresa de la cèl·lula i al reflex de les característiques de cèl·lula mare. No obstant això, també es van observar perfils d'expressió associats al llinatge de la leucèmia, posant de manifest els diferents rols de les HDACs segons el context cel·lular específic.

#### Perfil d'expressió de les HDACs segons el llinatge

En els pacients amb LLA-B (n=134), vam observar el perfil d'expressió diferencial de l'*HDAC7* en els pacients amb fenotip pro-B, tot i que el nombre de casos analitzats amb fenotip pro-B era baix i no vam poder observar diferències significatives. A més, vam observar diferències segons el subtipus genètic (veure Figura 32). Així, els pacients amb reordenament del gen *KMT2A* i aquells amb translocació t(1;19)/*TCF3-PBX1* presentaven expressió de totes les HDACs en pràcticament totes les mostres; per contra, els pacients amb LLA-B incloses en els altres subtipus citogenètics tenien una expressió més heterogènia i un elevat nombre de casos presentava absència d'expressió d'algunes HDACs. Aquestes diferències podrien ser degudes a l'existència d'un perfil epigenètic específic en cada subtipus de leucèmia determinat per les

alteracions genètiques. Cal destacar que es va poder identificar un perfil característic de les LLA-B amb reordenament *KMT2A*, ja que expressaven significativament nivells elevats d'*HDAC9*, *SIRT7* i *MEF2D*. A més, es va observar una correlació significativa entre nivells d'*HDAC9* i *MEF2D* en els pacients amb reordenament *KMT2A* en els pacients amb LMA, tant en lactants com en pediàtrics (Figura 35). Així, es va identificar una firma específica en els pacients amb reordenament *KMT2A*, independentment de l'edat, el *partner* del gen *KMT2A* i el fenotip.

Apart de la presència dels reordenaments del gen *KMT2A*, les causes de la sobreexpressió dels gens *HDAC9* i *MEF2D* podrien atribuir-se a diferents mecanismes. Recentment, s'ha descrit un nou subtipus molecular en les LLA-B caracteritzat per la presència de reordenaments de *MEF2D* amb diferents gens (*BCL9*, *CSF1R*, *DAZAP1*, *HNRNPUL1* i *SS18*)<sup>90</sup>. Aquests reordenaments es presenten normalment en nens més grans amb expressió dèbil o negativa de CD10 i presenten un perfil d'expressió característic amb sobreexpressió de l'*HDAC9* i amb sensibilitat farmacològica *in vitro* provada als HDACi<sup>188</sup>. En la nostra sèrie varem estudiar una pacient amb fenotip pro-B amb marcadors mieloides i una elevada expressió de l'*HDAC9*. Curiosament, els reordenaments de *MEF2D* es van descartar i finalment es va diagnosticar una translocació *EP300-ZNF384*. Tot i que a la literatura s'ha descrit la sobreexpressió de l'*HDAC9* com a característica dels reordenaments de *MEF2D*, podria ser que altres subtipus genètics també presentessin aquesta sobreexpressió. De fet, s'ha descrit una bona resposta *in vitro* a HDACi en reordenaments del gen *ZNF384*<sup>189</sup>.

En els pacients amb LLA-B, LMA i alguns casos de LLA-T, es van detectar nivells significativament alts de *MEF2C*. Les proteïnes MEF2 són diana de les HDACs de classe II i regulen diferents programes de regulació<sup>190,191</sup>. El gen *MEF2C* varia la seva expressió en funció dels estats de desenvolupament hematopoètics i podria estar conferint propietats de cèl·lula mare. De fet, tant en els progenitors hematopoètics mieloides com limfoides, *MEF2C* està altament expressat i els seus nivells disminueixen durant la maduració mioeloides i limfoide, mentre que està absent en les cèl·lules T madures<sup>191</sup>. En el nostre treball, en concordança amb la literatura, les cèl·lules madures pan-T que hem analitzat no presenten expressió de *MEF2C*. D'altra banda, però, sí que s'han descrit nivells elevats de *MEF2C* en leucèmies *KMT2A*<sup>192</sup>, en LMA i en dos subtipus de

LLA-T immadures que es superposen parcialment: les ETP-ALL<sup>191,193</sup> i en el nou subtipus de LLA-T definit per elevada expressió de *MEF2C*, descrit recentment<sup>194</sup>. Les ETP es caracteritzen per presentar un immunofenotip immadur, expressió de marcadors mieloides i baixa freqüència de mutacions al gen *NOTCH1*, en comparació amb els pacients amb LLA-T més diferenciades. De fet, els pacients amb ETP-ALL tenen un perfil mutacional més semblant als dels pacients amb LMA<sup>195</sup>. En aquest sentit, s'ha descrit que l'activitat dels gens *MEF2C* i *NOTCH1* actuaria de forma antagònica. Així, l'expressió ectòpica de *MEF2C* actuaria com a oncogen iniciador en els precursors mieloides i *early-T*, donant lloc a LMA i ETP-ALL, respectivament; mentre que l'activació de la via *NOTCH1* seria iniciador en les LLA-T corticals<sup>191</sup>. És interessant veure com en la nostra cohort, tots els pacients amb LLA-T i mutacions *NOTCH1/FBXW7*, excepte un, no tenen expressió de *MEF2C*, mentre que l'únic pacient amb mutacions a *NOTCH1/FBXW7* i expressió de *MEF2C* presentava un fenotip immadur pre-T (Figura 33). No obstant, altres estudis no observen diferències en la ocurrència d'events activadors de la via oncogènica *NOTCH1* entre els pacients amb fenotip immadur/ETP i els pacients amb LLA-T madures, definides segons el perfil d'expressió<sup>196,197</sup>. Aquestes diferències entre diferents autors poden ser degudes als criteris de selecció dels pacients inclosos a l'estudi o al nombre de casos analitzats, ja que, per exemple, en la nostra sèrie el nombre de pacients amb LLA-T i expressió de *MEF2C* era baix. D'altra banda, en les LMA, una expressió elevada de *MEF2C* s'ha associat amb alteracions en la regió 11q23<sup>192,198</sup>, cariotips amb monosomies, característiques associades a alt risc i mal pronòstic<sup>198</sup>. En models *in vitro* de leucèmies *KMT2A-MLLT3 (MLL-AF9)* i *KMT2A-ENL* s'ha descrit com *MEF2C* podria tenir un paper oncogènic cooperador, participar en l'increment de formació de colònies i regular els processos de migració i invasió cel·lular<sup>192,199</sup>.

#### *La sobreexpressió d'HDAC9 és un marcador pronòstic advers per la supervivència*

Pel que fa a la supervivència, vam poder confirmar l'*HDAC9* com a factor de mal pronòstic en les LLA-B, tal i com prèviament s'havia descrit<sup>166</sup>. Per contra, a diferència d'altres estudis<sup>165</sup>, vam observar que nivells baixos d'expressió d'*HDAC2* correlacionaven amb pitjor SG i SLE. Nivells elevats o heterogenis d'*HDAC2* s'han descrit en diferents tipus de càncer, i de fet, la inhibició de l'*HDAC2* amb HDACi resulta



en una disminució de la proliferació i un augment de l'apoptosi de les cèl·lules tumorals<sup>179,200</sup>. Cal tenir en compte, però, que en l'HDAC2 s'ha descrit la presència de modificacions post-traduccionals<sup>201</sup> i en el nostre treball només s'estudia a nivell de mRNA, de manera que caldrien més estudis per confirmar l'impacte pronòstic de l'expressió d'aquesta HDAC. En general, els pacients amb LMA amb nivells elevats d'HDACs van presentar pitjor pronòstic, i altra vegada, nivells elevats d'HDAC9 correlacionaven significativament amb pitjor SG i SLE. Aquest impacte de l'HDAC9 en la supervivència dels pacients, podria explicar-se, en part, per la seva associació amb el reordenament *KMT2A*, tant en les LLA-B com en les LMA. No obstant, l'impacte negatiu de la sobreexpressió d'HDAC9 també es va observar en els pacients amb LLA-B sense reordenament *KMT2A*, suggerint un impacte pronòstic negatiu d'HDAC9 associat a altres anormalitats genètiques, com els reordenaments de *MEF2D*, tal i com s'ha comentat prèviament.

Se sap que l'HDAC9 juga un paper important en càncer i, de fet, la seva sobreexpressió s'ha associat a pronòstic desfavorable en diferents tipus de neoplàsies, com en càncer de mama, medul·loblastoma i leucèmia<sup>166,202,203</sup>. No obstant, el rol específic que té l'HDAC9 en la biologia de la leucèmia, els mecanismes subjacents a la seva sobreexpressió i les conseqüències funcionals d'aquesta, no es coneixen amb exactitud. Només Lapierre *et al.*<sup>202</sup>, i Milde *et al.*<sup>203</sup>, han realitzat estudi funcional per tal d'esclarir els mecanismes que condueixen a la sobreexpressió, tot i que els resultats obtinguts per ambdós són controvertits.

Per tal d'entendre millor els mecanismes que condueixen a la sobreexpressió de l'HDAC9, vam descartar la **presència de mutacions hot-spot** en el domini catalític de l'HDAC9. Les mutacions activadores són un dels mecanismes que provoca sobreexpressió, i a l'HDAC9 s'ha descrit la presència de mutacions al llarg de tota la seqüència codificant<sup>176</sup>. No obstant, hi ha poques mutacions que afecten al domini catalític i que per tant, puguin ser funcionalment rellevants. La incidència de mutacions a l'HDAC9 en leucèmia aguda no ha estat gaire estudiada, i només hi ha tres casos reportats amb mutació en aquest gens, dos en pacients amb LMA i un pacient amb LLA i síndrome de Down (COSMIC database).

Un altre possible mecanisme que provocaria la sobreexpressió de l'*HDAC9* és la **desregulació de *MEF2D***. L'*HDAC9* és un gen diana directe conegut de *MEF2D*, per tant, la deregulació de *MEF2D* podria conduir a la sobreexpressió de l'*HDAC9*. De fet, experiments del tipus run-on reporten taxes de transcripció gènica elevades per l'*HDAC9*, suggerint que la seva regulació és donada principalment a nivell transcripcional<sup>202</sup>. En el nostre estudi, hem observat una correlació directa entre els gens *HDAC9* i *MEF2D*. No obstant, aquesta associació i regulació podria dependre del llinatge específic i de les alteracions genètiques subjacents. Recentment, la sobreexpressió de l'*HDAC9* s'ha associat a la presència de reordenaments de *MEF2D* dins el grup de les *B-other*<sup>90,92</sup>. Alguns d'aquests casos, també presenten un guany focal de *MEF2D* identificat per SNP array.

En quant al guany focal de *MEF2D* i *HDAC9*, l'**amplificació gènica** com a mecanisme de sobreexpressió és controvertit. Alguns autors han descrit la presència d'amplificacions del gen *HDAC9* en el 50% del limfomes B de cèl·lules grans difuses amb nivells alts d'*HDAC9*<sup>204</sup>. Per contra, estudis en càncer de mama suggereixen que el guany de número de còpies de l'*HDAC9* no afectaria als nivells d'expressió d'aquest<sup>202</sup>. Per tant, aquests tipus de regulació podria ser específica del tipus cel·lular o del context, i actualment no hi ha dades en leucèmia.

En aquest treball, tot i que no hem pogut realitzar SNParrays, hem revisat els cariotips dels pacients amb nivells més alts d'*HDAC9* de la nostra sèrie. Quatre dels 8 casos amb els nivells més elevats tenien hiperdiploïdia, però no es va observar cap trisomia o grans anomalies cromosòmiques en les regions 7p21.1 o 1p22, on es localitzen els gens *HDAC9* i *MEF2D*, respectivament. No obstant, per tal de descartar l'amplificació gènica com un possible mecanisme de sobreexpressió de l'*HDAC9* en els pacients amb leucèmia aguda caldria confirmar aquests resultats amb metodologies més sensibles.

La **regulació epigenètica** s'ha suggerit com un altre possible mecanisme que condueix a la sobreexpressió de l'*HDAC9* en un estudi en càncer de mama, on s'ha observat un augment de marques epigenètiques en el promotor de l'*HDAC9* en els casos amb sobreexpressió<sup>202</sup>.

En quant a les conseqüències d'aquesta sobreexpressió, tampoc hi ha suficients estudis concloents que defineixin els gens diana de l'*HDAC9*. En càncer de mama s'han fet estudis de transcriptoma en el que s'observa desregulació de processos cel·lulars com apoptosi i supervivència, migració cel·lular i proliferació i s'identifiquen *SOX9* i *CDKN1A* com a gens mediadors de l'activitat de l'*HDAC9*<sup>202</sup>. No obstant, aquests resultats haurien de confirmar-se en el context de la leucèmia aguda.

#### *Impacte pronòstic de les HDACs sobre la supervivència en altres llinatges*

En quant a la supervivència en els pacients amb LLA-T, vam observar una associació entre nivells elevats d'*HDAC4* i mala resposta a la prednisona. Com que la prefase de tractament amb prednisona s'ha incorporat en l'últim protocol, el nombre de pacients analitzats és baix i això podria explicar la falta de significança estadística en el resultat. No obstant, aquesta associació ja s'havia reportat prèviament, tot suggerint l'*HDAC4* com una possible diana terapèutica pels pacients pediàtrics amb leucèmia aguda<sup>165,166</sup>.

D'altra banda, els pacients amb LMA i nivells elevats d'*HDAC8* van presentar pitjor evolució (Figura 37). L'*HDAC8* pertany a la classe I i deacetila tant histones com proteïnes no-histones, com P53 i HOXA5. En l'hematopoesi normal, l'*HDAC8* modula l'activitat de P53 per tal d'assegurar el manteniment i la supervivència dels progenitors hematopoètics sota condicions d'estrès cel·lular<sup>205</sup>. En leucèmia, a més de modular l'activitat de p53, l'*HDAC8* s'ha associat amb la proteïna de fusió inv(16)/CBFB-MYH11 i altres co-repressors que inhibeixen diferents gens, donant lloc a una proliferació anormal de les cèl·lules hematopoètiques<sup>206</sup>.

#### *Paper dels HDACi i relació amb els perfils d'expressió d'HDACs*

Els HDACi han emergit en els últims anys com a prometedores dianes terapèutiques, però l'aparició de toxicitat ha limitat el seu ús en la pràctica clínica. Així, s'ha suggerit l'ús d'inhibidors més específics o selectius, sobretot en els subtipus de leucèmia de pacients amb alt risc<sup>207,208</sup>.

Diversos estudis mostren efectes diferents dels HDACi segons els nivells d'*HDAC9* en diferents neoplàsies. En càncer de mama, la resistència a HDACi s'ha correlacionat directament amb l'expressió de l'*HDAC9*, de manera que nivells elevats d'*HDAC9*

disminueixen l'eficàcia dels HDACi<sup>202</sup>. En canvi, en leucèmia, s'ha demostrat la sensibilitat a l'HDACi panobinostat en models *in vivo* amb presència del reordenament *MEF2D-BCL9*, caracteritzats per la sobreexpressió d'*HDAC9*<sup>90</sup>. En la mateixa línia, altres autors també observen activitat inhibidora de dos HDACi (vorinostat i quisinostat) en assajos *in vitro* amb línies cel·lulars i mostres primàries de pacients amb la fusió *MEF2D-BCL9*<sup>92</sup>. Aquests resultats suggereixen HDACi com a potencial opció terapèutica per aquests pacients amb leucèmia d'alt risc.

Els pacients amb reordenament del gen *KMT2A* presenten, en general, mal pronòstic, sobretot els lactants, on el pronòstic és fatal<sup>64</sup>. En els últims anys, la tendència és intentar desenvolupar teràpies dirigides per les leucèmies amb reordenament del gen *KMT2A* (revisat en<sup>68</sup>, i l'ús d'HDACi en<sup>68,180,209,210</sup>). No obstant, tant l'ús d'inhibidors de DOT1L com altres estratègies no han donat els resultats esperats en termes d'eficàcia i toxicitat. Per contra, l'ús d'HDACi de classe I sembla especialment útil en ells pacients amb fusió *KMT2A-AFF4*, mitjançant l'activació de la proteïna endògena *KMT2A wild-type*<sup>68,211</sup>. Aquests estudis i el nostre treball, doncs, suporten l'ús d'HDACi selectius pels pacients pediàtrics amb leucèmia aguda, i especialment aquells amb reordenament del gen *KMT2A*, ja que, a més, s'ha demostrat potencial activitat terapèutica en LLA-B<sup>212</sup>.

#### Limitacions i fortaleces del nostre estudi

El nostre treball, però, presenta algunes limitacions que cal esmentar. En primer lloc, tot i ser la cohort més àmplia fins al moment en la que s'estudia el perfil global d'expressió de les *HDACs*, la incidència de la leucèmia pediàtrica és baixa, de manera que el nombre de pacients en determinat subtipus genètics, definits per llinatge o alteracions moleculars, no és suficient per l'obtenció de resultats estadísticament significatius. Per tant, els nostres resultats han de tractar-se amb precaució fins a que siguin confirmats en sèries més grans de pacients. En segon lloc, no hem pogut confirmar els nostres resultats a nivell proteic. No obstant, diferents estudis suggereixen que el perfil d'expressió a nivell transcripcional és similar al que succeeix a nivell proteic, tant en cèl·lules hematopoètiques normals com leucèmiques, posant de relleu que la regulació de l'expressió de les *HDACs* és duu a terme principalment a nivell d'mRNA<sup>213</sup>. Malgrat això, les modificacions post-traduccionals no poden

descartar-se, com és el cas de l'*HDAC2*, tal i com hem comentat anteriorment<sup>201</sup>. Finalment, no hem pogut validar els resultats en una sèrie independent, però s'ha pogut confirmar l'impacte pronòstic de l'*HDAC2* i l'*HDAC9* en les LLA-B en dos protocols diferents dins la nostra sèrie, fet que reforça el seu valor com a biomarcadors pronòstic.

D'altra banda, cal destacar els punts forts d'aquest estudi, en el qual s'ha pogut analitzar tot el perfil d'expressió de les *HDAC* i els gens *MEF2C* i *MEF2D* en una sèrie àmplia de pacients, fins al moment la més gran, tractats homogèniament i amb tots els llinatges representats. Això ha permès la comparació dels perfils entre els diferents subtipus de leucèmia pediàtrica i obtenir una imatge global del seu paper en aquests pacients. A més, s'ha pogut identificar un perfil d'expressió diferencial pels pacients amb reordenament del gen *KMT2A* i apuntar l'ús d'algunes *HDACs* com a biomarcador pronòstic.

## PERSPECTIVES DE FUTUR

Amb aquest treball s'obren possibles noves vies de treball:

- ✓ **Validar els nostres resultats en altres sèries de pacients independents**, per tal de confirmar els nostres resultats i identificar nous biomarcadors amb impacte pronòstic i disseny de noves teràpies.
- ✓ **Estudi dels pacients amb LLA-B del subtipus *B-other*** per tal d'identificar noves categories (reordenaments de *MEF2D* i *ZNF384*) amb sensibilitat reportada als HDACi.
- ✓ **Realització d'estudis per entendre els mecanismes** pels quals les HDACs estan regulades, com estudis funcionals d'interacció amb altres mecanismes epigenètics (miRNA).
- ✓ **Estudis funcionals amb HDACi** (pan-inhibidors/isoforma-selectius).



## **CONCLUSIONS**





## CONCLUSIONS

1. Les cèl·lules hematopoètiques (CD34+, limfòcits B i T madurs) normals presenten perfils d'expressió d'*HDACs* que varien en funció del grau de maduració i llinatge.
2. Els pacients pediàtrics amb diferents subtipus de leucèmia aguda presenten perfils d'expressió d'*HDACs* característics, que poden reflectir el grau d'immaduresa de la cèl·lula leucèmica, el seu llinatge o la via oncogènica relacionada amb la leucemogènesi.
3. En la nostra sèrie, les diferents varietats genètiques de leucèmia van presentar signatures d'*HDACs* distintives:
  - a. Els pacients amb LLA-T amb absència d'expressió de *MEF2C* tenien mutacions a *NOTCH1/FBXW7*, mentre que els pacients amb nivells elevats de *MEF2C* no presentaven mutacions en *NOTCH1/FBXW7*.
  - b. Els pacients amb reordenament del gen *KMT2A* van mostrar una sobreexpressió de l'*HDAC9* i *MEF2D*, independentment de l'edat, llinatge i *partner* del gen de fusió.
4. La sobreexpressió de l'*HDAC9* va constituir un biomarcador de mal pronòstic en els pacients amb LLA-B, independentment de l'estat del gen *KMT2A*.



## **REFERÈNCIES**



1. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 2008;132(4):631–644.
2. Pietras EM, Reynaud D, Kang Y-A, et al. Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell*. 2015;17(1):35–46.
3. Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100 Suppl:11842–11849.
4. Blank U, Karlsson G, Karlsson S. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood*. 2008;111(2):492–503.
5. Akala OO, Clarke MF. Hematopoietic stem cell self-renewal. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2006;16(5):496–501.
6. Luis TC, Killmann NM-B, Staal FJT. Signal transduction pathways regulating hematopoietic stem cell biology: Introduction to a series of Spotlight Reviews. *Leukemia*. 2012;26(1):86–90.
7. Borowitz NJ, Bene MC, Harris NL, Porwit-MacDonald A ME. Acute leukaemias leukaemias of ambiguous lineage. *WHO Classif. Tumours Haematop. Lymphoid Tissues. Int. Agency Res. Cancer*. 150–155.
8. (NIH) NCI. US Cancer Institute's Surveillance Epidemiology and End Results (SEER program).
9. Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA. Cancer J. Clin.* 2014;64(2):83–103.
10. McReynolds LJ, Savage SA. Pediatric leukemia susceptibility disorders: manifestations and management. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* 2017;2017(1):242–250.
11. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*. 2006;6(3):193–203.
12. Kneale GW. Risk of childhood cancer from fetal irradiation. *Br. J. Radiol.* 1998;71(844):460–461.
13. McNerney ME, Godley LA, Le Beau MM. Therapy-related myeloid neoplasms: when genetics and environment collide. *Nat. Rev. Cancer*. 2017;17(9):513–527.
14. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013;381(9881):1943–1955.
15. Kinlen L. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a Scottish new town with nuclear reprocessing sites in Britain. *Lancet (London, England)*. 1988;2(8624):1323–7.
16. Greaves MF. Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1988;2(2):120–125.
17. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*. 2018;
18. Huntly BJP, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat. Rev. Cancer*. 2005;5(4):311–321.
19. Tremblay CS, Curtis DJ. The clonal evolution of leukemic stem cells in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* 2014;21(4):320–5.
20. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–674.

21. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*. 2003;3(9):639–649.
22. Moorman A V. Counting chromosomes in 2018: Is aneuploidy relevant in the genomic era? *New Mol. Insights Innov. Manag. Approaches Acute Lymphoblastic Leuk. EHA-SWG Sci. Meet.* 2018;21–23.
23. Ferrando AA, López-Otín C. Clonal evolution in leukemia. *Nat. Med.* 2017;23(10):1135–1145.
24. Mullighan CG. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin. Hematol.* 2013;50(4):314–324.
25. Alpar D, Wren D, Ermini L, et al. Clonal origins of ETV6-RUNX1+ acute lymphoblastic leukemia: studies in monozygotic twins. *Leukemia*. 2015;29(4):839–846.
26. Corces-Zimmerman MR, Majeti R. Pre-leukemic evolution of hematopoietic stem cells - the importance of early mutations in leukemogenesis. *Leukemia*. 2014;28(12):2276–2282.
27. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306–13.
28. Kelly LM, Gilliland DG. GENETICS OF MYELOID LEUKEMIAS. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2002;3(1):179–198.
29. Balgobind B V., Hollink IHIM, Arentsen-Peters STCJM, et al. Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2011;96(10):1478–1487.
30. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016;127(1):29–41.
31. Böiers C, Richardson SE, Wray JP, Enver T. Origins and clonal evolution of childhood leukemia. 2015;9(1):1–5.
32. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2008;322(5906):1377–80.
33. Greaves M. Cancer stem cells: Back to Darwin? *Semin. Cancer Biol.* 2010;20(2):65–70.
34. Greaves M. Darwin and evolutionary tales in leukemia. *Hematology*. 2009;2009(1):3–12.
35. Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, et al. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2011;471(7337):235–239.
36. A.Lassaleta Atienza FC. Leucemia linfoblástica aguda. *Hematol. y Oncol. Pediátricas*. 2015;445–464.
37. L.Maderi López APM. Leucemia mieloide aguda. *Hematol. y Oncol. Pediátricas*. 2015;465–480.
38. Genescà E, Ribera J, Ribera J-M. Leucemia aguda linfoblástica de precursores T: de la biología a la clínica. *Med. Clin. (Barc)*. 2015;144(5):223–229.
39. Kuo FC, Mar BG, Lindsley RC, Lindeman NI. The relative utilities of genome-wide, gene panel, and individual gene sequencing in clinical practice.
40. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007;446(7137):758–64.
41. Bolouri H, Farrar JE, Triche T, et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nat. Med.* 2017;24(1):103–112.

42. Harrison CJ, Haas O, Harbott 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. *Br. J. Haematol.* 2010;151(2):132–142.
43. Creutzig U, Van Den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: Recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2012;120(16):3167–3205.
44. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* 1976;33(4):451–8.
45. Wang S, He G. 2016 Revision to the WHO classification of acute lymphoblastic leukemia. *J. Transl. Intern. Med.* 2016;4(4):147–149.
46. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391–405.
47. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia.* 1995;9(10):1783–6.
48. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391–405.
49. Nigro L. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2013;35(4):245–252.
50. Paulsson K, Forestier E, Lilljebjorn H, et al. Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010;107(50):21719–21724.
51. Moorman A V. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev.* 2012;26(3):123–135.
52. Moorman A V, Ensor HM, Richards SM, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(5):429–438.
53. Paulsson K, Forestier E, Andersen MK, et al. High modal number and triple trisomies are highly correlated favorable factors in childhood B-cell precursor high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia treated according to the NOPHO ALL 1992/2000 protocols. *Haematologica.* 2013;98(9):1424–32.
54. Harrison CJ, Moorman A V, Broadfield ZJ, et al. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2004;125(5):552–559.
55. Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2015;
56. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 2013;45(3):242–52.
57. Safavi S, Paulsson K. Near-haploid and low hypodiploid acute lymphoblastic leukemia - two distinct subtypes but consistently poor prognosis. *Blood.* 2016;129(4):1–18.
58. Hunger SP. Chromosomal translocations involving the E2A gene in acute lymphoblastic leukemia: clinical features and molecular pathogenesis. *Blood.* 1996;87(4):1211–24.



59. Barber KE, Harrison CJ, Broadfield ZJ, et al. Molecular cytogenetic characterization of TCF3 (E2A)/19p13.3 rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes. Chromosomes Cancer*. 2007;46(5):478–86.
60. Motlló C, Ribera J-M, Morgades M, et al. Frequency and prognostic significance of additional cytogenetic abnormalities to the Philadelphia chromosome in young and older adults with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma*. 2018;59(1):146–154.
61. Rives S, Estella J, Gómez P, et al. Intermediate dose of imatinib in combination with chemotherapy followed by allogeneic stem cell transplantation improves early outcome in paediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (ALL): results of the Spanish Cooperative G. *Br. J. Haematol*. 2011;154(5):600–611.
62. Rives S, Camós M, Estella J, et al. Longer follow-up confirms major improvement in outcome in children and adolescents with Philadelphia chromosome acute lymphoblastic leukaemia treated with continuous imatinib and haematopoietic stem cell transplantation. Results from the Spanish Cooperative. *Br. J. Haematol*. 2013;162(3):.
63. Ribera J-M. Optimal approach to treatment of patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: how to best use all the available tools. *Leuk. Lymphoma*. 2013;54(1):21–27.
64. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*. 2018;32(2):273–284.
65. Marschalek R. Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins. *Br. J. Haematol*. 2011;152(2):141–154.
66. Yokoyama A. Transcriptional activation by MLL fusion proteins in leukemogenesis. *Exp. Hematol*. 2017;46:21–30.
67. Sanjuan-pla A, Bueno C, Prieto C, et al. Revisiting the biology of infant t(4;11)/MLL-AF41 B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;126(25):2676–2686.
68. Steinhilber D, Marschalek R. How to effectively treat acute leukemia patients bearing MLL -rearrangements? *Biochem. Pharmacol*. 2017;147:183–190.
69. Moorman A V., Harrison CJ, Buck GAN, et al. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*. 2007;109(8):3189–3197.
70. Dyer MJS, Akasaka T, Capasso M, et al. Immunoglobulin heavy chain locus chromosomal translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: rare clinical curios or potent genetic drivers? *Blood*. 2010;115(8):1490–1499.
71. Moorman A V, Schwab C, Ensor HM, et al. IGH@ translocations, CRLF2 deregulation, and microdeletions in adolescents and adults with acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol*. 2012;30(25):3100–8.
72. Moorman A V, Enshaei A, Schwab C, et al. A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;124(9):1434–44.
73. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. 2017;35(9):.
74. Lilljebjörn H, Fioretos T. New oncogenic subtypes in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;130(12):1395–1401.
75. Harrison CJ, Moorman A V, Schwab C, et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia*. 2014;28(5):1015–21.

76. Rand V, Parker H, Russell LJ, et al. Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;117(25):6848–6855.
77. Heerema NA, Carroll AJ, Devidas M, et al. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 is associated with inferior outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia treated in contemporary standard-risk children's oncology group studies: a report from the children's oncology group. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(27):3397–402.
78. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol.* 2009;10(2):125–134.
79. Izraeli S. Beyond Philadelphia: “Ph-like” B cell precursor acute lymphoblastic leukemias - diagnostic challenges and therapeutic promises. *Curr. Opin. Hematol.* 2014;21(4):289–96.
80. Ofran Y, Izraeli S. BCR-ABL (Ph)-like acute leukemia-Pathogenesis, diagnosis and therapeutic options. *Blood Rev.* 2016;
81. Maese L, Tasian SK, Raetz EA. How is the Ph-like signature being incorporated into ALL therapy? *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2017;30(3):222–228.
82. Moorman A V., Harrison CJ, Buck G a N, et al. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): Analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*. 2007;109(8):3189–3197.
83. Russell LJ, Jones L, Enshaei A, et al. Characterisation of the genomic landscape of CRLF2-rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosom. Cancer.* 2017;56(5):363–372.
84. Schmah J, Fedders B, Panzer-Grümayer R, et al. Molecular characterization of acute lymphoblastic leukemia with high *CRLF2* gene expression in childhood. *Pediatr. Blood Cancer.* 2017;64(10):e26539.
85. Jeffries SJ, Jones L, Harrison CJ, Russell LJ. IGH@ translocations co-exist with other primary rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2014;99(8):1334–42.
86. Schwab CJ, Chilton L, Morrison H, et al. Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Association with cytogenetics and clinical features. *Haematologica.* 2013;98(7):1081–1088.
87. Schwab C, Nebral K, Chilton L, et al. Intragenic amplification of PAX5: a novel subgroup in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia? *Blood Adv.* 2017;1(19):1473–1477.
88. Stasevich I, Inglott S, Austin N, et al. PAX5 alterations in genetically unclassified childhood Precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2015;171(2):263–272.
89. Farrar JE, Schuback HL, Ries RE, et al. Genomic profiling of pediatric acute myeloid leukemia reveals a changing mutational landscape from disease diagnosis to relapse. *Cancer Res.* 2016;2197–2206.
90. Gu Z, Churchman M, Roberts K, et al. Genomic analyses identify recurrent MEF2D fusions in acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Commun.* 2016;7:13331.

91. Shago M, Abla O, Hitzler J, Weitzman S, Abdelhaleem M. Frequency and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia with ZNF384 gene rearrangements including a novel translocation resulting in an ARID1B/ZNF384 gene fusion. *Pediatr. Blood Cancer*. 2016;63(11):1915–21.
92. Suzuki K, Okuno Y, Kawashima N, et al. MEF2D-BCL9 Fusion Gene Is Associated With High-Risk Acute B-Cell Precursor Lymphoblastic Leukemia in Adolescents. *J. Clin. Oncol*. 2016;34(28):3451–9.
93. Zhang J, McCastlain K, Yoshihara H, et al. Deregulation of DUX4 and ERG in acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet*. 2016;48(12):1481–1489.
94. Clappier E, Auclerc MF, Rapon J, et al. An intragenic ERG deletion is a marker of an oncogenic subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a favorable outcome despite frequent IKZF1 deletions. *Leukemia*. 2014;28(1):70–7.
95. Zaliouva M, Zimmermannova O, Dörge P, et al. ERG deletion is associated with CD2 and attenuates the negative impact of IKZF1 deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(5):1222.
96. Yasuda T, Tsuzuki S, Kawazu M, et al. Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults. *Nat. Genet*. 2016;48(5):569–574.
97. Lilljebjörn H, Henningsson R, Hyrenius-Wittsten A, et al. Identification of ETV6-RUNX1-like and DUX4-rearranged subtypes in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Commun*. 2016;7:11790.
98. Moorman A V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(4):407–16.
99. Boer JM, Steeghs EMP, Marchante JRM, et al. Tyrosine kinase fusion genes in pediatric & BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2017;8(3):4618–4628.
100. Stanulla M, Dagdan E, Zaliouva M, et al. IKZF1plus Defines a New Minimal Residual Disease-Dependent Very-Poor Prognostic Profile in Pediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Clin. Oncol*. 2018;36(12):1240–1249.
101. Dörge P, Meissner B, Zimmermann M, et al. IKZF1 deletion is an independent predictor of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Haematologica*. 2013;98(3):428–32.
102. Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of *IKZF1* and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2009;360(5):470–480.
103. Karrman K, Johansson B. Pediatric T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genes. Chromosomes Cancer*. 2016;
104. Yui M a., Rothenberg E V. Developmental gene networks: a triathlon on the course to T cell identity. *Nat. Rev. Immunol*. 2014;14(8):529–545.
105. Girardi T, Vicente C, Cools J, De Keersmaecker K. The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood*. 2017;129(9):1113–1123.
106. Vlierberghe P Van, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. ....* 2012;122(10):.
107. Vicente C, Cools J, Keersmaecker K De. The genetics and molecular biology of T-ALL Copyright © 2017 American Society of Hematology CDKN2A CDKN2B. 2017;(max 250):

108. Trinquand A, Tanguy-Schmidt A, Abdelali R Ben, et al. Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-Cell acute lymphoblastic leukemia: A group for research in adult acute lymphoblastic leukemia study. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(34):4333–4342.
109. Liu R-B, Guo J-G, Liu T-Z, et al. Meta-analysis of the clinical characteristics and prognostic relevance of NOTCH1 and FBXW7 mutation in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget.* 2017;8(39):66360–66370.
110. Petit A, Trinquand A, Chevret S, et al. Oncogenetic mutations combined with MRD improve outcome prediction in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2018;131(3):289–300.
111. Bolouri H, Farrar JE, Triche T, et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nat. Med.* 2017;24(1):103–112.
112. Bullinger L, Döhner K, Döhner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J. Clin. Oncol.* 2017;35(9):934–946.
113. Bonaventure A, Harewood R, Stiller CA, et al. Worldwide comparison of survival from childhood leukaemia for 1995-2009, by subtype, age, and sex (CONCORD-2): a population-based study of individual data for 89 828 children from 198 registries in 53 countries. *Lancet. Haematol.* 2017;4(5):e202–e217.
114. Smith M, Arthur D, Camitta B, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 1996;14(1):18–24.
115. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet (London, England).* 1999;354(9189):1499–503.
116. Bateman CM, Colman SM, Chaplin T, et al. Acquisition of genome-wide copy number alterations in monozygotic twins with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2010;115(17):3553–8.
117. Ma X, Edmonson M, Yergeau D, et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Commun.* 2015;6(1):6604.
118. Rubnitz JE, Wichlan D, Devidas M, et al. Prospective Analysis of *TEL* Gene Rearrangements in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Children’s Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* 2008;26(13):2186–2191.
119. Loh ML, Goldwasser MA, Silverman LB, et al. Prospective analysis of *TEL/AML1*-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01. *Blood.* 2006;107(11):4508–4513.
120. Dastugue N, Suciú S, Plat G, et al. Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood.* 2013;121(13):2415–23.
121. Kager L, Lion T, Attarbaschi A, et al. Incidence and outcome of *TCF3-PBX1*-positive acute lymphoblastic leukemia in Austrian children. *Haematologica.* 2007;92(11):1561–4.
122. Andersen MK, Autio K, Barbany G, et al. Paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia with *t(1;19)(q23;p13)*: clinical and cytogenetic characteristics of 47 cases from the Nordic countries treated according to NOPHO protocols. *Br. J. Haematol.* 2011;155(2):235–43.
123. Pui C-H, Campana D, Pei D, et al. Treating Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia without Cranial Irradiation. *N. Engl. J. Med.* 2009;360(26):2730–2741.

124. Pui C-H, Gaynon PS, Boyett JM, et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet*. 2002;359(9321):1909–1915.
125. Pui C-H, Chessells JM, Camitta B, et al. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia*. 2003;17(4):700–706.
126. Moorman A V, Robinson H, Schwab C, et al. Risk-directed treatment intensification significantly reduces the risk of relapse among children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia and intrachromosomal amplification of chromosome 21: a comparison of the MRC ALL97/99 and UKALL2003 trials. *J. Clin. Oncol*. 2013;31(27):3389–96.
127. Minson KA, Prasad P, Vear S, et al. t(17;19) in Children with Acute Lymphocytic Leukemia: A Report of 3 Cases and a Review of the Literature. *Case Rep. Hematol*. 2013;2013:563291.
128. Sirvent N, Suciú S, Riolland X, et al. Prognostic significance of the initial cerebro-spinal fluid (CSF) involvement of children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) treated without cranial irradiation: Results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Children Leukemia Group study 58881. *Eur. J. Cancer*. 2011;47(2):239–247.
129. Jaing T-H, Yang C-P, Hung I-J, et al. Clinical significance of central nervous system involvement at diagnosis of childhood t-cell acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer*. 2005;45(2):135–138.
130. Dördelmann M, Reiter A, Borkhardt A, et al. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1999;94(4):1209–17.
131. Creutzig U, Zimmermann M, Dworzak MN, et al. The prognostic significance of early treatment response in pediatric relapsed acute myeloid leukemia: results of the international study Relapsed AML 2001/01. *Haematologica*. 2014;99(9):1472–1478.
132. van Dongen JJM, van der Velden VHJ, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 2015;125(26):3996–4009.
133. Campana D, Pui C-H. Minimal residual disease–guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;129(14):1913–1918.
134. Ossenkoppele G, Schuurhuis GJ. MRD in AML: does it already guide therapy decision-making? *Hematology*. 2016;2016(1):356–365.
135. Denys B, van der Sluijs-Gelling AJ, Homburg C, et al. Improved flow cytometric detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2013;27(3):635–641.
136. Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, et al. Standardization and quality control studies of “real-time” quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K.* 2003;17(12):2318–2357.
137. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999;13(12):1901–28.

138. van Dongen JJM, van der Velden VHJ, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 2015;125(26):3996–4009.
139. Burmeister T, Marschalek R, Schneider B, et al. Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations. *Leukemia*. 2006;20(3):451–7.
140. Maxwell RR, Cole PD. Pharmacogenetic Predictors of Treatment-Related Toxicity Among Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2017;12(3):176–186.
141. Pui C-H, Yang JJ, Hunger SP, et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J. Clin. Oncol.* 2015;JCO.2014.59.1636.
142. Kaspers GJL, Zimmermann M, Reinhardt D, et al. Improved outcome in pediatric relapsed acute myeloid leukemia: results of a randomized trial on liposomal daunorubicin by the International BFM Study Group. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(5):599–607.
143. Zwaan CM, Kolb EA, Reinhardt D, et al. Collaborative Efforts Driving Progress in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2015;33(27):2949–2962.
144. Schrappe M, Hunger SP, Pui C-H, et al. Outcomes after Induction Failure in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2012;366(15):1371–1381.
145. Esteve J, Escoda L, Martín G, et al. Outcome of patients with acute promyelocytic leukemia failing to front-line treatment with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy (PETHEMA protocols LPA96 and LPA99): benefit of an early intervention. *Leukemia*. 2007;21(3):446–52.
146. Wells RJ, Woods WG, Lampkin BC, et al. Impact of high-dose cytarabine and asparaginase intensification on childhood acute myeloid leukemia: a report from the Childrens Cancer Group. *J. Clin. Oncol.* 1993;11(3):538–45.
147. Creutzig U, Ritter J, Zimmermann M, et al. Improved treatment results in high-risk pediatric acute myeloid leukemia patients after intensification with high-dose cytarabine and mitoxantrone: results of Study Acute Myeloid Leukemia-Berlin-Frankfurt-Münster 93. *J. Clin. Oncol.* 2001;19(10):2705–13.
148. Rasche M, Zimmermann M, Borschel L, et al. Successes and challenges in the treatment of pediatric acute myeloid leukemia: a retrospective analysis of the AML-BFM trials from 1987 to 2012. *Leukemia*. 2018;
149. Kang H, Wilson CS, Harvey RC, et al. Gene expression profiles predictive of outcome and age in infant acute lymphoblastic leukemia: a Children’s Oncology Group study. *Blood*. 2012;119(8):1872–81.
150. Mann G, Attarbaschi A, Schrappe M, et al. Improved outcome with hematopoietic stem cell transplantation in a poor prognostic subgroup of infants with mixed-lineage-leukemia (MLL)-rearranged acute lymphoblastic leukemia: results from the Interfant-99 Study. *Blood*. 2010;116(15):2644–50.
151. van der Linden MH, Valsecchi MG, De Lorenzo P, et al. Outcome of congenital acute lymphoblastic leukemia treated on the Interfant-99 protocol. *Blood*. 2009;114(18):3764–3768.
152. Van der Velden VHJ, Corral L, Valsecchi MG, et al. Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. *Leukemia*. 2009;23(6):1073–1079.

153. Fulbright JM, Raman S, McClellan WS, August KJ. Late Effects of Childhood Leukemia Therapy. *Curr. Hematol. Malign. Rep.* 2011;6(3):195–205.
154. Klonoff-Cohen H, Navarro A, Klonoff EA. Late effects awareness website for pediatric survivors of acute lymphocytic leukemia. *PLoS One.* 2018;13(2):e0193141.
155. Bochtler T, Stölzel F, Heilig CE, et al. Clonal heterogeneity as detected by metaphase karyotyping is an indicator of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(31):3898–905.
156. Niewerth D, Creutzig U, Bierings MB, Kaspers GJL. A review on allogeneic stem cell transplantation for newly diagnosed pediatric acute myeloid leukemia. *Blood.* 2010;116(13):2205–2214.
157. Hunger SP, Loh KM, Baker KS, Schultz KR. Controversies of and Unique Issues in Hematopoietic Cell Transplantation for Infant Leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2009;15(1):79–83.
158. Creutzig U, Reinhardt D. Current controversies: which patients with acute myeloid leukaemia should receive a bone marrow transplantation?--a European view. *Br. J. Haematol.* 2002;118(2):365–77.
159. Annesley CE, Brown P. Novel agents for the treatment of childhood acute leukemia. *Ther. Adv. Hematol.* 2015;6(2):61–79.
160. Maus M V, June CH. Making Better Chimeric Antigen Receptors for Adoptive T-cell Therapy. *Clin. Cancer Res.* 2016;22(8):1875–84.
161. Maus M V, Grupp SA, Porter DL, June CH. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood.* 2014;123(17):2625–35.
162. Tomuleasa C, Fuji S, Berce C, et al. Chimeric Antigen Receptor T-Cells for the Treatment of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front. Immunol.* 2018;9:239.
163. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2018;378(5):439–448.
164. Fyodorov D V., Zhou B-R, Skoultchi AI, Bai Y. Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017;
165. Gruhn B, Naumann T, Gruner D, et al. The expression of histone deacetylase 4 is associated with prednisone poor-response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* 2013;37(10):1200–1207.
166. Moreno DA, Scrideli CA, Cortez MAA, et al. Differential expression of HDAC3, HDAC7 and HDAC9 is associated with prognosis and survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia: Research paper. *Br. J. Haematol.* 2010;150(6):665–673.
167. Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: Proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18–20 September 2008. *Leukemia.* 2010;24(3):521–535.
168. Weng AP, Ferrando A a, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science.* 2004;306(5694):269–271.
169. Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood.* 2002;99(12):4326–35.
170. Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: Prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J. Clin. Oncol.* 2004;22(4):624–633.

171. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2017;
172. Kaplan E, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 1958;(53):457–481.
173. Cox D. Regression models and life-tables. *J R Stat Soc B.* 1972;(34):187–220.
174. Contal C, O’Quigley J. An application of changepoint methods in studying the effect of age on survival in breast cancer. *Comput Stat Data Anal.* 1999;(30):253–270.
175. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol. Oncol.* 2007;1(1):19–25.
176. Ceccacci E, Minucci S. Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: lessons from leukaemia. *Br. J. Cancer.* 2016;(February):1–7.
177. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: Implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* 2009;10(1):32–42.
178. Bose P, Dai Y, Grant S. Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: emerging insights. *Pharmacol Ther.* 2014;143(3):323–336.
179. Chrun ES, Modolo F, Daniel FI. Histone modifications: A review about the presence of this epigenetic phenomenon in carcinogenesis. *Pathol. Res. Pract.* 2017;213(11):1329–1339.
180. Ahmadzadeh A, Khodadi E, Shahjahani M, Bertacchini J, Vosoughi T. The Role of HDACs as Leukemia Therapy Targets using HDI. 2015;9(4):.
181. West AC, Johnstone RW. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *J Clin Invest.* 2014;124(1):30–39.
182. Haery L, Thompson RC, Gilmore TD. Histone acetyltransferases and histone deacetylases in B- and T-cell development , physiology and malignancy. 2015;6(May):
183. Tao Y-F, Pang L, Du X-J, et al. Differential mRNA expression levels of human histone-modifying enzymes in normal karyotype B cell pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14(2):3376–94.
184. Barneda-Zahonero B, Roman-Gonzalez L, Collazo O, Mahmoudi T, Parra M. Epigenetic regulation of B lymphocyte differentiation, transdifferentiation, and reprogramming. *Comp. Funct. Genomics.* 2012;2012(Figure 1):
185. Liu N, Li S, Wu N, Cho K-S. Acetylation and deacetylation in cancer stem-like cells. *Oncotarget.* 2017;8(51):89315–89325.
186. Bradbury C a, Khanim FL, Hayden R, et al. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K.* 2005;19(10):1751–1759.
187. Li L, Osdal T, Ho Y, et al. SIRT1 activation by a c-MYC oncogenic network promotes the maintenance and drug resistance of human FLT3-ITD acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell.* 2014;15(4):431–446.
188. Suzuki K, Okuno Y, Kawashima N, et al. MEF2D-BCL9 Fusion Gene Is Associated With High-Risk Acute B-Cell Precursor Lymphoblastic Leukemia in Adolescents. *J. Clin. Oncol.* 2016;34(28):3451–3459.



189. Qian M, Zhang H, Kham SK, et al. Whole Transcriptome Sequencing Identified a Distinct Subtype of Acute Lymphoblastic Leukemia with Predominant Genomic Abnormalities of. *Genome Res.* 2017;185–195.
190. Pon JR, Marra MA. MEF2 transcription factors: developmental regulators and emerging cancer genes. *Oncotarget.* 2016;7(3):2297–2312.
191. Canté-Barrett K, Pieters R, Meijerink JPP. Myocyte enhancer factor 2C in hematopoiesis and leukemia. *Oncogene.* 2014;33(4):403–410.
192. Krivtsov A V., Twomey D, Feng Z, et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature.* 2006;442(7104):818–822.
193. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2009;10(2):147–156.
194. Homminga I, Pieters R, Langerak AW, et al. Integrated Transcript and Genome Analyses Reveal NKX2-1 and MEF2C as Potential Oncogenes in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell.* 2011;19(4):484–497.
195. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature.* 2012;481(7380):157–163.
196. Zuurbier L, Gutierrez A, Mullighan CG, et al. Immature MEF2C-dysregulated T-cell leukemia patients have an early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia gene signature and typically have non-rearranged t-cell receptors. *Haematologica.* 2014;99(1):94–102.
197. Colomer-Lahiguera S, Pisecker M, König M, et al. *MEF2C* -dysregulated pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia is associated with *CDKN1B* deletions and a poor response to glucocorticoid therapy. *Leuk. Lymphoma.* 2017;58(12):2895–2904.
198. Laszlo GS, Alonzo TA, Gudgeon CJ, et al. High expression of myocyte enhancer factor 2C (MEF2C) is associated with adverse-risk features and poor outcome in pediatric acute myeloid leukemia: a report from the Children’s Oncology Group. *J. Hematol. Oncol.* 2015;8(1):115.
199. Schwieger M, Schüler A, Forster M, et al. Homing and invasiveness of MLL / ENL leukemic cells is regulated by MEF2C. *Blood.* 2011;114(12):2476–2488.
200. Barneda-Zahonero B, Parra M. Histone deacetylases and cancer. *Mol. Oncol.* 2012;6(6):579–589.
201. Krämer OH, Zhu P, Ostendorff HP, et al. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J.* 2003;22(13):3411–20.
202. Lapierre M, Linares A, Dalvai M, et al. Histone deacetylase 9 regulates breast cancer cell proliferation and the response to histone deacetylase inhibitors. *Oncotarget.* 2016;7(15):19693–708.
203. Milde T, Oehme I, Korshunov A, et al. HDAC5 and HDAC9 in medulloblastoma: Novel markers for risk stratification and role in tumor cell growth. *Clin. Cancer Res.* 2010;16(12):3240–3252.
204. Gil VS, Bhagat G, Howell L, et al. Deregulated expression of HDAC9 in B cells promotes development of lymphoproliferative disease and lymphoma in mice. *Dis. Model. Mech.* 2016;9(12):1483–1495.
205. Hua W-K, Qi J, Cai Q, et al. HDAC8 regulates long-term hematopoietic stem-cell maintenance under stress by modulating p53 activity. *Blood.* 2017;130(24):2619–2630.

206. Qi J, Singh S, Hua WK, et al. HDAC8 Inhibition Specifically Targets Inv(16) Acute Myeloid Leukemic Stem Cells by Restoring p53 Acetylation. *Cell Stem Cell*. 2015;17(5):597–610.
207. Stahl M, Gore SD, Vey N, Prebet T. Lost in translation? Ten years of development of histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2016;25(3):307–17.
208. Balasubramanian S, Verner E, Buggy JJ. Isoform-specific histone deacetylase inhibitors: The next step? *Cancer Lett*. 2009;280(2):211–221.
209. Stam RW, Schneider P, Hagelstein J a P, et al. Gene expression profiling – based dissection of MLL translocated and MLL germline acute lymphoblastic leukemia in infants Gene expression profiling – based dissection of MLL translocated and MLL germline acute lymphoblastic leukemia in infants. 2012;115(14):2835–2844.
210. Castro PG, van Roon EHJ, Pinhanços SSM, et al. The HDAC inhibitor Panobinostat (LBH589) exerts in vivo anti-leukaemic activity against MLL-rearranged acute lymphoblastic leukaemia and involves the RNF20/RNF40/WAC—H2B ubiquitination axis. *Leukemia*. 2017;(November 2016):1–9.
211. Ahmad K, Katryniok C, Scholz B, et al. Inhibition of class I HDACs abrogates the dominant effect of MLL-AF4 by activation of wild-type MLL. 2014;(May):
212. Stubbs MC, Kim W, Bariteau M, et al. Selective Inhibition of HDAC1 and HDAC2 as a Potential Therapeutic Option for B-ALL. *Clin. Cancer Res*. 2015;21(10):2348–2359.
213. Wada T, Kikuchi J, Nishimura N, et al. Expression levels of histone deacetylases determine the cell fate of hematopoietic progenitors. *J. Biol. Chem*. 2009;284(44):30673–30683.



## **ANNEX I**



## LLISTA DE FIGURES

Figura 1 | Hematopoesi fisiològica.

Figura 2 | Progenitors i llinatges hematopoètics.

Figura 3 | Esquema de l'adquisició d'alteracions genètiques en la patogènia de la LLA-B.

Figura 4 | Relació clonal entre el diagnòstic i la recaiguda en mostres de pacients recaiguts amb LLA.

Figura 5 | Contribució de la genètica, epigenètica i teràpia a l'evolució clonal de la leucèmia.

Figura 6 | Subtipus de leucèmia identificats en el subgrup de les *B-other*, segons el risc associat.

Figura 7 | Visió global dels esdeveniments cooperatius en el procés de leucemogènesi en els diferents subtipus de LLA-B segons el risc.

Figura 8 | Desenvolupament del limfòcit T: estadis, marcadors de superfície i expressió de factors de transcripció.

Figura 9 | Representació gràfica dels esdeveniments cooperatius en les LLA-T.

Figura 10 | Distribució de les diferents aberràncies genètiques de tipus-I i tipus-II en la LMA pediàtrica.

Figura 11 | Representació de les principals alteracions citogenètiques en LMA en funció de l'edat.

Figura 12 | Freqüències de les alteracions genètiques en funció de l'edat en les LLA.

Figura 13 | Supervivència lliure d'event dels pacients pediàtrics amb LLA en protocols consecutius de la SEHOP.

Figura 14 | Procediment d'immunoteràpia amb CART.

Figura 15 | Figura esquemàtica de l'estructura de les histones en els nucleosomes i dels residus en les seves cues.

Figura 16 | Compactació de l'ADN i modificacions epigenètiques.

Figura 17 | Procés d'acetilació i deacetilació d'histones, estructura de la cromatina i expressió gènica.

Figura 18| HDACs i els complexos proteics als que s'associen.

Figura 19| Estructura de les HDACs clàssiques.

Figura 20| Estructura de les sirtuïnes.

Figura 21| Dianes moleculars de les diferents HDACs i els seus efectes biològics.

Figura 22| Esquema del desenvolupament del limfòcit B.

Figura 23| Proteïnes de fusió leucemogèniques i la desregulació epigenètica que provoquen.

Figura 24| Diferents proteïnes de fusió associades a leucèmia recluten HDACs.

Figura 25| Molècules diana de les HDACs, les vies moleculars que modulen i les conseqüències que se'n deriven.

Figura 26| Estructures químiques dels quatre grups principals d'inhibidors d'HDAC (HDACi) i alguns dels compostos més avaluats en diferents assajos clínics.

Figura 27| Perfil d'expressió de les *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D* en cèl·lules hematopoètiques normals.

Figura 28| Perfil d'expressió de les *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D* en els 211 pacients pediàtrics amb leucèmia aguda.

Figura 29| Matriu de correlacions entre les *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D* en els 211 pacients pediàtrics amb leucèmia aguda.

Figura 30| Matriu de correlacions entre les *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D* en els 211 pacients pediàtrics amb leucèmia aguda segons llinatge.

Figura 31| Perfil d'expressió de les *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D* en els 134 pacients pediàtrics amb LLA-B i en les cèl·lules B madures CD19+.

Figura 32| Perfil d'expressió de les *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D* en els 134 pacients pediàtrics amb LLA-B segons els subtipus genètics.

Figura 33| Perfil d'expressió de les *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D* en els 33 pacients pediàtrics amb LLA-T segons l'estat mutacional de *NOTCH1/FBXW7*.

Figura 34|. Perfil d'expressió de les *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D* en els pacients pediàtrics amb leucèmia aguda segons el llinatge (LLA-B, LLA-T i LMA).

Figura 35| Perfil d'expressió de les *HDACs*, *MEF2C* i *MEF2D* en els pacients pediàtrics amb leucèmia aguda en funció de l'edat i de la presència del reordenament del gen *KMT2A*.

Figura 36| Supervivència lliure d'event (SLE) dels 134 pacients amb LLA-B segons l'expressió de l'*HDAC2* i l'*HDAC9*.

Figura 37| Supervivència lliure d'event (SLE) dels 44 pacients amb LMA segons l'expressió de l'*HDAC8*.





## LLISTA DE TAULES

Taula 1| Classificació morfològica (FAB) de les LLA.

Taula 2. Classificació immunològica (EGIL) de les LLA.

Taula 3| Classificació de la WHO 2016 de les neoplàsies precursors limfoides.

Taula 4| Classificació de les LMA segons la classificació FAB, freqüència en LMA pediàtrica i associació a alteracions citogenètiques recurrents.

Taula 5| Taula adaptada de la classificació de la WHO 2016.

Taula 6| Algunes de les principals alteracions genètiques recurrents en la LLA-B.

Taula 7| Alteracions genètiques recurrents en la LLA-T, incidència i implicació clínica.

Taula 8| Altres alteracions genètiques recurrents en la LLA-T.

Taula 9| Altres alteracions genètiques recurrents en la LMA.

Taula 10| Alteracions genètiques en la LLA pediàtrica i pronòstic associat segons el protocol actual SEHOP-PETHEMA 2013.

Taula 11| Classificació de les diferents *HDACs* segons la seva posició cromosòmica, la localització subcel·lular i els seus substractes no histona coneguts.

Taula 12| *HDACi* segons la seva estructura, especificitat i presència en assaigs clínics.

Taula 13| *HDACi* en combinació amb altres agents antitumorals actualment en assaig clínic (fase I/II/III).

Taula 14| Pacients i principals característiques clínico-biològiques al diagnòstic.

Taula 15| Cariotip dels pacients amb els nivells d'expressió d'*HDAC9* més elevats.

Taula 16| Resultat de l'anàlisi univariat per la SG en les LLA-B.

Taula 17| Resultat de l'anàlisi univariat per la SLE en les LLA-B.

Taula 18| Resultat de l'anàlisi multivariat per la SLE en les LLA-B.

Taula 19| Resultat de l'anàlisi univariat per la SG en les LLA-T.

Taula 20| Resultat de l'anàlisi univariat per la SLE en les LLA-T.

Taula 21| Resultat de l'anàlisi univariat per la SG en les LMA.

Taula 22| Resultat de l'anàlisi multivariat per la SG en les LMA.

Taula 23| Resultat de l'anàlisi univariat per la SLE en les LMA.

Taula 24| Resultat de l'anàlisi multivariat per la SLE en les LMA.



## **ANNEX II**



## **PUBLICACIONES**

1. Paediatric patients with acute leukaemia and *KMT2A* rearrangement show a distinctive expression pattern of histone deacetylases.

## **ALTRES PUBLICACIONES**

1. FLT3 is implicated in cytarabine transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 in pediatric acute leukemia
2. The transcriptional repressor HDAC7 promotes apoptosis and c-Myc downregulation in particular types of leukemia and lymphoma



**Paediatric patients with acute leukaemia and *KMT2A* rearrangement show a distinctive expression pattern of histone deacetylases.**

Nerea Vega-García, Roberta Malatesta, Camino Estella, Sara Pérez-Jaume, Elena Esperanza-Cebollada, Montserrat Torreadell, Albert Català, Susanna Gassiot, Rubén Berruenco, Anna Ruiz-Llobet, Anna Alonso-Saladrigues, Montserrat Mesegué, Sandra Pont-Martí, Susana Rives and Mireia Camós.

---

Histone deacetylase inhibitors (HDACi) emerged as promising drugs in leukaemia, but their toxicity due to lack of specificity limited their use. Therefore, there is a need to elucidate the role of HDACs in specific settings. The study of *HDAC* expression in childhood leukaemia could help to choose more specific HDACi for selected candidates in a personalized approach. We analysed *HDAC1-11*, *SIRT1*, *SIRT7*, *MEF2C* and *MEF2D* mRNA expression in 211 paediatric patients diagnosed with acute leukaemia. We found a global overexpression of *HDACs*, while specific *HDACs* correlated with clinical and biological features, and some even predicted outcome. Thus, some *HDAC* and *MEF2C* profiles probably reflected the lineage and the maturation of the blasts and some profiles pointed out specific oncogenic pathways active in the leukaemic cells. Specifically, we identified a distinctive signature for patients with *KMT2A* rearrangement, with high *HDAC9* and *MEF2D* expression, regardless of age, *KMT2A*-partner and lineage. Moreover, we observed an adverse prognostic value of overexpression of *HDAC9*, regardless of *KMT2A* rearrangement. Our results provide useful knowledge on the complex picture of *HDACs* expression in childhood leukaemia and support the directed use of specific HDACi to selected paediatric patients with acute leukaemia.





# Paediatric patients with acute leukaemia and *KMT2A (MLL)* rearrangement show a distinctive expression pattern of histone deacetylases

**1** Nerea Vega-García,<sup>1,2</sup> Roberta  
**2** Malatesta,<sup>1,2</sup> Camino Estella,<sup>1,2</sup>  
**3** Sara Pérez-Jaume,<sup>3</sup> Elena Esperanza-  
**4** Cebollada,<sup>1,2</sup> Montserrat Torredell,<sup>1,2,4</sup>  
**5** Albert Català,<sup>2,4,5</sup> Susanna Gassiot,<sup>1,2</sup>  
**6** Rubén Berrueto,<sup>2,4,5</sup> Anna  
**7** Ruiz-Llobet,<sup>2,5</sup> Anna  
**8** Alonso-Saladrigues,<sup>2,5</sup> Montserrat  
**9** Mesegué,<sup>2,5</sup> Sandra Pont-Martí,<sup>1,2</sup>  
**10** **11** **12** Susana Rives<sup>2,4,5</sup> and Mireia Camós<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Haematology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, University of Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>2</sup>Institut de Recerca Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>3</sup>Developmental Tumor Biology Laboratory, Institut de Recerca Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>4</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain and <sup>5</sup>Paediatric Haematology and Oncology Department, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Received 2 February 2018; accepted for publication 26 April 2018

Correspondence: Mireia Camós, MD, PhD, Haematology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu 2, 08950, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain.  
 E-mail: mcamos@sjdhospitalbarcelona.org


Recruitment of chromatin-modifying enzymes by oncogenic fusion proteins and altered expression of chromatin regulators are mediating steps in leukaemogenesis, thus making epigenetic therapies suitable for leukaemia patients (Bolden *et al*, 2006; Haberland *et al*, 2009; Chrun *et al*, 2017). Histone deacetylases (HDACs) act as transcriptional corepressors by deacetylating histones, leading to a closed chromatin status, and by regulating the activity of non-histone proteins (Barneda-Zahonero & Parra, 2012; Chrun *et al*, 2017). The HDAC superfamily is composed of different isoforms that, according to their structure (substrate specificity, enzymatic

## Summary

Histone deacetylase inhibitors (HDACi) had emerged as promising drugs in leukaemia, but their toxicity due to lack of specificity limited their use. Therefore, there is a need to elucidate the role of HDACs in specific settings. The study of HDAC expression in childhood leukaemia could help to choose more specific HDACi for selected candidates in a personalized approach. We analysed *HDAC1-11*, *SIRT1*, *SIRT7*, *MEF2C* and *MEF2D* mRNA expression in 211 paediatric patients diagnosed with acute leukaemia. There was a global overexpression of HDACs, while specific HDACs correlated with clinical and biological features, and some even predicted outcome. Thus, some HDAC and *MEF2C* profiles probably reflected the lineage and the maturation of the blasts and some profiles identified specific oncogenic pathways active in the leukaemic cells. Specifically, we identified a distinctive signature for patients with *KMT2A (MLL)* rearrangement, with high *HDAC9* and *MEF2D* expression, regardless of age, *KMT2A* partner and lineage. Moreover, we observed an adverse prognostic value of *HDAC9* overexpression, regardless of *KMT2A* rearrangement. Our results provide useful knowledge on the complex picture of HDAC expression in childhood leukaemia and support the directed use of specific HDACi to selected paediatric patients with acute leukaemia.

**Keywords:** paediatric acute leukaemia, *KMT2A (MLL)*, histone deacetylases, HDAC inhibitors, epigenetics.

mechanism, subcellular localization and tissue-specific expression), can be grouped in four classes: class I (HDAC1, 2, 3 and 8), class II (IIa, comprising HDAC4, 5, 7, 9; class IIb: HDAC6 and 10), class III (sirtuins or SIR, for Silent Information Regulators: *SIRT1*, 2, 3, 4, 5, 6 and 7) and class IV (HDAC11). Class I HDAC are ubiquitously expressed in all tissues and are found as part of multi-protein complexes recruited to target genes to mediate repression. Class IIa are expressed in a tissue-specific manner and are involved in differentiation and development. Sirtuins are widely expressed and have a broad range of functions, such as DNA repair,

Dispatch: 24.5.18	CE: Nirmala
No. of pages: 12	PE: Sudhakar Seenivasan
WILEY	
15436	Manuscript No.
B J H	Journal Code
	

1 regulation of oxidative stress, metabolism and aging. The  
2 function of HDAC11, the only member of class IV, is less  
3 known, but it seems to be essential for normal haematopoi-  
4 etic differentiation and may be associated with immune sys-  
5 tem response (Barneda-Zahonero & Parra, 2012; Sahakian  
6 *et al*, 2017). HDACs are involved in apoptosis, senescence,  
7 differentiation and angiogenesis, and have a role in the main-  
8 tenance and maturation of haematopoietic precursors (Cec-  
9 cacci & Minucci, 2016).

10 When overexpressed, HDACs may behave as oncogenes  
11 themselves or repress tumour-suppressive pathways (Ceccacci  
12 & Minucci, 2016). It has been reported that there is a global  
13 overexpression of HDACs in several haematological malign-  
14 ancies, correlating with proliferation and survival (Haery  
15 *et al*, 2015). Subsequently, different HDAC inhibitors  
16 (HDACi) are currently in clinical trials for paediatric acute  
17 leukaemia (i.e. NCT02419755, NCT02518750, NCT02676323  
18 for *KMT2A*-rearranged leukaemias, T-ALL and AML, respec-  
19 tively), and other haematological malignancies (reviewed in  
20 Ahmadzadeh *et al*, 2015; Ceccacci & Minucci, 2016; Ecks-  
21 chlager *et al*, 2017; Zhang *et al*, 2015; Haery *et al*, 2015).  
22 HDACi restore the epigenetic balance in neoplastic cells and  
23 promote their apoptosis through different mechanisms that  
24 include promotion of DNA damage, inhibition of DNA  
25 repair and regulation of apoptosis (Bolden *et al*, 2006; Bose  
26 *et al*, 2014; Eckschlager *et al*, 2017).

27 However, despite promising preclinical work, there are  
28 concerns both in terms of efficacy and safety, with secondary  
29 non-negligible toxicity (mainly fatigue, diarrhoea, bone mar-  
30 row toxicity, etc.) (Ceccacci & Minucci, 2016). To explain  
31 the differences between the clinical results and those expected  
32 from preclinical studies, one should consider that the mecha-  
33 nism of action of these inhibitors is not fully understood and  
34 that their effect may be different depending on the specific  
35 type of cancer, cellular context, specificity of the HDACi  
36 tested (pan-inhibitors *vs.* isoform-specific HDACi) and their  
37 dosage. Thus, the lack of specificity of HDAC inhibition  
38 makes it difficult to predict the biological effects, including  
39 toxicities, limiting their use either alone or in combination  
40 with chemotherapy. To overcome this issue, more selective  
41 (class-selective or isoform-specific) HDACi have recently  
42 been developed, aimed at achieving a better outcome with  
43 less toxicity (Balasubramanian *et al*, 2009).

44 Acute leukaemia is the most frequent cancer in childhood  
45 and the primary cause of paediatric mortality related to can-  
46 cer (Hunger & Mullighan, 2015; Pui *et al*, 2015). Although a  
47 striking improvement in the outcome of paediatric patients  
48 with acute leukaemia has been achieved in the last years,  
49 there is still a relevant proportion of patients who will  
50 relapse, even amongst those cases stratified in the low-risk  
51 group at diagnosis. On the other hand, survivors may suffer  
52 severe short- and long-term therapy-related side effects  
53 (Raetz & Bhatla, 2012; Gatta *et al*, 2013; Ward *et al*, 2014).  
54 Therefore, there is a need to find less toxic, more specific  
55 and personalized therapies for childhood leukaemia.

Although monotherapy with HDACi is unlikely to succeed,  
they could be useful for designing less toxic combination  
therapies; in this sense, as HDAC's roles are progressively  
elucidated in specific neoplastic diseases, different approaches  
combining HDACi with cytotoxic chemotherapy or other  
novel targeted therapies are being tested (Bose *et al*, 2014).  
However, very few studies have addressed the HDAC expres-  
sion in paediatric acute leukaemias (Moreno *et al*, 2010;  
Gruhn *et al*, 2013; Tao *et al*, 2013).

This study aimed to analyse the expression of HDAC  
genes and some of their targets and regulators, i.e., certain  
members of the *Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2)* family, in  
a series of paediatric patients with acute leukaemia to  
address: (1) possible specific profiles of HDAC expression in  
different subtypes of leukaemia and (2) whether abnormal  
HDAC expression could have a prognostic impact in our  
patients. Our final goal was to obtain data to better under-  
stand the correlation between HDAC expression and clinico-  
biological features in childhood leukaemia, to tailor therapy  
for each subgroup of patients.

## Methods and materials

We retrospectively analysed 211 patients aged 0–18 years,  
diagnosed with *de-novo* acute leukaemia from 2003 to 2017  
in Hospital Sant Joan de Déu, with an available biological  
sample. Our cohort included 134 patients with precursor B  
cell acute lymphoblastic leukaemia (BCP-ALL), 33 with T cell  
acute lymphoblastic leukaemia (T-ALL) and 44 with acute  
myeloid leukaemia (AML), with the main cytogenetic sub-  
types being represented. The clinical and biological character-  
istics of the patients are described in Supporting  
Information. The quantification of *HDAC1*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,  
9, 10 and 11, *SIRT1*, *SIRT7*, *MEF2C* and *MEF2D* mRNA was  
performed by real-time polymerase chain reaction (PCR)  
using an ABI7500 Real-Time PCR System (Applied Biosys-  
tems, Foster City, CA), according to the manufacturer's  
instructions. Relative quantification was calculated with the  
 $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, using  $\beta$ -glucuronidase (*GUSB*) as endoge-  
nous gene. A pool of RNA extracted from the bone marrow  
of 11 non-neoplastic patients was used as controls. We also  
determined the HDAC family, *MEF2C* and *MEF2D* expres-  
sion in normal bone marrow CD34<sup>+</sup> cells, mature peripheral  
blood CD19<sup>+</sup> B cells and mature peripheral blood Pan-T cells  
(STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) and used  
them as controls in the whole cohort of patients (CD34<sup>+</sup>),  
and for each leukaemic subtype (CD19<sup>+</sup> B cells for BCP-ALL  
patients and Pan-T cells for T-ALL cases). We used the  
method of Contal and O'Quigley (1999) to estimate cut-off  
values of the gene expression levels and thus determine high  
and low expression. The statistical analyses were performed  
using the SPSS 24.0 statistical software package (SPSS Inc.,  
Chicago, IL, USA), R software version 3.4.2 (www.R-project.  
org) and GraphPad Prism version 7.00 (GraphPad Software,  
La Jolla, CA, USA). All *p* values were considered significant

when  $<0.05$ . More detailed information about patients and methods is provided in the Supporting Information.

The study was conducted in accordance with the ethical standards and the Declaration of Helsinki following the national and international guidelines and was approved by the authors' institutional review board. According to the Local Ethics Committee of our institution, all samples were stored in the legally competent Biobank of our Hospital and were used after informed consent was obtained either from the patients or their legal guardians.

## Results

### *Global HDAC expression in normal haematopoietic cells and in leukaemia patients*

We first analysed the expression of HDACs in different subsets of normal haematopoietic cells: bone marrow CD34<sup>+</sup> cells, peripheral blood mature CD19<sup>+</sup> lymphocytes and pan-T cells (Fig S1). In 211 leukaemic patients, we observed a global overexpression of HDACs, *MEF2C*, and *MEF2D* genes, except for *HDAC1*, *HDAC3*, *HDAC10*, and *SIRT7*, whose median expression level was around or below that of the controls (Fig 1). All cases showed homogeneous expression of class I *HDAC1*, *HDAC2* and *HDAC3*, in contrast to the more heterogeneous expression of other HDAC isoforms. Nearly all leukaemic patients expressed *HDAC1*, *HDAC2*, and *HDAC3*, while some patients did not express some HDACs. Class III *SIRT1* and *SIRT7* were expressed in almost all patients. Both *MEF2C* and *MEF2D* genes were highly expressed, with *MEF2C* showing the highest median expression in leukaemic patients, as compared to the non-neoplastic samples.

### *There is a significant correlation between the expression of HDACs, MEF2C, and MEF2D*

Both the whole cohort of patients, and when analysed separately according to lineage, showed a significant positive Spearman's correlation among class I HDACs, which was very strong between *HDAC1* and *HDAC3* (Fig S2). There was also a significant direct correlation among class II members HDACs, especially between *HDAC4* and *HDAC5*, and between class IIa and class IIb HDACs (*HDAC4*, *HDAC5*, and *HDAC7* correlated to *HDAC6* and *HDAC10*). In turn, *MEF2C* and *MEF2D* were strongly correlated with each other. In contrast, some HDACs had different correlation profiles depending on the lineage of the leukaemia. Thus, in BCP-ALL and AML, *HDAC9* correlated directly with *SIRT1*, *MEF2C* and *MEF2D*. In T-ALL patients, although the number of samples expressing *MEF2* genes was very low, we saw a negative correlation between these genes and some HDACs. Class III *SIRT1* and *SIRT7*, and class IV *HDAC11* were more heterogeneous and differed according to the lineage of the leukaemia.

### *Correlation of HDACs, MEF2C and MEF2D expression with clinical and biological variables*

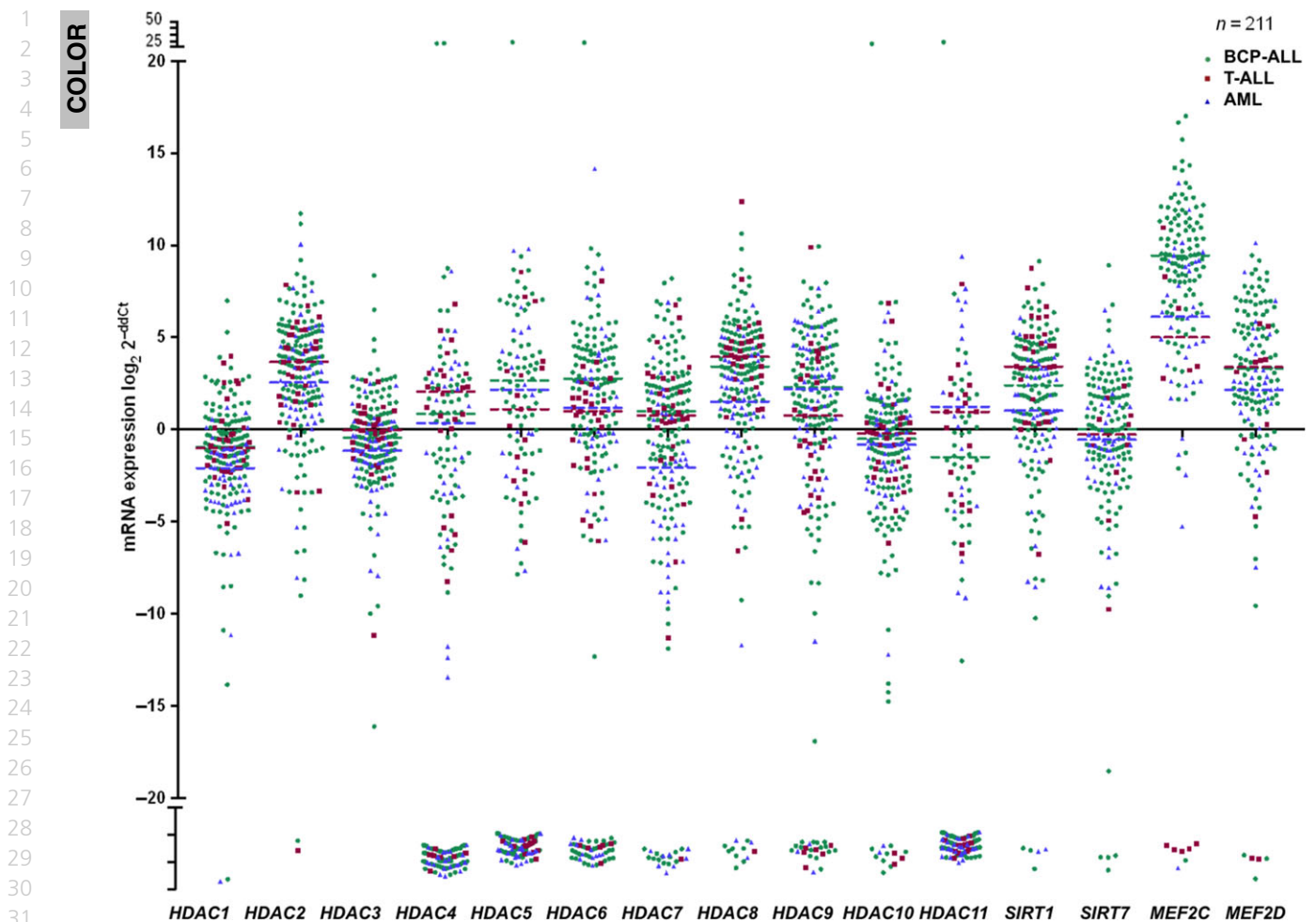
We observed a lower expression of *HDAC3* in males ( $P = 0.015$ ). Regarding age, high *MEF2D* levels had a trend to correlate with lower age ( $P = 0.056$ ), and *HDAC9* expression tended toward higher levels in infants and in patients  $>10$  years, compared to 1- to 9-year-old patients ( $P = 0.057$ ). A lower expression of *HDAC1* and *HDAC3* correlated with hyperleucocytosis above  $50 \times 10^9/l$  ( $P = 0.017$  and  $P = 0.029$ , respectively). Those patients with infiltration of the central nervous system (CNS-3), presented with lower *HDAC2* levels, although this was not significant ( $P = 0.052$ ). Interestingly, we observed different HDAC expression according to the lineage of the leukaemia (see below and Fig S3).

### *Different expression of HDACs, MEF2C, and MEF2D in BCP-ALL patients according to cytogenetics*

In the 134 BCP-ALL patients analysed, we observed expression of class I *HDAC1*, *HDAC2* and *HDAC3*, as well as *SIRT1*, *SIRT7*, *MEF2C* and *MEF2D* in almost all samples. Patients with BCP-ALL showed significantly higher expression of *HDAC6* and *MEF2C* when compared to T-ALL and AML patients ( $P = 0.005$  and  $P < 0.001$ , respectively). Globally, the BCP-ALL profile for HDAC classes I, II and IV was closer to the normal CD34<sup>+</sup> cells than to the mature CD19<sup>+</sup> cells (Fig S4). Regarding the absence of expression of certain genes, while mature B cells were characterized by the lack of expression of *HDAC5* only, about 70% of BCP-ALL patients did not express *HDAC11*. In addition, *HDAC4* and *HDAC5* were absent in half of our patients, and *HDAC6*, *HDAC7*, *HDAC8*, *HDAC9* and *HDAC10* expression was not detected in a lower percentage of patients (5–20%). Interestingly, patients simultaneously lacked several HDACs, both from the same class or from different classes. We analysed if the lack of expression of a certain HDAC correlated with any clinical or biological variable, but only observed that the absence of expression of *HDAC8* in BCP-ALL patients correlated with high minimal residual disease (MRD) levels at day 15 of induction treatment (MRD  $> 10\%$ ,  $P = 0.03$ ).

Regarding the correlation between the expressed genes and clinical and biological variables in BCP-ALL patients, we found a higher *HDAC5* expression in males ( $P = 0.021$ ). Higher expression of *HDAC9*, *HDAC11*, *SIRT7* and *MEF2D* correlated with hyperleucocytosis ( $P = 0.031$ ,  $P = 0.024$ ,  $P = 0.014$  and  $P = 0.005$ , respectively). Those patients with a pro-B phenotype ( $n = 9$ ) had significantly lower age (infants,  $P < 0.001$ ), hyperleucocytosis ( $P = 0.002$ ) and were associated with *KMT2A* (*lysine methyltransferase 2A*, previously termed *MLL*) rearrangement ( $P < 0.001$ ), but we found no association of this phenotype with specific HDAC expression.

Noticeably, HDAC expression was different according to the cytogenetic subtypes (Fig S5). Thus, nearly all patients with *KMT2A* rearrangement and patients with translocation *t*



**4** Fig 1. Expression levels of *HDACs*, *MEF2C* and *MEF2D* genes in 211 paediatric patients with acute leukaemia. Relative quantification was calculated with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and a pool of non-neoplastic samples was used as controls (X-axis). Dashed lines represent the median value of the samples. The  $\log_2$  normalized gene expression is depicted for patients with precursor B cell acute lymphoblastic leukaemia (BCP-ALL; green dots), T cell acute lymphoblastic leukaemia (T-ALL; red dots) and acute myeloid leukaemia (AML; blue dots). Outliers are represented in scale at the top of the graph and patients who did not express a determined gene are represented out of the limits of Y-axis (bottom of the graph, not to scale).

(1;19)/*TCF3-PBX1* fusion gene expressed all genes, whereas patients included in other categories lacked expression of class II and IV *HDAC* genes: absence of *HDAC11* was particularly frequent in patients with *t(9;22)/BCR-ABL1* and patients with *t(12;21)/ETV6-RUNX1*, where it was absent in more than 80% of the cases. Interestingly, a specific profile was identified for patients with BCP-ALL and *KMT2A* rearrangement: they expressed, in all but one case, *HDAC4* ( $P = 0.009$ ), and had a significantly higher expression of *HDAC9*, *SIRT7* and *MEF2D* than other BCP-ALL subtypes ( $P = 0.033$ ,  $P = 0.039$ , and  $P = 0.016$ , respectively).

#### Different expression of *HDACs*, *MEF2C*, and *MEF2D* in T-ALL patients

Similarly to BCP-ALL, nearly all the 33 T-ALL patients expressed *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3*, *SIRT1*, *SIRT7*, *MEF2C* and *MEF2D* (Fig S3). Patients with T-ALL had the highest

levels of *SIRT1*, as compared to BCP-ALL and AML cases ( $P = 0.036$ ). In contrast to mature Pan-T cells, most patients expressed *HDAC4* to *HDAC9* and *MEF2C* at different levels. Males with T-ALL presented higher *HDAC10* levels ( $P = 0.005$ ). Of note, we found an association between high *HDAC4* expression and a poor prednisone response at day +8 of induction treatment, although not at a significant level ( $P = 0.053$ ). T-ALL patients with *NOTCH1/FBXW7* mutations ( $n = 14$ ), presented some differences with non-mutated cases in *HDAC* and *MEF2C* expression (Fig S6). Thus, mutated *NOTCH1/FBXW7* patients more frequently lacked *HDAC4*, *HDAC5*, *HDAC6*, *HDAC9*, *HDAC11* and *MEF2C*, resembling their normal mature counterpart. All patients with absent expression of *MEF2C* were *NOTCH1/FBXW7* mutated, while all but one patient with high *MEF2C* expression were wild-type for *NOTCH1/FBXW7* screening; however, the very low number of patients precluded a conclusion regarding statistical significance. The only patient who

expressed *MEF2C* and harboured mutations in *NOTCH1* gene had a pre-T phenotype.

#### Different expression of HDACs, *MEF2C*, and *MEF2D* in AML patients

In our 44 AML patients, as in other lineages, the analysed class I and III HDACs, *MEF2C* and *MEF2D* genes were expressed in almost all samples. Of note, class I HDAC1, HDAC3, HDAC8 and HDAC7 were significantly underexpressed in AML cases compared to lymphoid leukaemias ( $P < 0.001$ ,  $P = 0.008$ ,  $P = 0.001$  and  $P = 0.001$ , respectively; Fig S3). We observed that low levels of HDAC1 and *SIRT1*, and absence of HDAC10 and/or HDAC7 was associated with hyperleucocytosis  $>50 \times 10^9/l$  ( $P = 0.028$ ,  $P = 0.008$ ,  $P < 0.001$  and  $P = 0.034$ , respectively). Low levels of *SIRT1* also correlated significantly with CNS infiltration (CNS-3) ( $P = 0.048$ ). Notably, as in BCP-ALL patients, higher HDAC9 and *MEF2D* expression was associated with the presence of *KMT2A* rearrangement ( $P = 0.034$  and  $P = 0.042$ , respectively).

#### Patients with *KMT2A* rearrangement overexpressed HDAC9 and *MEF2D*, regardless the age and the lineage of the leukaemia

In the whole patient cohort, a high expression of HDAC9 and *MEF2D* was significantly associated with the presence of *KMT2A* rearrangement ( $P = 0.005$  and  $P = 0.034$ , respectively), in both infant and paediatric patients. As *KMT2A* rearrangements were significantly more frequent in infants ( $P < 0.001$ ), we analysed HDACs, *MEF2C* and *MEF2D* expression in different groups according to age (infants vs. paediatrics) and the presence of the *KMT2A* rearrangement (Fig 2). *KMT2A*-rearranged cases included different translocations with different partners (Table S1). Interestingly, *KMT2A* rearrangements presented a distinctive signature that was independent of age, lineage and *KMT2A*-partner, characterized by overexpression of HDAC9 and *MEF2D* genes.

#### HDAC expression may impact on outcome of paediatric patients with acute leukaemia

After a median follow-up of 4.8 years (range, 0.1–16.0 years), 25 of the whole cohort of patients had died. The overall survival (OS) and event-free survival (EFS) varied significantly according to the lineage of the leukaemia, as expected (Table S1).

Log rank tests were first performed to assess outcome in the BCP-ALL subgroup ( $n = 134$ ). CNS infiltration (CNS-3) predicted a worse OS ( $P = 0.019$ ). Patients aged 1–9 years had better OS than infants or older patients ( $P = 0.046$ ). Among the genes analysed, only low HDAC2 expression (defined with a cut-off at 3.29; around the median, percentile 50, p50), high HDAC9 (cut-off 3.62; around p65) and high *SIRT1* (cut-off 4.08; around p70), negatively impacted

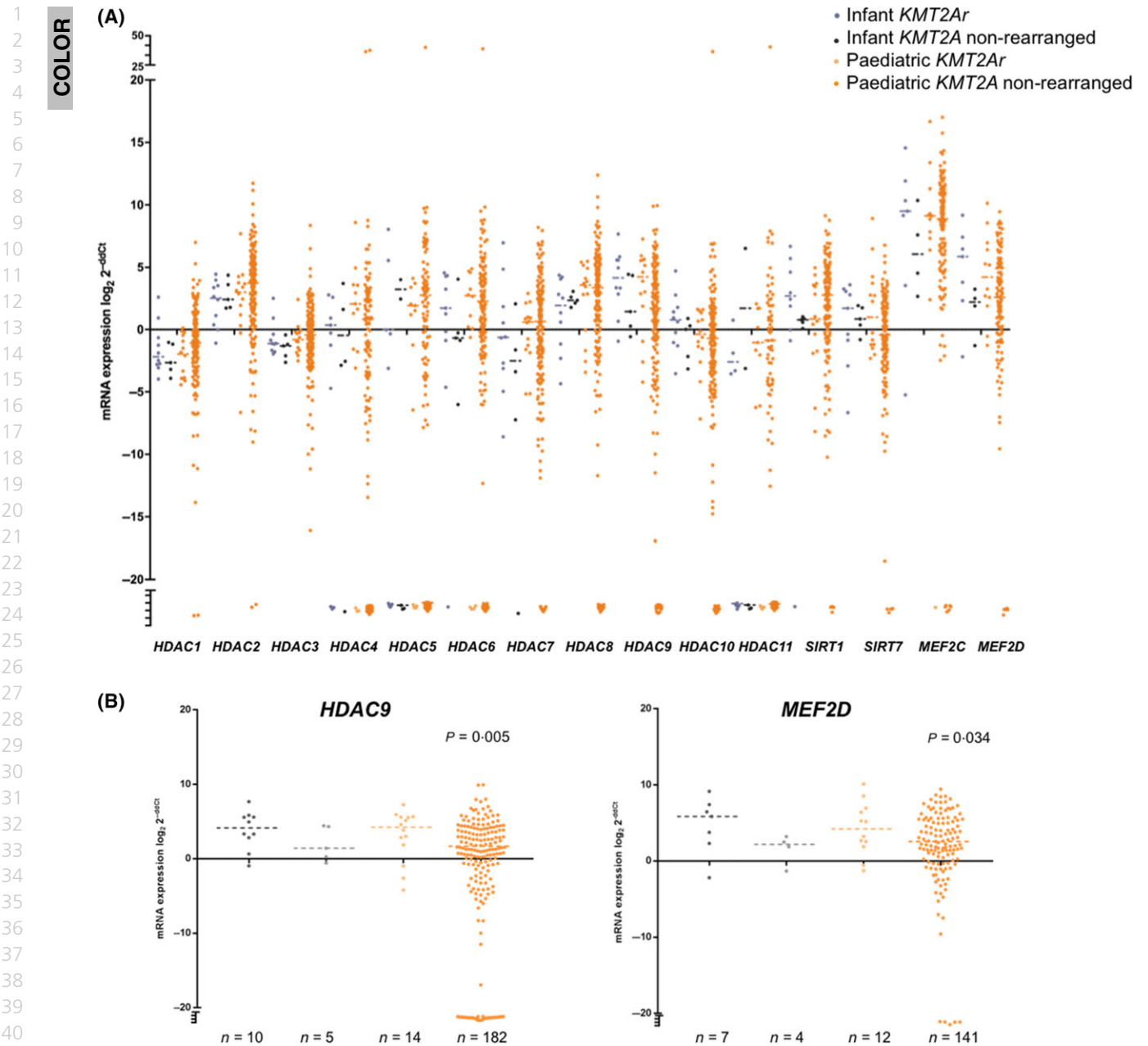
significantly on OS ( $P = 0.008$ ,  $P = 0.007$  and  $P = 0.027$ , respectively). Different clinical and biological factors were predictive of EFS: age (both categorized as infants vs. non-infants and as 3 groups: infants vs. 1–9 years vs. 10 years and older), CNS infiltration, cytogenetic subgroup, the presence of *KMT2A* rearrangement and MRD levels after induction ( $>0.01\%$  MRD, as assessed by flow cytometry). Again, low HDAC2 and high HDAC9 expression predicted a worse EFS ( $P = 0.002$  and  $P < 0.001$ , respectively; Fig 3). In the Cox model for multivariate analysis, low HDAC2 and high HDAC9 expression remained as independent prognostic factors for EFS (hazard ratio [HR] 0.12, 95% confidence interval [CI] 0.03–0.50,  $P = 0.003$ , and HR 42.48, 95%CI 3.80–473.97,  $P = 0.002$ , respectively).

We found no significant factors predictive for OS in T-ALL patients ( $n = 33$ ). However, hyperleucocytosis  $> 100 \times 10^9/l$  and positive MRD after induction ( $>0.01\%$ , as assessed by flow cytometry), were adverse prognostic factors for EFS (log rank test,  $P = 0.04$  and  $P = 0.004$ , respectively). Probably related to the sample size, we found no significant predictive factors in the multivariate analysis.

In the subgroup of AML patients ( $n = 44$ ), patients with high HDACs expression had a worse outcome. High HDAC9 expression correlated with a worse OS ( $P = 0.011$ ). Although the number of patients expressing HDAC5 was low ( $n = 18$ ), we saw a worse OS and EFS in patients with high levels of this gene, that remained significant in the Cox model multivariate analysis for OS (HR 10.92, 95%CI 1.16–103.29,  $P = 0.034$ ). As for EFS, we found that hyperleucocytosis  $>50 \times 10^9/l$ , the genetic subtype (grouped as follows: acute promyelocytic and core-binding factor leukaemias vs. *KMT2A*-rearranged leukaemias vs. *KMT2A* wild-type cases) and high HDAC8 expression (Fig 4) had a significant impact ( $P = 0.027$ ,  $P = 0.002$  and  $P = 0.015$ , respectively). High levels of HDAC1 and high HDAC9 expression showed a trend to lower EFS ( $P = 0.052$  and  $P = 0.074$ , respectively).

## Discussion

Hypoacetylation has been recurrently described in cancer and overexpression of HDACs has been reported in leukaemia (Ropero & Esteller, 2007; Haberland *et al*, 2009; Ceccacci & Minucci, 2016). Hence, more than 40 HDACi have been included in clinical trials (Bose *et al*, 2014; West & Johnstone, 2014; Ahmadzadeh *et al*, 2015; Haery *et al*, 2015; Ceccacci & Minucci, 2016; Chrun *et al*, 2017), but the toxicity found in patients hampered their use in clinical practice and the use of more specific HDACi has been proposed (Subramanian *et al*, 2010; Ceccacci & Minucci, 2016). Thus, a better knowledge of HDAC expression in specific settings would help to design the best therapeutic approach in a tailored manner. However, only a few studies (Moreno *et al*, 2010; Gruhn *et al*, 2013; Tao *et al*, 2013), with a much smaller number of patients, have partially addressed the expression of specific HDACs classes in childhood leukaemia, and no



42 Fig 2. Expression levels of *HDACs*, *MEF2C* and *MEF2D* genes according to age and *KMT2A* gene rearrangements. Relative quantification was calculated with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and a pool of non-neoplastic samples was used as controls (*X*-axis). Dashed lines represent the median value of the samples. The  $\log_2$  normalized gene expression is depicted for infant (grey dots) and paediatric (orange dots) patients. To assess the different profile according to age and *KMT2A* rearrangement, we analysed them separately: light grey dots corresponds to infants with no *KMT2A* rearrangement, while dark grey dots depict *KMT2A*-rearranged infants; light orange dots are paediatric patients with wild-type *KMT2A*, and dark orange dots show paediatric patients with *KMT2A* rearrangement. Outliers are represented in scale at the top of the graph and patients who did not express a determined gene are represented out of the limits of *Y*-axis (bottom of the graph, not to scale). 2a) Expression levels of *HDACs*, *MEF2C* and *MEF2D* genes according to age and *KMT2A* rearrangement. 2b) Enlarged view of *HDAC9* and *MEF2D* genes according to age and *KMT2A* rearrangement.

51 global picture has been described to date. We analysed a  
52 large consecutive series of patients including all leukaemic  
53 lineages and found that some *HDACs* correlated with specific  
54 clinical and biological features, and some even predicted outcome.  
55 Specifically, we found an *HDAC* profile that correlated

with *KMT2A* rearrangement, regardless of age, *KMT2A*-partner and lineage. Other *HDAC* and *MEF2C* profiles were probably reflecting the lineage and the maturation of the blasts and, interestingly, some indicated specific oncogenic pathways active in the leukaemic cells.

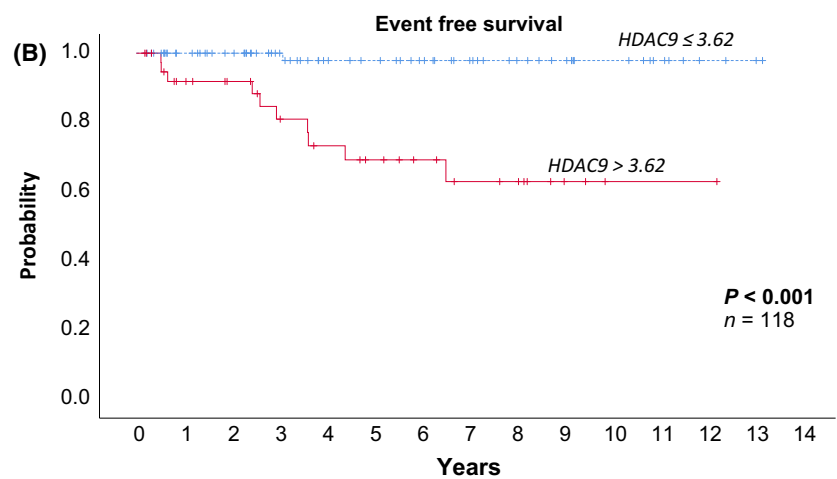
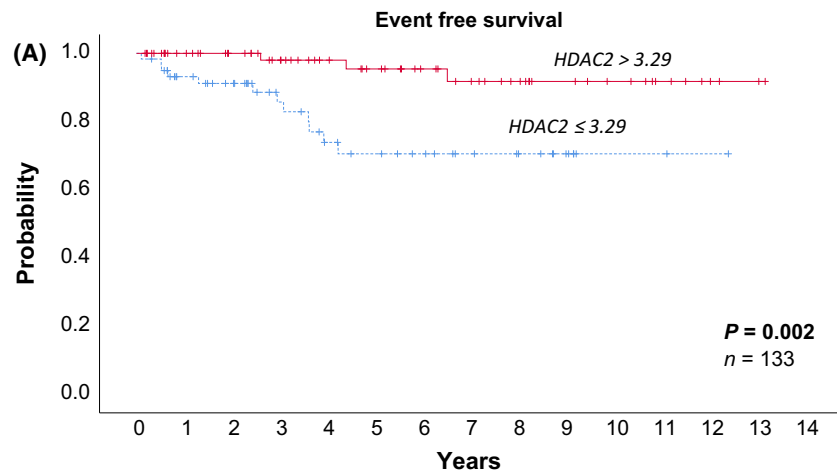


Fig 3. Event-free survival (EFS) of 134 patients with precursor B cell acute lymphoblastic leukaemia according to the expression of *HDAC2* and *HDAC9*. 3a) Patients with *HDAC2* expression above the median (cut-off 3.29; around percentile 50, p50), had a significant better EFS (5-year EFS  $95.4 \pm 3\%$  vs.  $70.5 \pm 7\%$ ,  $P = 0.002$ ). 3b) Patients with high *HDAC9* expression (cut-off 3.62; around p65), did significantly worse than low *HDAC9* cases (5-year EFS  $69.1 \pm 9\%$  vs.  $97.9 \pm 2\%$ ,  $P < 0.001$ ).

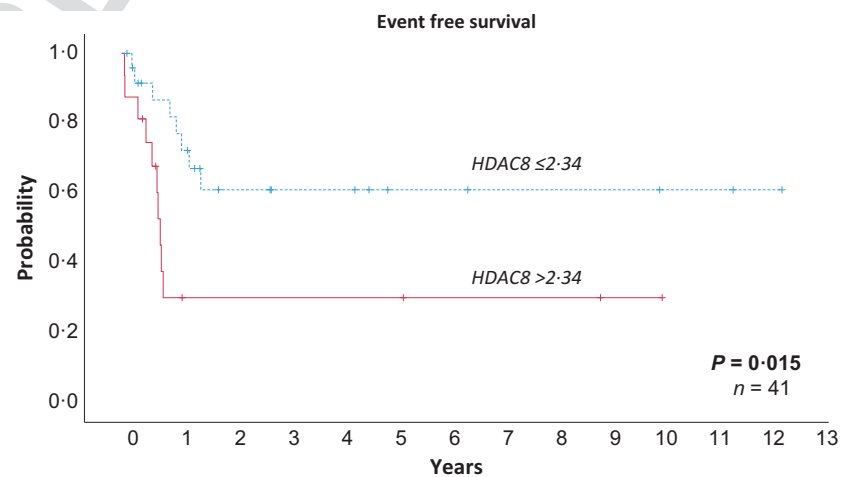


Fig 4. Event-free survival (EFS) of 44 patients with acute myeloid leukaemia according to *HDAC8* expression. Patients with high *HDAC8* expression (cut-off 2.34; around percentile 55), had a significantly worse EFS (5-year EFS  $30.1 \pm 12\%$  vs.  $61 \pm 11\%$ ,  $P = 0.015$ ).

Not previously reported, we observed that some *HDACs* were constantly expressed in all patients, whereas other *HDAC* isoforms seemed to be non-essential for blasts and were absent. Interestingly, nearly all patients of all lineages expressed class I *HDACs*, especially *HDAC1*, *HDAC2* and *HDAC3* and, to a lesser extent, *HDAC8*. These are the

nuclear isoforms with *HDAC* function that are ubiquitously expressed in all tissues. *HDAC1*, *HDAC2* and *HDAC3* are essential for haematopoietic stem cell (HSC) maintenance and self-renewal properties (Barneda-Zahonero & Parra, 2012; Haery *et al*, 2015; Liu *et al*, 2017). Therefore, it seems comprehensible that all our patients, independently of the



lineage of the leukaemia, constantly expressed these class I HDACs, and also very homogeneously, as shown in Fig 1. Interestingly, we observed a significant direct correlation among class I HDACs, especially between *HDAC1* and *HDAC3*. Although a functional redundancy among class I HDACs has been suggested, each member has unique roles in the control of specific gene expression programs (Haberland *et al*, 2009). *HDAC1* and *HDAC2* are involved in many cellular processes, such as proliferation, cell cycle and apoptosis, while *HDAC3* also plays a role in DNA damage response (Barneda-Zahonero & Parra, 2012). Thus, *HDAC1*, *HDAC2* and *HDAC3* seem to be equally indispensable, highlighting the important function of these class I HDACs in normal and leukaemic cells. *HDAC8* was expressed in our patients in a more heterogeneous way, but we observed a direct correlation with *HDAC2* levels, especially in patients with BCP-ALL and T-ALL. *HDAC8* has not been described as a member of any protein complex and its expression is thought to be more cancer-type specific (Barneda-Zahonero & Parra, 2012). Regarding the levels of expression, we observed lower levels of *HDAC1* and overexpression of *HDAC2* and *HDAC8* when compared to bone marrow non-neoplastic samples. We also confirmed the profile previously reported both in smaller cohorts of paediatric patients with acute leukaemia (Moreno *et al*, 2010; Gruhn *et al*, 2013) and in several types of cancer (Chrun *et al*, 2017). In contrast, class IIa HDACs expression was quite more heterogeneous and differed according to the lineage of the leukaemia. Our findings are in line with a heterogeneous expression reported in previous studies (Moreno *et al*, 2010). Class III *SIRT1* and *SIRT7* were more heterogeneously expressed in most of our patients, and we observed an overall overexpression of *SIRT1*, especially in T-ALL patients. Sirtuins seem to play a double-edged sword role in cancer, being reported as pro-oncogenes and as tumour suppressors (Barneda-Zahonero & Parra, 2012). *SIRT1* plays an important role in the pathogenesis of solid tumours and leukaemias and has also been involved in drug resistance, by regulating the acetylation of several transcription factors, such as TP53, C-MYC, N-MYC and NF- $\kappa$ B, and others (Ahmadzadeh *et al*, 2015). Thus, in chronic myeloid leukaemia samples, the inhibition of *SIRT1* by HDACi led to TP53 acetylation and increased apoptosis in leukaemia stem cells (Ahmadzadeh *et al*, 2015; Liu *et al*, 2017). Overexpression of *SIRT1* has been described in adult patients with AML (Bradbury *et al*, 2005) and Li *et al* (2014) proposed the combination of *SIRT1* inhibition plus tyrosine kinase inhibitors to overcome drug resistance in *FLT3*-internal tandem duplication AML stem cells by deacetylating C-MYC.

Overall, all patients presented an HDAC profile more similar to that of normal CD34<sup>+</sup> cells than to their mature counterpart, especially T-ALL patients. Thus, global overexpression of some HDACs could be related to the immature and stemness features of the leukaemic cells. However, in addition to common findings in our whole cohort of patients, some HDACs profiles were associated with the

lineage of the leukaemia, exposing HDACs different roles in specific cellular contexts. In the BCP-ALL cohort ( $n = 134$ ), we sought to confirm a differential expression of *HDAC7* expression in pro-B patients, as described by Barneda-Zahonero *et al* (2015), but the number of pro-B cases analysed in our series was low and we did not observe significant differences. Importantly, HDAC expression was different according to cytogenetic subtype (Fig S5). Thus, both *KMT2A*-rearranged patients and those harbouring *t(1;19)/TCF3-PBX1* expressed all HDACs in nearly all samples, in contrast to other BCP-ALL subtypes, in which the expression was more heterogeneous and a high percentage of patients lacked the expression of several HDACs. This could be related to a specific epigenetic landscape as determined by the genetic abnormalities of each leukaemic subtype. Importantly, we observed a specific profile of *KMT2A*-rearranged BCP-ALL patients, who expressed significantly higher levels of *HDAC9*, *SIRT7* and *MEF2D*. Of note, we also observed a significant correlation between high *HDAC9* and *MEF2D* expression in *KMT2A*-rearranged AML patients, and this was also true in both infants and older patients (Fig 2). Hence, we found a distinctive signature for *KMT2A*-rearranged patients, regardless of age, the *KMT2A*-partner and phenotype. Other than *KMT2A*-rearrangements, overexpression of *HDAC9* and *MEF2D* could be due to different abnormalities: very recently, a new subtype of BCP-ALL characterized by *MEF2D*-rearrangements with different partners (*BCL9*, *CSF1R*, *DAZAPI*, *HNRNPUL1*, and *SS18*) has been described (Gu *et al*, 2016; Liu *et al*, 2016; Suzuki *et al*, 2016). Interestingly, such *MEF2D*-rearrangements presented in older patients with a low CD10 expression, showed a specific gene expression signature with overexpression of *HDAC9* and were sensitive to HDACi (Gu *et al*, 2016).

We also observed significantly high expression of *MEF2C* in BCP-ALL and AML and in some T-ALL cases. The *MEF2* proteins are targets of class II HDACs and regulate different developmental programs (Canté-Barrett *et al*, 2014; Pon & Marra, 2016). *MEF2C* is differentially expressed in various stages of haematopoietic development and it may be involved in conferring stem cell-like properties. *MEF2C* is highly abundant in HSC, common lymphoid progenitors and common myeloid progenitors and decreases during B-lymphoid and myeloid maturation, but it is absent in T cells (Canté-Barrett *et al*, 2014). In concordance with that, we did not find *MEF2C* expression in normal mature T cells. However, the high ectopic *MEF2C* expression has been described in *KMT2A*-rearranged leukaemias (Krivtsov *et al*, 2006), AML and two partially overlapping immature T-ALL subtypes: the so-called early T cell precursor leukaemia (ETP-ALL) (Coustan-Smith *et al*, 2009; Canté-Barrett *et al*, 2014) and in a recently described T-ALL subgroup defined by high *MEF2C* expression (Homminga *et al*, 2011). ETP-ALL is characterized by presenting an immature immunophenotype, expression of myeloid markers and lower frequencies of *NOTCH1* mutations than more differentiated T-ALL patients. Instead, ETP-ALL patients

1 harbour a mutational landscape similar to AML patients  
 2 (Zhang *et al*, 2012). In this regard, it *MEF2C* has been  
 3 reported to antagonize the *NOTCH1* signalling activity. There-  
 4 fore, ectopic expression of *MEF2C* would play a role as a driv-  
 5 ing oncogene in myeloid or early T cell precursors, resulting in  
 6 AML or ETP-ALL, respectively (Canté-Barrett *et al*, 2014). Of  
 7 note, in our cohort, all but one T-ALL patients with  
 8 *NOTCH1/FBXW7* mutations lacked expression of *MEF2C*,  
 9 and the only patient with high *MEF2C* expression and muta-  
 10 tions in *NOTCH1/FBXW7* had an immature phenotype (Fig  
 11 S6). However, other studies did not observe differences in the  
 12 occurrence of *NOTCH1* pathway activating events between  
 13 immature/ETP-like and other T-ALL patients defined by gene  
 14 expression profiling (Zuurbier *et al*, 2014; Colomer-Lahiguera  
 15 *et al*, 2017). These differences could be due either to the differ-  
 16 ent selection criteria or the different numbers of patients anal-  
 17 ysed, as the number of T-ALL patients expressing *MEF2C* in  
 18 our series was rather low. In AML, high *MEF2C* expression  
 19 has been associated with 11q23 abnormalities (Krivtsov *et al*,  
 20 2006; Laszlo *et al*, 2015), monosomal karyotypes, adverse-risk  
 21 disease features and poor outcome (Laszlo *et al*, 2015). In  
 22 *KMT2A-MLLT3* and *KMT2A-MLLT1* models, *MEF2C* could  
 23 have a cooperative oncogenic role, enhancing colony forma-  
 24 tion and regulating cell migration and invasiveness (Krivtsov  
 25 *et al*, 2006; Schwieger *et al*, 2009).

26 Regarding outcome, we confirmed the previously  
 27 described worse prognosis of high *HDAC9* expression in  
 28 BCP-ALL patients (Moreno *et al*, 2010), but, in contrast to  
 29 previous studies (Gruhn *et al*, 2013), we found that lower  
 30 *HDAC2* expression correlated with worse OS and EFS. High  
 31 or heterogeneous levels of *HDAC2* have been described in  
 32 several cancers, and suppression of *HDAC2* with class I  
 33 HDACi has resulted in inhibition of proliferation and  
 34 increased apoptosis of tumour cells (Barneda-Zahonero &  
 35 Parra, 2012; Chrun *et al*, 2017). As we have only looked at  
 36 mRNA levels and some post-translational modifications for  
 37 *HDAC2* have been reported (Krämer *et al*, 2003), the prog-  
 38 nostic value of *HDAC2* expression should be further  
 39 explored. In general, our AML patients with high *HDACs*  
 40 expression had a worse outcome, and again high *HDAC9*  
 41 expression significantly correlated with a worse OS, and had  
 42 a trend to a worse EFS. The impact of *HDAC9* overexpres-  
 43 sion on outcome may be partially explained by the fact that  
 44 *HDAC9* may act as a surrogate of *KMT2A* rearrangements,  
 45 both in BCP-ALL and in AML. However, the negative impact  
 46 of high *HDAC9* levels was also seen in BCP-ALL *KMT2A*-  
 47 wild-type patients, suggesting a possible prognostic impact of  
 48 other recently described genetic abnormalities like *MEF2D*  
 49 rearrangements, as aforementioned (Gu *et al*, 2016; Liu *et al*,  
 50 2016; Suzuki *et al*, 2016). *HDAC9* overexpression has been  
 51 associated with dismal outcome in other neoplasias, such as  
 52 breast cancer and medulloblastoma (Milde *et al*, 2010;  
 53 Lapiere *et al*, 2016). However, the specific role of *HDAC9* in  
 54 leukaemia biology and the mechanisms underlying the over-  
 55 expression and the functional consequences are not fully

understood. We discarded mutations in the hot-spot regions  
 in the catalytic domain of *HDAC9* as a molecular mechanism  
 leading to enhanced expression (data not shown). Lapiere  
*et al* (2016) suggested that the deregulation of *HDAC9*  
 expression mainly occurs at the transcriptional level, as evi-  
 denced by their run-on experiments and the finding of epige-  
 netic marks in the *HDAC9* promoter. As *HDAC9* is a direct  
 transcriptional target of *MEF2D*, deregulation of *MEF2D*  
 could account for the *HDAC9* overexpression. In our study,  
 we found a significant direct correlation between both genes.  
 Interestingly, in breast cancer, the comprehensive signature  
 of the *HDAC9* expression revealed deregulated processes,  
 such as cell death and survival, cell movement, cell growth  
 and proliferation, and identified *SOX9* and *CDKN1A* as two  
 important genes mediating *HDAC9* effects (Lapiere *et al*,  
 2016). However, these results could be context-dependent  
 and should be confirmed in other neoplasias.

We observed a trend towards significance between high  
 expression of *HDAC4* and prednisone-poor response in our  
 T-ALL patients. Similar results had been previously reported  
 (Moreno *et al*, 2010; Gruhn *et al*, 2013). This information  
 could be clinically relevant, as *HDAC4* inhibitors could be use-  
 ful in the high-risk subgroup of patients with T-ALL with poor  
 response to prednisone; therefore, larger series of patients with  
 more robust statistical data are needed to confirm this.

Of note, high *HDAC8* levels in AML patients were associ-  
 ated with worse outcome (Fig 4). *HDAC8* is a class I mem-  
 ber that deacetylates both histone and non-histone proteins,  
 with TP53 and HOXA5 being among its substrates. In nor-  
 mal haematopoiesis, *HDAC8* modulates TP53 activity to  
 ensure HSC maintenance and cell survival under stress (Hua  
*et al*, 2017). In leukaemia, in addition to the modulation of  
 TP53, *HDAC8* also associates with the *inv(16)* fusion protein  
 and other co-repressors to repress several genes, such as  
*CDKN1A* (p21), resulting in abnormal haematopoietic cell  
 proliferation (Hua *et al*, 2017).

HDACi arose as promising drugs, but their toxicity profile  
 limited their clinical use and suggested that isoform-specific  
 HDACi should be considered, especially for high-risk paed-  
 iatric leukaemia subtypes (Balasubramanian *et al*, 2009; Stahl  
*et al*, 2016). Several studies have shown a correlation between  
 the expression of HDACs and the effect of HDACi (Gu *et al*,  
 2016; Suzuki *et al*, 2016). The authors demonstrated sensitiv-  
 ity to various pan-HDACi in *in vitro* and *in vivo* models with  
*MEF2D-BCL9* leukaemic samples, characterized by *HDAC9*  
 overexpression, thus suggesting HDACi as a potential direc-  
 ted treatment in this leukaemia subtype.

In general, *KMT2A* rearrangements harbour a worse prog-  
 nosis, especially in infants, in whom the prognosis is dismal  
 (Meyer *et al*, 2018). Huge efforts have been made to develop  
 targeted therapies to inhibit *KMT2A* leukaemias (reviewed in  
 (Steinhilber & Marschalek, 2018)), including the use of  
 HDACi (Stumpel *et al*, 2012; Ahmad *et al*, 2014; Garrido  
 Castro *et al*, 2018; Steinhilber & Marschalek, 2018). How-  
 ever, DOT1L inhibitors and other approaches did not

1 accomplish the initial expectations in terms of efficacy and  
 2 toxicity. In contrast, the use of class I HDACi seems to be  
 3 especially beneficial, as they inactivate the *KMT2A-AFF1*  
 4 fusion gene while activating the endogenous wild-type MLL  
 5 (*KMT2A*) protein (Ahmad *et al*, 2014; Steinhilber &  
 6 Marschalek, 2018). These and our findings support the use  
 7 of selective class I HDACi for *KMT2A* and other paediatric  
 8 leukaemia patients, as a potential therapeutic activity in  
 9 BCP-ALL has been demonstrated (Stubbs *et al*, 2015).

10 Our studies have some limitations that need to be  
 11 acknowledged. First, despite being the largest series of  
 12 patients reported addressing HDACs expression, the inci-  
 13 dence of childhood leukaemia is low, and the number of  
 14 patients in determined subgroups, defined by lineage or  
 15 molecular abnormalities, was not high enough to reach sta-  
 16 tistical significance. Therefore, our results must be taken with  
 17 caution and deserve further confirmation in larger series.  
 18 Second, we did not confirm our results at a protein level.  
 19 However, there is some data suggesting that the expression  
 20 pattern of HDAC transcripts is very similar to that of HDAC  
 21 proteins in normal and malignant haematopoietic cells, sug-  
 22 gesting that the expression of HDACs is regulated primarily  
 23 at the mRNA level (Wada *et al*, 2009). However, post-trans-  
 24 lational modifications cannot be ruled out, especially in  
 25 HDAC2, as previously reported (Krämer *et al*, 2003). Finally,  
 26 we cannot provide a large validation cohort, but we have  
 27 been able to confirm the prognostic impact of *HDAC2* and  
 28 *HDAC9* in two different therapeutic protocols in our BCP-  
 29 ALL patients, thus reinforcing their value as prognostic  
 30 biomarkers. On the other hand, it is a strength of our study  
 31 that we analysed the full HDAC family and *MEF2C* and  
 32 *MEF2D* genes in the largest series of homogeneously treated  
 33 paediatric patients reported to date, simultaneously including  
 34 all lineages for the first time. This has allowed us to compare  
 35 HDACs profiles and gain a full picture of their expression in  
 36 childhood leukaemia. Furthermore, we could identify a dis-  
 37 tinctive signature for *KMT2A* rearrangements and describe  
 38 the role of some HDACs as prognostic biomarkers.

39 In conclusion, we have identified a distinctive signature for  
 40 paediatric patients with *KMT2A* rearrangements, with high  
 41 *HDAC9* and *MEF2D* expression, regardless of age, *KMT2A*  
 42 partner and lineage of the leukaemia. Moreover, we confirmed  
 43 previous data on the adverse prognostic value of overexpres-  
 44 sion of *HDAC9* that cannot be explained only by *KMT2A* rear-  
 45 rangements. Our findings shed some light on the complex  
 46 picture of HDACs expression in childhood leukaemia and pave  
 47 the way to more in-depth mechanistic studies. In this sense, it  
 48 would be very interesting to have a deeper insight of the mech-  
 49 anisms leading to the overexpression of HDACs and their role  
 50 in leukaemogenesis, issues that have been scarcely studied in  
 51 leukaemia. Finally, and more importantly, our data support  
 52 the directed use of selective class I HDACi or even isoform-  
 53 restricted HDACi or MEF2 inhibition in selected subtypes of  
 54 paediatric patients with acute leukaemia.  
 55

## Acknowledgements

We are indebted to our patients and families for their help and to Obra Social from Hospital Sant Joan de Déu, “Força Miquel”, “Candela polsera solidària”, “Pirata Barballum”, “Magic” and “Mua” projects for their support. We also want to thank the excellent technical support by Ms. Lidia Ruiz. We are indebted to the “Biobanc de l’Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació”, integrated in the Spanish Biobank Network of ISCIII for the sample and data procurement. This study has been funded by projects PI12/02417, and PI16/00246, integrated into Plan Nacional de I+D+I and co-funded by ISCIII – Subdirecció General de Evaluació y Fomento de la Investigación Sanitaria – and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), CIBERER, from Fundació AECC-Cancer Infantil 2012, Fundació Cris contra el càncer, Fundació Pelayo and Fundació Unoentrecienmil.

## Author contributions

NVG and MC designed the study and MC supervised the project; NVG, RM, CE, EEC and SPM performed the genetic analyses; NVG, SPJ and MC analysed the data and performed the statistical analyses; NVG and MC wrote the paper with contribution of SPJ, MT, AC, SG, RB, ARLL and SR. AC, RB, ARLL, MM, AAS and SR recruited patients. All authors read and approved the final version of the manuscript.

## Conflict of interest

None.

## Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**Table S1.** Main clinic and biological characteristics of the 211 paediatric patients with acute leukaemia included in the study.

**Fig S1.** Expression levels of HDACs, *MEF2C* and *MEF2D* genes in normal hematopoietic cells.

**Fig S2.** Correlation among HDACs, *MEF2C* and *MEF2D* in 211 paediatric leukaemic patients according to lineage.

**Fig S3.** Expression of HDACs, *MEF2C* and *MEF2D* in 211 paediatric patients according to the lineage of the leukaemia.

**Fig S4.** Expression levels of HDACs, *MEF2C* and *MEF2D* genes in 134 paediatric BCP-ALL patients.

**Fig S5.** Expression of HDACs, *MEF2C* and *MEF2D* in 134 paediatric BCP-ALL patients, according to the cytogenetic subtype.

**Fig S6.** Expression of HDACs, *MEF2C* and *MEF2D* in 33 paediatric T-ALL patients according to the *NOTCH1-FBXW7* mutational status.

## References

- 1 Ahmad, K., Katryniok, C., Scholz, B., Merkens, J.,  
2 Löscher, D., Marschalek, R. & Steinhilber, D.  
3 (2014) Inhibition of class I HDACs abrogates  
4 the dominant effect of MLL-AF4 by activation  
5 of wild-type MLL. *Oncogenesis*, **3**, e127. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2014.39> [Accessed April  
6 26]
- 7 Ahmadzadeh, A., Khodadi, E., Shahjahani, M.,  
8 Bertacchini, J. & Vosoughi, T. (2015) The role  
9 of HDACs as leukemia therapy targets using  
10 HDI. *International Journal of Hematology-Oncology  
11 and Stem Cell Research*, **9**, 203–214.
- 12 Balasubramanian, S., Verner, E. & Buggy, J.J.  
13 (2009) Isoform-specific histone deacetylase inhibitors:  
14 the next step? *Cancer Letters*, **280**, 211–  
15 221.
- 16 Barneda-Zahonero, B. & Parra, M. (2012) Histone  
17 deacetylases and cancer. *Molecular Oncology*, **6**,  
18 579–589.
- 19 Barneda-Zahonero, B., Collazo, O., Azagra, A.,  
20 Fernández-Duran, I., Serra-Musach, J., Islam,  
21 A.B.M.M.K., Vega-García, N., Malatesta, R.,  
22 Camós, M., Gómez, A., Román-González, L.,  
23 Vidal, A., López-Bigas, N., Villanueva, A., Esteller,  
24 M. & Parra, M. (2015) The transcriptional repressor  
25 HDAC7 promotes apoptosis and c-Myc downregulation  
26 in particular types of leukemia and lymphoma. *Cell  
27 Death and Disease*, **6**, e1635.
- 28 Bolden, J.E., Peart, M.J. & Johnstone, R.W. (2006)  
29 Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors.  
30 *Nature Reviews. Drug discovery*, **5**, 769–  
31 784.
- 32 Bose, P., Dai, Y. & Grant, S. (2014) Histone  
33 deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of  
34 action: emerging insights. *Pharmacology & Therapeutics*,  
35 **143**, 323–336.
- 36 Bradbury, C., Khanim, F., Hayden, R., Bunce, C.,  
37 White, D., Drayson, M., Craddock, C. & Turner,  
38 B. (2005) Histone deacetylases in acute myeloid  
39 leukaemia show a distinctive pattern of expression  
40 that changes selectively in response to deacetylase  
41 inhibitors. *Leukemia*, **19**, 1751–1759.
- 42 Canté-Barrett, K., Pieters, R. & Meijerink, J.P.P.  
43 (2014) Myocyte enhancer factor 2C in hematopoiesis  
44 and leukemia. *Oncogene*, **33**, 403–410.
- 45 Ceccacci, E. & Minucci, S. (2016) Inhibition of  
46 histone deacetylases in cancer therapy: lessons  
47 from leukaemia. *British Journal of Cancer*, **114**,  
48 605–611.
- 49 Chrun, E.S., Modolo, F. & Daniel, F.I. (2017) Histone  
50 modifications: a review about the presence of this  
51 epigenetic phenomenon in carcinogenesis. *Pathology -  
52 Research and Practice*, **213**, 1329–1339.
- 53 Colomer-Lahiguera, S., Pisecker, M., König, M.,  
54 Nebral, K., Pickl, W.F., Kauer, M.O., Haas, O.A.,  
55 Ullmann, R., Attarbaschi, A., Dworzak, M.N. & Strehl, S.  
(2017) *MEF2C*-dysregulated pediatric T-cell acute  
lymphoblastic leukemia is associated with *CDKN1B* deletions  
and a poor response to glucocorticoid therapy. *Leukemia &  
Lymphoma*, **58**, 2895–2904.
- Contal, C. & O'Quigley, J. (1999) An application  
of changepoint methods in studying the effect of  
age on survival in breast cancer. *Computational  
Statistics and Data Analysis*, **30**, 253–270.
- Coustan-Smith, E., Mullighan, C.G., Onciu, M.,  
Behm, F.G., Raimondi, S.C., Pei, D., Cheng, C.,  
Su, X., Rubnitz, J.E., Basso, G., Biondi, A., Pui,  
C.H., Downing, J.R. & Campana, D. (2009) Early  
T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk  
acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet Oncology*,  
**10**, 147–156.
- Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M. & Hrabeta,  
J. (2017) Histone deacetylase inhibitors as anti-cancer  
drugs. *International Journal of Molecular Sciences*,  
**18**, 1–25.
- Garrido Castro, P., van Roon, E.H.J., Pinhanços,  
S.S.M., Trentin, L., Schneider, P., Kerstjens, M.,  
te Kronnie, G., Heidenreich, O., Pieters, R. & Stam,  
R.W. (2018) The HDAC inhibitor Panobinostat  
(LBH589) exerts in vivo anti-leukaemic activity  
against MLL-rearranged acute lymphoblastic  
leukaemia and involves the RNF20/RNF40/WAC—H2B  
ubiquitination axis. *Leukemia*, **32**, 323–331.
- Gatta, G., Rossi, S., Foschi, R., Trama, A., Marcos-  
Gragera, R., Pastore, G., Peris-Bonet, R., Stiller,  
C. & Capocaccia, R. (2013) Survival and cure  
trends for European children, adolescents and young  
adults diagnosed with acute lymphoblastic  
leukemia from 1982 to 2002. *Haematologica*,  
**98**, 744–752.
- Gruhn, B., Naumann, T., Gruner, D., Walther, M.,  
Wittig, S., Becker, S., Beck, J.F. & Sonnemann,  
J. (2013) The expression of histone deacetylase 4 is  
associated with prednisone poor-response in  
childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia  
Research*, **37**, 1200–1207.
- Gu, Z., Churchman, M., Roberts, K., Li, Y., Liu,  
Y., Harvey, R.C., McCastlain, K., Reshmi, S.C.,  
Payne-Turner, D., Iacobucci, I., Shao, Y., Chen,  
I.-M., Valentine, M., Pei, D., Mungall, K.L.,  
Mungall, A.J., Ma, Y., Moore, R., Marra, M.,  
Stonerock, E., Gastier-Foster, J.M., Devidas, M.,  
Dai, Y., Wood, B., Borowitz, M., Larsen, E.E.,  
Maloney, K., Mattano, L.A. Jr, Angiolillo, A.,  
Salzer, W.L., Burke, M.J., Gianni, F., Spinelli,  
O., Radich, J.P., Minden, M.D., Moorman, A.V.,  
Patel, B., Fielding, A.K., Rowe, J.M., Luger,  
S.M., Bhatia, R., Aldoss, I., Forman, S.J.,  
Kohlschmidt, J., Mrózek, K., Marcucci, G.,  
Bloomfield, C.D., Stock, W., Kornblau, S., Kantarjian,  
H.M., Konopleva, M., Paietta, E., Willman, C.L.,  
Loh, M.L., Hunger, S.P. & Mullighan, C.G. (2016)  
Genomic analyses identify recurrent *MEF2D* fusions  
in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Communications*,  
**7**, 13331. <https://doi.org/10.1038/ncomms13331>
- Haberland, M., Montgomery, R.L. & Olson, E.N.  
(2009) The many roles of histone deacetylases in  
development and physiology: implications for  
disease and therapy. *Nature Reviews Genetics*, **10**,  
32–42.
- Haery, L., Thompson, R.C. & Gilmore, T.D.  
(2015) Histone acetyltransferases and histone  
deacetylases in B- and T-cell development,  
physiology and malignancy. *Genes & Cancer*, **6**,  
184–213.
- Homminga, I., Pieters, R., Langerak, A.W., de  
Rooij, J.J., Stubbs, A., Verstegen, M., Vuerhard,  
M., Buijs-Gladdines, J., Kooij, C., Klous, P., van  
Vlierbergh, P., Ferrando, A.A., Cayuela, J.M.,  
Verhaaf, B., Beverloo, H.B., Horstmann, M., de  
Haas, V., Wiekmeijer, A.S., Pike-Overzet, K.,  
Staal, F.J.T., de Laat, W., Soulier, J., Sigaux, F.  
& Meijerink, J.P.P. (2011) Integrated transcript  
and genome analyses reveal *NKX2-1* and  
*MEF2C* as potential oncogenes in T cell acute  
lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*, **19**, 484–  
497.
- Hua, W.-K., Qi, J., Cai, Q., Carnahan, E., Ayala  
Ramirez, M., Li, L., Marcucci, G. & Kuo, Y.-H.  
(2017) HDAC8 regulates long-term hematopoietic  
stem cell maintenance under stress by modulating  
*p53* activity. *Blood*, **30**, 2619–2630.
- Hunger, S.P. & Mullighan, C.G. (2015) Acute  
lymphoblastic leukemia in children. *The New England  
Journal of Medicine*, **373**, 1541–1552.
- Krämer, O.H., Zhu, P., Ostendorff, H.P., Golebiewski,  
M., Tiefenbach, J., Peters, M.A., Brill,  
B., Groner, B., Bach, I., Heinzl, T. & Göttlicher,  
M. (2003) The histone deacetylase inhibitor valproic  
acid selectively induces proteasomal degradation of  
*HDAC2*. *The EMBO Journal*, **22**, 3411–3420.
- Krivtsov, A.V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs,  
M.C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J.E., Wang, J.,  
Hahn, W.C., Gilliland, D.G., Golub, T.R. & Armstrong,  
S.A. (2006) Transformation from committed  
progenitor to leukaemia stem cell initiated by  
*MLL-AF9*. *Nature*, **442**, 818–822.
- Lapierre, M., Linares, A., Dalvai, M., Duraffourd,  
C., Bonnet, S., Boulahtouf, A., Rodriguez, C.,  
Jalaguier, S., Assou, S., Orsetti, B., Balaguer, P.,  
Maudelonde, T., Blache, P., Bystricky, K.,  
Boulle, N. & Cavallès, V. (2016) Histone  
deacetylase 9 regulates breast cancer cell proliferation  
and the response to histone deacetylase inhibitors.  
*Oncotarget*, **7**, 19693–19708.
- Laszlo, G.S., Alonzo, T.A., Gudgeon, C.J., Harrington,  
K.H., Kentsis, A., Gerbing, R.B., Wang, Y.-C.,  
Ries, R.E., Raimondi, S.C., Hirsch, B.A., Gamis,  
A.S., Meshinchi, S. & Walter, R.B. (2015) High  
expression of myocyte enhancer factor 2C (*MEF2C*) is  
associated with adverse risk features and poor  
outcome in pediatric acute myeloid leukemia: a report  
from the Children's Oncology Group. *Journal of  
Hematology & Oncology*, **8**, 115.
- Li, L., Osdal, T., Ho, Y., Chun, S., McDonald, T.,  
Agarwal, P., Lin, A., Chu, S., Qi, J., Li, L., Hsieh,  
Y.T., Santos, C.Dos, Yuan, H., Ha, T.Q., Popa, M.,  
Hovland, R., Bruserud, E., Gjertsen, B.T., Kuo,  
Y.H., Chen, W., Lain, S., McCormack, E. & Bhatia,  
R. (2014) *SIRT1* activation by a c-MYC oncogenic  
network promotes the maintenance and drug  
resistance of human *FLT3-ITD* acute myeloid  
leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*, **15**, 431–446.
- Liu, Y.-F., Wang, B.-Y., Zhang, W.-N., Huang,  
J.-Y., Li, B.-S., Zhang, M., Jiang, L., Li, J.-F.,

- Wang, M.-J., Dai, Y.-J., Zhang, Z.-G., Wang, Q., Kong, J., Chen, B., Zhu, Y.-M., Weng, X.-Q., Shen, Z.-X., Li, J.-M., Wang, J., Yan, X.-J., Li, Y., Liang, Y.-M., Liu, L., Chen, X.-Q., Zhang, W.-G., Yan, J.-S., Hu, J.-D., Shen, S.-H., Chen, J., Gu, L.-J., Pei, D., Li, Y., Wu, G., Zhou, X., Ren, R.-B., Cheng, C., Yang, J.J., Wang, K.-K., Wang, S.-Y., Zhang, J., Mi, J.-Q., Pui, C.-H., Tang, J.-Y., Chen, Z. & Chen, S.-J. (2016) Genomic profiling of adult and pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *EBioMedicine*, **8**, 173–183.
- Liu, N., Li, S., Wu, N. & Cho, K.-S. (2017) Acetylation and deacetylation in cancer stem-like cells. *Oncotarget*, **8**, 89315–89325.
- Meyer, C., Burmeister, T., Groer, D., Tsauro, G., Fecina, L., Renneville, S., Sutton, R., Venn, N.C., Emerenciano, M., Pombo-De-Oliveira, M.S., Blunck, B., Lopes, A., Zuna, J., Trka, J., Ballerini, P., Lapillonne, H., De Braekeleer, M., Cazzaniga, G., Abascal, L.C., van der Velden, V.H.J., Delabesse, E., Park, T.S., Oh, S.H., Silva, M.L.M., Lund-Aho, T., Juvonen, V., Moore, A.S., Heidenreich, O., Vormoor, J., Zerkalenkova, E., Olshanskaya, Y., Bueno, C., Menendez, P., Teigler-Schlegel, A., zur Stadt, U., Lentjes, J., Göhring, G., Kustanovich, A., Aleinikova, O., Schäfer, B.W., Kubetzko, S., Madsen, H.O., Gruhn, B., Duarte, X., Gameiro, P., Lippert, E., Bidet, A., Cayuela, J.M., Clappier, E., Alonso, C.N., Zwaan, C.M., van den Heuvel-Eibrink, M.M., Izraeli, S., Trakhtenbrot, L., Archer, P., Hancock, J., Möricke, A., Alten, J., Schrappe, M., Stanulla, M., Strehl, S., Attarbaschi, A., Dworzak, M., Haas, O.A., Panzer-Grümayer, R., Sedék, L., Szczepanski, T., Caye, A., Suarez, L., Cavé, H. & Marschalek, R. (2018) The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*, **32**, 273–284.
- Milde, T., Oehme, L., Korshunov, A., Kopp-Schneider, A., Remke, M., Northcott, P., Deubzer, H.E., Lodrini, M., Taylor, M.D., von Deimling, A., Pfister, S. & Witt, O. (2010) HDAC5 and HDAC9 in medulloblastoma: novel markers for risk stratification and role in tumor cell growth. *Clinical Cancer Research*, **16**, 3240–3252.
- Moreno, D.A., Scrideli, C.A., Cortez, M.A.A., De Paula Queiroz, R., Valera, E.T., Da Silva Silveira, V., Yunes, J.A., Brandalise, S.R. & Tone, L.G. (2010) Differential expression of HDAC3, HDAC7 and HDAC9 is associated with prognosis and survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia: research paper. *British Journal of Haematology*, **150**, 665–673.
- Pon, J.R. & Marra, M.A. (2016) MEF2 transcription factors: developmental regulators and emerging cancer genes. *Oncotarget*, **7**, 2297–2312.
- Pui, C.-H., Yang, J.J., Hunger, S.P., Pieters, R., Schrappe, M., Biondi, A., Vora, A., Baruchel, A., Silverman, L.B., Schmiegelow, K., Escherich, G., Horibe, K., Benoit, Y.C.M., Izraeli, S., Yeoh, A.E.J., Liang, D.-C., Downing, J.R., Evans, W.E., Relling, M.V. & Mullighan, C.G. (2015) Childhood acute lymphoblastic leukemia: progress through collaboration. *Journal of Clinical Oncology*, **33**, 2938–2948.
- Raetz, E.A. & Bhatla, T. (2012) Where do we stand in the treatment of relapsed acute lymphoblastic leukemia? *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, **2012**, 129–136.
- Ropero, S. & Esteller, M. (2007) The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular Oncology*, **1**, 19–25.
- Sahakian, E., Chen, J., Powers, J.J., Chen, X., Maharaj, K., Deng, S.L., Achille, A.N., Lienlaf, M., Wang, H.W., Cheng, F., Sodr , A.L., Distler, A., Xing, L., Perez-Villaruel, P., Wei, S., Villagra, A., Seto, E., Sotomayor, E.M., Horna, P. & Pinilla-Ibarz, J. (2017) Essential role for histone deacetylase 11 (HDAC11) in neutrophil biology. *Journal of Leukocyte Biology*, **102**, 475–486.
- Schwieger, M., Schü, A., Forster, M., Engelmann, A., Arnold, M.A., Delwel, R., Valk, P.J., Rgen, J., Hler, L., Slany, R.K., Olson, E.N. & Stocking, C. (2009) Homing and invasiveness of MLL/ENL leukemic cells is regulated by MEF2C. *Blood*, **114**, 2476–2488.
- Stahl, M., Gore, S.D., Vey, N. & Prebet, T. (2016) Lost in translation? Ten years of development of histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **25**, 307–317.
- Steinhilber, D. & Marschalek, R. (2018) How to effectively treat acute leukemia patients bearing MLL -rearrangements? *Biochemical Pharmacology*, **147**, 183–190.
- Stubbs, M.C., Kim, W., Bariteau, M., Davis, T., Vempati, S., Minehart, J., Witkin, M., Qi, J., Krivtsov, A.V., Bradner, J.E., Kung, A.L. & Armstrong, S. A. (2015) Selective inhibition of HDAC1 and HDAC2 as a potential therapeutic option for B-ALL. *Clinical Cancer Research*, **21**, 2348–2358.
- Stumpel, D., Schneider, P., Seslija, L., Osaki, H., Williams, O., Pieters, R. & Stam, R. (2012) Connectivity mapping identifies HDAC inhibitors for the treatment of t(4;11)-positive infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **26**, 682–692.
- Subramanian, S., Bates, S.E., Wright, J.J., Espinoza-Delgado, I. & Piekarz, R.L. (2010) Clinical toxicities of histone deacetylase inhibitors. *Pharmaceuticals*, **3**, 2751–2767.
- Suzuki, K., Okuno, Y., Kawashima, N., Muramatsu, H., Okuno, T., Wang, X., Kataoka, S., Sekiya, Y., Hamada, M., Murakami, N., Kojima, D., Narita, K., Narita, A., Sakaguchi, H., Sakaguchi, K., Yoshida, N., Nishio, N., Hama, A., Takahashi, Y., Kudo, K., Kato, K. & Kojima, S. (2016) MEF2D-BCL9 fusion gene is associated with high-risk acute B-Cell precursor lymphoblastic leukemia in adolescents. *Journal of Clinical Oncology*, **34**, 3451–3459.
- Tao, Y.-F., Pang, L., Du, X.-J., Sun, L.-C., Hu, S.-Y., Lu, J., Cao, L., Zhao, W.-L., Feng, X., Wang, J., Wu, D., Wang, N., Ni, J. & Pan, J. (2013) Differential mRNA expression levels of human histone-modifying enzymes in normal karyotype B cell pediatric acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 3376–3394.
- Wada, T., Kikuchi, J., Nishimura, N., Shimizu, R., Kitamura, T. & Furukawa, Y. (2009) Expression levels of histone deacetylases determine the cell fate of hematopoietic progenitors. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 30673–30683.
- Ward, E., DeSantis, C., Robbins, A., Kohler, B. & Jemal, A. (2014) Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *A Cancer Journal for Clinicians*, **64**, 83–103.
- West, A.C. & Johnstone, R.W. (2014) New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *The Journal of Clinical Investigation*, **124**, 30–39.
- Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S.L., Payne-Turner, D., Easton, J., Chen, X., Wang, J., Rusch, M., Lu, C., Chen, S.-C., Wei, L., Collins-Underwood, J.R., Ma, J., Roberts, K.G., Pounds, S.B., Ulyanov, A., Becksfors, J., Gupta, P., Huether, R., Kriwacki, R.W., Parker, M., McGoldrick, D.J., Zhao, D., Alford, D., Espy, S., Bobba, K.C., Song, G., Pei, D., Cheng, C., Roberts, S., Barbato, M.I., Campana, D., Coustan-Smith, E., Shurtleff, S.A., Raimondi, S.C., Kleppe, M., Cools, J., Shimano, K.A., Hermiton, M.L., Doulatov, S., Eppert, K., Laurenti, E., Notta, F., Dick, J.E., Basso, G., Hunger, S.P., Loh, M.L., Devidas, M., Wood, B., Winter, S., Dunsmore, K.P., Fulton, R.S., Fulton, L.L., Hong, X., Harris, C.C., Dooling, D.J., Ochoa, K., Johnson, K.J., Obenaus, J.C., Evans, W.E., Pui, C.-H., Naevae, C.W., Ley, T.J., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Downing, J.R. & Mullighan, C.G. (2012) The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, **481**, 157–163.
- Zhang, C., Zhong, J.F., Stucky, A., Chen, X.-L., Press, M.F. & Zhang, X. (2015) Histone acetylation: novel target for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Epigenetics*, **7**, 117.
- Zuurbier, L., Gutierrez, A., Mullighan, C.G., Canté-Barrett, K., Gevaert, O., de Rooi, J., Li, Y., Smits, W.K., Buijs-Gladdines, J.G., Sonneveld, E. & Look, A.T. (2014) Immature MEF2C-dysregulated T-cell leukemia patients have an early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia gene signature and typically have non-rearranged t-cell receptors. *Haematologica*, **99**, 94–102.

1 **SUPPORTING INFORMATION**

2 **Supplementary Methods.**

3 **Supplementary Table I.** Main clinic and biological characteristics of the 211 paediatric patients  
4 with acute leukaemia included in the study.

5 **Supplementary Figure 1.** Expression levels of *HDACs*, *MEF2C* and *MEF2D* genes in normal  
6 hematopoietic cells.

7 **Supplementary Figure 2.** Correlation among *HDACs*, *MEF2C* and *MEF2D* in 211 paediatric  
8 leukaemic patients according to lineage.

9 **Supplementary Figure 3.** Expression of *HDACs*, *MEF2C* and *MEF2D* in 211 paediatric patients  
10 according to the lineage of the leukaemia.

11 **Supplementary Figure 4.** Expression levels of *HDACs*, *MEF2C* and *MEF2D* genes in 134  
12 paediatric BCP-ALL patients.

13 **Supplementary Figure 5.** Expression of *HDACs*, *MEF2C* and *MEF2D* in 134 paediatric BCP-ALL  
14 patients, according to the cytogenetic subtype.

15 **Supplementary Figure 6.** Expression of *HDACs*, *MEF2C* and *MEF2D* in 33 paediatric T-ALL  
16 patients according to the *NOTCH1-FBXW7* mutational status.

17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26

## 27 **Supplementary Methods**

### 28 **Patients**

29 Patients were all uniformly treated according to the Spanish Society of Pediatric Haematology  
30 and Oncology (SEHOP) consecutive protocols: SHOP-LAL-1999, SHOP-LAL-2005 and SEHOP-  
31 PETHEMA 2013 for ALL cases and SHOP-LAM-96, SHOP-LAM-2001, and SHOP-LAM-2007 for  
32 AML cases. Acute promyelocytic leukaemia (APL) patients were treated as per protocol  
33 PETHEMA LPA 2005. Infants with ALL were treated according to SHOP-LAL INFANTS 2001 and  
34 INTERFANT-06 protocols. Patients were assigned to a determined risk group according to each  
35 protocol, based on clinic-biological variables at diagnosis and subsequently according to the  
36 levels of minimal residual disease (MRD). Following the guidelines of the consecutive  
37 protocols, in ALL patients MRD was assessed by multiparametric flow cytometry (MFC, 4 and 8  
38 fluorescences) in all cases and also by quantitative real-time PCR (RQ-PCR) in patients  
39 harbouring *BCR-ABL1* fusion gene (Brüggemann *et al*, 2010). In AML cases, we followed MRD by  
40 MFC and by RQ-PCR in *core-binding factor* leukaemias and in patients with *PML-RAR $\alpha$*  fusion  
41 gene.

### 42 **DNA and RNA extraction and reverse transcription**

43 Bone marrow or peripheral blood samples from diagnosis were used for the analyses.  
44 Separation of mononuclear cells was performed using density gradient with Ficoll-Hypaque  
45 (Sigma, St Louis MO, USA). Genomic DNA was extracted with Qiaquick and Gentrage DNA  
46 extraction kits (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA was extracted with TriPure (Roche  
47 Diagnostics, Indianapolis, IN) and cDNA synthesis was performed from 50-100 ng of total RNA,  
48 using Qiagen QuantiTect Whole Transcriptome cDNA kit (Qiagen, Hilden, Germany).

### 49 **Identification of recurrent genetic abnormalities**

50 The diagnosis was based on the standard cytomorphological, immunophenotypic and  
51 cytogenetic/molecular criteria as previously described (Harrison *et al*, 2010; Gabert *et al*,  
52 2003). We assessed the copy number alterations (CNA) by Multiple Ligand Probe Amplification

53 (MLPA, MRC Holland) using SALSA P-335 and SALSA P-383 kits for pB-ALL and T-ALL,  
54 respectively. *NOTCH1* and *FBXW7* mutations were analysed in DNA by PCR and Sanger  
55 sequencing as previously described (Weng *et al*, 2004). *FLT3* internal tandem duplications  
56 (*FLT3*-ITD) and *NPM1* mutations were analysed by fluorescent PCR (Thiede *et al*, 2002). *CEBPA*  
57 mutational status was studied by PCR and Sanger sequencing as reported (Fröhling *et al*,  
58 2004). HDAC9 mutational status was analysed by PCR and Sanger sequencing using in-house  
59 method. We studied the hot-spot regions in the catalytic domain located in exon 13 (F: 5'-  
60 tcttgcctgtattcccttgtc-3'; R: 5'- cccaaatgaatactggcctct-3'), exon 19 (F: 5'-cgtctgttttcattccctgta-  
61 3'; R: 5'-aacaccagcaaggacaagaa-3') and exon 20 (F: 5'-agagctcccatgtgcttggt-3'; R: 5'-  
62 tccaattgcccactttcaga-3').

63

#### 64 **HDAC and MEF2 family mRNA expression**

65 Amplifications were obtained using the TaqMan® Gene Expression Assays *HDAC1*  
66 (Hs02621185\_s1), *HDAC2* (Hs00231032\_m1), *HDAC3* (Hs00187320\_m1), *HDAC4*  
67 (Hs00195814\_m1), *HDAC5* (Hs00608366\_m1), *HDAC6* (Hs00195869\_m1), *HDAC7*  
68 (Hs00248789\_m1), *HDAC8* (Hs00218503\_m1), *HDAC9* (Hs00206843\_m1), *HDAC10*  
69 (Hs00368899\_m1), *HDAC11* (Hs00227335\_m1), *SIRT1* (Hs01009006\_m1), *SIRT7*  
70 (Hs01034735\_m1), *MEF2C* (Hs\_00231149\_m1) and *MEF2D* (Hs\_00954735\_m1).

#### 71 **Statistical Analysis**

72 The statistical analyses were performed using the SPSS 24.0 statistical software package (SPSS  
73 Inc., Chicago, IL, USA), R software version 3.4.2 ([www.R-project.org](http://www.R-project.org)) (R Core Team, 2017) and  
74 GraphPad Prism version 7.00 (GraphPad Software, California, USA). All p-values lower than  
75 0.05 were considered significant. The association between categorical variables was evaluated  
76 by the  $\chi^2$  or the Fisher's exact tests, depending on whether the applicability conditions of the  
77  $\chi^2$  test were fulfilled. For quantitative variables, the Student's t-test or the Mann–Whitney U-  
78 test (for non-parametric tests) was used. In addition, the Kruskal–Wallis test was used to  
79 compare the gene expression levels among categorical variables with three or more  
80 categories. Spearman's correlation coefficient was calculated to assess association between  
81 quantitative variables. When performing multiple comparisons, the Holm-Bonferroni method  
82 was used to adjust p-values (Holm, 1979). As some patients did not show expression of some



83 genes, we consider expression levels as (1) a quantitative variable, including only those  
84 patients with quantifiable gene expression; and (2) a qualitative variable, considering two  
85 groups of patients, those expressing the gene and those with no expression at all. Survival was  
86 estimated using the Kaplan-Meier estimator (Kaplan & Meier, 1958) and differences in survival  
87 between groups were assessed using the log-rank test (Greenwood, 1926; Kalbfleisch &  
88 Prentice, 1980). Overall survival (OS) was calculated as the time from diagnosis to death or last  
89 follow-up and event-free survival (EFS) as the time from diagnosis to the occurrence of an  
90 event (refractoriness, relapse, death or last follow-up, censoring at the time of allogeneic  
91 hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) to avoid the confounding effect of other  
92 competitive events after transplant). In the univariate analysis we included the main clinical  
93 and biological prognostic factors, such as age, leucocytes, CNS, MLL-rearrangement, MRD post-  
94 inductions and the different cut-off for HDAC expression levels. Those factors statistically  
95 significant in the univariate analysis were included in the multivariate. Multivariate survival  
96 analyses were performed using the Cox proportional hazards model. Hazard ratios and their  
97 corresponding confidence intervals were derived from that model (Cox, 1972). We used the  
98 Contal and O'Quigley method (Contal & O'Quigley, 1999) to estimate cut-off values of the gene  
99 expression levels and thus determine high and low expression.

100 Brüggemann, M., Schrauder, A., Raff, T., Pfeifer, H., Dworzak, M., Ottmann, O.G., Asnafi, V.,  
101 Baruchel, A., Bassan, R., Benoit, Y., Biondi, A., Cavé, H., Dombret, H., Fielding, A.K., Foà,  
102 R., Gökbüget, N., Goldstone, A.H., Goulden, N., Henze, G., Hoelzer, D., et al (2010)  
103 Standardized MRD quantification in European ALL trials: Proceedings of the Second  
104 International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18–20 September 2008.  
105 *Leukemia*, **24**, 521–535 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20033054>  
106 [Accessed December 13, 2017].

107 Contal, C. & O'Quigley, J. (1999) An application of changepoint methods in studying the effect  
108 of age on survival in breast cancer. *Comput Stat Data Anal*, 253–270.

109 Cox, D. (1972) Regression models and life-tables. *J R Stat Soc B*, 187–220.

110 Fröhling, S., Schlenk, R.F., Stolze, I., Bihlmayr, J., Benner, A., Kreitmeier, S., Tobis, K., Döhner, H.  
111 & Döhner, K. (2004) CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and  
112 normal cytogenetics: Prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *Journal*  
113 *of Clinical Oncology*, **22**, 624–633.

114 Gabert, J., Beillard, E., van der Velden, V.H.J., Bi, W., Grimwade, D., Pallisgaard, N., Barbany, G.,  
115 Cazzaniga, G., Cayuela, J.M., Cavé, H., Pane, F., Aerts, J.L.E., De Micheli, D., Thirion, X.,

116 Pradel, V., González, M., Viehmann, S., Malec, M., Saglio, G. & van Dongen, J.J.M. (2003)  
117 Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse  
118 transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease  
119 detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia : official journal of*  
120 *the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, **17**, 2318–2357.

121 Greenwood, M. (1926) The natural duration of cancer. *Rep Public Health Med Subj*, 1–26.

122 Harrison, C.J., Haas, O., Harbott, J., Biondi, A., Stanulla, M., Trka, J., Izraeli, S. & Biology and  
123 Diagnosis Committee of International Berlin-Frankfurt-Münster study group (2010)  
124 Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor  
125 acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from the Biology and Diagnosis  
126 Committee of the International Berlin-Frankfurt-Münster study group. *British Journal of*  
127 *Haematology*, **151**, 132–142 Available at:  
128 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20701601> [Accessed December 13, 2017].

129 Holm, S. (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal*  
130 *of Statistics*, 65–70.

131 Kalbfleisch, J. & Prentice, R. (1980) The statistical analysis of failure time data New York: John  
132 Wiley and Sons, Inc.

133 Kaplan, E. & Meier, P. (1958) Non parametric estimation from incomplete observations.  
134 *Journal of American Statistics Association*, 457–481.

135 R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for  
136 Statistical Computing, Vienna, Austria.

137 Thiede, C., Steudel, C., Mohr, B., Schaich, M., Schäkel, U., Platzbecker, U., Wermke, M.,  
138 Bornhäuser, M., Ritter, M., Neubauer, A., Ehninger, G. & Illmer, T. (2002) Analysis of  
139 FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association  
140 with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, **99**, 4326–  
141 35 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12036858> [Accessed December  
142 13, 2017].

143 Weng, A.P., Ferrando, A. a, Lee, W., Morris, J.P., Silverman, L.B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow,  
144 S.C., Look, a T. & Aster, J.C. (2004) Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute  
145 lymphoblastic leukemia. *Science (New York, N.Y.)*, **306**, 269–271.

146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155

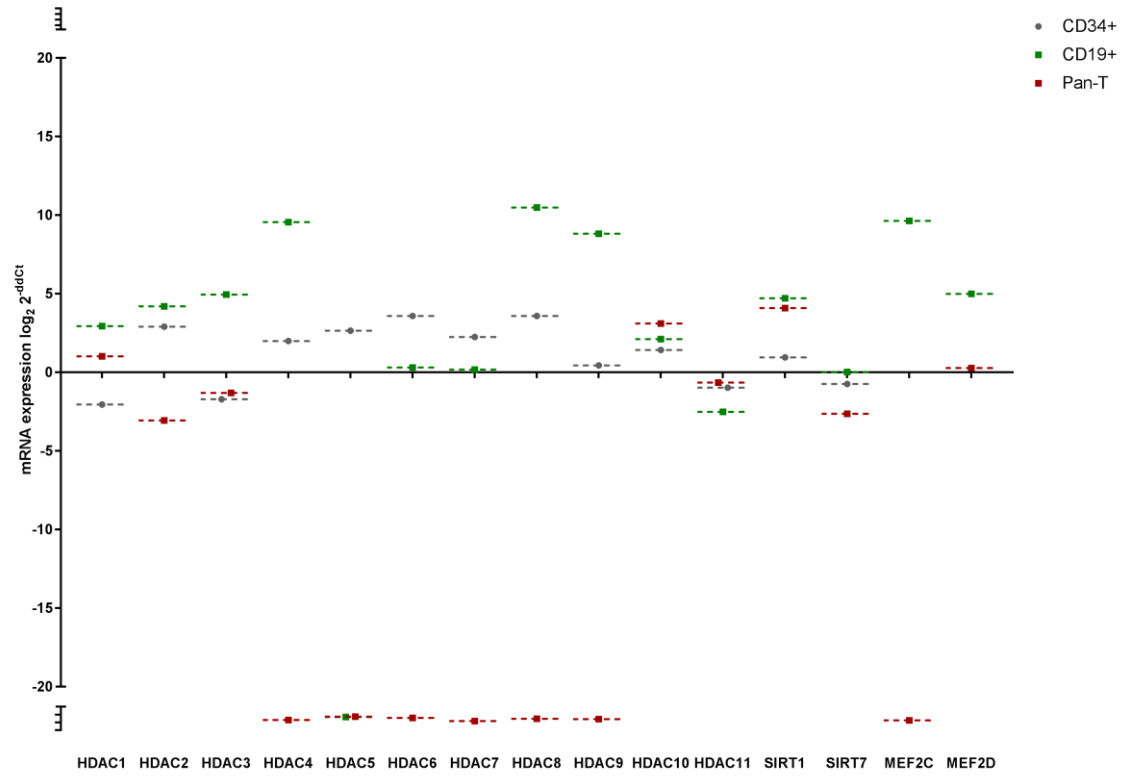
156 **Supplementary Table I.** Main clinic and biological characteristics of the 211 pediatric patients  
 157 with acute leukaemia included in the study.

Patients	Total no. (%) 211
<b>Sex</b>	
Male	121 (57)
Female	90 (43)
<b>Age, years</b>	
Median (range)	5.8 (0-17.1)
< 1 year old	15 (7)
1-9 years old	147 (70)
>10 years old	49 (23)
<b>WBC count, x10<sup>9</sup>/L, median (range)</b>	52.8 (0.6-741.0)
<b>Blasts, median (range)</b>	
Bone marrow	84.9 (13-100)
Peripheral blood	47.5 (0-100)
<b>CNS (n=209)</b>	
CNS-1	165 (78)
CNS-2	27 (12)
CNS-3	16 (8)
<b>Lineage &amp; Immunophenotype</b>	
<b>Precursor B-cell ALL (BCP-ALL) (n=134)</b>	
Common CD10+	125
Pro-B CD10-	9
<b>T-ALL (n=33)</b>	
Pro-T	1
Pre-T	4
Early T-cell Precursor	4
Cortical	21
Mature	3
<b>AML (n=44)</b>	
<b>Cytogenetics</b>	
<b>pB-ALL (n=134)</b>	
High Hyperdiploidy	47
t(12;21)(p13;q22)/ <i>ETV6-RUNX1</i>	25
t(1;19)(q23;p13)/ <i>TCF3-PBX1</i>	6
t(9;22)(q34;q11)/ <i>BCR-ABL1</i>	7
<i>MLL</i> -rearranged <sup>a</sup>	11
B-other	38
<b>T-ALL (n=33)</b>	
Normal	16
Abnormal	8
No metaphases	4
<b>AML (n=44)</b>	
Acute Promyelocytic Leukaemia	3
CBF-AML <sup>b</sup>	6
<i>MLL</i> -rearranged <sup>c</sup>	12
Other <sup>d</sup>	23
<b>Protocol</b>	
<b>pB-ALL</b>	
INTERFANT-06	4
SHOP-INFANT 2001	1
SHOP-1999	13
SHOP-2005	62
SEHOP-PETHEMA 2013	54
<b>T-ALL</b>	
SHOP-2005	17
SEHOP-PETHEMA 2013	16
<b>AML</b>	
SHOP-LAM-1996	1
SHOP-LAM-2001	11
SHOP-LAM-2007	28
PETHEMA LPA 2005	3
LAM DOWN 2006	1
<b>Median follow-up, years (range)</b>	4.84 (0.01-16.0.)
<b>Overall Survival at 5 years, estimate ± SE, %</b>	
BCP-ALL	96±2%
T-ALL	82±7%
AML	66±8%
<b>Event Free Survival at 5 years, estimate ± SE, %</b>	
BCP-ALL	84.3±4%
T-ALL	82.1±7%
AML	50.3±8%

159 WBC: white blood cell. CNS: Central Nervous System. ALL: Acute Lymphoblastic Leukaemia. AML: Acute Myeloblastic Leukaemia. CBF: core-binding  
160 factor. SE: Standard Error.  
161 <sup>a</sup> *MLL* rearrangements in BCP-ALL: t(4;11)(q21;q23), n=3; t(11;19)(q23;p13), n=1; t(9;11)(p22;q23), n=1; t(7;11)(p22;q23), n=1; other *MLL*-rearranged  
162 cases with unknown partner (FISH-positive cases), n=5.  
163 <sup>b</sup> CBF-AML: t(8;21)(q22;q22), n=3; inv(16)(p13;q22)/t(16;16)(p13;q22), n=3.  
164 <sup>c</sup> *MLL* rearrangements in AML: t(9;11)(p22;q23), n=4; t(11;19)(q23;p13), n=3; t(10;11)(q11.2;q23), n=2; other *MLL*-rearranged cases with unknown  
165 partner (FISH-positive cases), n=3.  
166 <sup>d</sup> Other AML: complex karyotype and other rearrangements.  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185

186 **Supplementary Figure 1. Expression levels of HDACs, MEF2C and MEF2D genes in normal**  
187 **hematopoietic cells.** Relative quantification was calculated with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and a pool  
188 of non-neoplastic samples was used as calibrator (X-axis). Dashed lines represent the median  
189 value of the samples; in normal haematopoietic cells represent the median of three replicates.  
190 The  $\log_2$  normalized gene expression is depicted in grey dots for CD34+ cells, green dots for  
191 normal mature CD19+ cells and red dots for normal mature Pan-T cells. Patients who did not  
192 express a determined gene are represented out of the limits of Y-axis (bottom of the graphic,  
193 not at scale).

194 The CD34+ cells globally overexpressed all HDACs and showed a very high expression of *SIRT1*,  
195 while *HDAC1*, *HDAC3* and *HDAC11* were expressed at lower levels regarding the normal bone  
196 marrow used as calibrator. Unfortunately, we could not assess *MEF2C* and *MEF2D* expression  
197 in CD34+ cells. Peripheral blood mature cells had a different profile: CD19+ B-lymphocytes  
198 lacked *HDAC5* expression, but had high levels of the remaining genes, except for *HDAC11*,  
199 which was under-expressed, and for *HDAC6*, *HDAC7* and *SIRT7*, all of them expressed at the  
200 same level as the calibrator. Mature T-cells presented absence of expression of *HDAC4* to  
201 *HDAC9*, and *MEF2C*; *HDAC2*, *HDAC3*, *HDAC11* and *SIRT7* were under-expressed, while *HDAC10*  
202 and *SIRT1* levels were high as compared to the calibrator.



203

204

205

206

207

208

209

210

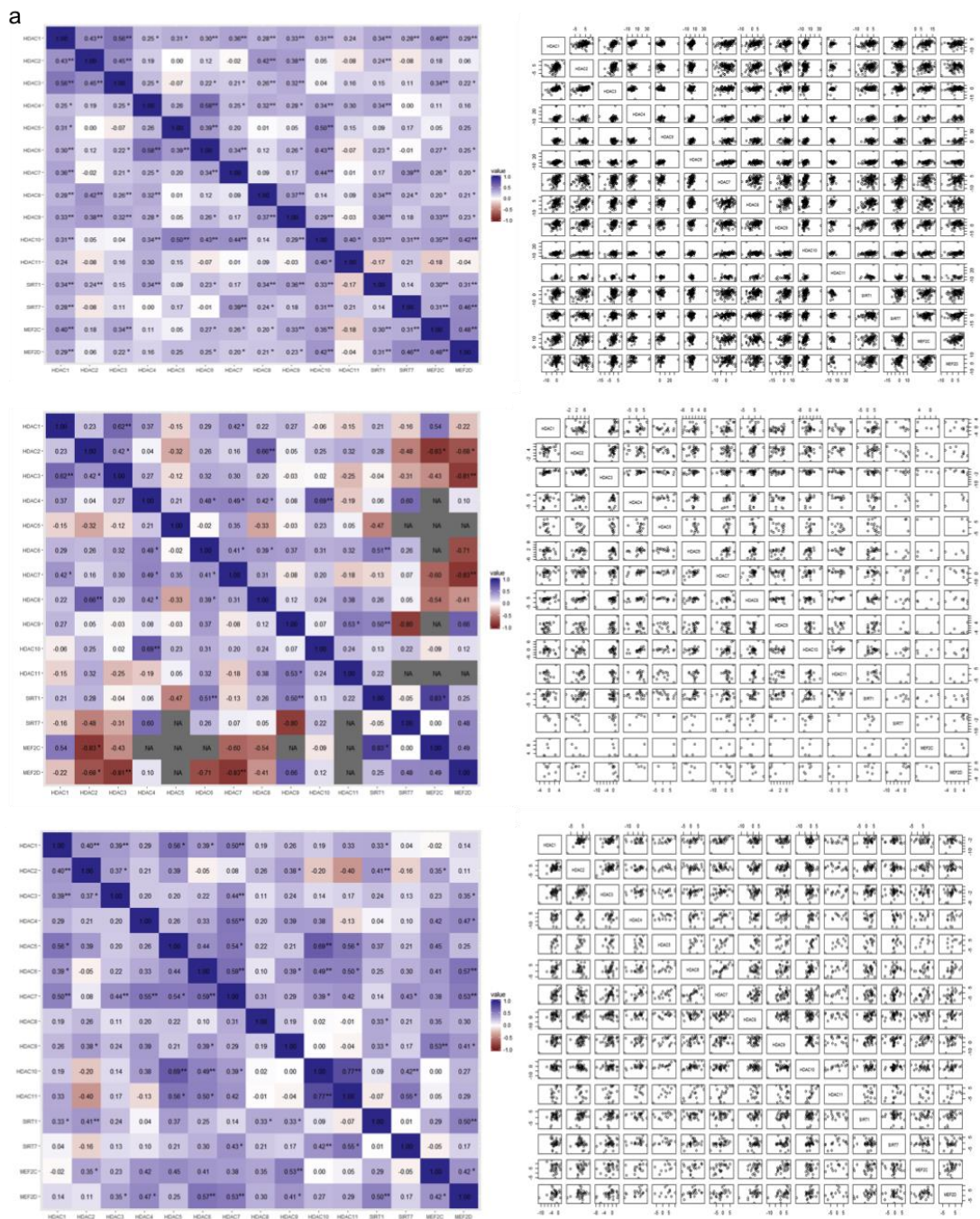
211

212

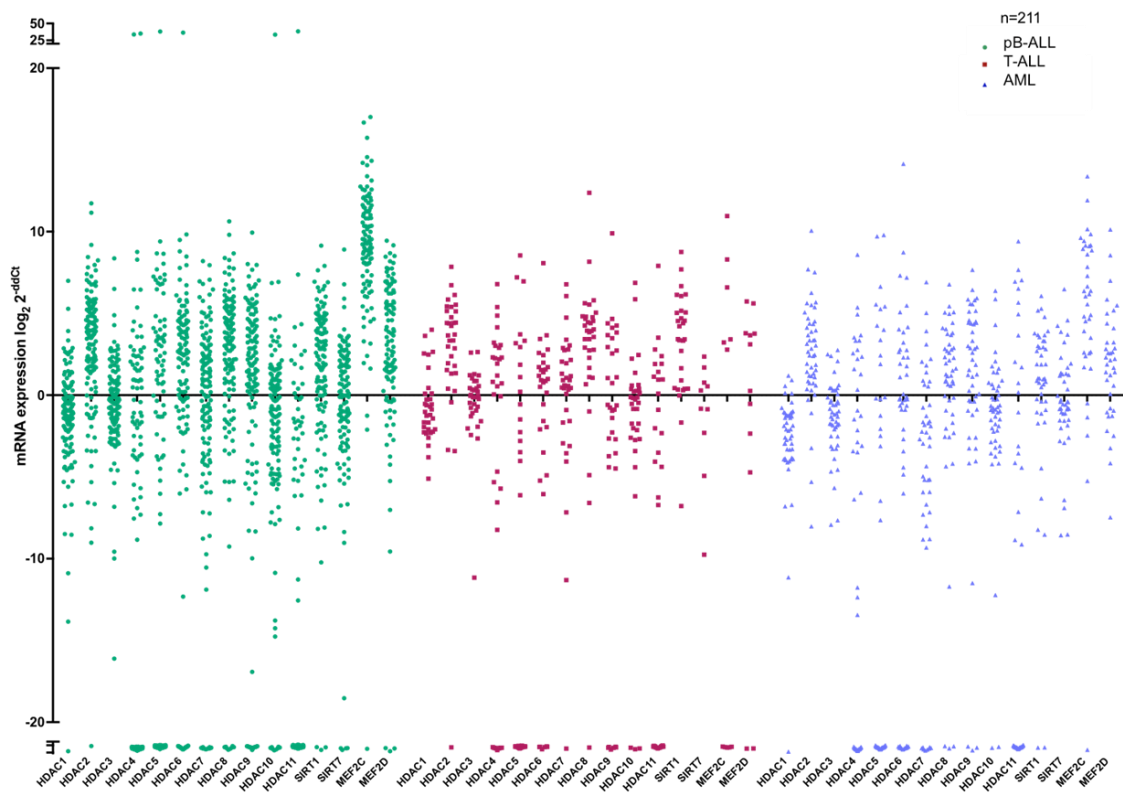
213

214

215 **Supplementary Figure 2. Correlation among HDACs, MEF2C and MEF2D in 211 paediatric**  
 216 **leukaemic patients according to lineage.** 2a) 134 patients with BCP-ALL; 2b) 33 T-ALL patients  
 217 and 2c) 44 AML patients. Spearman's correlation coefficients between all possible gene pairs  
 218 are shown. NAs correspond to pairs with sample sizes lower than 5, for which correlations  
 219 were not estimated. We observed a significant Spearman's correlation intra- and inter HDACs  
 220 classes. Statistical significance is represented by \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .



222 **Supplementary Figure 3. Expression of HDACs, MEF2C and MEF2D in 211 paediatric patients**  
 223 **according to the lineage of the leukaemia.** We included in our study 134 BCP-ALL cases, 33 T-  
 224 ALL and 44 AML patients, and observed different HDAC expression according to the lineage of  
 225 the leukaemia. Relative quantification was calculated with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and a pool of non-  
 226 neoplastic samples was used as calibrator (X-axis). Dashed lines represent the median value of  
 227 the samples. The log<sub>2</sub> normalized gene expression is depicted in green dots for BCP-ALL  
 228 samples, red dots for T-ALL and blue dots for AML patients. Patients who did not express a  
 229 determined gene are represented out of the limits of Y-axis (bottom of the graphic, not at  
 230 scale).



231

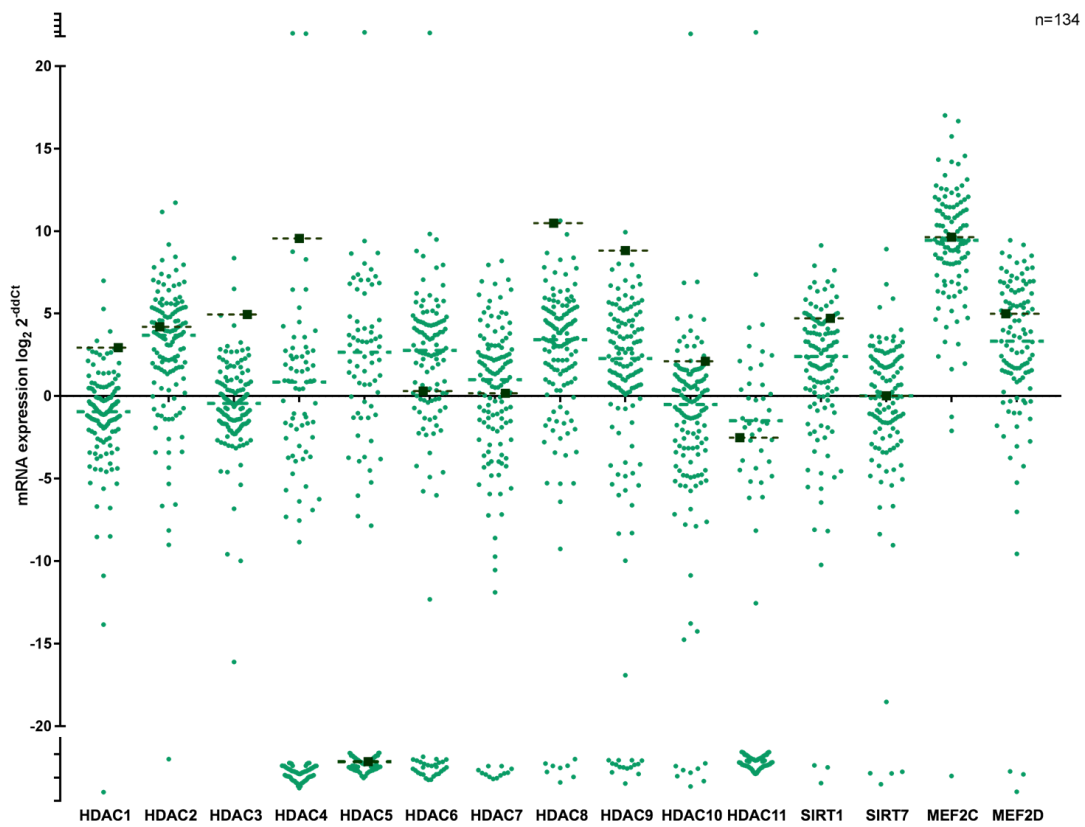
232

233

234



235 **Supplementary Figure 4. Expression levels of HDACs, MEF2C and MEF2D genes in 134**  
 236 **paediatric BCP-ALL patients.** Relative quantification was calculated with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and  
 237 a pool of non-neoplastic samples was used as calibrator (X axis). Dashed lines represent the  
 238 median value of the samples. The log<sub>2</sub> normalized gene expression is depicted in green dots  
 239 for BCP-ALL patients and in dark green for normal mature CD19+ cells (median value of three  
 240 replicates). Patients who did not express a determined gene are represented out of the limits  
 241 of Y-axis (bottom of the graphic, not at scale).



242

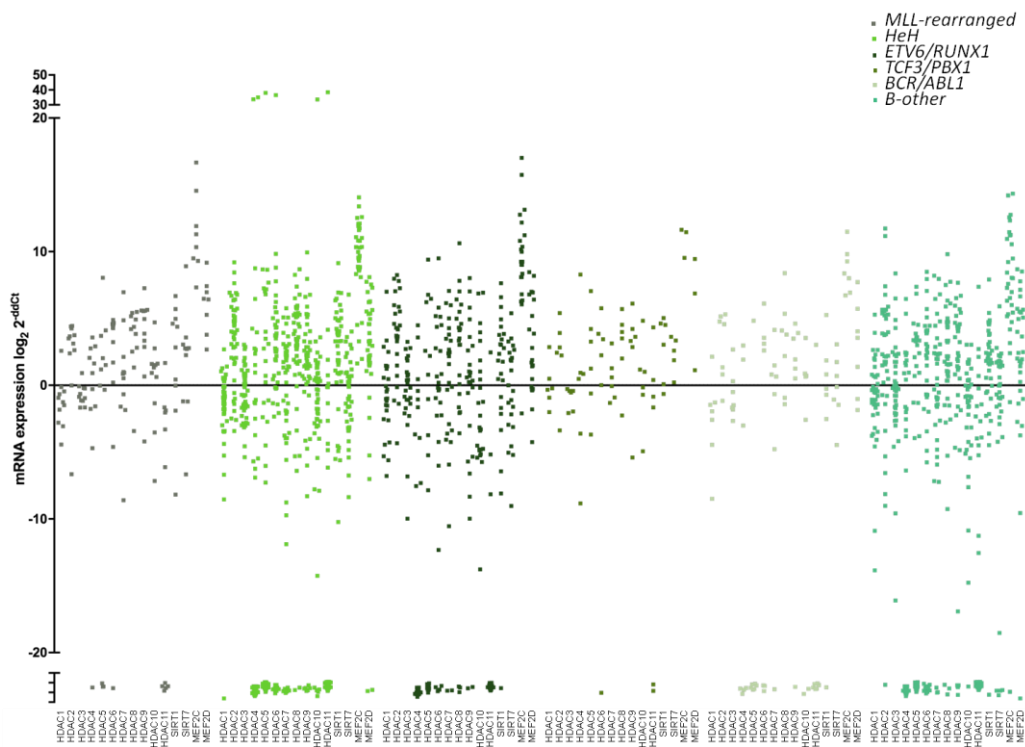
243

244

245

246

247 **Supplementary Figure 5. Expression of HDACs, MEF2C and MEF2D in 134 paediatric BCP-ALL**  
 248 **patients, according to the cytogenetic subtype.** Relative quantification was calculated with  
 249 the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and a pool of non-neoplastic samples was used as calibrator (X axis). Dashed  
 250 lines represent the median value of the samples. The log<sub>2</sub> normalized gene expression is  
 251 depicted in grey dots for *MLL* rearranged patients, in light green dots for patients with high  
 252 hyperdiploidy (HeH), dark green dots for *ETV6-RUNX1* patients, intermediate green dots for  
 253 *TCF3-PBX1* cases, light blue dots for patients with *BCR-ABL1* rearrangement and blue dots for  
 254 patients included in the B-other category. Patients who did not express a determined gene are  
 255 represented out of the limits of Y-axis (bottom of the graphic, not at scale).



256

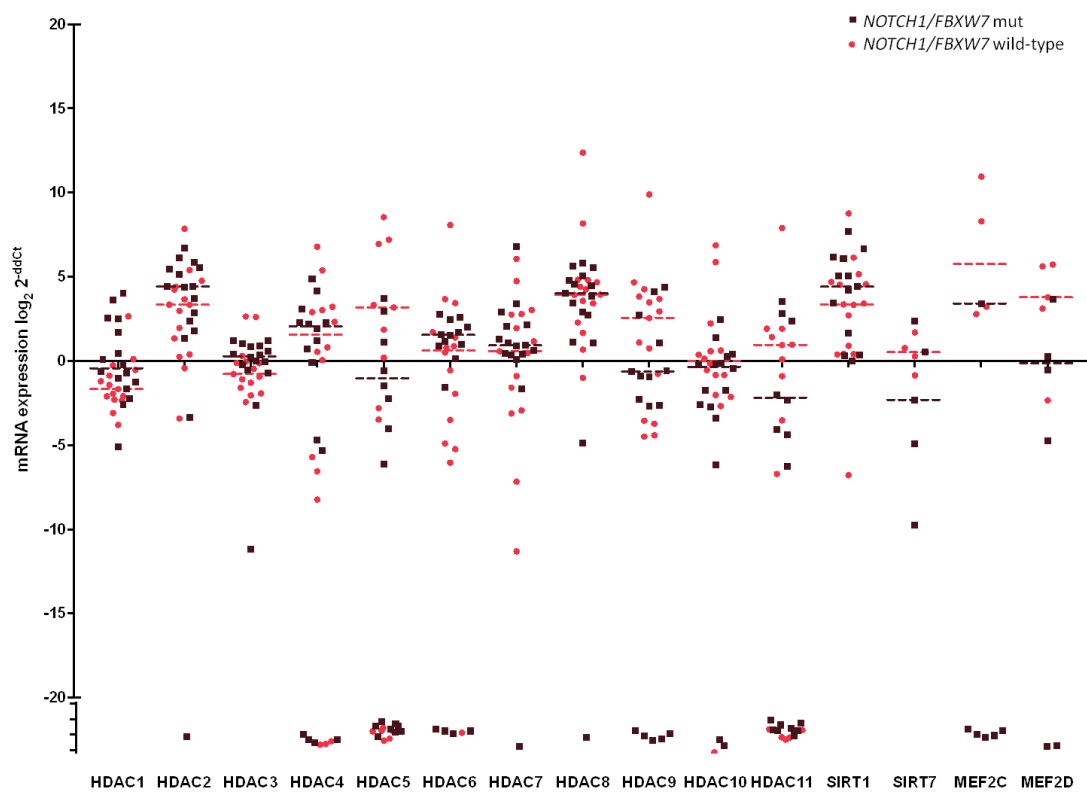
257

258

259

260

261 **Supplementary Figure 6. Expression of HDACs, MEF2C and MEF2D in 33 paediatric T-ALL**  
262 **patients according to the NOTCH1-FBXW7 mutational status.** Relative quantification was  
263 calculated with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and a pool of non-neoplastic samples was used as calibrator  
264 (X axis). Dashed lines represent the median value of the samples. The log2 normalized gene  
265 expression is depicted in light pink dots for non-mutated NOTCH1-FBXW7 patients and in black  
266 dots for NOTCH1-FBXW7 mutated cases. Patients who did not express a determined gene are  
267 represented out of the limits of Y-axis (bottom of the graphic, not at scale).



268

**Editor-in-Chief**

Finbarr E. Cotter

*Chair of Experimental Haematology, Barts Cancer Institute, Centre for Haemato-Oncology, Barts and The London School of Medicine, London, UK*

Barcelona, 20<sup>th</sup> of April, 2018

Dear Dr Cotter,

We appreciate your comments on our manuscript entitled **“Paediatric patients with acute leukaemia and *MLL* rearrangement show a distinctive expression pattern of histone deacetylases”** (BJH-2018-00214) and send a revised version for your consideration to be published in British Journal of Haematology, after addressing in detail all the main issues raised by the reviewers and introducing the appropriate changes in the manuscript.

We

**We think that all the constructive suggestions would help to maximize the results of our study and improve the quality of this manuscript. Robustly support It is our belief that the manuscript is substantially improved after making the suggested edits.**

We hope that these revisions improve the paper such that you and the reviewers now deem it worthy of publication in BJH. Next, we offer detailed responses to your comments as well as those of the reviewers.

Sincerely,

Mireia Camós

**Interestingly, as *MEF2D* rearrangements are associated to pro-B phenotype in B-other ALL, we studied one of our cases with similar presentation (teenager, pro-B phenotype, very high HDAC9 expression): the FISH studies showed no rearrangement of *MEF2D* but a fusion of *ZNF384* instead.**

## REVIEWER 1

---

### *Comments to the Author*

*This manuscript describes the expression of HDAC and associated transcription factors in primary paediatric leukaemia samples. The patient cohort is large enough to demonstrate striking associations between leukaemia lineage and in some cases molecular/cytogenetic status, and expression of specific patterns of HDACi and MEF2C/D. In some cases, these patterns are significant for disease prognosis and may well make an important contribution towards future efforts to use HDAC inhibitors, especially more subtype specific ones, in clinical trials. Furthermore, the association between MLL rearranged leukaemias and high HDAC9/MEF2D expression gives interesting clues and insights into the transcriptional networks controlling the leukaemia biology in this subtype. This may well be exploited in future analyses of possible therapeutic options for MLL rearranged leukaemias. The data described in this manuscript will therefore be of interest to both leukaemia biologists and clinicians.*

We would like to thank the reviewer 1 for the kindly comments and the interest showed in our study. We fully appreciate the thorough reading and the positive feedback from the reviewer 1.

## REVIEWER 2

---

### *Comments to the Author*

*Vega-Garcia N et al. analyzed expression of HDACs and other genes in pediatric leukemia and association of expression of each gene. They also showed that HDAC9 was correlated with outcome. The results are potentially interesting but an impact of this study is minimized due to insufficient information. The following issues to be addressed:*

We highly appreciate the detailed valuable comments of reviewer 2. As suggested by the reviewer, we have sought for more information to try to maximize the possible impact of our study. Thus, we have performed additional experimental data to support our conclusions and discussion has been modified as suggested to clarify the message.

We addressed all the comments and questions raised by the reviewer one by one as follows:

*#1. Authors showed an association between HDACs expression and outcome, and HDAC9 had an adverse effect on outcome. However, an importance of HDAC9 in leukemia biology is unclear.*

The reviewer is right; HDAC9 plays an important role in cancer and, in fact, its overexpression has been associated to dismal outcome in different neoplasias, such as breast cancer, medulloblastoma and leukaemia (Lapierre et al., 2016; Milde et al., 2010; and Moreno et al., 2010, respectively). However, the specific role of HDAC9 in leukaemia biology and the mechanisms underlying the overexpression and the functional consequences are not fully understood and have been scarcely addressed. Thus, only Lapierre & Milde have investigated the HDAC9 overexpression in breast cancer and medulloblastoma respectively, with some interesting insights regarding possible epigenetic mechanisms responsible for the overexpression, but without conclusive results.

*1.1 Authors should show how overexpression of HDAC9 is induced, and also investigate underlying mechanism caused by overexpression of HDAC9.*

Possible mechanism of HDAC9 overexpression can be considered:

1) MEF2D upregulation and consequent HDAC9 deregulation

HDAC9 is a direct transcriptional target of MEF2D; therefore, deregulation of MEF2D could account for the HDAC9 overexpression. In our study we found a significant direct correlation of both genes. However, this regulation could depend on the specific cell lineage and underlying genetic aberrations. Recently, overexpression of HDAC9 was reported to be the result of MEF2D fusions (Gu Z, et al 2016; Kyogo S, et al 2016). In these studies some, but not all cases, had focal gains at MEF2D, as observed by SNP arrays.

2) HDAC9 gene amplification

HDAC9 gene amplification as a mechanism of overexpression is somewhat controversial. Thus, Gil et al. found HDAC9 gene amplification in 50% of diffuse large B-cell lymphoma cases with high HDAC9 expression. However, studies in breast cancer suggested that gain in HDAC9 gene copy number is not involved in HDAC9 overexpression (Lapierre et al., 2016). Therefore, this could be modulated by specific cell type and cancer settings, and there is no reported data on leukaemia.

We have reviewed the karyotype of the most highly expressed HDAC9 cases in our series (see table). Four out of 8 cases with highest HDAC9 expression had hyperdiploidy, but no trisomies or gross abnormalities in 7p21.1 or 1q22 (where HDAC9 and MEF2D genes are located), were observed. However, methodologies with higher sensitivity should be performed to discard gene amplification as a mechanism of HDAC9 overexpression in patients with leukaemia.

Patient	Log2 HDAC9 mRNA expression	Cytogenetics
1	7,675	B-other. ZNF384 rearrangement (FISH)
2	7,959	46,XY[15]/hyperdiploid,51+[10]
3	9,942	61,XXY,der(1),+5,+6,+8,+9,+10,+14,+15+16+17+18,+19+20+21+22 [20]
4	9,899	45/46,XY,del(5)(q),del(7)(q),-5?,-7?. [18]
5	6,776	54,XX,+X,dup(1)(q21;q32)?,+4,+6,+10,+14,+17,+18,+21[20]/46,XX[7]
6	6,705	46,XX [20]
7	6,520	44, XX,-4 der (9), t(9;13)(p13;q12),-13
8	6,619	51,XY,+X,+10,+18,+21,+mar[9]/46,XY[11]

3) HDAC9 mutations

Activating mutations is one of the mechanisms leading to gene overexpression, and so HDAC9 has been reported to have several mutations along the entire coding sequence in several types of cancer (Ceccacci E & Minucci S, 2016). However, only few sites located in the catalytic domain could be functionally relevant. The incidence of HDAC9 mutation in acute leukaemia has been

scarcely studied and only three mutated cases have been reported, two in acute myeloid leukaemia patients and one in a pediatric patient with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) and Down Syndrome (COSMIC database).

In order to elucidate the underlying mechanisms that induce HDAC9 overexpression, we studied the mutational status of HDAC9 in the hot-spot regions located in the histone deacetylase catalytic domain (exons 13, 19 and 20). We selected those patients with highest levels of HDAC9 (i.e. those patients with HDAC9 expression above the cut-off 3.62, with a statistically significant worse outcome) and found no mutations; only one patient showed a polymorphism in exon 19, consisting of a synonymous variant previously described: rs370099772; c.2472A>T; p.Gly783=.

The information about the study of the mutations status of HDAC9 has been added to the revised version of manuscript in the Supplementary Methods, lines 58-62 and in discussion (lines 453-455).

#### 4) Epigenetic regulation

Epigenetic regulation has been suggested as a mechanism of overexpression in a single study in breast cancer; the authors reported that HDAC9 overexpression was associated with increased epigenetic marks on the HDAC9 promoter (Lapierre et al., 2016).

In summary, the mechanisms underlying the overexpression of HDAC9 are not fully understood and more in-depth mechanistic insights are required to understand the altered function of HDAC9 in cancer cells. Following the reviewer's suggestions, we have discarded mutations in hot-spot regions as a mechanism of HDAC9 overexpression; more complex mechanistic studies are far beyond the scope of our work.

Moreover, consequences of HDAC9 overexpression and the global role of HDAC9 in leukaemogenesis are not fully elucidated.

*1.2 It would be nice if authors could show comprehensive signature of expression with/without HDAC9 expression.*

In complete agreement with the reviewer we think that a comprehensive signature of HDAC9 expression both *in vitro* or *in vivo* models would be helpful to confirm our results. However, these kind of experimental approaches are beyond the scope of this paper.

*#2.1 Authors showed expression of some genes were associated with better/poor outcome, but authors assayed many genes, and authors should adjust for multiple comparisons, as most of p-values is around 0.05.*

We thank the reviewer for the opportunity to clarify this point, as this adjust for multiples comparisons was already made in our article, but was not clearly stated.

*We have clarified this point in the Supporting information (Line 76-77): "When performing multiple comparisons, the Holm-Bonferroni method was used to adjust p-values (Holm, 1979)"*

*2.2 Furthermore, authors performed multivariate analysis, but detailed information for the analysis is missing. Please describe which factors were included into the multivariate analysis.*

Regarding multivariate analysis, all univariate analysis included the main clinical and biological prognostic factors, such as age, leucocytes, CNS, MLL-rearrangement, MRD post-induction and

the different cut-off for HDAC expression levels. In the multivariate analysis we included those factors statistically significant in the univariate analysis.

For OS in B-ALL we did not find any significant factor in the univariate analyses so we did not perform the multivariate. For the EFS we included age, WBC count, MLL-rearrangement, HDAC2  $\geq 3.29$  and HDAC9  $\geq 3.62$ , in the multivariate analysis remain statistical significant HDAC2 and HDAC9 ( $p=0.0034$  and  $p=0.0023$ , respectively).

*Add to Manuscript: Line 87-90 (Supporting information): "In the univariate analysis we included the main clinical and biological prognostic factors, such as age, leucocytes, CNS, MLL-rearrangement, MRD post-induction and the different cut-off for HDAC expression levels. Those factors statistically significant in the univariate analysis were included in the multivariate."*

Here we showed the results for the univariate and multivariate analysis:

### B-ALL UNIVARIATE OS

	HR	95% CI	p-value	Global p-value
sex=1	1.156	0.192 6.958	0.87	-
age	1.136	0.948 1.360	0.17	-
age=[1, 10)	0.155	0.014 1.714	0.13	0.19
age=[10, 18)	0.734	0.065 8.255	0.80	
age=[1, 18)	0.254	0.028 2.283	0.22	-
WBC	1.002	0.997 1.008	0.43	-
WBC $\geq 20$	0.373	0.042 3.342	0.38	-
WBC $\geq 50$	1.091	0.122 9.782	0.94	-
WBC $\geq 100$	2.053	0.229 18.434	0.52	-
WBC $\geq 200$	6.228	0.686 56.523	0.10	-
CNS=2/3	2.092	0.228 19.225	0.51	-
MLL=1	2.322	0.258 20.868	0.45	-
MRDFI001=1	0.764	0.085 6.885	0.81	-

### B-ALL UNIVARIATE EFS

	HR	95% CI	p-value	Global p-value
sex=1	1.659	0.567 4.857	0.36	-
age	1.091	0.970 1.226	0.15	-
age=[1, 10)	0.124	0.026 0.591	0.0088	0.054
age=[10, 18)	0.312	0.056 1.721	0.18	
age=[1, 18)	0.155	0.034 0.702	0.016	-
WBC	1.007	1.003 1.011	<0.001	-
WBC $\geq 20$	2.195	0.795 6.058	0.13	-
WBC $\geq 50$	1.523	0.429 5.406	0.51	-



WBC≥100	2.218	0.497	9.894	0.30	-
WBC≥200	9.349	2.039	42.878	0.0040	-
CNS=2/3	2.168	0.606	7.753	0.23	-
MLL=1	6.887	2.149	22.070	0.0012	-
MRDFI001=1	0.963	0.268	3.459	0.95	-
HDAC2≥3.29	0.185	0.051	0.664	0.0097	-
HDAC9≥3.62	21.377	2.736	167.052	0.0035	-

### B-ALL MULTIVARIATE EFS

	HR	95% CI	p-value
age=[1, 18)	0.082	0.003 2.344	0.14
WBC	1.002	0.994 1.010	0.62
MLL=1	1.963	0.411 9.368	0.40
HDAC2 ≥3.29	0.123	0.030 0.499	0.0034
HDAC9 ≥3.62	42.479	3.807 473.971	0.0023

For T-ALL, both OS and EFS, we did not perform any multivariate analysis because any factor was significant in the univariate analyses.

### T-ALL UNIVARIATE OS

	HR	95% CI	p-value
age	1.030	0.824 1.288	0.79
age=[10, 18)	0.866	0.144 5.199	0.88
WBC	1.000	0.995 1.005	0.96
WBC≥20	1.674	0.187 14.983	0.64
WBC≥50	0.847	0.141 5.080	0.86
WBC≥100	2.050	0.341 12.339	0.43
WBC≥200	1.072	0.120 9.604	0.95
CNS=2/3	0.652	0.073 5.852	0.70
MRDFI001=1	3.902	0.425 35.793	0.23

### T-ALL UNIVARIATE EFS

	HR	95% CI	p-value
age	0.905	0.704 1.163	0.43
age=[10, 18)	0.318	0.035 2.851	0.31
WBC	1.003	0.999 1.006	0.12
WBC≥50	2.135	0.355 12.825	0.41
WBC≥100	5.414	0.895 32.745	0.066
WBC≥200	3.414	0.569 20.479	0.18
CNS=2/3	0.542	0.061 4.852	0.58

	HR	95% CI	p-value
MRDFI001=1	3.858	0.421 35.363	0.23

For AML and OS we included HDAC5 $\geq$ 2.43 and HDAC9 $\geq$ 5.11.

### AML UNIVARIATE OS

	HR	95% CI	p-value	Global p-value
sex=1	0.744	0.270 2.055	0.57	-
age	0.990	0.900 1.089	0.84	-
age=[1, 10)	0.375	0.108 1.300	0.12	0.33
age=[10, 18)	0.568	0.141 2.288	0.43	
age=[1, 18)	0.429	0.135 1.365	0.15	-
WBC	0.991	0.978 1.005	0.21	-
WBC $\geq$ 20	0.740	0.235 2.335	0.61	-
WBC $\geq$ 50	0.194	0.025 1.475	0.11	-
CNS=2	1.394	0.374 5.199	0.62	0.76
CNS=3	1.579	0.425 5.871	0.50	
MLL=1	0.745	0.210 2.649	0.65	-
MRDFI001=1	2.788	0.897 8.666	0.076	-
HDAC1 $\geq$ 2.96	2.757	0.775 9.803	0.12	-
HDAC5 $\geq$ 2.43	10.665	1.234 92.145	0.031	-
HDAC8 $\geq$ 2.34	2.371	0.851 6.610	0.10	-
HDAC9 $\geq$ 5.11	3.702	1.271 10.780	0.016	-

### AML MULTIVARIATE OS

	HR	95% CI	p-value
HDAC5 $\geq$ 2.43	10.923	1.155 103.287	0.034
HDAC9 $\geq$ 5.11	3.466	0.733 16.377	0.12

For EFS multivariate analyses we included MRD post-induction and HDAC8.

### AML UNIVARIATE EFS

	HR	95% CI	p-value	Global p-value
sex=1	0.487	0.196 1.210	0.12	
Age	0.981	0.901 1.067	0.65	
age dx2[1, 10)	0.488	0.163 1.461	0.20	0.46
age.dx2[10, 18)	0.645	0.186 2.236	0.49	
age=[1, 18)	0.534	0.192 1.488	0.23	
WBC	0.989	0.974 1.003	0.12	
WBC $\geq$ 20	0.487	0.162 1.470	0.20	
leucos $\geq$ 50	0.140	0.019 1.054	0.06	

	HR	95% CI		p-value	Global p-value
SNC2	1.330	0.376	4.709	0.66	0.91
SNC3	1.011	0.287	3.560	0.99	
MLL=1	0.428	0.124	1.469	0.18	
MRDFI001=1	3.258	1.215	8.738	0.019	
HDAC1≥-2.96	3.152	0.909	10.923	0.070	
HDAC5≥2.43	4.277	0.902	20.278	0.067	
HDAC8≥1.52	3.044	1.078	8.589	0.035	
HDAC9≥5.11	2.350	0.879	6.284	0.089	

### AML MULTIVARIATE EFS

	HR	95% CI		p-value
MRDFI001=1	2.514	0.867	7.289	0.090
HDAC8 ≥1.52	2.841	0.755	10.699	0.12

*#3. In abstract and Introduction, authors mentioned that the study aimed to provide evidences helping to choose more specific HDACi in a personalized medicine. Is there any data regarding correlation between expression of HDACs and effect of HDACi? Please show/discuss it.*

Regarding correlation between expression of HDAC and and the effect of HDACi, there are different studies reporting different HDACi effect according to HDAC9 expression levels.

Kyogo S, et al 2016 showed the inhibitory activities of two HDACi vorinostat and quisinostat, in cells with MEF2D-BCL9 fusion cultured at therapeutic concentration. They also demonstrated sensitive to HDACi treatment in those patients with MEF2D-BCL9.

Gu Z, et al.2016 demonstrated sensitivity to HDAC inhibitor panobinostat in leukemia cells with MEF2D-BCL9, characterized by overexpression of HDAC9, but little sensitivity to BCL9 inhibitors. This data suggest HDAC inhibition as a potential therapeutic option in this high-risk form of leukaemia.

Moreover, in breast cancer HDAC9 expression controls the sensitivity of breast cancer cells to HDAC inhibitors (Lapierre et al., 2016).

*#4. In T-ALL, an impact of HDAC4 did not reach statistical significance, but authors discuss as if it had significant impact.*

Authors, as reviewer 2 suggested, considered not discuss the results obtained for HDAC4 because it was a trend, not statistically significant. This was probably due to the lower cases included because prednisone was only given in the last protocol. However, considering that in other publications the results were significant and our trend made clinically sense, authors mentioned the results in the discussion, highlighting its clinical and therapeutic impact due to the possibility that this HDAC offers as a targetable drug, especially in a high risk subgroup (prednisone-poor responders).

## **FLT3 is implicated in cytarabine transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 in pediatric acute leukemia**

Albert Català, Marçal Pastor-Anglada, Liska Caviedes-Cárdenas, Roberta Malatesta, Susana Rives, Nerea Vega-García, Mireia Camós, Paula Fernández-Calotti

---

FLT3 abnormalities are negative prognostic markers in acute leukemia. Infant leukemias are a subgroup with frequent MLL (KMT2A) rearrangements, FLT3 overexpression and high sensitivity to cytarabine, but dismal prognosis. Cytarabine is transported into cells by Human Equilibrative Nucleoside Transporter-1 (hENT1, SLC29A1), but the mechanisms that regulate hENT1 in acute leukemia have been scarcely studied. We explored the expression and functional link between FLT3 and main cytarabine transporters in 50 pediatric patients diagnosed with acute lymphoblastic leukemia and MLL rearrangement (ALL-MLL+) and other subtypes of leukemia, and in leukemia cell lines. A significant positive correlation was found between FLT3 and hENT1 expression in patients. Cytarabine uptake into cells was mediated mainly by hENT1, hENT2 and hCNT1. hENT1-mediated uptake of cytarabine was transiently abolished by the FLT3 inhibitor PKC412, and this effect was associated with decreased *hENT1* mRNA and protein levels. Noticeably, the cytotoxicity of cytarabine was lower when cells were first exposed to FLT3 inhibitors (PKC412 or AC220), probably due to decreased hENT1 activity, but we observed a higher cytotoxic effect if FLT3 inhibitors were administered after cytarabine. FLT3 regulates hENT1 activity and thereby affects cytarabine cytotoxicity. The sequence of administration of cytarabine and FLT3 inhibitors is important to maintain their efficacy.



## FLT3 is implicated in cytarabine transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 in pediatric acute leukemia

Albert Català<sup>1,2,6</sup>, Marçal Pastor-Anglada<sup>3,4,6</sup>, Liska Caviedes-Cárdenas<sup>3</sup>, Roberta Malatesta<sup>5</sup>, Susana Rives<sup>1,2,6</sup>, Nerea Vega-García<sup>5</sup>, Mireia Camós<sup>2,5,6\*</sup>, Paula Fernández-Calotti<sup>3,4,6\*</sup>

<sup>1</sup>Pediatric Hematology and Oncology Department, Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>National Biomedical Research Institute on Rare Diseases (CIBER ER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Institute of Biomedicine (IBUB), Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Oncology Program, National Biomedical Research Institute of Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBER EHD), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>5</sup>Hematology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>6</sup>Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu (IRP-HSJD), Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain

\* Co-senior authors

**Correspondence to:** Albert Català, **email:** acatala@hsjdbcn.org  
Marçal Pastor-Anglada, **email:** mpastor@ub.edu

**Keywords:** *FLT3, Cytarabine, hENT1, nucleoside transporters, pediatric acute leukemia*

**Received:** November 04, 2015

**Accepted:** June 26, 2016

**Published:** July 06, 2016

### ABSTRACT

**FLT3 abnormalities are negative prognostic markers in acute leukemia. Infant leukemias are a subgroup with frequent *MLL (KMT2A)* rearrangements, *FLT3* overexpression and high sensitivity to cytarabine, but dismal prognosis. Cytarabine is transported into cells by Human Equilibrative Nucleoside Transporter-1 (*hENT1*, *SLC29A1*), but the mechanisms that regulate *hENT1* in acute leukemia have been scarcely studied.**

**We explored the expression and functional link between *FLT3* and main cytarabine transporters in 50 pediatric patients diagnosed with acute lymphoblastic leukemia and *MLL* rearrangement (*ALL-MLL+*) and other subtypes of leukemia, and in leukemia cell lines.**

**A significant positive correlation was found between *FLT3* and *hENT1* expression in patients. Cytarabine uptake into cells was mediated mainly by *hENT1*, *hENT2* and *hCNT1*. *hENT1*-mediated uptake of cytarabine was transiently abolished by the *FLT3* inhibitor *PKC412*, and this effect was associated with decreased *hENT1* mRNA and protein levels. Noticeably, the cytotoxicity of cytarabine was lower when cells were first exposed to *FLT3* inhibitors (*PKC412* or *AC220*), probably due to decreased *hENT1* activity, but we observed a higher cytotoxic effect if *FLT3* inhibitors were administered after cytarabine.**

***FLT3* regulates *hENT1* activity and thereby affects cytarabine cytotoxicity. The sequence of administration of cytarabine and *FLT3* inhibitors is important to maintain their efficacy.**

### INTRODUCTION

Acute leukemia is the most frequent cancer in children. Although a remarkable improvement in survival of children with acute leukemia has been achieved, some

patients still have a poor outcome. For these high-risk patients it is still necessary to find new biomarkers that may guide therapy or serve themselves as a target for new therapies. Among high-risk cases, infant leukemias (those diagnosed at age < 1 year) are a special subgroup

with distinctive clinical and biological features, including frequent *MLL* (*Mixed Lineage Leukemia*, also known as *KMT2A*) rearrangements, high *FLT3* (*FMS-like tyrosine kinase 3*) expression and high sensitivity to the nucleoside analogue cytarabine (Ara-C), but a dismal prognosis [1–6].

*FLT3* is a tyrosine-kinase receptor with a key role in hematopoiesis. *FLT3* mutations and overexpression have emerged as negative prognostic biomarkers in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloblastic leukemia (AML) [3, 7–10]. *FLT3* is expressed in the majority of ALL and AML cases, but the highest levels have been observed in ALL with *MLL* gene rearrangements (ALL-*MLL*+) and hyperdiploid ALL (51–67 chromosomes, HeH) [6, 10]. *FLT3* overexpression correlates with unfavorable prognosis in adult AML cases as well as in infant leukemias [8]. The overexpression of *FLT3*, even in the absence of activating mutations, causes phosphorylation of the receptor, resulting in a constitutively active form of *FLT3* in a ligand-independent manner [3, 5, 8, 9, 11]. Internal tandem duplication of the *FLT3* gene (*FLT3*-ITD) constitutively activates the receptor and confers a negative prognostic impact in both adult and pediatric AML cases, especially when a high mutant to wild-type allelic ratio is observed [3, 8, 12, 13].

Ara-C is a nucleoside analog that requires membrane transport proteins of the human nucleoside transporters (hNT) gene families *SLC28* and *SLC29* to be internalized into target cells. *SLC28* encode human Concentrative Nucleoside Transporters (hCNT) whereas *SLC29* encode human Equilibrative Nucleoside Transporter (hENT) proteins. Despite important advances in the knowledge of the tissue distribution and pharmacology of hNT proteins, there is still a limited understanding of the mechanisms that regulate their expression and activity [14]. Ara-C is known to be transported across the cell membrane mainly by Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (hENT1, *SLC29A1*) [14, 15]. Once inside the cell, Ara-C undergoes metabolic activation, and the first and rate-limiting step in this process is its phosphorylation by deoxycytidine kinase (*DCK*), necessary to finally exert its cytotoxic action [16].

Uptake into cells is a key step in the bioavailability and pharmacological action of nucleoside analogues [16] and, accordingly, several studies have established a correlation between high *hENT1* expression levels, drug sensitivity and outcome [14]. In this regard, elevated *hENT1* expression has been reported to facilitate the high Ara-C sensitivity of infant ALL-*MLL*+, and a strong correlation between *hENT1* levels and Ara-C sensitivity has been reported in those cases, as well as in adult AML patients [17–19]. On the contrary, low *hENT1* expression levels have been related to Ara-C resistance in childhood AML. Overall, these data are in line with the evidence that *in vitro* Ara-C sensitivity in childhood and adult AML is dependent upon *hENT1* [19].

In this setting, given that ALL-*MLL*+ cases present both high levels of *FLT3* and high sensitivity to Ara-C, we

hypothesized that *FLT3* is a suitable candidate to modulate hNT expression and activity, thereby contributing to cell chemosensitivity. To address this issue, we analyzed the relationship between *FLT3* expression levels and mutations and the expression and activity of different hNT and Ara-C metabolizing enzymes in different cell lines and in a series of ALL and AML pediatric patients.

## RESULTS

### ***FLT3* is highly expressed in pediatric ALL-*MLL*+ patients**

*FLT3* mRNA expression was quantified by RQ-PCR in 50 patients and 3 cell lines (MV4-11, SEM, K562) and normalized against mRNA from commercial bone marrow CD34+ cells. The expression of *FLT3* was heterogeneous, with a median (arbitrary units) of 4.35 (0.09–4470). Among the different cytogenetic subgroups, the highest *FLT3* levels were observed in ALL-*MLL*+ patients; none of them had *FLT3*-ITD (data not shown). We found no significant differences between *FLT3* levels and gender, CNS status or white blood cell count.

### **Positive correlation between hENT1 and *FLT3* mRNA expression in pediatric leukemia samples**

The mRNA amounts of the main nucleoside transporters (NT) and intracellular metabolizing enzymes (ME), *hENT1*, *hENT2* (*SLC29A2*), *hCNT1* (*SLC28A1*), *hCNT2* (*SLC28A2*), *hCNT3* (*SLC28A3*), *DCK* and *cN-II* (*NT5C2*), were measured in 50 pediatric leukemia cases by RQ-PCR. When correlating *FLT3* mRNA levels with all these genes, noticeably, despite the high interpatient variability, a positive correlation was found between *FLT3* and *hENT1* mRNA levels (Figure 1). Based upon these observations we could hypothesize that samples with high *FLT3* mRNA levels would show high Ara-C uptake and probably, a better response to therapy. On the other hand, no significant differences were found between *hENT1*, *hENT2*, *hCNT1*, *hCNT2*, and *hCNT3*, *DCK* and *cN-II* mRNA expression levels and age, gender, CNS status and WBC count. Nevertheless, a positive correlation between *FLT3* and *DCK* was also observed (Supplementary Figure S1).

Although our study was not designed to analyze NT or ME expression patterns in acute leukemia molecular subgroups, we also found significantly higher *hENT1* levels in AML-*MLL*+ and lower *DCK* and *cN-II* levels in AML cases and T-ALL samples.

### **Characterization of the mRNA expression and associated biological function of nucleoside transporters in leukemic cell lines**

As nucleoside transporter expression in pediatric leukemic cells is not well known we analyzed the mRNA

expression levels of the most relevant NT that could potentially be implicated in Ara-C uptake, *hENT1*, *hENT2*, *hCNT1* and *hCNT3*, in MV4-11, SEM and K562 leukemic cell lines. The former two cell lines originated from childhood leukemia. We observed that *hENT1*, *hENT2* and *hCNT1* expression is retained in the three cell lines, whereas barely detectable *hCNT3* mRNA was found in SEM and K562 cell lines (Supplementary Table S1).

Knowing that all cell lines expressed almost all NT mRNAs, we then aimed at determining the transportability profiles for each cell line. For this purpose, we performed radiolabeled cytidine uptake measurements. We chose cytidine because it is a pyrimidine that it is known to be a good substrate for hENTs, hCNT1 and hCNT3, all the putative Ara-C transporters. All cell lines showed hENT1-related function (Figure 2A) which was found to be the predominant nucleoside transporter activity in the three cell lines. We also detected, albeit to a lesser extent, hENT2 and hCNT1-related activities in all of them. MV4-11 also retained some hCNT3-related function, being this activity undetectable in K562 and SEM cells.

### Nucleoside transporters implicated in Ara-C uptake

Direct transport of Ara-C by each of the previously identified NTs was determined. Given that the only cell line that retained all the NT-related activities was MV4-11, we decided to focus on this cell line to study Ara-C transport. We observed that Ara-C was translocated inside cells by hENT1, hENT2 and hCNT1 (Figure 2B).

### FLT3 effect on hENT1 expression and activity

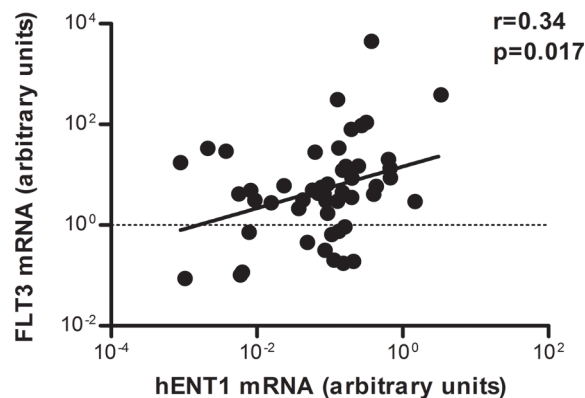
As we previously detected a positive correlation between *FLT3* and *hENT1* expression in the cohort of primary samples from pediatric patients we decided to evaluate the role FLT3 plays in modulating hENT1 expression. For this purpose we initially analyzed the effects of the FLT3 inhibitor, PKC412, on MV4-11

and SEM cell lines. All NTs and ME mRNA levels were determined in MV4-11 and SEM cells either in the presence or in the absence of PKC412 used at a concentration based upon previous literature [20]. Acute treatment with PKC412 resulted in a significant down-regulation of *hENT1*-related mRNA levels at the first studied time-point (8 h) without any further change at 24 h after treatment (Figure 3A). No changes in *hENT2*-related mRNA levels were found under the same conditions (Figure 3B). The down-regulation of the hENT1-related mRNA levels resulted in decreased hENT1 protein amounts (Figure 3C). Overall these data suggest that down-regulation of hENT1 is somehow specific and occurs immediately after PKC412 treatment no matter whether activated FLT3 is the result of its overexpression (SEM cells) or the consequence of mutations resulting in the constitutive activation of this kinase (MV4-11). Under the experimental conditions described above, it was also demonstrated that PKC412 inhibited FLT3 phosphorylation, without affecting total FLT3 expression (Figure 3D) proving that the inhibitor was acting as expected. To further assess the involvement of FLT3 in hENT1 regulation, another FLT3 inhibitor likely to be more specific than PKC412, AC220, was also used. AC220 could also inhibit FLT3 phosphorylation, thereby inducing a significant down-regulation of hENT1 protein expression (Supplementary Figure S2).

The functional impact of hENT1 down-regulation following FLT3 inhibition was demonstrated by monitoring hENT1-mediated cytidine uptake in MV4-11 cells. hENT1 function was significantly decreased reaching its maximum inhibition at 16 h incubation with PKC412 inhibitor (Supplementary Figure S3).

### Effect of FLT3 inhibition on Ara-C uptake and cytotoxicity

Considering that FLT3 inhibition induced the down-regulation of *hENT1* mRNA expression and related activity, without significantly affecting other NTs, we



**Figure 1: Correlation between *hENT1* and *FLT3* mRNA expression in pediatric leukemia samples.** Relative *hENT1* mRNA levels of cells from 50 pediatric patients with acute leukemia were plotted against the levels of *FLT3* mRNA in the same samples. Correlation coefficient is shown in the figure.



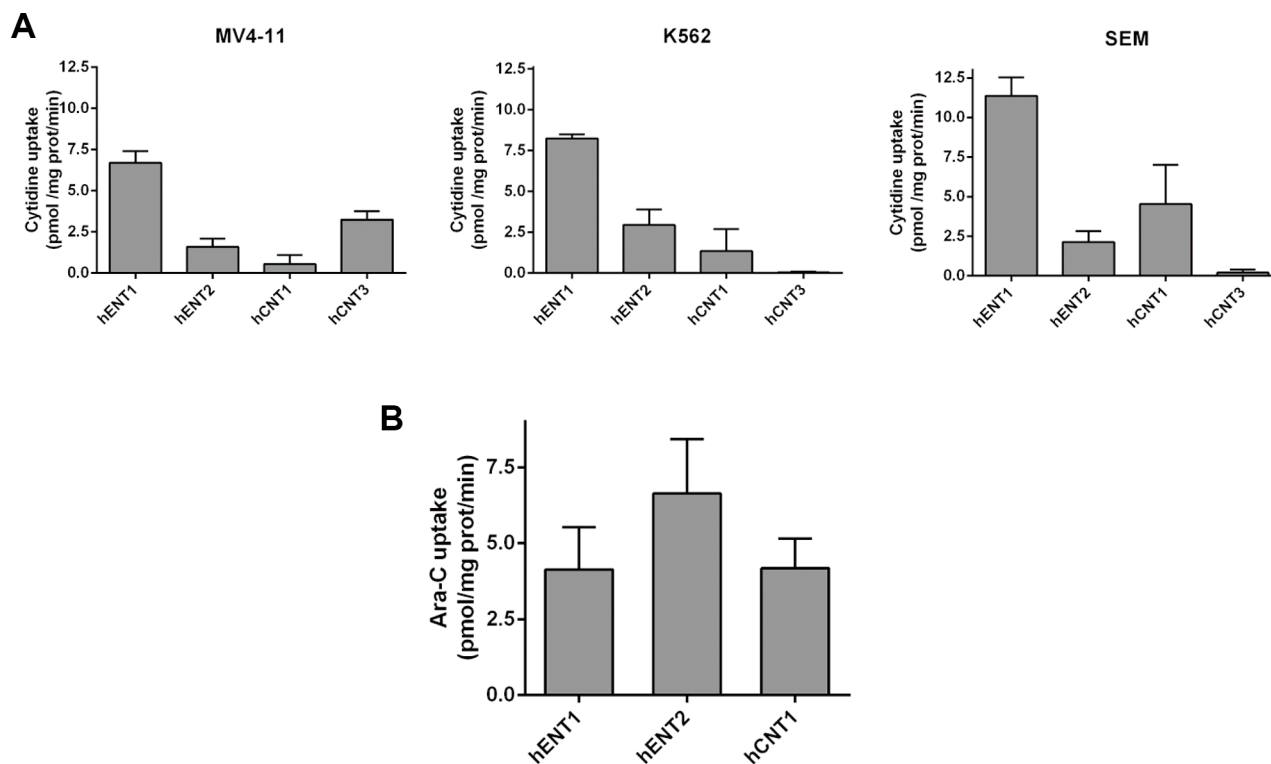
then aimed at determining the effect of FLT3 inhibition on Ara-C transport. For this purpose, we cultured MV4-11 cells with PKC412 for 16 h and evaluated direct Ara-C uptake mediated by the previously demonstrated entities that were responsible for the transport of the drug, hENT1, hENT2 and hCNT1. Under conditions of maximal FLT3 inhibition, hENT1-mediated Ara-C uptake was dramatically decreased (Figure 4), without significantly affecting hENT2 and hCNT1 related activities. However, the residual hENT1 activity was still significant, representing nearly a 25% of that of untreated cells. In any case, no compensatory up-regulation associated with the other Ara-C transporters was observed.

To address the question of whether Ara-C cytotoxicity could be affected by hENT1 down-regulation under FLT3 inhibition conditions, cytotoxicity assays were performed. Ara-C was used at  $IC_{50}$  concentrations in SEM and MV4-11 cells (not shown). Under conditions of hENT1 activity inhibition (using 1  $\mu$ M NBTI) Ara-C induced cytotoxicity was significantly blocked, whereas addition of phloridzin (an hCNT inhibitor) did not significantly alter Ara-C action (Figure 5A). Thus, in basal conditions (no PKC412 present), Ara-C induced cytotoxicity was mostly related to hENT1 function. When MV4-11 cells were treated with the FLT3 inhibitor PKC412 for 16 h, followed by a 6 h exposure to Ara-C, impact on cell survival was not significantly greater than when treating the cells with PKC412 alone (Figure 5B);

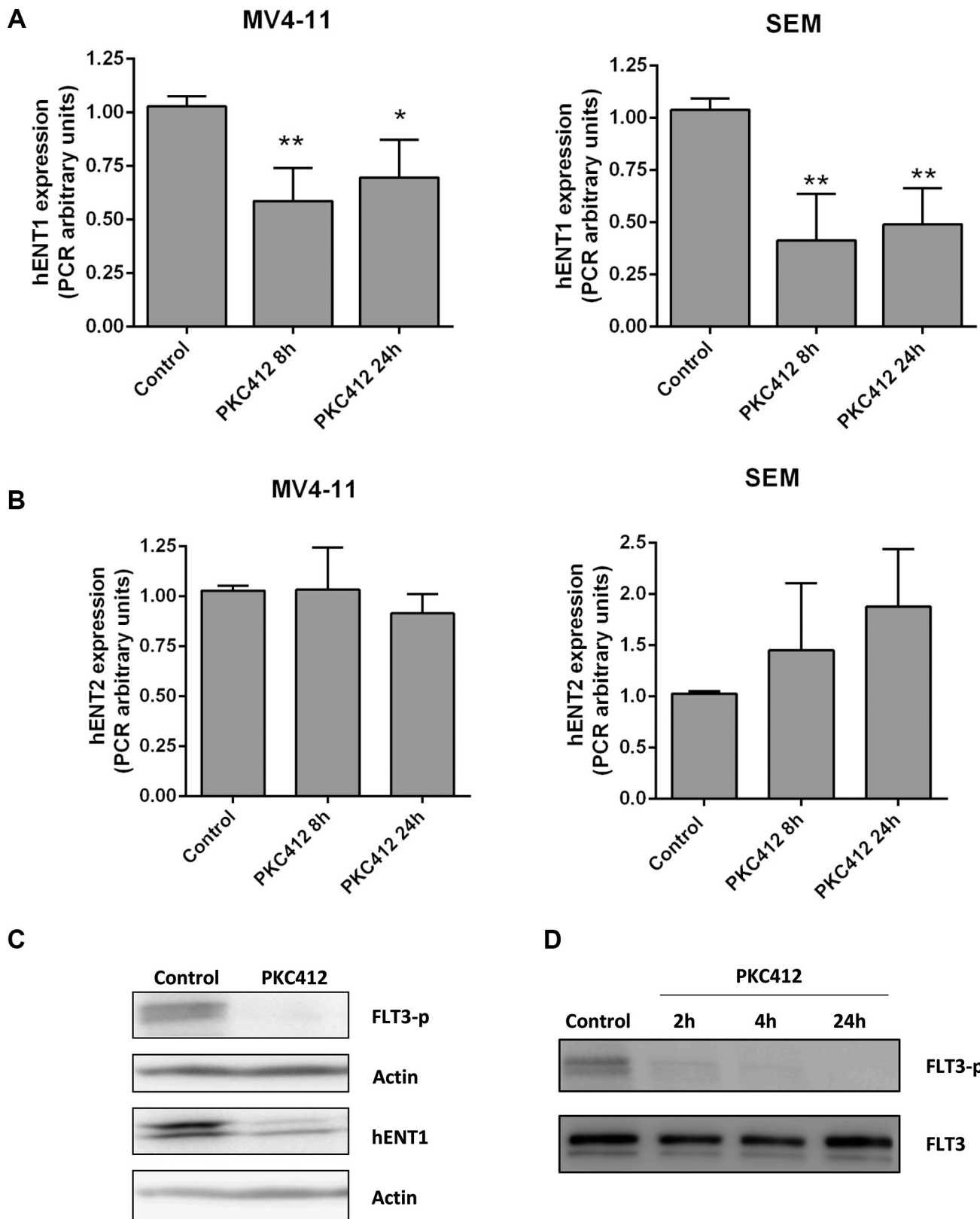
however, if the exposure to the drugs was the opposite (6 h Ara-C treatment, followed by a 16 h exposure to PKC412), this combined treatment resulted in a significantly greater cell death than when treating the cells with PKC412 alone (Figure 5C). Thus, a lower cytotoxicity was observed if PKC412 was given previous to Ara-C exposure, probably due to a reduction in hENT1 activity. In contrast, once Ara-C had been administered, the subsequent addition of PKC412 resulted in greater cytotoxicity. In the former experimental design, the calculation of the coefficient of drug interaction (CDI) revealed the occurrence of drug antagonism (CDI: 1.20), whereas in the latter design, the effect of both drugs turned out to be additive (CDI: 1.05). Interestingly, when these experiments were performed using the FLT3 inhibitor AC220, similar results were obtained (Supplementary Figure S4), thereby reinforcing the key role of FLT3 in hENT1 modulation and cytarabine-associated cytotoxicity.

## DISCUSSION

*FLT3* mutations have emerged in the last years as key prognostic biomarkers in AML. *FLT3*-ITD mutation is a recognized adverse prognostic factor for outcome in adult and pediatric AML patients [2, 3, 5, 7, 8, 21–23]. Accordingly, patients harboring *FLT3*-ITD mutations are considered as high-risk patients, and benefit from hematopoietic stem cell transplant (HSCT)



**Figure 2: Characterization of nucleoside transporter activity implicated in Ara-C uptake.** (A)  $[^3H]$ -cytidine uptake (1  $\mu$ M, 1 min) by MV4-11, K562 and SEM cells and (B)  $[^3H]$ -Ara-C transport (1  $\mu$ M, 1min) in MV4-11 cell line were assayed. Cross-inhibitions were performed by adding to the transport medium cold guanosine (100  $\mu$ M) and inhibition of hENT1 was achieved adding NBTI (1  $\mu$ M) to the transport medium. Data are expressed as means  $\pm$  SEM of triplicate measurements from three independent cultures.



**Figure 3: Involvement of FLT3 in *hENT1* expression.** mRNA expression of (A) *hENT1* and (B) *hENT2* were assayed by quantitative RQ-PCR in MV4-11 and SEM cells treated for 8 or 24 h with FLT3 inhibitor PKC412 (0.045  $\mu$ M). Results are based on duplicate measurements from three independent experiments. Western blot for *hENT1* (C), FLT3 and phospho-FLT3 (Tyr591) (D) were performed in cell extracts from MV4-11 cells incubated in the presence of PKC412 (0.045  $\mu$ M) for different periods of time. A representative Western blot of three independent experiments is shown in each panel. Statistical significance denotes significant difference relative to control cells (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

in first complete remission (CR1) [2, 21, 24]. *FLT3* overexpression is associated with *FLT3* phosphorylation, thereby resulting in constitutive activation of the receptor, similarly to *FLT3* mutants [3, 5, 8, 12]. Some authors have correlated *FLT3* overexpression, in absence of *FLT3* mutation, with poor outcome in both ALL and AML [4, 5, 8]. Beyond these clinical observations, little is known about the exact biological mechanism that confers high risk in such patients. Armstrong and co-authors [25] revealed that *FLT3* gene overexpression is the most distinctive feature of *MLL* rearranged acute leukemia. Moreover, a significantly higher *FLT3* expression level was observed in infant ALL-*MLL*<sup>+</sup> patients. Interestingly, infant patients are highly sensitive to Ara-C, but show *in vitro* resistance to prednisone and asparaginase [1]. All these data have been taken into account to design the chemotherapeutic schemes in the International Cooperative Treatment Protocol for Infants with ALL, INTERFANT (99 & 06) [26].

Ara-C is mainly, but not exclusively, transported by hENT1, being this plasma membrane transporter a major contributor to Ara-C bioavailability and, likely, action. In fact, high *hENT1*-related mRNA levels have been reported in ALL-*MLL*<sup>+</sup> patients, and this evidence may explain, at least partially, their Ara-C sensitivity [17]. The same group demonstrated that *MLL* rearrangements were not directly involved in Ara-C sensitivity in infant ALL and childhood AML-*MLL*<sup>+</sup> [30], pointing out that other mechanisms are involved in Ara-C sensitivity in these patients.

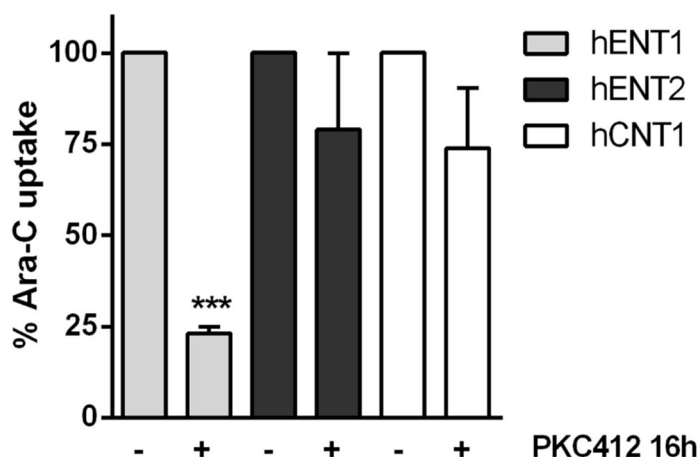
In our study, the analysis of a cohort of 50 pediatric leukemia patients revealed a positive correlation between the expression (mRNA levels) of *FLT3* and *hENT1*. These results would be consistent with previous observations showing that subgroups of patients with high sensitivity to cytarabine frequently overexpress *FLT3* [3, 10, 27]. Our results showing high *hENT1* and *FLT3* expression and

a positive correlation between both parameters suggest that *FLT3* might play a relevant role on Ara-C sensitivity, likely to involve hENT1 up-regulation.

We could not find any significant association between *FLT3* expression levels and other clinical or biological features, although this analysis was far out of the scope of our study. Moreover, a bias related to the selection of determined molecular subtypes in our cohort of patients was also introduced during the design of our study.

mRNA levels of other putative Ara-C transporters (*hENT2*, *hCNT1*, *hCNT3*) and those of the intracellular metabolizing enzymes *DCK* and *cN-II* were also determined in the same cohort of patients, although no correlations among NT and ME and clinical and biological parameters were observed. Previous studies have suggested a correlation between specific NT expression profiles and outcome in solid tumors and hematological malignancies [15, 19, 28, 29], being this issue recently reviewed by ourselves [14]. However, the limited number of patients within the present cohort did not allow us to establish prognostic correlations.

We also found a positive correlation between *FLT3* and *DCK* expression (Supplementary Figure S1), the kinase involved in the first phosphorylation step of nucleoside analogs once they have entered the cells via NTs. Low levels of *DCK* tend to correlate with Ara-C resistance in childhood ALL and AML and adult AML [18, 30, 31]. Our observations suggest that *DCK* would not be a limiting step in Ara-CTP formation in patients with high *FLT3* expression and thus, would support intracellular activation (i.e. phosphorylation) of Ara-C. These results would be in agreement with other studies [19] showing an *in vitro* correlation between hENT1 and *DCK* expression and nucleoside analogs sensitivity in pediatric and adult AML [18]. Recently, a collaborative EORTC-GIMEMA trial has demonstrated a better response rate and survival with high



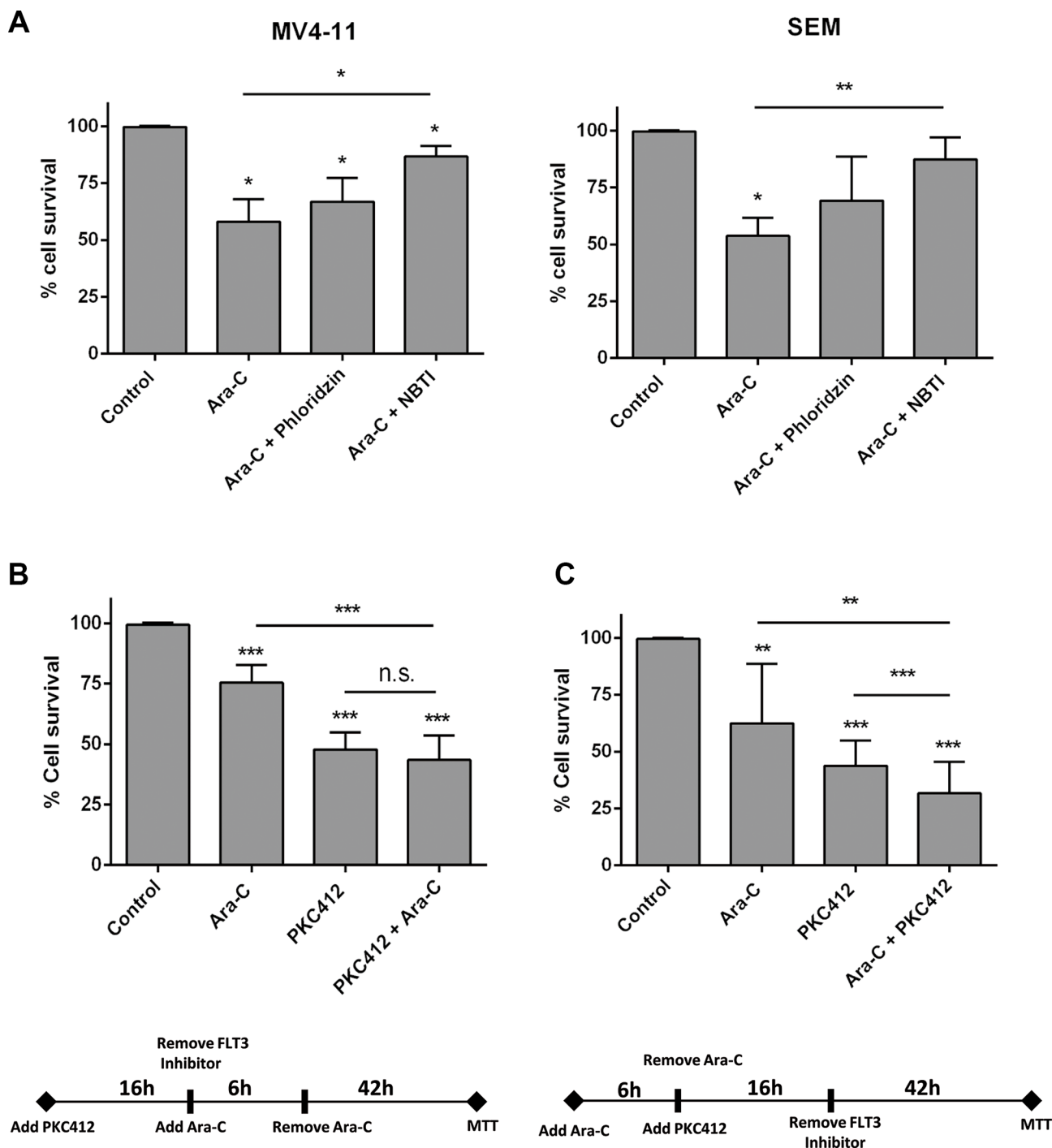
**Figure 4: Effect of *FLT3* inhibition in the uptake of Ara-C.** Direct uptake of [<sup>3</sup>H]Ara-C (1 μM, 1 min) was measured in MV4-11 cells in the presence of PKC412 for 16 h either in medium containing NaCl or choline chloride. Sodium-dependent transport was calculated as uptake in NaCl medium minus uptake in choline chloride medium. Data are normalized to uptake measured in the absence of PKC412 and expressed as percentage ± SEM from 3 independent experiments, each conducted in quadruplicate. Statistical significance denotes significant difference relative to control cells (\*\**p* < 0.001).

dose Ara-C in very high risk setting patients, including AML FLT3-ITD cases [22], that presumably would show high hENT1 expression according to our results.

Nucleoside analogues are the mainstay treatment in AML and are broadly used in relapsed-refractory ALL salvage schedules with diverse success rate [32–36].

As we here demonstrate a significant correlation between FLT3 and Ara-C transporter hENT1, we propose that FLT3 expression could be used as a nucleoside analogue sensitivity surrogate.

Not surprisingly, several FLT3 inhibitors have been developed in the last few years, and some of



**Figure 5: Effect of FLT3 inhibition in the cytotoxicity induced by Ara-C.** Cell viability was determined by MTT assays when (A) MV4-11 and SEM cells were cultured with Ara-C (3  $\mu$ M and 1  $\mu$ M for MV4-11 and SEM cells respectively) either in the presence or not of NBTI (1  $\mu$ M) or phloridzin (250  $\mu$ M) for 48 h; (B) MV4-11 cells were treated with the FLT3 inhibitor PCK412 (16 h), followed by a 6 h exposure to Ara-C (10  $\mu$ M), and (C) MV4-11 cells were cultured with Ara-C (10  $\mu$ M) for 6 h, followed by a 16 h exposure to PKC412. Data are expressed as percentage of survival  $\pm$  SEM of triplicate measurements from six-nine independent experiments. Statistical significance denotes significant difference relative to control cells (\* $p$  < 0.1; \*\* $p$  < 0.01; \*\*\* $p$  < 0.001) or to Ara-C or PKC412 treated cells as indicated.

them are currently used in advanced-phases clinical trials with variable success rate (<https://clinicaltrials.gov/>). FLT3 inhibitors are basically expected to inhibit cellular proliferation through the down-regulation of this kinase, thus resulting in a withdrawal of antiapoptotic signals [37–39]. Some FLT3 inhibitors revealed higher efficacy when combined with chemotherapy [38, 40–42]. However, the best schedule combination with conventional chemotherapy has not been identified yet and research using different approaches to overcome inhibitors resistance is still needed. Given that a significant correlation was found in our study between *FLT3* expression and *hENT1* expression, we also wanted to explore how FLT3 inhibitors could modulate Ara-C uptake and related cytotoxicity. We verified that Ara-C is transported by hENT1 as it was previously reported, and we also found that Ara-C can also be transported into the cells by hENT2 and hCNT1. We next demonstrated that the FLT3 inhibitor PKC412 induced a significant reduction of *hENT1* mRNA expression in both MV4-11 and SEM cell lines, which results in functional down-regulation of hENT1-dependent drug uptake. Similar effects on hENT1 down-regulation were found with AC220, a more selective FLT3 inhibitor. This effect appears to be specific, as PKC412 does not modify other transporter functions (i.e. hENT2 and hCNT1). Taken together, our results suggest that Ara-C transporter hENT1 expression and activity are regulated by FLT3. Interestingly, Jin and colleagues [20], using heterologous transduction of FLT3-ITD in HF6 cells, had suggested that FLT3-ITD down-regulates hENT1 expression in a heterologous system using transduced FLT3-ITD in HF6 cells. Oppositely, our results achieved in endogenously expressing FLT3 cell lines (wild type FLT3 and FLT3-ITD) suggest that FLT3 is indeed up-regulating *hENT1* expression and related activity. Those results are fully consistent with the clinical data, showing a positive correlation between *FLT3* and *hENT1* mRNA expression levels in the cohort of 50 patients here analyzed.

Regarding the effect on cell survival of the combination of a FLT3 inhibitor and a chemotherapeutic drug, two studies [43, 44] have previously demonstrated *in vitro* that combined therapies involving FLT3 inhibitors and chemotherapeutic agents might yield variable efficacy depending upon the sequence of drug treatment. Thus, antagonistic cytotoxic effects were induced when they pretreated FLT3-ITD cell lines and primary patient samples with a FLT3 inhibitor followed by chemotherapy. Similar results were obtained in wild type FLT3 with high *FLT3* mRNA expression levels. This effect appears to be the result of the FLT3 inhibitor inducing cell cycle arrest at the G1-S phase, thereby perturbing the action of genotoxic drugs, such as Ara-C. The possibility of FLT3 modulating hENT1 as a result of cell cycle perturbation should not be ruled out, although it looks unlikely to us. hENT1 has been shown to provide extracellular

nucleosides for DNA synthesis in murine primary bone marrow macrophages [45], but hCNT1 is the transporter known to be cell cycle-dependent, showing up-regulation at the S phase [46]. Moreover, whereas FLT3 inhibition induces down-regulation of hENT1 it does not change at all either *hCNT1* mRNA expression levels or hCNT1-related activity. In summary, we think FLT3-related hENT1 modulation might not be the indirect result of cell cycle arrest induced by FLT3 inhibition. However, our data do further support the relevance of the sequence of drug treatment. In fact, under conditions of hENT1 down-regulation, the cytotoxic effect triggered by either PKC412 or AC220 was not further potentiated by Ara-C treatment, whereas this was not the case when cells were first treated with Ara-C, and basal hENT1 activity had not been yet down-regulated by FLT3 inhibition. Under these conditions the cytotoxic efficacy of the combined therapy was significantly much greater than when treating the cells with the FLT3 inhibitor alone. This finding highlights also the need for a better understanding of the basal regulatory properties of drug transporters, which may be targets of kinase inhibitors used in combined therapies.

In summary, we have demonstrated that Ara-C transport into cells is mediated by hENT1, hENT2 and hCNT1. More importantly, we also demonstrated that FLT3 significantly regulates hENT1 expression and activity and thereby Ara-C sensitivity. We have also proved that the sequence of the administration of FLT3 inhibitors and Ara-C is important, as the cytotoxic efficacy of the latter is greater when FLT3 inhibitors follow Ara-C administration. Overall, our data might contribute to better understand how FLT3 may influence drug sensitivity and to develop new therapeutic approaches in order to improve the overall outcome of patients with high risk subtypes of leukemia.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics statement

Investigation has been conducted in accordance with the ethical standards and according to the Declaration of Helsinki and according to national and international guidelines and has been approved by the authors' institutional review board.

### Patient samples and cell lines

Among 265 pediatric patients aged 0–18 years diagnosed with acute leukemia from 2003 to 2013 in Hospital Sant Joan de Déu, we selected 50 cases (B-cell precursor ALL: 44; T-ALL: 2; AML: 4) with available biological samples for the study. We selected cases with the main genetic abnormalities reported in ALL but, as we wanted to determine the possible influence of FLT3 over nucleoside transport activity, we conducted a bias towards

cases with expected high *FLT3* expression, that is, patients with ALL and hyperdiploidy (51-67 chromosomes, HeH) and *MLL* rearranged cases (ALL-*MLL*<sup>+</sup>). The main clinical and biological characteristics of patients are described in Table 1. Patients were all uniformly treated according to the Spanish Society of Pediatric Hematology and Oncology (SEHOP) consecutive protocols SHOP-LAL-99 & 05 (ALL cases) and SHOP-LAM-00 & 07 (AML cases). We used normal bone marrow CD34<sup>+</sup> cells as calibrator for *FLT3* and *hNT* expression. According to the Local Ethics Committee of our institution, all samples were stored in the legally competent Biobank of our Hospital and were used after informed consent was obtained either from the patients or their legal tutors.

We analyzed 3 different acute leukemia cell lines, SEM (childhood B-cell precursor ALL with translocation t(4;11) and *MLL* rearrangement with demonstrated high *FLT3* expression and no *FLT3* mutation; DSMZ ACC 546); MV4-11 (childhood AML with translocation t(4;11) and *MLL* rearrangement, harboring a *FLT3*-ITD mutation; DSMZ ACC 102) and K562 (lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia with known low *FLT3* expression and no *FLT3* mutations; DSMZ ACC 10). K562 and MV4-11 cells were routinely cultured in RPMI-1640 medium (Lonza, Walkersville, MD) supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (Life Technologies, Carlsbad, CA), 50 µg/ml penicillin-streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA), and 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA). SEM cells were cultured in Iscove's Modified Dubecco's Medium (IMDM) (Gibco, Breda, Netherlands) similarly supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 50 µg/ml penicillin-streptomycin and 2 mM L-glutamine.

### DNA and RNA extraction and reverse transcription

Bone marrow or peripheral blood samples from diagnosis were used for the analysis. Separation of mononuclear cells was performed using density gradient with Ficoll-Hypaque (Sigma, St Louis MO, USA) and DNA was extracted with Qiaquick DNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA was extracted with TriPure (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) and cDNA synthesis was performed from 10 ng of total RNA, using the QuantiTect Whole Transcriptome Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

### FLT3 mutational status

*FLT3*-ITD was studied by amplification of the juxtamembrane domain spanning exons 14 and 15, using fluorescently-labeled primers and subsequent analysis on a 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA), as previously described [47]. To detect point mutations in codon

D835 or deletions within codon I836, we amplified the exon 20 of *FLT3* and digested the product with Eco-RV enzyme, as reported [48]. All positive cases were directly sequenced to confirm the presence of mutations, using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.0 (Applied Biosystems, Life Technologies).

### Quantification of *FLT3* mRNA and protein expression

The quantification of the *FLT3* gene-related mRNA was performed by real-time quantitative PCR (RQ-PCR) using the TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay Hs00174690\_m1 (Applied Biosystems, Life Technologies) (see Supplementary Table S2), in a Light-Cycler 480 II (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), according to the manufacturer's instructions. Relative quantification was calculated with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method, using  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) (NM\_000181.2, ref. 4310888E) as endogenous gene and normal bone marrow CD34<sup>+</sup> cells as calibrator.

*FLT3* protein levels before and after treatment with the *FLT3* inhibitors PKC412 (Enzo Life Science, Plymouth Meeting, PA) and AC220 (Selleck Chemicals, Houston, TX) were quantified by Western blot. For this purpose, cells were treated with either PKC412 (0.045 µM) or AC220 (0.5 nM) and lysed in a buffer containing 20 nM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% triton X-100 supplemented with 1 mM sodium orthovanadate, protease inhibitor (Complete mini; Roche, Basel, Switzerland) and phosphatase inhibitor cocktails (PhosSTOP; Roche). Fifty µg of proteins were separated by SDS-PAGE on standard 10% gel and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). Membranes were incubated with *FLT3* (8F2) and phospho-*FLT3* (Tyr591) antibodies (Cell Signalling, MA, USA). After washing with TBS-Tween, membranes were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies. Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA).

### Quantification of NT and metabolizing enzymes

Real-time quantitative PCR (RQ-PCR) amplification of hCNTs and hENTs were performed with primers and probes from Applied Biosystems, summarized in Supplementary Table S2, using the TaqMan Universal Master Mix, 700 nmol/L probe and 150 nmol/L of each primer in the ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The relative mRNA level of each gene was calculated with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and normalized to that of  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) expression level and normal bone marrow CD34<sup>+</sup> cells as calibrator. Absolute RQ-PCR results were obtained from interpolation of  $\Delta Ct$  of each sample in line regression standards for number of cDNA copies of each gene. hENT1 protein levels were

**Table 1: Clinical and biological characteristics of the 50 patients diagnosed with acute leukemia included in our study**

<i>N</i> = 50	
Age, years (range)	4.3 (0–16)
Gender, n (%)	
Male	26 (52)
Female	24 (48)
CNS, n (%)	
CNS1	46 (92)
CNS2 <sup>a</sup>	3 (6)
CNS3	1 (2)
WBC count, ×10 <sup>9</sup> /L, median (range)	17.6 (1.1–331.2)
Hemoglobin, g/L, median (range)	7.7 (2.9–11.7)
Platelets, ×10 <sup>9</sup> /L, median (range)	52 (2–520)
Blasts, median (range)	
Bone marrow	93 (58–100)
Peripheral blood	55 (0–99)
Immunophenotype, n (%)	
Precursor B-ALL	44 (88)
T-ALL <sup>b</sup>	2 (4)
AML	4 (8)
Genetics, n (%)	
ALL:	
<i>HeH</i>	19 (38)
Other <sup>c</sup>	16 (32)
<i>ETV6-RUNX1</i>	4 (8)
<i>MLL+</i>	3 (6)
<i>TCF3-PBX1</i>	2 (4)
<i>BCR-ABL1</i>	2 (4)
AML:	
<i>MLL+</i>	3 (6)
Other <sup>d</sup>	1 (2)

*a: CNS2t: traumatic lumbar puncture.*

*b: Two cases of Early T-cell Precursor T-ALL, one of them harboring a FLT3-ITD mutation, were included.*

*c: Other B-cell precursor ALL cases (n = 14) included patients with normal karyotype (n = 5), cases with < 20 assessable metaphases (n = 6), cases with abnormalities at chromosome 9p (n = 3).*

*The two T-cell ALL cases included had a normal karyotype.*

*d: Other AML cases: we included a patient with 47, XX, t(6;9)(p23;q34), + 13[6]/46, XX, t(6;9)(p23;q34)[6] harboring a FLT3-ITD mutation.*

*Note: CNS: central nervous system. WBC: white blood cell. PB: peripheral blood. ALL: acute lymphoblastic leukemia. AML: acute myeloblastic leukemia. HeH: high hyperdiploid ALL (51–67 chromosomes).*

semi-quantified by Western Blot, using a commercial anti-hENT1 polyclonal antibody (STJ96396) from Saint John's Laboratory Ltd. (London, UK).

### hNT activity assays

Nucleoside uptake was measured in MV4-11, SEM and K562 cells using a method adapted from a technique previously described by our laboratory [49]. Cells were washed twice and resuspended in either a 137 mM NaCl or 137 mM choline chloride buffer. Uptake assays were

started by mixing cell suspensions with a 10% of the final volume of the same buffer, supplemented with a radionucleoside - [<sup>3</sup>H]Ara-C or [<sup>3</sup>H]cytidine – at a final concentration of 1 μM (specific activity 1 μCi/nmol) at a specific activity of 4000 dpm/pmol. Incubation was stopped after 1min (linear initial velocity conditions) by washing the cells three times in 1 mL of a cold buffer composed of 137 mM NaCl and 10 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane-HEPES (pH 7.4). Cells were then dissolved in 1 ml Triton-X-100 and aliquots were sampled for protein determination, according to

Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA), and for radioactivity measurements.

In the presence of Na<sup>+</sup>, hENTs and hCNTs are functional, although only hCNTs require this ion for substrate translocation. Thus, sodium dependent nucleoside transport activity (hCNT-related) was determined by subtracting uptake rates measured in the choline chloride medium (almost exclusively related to hENT1 and hENT2 activities) from measurements obtained in the sodium containing buffer (in which both ENT and CNT are active).

Cross-inhibition experiments were performed as described above, but adding saturating concentrations (100 μM) of a secondary non-radiolabeled nucleoside to the incubation media, which will compete for the transporter and block the transport of radiolabeled substrate. By adding extra guanosine to [<sup>3</sup>H]cytidine uptake media, hCNT3 but not hCNT1 activity will be blocked. hCNT1-mediated uptake was determined by subtracting the activity measured in [<sup>3</sup>H]cytidine + guanosine conditions from [<sup>3</sup>H]cytidine alone and hCNT3 related activity from the subtraction of [<sup>3</sup>H]cytidine + guanosine transport activity from the one determined when using [<sup>3</sup>H]cytidine alone. The equilibrative (Na<sup>+</sup>-independent) transport component inhibited by NBTI (1 μM) accounts for the hENT1-related nucleoside transport activity, whereas the NBTI-resistant transport includes residual hENT2-related uptake plus diffusion and binding components, which in general are negligible.

### Cell treatment and apoptosis detection by MTT assay

For routine cytotoxicity assays, 2 × 10<sup>4</sup> cells were cultured either in the presence or the absence of appropriate inhibitors. To unveil the role selected nucleoside transporters can play in cytarabine-induced cytotoxicity cells were incubated for 15 min either in the presence or in the absence of NBTI (1 μM for hENT1 inhibition) or phloridzin 250 μM (for hCNT1 inhibition). Afterwards Ara-C was added (3 μM and 1 μM for MV4-11 and SEM cells respectively) and cytotoxicity determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT; Sigma-Aldrich) after 48 h. Optical density (OD) was measured at 550 nm. For the analysis of combined drug effects cells were cultured with either 0.045 μM PKC412 or 0.5 nM AC220 and 10 μM Ara-C, following the experimental design described in the Results section, aimed at elucidating the probable role of the order of drug administration of chemotherapeutic efficacy. The Coefficient of Drug Interaction (CDI) was calculated as explained in [50].

### Statistical analysis

For the correlation of clinical and biological variables, we used the  $\chi^2$  and the Fisher's exact tests for

categorical variables and the Student's *t*-test or the Mann–Whitney *U*-test for non-parametric tests. The Spearman non-parametric test was used to determine correlations among mRNA expression values of the analyzed genes. In addition, a Kruskal–Wallis test was used to compare the gene expression levels of *FLT3* and *NT* among the different ALL subgroups. As we selected certain subtypes of leukemia according to their expected *FLT3* expression and also the total number of primary cases is low, we did not perform survival analysis in our study. All *p* values were considered significant when < 0.05. All the statistical analyses were performed using the SPSS 22.0 statistical software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to patients and families for their help and to Obra Social from Hospital Sant Joan de Déu for their support. We are indebted to the “Biobanc de l’Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació” integrated in the Spanish Biobank Network of ISCIII for the sample and data procurement.

### CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no competing financial interest.

### GRANT SUPPORT

This study has been funded by projects PI12/2417 (AC, RM, SR, NVG, MC), integrated in Plan Nacional de I+D+I and cofunded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) – Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria – and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (AC, RM, SR, NVG, MC, LCC, MPA, PFC) and SAF2011-23660 and SAF2014-52067-R (MPA) by grants from Asociación Española Contra el Cáncer AECC-Foundation (AC, SR, MC), Fundación Sandra Ibarra de Solidaridad Frente al Cáncer (RM, SR, MC), Fundación Cris contra el Cáncer (MC), “Força Miquel”, “Mua” & “Candela, polsera solidària” projects (AC, RM, SR, NVG, MC). CIBER is an initiative of ISCIII (Madrid, Spain). LCC is being funded by the Becas Chile Program (CONICYT, Gobierno de Chile).

### REFERENCES

1. Pieters R, den Boer ML, Durian M, Janka G, Schmiegelow K, Kaspers GJ, van Wering ER, Veerman AJ. Relation between age, immunophenotype and *in vitro* drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia—implications for treatment of infants. *Leukemia*. 1998; 12:1344–8.
2. Hasle H. A critical review of which children with acute myeloid leukaemia need stem cell procedures. *Br J Haematol*. 2014; 166:23–33.



3. Stam RW, den Boer ML, Schneider P, Meier M, Beverloo HB, Pieters R.D-HPLC analysis of the entire FLT3 gene in MLL rearranged and hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2007; 921565–8.
4. Stam RW, Schneider P, de Lorenzo P, Valsecchi MG, den Boer ML, Pieters R. *Blood*. United States. 2007; 2774–5.
5. Kang H, Wilson CS, Harvey RC, Chen I-M, Murphy MH, Atlas SR, Bedrick EJ, Devidas M, Carroll AJ, Robinson BW, Stam RW, Valsecchi MG, Pieters R, et al. Gene expression profiles predictive of outcome and age in infant acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2012; 1191872–81.
6. Yeoh E-J, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, Behm FG, Raimondi SC, Relling MV, Patel A, Cheng C, Campana D, Wilkins D, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*. 2002; 1133–43.
7. Staffas A, Kanduri M, Hovland R, Rosenquist R, Ommen HB, Abrahamsson J, Forestier E, Jahnukainen K, Jónsson G, Zeller B, Palle J, Lönnerholm G, Hasle H, et al. Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO). Presence of FLT3-ITD and high BAALC expression are independent prognostic markers in childhood acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011; 1185905–13.
8. Ozeki K, Kiyoi H, Hirose Y, Iwai M, Ninomiya M, Kodera Y, Miyawaki S, Kuriyama K, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, et al. Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004; 1031901–8.
9. Stam RW, den Boer ML, Schneider P, Nollau P, Horstmann M, Beverloo HB, van der Voort E, Valsecchi MG, de Lorenzo P, Sallan SE, Armstrong SA, Pieters R. Targeting FLT3 in primary MLL-gene-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2005; 1062484–90.
10. Andersson A, Paulsson K, Lilljebjörn H, Lassen C, Strömbeck B, Heldrup J, Behrendtz M, Johansson B, Fioretos T. FLT3 mutations in a 10 year consecutive series of 177 childhood acute leukemias and their impact on global gene expression patterns. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008; 4764–70.
11. Armstrong SA, Kung AL, Mabon ME, Silverman LB, Stam RW, Den Boer ML, Pieters R, Kersey JH, Sallan SE, Fletcher JA, Golub TR, Griffin JD, Korsmeyer SJ. Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer Cell*. 2003; 3173–83.
12. Brown P, Levis M, Shurtleff S, Campana D, Downing J, Small D. FLT3 inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression. *Blood*. 2005; 105812–20.
13. Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, Escoda L, Guàrdia R, Queipo de Llano MP, Salamero O, Bargay J, Pedro C, Martí JM, et al. Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas Mieloblásticas. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood*. 2013; 1212734–8.
14. Pastor-Anglada M, Pérez-Torras S. Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Front Pharmacol*. 2015; 613.
15. White JC, Rathmell JP, Capizzi RL. Membrane transport influences the rate of accumulation of cytosine arabinoside in human leukemia cells. *J Clin Invest*. 1987; 79380–7.
16. Errasti-Murugarren E, Pastor-Anglada M. Drug transporter pharmacogenetics in nucleoside-based therapies. *Pharmacogenomics*. 2010; 11809–41.
17. Stam RW, den Boer ML, Meijerink JPP, Ebus MEG, Peters GJ, Noordhuis P, Janka-Schaub GE, Armstrong SA, Korsmeyer SJ, Pieters R. Differential mRNA expression of Ara-C-metabolizing enzymes explains Ara-C sensitivity in MLL gene-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2003; 1011270–6.
18. Abraham A, Varatharajan S, Karathedath S, Philip C, Lakshmi KM, Jayavelu AK, Mohanan E, Janet NB, Srivastava VM, Shaji RV, Zhang W, Abraham A, Viswabandya A, et al. RNA expression of genes involved in cytarabine metabolism and transport predicts cytarabine response in acute myeloid leukemia. *Pharmacogenomics*. 2015; 16877–90.
19. Hubeek I, Stam RW, Peters GJ, Broekhuizen R, Meijerink JPP, van Wering ER, Gibson BES, Creutzig U, Zwaan CM, Cloos J, Kuik DJ, Pieters R, Kaspers GJL. The human equilibrative nucleoside transporter 1 mediates *in vitro* cytarabine sensitivity in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer*. 2005; 931388–94.
20. Jin G, Matsushita H, Asai S, Tsukamoto H, Ono R, Nosaka T, Yahata T, Takahashi S, Miyachi H. FLT3-ITD induces ara-C resistance in myeloid leukemic cells through the repression of the ENT1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 3901001–6.
21. Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL, Zwaan M, Zimmerman M, Reinhardt D, Kaspers GJL, Heerema NA, Gerbing R, Lange BJ, Radich JP. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood*. 2006; 1083654–61.
22. Willemze R, Suci S, Meloni G, Labar B, Marie JP, Halkes CJM, Muus P, Mistrik M, Amadori S, Specchia G, Fabbiano F, Nobile F, Sborgia M, et al. High-dose cytarabine in induction treatment improves the outcome of adult patients younger than age 46 years with acute myeloid leukemia: results of the EORTC-GIMEMA AML-12 trial. *J Clin Oncol*. 2014; 32219–28.
23. Braoudaki M, Karpusas M, Katsibardi K, Papatthanassiou CH, Karamolegou K, Tzortzatou-Stathopoulou F. Frequency of FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Oncol*. 2009; 26460–2.

24. Brunet S, Labopin M, Esteve J, Cornelissen J, Socié G, Iori AP, Verdonck LF, Volin L, Gratwohl A, Sierra J, Mohty M, Rocha V. Impact of FLT3 internal tandem duplication on the outcome of related and unrelated hematopoietic transplantation for adult acute myeloid leukemia in first remission: a retrospective analysis. *J Clin Oncol*. 2012; 30735–41.
25. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, Sallan SE, Lander ES, Golub TR, Korsmeyer SJ. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet*. 2002; 3041–7.
26. Pieters R, Schrappe M, De Lorenzo P, Hann I, De Rossi G, Felice M, Hovi L, LeBlanc T, Szczepanski T, Ferster A, Janka G, Rubnitz J, Silverman L, et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2007; 370240–50.
27. Armstrong SA, Mabon ME, Silverman LB, Li A, Gribben JG, Fox EA, Sallan SE, Korsmeyer SJ. FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2004; 1033544–6.
28. Gloeckner-Hofmann K, Guillén-Gómez E, Schmidtgen C, Porstmann R, Ziegler R, Stoss O, Casado FJ, Rüschoff J, Pastor-Anglada M. Expression of the high-affinity fluoropyrimidine-preferring nucleoside transporter hCNT1 correlates with decreased disease-free survival in breast cancer. *Oncology*. 2006; 70238–44.
29. Fernández-Calotti PX, Colomer D, Pastor-Anglada M. Translocation of nucleoside analogs across the plasma membrane in hematologic malignancies. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2011; 301324–40.
30. Galmarini CM, Thomas X, Graham K, El Jafaari A, Cros E, Jordheim L, Mackey JR, Dumontet C. Deoxycytidine kinase and cN-II nucleotidase expression in blast cells predict survival in acute myeloid leukaemia patients treated with cytarabine. *Br J Haematol*. 2003; 12253–60.
31. Kakihara T, Fukuda T, Tanaka A, Emura I, Kishi K, Asami K, Uchiyama M. Expression of deoxycytidine kinase (dCK) gene in leukemic cells in childhood: decreased expression of dCK gene in relapsed leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1998; 31405–9.
32. Locatelli F, Moretta F, Rutella S. Management of relapsed acute lymphoblastic leukemia in childhood with conventional and innovative approaches. *Curr Opin Oncol*. 2013; 25707–15.
33. Byrne JL, Dasgupta E, Pallis M, Turzanski J, Forman K, Mitchell D, Haynes AP, Russell NH. Early allogeneic transplantation for refractory or relapsed acute leukaemia following remission induction with FLAG. *Leukemia*. 1999; 13786–91.
34. McCarthy AJ, Pitcher LA, Hann IM, Oakhill A. FLAG (fludarabine, high-dose cytarabine, and G-CSF) for refractory and high-risk relapsed acute leukemia in children. *Med Pediatr Oncol*. 1999; 32411–5.
35. Hijiya N, Barry E, Arceci RJ. Clofarabine in pediatric acute leukemia: current findings and issues. *Pediatr Blood Cancer*. 2012; 59417–22.
36. Tavil B, Aytac S, Balci YI, Unal S, Kuskonmaz B, Yetgin S, Gurgey A, Tuncer M, Gumruk F, Uckan D, Cetin M. Fludarabine, cytarabine, granulocyte colony-stimulating factor, and idarubicin (FLAG-IDA) for the treatment of children with poor-prognosis acute leukemia: the Hacettepe experience. *Pediatr Hematol Oncol*. 2010; 27517–28.
37. Levis M, Allebach J, Tse KF, Zheng R, Baldwin BR, Smith BD, Jones-Bolin S, Ruggeri B, Dionne C, Small D. A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells *in vitro* and *in vivo*. *Blood*. 2002; 993885–91.
38. Stubbs MC, Armstrong SA. FLT3 as a therapeutic target in childhood acute leukemia. *Curr Drug Targets*. 2007; 8703–14.
39. König H, Levis M. Targeting FLT3 to treat leukemia. *Expert Opin Ther Targets*. 2015; 1937–54.
40. Grunwald MR, Levis MJ. FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia: a review of their efficacy and mechanisms of resistance. *Int J Hematol*. 2013; 97683–94.
41. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD, Grandin W, Lebwohl D, Wang Y, Cohen P, Fox EA, Neuberg D, Clark J, et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*. 2005; 10554–60.
42. Smith BD, Levis M, Beran M, Giles F, Kantarjian H, Berg K, Murphy KM, Dausers T, Allebach J, Small D. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004; 1033669–76.
43. Levis M, Pham R, Smith BD, Small D. *In vitro* studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects. *Blood*. 2004; 1041145–50.
44. Brown P, Levis M, McIntyre E, Griesemer M, Small D. Combinations of the FLT3 inhibitor CEP-701 and chemotherapy synergistically kill infant and childhood MLL-rearranged ALL cells in a sequence-dependent manner. *Leukemia*. 2006; 201368–76.
45. Soler C, García-Manteiga J, Valdés R, Xaus J, Comalada M, Casado FJ, Pastor-Anglada M, Celada A, Felipe A. Macrophages require different nucleoside transport systems for proliferation and activation. *FASEB J*. 2001; 151979–88.
46. Valdés R, Casado FJ, Pastor-Anglada M. Cell-cycle-dependent regulation of CNT1, a concentrative nucleoside transporter involved in the uptake of cell-cycle-dependent nucleoside-derived anticancer drugs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 296575–9.
47. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002; 994326–35.

48. Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, Frew ME, Bowen DT, Linch DC. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood*. 2002; 100:2393–8.
49. Fernández-Calotti P, Pastor-Anglada M. All-trans-retinoic acid promotes trafficking of human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) to the plasma membrane by a TGF-beta1-mediated mechanism. *J Biol Chem*. 2010; 285:13589–98.
50. Urtasun N, Vidal-Pla A, Pérez-Torras S, Mazo A. Human pancreatic cancer stem cells are sensitive to dual inhibition of IGF-IR and ErbB receptors. *BMC Cancer*. 2015; 15:223.

## **The transcriptional repressor HDAC7 promotes apoptosis and c-Myc downregulation in particular types of leukemia and lymphoma**

B Barneda-Zahonero, O Collazo, A Azagra, I Fernández-Duran, J Serra-Musach, ABMMK Islam, N Vega-García, R Malatesta, M Camós, A Gómez, L Román-González, A Vidal, N López-Bigas, A Villanueva, M Esteller and M Parra

---

The generation of B cells is a complex process requiring several cellular transitions, including cell commitment and differentiation. Proper transcriptional control to establish the genetic programs characteristic of each cellular stage is essential for the correct development of B lymphocytes. Deregulation of these particular transcriptional programs may result in a block in B-cell maturation, contributing to the development of hematological malignancies such as leukemia and lymphoma. However, very little is currently known about the role of transcriptional repressors in normal and aberrant B lymphopoiesis. Here we report that histone deacetylase 7 (HDAC7) is underexpressed in pro-B acute lymphoblastic leukemia (pro-B-ALL) and Burkitt lymphoma. Ectopic expression of HDAC7 induces apoptosis, leads to the downregulation of c-Myc and inhibits the oncogenic potential of cells *in vivo*, in a xenograft model. Most significantly, we have observed low levels of HDAC7 expression in B-ALL patient samples, which is correlated with the increased levels of c-Myc. From a mechanistic angle, we show that ectopically expressed HDAC7 localizes to the nucleus and interacts with the transcription factor myocyte enhancer factor C (MEF2C) and the corepressors HDAC3 and SMRT. Accordingly, both the HDAC7–MEF2C interaction domain as well as its catalytic domain are involved in the reduced cell viability induced by HDAC7. We conclude that HDAC7 has a potent anti-oncogenic effect on specific B-cell malignancies, indicating that its deregulation may contribute to the pathogenesis of the disease.



# The transcriptional repressor HDAC7 promotes apoptosis and c-Myc downregulation in particular types of leukemia and lymphoma

B Barneda-Zahonero<sup>1</sup>, O Collazo<sup>1,11</sup>, A Azagra<sup>1,11</sup>, I Fernández-Duran<sup>1</sup>, J Serra-Musach<sup>2</sup>, ABMMK Islam<sup>3</sup>, N Vega-García<sup>4</sup>, R Malatesta<sup>4</sup>, M Camós<sup>4</sup>, A Gómez<sup>5</sup>, L Román-González<sup>1</sup>, A Vidal<sup>6</sup>, N López-Bigas<sup>7,8</sup>, A Villanueva<sup>9</sup>, M Esteller<sup>5,8,10</sup> and M Parra<sup>\*,1</sup>

The generation of B cells is a complex process requiring several cellular transitions, including cell commitment and differentiation. Proper transcriptional control to establish the genetic programs characteristic of each cellular stage is essential for the correct development of B lymphocytes. Deregulation of these particular transcriptional programs may result in a block in B-cell maturation, contributing to the development of hematological malignancies such as leukemia and lymphoma. However, very little is currently known about the role of transcriptional repressors in normal and aberrant B lymphopoiesis. Here we report that histone deacetylase 7 (HDAC7) is underexpressed in pro-B acute lymphoblastic leukemia (pro-B-ALL) and Burkitt lymphoma. Ectopic expression of HDAC7 induces apoptosis, leads to the downregulation of c-Myc and inhibits the oncogenic potential of cells *in vivo*, in a xenograft model. Most significantly, we have observed low levels of HDAC7 expression in B-ALL patient samples, which is correlated with the increased levels of c-Myc. From a mechanistic angle, we show that ectopically expressed HDAC7 localizes to the nucleus and interacts with the transcription factor myocyte enhancer factor C (MEF2C) and the corepressors HDAC3 and SMRT. Accordingly, both the HDAC7–MEF2C interaction domain as well as its catalytic domain are involved in the reduced cell viability induced by HDAC7. We conclude that HDAC7 has a potent anti-oncogenic effect on specific B-cell malignancies, indicating that its deregulation may contribute to the pathogenesis of the disease.

*Cell Death and Disease* (2015) 6, e1635; doi:10.1038/cddis.2014.594; published online 12 February 2015

Proper generation of mature B lymphocytes is the result of complex cell lineage commitment and differentiation processes. Each cellular transition is tightly regulated at the transcriptional level by the action of lineage-specific transcription factors (TFs), such as PU.1, Ikaros, myocyte enhancer factor C (MEF2C), E2A and PAX5 among others.<sup>1–9</sup> The deregulation of these particular transcriptional programs may result in a block in the differentiation and a hyperproliferative cellular state, thereby contributing to the development of hematological malignancies such as leukemia and lymphoma. Aberrant expression or mutation of many of the lineage-specific TFs involved in B lymphocyte development have been linked to the outcome of hematopoietic malignancies.<sup>10,11</sup> In addition, the overexpression of c-Myc has been found in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and B-ALL, and some types of B-cell lymphoma, such as Burkitt lymphoma, present translocations in the *MYC* gene (*c-MYC-IgH*).<sup>12</sup> The deregulation of B-cell TFs in combination with chromosomal

aberrations, such as gene translocations (*ETV6-RUNX1* and *BCR-ABL1*) and rearrangements in the *MLL* gene are key events in aberrant B lymphopoiesis and considered as primary lesions.<sup>11,13</sup>

In recent years, the idea has begun to emerge that, in addition to the activation of gene expression, transcriptional repression is a fundamental mechanism to ensure proper B lymphopoiesis.<sup>3,14,15</sup> Among the different types of transcriptional repressors, histone deacetylases (HDACs) are thought to be crucial enzymes in many physiological and pathological processes.<sup>16,17</sup> Mutation and/or aberrant expression of HDACs have often been observed in human disease, in particular cancer, making them important therapeutic targets.<sup>18,19</sup> In pathological situations where classic HDACs are overexpressed, HDAC inhibitors (HDIs) have emerged as promising therapeutic agents.<sup>19</sup> However, it is worth mentioning that the contribution of HDACs to cancer could be due to mechanisms other than overexpression. In fact, HDACs may

<sup>1</sup>Cellular Differentiation Group, Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Avenida Gran Via 199, 08908 L'Hospitalet, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Breast Cancer and Systems Biology Unit, Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology (ICO), Bellvitge Institute for Biomedical Research (IDIBELL), Avenida Gran Via s/n km 2.7, 08907 L'Hospitalet, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Department of Genetic Engineering & Biotechnology, University of Dhaka, Dhaka, Bangladesh; <sup>4</sup>Department of Hematology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Cancer Epigenetics Group, Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Avenida Gran Via 199, 08908 L'Hospitalet, Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Department of Pathology, University Hospital of Bellvitge, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain; <sup>7</sup>Research Unit on Biomedical Informatics, Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Dr Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain; <sup>8</sup>Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain; <sup>9</sup>Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology, Bellvitge Biomedical Research Institute, Barcelona, Spain and <sup>10</sup>Department of Physiological Sciences II, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

\*Corresponding author: M Parra, Cellular Differentiation Group, Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Avenida Gran Via 199, L'Hospitalet, 08908 Barcelona, Spain. Tel: +34 932 607133; Fax: +34 932 607219; E-mail: mparra@idibell.cat

<sup>11</sup>These authors contributed equally to this work.

**Abbreviations:** HDAC7, histone deacetylase 7; B-ALL, B-cell acute lymphoblastic leukemia; MEF2C, myocyte enhancer factor C; HDIs, histone deacetylase inhibitors  
Received 26.8.14; revised 16.12.14; accepted 18.12.14; Edited by A Oberst

also present truncating or inactivating mutations.<sup>18</sup> Therefore, we are far from fully understanding the contribution of individual HDACs to cancer.

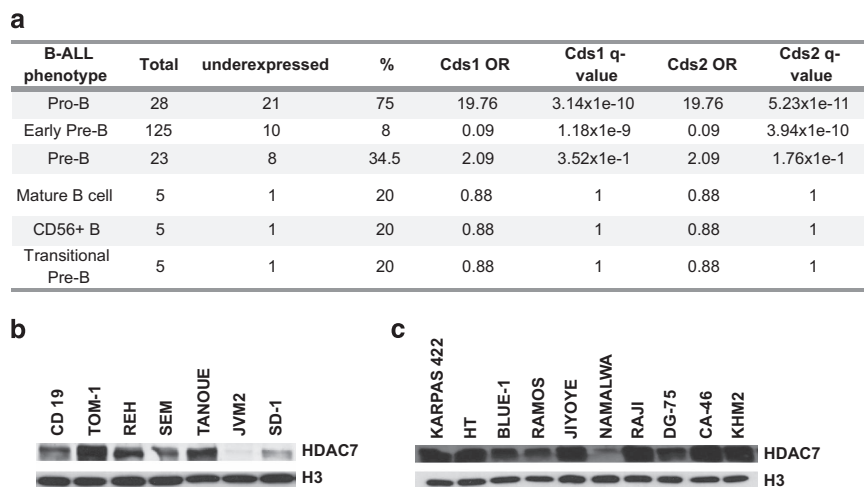
Of the various HDACs, HDAC7 appears to be a lymphoid-specific transcriptional repressor.<sup>20–26</sup> In addition to its critical role in T lymphocyte biology, we have recently reported that HDAC7 is critical in maintaining the genetic identity of B lymphocytes.<sup>20</sup> Interestingly, HDAC7 has been identified as a target gene in hematopoietic cancers in a PiggyBac transposon mutagenesis screening in mice.<sup>27</sup> On the basis of our recent findings, we postulated that HDAC7 might be deregulated in B-cell malignancies. Here we report the loss of HDAC7 expression in cell lines established from B-ALL and Burkitt lymphoma as well as in pro-B-ALL samples from patients. Forced expression of HDAC7 induces the apoptosis of the cells. Strikingly, the presence of HDAC7 results in the downregulation of the oncogene *c-Myc*. HDAC7 expression interferes with the oncogenic potential of the cells in a xenograft model. Most significantly, we have found low levels of HDAC7 expression in B-ALL samples from patients, which are associated with high levels of *c-Myc*. Taken together, our findings suggest that HDAC7 expression may exert an anti-oncogenic activity in particular types of B-cell malignancies and that its deregulation may contribute to the pathogenesis of B-ALL and B-cell lymphoma.

## Results

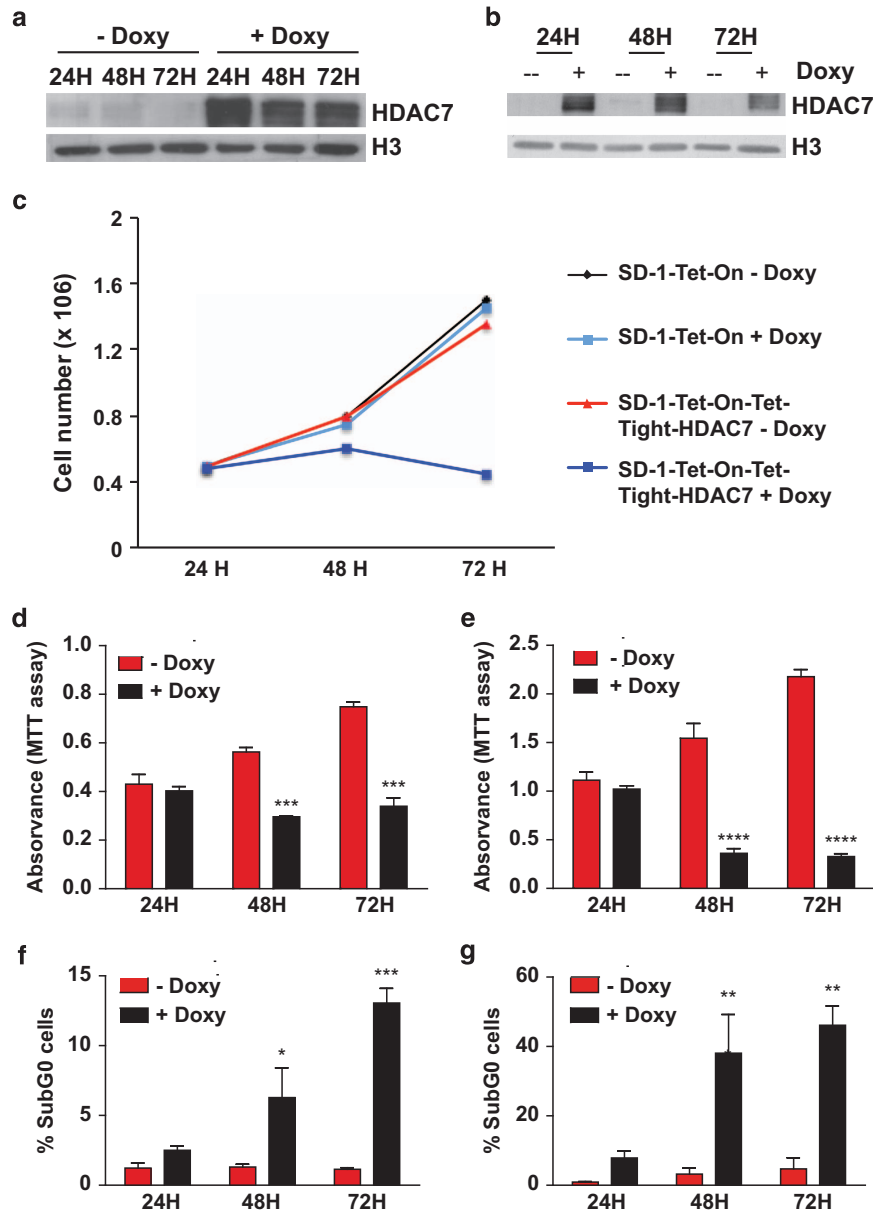
**HDAC7 is underexpressed in pro-B-ALL and B-cell lymphoma.** First, to further validate the notion that HDAC7 is a lymphoid-specific transcriptional repressor within the hematopoietic system we examined the Immunological Genome Project Database (Immgen) (<http://www.immgen.org/>). Using this database we confirmed that HDAC7 is specifically expressed in lymphoid cells but not in cells from the myeloid lineage (Supplementary Figure 1). This finding led us to speculate that HDAC7 expression could be

deregulated in B-cell malignancies. To test this hypothesis, we first examined HDAC7 expression levels in a publicly available microarray GEO data set (GSE34861), which consists of the gene expression profile of 191 samples of adult B-ALL and 3 normal samples. The B-ALL samples comprised 28 corresponding to pro-B-ALL, 125 to early pre-B-ALL, 23 to pre-B-ALL, 5 to mature B-ALL, 5 to CD56+ B-ALL and 5 to transitional-pre-B-ALL immunophenotypes. Analysis using the Fisher test showed that HDAC7 was significantly associated with underexpression in pro-B-ALL samples (Figure 1a). We found no significant association with deregulation of HDAC7 expression in samples from the other immunophenotypes analyzed (Figure 1a). To further confirm our findings, we next assessed the HDAC7 protein levels in established cell lines from six B-ALLs. We observed that SD-1 and JVM-2 cells presented low or undetectable HDAC7 protein levels (Figure 1b). Next we tested whether HDAC7 expression could also be deregulated in lymphomas. We found that HDAC7 was underexpressed in the Burkitt lymphoma-derived Namalwa cell line (Figure 1c). Altogether, these data indicate that HDAC7 is deregulated in particular types of B-ALL and B-cell lymphoma.

**HDAC7 expression induces apoptosis in SD-1 and Namalwa cells.** To assess whether the absence of HDAC7 is associated with the oncogenic features of SD-1 and Namalwa cells we adopted a gain-of-function experimental approach. We generated a doxycycline-inducible system to express HDAC7 exogenously in both the cell lines (Figures 2a and b). Expression of HDAC7 after the addition of doxycycline to SD-1 cells resulted in complete cell growth arrest over a course of 3 days (Figure 2c). In contrast, addition of doxycycline to the parental SD-1 cell line had no significant effect on cell growth, demonstrating that HDAC7 specifically mediates the growth arrest of the cells (Figure 2c). We then tested whether the reduction in the total number of cells was the result of a block in cell



**Figure 1** HDAC7 is underexpressed in pro-B acute lymphoblastic leukemia (ALL) and B-cell lymphoma. (a) Table shows the results of the Fisher test. The  $q$ -values result from multiple correction by FDR. The OR (odds ratio) shows the association between an ALL type and HDAC7 underexpression. OR > 1 indicates that ALL type is positively associated with underexpression, whereas OR < 1 indicates that it is negatively associated with underexpression. An OR = 1 indicates no association between ALL type and regulation. (b) and (c) represent the western blots for HDAC7 in B-ALL and lymphoma cell lines



**Figure 2** Forced expression of HDAC7 in SD-1 and Namalwa cell lines blocks their proliferation capacity and induces apoptosis. (a) and (b) SD-1 and Namalwa cells were transduced to express HDAC7 in a doxycycline-inducible manner (SD-1-Tet-On-Tight-HDAC7 and Namalwa-Tet-On-Tight-HDAC7 cells). Representative western blots showing HDAC7 protein levels after cell treatment with doxycycline. (c) SD-1-Tet-On and SD-1-Tet-On-Tight-HDAC7 cells were cultured and treated, or not, with doxycycline. At the indicated times after treatment, the cell number was assessed by cell counting. Trypan blue-dyed cells were omitted from the cell counts. Means  $\pm$  S.D. of the four independent experiments performed in triplicate. (d) and (e) Mean  $\pm$  S.E.M. of the absorbance units from five independent MTT assays performed in triplicate, of SD-1-Tet-On-Tight-HDAC7 (left) and Namalwa-Tet-On-Tight-HDAC7 (right) treated, or not, with doxycycline. \*\*\* $P$  < 0.001; \*\*\*\* $P$  < 0.0001. (f) and (g) show the percentage of cells in SubG0 from three independent experiments in SD-1-Tet-On-Tight-HDAC7 (left) and Namalwa-Tet-On-Tight-HDAC7 (right) cells treated, or not, with doxycycline for the indicated times. \* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01; \*\*\* $P$  < 0.001

proliferation by performing an MTT assay in the absence and presence of HDAC7. HDAC7 expression significantly reduced the cell viability of both SD-1 and Namalwa cell lines (Figures 2d and e). To rule out the possibility that the effect observed on cell viability is due to the toxicity of ectopic overexpression of HDAC7, we generated HDAC7-inducible lines in cells that express normal HDAC7 levels. We found that ectopic expression of HDAC7 in RAJ1 and TOM-1 cell lines did not affect their viability (Supplementary Figure 2a and b). Moreover, the class IIa HDACs, HDAC4 and HDAC9

were found to be expressed in both SD-1 and Namalwa cells in the absence and in the presence of doxycycline indicating that the effect observed was specific to the expression of HDAC7 (Supplementary Figure 2c). Next we examined whether HDAC7 could induce apoptosis and assessed the cell cycle status. We observed a significant accumulation of cells in subG0 at 48 and 72 h after doxycycline treatment of both SD-1 and Namalwa cell lines, demonstrating that HDAC7 induced apoptosis (Figures 2d and e and Supplementary Figure 3). These findings indicate that the



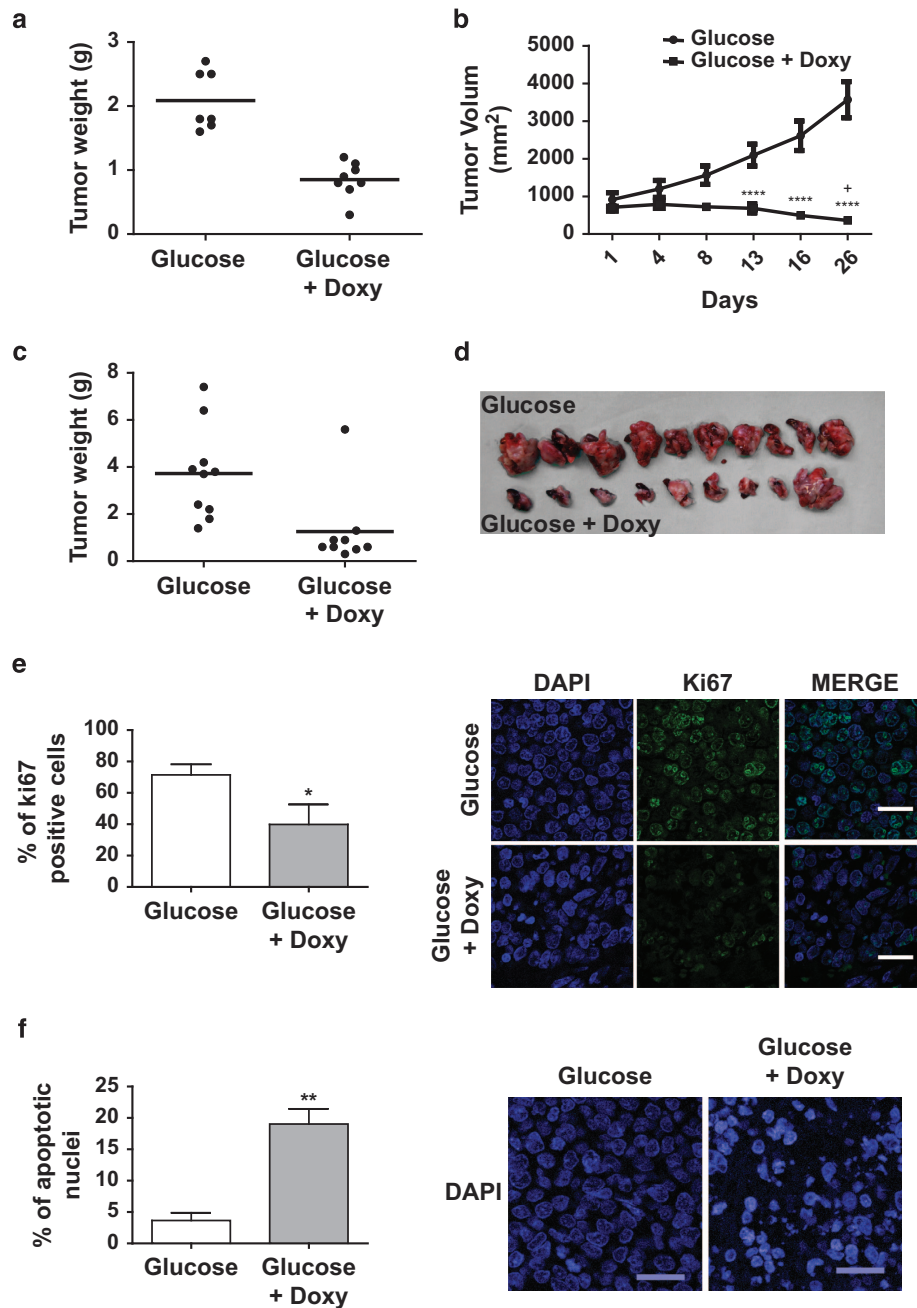
absence of HDAC7 could be associated with the survival of both the cancer cell lines and suggest that its re-expression may exert a therapeutic anti-oncogenic effect.

**HDAC7 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in a xenograft model.** To determine the physiological consequences of HDAC7 expression in SD-1 and Namalwa cells we performed *in vivo* functional experiments using a xenograft model in athymic mice. First, SD-1 cells were injected subcutaneously into the back of several athymic mice. When tumors reached a homogeneous size they were randomly allocated into two treatment groups: (i) mice drank glucose; and (ii) drank glucose plus doxycycline in water. Tumors in mice taking glucose-treated water that did not express HDAC7 continued to grow. Strikingly, tumors in mice treated with doxycycline showed a marked decrease in their size (Figures 3a and b). Next to test the effect of HDAC7 expression on the lymphomagenic capacity of the Namalwa cell line,  $1.5 \times 10^6$  cells were injected orthotopically into the spleen of 19 athymic mice and they were randomly allocated into two treatment groups. (i) mice drank glucose; and (ii) drank glucose plus doxycycline in water. Notably, 15 days later, the tumors of mice treated with doxycycline were almost undetectable at palpation. At that point, all mice were killed and their spleens surgically removed. Similar to the results obtained with leukemic cells, the expression of HDAC7 in Namalwa cells markedly interfered with the growth of lymphomas (Figures 3c and d). Immunofluorescence assays revealed a significant reduction of proliferation, as revealed by Ki67 staining, and increased apoptosis in tumor cells expressing HDAC7 (Figures 3e and f and Supplementary Figure 4). Thus, our *in vivo* data confirm that HDAC7 induces apoptosis and exerts a potent anti-oncogenic effect suggesting that its absence may be involved in the pathogenesis of specific types of B-ALL and B-cell lymphoma.

**HDAC7 expression induces the apoptotic gene program of leukemic cells.** As HDAC7 is a transcriptional regulator, we decided to investigate the impact of HDAC7 expression on the global gene expression profile of SD-1 cells. Microarray analysis revealed that 660 genes were differentially expressed when HDAC7 was ectopically expressed in SD-1 cells. Of these, 410 genes were upregulated and 250 were downregulated (Supplementary Figure 5, Supplementary Data Sets 1 and 2). Next we examined the list of upregulated genes after HDAC7 expression and looked for the presence of apoptosis-related genes. We observed that HDAC7 induced the expression of several genes, such as *CD44*, *FAS*, *ATM*, *TP53BP2*, *CD40* and *BIRC3*, with known apoptotic functions (Supplementary Table 1). In addition, we also found that the presence of HDAC7 led to the upregulation of genes related to immune processes (*IL16*, *FCGR2A*, *IRAK2*, *CD86* and *CD40*, among others) and cancer (*RASSF4*, *RAB31*, *NEDD9* and *RASSF2*, among others; Supplementary Table 1). To further investigate if HDAC7 expression leads to the activation of the apoptotic genetic program in SD-1 cells, we performed a gene set enrichment analysis based on the gene ontology (GO) categories corresponding to the biological processes and on the KEGG pathways. The biological processes analysis

revealed that the set of genes upregulated upon HDAC7 expression belong to GO categories representing immune system processes, regulation of cell death and regulation of cell proliferation, among others (Figure 4a). KEGG pathway enrichment analysis confirmed that the genes whose expression was induced by HDAC7 were significantly enriched in the apoptosis pathway (Figure 4b). A selected number of genes were validated by RT-qPCR (Figure 4c). To better understand the mechanism associated with the HDAC7-induced apoptotic pathway in SD-1 cells, we investigated the possible enrichment of TF motifs from the TRANSFAC database in the set of upregulated genes. We observed a significant enrichment of a set of TFs. Remarkably, we found the enrichment of the binding motif for p53, suggesting that the induction of apoptosis may occur in a p53-mediated manner (Figure 4d). To test this possibility we assessed the status of p53 activation after the expression of HDAC7 in both SD-1 and Namalwa cells and found that the presence of HDAC7 in both the cell lines resulted in the phosphorylation and acetylation of p53 at serine 392 and lysine 382, respectively, two post-translational modifications indicative of p53 activation (Figure 4e). Overall, our data demonstrate that HDAC7 induces apoptosis presumably via the activation of the p53 pathway.

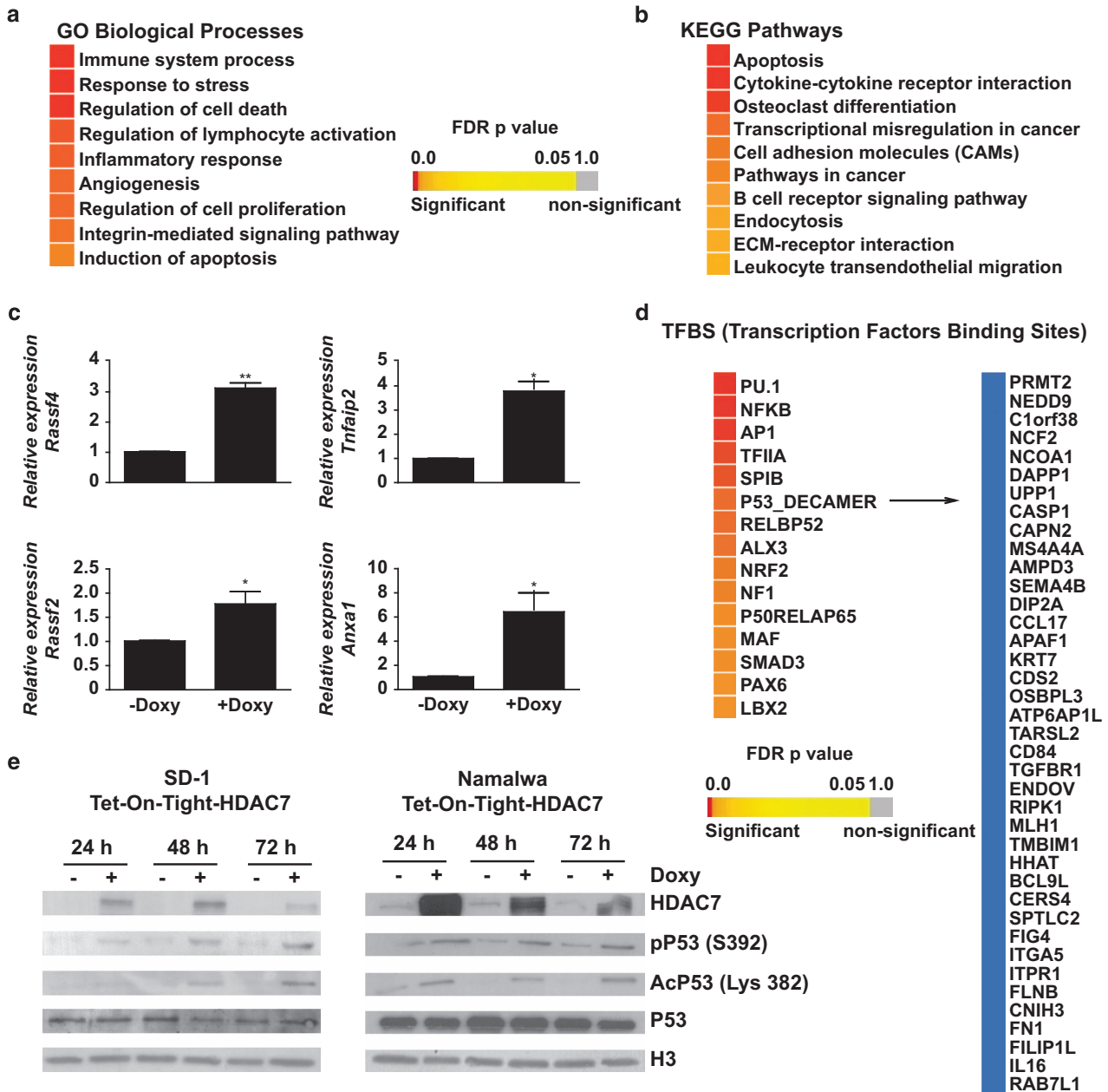
**HDAC7 represses the expression of c-Myc.** Our findings strongly indicate that HDAC7 exerts a strong anti-oncogenic effect in pro-B-ALL and B-cell lymphoma. Given that HDAC7 is a transcriptional repressor, we wondered whether its expression could lead to the repression of key oncogenes in leukemia and lymphoma. We examined our microarray data and looked for the presence of potential oncogenes in the list of downregulated genes after HDAC7 expression. Strikingly, we observed that the presence of HDAC7 resulted in the downregulation of crucial genes with known oncogenic potential, such as *MYC*, *TERT* and *AICDA* (Supplementary Table 2). This finding was validated by RT-qPCR in both SD-1 and Namalwa cells (Figures 5a and b). Using the TRANSFAC database, we found a significant enrichment of the binding site motifs for MYC factors in the HDAC7-induced downregulated genes (Figure 5c). Moreover, we also found that HDAC7 expression resulted in the reduction of c-Myc protein levels (Figure 5d). Next we tested whether the ectopic expression of c-Myc could prevent the cell growth arrest induced by HDAC7 in both SD-1 and Namalwa cells. We found that exogenous expression of c-Myc induced a significant rescue of cell growth in cells treated with doxycycline to express HDAC7. This finding further corroborates that the anti-oncogenic capacity of HDAC7 is mediated, at least in part, by the downregulation of c-Myc in SD-1 and Namalwa cells (Figure 5e). To confirm the relevance of our finding we further analyzed the published microarray GEO data set (GSE34861) and examined whether there was an association between HDAC7 and c-Myc expression levels. Strikingly, we found that a low level of expression of HDAC7 was significantly associated with high levels of c-Myc in B-ALL patients (Figure 5f). These data strongly support the hypothesis that HDAC7 possesses an anti-oncogenic potential on the B-cell malignancies studied.



**Figure 3** HDAC7 impairs the oncogenic capacity of SD-1 and Namalwa cells. Xenographic assays were performed with SD-1-Tet-On-Tight-HDAC7 and Namalwa-Tet-On-Tight-HDAC7 cells. SD-1 cells ( $5 \times 10^6$ ) were injected subcutaneously and  $1.5 \times 10^6$  Namalwa cells were orthotopically injected into the spleen. Treatment with doxycycline was started 2 weeks after injection. (a) and (b) Tumor weight at the end point of the experiment and tumor growth during the experiment of SD-1-Tet-On-Tight HDAC7 cell xenographic assays. (c) and (d) Graph of tumor weight and pictures of the tumors of Namalwa Tet-On-Tight-HDAC7 cell xenographic assays. (e) HDAC7 expression reduced the number of Ki67-positive cells and promoted an increased in the number of apoptotic nuclei. Panel (e) shows the frequency of Ki67-positive cells in the SD-1-Tet-On-Tight-HDAC7 xenographic assay. More than 2400 cells per animal (three glucose; three glucose+Doxy) were analyzed. \* $P < 0.05$ . (f) Percentage of condensed or fragmented nuclei of all nuclei from  $>2400$  cells per animal (three glucose; three glucose+Doxy). \*\* $P < 0.01$

**HDAC7 interacts with MEF2C, HDAC3 and SMRT and is localized in the nucleus.** Class IIa HDACs possess a highly conserved C-terminal catalytic domain that mediates their recruitment to a corepressor complex containing HDAC3 and SRMT/N-CoR. In addition, class IIa HDACs contain a long N-terminal region that has been shown to mediate their

interaction with tissue-specific TFs and their phosphorylation-dependent subcellular localization. To gain an insight into the mechanism of action of HDAC7, we first assessed its subcellular distribution in Namalwa cells treated, or not, with doxycycline. As expected, we found that ectopically expressed HDAC7 was mainly localized in the nuclear



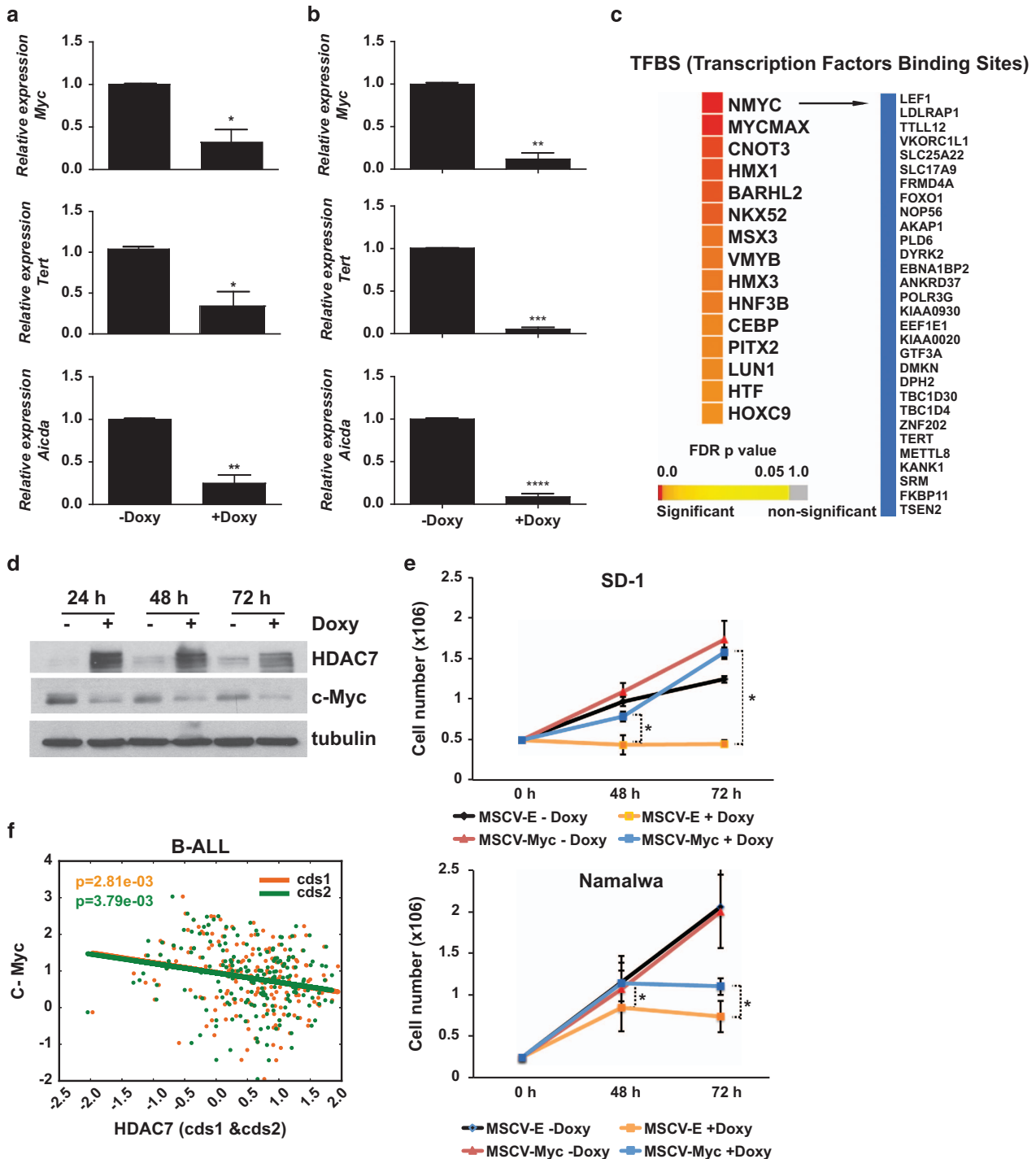
**Figure 4** HDAC7 expression results in the enrichment of apoptotic and immune system programs and p53 activation in SD-1 cells. (a) and (b) Heatmaps showing significantly (adjusted  $P < 0.05$ ) enriched GO biological processes and KEGG pathways among the upregulated genes after HDAC7 expression. (c) RT-qPCR validation for the selected upregulated genes. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ . (d) TF-binding sites enriched in the upregulated genes after HDAC7 expression. p53 target genes are shown. (e) Representative western blot of SD-1-1-Tet-On-Tight HDAC7 and Namalwa-1-Tet-On-Tight HDAC7 cells treated, or not, with doxycycline for the indicated times showing p53 phosphorylation and acetylation status

compartment (Figure 6a). Next we tested the potential requirement of both the TF-binding domain and the catalytic domain in HDAC7-decreased cell viability. We generated retroviral vectors carrying a C-terminal truncated construct HDAC7 (1–487) that completely lacks the HDAC catalytic domain but contains the MEF2 interacting motif, and an N-terminal truncated construct HDAC7 (438–915) bearing the enzymatic motif but lacking the MEF2 domain. Expression of wild-type HDAC7 resulted in a significant decrease in the viability of Namalwa cells, whereas the expression of HDAC7

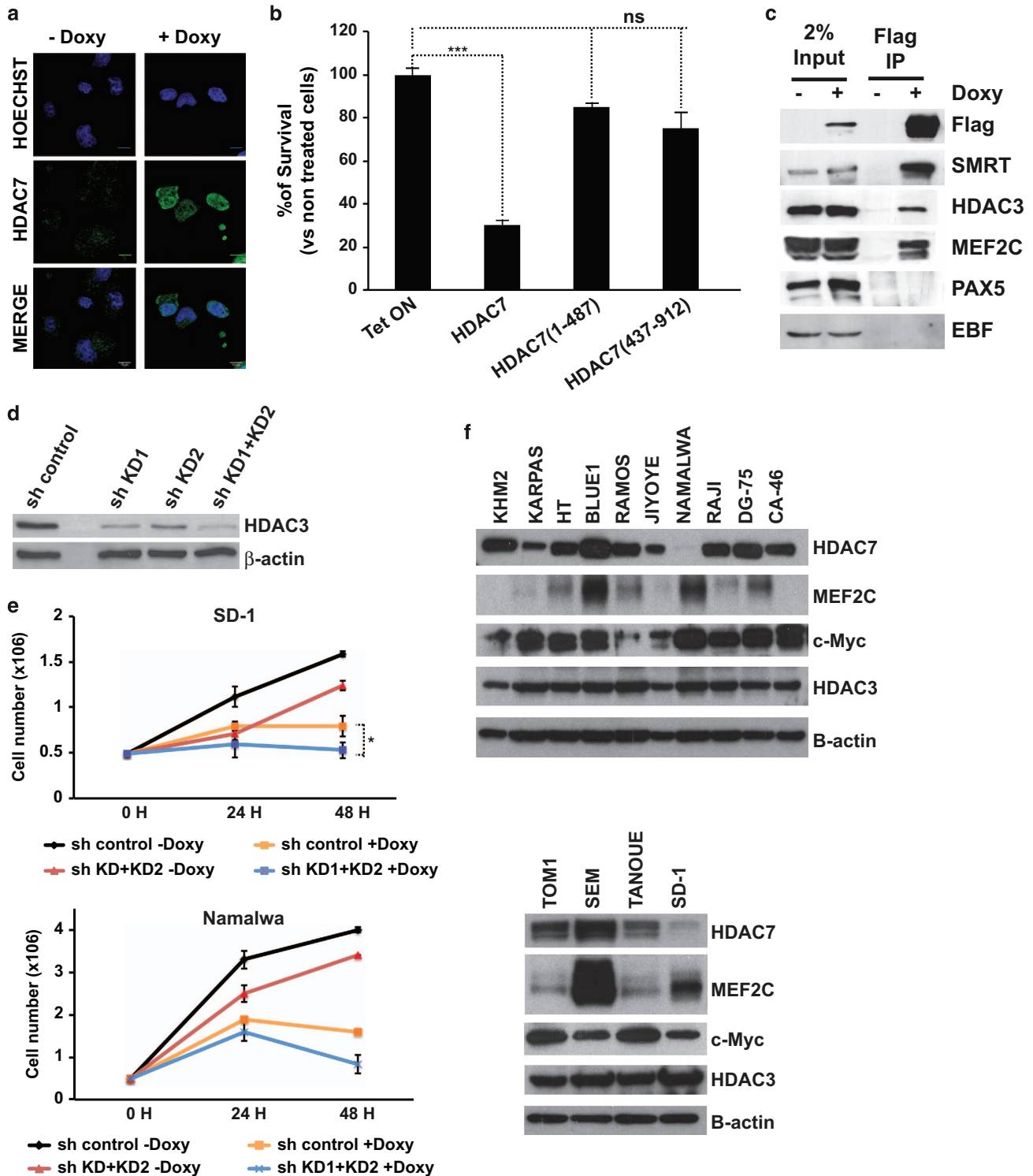
(1–487) and HDAC7 (438–915) constructs did not have a significant effect (Figure 6b). We have recently reported that HDAC7 interacts with the TF MEF2C in B lymphocytes. To address whether ectopically expressed HDAC7 specifically interacts with MEF2C in Namalwa cells, we performed co-immunoprecipitation experiments. We found that HDAC7 associated with MEF2C and not with other B-cell-specific TFs in Namalwa cells (Figure 6c). We also observed that HDAC7 interacted with HDAC3 and SMRT (Figure 6c). It has been proposed that HDAC7 lacks any enzymatic activity and that it

exerts its repressive function via the interaction with HDAC3. However, the function of HDAC7 in the absence of HDAC3 has not been properly studied. To address whether

HDAC7 induces cell growth arrest through the interaction with HDAC3 in SD-1 and Namalwa cells, we performed a loss-of-function experimental approach (Figure 6d).



**Figure 5** HDAC7 leads to the repression of c-Myc in SD-1 and Namalwa cells. (a) and (b) RT-qPCR validation for selected downregulated genes in the presence of HDAC7 are shown in SD-1-Tet-On-Tight HDAC7 (a) SD-1 and Namalwa-Tet-On-Tight HDAC7 cells (b). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ . (c) TF-binding sites enriched in the downregulated genes after HDAC7 expression in SD-1 cells. Myc target genes are shown. (d) Western blot showing the downregulation of c-Myc after HDAC7 expression in SD-1 cells. (e) SD-1-Tet-On-Tight-HDAC7 and Namalwa-Tet-On-Tight-HDAC7 cells transduced with either MSCV-Empty or MSCV-c-Myc retroviral vectors were cultured and treated, or not, with doxycycline. At the indicated times after treatment, the cell number was assessed by cell counting. Trypan blue-dyed cells were omitted from the cell counts. Means  $\pm$  S.D. of the three independent experiments performed in triplicate. \* $P < 0.05$  (f) GSE34861 data were analyzed to determine any correlation between HDAC7 and c-MYC expression. c-MYC and HDAC7 probes were normalized with respect to values of healthy patients. The graph shows the negative correlation between c-MYC and HDAC7 (cds1  $\rho = -2.15e-01$ ; cds2  $\rho = -2.09e-01$ ) expression in the B-ALL patients



**Figure 6** HDAC7 interacts with MEF2C, HDAC3 and SMRT and is localized in the nucleus. (a) Namalwa-Tet-On-Tight-HDAC7 cells were treated, or not, with doxycycline for 24 h. The subcellular localization of HDAC7 was determined by immunofluorescence. (b) Mean  $\pm$  S.E.M. of the percentage of survival cells from three independent MTT assays performed in triplicate of Namalwa cells expressing empty vector, wild-type HDAC7, and HDAC7 (1–487) and HDAC7 (438–915) deleted forms treated, or not, with doxycycline.  $***P < 0.001$ . (c) Cell lysates from Namalwa-Tet-On-Tight-HDAC7 treated, or not, with doxycycline were immunoprecipitated with anti-M2 agarose beads and analyzed by western blotting with the indicated antibodies. (d) Namalwa-Tet-On-Tight-HDAC7 cells were transduced with lentiviral vectors for the expression of the control shRNA or the shRNAs targeting HDAC3, and GFP-positive cells were purified by flow cytometry. HDAC3 protein levels were assessed by western blot. (e) SD-1-Tet-On-Tight-HDAC7 and Namalwa-Tet-On-Tight-HDAC7 cells transduced with either pLKO.1-shRNA control or pLKO.1-shHDAC3KD1+KD2 lentiviral vectors were cultured and treated, or not, with doxycycline. At the indicated times after treatment, the cell number was assessed by cell counting. Trypan blue-dyed cells were omitted from the cell counts. Means  $\pm$  S.D. of the three independent experiments performed in triplicate. (f) Western blots for HDAC7, MEF2C, c-Myc and HDAC3 in B-ALL and lymphoma cell lines

Strikingly, we observed that HDAC3 knockdown in both cell lines reduced cell growth in the absence of HDAC7, indicating that targeting HDAC3 would also have an anti-oncogenic effect. However, in the presence of HDAC7, lowering HDAC3 levels did not lead to a rescue in the cell growth block induced by HDAC7 (Figure 6e). This result indicates that HDAC7 may possess an intrinsic enzymatic activity independent of HDAC3. Next we wondered whether the expression of HDAC7 partners could be deregulated in leukemia and lymphoma cells expressing HDAC7. To test this possibility, we determined the protein levels of HDAC3, MEF2C and c-Myc in leukemia and lymphoma cell lines. As expected, most of the cell lines express high levels of c-Myc (Figure 6f). However, we did not observe differences in the expression of HDAC3 between the cell lines tested (Figure 6f). This supports the finding that HDAC7 exerts its anti-oncogenic effect in an HDAC3-independent manner. Strikingly, we observed that in contrast to SD-1 and Namalwa cells that express the TF MEF2C, many of the other cell lines either lack or express very low levels of this TF. Therefore, the absence of MEF2C may explain why those cell lines can tolerate normal HDAC7 levels. Altogether, these experiments demonstrate that both the HDAC7–MEF2C interaction and its catalytic domain, are necessary for HDAC7 to reduce the viability of SD-1 and Namalwa cells.

## Discussion

We present data demonstrating that the transcriptional repressor HDAC7 has a potent anti-oncogenic effect in particular types of B-ALL and B-cell lymphoma. First, we report the loss of HDAC7 expression in pro-B-ALL patients and in established B-ALL and B lymphoma cell lines. Second, we show that HDAC7 expression induces apoptosis and inhibits the oncogenic potential of the cell lines tested *in vitro* and *in vivo*. Third, using genome-wide transcriptome profiling we show that ectopically expressed HDAC7 induces the expression of apoptotic genes and leads to the downregulation of key oncogenes such as c-Myc. And fourth, we report the key finding that samples from pro-B-ALL patients present low levels of HDAC7, which are associated with high levels of c-Myc expression.

The idea that HDACs are aberrantly overexpressed in cancer has been prevalent for some time, to the point where it is stated as dogma. In fact, inhibition of HDACs has been reported to have promising effects in cancer treatment.<sup>18</sup> However, most HDIs are disadvantaged by their lack of enzyme specificity and have a broad range of potential side effects.<sup>28</sup> Our findings from this study reveal an unexpected anti-oncogenic function for an HDAC in pro-B-ALL and B-cell lymphoma. We demonstrated that the expression of a crucial HDAC, HDAC7, for B lymphocyte biology is lost in pro-B-ALL patients and in the B-ALL and B-cell lymphoma cell lines, and that its re-expression has a potent anti-oncogenic effect. In this regard, it is important to note that under-expression levels, truncating or inactivating mutations in some HDACs in cancer have also been reported.<sup>18</sup> Recently, Heideman *et al.*<sup>29</sup> demonstrated that the reduction in HDAC1 and HDAC2 expression levels *in vivo* brings about T-cell lymphomagenesis owing to a block in the early thymocyte

development. A different study demonstrated that the lack of HDAC3 specifically in the liver leads to the development of hepatocellular carcinomas.<sup>30</sup> Therefore, our understanding of the contribution of specific HDACs to a given cancer type continues to be incomplete. Efforts are needed to establish definitively the role of specific HDACs and whether they are overexpressed, underexpressed or mutated in a particular cancer. This will allow for the design and development of HDAC isoform-specific HDIs or other molecules that can modulate the expression of a particular HDAC.

Several reports have described a potential role for HDAC7 in hematological malignancies.<sup>27,31–34</sup> However, the functional contribution of HDAC7 to B-ALL remains to be elucidated. In an elegant study using a PiggyBac transposon screening in mice, Rad *et al.*<sup>27</sup> revealed that HDAC7 is a target gene in hematopoietic cancers. In addition, HDAC7 has been shown to be overexpressed in childhood ALL.<sup>34</sup> This discrepancy with our data could be explained by the different analytical methods used in the two studies. Tone and colleagues analyzed 94 samples from childhood ALL patients, of which 78 corresponded to B-ALL and only 4 had a pro-B-ALL immunophenotype.<sup>34</sup> In the present work, we took advantage of a data set obtained in an integrative epigenomic study where they analyzed adult B-ALL patients distinguishing different immunophenotypes.<sup>35</sup> Performing an accurate analysis of the expression of HDAC7, we found that HDAC7 was significantly underexpressed in pro-B-ALL patients. Therefore, it is possible that Gonzaga and colleagues did not find low levels of HDAC7 because pro-B-ALL was underrepresented in their study.

Why is HDAC7 underexpressed in specific types of B-ALL and B-cell lymphoma? Leukemogenesis and lymphomagenesis are complex malignant processes that may comprise a broad number of driver mutations, rearrangements and translocations in crucial genes, which are considered as primary lesions. We speculate that the loss of HDAC7 expression in particular types of leukemia and lymphoma may be the result of the transcriptome changes induced by a specific primary lesion. Several mechanisms could account for the loss of HDAC7 expression in leukemia and lymphoma. First, it is possible that the HDAC7 gene suffers from DNA methylation leading to its epigenetic silencing. A second potential mechanism responsible for the deregulation of HDAC7 is the action of microRNAs. In fact, another class IIa HDAC, HDAC4, has been reported to be a target of miR-155 in a Eu-miR-155 transgenic mouse model.<sup>36</sup> Eu-miR-155 mice exhibit high proliferation rates of pre-B cells and develop lymphoma/leukemia. Croce and colleagues have shown that miR-155 targets HDAC4, leading to its underexpression, and that the ectopic expression of HDAC4 in diffuse large B-cell lymphoma cells inhibits miR-155-induced proliferation and increases the apoptosis of the cells.<sup>36</sup> The elucidation of the molecular mechanisms involved in the repression of HDAC7 in pro-B-ALL and B-cell lymphoma is a current focus of study in our laboratory. The modulation of HDAC7 expression in specific types of B-ALL and B-cell lymphoma leading to the induction of apoptosis and the downregulation of the c-Myc oncogene may be a promising therapeutic pathway in future. On the basis of this study, HDAC7 appears to be a promising therapeutic target in these particular types of hematological

disease. Our data will help to generate new, highly specific and personalized therapies for the treatment of pro-B-ALL and B-cell lymphoma.

## Materials and methods

**Plasmids and retroviral supernatant generation.** pRetro-X-Tight-Pur-HDAC7 constructs were generated by cloning full length or deleted HDAC7 cDNAs obtained by EcoRI digestion of the pcDNA3.1-HDAC7 plasmids into the pRetro-X-Tight-Pur vector (Takara Bio, Otsu, Japan). MSCV-c-Myc-GFP retroviral vector was obtained from Addgene (Cambridge, MA, USA), pLKO.1-shHDAC3KD1-GFP and pLKO.1-shHDAC3KD2-GFP constructs were generated by cloning two validated shRNAs sequences that target HDAC3 (SIGMA, St. Louis, MO, USA), into the pLKO.1-GFP lentiviral vector. For retrovirus generation, pRetro-X-Tight-Pur-HDAC7 and pRetro-X-Tet-On-Advanced (Takara Bio) plasmids were transfected into the packaged cell line Platinum-E and the supernatant was collected 48 h post transfection. For lentivirus generation, the generated constructs were transfected into 293 T cells together with enveloped and packaging plasmids and supernatant was collected 48 h post transfection.

**Retroviral transduction and doxycycline treatment.** Inducible HDAC7 expression in SD-1 and Namalwa cell lines was achieved by the generation of the SD-1 and Namalwa Tet-On-Tight-HDAC7 cell lines. In brief, SD-1 and Namalwa cells were first infected with the supernatant containing the pRetro-X-Tet-On-Advanced viral particles overnight and 72 h later selected with 1.5  $\mu$ g/ml geneticin (GIBCO, Carlsbad, CA, USA). Next the selected cells were infected with the pRetro-X-Tight-Pur-HDAC7 viral particles overnight and after 72 h selected with 3  $\mu$ g/ml puromycin. For HDAC7 expression, cells were treated with 500 ng/ml of doxycycline for the indicated periods. For c-Myc expression or HDAC3 knockdown, SD-1 and Namalwa Tet-On-Tight-HDAC7 cell lines were transduced with MSCV-Empty-GFP, MSCV-c-Myc-GFP, pLKO.1-GFP and pLKO.1-shHDAC3KD1+KD2-GFP and GFP-positive cells were sorted by flow cytometry.

**Proliferation and cell cycle assays.** For the MTT assays,  $5 \times 10^4$  cells were plated onto 24-well plates. At different times, MTT was added at a final concentration of 5 mg/ml. After incubation for 3 h (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), the blue formazan derivative was solubilized in dimethyl sulfoxide and the absorbance was measured at 570 nm. Cell proliferation was also assessed by cell counting. Cell cycle and apoptosis were assessed by propidium iodide staining (distribution of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S and G<sub>2</sub>/M phase, and in SudG<sub>0</sub>) followed by flow cytometry analysis using a Gallios flow cytometer (Gallios, Beckman-Coulter, Brea, CA, USA).

**Co-immunoprecipitation assays.** Co-immunoprecipitation assays were performed as previously described in.<sup>26</sup>

**Mouse xenograft assay.** Five-week-old male athymic *nu/nu* mice (Charles River, Wilmington, MA, USA), housed under specific pathogen-free conditions, were used in this study. To minimize tumor growth dispersion observed by subcutaneous injection of SD-1 cell line, SD-1-Tet-On-Tight-HDAC7 cells were developed in two steps: (i)  $5 \times 10^6$  SD-1-Tet-On-Tight-HDAC7 cells were subcutaneously injected into the back of  $n=5$  animals. Once the tumors grew, they were harvested, cut into equal size small fragments and subcutaneously transplanted into the back of other nude mice. Mice bearing subcutaneous engrafted tumors (150–200 mm<sup>3</sup>) were randomly allocated in the two treatment groups: (i) mice drank 1% glucose; and (ii) drank 1% glucose plus 2 mg/ml doxycycline in water. The tumor growth was recorded twice per week and tumor volume (in mm<sup>3</sup>) was estimated according to the formula  $V = \pi/6 \times L \times W^2$ , (W) width and (L) length. For Namalwa-Tet-On-Tight-HDAC7 cells ( $1.5 \times 10^6$ ) were injected orthotopically into the middle of the spleen and the tumors were monitored by palpation twice a week. Likewise, mice were randomly allocated in the two treatment groups: (i) mice drank 1% glucose; and (ii) drank 1% glucose plus 2 mg/ml doxycycline in water. At the time of killing (30 days after induction in SD-1 cells and 15 days for Namalwa cells) all the tumors were excised and weighed, analyzed macroscopically and by hematoxylin and eosin tissue staining for histological assessment. All experiments were approved by the IDIBELL animal care and use committee.

**Immunofluorescence.** Tumors were fixed in 4% formaldehyde overnight at 4 °C, embedded in paraffin wax and sectioned at 4  $\mu$ m. For immunofluorescence staining, antigen retrieval was performed in 10 mM sodium citrate (pH 6.0). Tumor sections were

blocked with 5% horse serum in phosphate-buffered saline for 1 h at room temperature and incubated with primary antibodies overnight at 4 °C. The primary antibody used was anti-Ki67 (Thermo Scientific, Alcobendas, Spain). Tumor sections were then incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. Nuclei were stained using 4',6-diamidino-2-phenylindole. Samples were imaged on a Leica TCS SP5 spectral confocal microscope (LEICA, Barcelona, Spain), with a 63XNA 1.4 objective and using the LASAF software version 7 (LEICA). Microphotographs were analyzed with Fiji software (<http://fiji.sc/>). In brief, images were analyzed in gray scale and median filtered. More than 2400 cells per animal (three glucose; three glucose+Doxo) were analyzed in Ki67 staining and apoptotic nuclei.

**Western blot.** Western blot analysis was performed according to standard procedures. Western blots were developed with the ECL detection kit (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, USA).

**RT-qPCR expression analyses.** RT-qPCR analysis were performed as previously described in.<sup>20</sup>

**GSE34861 analysis.** Expression profiling (microarray) of 191 samples of adult B-lineage ALL and 3 normal pre-B samples were extracted from GEO database (GSE34861). Raw data were robust multichip average (RMA) normalized using the RMA algorithm in NimbleScan 2.5 software (Roche NimbleGen, Inc, Basel, Switzerland). For differential expression analysis, average Log<sub>2</sub> expression of the normal samples were subtracted from each cancer patient expression data (Log<sub>2</sub> value) for each gene using in house python script. The association between the immunophenotypes of the various B-ALL patients and the downregulated levels of HDAC7 was examined using the Fisher test. Two HDAC7 probes were analyzed: cds1 Homo sapiens histone deacetylase 7A (HDAC7A), transcript variant 1, mRNA and cds2 Homo sapiens histone deacetylase 7A, mRNA (cDNA\_clone\_MGC:74915\_IMAGE:6179239), complete cds. Both the probes were normalized with respect to values of healthy patients. GSE34861 data were analyzed under R statistical language. The *q*-values were obtained from multiple correction by false discovery rate (FDR). The odds ratio (OR) shows the association between ALL immunophenotype and the downregulation of HDAC7. If an OR > 1 indicates that ALL immunophenotype is positively associated with having downregulated levels of HDAC7, whereas OR < 1 indicates negative association between having the specific ALL immunophenotype and HDAC7 downregulation. An OR = 1 indicates no association between ALL immunophenotype and HDAC7 expression. To identify the associations between the characterized cytogenetic features of B-ALL and low levels of HDAC7 expression we applied the Wilcoxon test. Data were analyzed using the R statistical language. To assess the correlation between *c-MYC* and the two HDAC7 probes in the 191 B-ALL patients the Pearson correlation coefficient was computed ( $\rho$ ) and linear regression was performed.

**Microarray experiments.** SD-1 Tet-On-Tight-HDAC7 or SD-1 cells were treated or not for 24 h with doxycycline and collected in Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA was extracted as described above. PCR-amplified RNAs were hybridized against an Affymetrix human array chip (Affymetrix Human Genome U219 Strip, Santa Clara, CA, USA) at the IRB genomics facility. Affymetrix raw CEL files have been deposited in the GEO database (GSE51895).

**Microarray analysis.** Expression data were analyzed using the R statistical program. The RMA method was applied to the raw data. This comprises three steps: convolution background adjustment, probe-level quantile normalization and median polish summarization. Linear model analysis (LIMMA package, Bioconductor) was used to identify the significant upregulated and downregulated genes. A FDR multiple test was applied to the *P*-values obtained from the LIMMA procedure; the upregulated and downregulated genes were considered to be significant for the values of adjusted  $P \leq 0.05$ . Values of  $\log_2FC \geq 0.5$  and  $\log_2FC \leq -0.5$ , respectively, indicated the upregulated and downregulated genes.

**Functional and pathway enrichment analysis.** Functional annotation of differentially expressed genes was based on GO (Consortium, 2000; <http://www.geneontology.org>) as extracted from the Ensembl and the KEGG pathway databases. Accordingly, all genes were classified into ontology categories. We took only the GO/pathway categories that had at least 10 annotated genes. We used GTools for enrichment analysis and heatmap generation<sup>37</sup> ([www.gitools.org](http://www.gitools.org)). The resulting *P*-values were adjusted for multiple testing using Benjamin and Hochberg's FDR method.

**Putative TF motif occurrence in promoter region.** The possible occurrence of the TF motif in the promoter region (500-bp upstream and 200-bp downstream of the transcription start site) was predicted with the STORM algorithm,<sup>38</sup> applying a cutoff of  $P=0.0000125$  and position frequency matrices from the TRANSFAC database<sup>39</sup> (professional version release 2009.4).

**Statistical analyses.** All data, except those from the arrays, were analyzed using GraphPad Prism5 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Student's *t*-test and one- or two-way ANOVA, incorporating Bonferroni multiple comparisons, were carried out to evaluate the differences between the groups.

### Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements.** This work was supported by a grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO; SAF2011-28290; to MP). MP was supported by a Ramón y Cajal contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICIIN). LR-G was supported by an IDIBELL PhD fellowship. NL-B acknowledges the funding from MICIIN (SAF2012-36199). This work benefitted from data assembled by the Immgen Consortium.

- Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT *et al*. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 2005; **121**: 295–306.
- Yoshida T, Ng SY, Zuniga-Pflucker JC, Georgopoulos K. Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat Immunol* 2006; **7**: 382–391.
- Stehling-Sun S, Dade J, Nutt SL, DeKoter RP, Camargo FD. Regulation of lymphoid versus myeloid fate 'choice' by the transcription factor Mef2c. *Nat Immunol* 2009; **10**: 289–296.
- Bain G, Maandag EC, Izon DJ, Amsen D, Kruisbeek AM, Weintraub BC *et al*. E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 1994; **79**: 885–892.
- Bain G, Robanus Maandag EC, te Riele HP, Feeney AJ, Sheehy A, Schlissel M *et al*. Both E12 and E47 allow commitment to the B cell lineage. *Immunity* 1997; **6**: 145–154.
- Zhuang Y, Soriano P, Weintraub H. The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* 1994; **79**: 875–884.
- Lin H, Grosschedl R. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* 1995; **376**: 263–267.
- Dengler HS, Baracho GV, Omori SA, Bruckner S, Arden KC, Castrillon DH *et al*. Distinct functions for the transcription factor Foxo1 at various stages of B cell differentiation. *Nat Immunol* 2008; **9**: 1388–1398.
- Urbánek P, Wang ZQ, Fetka I, Wagner EF, Busslinger M. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* 1994; **79**: 901–912.
- Kuiper RP, Schoenmakers EF, van Reijmersdal SV, Hehir-Kwa JY, van Kessel AG, van Leeuwen FN *et al*. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia* 2007; **21**: 1258–1266.
- Mullighan CG. Genomic profiling of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011; **24**: 489–503.
- Delgado MD, León J. Myc roles in hematopoiesis and leukemia. *Genes Cancer* 2010; **1**: 605–616.
- Tijchon E, Havinga J, van Leeuwen FN, Scheijen B. B-lineage transcription factors and cooperating gene lesions required for leukemia development. *Leukemia* 2013; **27**: 541–552.
- Delogu A, Schebesta A, Sun Q, Aschenbrenner K, Perlot T, Busslinger M. Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* 2006; **24**: 269–281.
- Treiber T, Mandel EM, Pott S, Györy I, Firner S, Liu ET *et al*. Early B cell factor 1 regulates B cell gene networks by activation, repression, and transcription-independent poising of chromatin. *Immunity* 2010; **32**: 714–725.
- Martin M, Kettmann R, Dequiedt F. Class IIa histone deacetylases: conducting development and differentiation. *Int J Dev Biol* 2009; **53**: 291–301.
- Parra M, Verdin E. Regulatory signal transduction pathways for class IIa histone deacetylases. *Curr Opin Pharmacol* 2010; **10**: 454–460.
- Barneda-Zahonero B, Parra M. Histone deacetylases and cancer. *Mol Oncol* 2012; **6**: 579–589.

- Shi BW, Xu WF. The development and potential clinical utility of biomarkers for HDAC inhibitors. *Drug Discov Ther* 2013; **7**: 129–136.
- Barneda-Zahonero B, Román-González L, Collazo O, Rafati H, Islam AB, Bussmann LH *et al*. HDAC7 is a repressor of myeloid genes whose downregulation is required for transdifferentiation of pre-B cells into macrophages. *PLoS Genet* 2013; **9**: e1003503.
- Dequiedt F, Kasler H, Fischle W, Kiermer V, Weinstein M, Herndier BG *et al*. HDAC7, a thymus-specific class II histone deacetylase, regulates Nur77 transcription and TCR-mediated apoptosis. *Immunity* 2003; **18**: 687–698.
- Kasler HG, Verdin E. Histone deacetylase 7 functions as a key regulator of genes involved in both positive and negative selection of thymocytes. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 5184–5200.
- Kasler HG, Young BD, Mottet D, Lim HW, Collins AM, Olson EN *et al*. Histone deacetylase 7 regulates cell survival and TCR signaling in CD4/CD8 double-positive thymocytes. *J Immunol* 2011; **186**: 4782–4793.
- Kasler HG, Lim HW, Mottet D, Collins AM, Lee IS, Verdin E. Nuclear export of histone deacetylase 7 during thymic selection is required for immune self-tolerance. *EMBO J* 2012; **31**: 4453–4465.
- Parra M, Kasler H, McKinsey TA, Olson EN, Verdin E. Protein kinase D1 phosphorylates HDAC7 and induces its nuclear export after T-cell receptor activation. *J Biol Chem* 2005; **280**: 13762–13770.
- Parra M, Mahmoudi T, Verdin E. Myosin phosphatase dephosphorylates HDAC7, controls its nucleocytoplasmic shuttling, and inhibits apoptosis in thymocytes. *Genes Dev* 2007; **21**: 638–643.
- Rad R, Rad L, Wang W, Cadinanos J, Vassiliou G, Rice S *et al*. PiggyBac transposon mutagenesis: a tool for cancer gene discovery in mice. *Science* 2010; **330**: 1104–1107.
- Khan O, La Thangue NB. HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunol Cell Biol* 2012; **90**: 85–94.
- Heideman MR, Wiltling RH, Yanover E, Velds A, de Jong J, Kerkhoven RM *et al*. Dosage-dependent tumor suppression by histone deacetylases 1 and 2 through regulation of c-Myc collaborating genes and p53 function. *Blood* 2013; **121**: 2038–2050.
- Bhaskara S, Knutson SK, Jiang G, Chandrasekharan MB, Wilson AJ, Zheng S *et al*. Hdac3 is essential for the maintenance of chromatin structure and genome stability. *Cancer Cell* 2010; **18**: 436–447.
- Van Damme M, Crompot E, Meuleman N, Mineur P, Bron D, Lagneaux L *et al*. HDAC isoenzyme expression is deregulated in chronic lymphocytic leukemia B-cells and has a complex prognostic significance. *Epigenetics* 2012; **7**: 1403–1412.
- Yan-Fang T, Dong W, Li P, Wen-Li Z, Jun L, Na W *et al*. Analyzing the gene expression profile of pediatric acute myeloid leukemia with real-time PCR arrays. *Cancer Cell Int* 2012; **12**: 40.
- Wang JC, Kafeel MI, Avezbakiev B, Chen C, Sun Y, Rathnasabapathy C *et al*. Histone deacetylase in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology* 2011; **81**: 325–329.
- Moreno DA, Scrideli CA, Cortez MA, de Paula Queiroz R, Valera ET, da Silva Silveira V *et al*. Differential expression of HDAC3, HDAC7 and HDAC9 is associated with prognosis and survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2010; **150**: 665–673.
- Geng H, Brennan S, Milne TA, Chen WY, Li Y, Hurtz C *et al*. Integrative epigenomic analysis identifies biomarkers and therapeutic targets in adult B-acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Discov* 2012; **2**: 1004–1023.
- Sandhu SK, Volinia S, Costinean S, Galasso M, Neinast R, Santhanam R *et al*. miR-155 targets histone deacetylase 4 (HDAC4) and impairs transcriptional activity of B-cell lymphoma 6 (BCL6) in the Eμ-miR-155 transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 20047–20052.
- Perez-Llamas C, Lopez-Bigas N. Gitoools: analysis and visualisation of genomic data using interactive heat-maps. *PLoS One* 2011; **6**: e19541.
- Schones DE, Smith AD, Zhang MQ. Statistical significance of cis-regulatory modules. *BMC Bioinformatics* 2007; **8**: 19.
- Matys V, Kel-Margoulis OV, Fricke E, Liebich I, Land S, Barre-Dirrie A *et al*. TRANSFAC and its module TRANSCOMP: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 2006; **34** (Database issue) D108–D110.



Cell Death and Disease is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International Licence. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons licence, users will need to obtain permission from the licence holder to reproduce the material. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)