



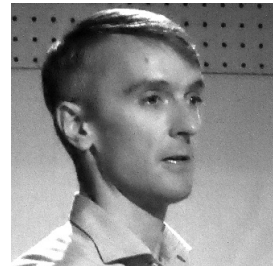
## Introducció

Es poden distingir més de dos-cents tipus cel·lulars en un ésser humà adult. Aquestes cèl·lules deriven totes d'una sola cèl·lula, el zigot fecundat, i es poden distingir per les profundes diferències estructurals, morfològiques i funcionals que hi ha entre elles. Malgrat aquestes diferències, totes contenen aproximadament la mateixa seqüència d'ADN en cada individu. Sorgeix, doncs, la qüestió de com aconsegueixen dos cèl·lules mostrar característiques dissimilars basades en informació quasi idèntica. La resposta es troba en la regulació de com i quan s'utilitza la informació entre tota la que es continguda en l'ADN, processos coneguts amb el nom de *regulació gènica*. Quan una cèl·lula es divideix, cada cèl·lula filla o bé segueix mantenint una funcionalitat idèntica a la cèl·lula mare, o bé es diferencia en una cèl·lula amb una funcionalitat diferent i més especialitzada. Així doncs, es defineix una jerarquia de tipus cel·lulars, amb les cèl·lules més diferenciades a la base i amb les cèl·lules més indiferenciades, o pluripotents, és a dir, amb capacitat per generar més tipus cel·lulars, al cim. Durant el desenvolupament embrionari, per exemple, de les cèl·lules de la mòrula se'n diu *totipotents*, ja que poden donar peu a tots els tipus cel·lulars que componen el cos humà; de les cèl·lules mare o progenitores que formen i mantenen determinats teixits en adults, en canvi, se'n diu *pluripotents*, ja que només poden generar un nombre restringit de tipus cel·lulars.

La regulació gènica es manifesta a diferents nivells, i resulta amb programes d'expressió gènica que defineixen les diferències morfològiques i funcionals entre tipus cel·lulars. Aquest fenomen és per exemple visible en diagrames d'agrupament d'ARN missatger (ARNm) provinent de diferents tipus cel·lulars (figura 1). Per una banda, intervenen factors de transcripció, que són proteïnes necessàries per a l'expressió dels gens. La presència i el funcionament correcte d'aquests factors determinarà la producció d'un gran ventall de molècules que contribuiran a la identitat cel·lular. Algunes mutacions en factors de transcripció han estat associades amb deficiències que impedeixen a les cèl·lules dur a terme les

## Adam Cruickshank

Doctor en ciències mèdiques i de la salut (Copenhaguen University), llicenciat en biologia (UB), Màster en biotecnologia (U. Califòrnia, Irvine). Especialista en biologia molecular i trastorns de la sang i leucèmia



Adam Cruickshank

## Subunitats reguladores de la cromatina i la leucèmia: Identificació de noves dianes terapèutiques

funcions esperades i poden resultar en condicions patològiques, com per exemple diferents tipus de càncer: el bloqueig per Runx1, Gata1, Pu.1, Notch en diferents etapes de diferenciació de cèl·lules sanguínies, per exemple, condueix a l'acumulació de cèl·lules mare o progenitores i al desenvolupament de trastorns de la sang en forma de neoplàsies més o menys malignes (figura 2).

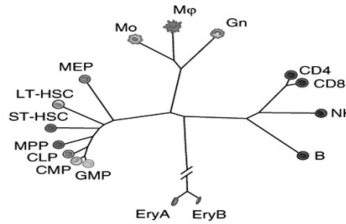


Figura 1. Agrupament de tipus cel·lulars segons ARN

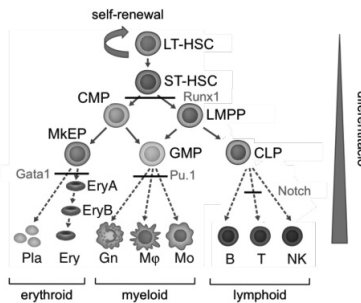


Figura 2. Diferenciació de cèl·lules de la sang. Runx1, Gata1, Pu.1, Notch: alguns defectes provoquen bloqueig en la diferenciació i acumulació de cèl·lules malignes

Un altre nivell de regulació de l'expressió gènica es fa possible pels processos epigenètics: mitjançant l'associació d'ADN amb proteïnes per formar la cromatina, almenys tres processos modulen l'accessibilitat de l'ADN i per tant el nivell d'expressió d'un locus genètic: la metilació de l'ADN; modificacions a les proteïnes a les quals s'envolta l'ADN, les histones, i la remodelació de la cromatina en processos dependents d'ATP. Els enzims que interactuen amb les modificacions d'histones poden ser categoritzats en tres categories: escriptors, esborradors i llegidors (figura 3).

En un estudi dut a terme com a projecte de doctorat i postdoctorat, vàrem utilitzar una biblioteca de petits ARN llaç (*small-hairpin* RNA, shRNA) per disminuir l'expressió de proteïnes relacionades amb la metilació de l'ADN, les

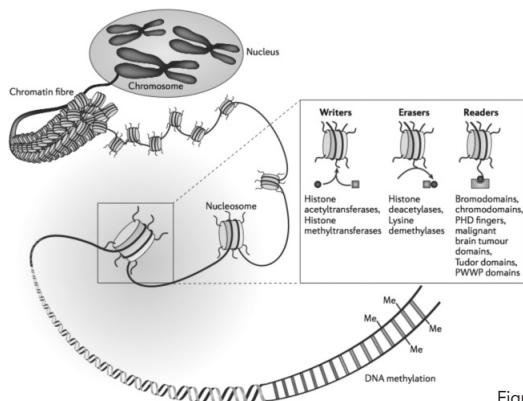


Figura 3

modificacions de les histones i la remodelació de la cromatina. La biblioteca contenia gairebé 1.000 seqüències contra 300 d'aquests gens. Comparant la velocitat de proliferació de cèl·lules leucèmiques que expressaven cada una petits ARN llaç amb la mateixa seqüència, a la velocitat de proliferació de cèl·lules sanes que contien els mateixos petits ARN llaç, va ser possible identificar gens necessaris específicament per a la proliferació de cèl·lules canceroses. D'aquesta manera es van identificar cinc dianes potencials per al tractament terapèutic de la leucèmia i que tenien un efecte mínim sobre cèl·lules sanguínies sanes.

### Rellevància per a la societat

Els objectius d'aquest projecte inclouen la identificació de nous enzims implicats funcionalment en aquest trastorn hematopoètic, i intents racionals d'analitzar el mecanisme a través del qual exerceixen la seva acció. En descriure els mecanismes moleculars causants de la malaltia, teníem com a objectiu proporcionar coneixements que permetessin dissenyar teràpies orientades efectives. Hi ha actualment un fort interès per descobrir noves teràpies específiques per als trastorns de la sang donada la intensitat dels règims quimioterapèutics actuals.

Amb el coneixement que proporciona la recerca bàsica, es dona la benvinguda a la possibilitat d'explorar noves oportunitats no aprofitades per superar la bretxa entre la molècula i la societat.

Amb un finançament públic i privat que flueix a totes les etapes del descobriment de fàrmacs, hi ha un augment clar dels esforços d'investigació que marquen l'ona epigenètica: la Comissió Europea va llançar el seu projecte Blueprint, de 39,9 milions d'euros, que reuneix 41 instituts i empreses per generar almenys 100 epigenomes de referència de cèl·lules sanes i leucèmiques. Igualment notable és que gairebé totes les grans companyies farmacèutiques desenvolupen el seu propi equip de recerca centrat en epigenètica o apareixen amb biotecnologia especialitzada, amb una inversió considerable, com ara GlaxoSmithKline, que va pagar 15 milions d'euros per associar-se amb Epizyme en un acord en el qual Epizyme podria rebre fins a 460 milions d'euros addicionals, i el gegant nord-americà Genentech, que va invertir 95 milions de dòlars en una associació amb Constellation l'any que es va finalitzar aquesta investigació. Com a punt de partida d'aquest projecte, es van optimitzar sistemes *in vitro* i *in vivo* de detecció de noves dianes terapèutiques emprant petits ARN llaç. Les biblioteques, en combinació amb els models de ratolí generats, constitueixen eines valuoses per investigar simultàniament el paper de diversos centenars de gens en el manteniment de leucèmia. En combinar els resultats d'una aplicació extremament eficient *in vitro* amb un entorn fisiològicament rellevant *in vivo* i contrastant-los, la configuració experimental proporciona una plataforma elegant que enriqueix els candidats genètics d'alt valor (figura 6).

### **Estratègia experimental**

Vàrem utilitzar una biblioteca de petits ARN llaç per identificar gens que requereixen un nivell complet d'expressió per sostenir la proliferació de cèl·lules leucèmiques en ratolins.

La validació posterior i la caracterització dels gens candidats varen requerir assaigs d'especificitat, assaigs de validació, proliferació i diferenciació *in vivo* en cèl·lules humanes i de ratolí, rescat per expressió ectòpica, estudis estructurals, incloent-hi mutagènesi dels dominis catalítics previstos, identificació de proteïnes d'interacció i perfils d'associació amb l'ADN.

### ***Producció de cèl·lules leucèmiques de ratolí***

Vàrem generar models de leucèmia mieloide aguda (LMA) amb cèl·lules de ratolí mitjançant la transducció retroviral de

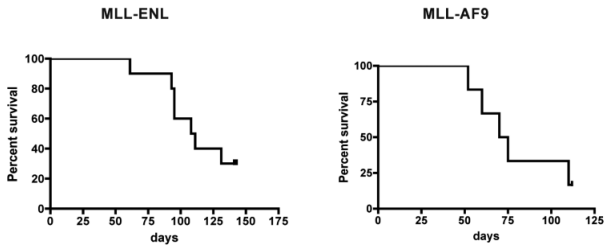


Figura 4. Supervivència de ratolins amb cèl·lules que expressen MLL-AF9 i MLL-ENL

cèl·lules de medul·la òssia de ratolins C57BL/6 que expressen el marcador c-Kit amb un vector retroviral (pMSCV) que portava l'ADNc codificant per MLL-AF9 o MLL-ENL humà. Les cèl·lules transformades *in vitro* MLL-AF9 i MLL-ENL van ser trasplantades en ratolins irradiats (900Gy) B6.SJL mitjançant una injecció dins la cua. Es van recollir cèl·lules leucèmiques primàries de la medul·la òssia i la melsa, que van ser analitzades per citometria de flux. El trasplantament secundari va causar el desenvolupament de leucèmia mieloide MLL-AF9 o MLL-ENL amb una latència mitjana de 70 i 100 dies, respectivament, en ratolins receptors (figura 4). Cèl·lules de medul·la òssia i de melsa CD45.2 + (donants) d'aquests ratolins mostren la leucèmia mieloide esperada amb un immunofenotip de maduració (Mac1 +, Gr1 +, c-Kit +, CD3-, B220-).

### Construcció de biblioteques de petits ARN llaç

Es va generar una biblioteca de petits ARN llaç (*small hairpin* RNA, shRNA) centrada en proteïnes amb funció epigenètica de 895 shRNA contra 319 gens de ratolí mitjançant la subclonació a partir d'una biblioteca pGIPZ (Open Biosystems®) en vectors retrovírics miRNA que expressen shRNA (pMSCV-LTR-mi30- SV40/GFP, d'ara endavant "pMLS"). La subclonació simultània i les eficiències de transducció de les cèl·lules leucèmiques van ser validades per seqüenciació d'ADN. La biblioteca també contenia tres controls negatius sense diana (Scr1, 2, 3) i diversos controls positius dirigits contra gens coneguts i importants per a la proliferació leucèmica MLL: Myb, Brd4 i Meis1, o gens essencials: Pcn1, Rpa3 i Polr2b.

Més endavant, també vam comparar dos llibreries shRNA pLKO.1-puromycina que contenien 2360 shRNA contra 601 gens epigenètics humans i de ratolí (Sigma-Aldrich®).

L'ús de la biblioteca pMLS per al cribratge era més convenient, ja que podem emprar citometria de flux amb el marcador proteïna verda fluorescent (GFP) per enriquir les cèl·lules transduïdes evitant l'ús d'antibiòtics, i controlar l'eficiència de la transducció mantenint la multiplicitat d'infecció igual o inferior a 1. Això es va aconseguir mantenint l'eficiència de transducció per sota del 30%, tal com es determina per valoració de cotransducció (Zuber *et al.*, 2011). Les llibreries pLKO.1 van ser útils per validar els nostres gens candidats de forma individual, amb seqüències diana diferents i en línies cel·lulars leucèmiques humanes.

### **Cribratge *in vitro* en cèl·lules sanes**

Per tal d'excloure possibles shRNA que mostressin toxicitat general, és a dir, tant contra cèl·lules leucèmiques com contra cèl·lules sanes, vam comparar resultats del cribratge *in vivo* MLL-AF9 amb un cribratge anàleg realitzat en cèl·lules de medul·la òssia (BM) no leucèmiques que expressaven c-Kit. Les cèl·lules transduïdes es van cultivar durant catorze dies, i es van prendre alíquotes cel·lulars en quatre punts de temps: t0, t2, t6 i t14. La lectura es va basar en el canvi en els nombres d'shRNA entre la referència (t0) i la mostra leucèmica (t2, t6 i t14) per a cada shRNA de la biblioteca (figura 5).

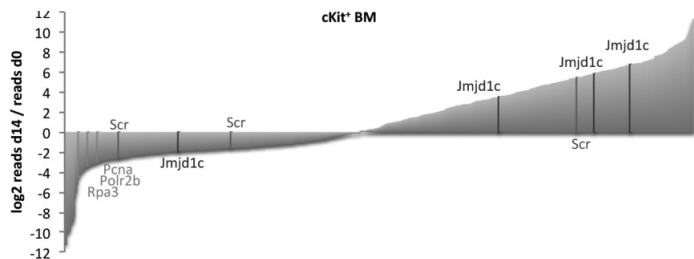


Figura 5. Cribratge de la biblioteca shRNA en cèl·lules cKit sanes (temps=t14). Scr: controls negatius, Pcna, Polr2b, Rpa3: controls positius, Jmjd1c: gen prova

### **Cribratge *in vivo* en cèl·lules MLL-AF9**

El cribratge es va realitzar mitjançant el trasplantament de cèl·lules leucèmiques infectades amb la biblioteca retroviral de shRNA en ratolins irradiats letalment (trasplantament secundari), amb duplicat. Part de les cèl·lules infectades es van trasplantar en ratolins i la resta es va guardar com a mostra de referència. Després de nou dies, es van aïllar les cèl·lules leucèmiques i es va extreure l'ADN genòmic de les

mostres de referència i de les cèl·lules leucèmiques. Els shRNA es van amplificar a partir de l'ADN genòmic i es van sotmetre a la seqüenciació Illumina HiSeq®.

La interpretació de l'experiment es va basar en el canvi en el nombre de cada shRNA entre la mostra de referència i les mostres leucèmiques per a cada shRNA de la biblioteca.

Aquesta estratègia ens va permetre detectar tant els oncògens putatius (shRNA esgotats en cèl·lules leucèmiques) com els gens supressors de tumors (shRNA enriquits a les cèl·lules leucèmiques).

S'havien d'estimar diversos paràmetres perquè aquesta estratègia tingués possibilitat d'èxit, incloent-hi avaluar el nombre inicial de clons que expressen cada shRNA desitjat, l'eficàcia de la transducció de cèl·lules leucèmiques, la tasa de supervivència de les cèl·lules trasplantades, la freqüència de cèl·lules iniciadores de leucèmia en la mostra trasplantada, i el nombre màxim de cèl·lules que podríem trasplantar per ratolí. Aquestes restriccions addicionals significaven que calia dividir la biblioteca en 31 grups de 51 shRNA: 45 shRNA de prova, 3 controls negatius i 3 controls positius.

Amb les dades dels dos cribratges, podríem seleccionar candidats amb un alt potencial de validació, ja que serien fisiològicament rellevants (cribratge *in vivo*), específics a la leucèmia (sense puntuar en el cribratge amb cèl·lules sanes) i tractables en cultiu cel·lular (figura 6).

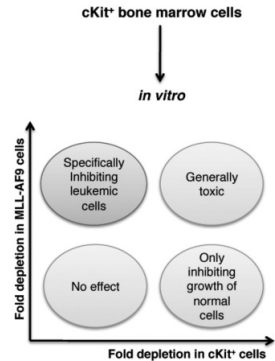


Figura 6. Interpretació dels resultats de cribratge i selecció de candidats

### La genomivació (knockdown) dels components del complex BAF inhibeix el manteniment LMA, però no afecta la proliferació de cèl·lules de medul·la òssia normals

Es van seleccionar 20 gens per a consideració (figura 7). Com a criteri, es va exigir que els shRNA esgotessin la proliferació cel·lular d'una forma similar als controls positius en les dos rèpliques i en els dos teixits examinats, i que hi hagués una correlació entre l'eficiència de genomivació mesurada en fibroblasts embrionaris de ratolí (MEF, figura 8C) i la proliferació de cèl·lules leucèmiques MLL-AF9 utilitzant els vectors lentivirals pLKO.1 amb seqüències diana alternatives. Es van identificar cinc dianes farmacològiques potencials, tres subunitats del complex BAF: SMARCA4/BRG1, SMARCD2/BAF60b, DPF2/BAF45d, i les dos demetilases SETD5 i SETD6.

La validació addicional va revelar la importància dels gens

relacionats amb el complex BAF en el manteniment de la capacitat de renovació de cèl·lules leucèmiques (figura 8A). A més a més, alguns ratolins trasplantats amb cèl·lules amb expressió reduïda d'aquestes proteïnes van mostrar una supervivència prolongada (figura 8D). És important destacar que els shRNA orientats contra aquests gens no eren empobrits en cèl·lules de la sang en medul·la òssia cKit sanes (figura 8B) i en el cribratge in vitro realitzat en cèl·lules sanes. Aquest paràmetre va ser mesurat per una puntuació de normalització classificada. L'algorisme va tenir en compte

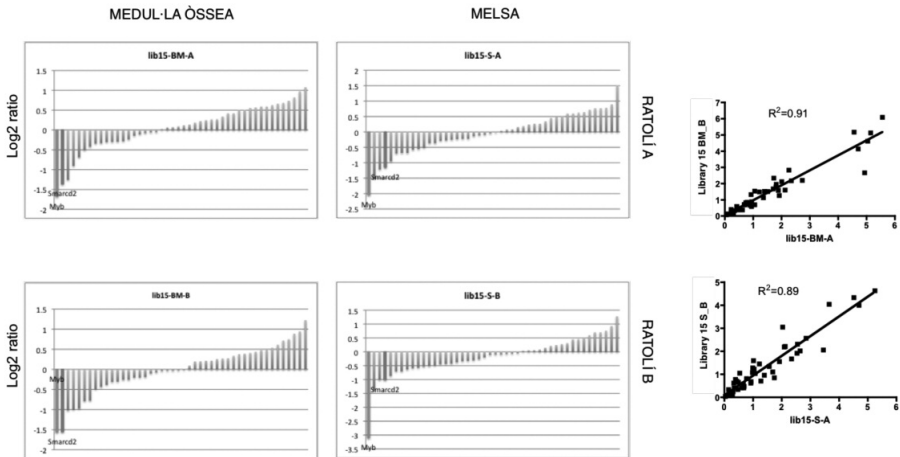


Figura 7. Exemple de cribratge d'shRNA (biblioteca 15 de 31) en cèl·lules leucèmiques de medul·la òssia i melsa. Myb: control positiu Smarcd2: gen prova

cada shRNA a través dels cribratges MLL-AF9 in vivo i c-Kit in vitro per assignar una puntuació centrada en el gen. Puntuacions i rangs dels candidats: SMARCD2: 331, 7; SETD5: 244, 12; SMARCA4: 243, 13; DPF2: -53, 46; SETD6: -79, 54, rang de puntuació = [(- 1372) - 513] 341 gens totals, el que suggereix que aquests cinc gens són requerits per al manteniment de l'LMA, però no l'hematopoesi normal.

### La genominació de Smarca4, Smarcd2 o Dpf2 condueix a apoptosi, canvis de cycle cel·lular i diferenciació mioleide en cèl·lules leucèmiques

Per investigar el defecte de creixement causat per l'esgotament de les subunitats del complex BAF, vam mesurar la fracció de cèl·lules apoptòtiques (cèl·lules tenyides amb Annexin-V) mitjançant anàlisi citomètrica de flux. Les cèl·lules del ratolí



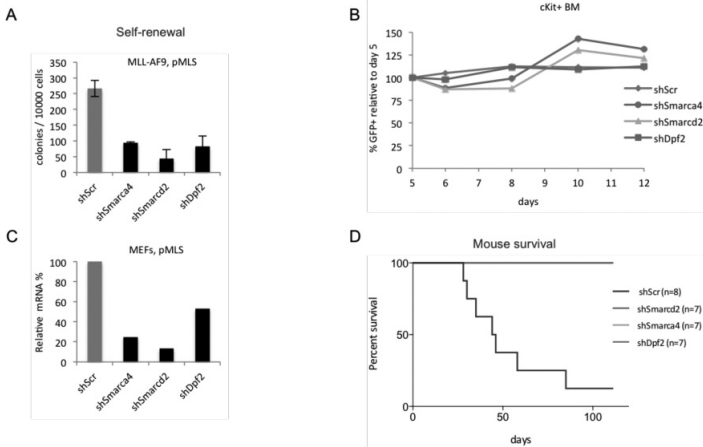


Figura 8

MLL-AF9 amb expressió reduïda de les subunitats BAF presentaven percentatges creixents d'apoptosi en funció del temps en comparació amb shScr (figura 10B). L'aparició de l'apoptosi es va observar després d'una reducció del percentatge de cèl·lules en fase S i una acumulació de cèl·lules a fase G2/M del cicle cel·lular (figura 10A), indicant que l'apoptosi podria ser un resultat d'un bloqueig del cicle cel·lular en aquestes cèl·lules.

Per investigar si la demora en la progressió del cicle cel·lular es devia a la diferenciació completa, es van etiquetar les cèl·lules MLL-AF9 del ratolí quatre dies després de transducció amb anticossos contra c-Kit i Mac1 i es van analitzar mitjançant citometria de flux. L'expressió c-Kit de les cèl·lules mare i cèl·lules progenitores hematopoètiques (HSPC) es va reduir en cèl·lules en què l'expressió de Smarca4, Smarcd2 o Dpf2 va quedar disminuïda en comparació amb el control. Per contra, l'expressió del marcador mieloides Mac1 va augmentar en les poblacions de genominació respecte al control (figura 9A). A més, la tinció de Giemsa May-Grünwald va revelar una freqüència més elevada de morfologies de cèl·lules monocítiques i granulocítiques en poblacions cel·lulars en cèl·lules en què l'expressió de Smarca4, Smarcd2 o Dpf2 va quedar disminuïda (figura 9B). Junts, aquests resultats indiquen que les subunitats de BAF Smarca4, Smarcd2 i Dpf2 tenen un paper important en el manteniment de l'estat indiferenciat i pluripotent de cèl·lules transformades per MLL-AF9.

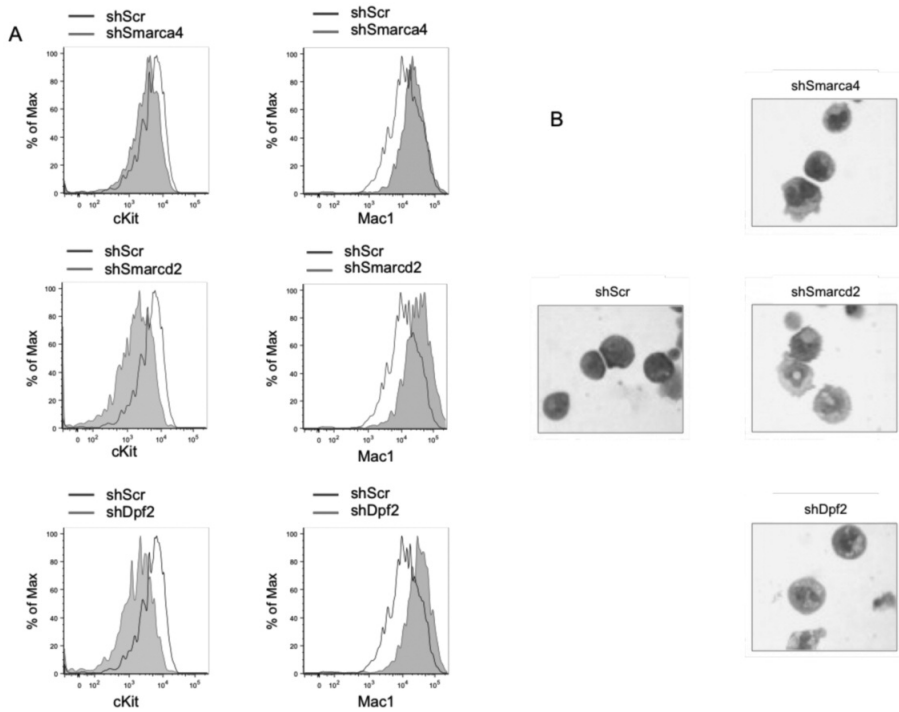


Figura 9

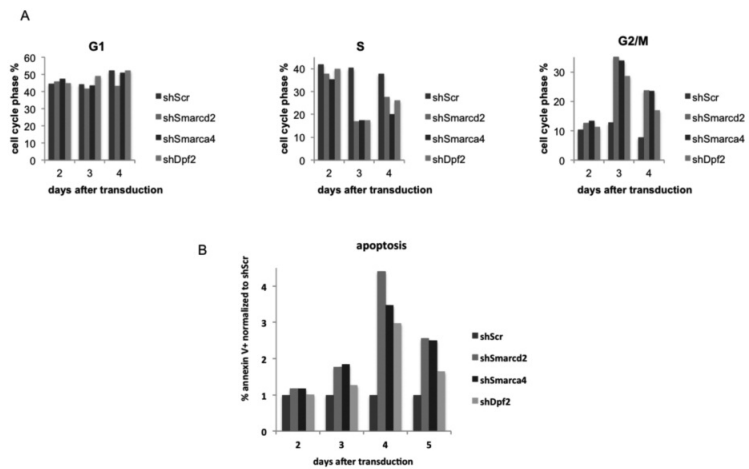
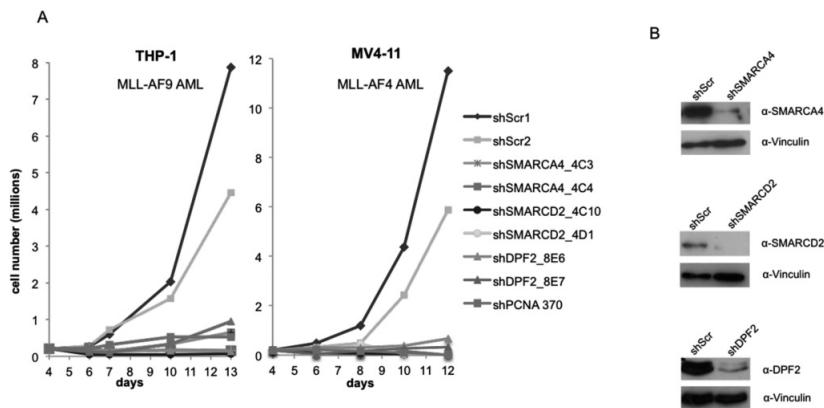


Figura 10

## SMARCA4, SMARCD2 i DPF2 mantenen l'autorenovació leucèmica en cèl·lules humanes

Seguidament es va explorar l'efecte de l'esgotament de les subunitats BAF en els programes d'expressió gènica en línies cel·lulars humanes. Amb aquesta finalitat, vam avaluar l'efecte de la genomivació de les subunitats BAF en la proliferació de leucèmia induïda per MLL-AF9 (THP-1) i MLL-AF4 (MV4-11) (figura 11A). L'esgotament de SMARCA4, SMARCD2 o DPF2, confirmat per transferència de proteïnes (Western blot) en cèl·lules THP-1 el quart dia després de la transducció (figura 11B), condueix a un marcat defecte de creixement de les cèl·lules.

Figura 11



A continuació, es van determinar els canvis transcripcionals globals induïts pels nivells disminuïts de cadascuna de les tres subunitats de les cèl·lules THP-1. Es va detectar un nombre baix però significatiu de gens amb major expressió (320, 5,7%) o amb disminució de l'expressió (209, 4,18%,  $p < 0.01$ ) amb les tres subunitats (figura 12). Per aprofundir aquestes investigacions, es van definir conjunts de gens afectats o bé en increment o en disminució (UP/ DOWN) per la genomivació de cadascun dels gens SMARCA4, SMARCD2 o DPF2. Aquests conjunts eren formats per aquells gens que es veien modificats almenys amb un valor  $\log_2 > 1$ , FDR (*false discovery rate*)  $< 0,05$  en cada cas. Es van analitzar aquests conjunts emprant una anàlisi d'enriquiment de conjunt genètic (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) per consultar l'enriquiment d'un conjunt de gens entre els gens més

canviants d'una altra subunitat (classificada per Signal2noise). Cadascuna d'aquestes comparacions bidireccionals va demostrar correlacions amb una forta significació estadística ( $p < 0,01$ , puntuacions d'enriament normalitzades NES  $> 2,30$ ), la qual cosa suggereix una funció cooperativa d'aquestes tres subunitats en el nivell transcripcional en LMA (figura 12B).

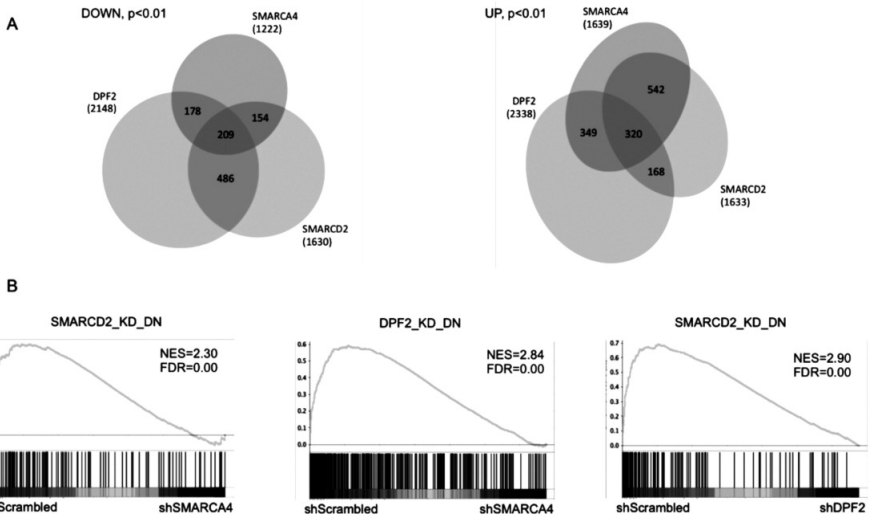
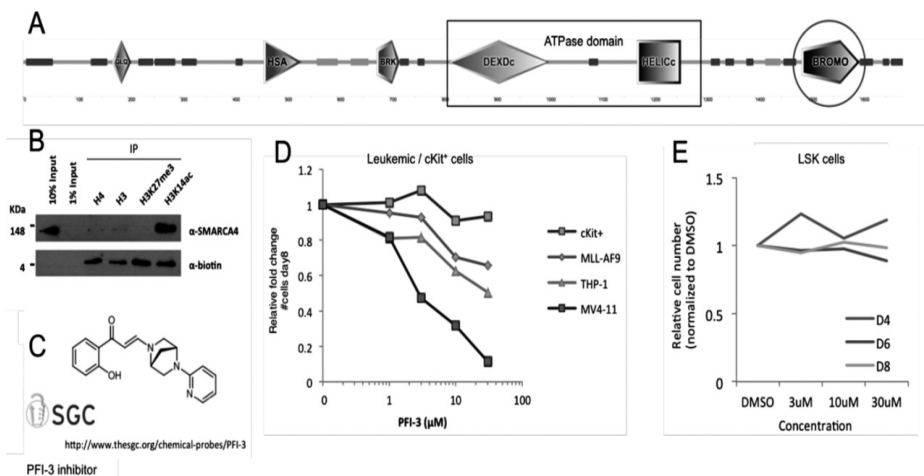


Figura 12. Encavalcament de gens regulats per SMARCA4, SMARCD2 i DPF2 en disminució (DOWN) i en increment (UP)(A). GSEA per consultar l'enriament d'un conjunt de gens entre els gens més canviants d'una altra subunitat (classificada per Signal2noise)

A més de la seva funció d'helicasa, SMARCA4 conté un domini bromo conservat evolutivament (figura 13A). Els dominis bromo (BRD) són mòduls d'interacció proteica que reconeixen exclusivament motius d'acetilació (Filippakopoulos *et al.*, 2012). L'acetilació d'histones s'associa amb l'activació transcripcional. Per tant, es va explorar la possible rellevància del domini bromo de SMARCA4 per als canvis d'expressió gènica observats. Efectivament, la correlació amb un conjunt de gens definit per gens disminuïts per ambdós inhibidors de desacetilases d'histones (HDAC), àcid hidroxàmic suberoilànildic (SAHA) i depsipèptid (Peart *et al.*, 2005) es perd significativament amb la genominvació de SMARCA4 en cèl·lules THP-1 (dades no vistes).



## L'inhibidor específic del domini bromo PFI-3 fenocopia la genomiació de SMARCA4 en cèl·lules leucèmiques humanes

Com que es va observar un possible vincle entre l'estat d'acetilació d'histones i els canvis d'expressió gènica incorreguts amb la genomiació de SMARCA4, vam provar l'efecte d'una sonda química (PFI-3, figura 13C) dissenyada contra els dominis bromo de SMARCA4, SMARCA2 (BRM) i el domini bromo 5 de PBRM1. L'efecte de PFI-3 sobre la proliferació de cèl·lules leucèmiques humanes va ser notable, i la màxima sensibilitat visible va ser en la línia cel·lular MLL-AF4/FLT3-ITD MV4-11, mentre que els c-Kit + no van resultar afectats de forma significativa (figura 13D).

També van comprovar l'efecte del tractament amb PFI-3 sobre cèl·lules no leucèmiques. Mentre que la genomiació de Smarca4, Smarcd2 o Dpf2 dificultava la proliferació de cèl·lules Lin-, Sca1 +, c-Kit + (LSK) de ratolí (dades no vistes), el tractament PFI-3 no afectava la seva capacitat d'expansió, tal com demostra la taxa de creixement de cèl·lules LSK en resposta a dosis creixents de PFI-3 en comparació amb el control DMSO (figura 13E).

Figura 13. Domini proteic de SMARCA4, quadrat blau: domini ATPasa, cercle vermell: domini bromo (A); immuno-precipitació de SMARCA4 amb pèptids trimetilats d'H3K27 o acetilats d'H3K14 (B); efecte de PFI-3 sobre la proliferació de cèl·lules leucèmiques (D) i cèl·lules sanes LSK (E)

## Bibliografia

FILIPPAKOPOULOS, P.; PICAUD, S.; MANGOS, M.; KEATES, T.; LAMBERT, J.P.; BARSYTE-LOVEJOY, D., et al. (2012). "Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family." *Cell*, 149(1), 214–231.

<http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.013>

PEART, M.J.; SMYTH, G.K.; VAN LAAR, R.K.; BOWTELL, D.D.; RICHON, V.M.; MARKS, P.A., et al. (2005). "Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(10), 3697–3702.

<http://doi.org/10.1073/pnas.0500369102>

ZUBER, J.; SHI, J.; WANG, E.; RAPPAPORT, A.R.; HERRMANN, H.; SISON, E.A., et al. (2011). "RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia." *Nature*, 478(7370), 524–528.

<http://doi.org/doi:10.1038/nature10334>

## Conclusions

Aquest estudi identifica i valida tres candidats per al tractament de la leucèmia (SMARCA4, SMARCD2 i DPF2).

Aquestes subunitats BAF col·laboren en la proliferació de cèl·lules leucèmiques.

La genominvació de l'expressió de les subunitats BAF causa diferenciació cel·lular i apoptosi en cèl·lules leucèmiques.

Les cèl·lules leucèmiques mostren sensibilitat a PFI-3, un inhibidor del domini proteic bromo de SMARCA4.