



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

Mecanismos genéticos de activación de vías de
señalización celular en neoplasias mieloproliferativas
crónicas *BCR-ABL1* negativas

Paula Aranaz Oroz

Servicio de Publicaciones de la Universidad de Navarra

ISBN 84-8081-135-8



Universidad de Navarra
Facultad de Ciencias

Mecanismos genéticos de activación de vías de señalización celular en neoplasias mieloproliferativas crónicas *BCR-ABL1* negativas

Memoria presentada por D^a Paula Aranaz Oroz para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Navarra

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Genética y autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 24 de Febrero de 2011

Dr. José Luis Vizmanos Pérez

**El presente trabajo ha sido presentado en la Facultad de Ciencias de la
Universidad de Navarra para optar al Título de Doctor en Bioquímica**

Este trabajo ha sido realizado gracias a la ayuda del Departamento de Educación del Gobierno de Navarra, el Instituto de Salud Carlos III (FIS PI040037), el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 2007-62473), el programa PIUNA de la Universidad de Navarra y la Fundación de Caja Navarra a través del programa “Tú eliges, tú decides” (Proyecto 10830).

A mi abuela

Aunque sólo sea mi nombre el que aparece en la portada, son muchas las personas que, de un modo u otro, han hecho posible la realización de este trabajo y a las que estoy enormemente agradecida.

En primer lugar, quisiera agradecer a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Navarra y al Departamento de Genética en especial, haberme concedido la oportunidad de realizar esta tesis doctoral. Además, quisiera agradecer a toda la Junta del Departamento y a Secretaría de la Facultad de Ciencias el esfuerzo y la confianza depositada en mí al permitirme permanecer un curso más como profesora auxiliar en Genética.

Quisiera agradecer a todos los profesores del Departamento, Javier, Marina, María José, Lola, Maribel, Marta y José Luis, su ayuda y apoyo en todo momento. Mariajo, gracias por las muestras con las que poder realizar los estudios y por enseñarnos tanto sobre este complejo mundo de las leucemias a través de tus seminarios. Gracias Javier por todos los conocimientos que has compartido con nosotros y por tu constante interés en nuestra investigación. Marina, gracias por ayudarme en la labor docente y, sobre todo, gracias por demostrar siempre una preocupación personal por todos nosotros. A Lola, por su cercanía y amabilidad en todo momento. Gracias a Marta por su herramienta UNStat, que muy generosamente ha puesto a nuestra disposición y sin la cual no habiéramos sido capaces de analizar muchos de los datos. A Maribel, por su ayuda en la realización de las prácticas y con la que he compartido muy buenos momentos, especialmente este último año. Y por supuesto, gracias a ti José Luis por todo lo que me has enseñado, por tener siempre un momento para mí, por contagiarme tu entusiasmo por la investigación, por levantarme en los momentos más duros y sobre todo, por confiar en mí y en mi trabajo. De todo corazón, gracias.

A todos mis compañeros de CIMA, Karmele, Ángela, Miren, Xabi, Carmen, Iria y Axel, con los que he compartido animadas sesiones de prácticas.

A Mariajo Barchino, por enseñarme todo sobre el mundo de las proteínas y por su paciencia conmigo. A Marta Fernández, por su entusiasmo con nuestro trabajo y por seguir preocupándose de nuestro trabajo incluso cuando ha estado lejos.

A Itziar, porque siempre consigues transmitir esa energía y apoyo a todo el mundo.

A Mikel Valgañón, que me ha ayudado siempre que le he necesitado, especialmente estos últimos meses.

A todas las chicas de molecular, Soni, Lauri, Mirentxu, María y Mariajo y las chicas de citogenética, Carmen, Neka, Ana, Estelín y, por supuesto, mi Arointxi, por la preocupación y apoyo que me han demostrado en todo momento pero, sobre todo, por ser algo más que

compañeras de trabajo. A Cristina y Lorea, por las conversaciones que hemos compartido entre comida y comida.

A todos los alumnos internos con los que he coincidido a lo largo de estos años, Natalia, Fina, Andrea, Amaya, David, Pablo y Adrián, con los que he pasado muy buenos momentos.

A Cris Ormazábal, mi profe y amiga, gracias por todo. Has sido un apoyo tanto durante los primeros años en el labo como durante este último. A Begotxu, por su alegría y las risas que hemos compartido, te deseo lo mejor en la vida. A mis *shicos*, Iñi, Eli, Sara y Nacho, no puedo imaginarme unos compañeros mejores. Gracias por los momentos que hemos compartido y por vuestro interés y apoyo en este proyecto, ha sido un placer trabajar con vosotros. Gracias en especial a ti Nachito, por tu paciencia conmigo y por todo lo que me has ayudado. Y por supuesto a Cris Hurtado, mi compañera y amiga por demostrarme siempre su confianza en mí y estar dispuesta a echarme una mano en todo momento. Este trabajo no hubiera sido posible sin todos vosotros.

A Mike, por todos los cafés que hemos tomado compartiendo penas y alegrías, que me han ayudado mucho. A Ion, porque siempre está dispuesto a ayudarme con cualquier cosa, tenga o no que ver con este trabajo. Gracias a los dos porque da gusto seguir contando con tan buenos amigos después de terminar la carrera.

A toda la gente que, aunque no trabaje en este mundillo, ha sido capaz de interesarse constantemente por mí y mi trabajo, apoyándome y motivándome cada día, gracias. A Ido, Paula, Itxas y Leti por estar *ahí* cada día, por echarme una mano en todo lo que pueden y por animarme y apoyarme en todo momento. Gracias chicas.

A Mamen, Iker, Silbi, Uxu, María, Caste y Ohiana, por todo lo que he vivido con vosotras y por seguir estando pendientes de mí y mi trabajo.

Gracias a Charo por su preocupación e interés en el proyecto y por apoyarme tanto a lo largo de estos años.

Gracias a mis padres, mis hermanos, mis abuelas y toda mi familia por su preocupación y su apoyo incondicional, por animarme a realizar este proyecto y sobre todo, por su paciencia conmigo en los peores momentos. Y por supuesto, gracias a ti Sendoa. Por estar siempre a mi lado, por celebrar conmigo mis éxitos y sufrir mis fracasos como si fueran los tuyos, por tu interminable motivación y por confiar en mí, gracias. Espero que sepas lo importante que has sido para la realización de este trabajo.

Muchísimas gracias a todos

Abreviaturas

ATP	Adenosín trifosfato
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i> (cromosoma artificial de bacteria)
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (ácido desoxirribonucleico complementario)
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i> (hibridación genómica comparada)
CSF	<i>Colony stimulating factor</i> (Factor estimulador de colonias)
C-terminal	Carboxi terminal
CTKs	<i>Citoplasmic tyrosine kinases</i> (Proteínas con actividad tirosín-quinasa citoplasmática)
DAPI	4'-6'-diaminofenilindol
Del	Delección
dHPLC	<i>Denaturing high performance liquid chromatography</i> (cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante)
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
dNTP	2'-desoxinucleósido 5'-trifosfato
d-UTP	2'-desoxiuridina 5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético sal disódica 2-hidrato
EEC	<i>Endogenous erythroid colonies</i> (colónicas eritrocitarias endógenas)
EPO	Eritropoyetina
FERM	<i>Erythrocyte protein 4.1</i> (<i>Four-point-one</i>), <i>ezrin</i> , <i>radixin</i> , <i>moesin</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> (hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia)
GIST	<i>Gastrointestinal stromal tumours</i> (tumores gastrointestinales)
GM-CSF	<i>Granulocyte, macrophage colony stimulating factor</i> (factor estimulador de macrófagos y granulocitos)
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
Hb	Hemoglobina
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL3	Interleuquina 3
ITD	Internal tandem duplication (duplicación interna en tándem)
JH	Jak Homology
JM	Juxtamembrana
Kb	Kilo base, mil pares de bases
LBC	Leucemia basofílica crónica

LANL	Leucemia aguda no linfoblástica
LEC	Leucemia eosinofílica crónica
LLA	Leucemia linfática aguda
LLC	Leucemia linfática crónica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LMCa	Leucemia mieloide crónica atípica
LMMC	Leucemia mielomonocítica crónica
LMMJ	Leucemia mielomonocítica crónica juvenil
LNC	Leucemia neutrofílica crónica
MFI	Mielofibrosis primaria
MO	Médula ósea
mRNA	Messenger ribonucleic acid (ácido ribonucleico mensajero)
MS	Mastocitosis sistémica
NK	<i>Natural Killer</i>
nm	Nanómetro
NMD/NMP	Neoplasias mielodisplásicas/ mieloproliferativas
NMPC	Neoplasias mieloproliferativas crónicas
NMPCa	Neoplasias mieloproliferativas crónicas atípicas
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio bromuro
N-terminal	Amino terminal
OMS/WHO	Organización mundial de la salud /World Health Organization
p/v	Peso/volumen
Pb	Par de bases
PBL	<i>Peripheral blood lymphocyte</i> (linfocitos de sangre periférica)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PES	<i>Phenazine ethosulfate</i>
PH	<i>Plekstrein homology</i>
PTK	Proteínas con actividad tirosín-quinasa
PV	Policitemia Vera
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (medio de cultivo)

RQ-PCR	<i>Real-time quantitative polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real)
RTKs	<i>Receptor tyrosine kinases</i> (receptores con actividad tirosín-quinasa)
RT-PCR	Retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa
SG	<i>Spectrum green</i>
SH2	<i>Src homology 2</i>
SH3	<i>Src homology 3</i>
SHE/LEC	Síndrome hipereosinofílico/Leucemia eosinofílica crónica
SMD	Síndromes mielodisplásicos
SMD/SMP	Síndromes mielodisplásicos/ mieloproliferativos
SMPC	Síndromes mieloproliferativos crónicos
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SO	<i>Spectrum orange</i>
SP	Sangre periférica
SSC	Solución salina de citrato de sodio
TBE	Tris, ácido bórico, EDTA
TE	Trombocitemia esencial
TKs	Tirosín-quinasa
TM	Transmembrana
Tm	Temperatura de <i>melting</i> o desnaturalización o fusión
TPO	Trombopoyetina
ARMS-PCR	<i>Amplification Refractory Mutation System-PCR</i> (PCR específica de alelo)
TEAA	Acetato de trietilamonio
TM	Transmembrana
Y	Tirosina

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. El cáncer como enfermedad genética y epigenética	1
2. El sistema hematopoyético	2
3. La señalización celular	3
4. Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPCs)	7
4.1 Clasificación de las NMPCs	8
4.2 Las neoplasias mieloproliferativas crónicas clásicas	9
4.2.1 Leucemia Mieloide Crónica	9
4.2.2 Policitemia Vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis idiopática	10
4.3 Las neoplasias mieloproliferativas crónicas atípicas	13
4.4 Resto de neoplasias mieloides crónicas	13
5. Patogénesis molecular de las NMPCs	15
5.1 La causa molecular de la LMC: fusión BCR-ABL1	16
5.2 La causa molecular de la PV, TE y MFI	19
5.3 La causa molecular de las NMPCs atípicas	23
5.4 La causa molecular de otras neoplasias mieloides crónicas	26
5.5 Neoplasias mieloides asociadas a reordenamientos de <i>PDGFRB</i> y <i>FGFR1</i>	27
6. Las proteínas con actividad tirosínquinasa (TKs)	30
6.1 Receptores con actividad tirosínquinasa (RTKs)	31
6.1.1 Familia FGFR (RTKs de clase IV)	34
6.1.2 Familia EGFR (RTKs de clase I)	38
6.2 Proteínas citoplasmáticas con actividad tirosínquinasa (CTKs)	40
6.2.1 Familia Abl	42
6.2.2 Familia Syk	45
7. Otras alteraciones descritas en las NMPCs en los últimos años	48
7.1 Familia Cbl	48
7.1.1 Papel de las proteínas Cbl en la señalización	50
7.1.2 Alteraciones en genes de la familia Cbl y enfermedad	53
7.2 Otros genes implicados en las NMPCs	55
II. HIPÓTESIS	61
III. OBJETIVOS	65
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	69

PACIENTES	69
MÉTODOS	71
1. Análisis citogenético	71
1.1 Citogenética convencional: cariotipo de bandas G	71
1.2 Citogenética molecular: FISH	71
1.2.1 Material de partida: suspensiones celulares	73
1.2.2 Sondas no comerciales	73
1.2.2.1 Selección de los clones	74
1.2.2.2 Extracción del fragmento de DNA usado como sonda	75
1.2.2.3 Marcaje de las sondas	76
1.2.2.4 Coprecipitación de las sondas	77
1.2.3 Sondas comerciales	77
1.2.4 Hibridación	77
1.2.5 Lavados	78
1.2.6 Observación a microscopio, valor umbral y análisis de resultados	79
2. Análisis molecular	80
2.1 Extracción y tratamiento de ácidos nucleicos	80
2.1.1 Obtención de células mononucleadas	80
2.1.2 Extracción de DNA genómico a partir de células mononucleadas	80
2.1.3 Amplificación del genoma completo	80
2.1.4 Extracción del RNA de células mononucleadas	81
2.1.5 Tratamiento con DNAsa del RNA	81
2.2 Cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante (dHPLC)	81
2.2.1 Diseño de cebadores para la amplificación de los fragmentos	83
2.2.2 Amplificación por PCR y formación de moléculas heterodúplex	85
2.2.3 Predicción y validación de las temperaturas del análisis dHPLC	86
2.2.4 Análisis de las muestras	87
2.2.5 Análisis estadístico de los resultados obtenidos por dHPLC	88
2.2.6 Efecto en el ayuste (<i>splicing</i>) de los cambios detectados	89
2.2.7 Análisis de la deleción de C-CBL	90
2.3 PCR cuantitativa a tiempo real (RQ-PCR)	90
2.3.1 Principio de la RQ-PCR	90
2.3.2 Cuantificación absoluta y relativa	92
2.3.3 Ensayo de RQ-PCR	93
2.3.3.1 Síntesis de cDNA: retrotranscripción	93
2.3.3.2 Selección de cebadores y sondas	95

2.3.3.3 Selección del gen endógeno	96
2.3.3.4 Realización de los ensayos de RQ-PCR	97
2.3.3.5 Análisis de los resultados	97
2.3.3.6 Análisis estadístico de los resultados obtenidos por RQ-PCR	97
3. Ensayos funcionales de las alteraciones en los genes de la familia Cbl	98
3.1 Líneas celulares	98
3.2 Vectores de expresión	99
3.2.1 Mantenimiento de los vectores en cultivos bacterianos	101
3.2.2 Obtención del vector pCMV6-AC-RFP- <i>FLT3</i>	102
3.2.3 Obtención de los vectores de expresión mutantes: mutagénesis	103
3.2.4 Extracción del DNA libre de endotoxinas	105
3.3 Transfección de los vectores a las células eucariotas: nucleofección	105
3.3.1 Ensayos de nucleofección	106
3.3.1.1 Nucleofección de <i>FLT3</i>	106
3.3.1.2 Nucleofección de los genes CBL (<i>C-CBL</i> , <i>CBL-B</i> y <i>CBL-C</i>)	107
3.3.2 Eficiencia de la transfección y fluorescencia	108
3.4 Ensayo de proliferación celular: MTS	109
3.5 Contaje celular mediante azul tripán	111
3.6 Análisis estadístico de los resultados de los ensayos funcionales	112
V. RESULTADOS	115
1. Análisis citogenético	115
1.1 Citogenética convencional: cariotipo de bandas G	115
1.2 Citogenética molecular: FISH	115
1.2.1 Optimización de los ensayos de FISH	115
1.2.2 Validación de los ensayos de FISH y estimación del valor umbral	116
1.2.3 Análisis FISH de las muestras de pacientes	118
2. Análisis molecular	120
2.1 dHPLC: cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante	120
2.1.1 Diseño, optimización y validación de los análisis mediante dHPLC	120
2.1.2 Genes TK	122
2.1.2.1 Genes de la familia Abl	122
2.1.2.2 Genes de la familia Syk	123
2.1.2.3 Genes de la familia Fgfr	127
2.1.2.4 <i>EGFR</i>	132
2.1.3 Genes de la familia Cbl	133

2.1.3.1 C-CBL	134
2.1.3.2 CBL-B	139
2.1.3.3 CBL-C	142
2.1.3.4 Análisis mediante PCR de la delección del exón 8 de C-CBL	145
2.2 Ensayos de RQ-PCR	146
2.2.1 Ensayo de RQ-PCR	147
2.2.1.1 Síntesis de cDNA: retrotranscripción (RT)	147
2.2.1.2 Selección de cebadores y sondas	148
2.2.1.3 Selección del gen endógeno de expresión constitutiva	149
2.2.1.4 Validación de los ensayos Taqman y detección de DNAg	149
2.2.1.5 Preamplificación de las muestras	149
2.2.1.6 Amplificación por RQ-PCR	150
2.2.2 Análisis de los resultados	150
2.2.2.1 Análisis de SYK	151
2.2.2.2 Análisis de ABL1	152
2.2.2.3 Análisis de ABL2	153
2.2.2.4 Análisis de FGFR1	154
2.2.2.5 Análisis de JAK2	155
3. Ensayos funcionales de las alteraciones en los genes de la familia Cbl	157
3.1 Líneas celulares	157
3.1.1 Contaje celular mediante azul tripan	158
3.2 Vectores de expresión	158
3.3 Ensayos funcionales de las alteraciones encontradas	158
3.3.1 Optimización de los ensayos de proliferación: MTS	159
3.3.2 Resultados obtenidos en el modelo humano: M07e y HEL	161
3.3.3 Resultados obtenidos en el modelo murino: 32D	165
3.3.3.1 Mutaciones del dominio RING Finger de C-CBL	165
3.3.3.2 Mutaciones del dominio rico en prolina de C-CBL	169
3.3.3.3 Contaje celular mediante azul tripán	172
3.3.3.4 Independencia a factores de crecimiento	172
3.3.4 Mutaciones en CBL-B	175
3.3.5 Mutaciones en CBL-C	176
VI. DISCUSIÓN	181
1. Muestras del estudio	182
2. Estudio de los genes TK	183
2.1 Análisis mediante FISH de genes TK	183

2.2 Búsqueda de mutaciones mediante dHPLC en genes TK	185
2.2.1 Cambios de secuencia detectados en los genes TK	186
2.2.2 Relación de los SNPs detectados y predisposición a enfermedad	189
2.3 Análisis de la expresión de genes TK:RQ-PCR	192
2.4 Conclusiones del estudio de los genes TK	196
3. Genes de la familia Cbl	198
3.1 Mutaciones en los genes de la familia Cbl	203
3.1.1 <i>C-CBL</i>	205
3.1.2 <i>CBL-B</i> y <i>CBL-C</i>	208
3.2 Análisis en modelos celulares de las mutaciones en los genes Cbl	211
3.2.1 Efecto de las mutaciones de <i>C-CBL</i> sobre líneas celulares humanas	213
3.2.2 Efecto de las mutaciones de <i>C-CBL</i> sobre la línea murina 32D	215
3.2.2.1 Mutaciones en el dominio <i>RING finger</i>	215
3.2.2.2 Mutaciones en el dominio rico en prolina	217
3.2.2.3 Independencia de factores de crecimiento	219
3.2.3 Efecto de los mutantes <i>CBL-B</i> y <i>C</i> sobre la línea murina 32D	220
3.2.3.1 Mutaciones en <i>CBL-B</i>	220
3.2.3.2 Mutaciones en <i>CBL-C</i>	220
VII. CONCLUSIONES	227
VIII. ANEXOS	231
IX. REFERENCIAS	259

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

1 El cáncer como enfermedad genética y epigenética

La característica común de todo proceso neoplásico es la pérdida de la regulación del crecimiento y proliferación celular. Esto se inicia cuando una célula adquiere una o varias alteraciones somáticas sucesivas en su material genético, lo que provoca que estos procesos fisiológicos no puedan ser controlados, confiriendo a estas células una ventaja proliferativa. Por ello, el cáncer es básicamente una enfermedad genética y/o epigenética de las células somáticas, aunque determinados cambios presentes en la línea germinal pueden provocar una mayor predisposición a padecerla (Blume-Jensen & Hunter, 2001; Vogelstein & Kinzler, 2004, Mitelman *et al*, 2007).

Estas alteraciones genéticas pueden ocurrir a varios niveles, ya sea afectando a la parte estructural de genes concretos (como los supresores tumorales y oncogenes), como a la regulación de su expresión genética (Vogelstein & Kinzler, 2004; Futreal *et al*, 2004). Esto sucede a través de diversos mecanismos, como aberraciones cromosómicas que llevan a la pérdida, amplificación o reorganización de material genético, mutaciones que afectan a uno o varios nucleótidos, cambios en el patrón de corte y empalme alternativo, o alteración de las modificaciones químicas del DNA o de las histonas asociadas a él. Todo ello puede desembocar finalmente en la pérdida de función de determinados genes (supresores tumorales) o en la ganancia de función de otros (oncogenes) (Vogelstein & Kinzler, 2004; Mitelman *et al*, 2007).

Hasta la fecha, se conocen más de 350 genes cuya alteración puede estar involucrada en la patogénesis de distintas neoplasias, lo que corresponde aproximadamente al 1% de los genes humanos. Gran parte de ellos, codifican proteínas implicadas en la regulación de la proliferación, diferenciación y muerte celular a través de su participación en diversas vías de señalización. De hecho, el dominio proteico más frecuente en estas proteínas implicadas en cáncer es el quinasa, fundamentalmente tirosina quinasa (*tyrosine kinase*, TK), aunque también el serina/treonina quinasa. Curiosamente, las fosfatasa, enzimas que realizan la función inversa, no se encuentran tan implicadas. El siguiente grupo de proteínas afectadas son los factores de transcripción y, en tercer lugar, aparecerían las proteínas implicadas en el mantenimiento y reparación del DNA. (Skorski 2002; Vogelstein & Kinzler, 2004; Futreal *et al*, 2004; Mitelman *et al*, 2007)

Existen muchos tipos de neoplasias, en función del tejido y tipo celular afectado. Entre ellas, las leucemias y linfomas son tumores que afectan a diversos tipos celulares hematológicos. Uno de los principales objetivos en la investigación del cáncer actual es la identificación y

caracterización de los genes cuya alteración da lugar al desarrollo del proceso neoplásico. La mayor facilidad técnica del análisis de las alteraciones genéticas asociadas al desarrollo de leucemias y linfomas, ha llevado a que estas enfermedades sean consideradas paradigmáticas en este campo. Los resultados de estos análisis, además de mejorar el conocimiento sobre sus causas, están siendo aplicados de manera directa y exitosa en el manejo clínico y tratamiento de los pacientes que padecen este tipo de enfermedades.

2 El sistema hematopoyético

La hematopoyesis es el proceso fisiológico mediante el cual se forman las células sanguíneas maduras (eritrocitos, plaquetas y leucocitos) a partir de una célula precursora pluripotencial hematopoyética (*Stem Cell* o UFC, unidad formadora de clones). En el adulto, estas células madre se encuentran en la médula ósea y tienen la capacidad de diferenciarse a precursores del linaje mieloide (progenitor pluripotencial mieloide) y linfoide (progenitor pluripotencial linfoide). Estos precursores, a través de la mielopoyesis y linfopoyesis, generan las células de la estirpe mieloide (eritrocitos, plaquetas, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas y osteoclastos) y linfoide (linfocitos T, B y NK, *natural killer*), que son vertidas a la sangre (**Figura 1**) (Baker *et al*, 2007). Todo este proceso está regulado por distintos factores de crecimiento hematopoyéticos solubles o citoquinas, que se unen a receptores específicos de la superficie de la célula precursora (Metcalf *et al*, 2008).

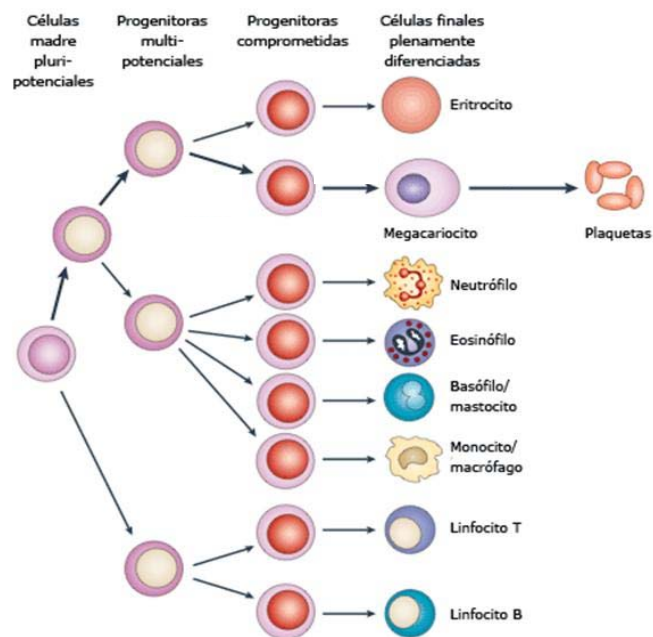


Figura 1. Esquema de la hematopoyesis. Una célula madre pluripotencial de la médula ósea se divide y diferencia en el linaje linfoide y mieloide, para la formación de todas las células sanguíneas maduras.

3 La señalización celular

La proliferación, diferenciación, migración y apoptosis, son procesos celulares que mantienen el equilibrio fisiológico de la célula en respuesta al ambiente que la rodea. Estos procesos, vienen regulados por una serie de señales externas, a las que la célula responde con la expresión de determinados genes. Muchas de las señales externas son moléculas químicas (factores de crecimiento y citoquinas), que actúan como ligandos solubles que se unen específicamente a receptores situados en la superficie celular. Esta especificidad condiciona las distintas respuestas de la célula a estos estímulos externos. La interacción ligando-receptor provoca una serie de cambios bioquímicos intracelulares en moléculas que forman parte de las diferentes vías de señalización, encargadas de transportar el estímulo recibido al interior del núcleo celular. Allí, distintos factores de transcripción promueven la expresión de diversos genes, dando respuesta a la señal extracelular recibida (Rane *et al*, 2000; Baker *et al*, 2007).

Las vías de señalización realizan su función a través de moléculas intracelulares susceptibles de ser activadas e inactivadas (Rane *et al*, 2000). Uno de los procesos de activación/inactivación más importantes es la fosforilación y desfosforilación de proteínas, llevado a cabo a través de la acción coordinada de quinasas y fosfatasa, respectivamente. Esta fosforilación, dependiente de ATP, se produce en un grupo hidroxilo libre y afecta a determinados aminoácidos, como serina (Ser, S), treonina (Thr, T) y tirosina (Tyr, Y), induciendo cambios en el estado y conformación de las proteínas afectadas (Sun & Tonks, 1994; Béné, 2006). Como ya se ha comentado, el desequilibrio entre la actividad de quinasas y fosfatasa puede alterar la regulación fisiológica de las vías de señalización, afectando a los procesos de proliferación, diferenciación, migración y apoptosis celular y conduciendo a una transformación celular maligna (Sun & Tonks, 1994; Vogelstein & Kinzler, 2004; Cowan-Jacob 2006).

Las vías de señalización más importantes en las células hematopoyéticas en las que, además de quinasas y fosfatasa, participan proteínas de diversa función, se explican en las figuras 2, 3 y 4. La proliferación y diferenciación desencadenada por ellas permiten que células pluripotentes, multipotentes e intermediarios de éstas se desarrollen hacia diversos tipos de células sanguíneas, maduras y funcionales (Macdonald & Cross, 2007; Baker *et al*, 2007). Todas estas vías son activadas cuando un receptor de membrana reconoce y une su correspondiente ligando, factores de crecimiento solubles (citoquinas) entre los que se encuentra la eritropoyetina (EPO), la trombopoyetina (TPO) y el factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF) en el caso de las células hematopoyéticas (Macdonald & Cross, 2007; Baker *et al*, 2007; Metcalf *et al*, 2008). Tras esta unión, el receptor se activa trasladando la señal al interior celular para provocar la respuesta.

Una de las vías de señalización más importantes de las células hematopoyéticas es la vía JAK-STAT (**Figura 2**), que juega un papel fundamental en la respuesta proliferativa y anti-apoptótica celular. Esta vía es activada por diversas citoquinas y factores de crecimiento, que se unen a un receptor de membrana, con o sin actividad TK (como EGFR o EPOR, respectivamente) (Ward *et al*, 2000; Imada & Leonard, 2000; Rane 2000; Schlessinger 2000; Rawlings *et al*, 2004; Khwaja 2006; Baker *et al*, 2007).

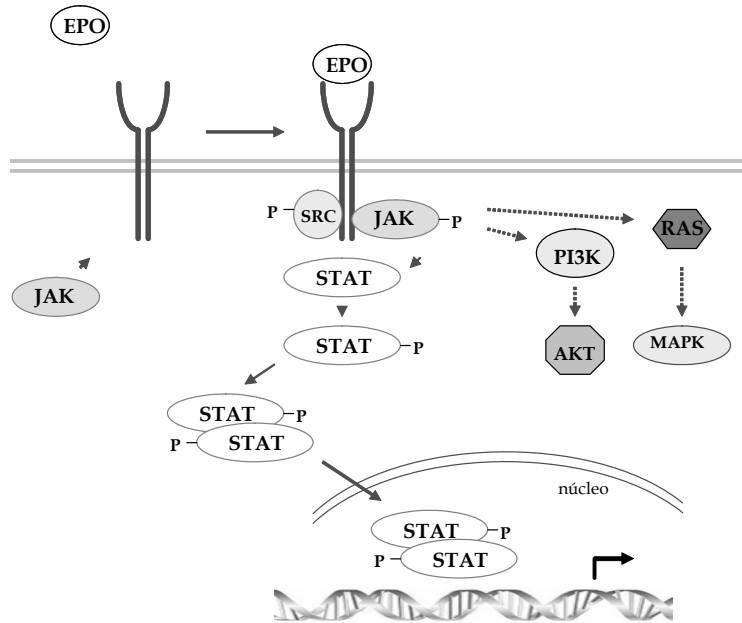


Figura 2. Vía JAK-STAT. La unión de la citoquina al receptor da lugar a la activación, directa o indirectamente a través de Src, de las TK citoplasmáticas JAK (*Janus kinases*, JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2). Éstas fosforilan y activan a su vez a los factores de transcripción STAT (STAT1-STAT7), que dimerizan y translocan al núcleo, donde regulan la expresión de determinados genes. Además, las JAKs activadas pueden estimular indirectamente la cascada de señalización MAPK Y PI3K.

En el caso de los receptores con actividad TK, la principal vía de señalización que estimulan es la Ras/MAPK (*mitogen activated protein kinase*), que regula procesos metabólicos, el ciclo celular, la migración, proliferación, diferenciación y morfogénesis (**Figura 3**) (Rane *et al*, 2000; Schlessinger 1994; Pawson 1995; Steelman *et al*, 2004; Schlessinger 2000; Baker *et al*, 2007; Lurje & Lenz 2009). Estos receptores RTK, activan directamente mediante fosforilación diversas moléculas, pero también sirven de plataforma de activación de otras muchas proteínas adaptadoras fundamentales para la señalización, que se unen a estos receptores activados a través de dominios específicos SH2 (*Src homology 2*) y PH (*Plekstrein homology*) (Fantl *et al*, 1993; Van der Geer *et al*, 1994).

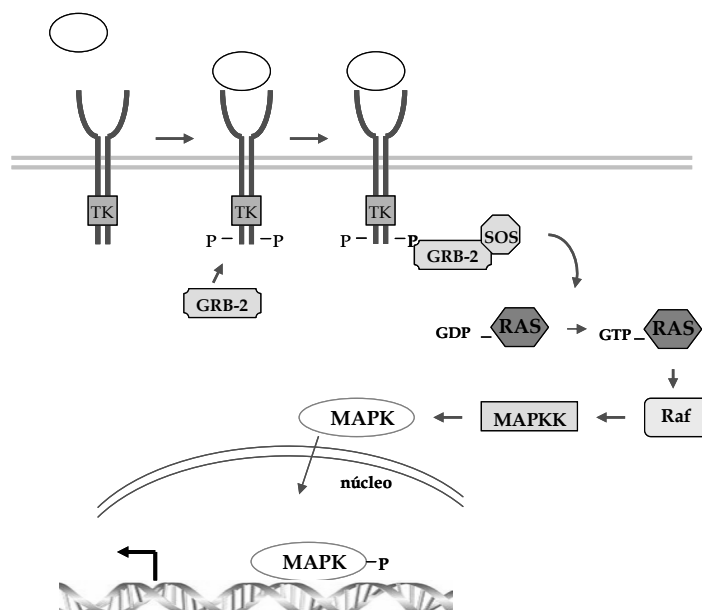


Figura 3: Vía Ras-MAPK. TRAS la activación del receptor TK por la unión del correspondiente ligando se recluta a la membrana la proteína adaptadora Grb2 que se une, mediante su dominio SH2, a fosfotirosinas del receptor y, mediante el dominio SH3 a la proteína de intercambio de nucleótidos de guanina SOS. El acercamiento de SOS a la membrana permite su aproximación a RAS (proteína de unión a GTP, HA-RAS, Ki-RAS y N-RAS), lo que estimula su activación mediante el cambio de RAS-GDP a RAS-GTP. Esta proteína, ahora activa, interacciona con muchas proteínas efectoras como Raf (A-Raf, B-Raf, Raf-1) que estimulan las MAPKK (MEK1, MEK2, MEK3, MEK4 y MEK5) fosforilando un residuo de serina en su bucle de activación. MAPKK fosforila ahora a MAPK o ERK en residuos de treonina y tirosina, activándolas. Las MAPK activadas fosforilan una amplia variedad de sustratos citoplasmáticos y de membrana, además de translocarse al núcleo donde fosforila y activa factores de transcripción.

Otra vía importante de señalización activada por todas las RTKs es mediada por la activación de PI3K, que también participa en la regulación del crecimiento celular, la apoptosis, la resistencia a la quimioterapia, la invasión tumoral y la migración celular. La fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) es una enzima dimérica formada por dos subunidades, la p110 (catalítica) y la p85 (reguladora) (**Figura 4**). A su vez, esta vía puede dar lugar a la activación de otras proteínas como las de PLC γ (fosfolipasa C- γ) y MAPK (Schlessinger 2000; Steelman *et al*, 2004; Scaltriti & Baselga, 2006; Lurje & Lenz, 2009). Una de las principales proteínas activadas por PI3K, es AKT, una serín-treonín quinasa fundamental en los procesos celulares anteriormente citados (Schlessinger 2000; Steelman *et al*, 2004; Scaltriti & Baselga, 2006; Baker *et al*, 2007; Lurje & Lenz, 2009).

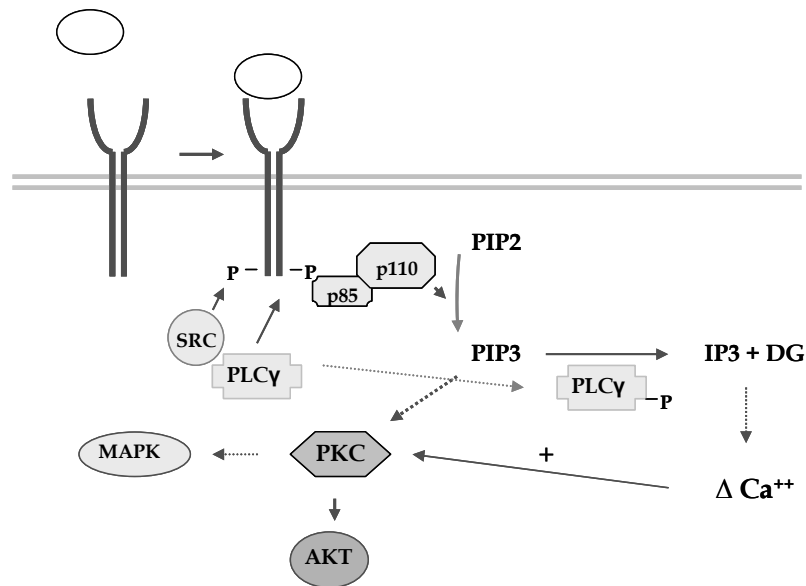


Figura 4: Vía PI3K. Tras la unión de un ligando a su correspondiente receptor de citoquinas (con o sin actividad TK intrínseca), la subunidad p85 de PI3K es capaz de unirse a través de su dominio SH2 a las tirosinas fosforiladas del receptor. Esta unión permite el acercamiento a la membrana plasmática de PI3K, donde la subunidad p110, con actividad quinasa lipídica y serín-treonín quinasa, cataliza la fosforilación del fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP2) al segundo mensajero fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). Esto provoca la activación de la PKC, que activa a su vez a AKT. La acción de la PI3K y la generación del PIP3, provocan a su vez la activación de la fosfolipasa C- γ (PLC γ), que es reclutada a la membrana, donde interacciona con el receptor fosforilado. PLC γ hidroliza el segundo mensajero PIP3 generado por la PI3K, dando lugar a la formación de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol. IP3 estimula la liberación de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares que, cuando se unen a la calmodulina, provocan la activación de quinasas dependientes de calcio. Además, tanto el Ca²⁺ como el diacilglicerol, activan miembros de la familia PKC, activando lateralmente la vía MAPK.

Todas estas vías de señalización deben estar correctamente reguladas para que, una vez finalizada su función, cada proteína que interviene en el proceso vuelva a su estado inactivo. La pérdida de la regulación fisiológica de estas vías, puede provocar que la señal recibida no disminuya en ausencia del estímulo correspondiente. Uno de los principales mecanismos reguladores lo constituyen las proteínas fosfatasa (PTP, *protein tyrosine phosphatases*), entre las destaca SHP-1, que revierten la fosforilación de las quinasas eliminando el grupo fosfato de las tirosinas fosforiladas (Ward *et al*, 2000; Rawlings *et al*, 2004).

Otro mecanismo regulador es la degradación de las proteínas que intervienen en estas vías por acción del proteosoma (en el caso de las proteínas citoplasmáticas) o a través de su fusión con los lisosomas (en el caso de los receptores de membrana). Para ello, es necesaria su unión a moléculas de ubiquitina (ubiquitinación), proceso que tiene lugar a través de varios pasos mediados por una cascada enzimática. En primer lugar, una enzima activadora de ubiquitina (E1), inicia el proceso uniéndose a una molécula de ubiquitina. Posteriormente, una enzima conjugada a ubiquitina (E2), capta la molécula de ubiquitina de la E1 y finalmente, una E3

ubiquitina-ligasa transfiere la ubiquitina de la proteína E2 a una lisina situada en la proteína sustrato, determinando así la especificidad de la molécula que debe ser degradada (Joazeiro *et al*, 1999; Thien & Langdon 2001; Peschard & Park, 2003; Thien & Langdon 2005; Ryan *et al*, 2006).

Por último, algunas de las vías de señalización presentan también moléculas de regulación negativa específicas. Por ejemplo, en el caso de la vía JAK-STAT las STATs activadas estimulan la transcripción de muchos genes, entre los que se encuentran los de la familia SOCS (*supressor of cytokine signalling*). Las proteínas SOCS se unen a las JAKs fosforiladas y a sus receptores, deteniendo la señalización. Otras moléculas reguladoras específicas de esta vía son las PIAS (*protein inhibitor of activated STAT*) (PIAS 1, PIAS 2, PIAS3, PIASx y PIASy), que se unen a los dímeros de STAT activados, impidiendo su entrada al núcleo y su interacción con el DNA (Imada & Leonard, 2000; Ward *et al*, 2000; Rawlings *et al*, 2004; Khwaja 2006).

4 Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPCs)

Las neoplasias hematológicas o leucemias son enfermedades del linaje hematopoyético, es decir, son el cáncer de las células de la sangre y se caracterizan por una proliferación anormal de uno o varios tipos de estas células. Existen distintos tipos de leucemias, en función del linaje celular que se vea afectado (linfoide o mieloide), y del curso clínico de la enfermedad (aguda o crónica). Las leucemias crónicas se caracterizan por una sobreproducción y acumulación de células maduras, mientras que las agudas presentan acumulación de células inmaduras que no llegan a diferenciarse.

Entre las leucemias crónicas mieloides, destacan las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPCs), enfermedades clonales hematopoyéticas en las que se observa un aumento de uno o más linajes de la serie mieloide (granulocítico, eritroide o megacariocítico), debido a la pérdida de la regulación de la proliferación en la célula madre pluripotencial que las origina (Kralovics 2002; Cross & Reiter, 2002; Delhommeau *et al*, 2006; De Keersmaecker & Cools, 2006; Macdonald & Cross, 2007; Skoda 2007; Tefferi & Vardiman 2008).

Estas enfermedades fueron inicialmente descritas por Dameshek en 1951 como *síndromes mieloproliferativos*, refiriéndose con ello a un grupo de desórdenes caracterizados por un aumento en la proliferación de uno o más linajes mieloides, pero con una maduración relativamente normal y efectiva (Dameshek, 1951; Tefferi, 2008a). Estas enfermedades se encontraban frecuentemente asociadas a hepato y/o esplenomegalia y tenían una cierta predisposición a transformarse en leucemia aguda o fibrosis de médula ósea (Campbell & Green, 2006; Macdonald & Cross, 2007). En 1974, Prchal y colaboradores demostraron que los

progenitores eritroides de la médula ósea de pacientes con una de estas enfermedades (la policitemia vera o PV) eran capaces de crecer *in vitro* en ausencia de eritropoyetina (EPO) (Prchal & Axelrad, 1974; Kralovics 2002, Campbell & Green, 2006). Durante esa época, estudios basados en la inactivación del cromosoma X demostraron su carácter clonal (Adamson *et al*, 1976; Kralovics 2002; Campbell & Green 2006).

En 2008, la Organización Mundial de la Salud (OMS) sustituyó la denominación *síndromes* por la de *neoplasias mieloproliferativas crónicas* (NMPCs) (Tefferi & Vardiman, 2008), término que resalta su carácter tumoral (Spivak & Silver, 2008; Tefferi, 2008a). Las NMPCs son, por tanto, enfermedades clonales originadas a partir de una célula madre pluripotencial hematopoyética, que adquiere una alteración genética somática que le confiere una ventaja competitiva y le permite evadirse de la apoptosis (Kralovics *et al*, 2002; Campbell & Green, 2006; Skoda, 2007).

Además, en algunos casos se ha demostrado una agrupación familiar con baja penetrancia (Landgren *et al*, 2008), lo que indicaría la existencia de variantes genéticas germinales que predisponen a la enfermedad que no muestran diferencias fenotípicas con los casos esporádicos (Skoda, 2007; Rumi, 2008).

4.1 Clasificación de las NMPCs

Dentro de las neoplasias mieloides se incluyen también diversos tipos de leucemias mieloides agudas (LMA), los síndromes mielodisplásicos (SMD), las neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (NMD/NMP) y, recientemente como entidades independientes, las neoplasias asociadas con eosinofilia y alteraciones en los genes *PDGFRA*, *PDGFRB* o *FGFR1* (**Tabla 1**) (Tefferi & Vardiman, 2008). Estas últimas estaban incluidas hasta hace poco dentro de las NMPCs y las NMD/NMP, pero la presencia de alteraciones en genes concretos y ciertas características fenotípicas asociadas han posibilitado su clasificación como entidades independientes.

Tradicionalmente, las NMPCs se han clasificado en dos grupos. La leucemia mieloides crónica (LMC), la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE) y la mielofibrosis idiopática (MFI), quedarían englobadas en las NMPCs *clásicas*, mientras que la leucemia neutrofílica crónica (LNC), el síndrome hipereosinofílico/leucemia eosinofílica crónica (SHE/LEC), la mastocitosis sistémica (MS) y otras neoplasias mieloproliferativas inclasificables (por el momento) son consideradas NMPC *atípicas* (Tefferi & Gilliland, 2007; Tefferi & Vardiman, 2008).

Tabla 1. Clasificación de la OMS de 2008 de las neoplasias mieloides (Tefferi & Vardiman, 2008).

1. Leucemia mieloide aguda (LMA)	
2. Síndromes mielodisplásicos (SMD)	
3. Neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPCs)	
3.1 Leucemia mieloide crónica (LMC)	NMPCs clásicas
3.2 Policitemia vera (PV)	
3.3 Trombocitemia esencial (TE)	
3.4 Mielofibrosis idiopática (MFI)	
3.5 Leucemia neutrofílica crónica (LNC)	NMPCs atípicas
3.6 Leucemia eosinofílica crónica (LEC)	
3.7 Síndrome hipereosinofílico (SHE)	
3.8 Mastocitosis sistémica (MS)	
3.9 NMPCs inclasificables	
4. Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (NMD/NMP)	
4.1 Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)	
4.2 Leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ)	
4.3 Leucemia mieloide crónica atípica (LMCa)	
4.4 NMD/NMP inclasificables	
5. Neoplasias mieloides asociadas con eosinofilia y alteraciones de <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i> y <i>FGFR1</i>	

4.2 Las neoplasias mieloproliferativas crónicas clásicas

La característica común de este tipo de enfermedades es la presencia anormalmente elevada de un clon de células mieloides maduras (granulocitosis, trombocitosis o eritrocitosis) en sangre periférica. Es frecuente que todas ellas se transformen finalmente en LMA en su fase final (Delhommeau *et al*, 2006; Haferlach *et al*, 2007; Tefferi & Vardiman, 2008; Tefferi, 2008b).

4.2.1 Leucemia mieloide crónica

La NMPC mejor conocida y caracterizada es la LMC, que fue descrita inicialmente por Bennett en 1845 como leucocitemia (Bennett, 1845) y finalmente por Virchow como leucemia (Virchow, 1845). En esta enfermedad se observa un aumento de la proliferación general de leucocitos maduros de la serie granulocítica en la médula ósea, sangre periférica y otros órganos hematopoyéticos como el bazo, acompañada de basofilia constante y frecuentemente esplenomegalia (Faderl *et al*, 1999; Delhommeau *et al*, 2006; Druker 2008; Quintás-Cardama & Cortes, 2009).

La LMC constituye el 15-20% del total de las leucemias, con una incidencia de 1,5 casos por cada 100.000 habitantes/año y es más frecuente en varones de edad media-avanzada (55-60 años en adelante) (Hehlmann *et al*, 2007; Druker 2008). Su curso natural puede ser dividido en varias fases. Tras una primera fase inicial mieloproliferativa o crónica, la enfermedad avanza hacia una fase de aceleración, en la que la maduración de las células hematopoyéticas normales cesa, desembocando en una fase aguda. En la mayoría de los casos, la presencia de una trombosis aislada puede llevar a la detección de la enfermedad en la fase crónica aunque, en otros casos, la transformación a leucemia aguda es inmediata (Faderl *et al*, 1999; Delhommeau *et al*, 2006, Druker 2008). En la actualidad, y con el tratamiento adecuado, los pacientes que la sufren pueden presentar supervivencias de 30 años o más sin que la enfermedad se agudice (Hehlmann *et al*, 2007; Druker 2008).

Como se verá a continuación, la LMC se caracteriza por la presencia del transcrito de fusión *BCR-ABL1* (Prieto 1970; Rowley 1973), consecuencia de la t(9;22)(q34;q11) que origina el denominado cromosoma *philadelphia* (*Ph*) (Nowell & Hungerford, 1960). Este rasgo, sirve de criterio diagnóstico para la LMC y permite diferenciarla del resto de NMPCs clásicas (Kralovics 2002; Delhommeau *et al*, 2006, De Keersmaecker & Cools, 2006; Macdonad & Cross, 2007; Tefferi & Gilliland, 2007; Panani *et al*, 2007; Levine & Gilliland, 2008).

4.2.2 Policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis idiopática

El resto de NMPC clásicas (PV, TE y MFI) no presentan el transcrito *BCR-ABL1*, por lo que se denominan NMPCs *BCR-ABL1* negativas o *Ph* negativas. Las tres son enfermedades muy semejantes desde el punto de vista biológico, genotípico y fenotípico y ninguna muestra un inmunofenotipo único o característico. Todas ellas tienen su origen en una célula pluripotencial hematopoyética, presentan una maduración celular relativamente normal y una tendencia a evolucionar a mielofibrosis secundaria. (Campbell & Green 2006; Haferlach *et al*, 2007; Spivak & Silver, 2008).

La policitemia vera (PV) fue descrita por primera vez en 1892 por Louis Henri Vaquez (Levine & Gilliland, 2008; Tefferi, 2008). Los pacientes que la padecen muestran un exceso en la proliferación de la serie eritroide, sin aumento de los niveles de EPO sérica y con una maduración celular relativamente normal (Campbell & Green, 2005; Levine & Gilliland, 2008). Los progenitores eritroides obtenidos de estos pacientes muestran la capacidad de formar colonias eritroides endógenas *in vitro* (EEC, *endogenous erythroid colonies*) (Prchal & Axelrad, 1974) que, junto a la eritrocitosis asociada, demuestra su carácter neoplásico. Su incidencia es de

2-3 casos por cada 100.000 habitantes/año y es ligeramente más frecuente en varones de edad media (Tefferi *et al*, 2003; Passamonti *et al*, 2004; Campbel & Green, 2005). Sus síntomas más frecuentes son inespecíficos (fatiga, debilidad, vértigo, sangrado, dolor abdominal y cefalea). Algunas veces aparecen otros síntomas más específicos como prurito, mucosas y piel con tono rojo-púrpura, trombosis, esplenomegalia y/o hepatomegalia (Spivak 2002; Campbel & Green 2005). Al igual que en la LMC, la PV comienza con una fase crónica con eritrocitemia, seguida de trombocitemia y leucocitemia. Tras ello, se desarrolla una mielofibrosis medular que desemboca finalmente en una leucemia aguda con un alto grado de mielofibrosis, acompañada de esplenomegalia y hepatomegalia (Tefferi 2003; Campbel & Green, 2005; Michiels *et al*, 2007; Spivak & Silver, 2008; Tefferi & Vardiman, 2008). La media de supervivencia de los pacientes con PV es de 10 años (Haferlach *et al*, 2007; Tefferi, 2008).

La trombocitemia esencial (TE), fue descrita en 1934 por Emil Epstein y Alfred Goedel (Epstein & Goedel, 1934; Levine & Gilliland, 2008; Tefferi, 2008a). Los pacientes que la padecen, muestran un número de plaquetas elevado (trombocitosis) y una hiperplasia megacariocítica de la médula ósea (Michiels *et al*, 2007; Spivak & Silver, 2008; Tefferi & Vardiman, 2008), con megacariocitos largos, aparentemente maduros, con núcleos lobulados e hiperlobulados (Tefferi *et al*, 2007; Tefferi & Vardiman, 2008). Esta enfermedad es menos frecuente que la PV, con 0,2-2,5 casos por cada 100.000 habitantes/año y muestra una incidencia mayor en mujeres de edad media (Tefferi *et al*, 2003; Tefferi, 2008b). La supervivencia media de los pacientes se encuentra entre los 10 a 15 años (Haferlach *et al*, 2007, Tefferi, 2008b).

La mielofibrosis idiopática (MFI), fue descrita por primera vez por Gustav Heuck en 1897 (Tefferi 2008; Levine & Gilliland, 2008). Se caracteriza por una proliferación megacariocítica, acompañada de un aumento del tejido fibroso en médula ósea y por la presencia de una hematopoyesis extramedular, principalmente en bazo e hígado (Michiels *et al*, 2007; Levine & Gilliland, 2008; Spivak & Silver, 2008; Tefferi & Vardiman, 2008). Es poco frecuente, con 0,5-1,3 nuevos casos por cada 100.000 habitantes/año y presenta una incidencia algo mayor en varones de edad media-avanzada (Tefferi *et al*, 2003; Tefferi 2007). Se trata de la NMPC clásica más agresiva, con una media de supervivencia de cuatro años (Haferlach *et al*, 2007; Tefferi, 2008).

Debido a la semejanza de los rasgos clínicos de todas estas enfermedades, la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso en el año 2008 una serie de criterios diagnósticos para diferenciarlas (**Tabla 2**) (Tefferi *et al*, 2008; Tefferi & Vardiman, 2008; Spivak & Silver, 2008).

Tabla 2. Criterios diagnósticos de la PV, TE y MFI (tomados de Tefferi *et al*, 2008; Tefferi & Vardiman, 2008; Spivak & Silver, 2008).

Policitemia vera (PV)
Criterios mayores:
<ul style="list-style-type: none">• Hemoglobina >18,5 g/dL en hombre y 16,5 g/dL en mujeres, o evidencia del aumento del volumen de eritrocitos.• Presencia de mutación V617F de <i>JAK2</i> o en el exón 12 de <i>JAK2</i>.
Criterios menores:
<ul style="list-style-type: none">• Hipercelularidad de médula ósea con aumento en la proliferación de las líneas eritroide, granulocítica y megacariocítica (panmielosis).• Descenso en el nivel de eritropoyetina sérica, por debajo del normal.• Formación de colonias eritroides endógenas <i>in vitro</i>.
Trombocitemia esencial (TE)
<ul style="list-style-type: none">• Recuento de plaquetas $\geq 450 \times 10^9/L$• Aumento en la proliferación de megacariocitos maduros con forma larga, pero no necesariamente de granulocitos neutrófilos ni eritrocitos.• Ausencia de criterios diagnósticos para PV, TE, LMC y SMD, u otras neoplasias mieloides.• Demostración de la mutación V617F de <i>JAK2</i> o de otro marcador de clonalidad o, en ausencia de marcador, la ausencia de evidente trombocitosis reactiva.
Mielofibrosis idiopática (MFI)
Criterios mayores:
<ul style="list-style-type: none">• Proliferación de megacariocitos anómalos acompañada de un aumento de la reticulina y/o fibrosis de colágeno. En ausencia de fibrosis reticular, los cambios en los megacariocitos van acompañados de un aumento de la celularidad medular, proliferación granulocítica y, en ocasiones, descenso de la eritrocitosis (MFI pre-fibrótica).• Ausencia de criterios diagnósticos para la LMC, PV, SMD y otras neoplasias mieloides.• Demostración de la mutación V617F de <i>JAK2</i> (sangre periférica) o de otro marcador clonal (como W515L/K de <i>MPL</i>) o, en ausencia de marcador, evidencia de la ausencia de fibrosis medular reactiva.
Criterios menores:
<ul style="list-style-type: none">• Leucoeritroblastosis• Aumento de la LDH sérica.• Anemia.• Esplenomegalia palpable.

En el caso de la PV, es necesario que el paciente cumpla ambos criterios mayores y al menos un criterio menor, o el primer criterio mayor (eritrocitosis) y al menos dos criterios menores. En el caso de la TE, se deben cumplir los cuatro criterios señalados, que incluyen un marcador genético de clonalidad o, en su ausencia, una biopsia de médula ósea, para comprobar la hiperplasia megacariocítica de ésta y diferenciar las trombocitosis reactivas u neoplasias mieloides (Tefferi & Vardiman, 2008; Spivak & Silver 2008). Por último, en el caso de la MFI se deben cumplir los tres criterios mayores y dos de los menores. Los pacientes con MFI presentan una fibrosis reticular o de colágeno de la médula ósea, acompañada de una hiperproducción de megacariocitos anómalos. Si no hay fibrosis, los cambios en los megacariocitos deben ir

acompañados de un aumento en la celularidad de la médula ósea (Tefferi & Vardiman, 2008; Spivak & Silver 2008).

4.3 Las neoplasias mieloproliferativas crónicas atípicas

Como ya se ha indicado (Tabla 1), este grupo engloba a varias enfermedades (Tefferi & Vardiman, 2008), todas ellas raras, de difícil diagnóstico y con características clínicas comunes y solapadas entre sí.

La Leucemia Neutrófila Crónica (LNC), se caracteriza por una leucocitosis persistente en sangre periférica ($\geq 25 \times 10^9/L$) de neutrófilos segmentados, frecuente esplenomegalia e hipercelularidad granulocítica de médula ósea, sin displasia evidente ni fibrosis reticular (Elliott 2004; Haferlach *et al*, 2007). Existen pocos casos descritos en la bibliografía y su diagnóstico se realiza por exclusión.

En el caso de la Leucemia Eosinofílica Crónica (LEC) y el Síndrome Hipereosinofílico (SHE) (Hardy & Anderson, 1968), la característica predominante es una eosinofilia persistente de origen desconocido ($\geq 1,5 \times 10^9/L$ en sangre periférica) durante más de 6 meses (en el caso del SHE) y un aumento en el número de eosinófilos en médula ósea (en el caso de la LEC) (Chusid & Dale, 1975; Gleich & Leiferman, 2005; Klion *et al*, 2006; Haferlach *et al*, 2007). Esta eosinofilia prolongada provoca infiltración en distintos tejidos, con el consiguiente daño orgánico (Gleich & Leiferman, 2005; Roufosse *et al*, 2007). Los pacientes muestran frecuentemente hepatomegalia, esplenomegalia y un aumento de la vitamina B12 sérica (Gleich & Leiferman, 2005).

La Mastocitosis Sistémica (MS) es una enfermedad compleja, descrita inicialmente por Nettleship en 1869 como urticaria pigmentosa (Robyn & Metcalfe, 2006). Se caracteriza por un crecimiento anormal y una acumulación de mastocitos en uno o más órganos. Es más prevalente en mujeres que en hombres de raza caucásica (3:1) (Robyn & Metcalfe, 2006). En muchos pacientes, la acumulación de mastocitos afecta únicamente a la piel (Robyn & Metcalfe, 2006), pero en otros pueden verse afectados otros órganos, como la médula ósea, el bazo y el tracto gastrointestinal (Delhommeau *et al*, 2006; De Keersmaecker & Cools, 2006).

4.4 Resto de neoplasias mieloides crónicas

En cuanto al resto de neoplasias mieloides, los síndromes mielodisplásicos (SMD) se caracterizan por una hematopoyesis inefectiva, que origina una disminución del número de

células maduras en sangre periférica (citopenia) y una hiperplasia de médula ósea (Nolte & Hofmann, 2008; Tefferi & Vardiman, 2008).

Los pacientes con Neoplasias Mieloproliferativas/Neoplasias Mielodisplásicas (NMP/NMD) presentan características comunes de ambos tipos de neoplasias mieloproliferativas y mielodisplásicas, ya que muestran displasia eritroide o granulocítica con mieloproliferación efectiva (Orazi & Germing, 2008). En algunos casos se observa leucocitosis y/o monocitosis. Entre ellas, hay entidades clínicas como la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), la leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), la leucemia mieloide crónica atípica (LMCa) y entidades clínicas de difícil clasificación (NMD/NMP inclasificables), pero que muestran algunos de estos rasgos (Tefferi & Vardiman, 2008; Vardiman 2010).

La LMMC muestra monocitosis en sangre periférica ($>1 \times 10^9/L$) y disgranulopoyesis ($>10\%$) (Haferlach *et al*, 2007). En esta enfermedad los monocitos suelen presentar una morfología alterada, con gránulos citoplasmáticos y núcleos extraños. Además, la médula ósea muestra hiperplasia monocítica y granulocítica (Orazi & Germing, 2008). La OMS diferencia LMMC-1 y 2, en función del número de blastos detectados en sangre periférica y médula ósea (Vardiman *et al*, 2002): $<5\%$ blastos en sangre periférica y $<10\%$ en médula ósea en la LMMC-1 y 5-19% blastos en sangre periférica y 10-19% en médula ósea en la LMMC-2.

La LMMJ es una enfermedad agresiva que mezcla rasgos mieloproliferativos con mielodisplásicos y que afecta a niños. Se caracteriza por una superproducción de mielomonocitos y leucocitos acompañada de trombocitemia y anemia (Koike & Matsuda, 2008).

La LMCa es una enfermedad rara, más agresiva que la LMC *BCR-ABL1* positiva, y que muestra una disgranulopoyesis severa que se diferencia de la LMMC por la ausencia de monocitosis y basofilia (Vardiman *et al*, 2002; Orazi & Germing, 2008).

Aquellos casos con rasgos mieloproliferativos y eosinofilia persistente en los cuales se hayan detectado alteraciones en las regiones correspondientes a los genes *PDGFRA* (4q12), *PDGFRB* (5q31-33) o *FGFR1* (8p11), se clasifican ahora dentro de entidades clínicas propias (Orazi & Germing, 2008; Tefferi & Vardiman, 2008). La implicación de estos genes en la patogénesis de las NMPCs se describirá posteriormente. Entre ellas destacan los reordenamientos de 8p11. Hasta la fecha, se han descrito once translocaciones que implican esa región, cuyo resultado es la fusión del gen *FGFR1* con otros genes *partner*. El fenotipo de los pacientes con estas alteraciones es muy similar, por lo que ya hace años se propuso la creación de una entidad clínica propia, el *síndrome leucemia/linfoma de células madre* o *síndrome mieloproliferativo 8p11* (EMS, *8p11 myeloproliferative syndrome*) (Macdonald *et al*, 1995; Inhorn *et al*, 1995). Se trata de una enfermedad muy agresiva, con una marcada eosinofilia, que suele presentar una rápida

evolución la leucemia aguda, con una supervivencia inferior a 12 meses (Macdonald *et al*, 2002; Cross & Reiter, 2008; Goradia *et al*, 2008), aunque en algunos casos no es así (Vizmanos *et al*, 2004). Actualmente, la nueva clasificación de la OMS, ha modificado el término de *síndrome 8p11* por el de *neoplasias mieloides y linfoides asociadas con reordenamientos de FGFR1* (Tefferi & Vardiman, 2008).

5 Patogénesis molecular de las NMPCs

Las alteraciones genéticas que originan estas enfermedades no se conocen por completo. A pesar de que los análisis realizados en los últimos años han descrito algunas de ellas, todavía existe un grupo considerable de pacientes con NMPCs para el que no ha podido encontrarse ninguna alteración genética que justifique el desarrollo de su enfermedad (Cross & Reiter, 2002; Delhommeau *et al*, 2006). Las primeras alteraciones descritas se detectaron a nivel citogenético y muchas de las caracterizadas molecularmente tenían como consecuencia la generación de genes de fusión. Posteriormente, la aplicación de técnicas masivas de barrido a nivel molecular, ha permitido la caracterización de otras alteraciones a nivel de secuencia, que provocan la pérdida o ganancia de función de los genes afectados (Skorski 2002; De Keersmaecker & Cools, 2006; Mitelman 2007; Macdonald & Cross, 2007; Walz *et al*, 2008). Como veremos, la descripción y caracterización de estas alteraciones, permite comprender mejor la génesis de este tipo de enfermedades, la relación entre ellas y, sobre todo, permite realizar un mejor diagnóstico y tratamiento de los pacientes que las padecen.

A nivel citogenético, la alteración más frecuente y estudiada es la t(9;22)(q34;q11) (Prieto *et al*, 1970; Rowley, 1973) que, en el contexto mieloproliferativo, es criterio diagnóstico de la LMC. En el resto de las enfermedades mieloproliferativas, no existen alteraciones específicas de este tipo y en la mayoría de los casos el cariotipo es normal (Cross & Reiter, 2002; De Keersmaecker & Cools, 2006), lo que, en muchos casos, complica su diagnóstico.

A pesar de esto, a lo largo de los años se han descrito diversas alteraciones citogenéticas con una cierta recurrencia (generalmente siempre inferior en la TE), como ganancias en 9p (en 30-40% de los pacientes con PV y MFI y 5-6% de TE), deleción en 20q (en 10% de pacientes con PV y MFI), deleción en 13q (más frecuente en mielofibrosis secundarias a una leucemia), duplicaciones de 1q, trisomía del cromosoma 8 (asociada a buen pronóstico), trisomía del cromosoma 9 y finalmente, translocaciones que afectan a 8p11 y 5q33 y deleción de 4q (Chen *et al*, 1998; Bench *et al*, 1998; Bench & Pahl, 2005; Tefferi & Gilliland, 2006; Delhommeau *et al*, 2006; De Keersmaecker & Cools, 2007; Panani, 2007; Haferlach *et al*, 2007). Éstas últimas alteraciones han dado lugar, como se ha indicado, al establecimiento de entidades clínico-patológicas

diferenciadas según la clasificación de la OMS de 2008 (Tabla 1) (Tefferi & Vardiman, 2008; Spivak & Silver, 2008).

5.1 La causa molecular de la LMC: fusión *BCR-ABL1*

En 1960 Nowell y Hungerford descubrieron que los pacientes con LMC mostraban una alteración cromosómica recurrente (Nowell & Hungerford, 1960), que consistía en la presencia de un cromosoma más pequeño y acrocéntrico, al que se dió el nombre de cromosoma *Philadelphia* (*Ph*), en honor a la ciudad donde se había descubierto (Filadelfia, PA, EE. UU.). Inicialmente, se pensó que esta alteración podía ser el resultado de la pérdida de material de algún cromosoma y fue el primer ejemplo en el que una alteración cromosómica se vinculó al desarrollo de una neoplasia (Sawyers, 1999).

Posteriormente, la técnica de bandeo cromosómico permitió identificar al cromosoma afectado como el 22 y se comprobó que, en realidad, el cromosoma *Ph* era consecuencia de una translocación recíproca equilibrada entre los cromosomas 9 y 22, la $t(9;22)(q34;q11)$ (Prieto *et al*, 1970; Rowley, 1973), que tenía como resultado la formación de un nuevo gen de fusión entre *BCR* (*B*reakpoint *C*luster *R*egion) y *ABL1* (*A*belson murine *l*eukemia viral oncogene homolog *1*) (Groffen *et al*, 1984; Shtivelman *et al*, 1985; Stam *et al*, 1985) (**Figura 5A**). El extremo 5' del gen *BCR*, localizado en 22q11, se fusionaba al extremo 3' del gen *ABL1*, situado en 9q34, y como consecuencia se crea un nuevo gen de fusión *BCR-ABL1* (**Figura 5B**). Actualmente, la presencia de esta fusión es un criterio diagnóstico y característico de la LMC en el contexto mieloproliferativo (Sawyers 1999; Quintás-Cardama & Cortes, 2006; Hehlmann, 2007), aunque también aparece en un 25% de los casos con LLA (Radich, 2001; Ottmann & Wassmann, 2005; Piccaluga *et al*, 2007).

La $t(9;22)(q34;q11)$ es la única alteración citogenética detectada en la LMC en fase crónica. Sin embargo, en la fase acelerada se observan más aberraciones cromosómicas en el 60-80% de los casos. Las más frecuentes son la trisomía 8, trisomía 19, isocromosoma 17 y, en algunos casos, un segundo cromosoma *Ph* (Chase *et al*, 2001; Johansson *et al*, 2002; Quintás-Cardama & Cortes, 2009). Por ello, se cree que la proteína *BCR-ABL1* sería la causante de la fase crónica de la LMC, aunque para su progresión parecen necesarias otras alteraciones genéticas (Delhommeau *et al*, 2006; Walz *et al*, 2008; Quintás-Cardama & Cortes, 2009).

BCR se expresa en la mayoría de tipos celulares pero, sorprendentemente, su función no está clara. La proteína que codifica, contiene en su extremo aminoterminal un dominio tipo *coiled-coil*, con capacidad de oligomerización (McWhirter & Wang, 1993). *ABL1* codifica una proteína con actividad TK citoplasmática (CTK, *c*itoplasmatic *t*yrosine *k*inase) (Heisterkamp *et al*, 1983;

Sawyers *et al*, 1994), que actúa como intermediario en varias vías de señalización intracelular, implicadas en el crecimiento y proliferación (Sawyers *et al*, 1994; Pendergast, 1996; Wang, 2000; Pendergast, 2002). La translocación produce la fusión de la porción de *BCR* que codifica el dominio de oligomerización con la porción de *ABL1* que codifica el dominio TK. Como consecuencia, se forma una proteína quimérica BCR-ABL1 que presenta una actividad TK constitutivamente activa e independiente de estímulo. Esto conduce al aumento de la señalización mediada por ABL1 en diversas vías, con el consiguiente aumento en la proliferación e inhibición de la apoptosis (Delhommeau *et al*, 2006; De keersmaecker & Cools, 2006; Walz *et al*, 2008; Kralovics 2008; Quintás-Cardama & Cortes, 2009).

Existen distintas formas de oncoproteínas BCR-ABL1, según los exones de *BCR* que se fusionen, en todos los casos, con el exón 2 de *ABL1* (**Figura 5B**). Las formas más frecuentes en LMC son las denominadas b2a2 (fusión entre los exones 13 de *BCR* y 2 de *ABL1*) y b3a2 (fusión entre los exones 14 de *BCR* y 2 de *ABL1*) que generan, en ambos casos, una oncoproteína de 210 KDa denominada p210^{BCR-ABL1}. Otras formas menos frecuentes son la p190^{BCR-ABL1} (por fusión del exón 2 de *ABL1* con el exón 1 de *BCR*) y la p230^{BCR-ABL1} (por fusión con el exón 19 de *BCR*), que están asociadas a casos de LMC con monocitosis o granulocitosis severa (Delhommeau *et al*, 2006; Mitelman *et al*, 2007; Tefferi & Gilliland, 2007; Walz *et al*, 2008). La forma p190^{BCR-ABL1} se encuentra también en casos de LLA de células B (Delhommeau *et al*, 2006).

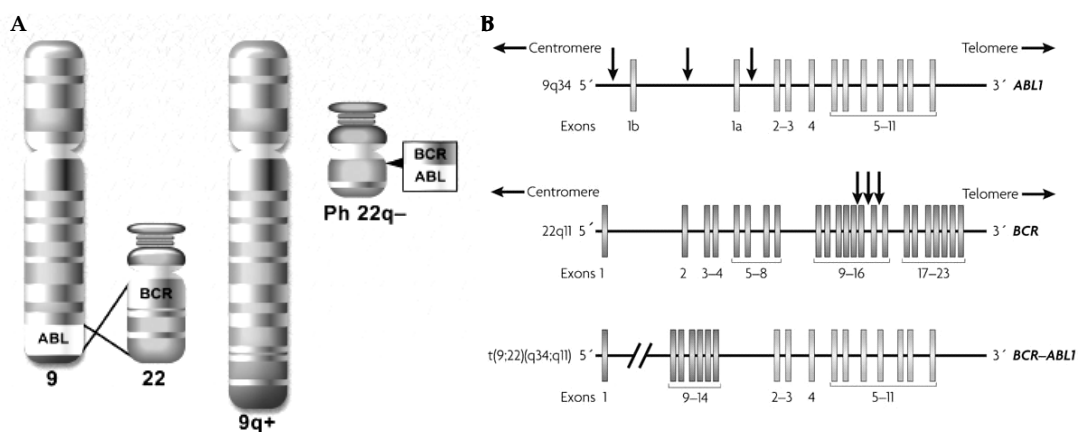


Figura 5. A) Esquema de la t(9;22)(q34;q11). *BCR* (en 22q11) se fusiona con *ABL1* (en 9q34) para dar lugar al cromosoma *philadelphia* (*Ph*), un der(22) con parte del cromosoma 9. B) Puntos de rotura observados en los genes *ABL1* y *BCR*. *ABL1* presenta dos transcritos alternativos, según presenten el exón 1a ó 1b. El gen de fusión *BCR-ABL1*, muestra el extremo 5' de *BCR* y el 3' de *ABL1*. A pesar de que se han descrito distintos puntos de rotura en *BCR*, en todos los casos se fusionan con el exón 2 de *ABL1*. Figura tomada de Mitelman *et al*, 2007.

La caracterización de *BCR-ABL1* en la mayor parte de los pacientes con LMC fue uno de los principales avances en la investigación oncológica del siglo XX y permitió desarrollar una terapia específica. Hasta 1990 el tratamiento de la LMC era poco específico y eficaz, con fármacos como el busulfan, la hidroxiurea o el interferón alfa recombinante (IFN- α), aunque únicamente el trasplante alogénico de médula ósea era realmente eficaz. A lo largo de la década de los 90, estos tratamientos fueron sustituidos con éxito por moléculas inhibitoras de la acción TK de *BCR-ABL1* (Vlahovic & Crawford, 2003; Druker 2008; Quintás-Cardama & Cortes, 2009), permitiendo que la enfermedad cronifique y no se agudice.

La primera molécula de este tipo, fue el STI571 o mesilato de imatinib (*Imatinib mesylate*, Glivec®, Novartis, Suiza), un inhibidor de la actividad TK de varias TKs, desarrollado inicialmente Brian Druker y colaboradores en 1994 (Buchdunger *et al*, 1996; Tefferi, 2008c). Esta molécula, análoga estructural del ATP necesario para la actividad fosforiladora de *ABL1*, compite con él en el centro activo enzimático bloqueando la cascada de señalización (**Figura 6**) (Schindler *et al*, 2000). La actividad inhibitora de esta molécula frente a otras TKs como PDGFRs (Buchdunger *et al*, 1995), KIT (Heinrich *et al*, 2000) y *ABL2* (Okuda *et al*, 2001) permite también su aplicación terapéutica en las neoplasias con alteraciones activantes de estos genes, algunas de ellas relacionadas, como veremos, con la LMC (Carroll *et al*, 1997; Buchdunger *et al*, 2000; Savage & Antman, 2002; Pardanani & Tefferi, 2004; Tefferi 2008c; An *et al*, 2010).

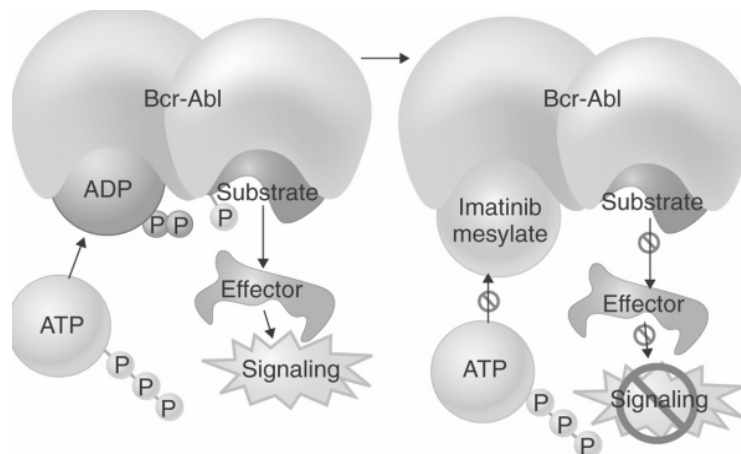


Figura 6. Mecanismo de acción del mesilato de imatinib (Glivec®). La proteína de fusión *BCR-ABL1* interviene en diversas vías de señalización a través de la fosforilación de otras proteínas, para lo que es necesario el ATP. El imatinib compite con el ATP impidiendo la acción fosforiladora de *BCR-ABL1*, así como de otras TKs. Figura tomada de Goldman, *Cecil Medicine*, 23ª edición.

Sin embargo, a pesar del enorme éxito del imatinib y de la ventaja que ha supuesto en el tratamiento de la LMC, cerca del 20% de los pacientes de LMC desarrollan resistencias a esta

molécula. Uno de los mecanismos de resistencia más frecuentes es la aparición de mutaciones puntuales en el dominio TK de ABL1, como la T315I (Gorre *et al*, 2001; Druker 2008; An *et al*, 2010). El desarrollo de inhibidores de segunda generación por parte de algunas compañías farmacéuticas en los últimos años ha solucionado algunos de estos problemas. Entre estas nuevas moléculas se encuentran el nilotinib (AMN107; Tasigna®, Novartis) (Weisberg *et al*, 2005), con una actividad de entre 10 y 30 veces mayor que el imatinib, el dasatinib (BMS 354825; Sprycel®, Bristol-Myers Squibb; Shah *et al*, 2004; Lombardo *et al*, 2004) y el bosutinib (SKI-606, Wyeth; Golas *et al*, 2003). En general, estos fármacos son eficaces contra las mutaciones de ABL1 causantes de resistencia a imatinib, salvo la T315I (Druker, 2008; Tefferi 2008c, An *et al*, 2010), aunque hay otros en desarrollo que sí parecen serlo (Mughal & Goldman, 2007; An *et al*, 2010).

5.2 La causa molecular de la PV, TE y MFI

Como se ha señalado y a diferencia de la LMC, en este tipo de enfermedades no se observan alteraciones cromosómicas específicas recurrentes que puedan considerarse la causa de estas patologías. Sin embargo, su detección en algunos casos, junto con los análisis del patrón de inactivación del cromosoma X, demuestran que también son enfermedades clonales (Bench *et al*, 1998; Bench & Pahl, 2005; Skoda 2007; Panani *et al* 2007; Kralovics, 2008).

El hecho de que la eritrocitosis sea un rasgo característico de la PV (Campbell & Green, 2006), que las células progenitoras eritroides de estos pacientes y de algunos casos con TE (Bench & Pahl, 2005) sean capaces de proliferar *in vitro* en ausencia de eritropoyetina (Prchal & Axilrad, 1974; Westwood & Pearson, 1996) y la hipersensibilidad de estas células a diversos factores de crecimiento hematopoyéticos (como EPO, TPO, IGF-1, IL3 y GM-CSF) (Dai *et al*, 1991; Dai *et al*, 1994; Correa *et al*, 1994; Montagna *et al*, 1994), hizo pensar que la causa de estas enfermedades debía estar en la alteración de los componentes de la señalización mediada por estas citoquinas (Tefferi & Spivak, 2005).

Inicialmente, los análisis se centraron en el estudio de los genes codificantes de los receptores de algunos de estos factores de crecimiento (Tefferi & Spivak, 2005). En contra de lo esperado, no se encontraron mutaciones en los genes codificantes del receptor de la eritropoyetina (EPOR, Hess *et al*, 1994; Mittelman *et al*, 1996; Le Couedic *et al*, 1996), del receptor II de TGFbeta (TGFB2, Li *et al*, 1998) o del receptor de IGF1 (IGF1R, Michl *et al*, 2001). Por el contrario, se observó una expresión anormalmente reducida del receptor de la trombopoyetina (TPOR), codificado por *MPL*, aunque no parecía ser específica de las NMPCs clásicas y su relevancia no estaba clara. Además, en algunos pacientes con PV, se observó la existencia de una sobreexpresión de *PRV-1* en sus granulocitos (Klippel *et al*, 2003), pero sin asociación con un aumento de su producto proteico y de la que se desconoce su función biológica. Esta alteración

no era específica de la PV y también se observaba en el 50% de los pacientes con TE y el 78% de los pacientes con MFI (Passamonti *et al*, 2004).

Durante los últimos 10 años los ensayos con *arrays* de CGH han conducido a la identificación de regiones con pérdida de heterocigosidad (LOH, *loss of heterozygosity*), en las que se produce disomía uniparental (UPD, *uniparental disomy*) adquirida o somática. La UPD adquirida, es el resultado de una recombinación mitótica causada por el intercambio de DNA cromosómico entre cromátidas no hermanas durante la mitosis, que da lugar a la presencia de regiones homocigotas muy extensas, pero sin cambios en el número de copia (Kralovics 2008). Estas regiones eran buenas candidatas a contener genes cuya alteración podría ser la causa de la neoplasia. Por ello, su identificación ayuda a detectar nuevos genes (tanto supresores de tumores como oncogenes) candidatos a estar implicados en la patogénesis de estas enfermedades (Chen *et al*, 1998; Westwood *et al*, 2001; Najfeld *et al*, 2002). De hecho, uno de los descubrimientos más interesantes en la PV fue la frecuente LOH y ganancia de material en 9p en pacientes con esta enfermedad (Kralovics *et al*, 2002; Kralovics *et al*, 2003).

En el año 2005, cinco grupos de investigación (Baxter *et al*, 2005; James *et al*, 2005; Kralovics *et al*, 2005; Levine *et al*, 2005; Zhao *et al*, 2005), de manera independiente y con distintas hipótesis de trabajo y aproximaciones experimentales, descubrieron lo que en aquel momento pareció ser la alteración genética causante de estas enfermedades. Los cinco grupos describieron la presencia de una única mutación somática en el gen *JAK2*, presente en la mayoría de los pacientes con PV y en una gran parte de los pacientes con TE y MFI. Esto demostraba de nuevo la relación entre las tres enfermedades. La mutación consiste en una sustitución puntual de Val por Phe en la posición 617 de *JAK2* (p.V617F), como consecuencia del cambio c.1849G>T en el exón 14 del gen. De manera inmediata, otro grupo publicó sus resultados sobre la incidencia de esta mutación en diversas neoplasias mieloides, encontrando que también aparecía en otras NMPCs, pero no en LMC, MS, eritrocitosis secundarias, LMA, ni en la población sin enfermedad (Jones *et al*, 2005).

JAK2 (*Janus kinase 2* o *Just Another Kinase 2*, 9p24), codifica para una TK de localización citoplasmática y nuclear que forma, junto con *JAK1* (1p31.3), *JAK3* (19p13.2) y *TYK2* (19p13.2), una familia de CTKs implicadas en distintas vías de señalización fundamentales en la biología de las células hematopoyéticas, especialmente en la vía JAK-STAT (Ward *et al*, 2000; Tefferi 2008). Las JAK son proteínas grandes (120-140 kDa) y muestran una estructura común dividida en dominios (**Figura 7**). La actividad catalítica quinasa reside en el dominio TK carboxiterminal o JH1 (*Jak homology 1*). Hacia el extremo aminoterminal, el dominio pseudoquinasa adyacente o JH2 (*Jak homology 2*) parece que ejerce una función autoinhibitoria de la actividad TK. *JAK2* posee además un dominio central SH2 (*Src homology 2*), necesario para su interacción con otras

proteínas de señalización y un dominio FERM (nombre obtenido a partir de las cuatro proteínas originales donde fue descrito F de *Band 4.1*, E de *Ezrin*, R de *Radixin*, M de *Moesin*), con posible función autoreguladora y de unión a proteínas transmembrana y del citoesqueleto (Imada & Leonard, 2000; Ward *et al*, 2000). La sustitución p.V617F afecta al dominio pseudoquinasa JH2 y parece causar la pérdida de su función autoinhibitoria, haciendo que JAK2 permanezca constantemente activada (Delhommeau *et al*, 2006; De Keersmaecker & Cools, 2006; Levine *et al*, 2007; Kralovics 2008; Tefferi & Gilliland, 2008; Kota *et al*, 2008; Tefferi, 2010).

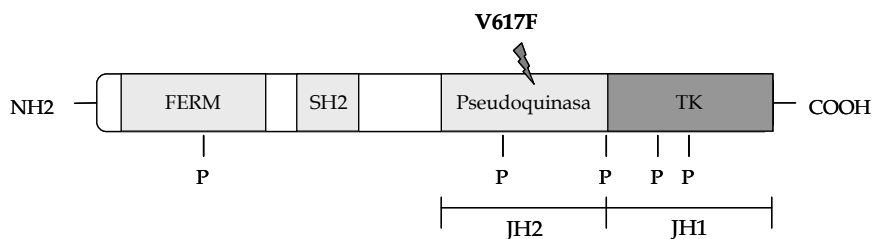


Figura 7. Estructura dividida en dominios de JAK2. La mutación V617F afecta al dominio pseudoquinasa (JH2).

La presencia de la p.V617F en *JAK2*, confiere a las células hematopoyéticas una hipersensibilidad a citoquinas y un crecimiento independiente de éstas, características previamente descritas en la PV (Lacout *et al*, 2006; Wernig *et al*, 2006; Levine *et al*, 2007). Los estudios *in vitro* de esta mutación han demostrado que su presencia da lugar a la activación de múltiples vías de señalización intracelular, como JAK-STAT, MAPK y PI3K-AKT (Levine *et al*, 2005; James *et al*, 2005; Delhommeau *et al*, 2006; Wernig *et al*, 2006; Levine *et al*, 2007; Kota *et al*, 2008). Además, estudios *in vivo* han demostrado que es capaz de inducir un fenotipo neoplásico semejante a la PV en ratones (James *et al*, 2005; Wernig *et al*, 2006).

Actualmente, la detección de esta mutación es importante desde el punto de vista diagnóstico, ya que permite diferenciar estas enfermedades de otras patologías no neoplásicas (Macdonald & Cross, 2007). Sin embargo, a pesar de que podría constituir una excelente diana terapéutica, los primeros ensayos con diversas moléculas anti-JAK2 como el XL019 (Verstovsek *et al*, 2008a), INCB018424 (Verstovsek *et al*, 2008b), CEP701 (Hexner *et al*, 2007) y TG101348 (Lasho *et al*, 2008) no han sido muy prometedores (Levine *et al*, 2007; Tefferi 2008).

A pesar de la alta frecuencia de la mutación p.V617F en NMPCs, todavía hay algunos casos de PV y, prácticamente la mitad de los casos con TE y MFI, que no la presentan. Los análisis de este mismo gen en pacientes V617F/*JAK2* negativos, ha conducido a la identificación de varias mutaciones somáticas en el exón 12, todas ellas en pacientes con PV (Martínez-Aviles *et al*, 2007; Pardanani *et al*, 2007a; Percy *et al*, 2007; Scott *et al*, 2007; Williams *et al*, 2007; Butcher *et al* 2008; Pietra *et al*, 2008; Wang *et al*, 2008; Ormazábal *et al*, 2008; Schnittger *et al*, 2009; Tefferi 2010).

Estas mutaciones también dan lugar a una proteína JAK2 constitutivamente activa (Scott *et al*, 2007; Levine *et al*, 2007) y se encuentran en una región muy conservada del dominio JH2, que codifica para los aminoácidos situados entre las posiciones 536 (Val) y 547 (Phe). Sin embargo, su incidencia es inferior al 5% (Kota *et al*, 2008). También en el dominio JH2 de JAK2, se han encontrado otras mutaciones menos frecuentes: la p.V617F, creada a partir de c.1848_1849delinsCT y descrita en un paciente con TE (Wong *et al*, 2007), la p.C616Y, descrita en un paciente con PV (Zhang *et al*, 2007), la p.C618R, en un paciente con PV que además presentaba la mutación V617F (Karow *et al*, 2008), la p.D620E en un paciente con PV y otro con una NMPC no clasificada (Grünebach *et al*, 2006; Schnittger *et al*, 2006) y la p.E627E (sin cambio de aminoácido), de nuevo en un paciente con una NMPC no clasificada (Schnittger *et al*, 2006). En nuestro laboratorio se ha encontrado también una mutación en el exón 8 (p.R340Q) en un paciente con mielofibrosis, que afectaría al dominio FERM (Aranaz & Ormazábal, 2010). En la actualidad, se está analizando su posible papel transformante. Se ha propuesto que prácticamente el 100% de los pacientes con PV presentarían algún tipo de mutación en JAK2 (Wang, *et al*, 2008); ya sea en el exón 12 o en el 14 (Kota *et al*, 2008; Tefferi 2010).

JAK2 también se observa constitutivamente activada en otras neoplasias hematológicas a través de su fusión con diversos genes (Tefferi & Gilliland, 2007). Así, se ha descrito la fusión ETV6-JAK2 como consecuencia de una t(9;12)(p24;p13) en casos de NMPCs atípicas, LLA-preB y LLA-preT (Peeters *et al*, 1997; Lacronique *et al*, 1997), la fusión PCMI-JAK2 derivada de una t(8;9)(p22;p24) en NMPCs atípicas asociados a eosinofilia, LLA/LMA o linfoma de células T (Reiter *et al*, 2005; Murati *et al*, 2005; Bousquet *et al*, 2005; Adelaide *et al*, 2006) y finalmente, la fusión BCR-JAK2 consecuencia de la t(9;22)(p24;q11.2) en NMPCs atípicas que no responden a imatinib (Griesinger *et al*, 2005).

El papel de JAK2 en la vía de señalización JAK-STAT ha hecho pensar que podrían estar afectados genes codificantes de otras proteínas implicadas en esta vía que produjeran el mismo efecto. Esta vía es ampliamente empleada por múltiples citoquinas que se unen a receptores de membrana específicos, que carecen de actividad TK intrínseca, por lo que dependen de CTKs (las JAKs) para iniciar la señalización intracelular (Kota *et al*, 2008). De hecho, a pesar de que no se encontraron mutaciones en los receptores de EPO (EPOR) y de G-CSF (GCSFR) (Hess *et al*, 1994; Mittelman *et al*, 1996; Le Couedic *et al*, 1996), Pikman y colaboradores identificaron una mutación puntual (p.W515L) en *MPL*, que codifica para el receptor de la trombopoyetina (TPOR), en pacientes con MFI V617F/JAK2 negativos (Pikman *et al*, 2006). Actualmente, se considera que un 10-15% de los pacientes con MFI y un 5-8,5% de los pacientes con TE muestran mutaciones (p.W515L, p.W515K, p.W515A, p.A506T, p.A519T) en este gen (Pikman *et al*, 2006; Pardanani *et al*, 2006; Staerk *et al*, 2007; Tefferi & Gilliland, 2007; Chaligné *et al*, 2007; Kilpivaara & Levine, 2008; Tefferi 2008; Beer *et al*, 2008; Chaligné *et al*, 2008). Estas alteraciones

se han observado también en algunos pacientes con la mutación p.V617F en *JAK2* (Kilpivaara & Levine, 2008; Chaligné *et al*, 2008), pero nunca en pacientes con PV. Además, algunas de ellas como la p.W515S y la p.S505N, habían sido previamente relacionadas con casos de NMPC familiar (Ding *et al*, 2004; Teofili *et al*, 2007; Tefferi 2010) pudiendo ser, por tanto, somáticas y germinales. Estudios *in vitro* demuestran que estas mutaciones inducen la activación constitutiva del receptor y de la vía JAK-STAT, confiriendo a las células una ventaja proliferativa (Pikman *et al*, 2006; Levine *et al*, 2007; Kota *et al*, 2008; Tefferi 2008; Tefferi 2010). En estos pacientes, el tratamiento con moléculas inhibitoras de JAK2 inhiben la proliferación de las células transformadas (Pardanani *et al*, 2007), lo que sugiere que la inhibición de la vía JAK-STAT puede ser una terapia eficaz, tanto si existe mutación en *JAK2* como si afecta a otras moléculas de la vía (Tefferi & Gilliland, 2007; Tefferi 2008). Como se describirá posteriormente, durante los dos últimos años también se han descrito alteraciones en otros genes implicados en la señalización celular en este tipo de enfermedades.

5.3 La causa molecular de las NMPCs atípicas

Las NMPC atípicas son un conjunto de neoplasias mieloproliferativas de difícil diagnóstico y clasificación, ya que no presentan alteraciones genéticas específicas asociadas y sus características clínicas se solapan. No obstante, como se ha comentado anteriormente, en algunos pacientes sí se han identificado algunas alteraciones cromosómicas que afectan a genes codificantes de TKs. Por ello, parece evidente que la alteración de la señalización a través de este tipo de proteínas constituye un mecanismo frecuente en el desarrollo del fenotipo mieloproliferativo.

La mayoría de los casos de síndrome hipereosinófilico (SHE) y leucemia eosinófila crónica (LEC) presentan cariotipos normales en el momento del diagnóstico. Esto hace que su diferenciación, en base a la demostración de clonalidad, no sea sencilla. Sin embargo, hace varios años se observó que algunos pacientes diagnosticados con estas enfermedades respondían al tratamiento con imatinib, a pesar de no tener el transcrito de fusión *BCR-ABL1*. Esto hacía sospechar de la presencia de alguna alteración en un gen con actividad TK, tras lo cual se identificó la fusión *FIP1L1-PDGFR α* (Cools *et al*, 2003). Esta fusión no era el resultado de una translocación, sino de una deleción intersticial de 800 Kb situada en el cromosoma 4 (4q12), críptica a nivel citogenético, que además provoca la pérdida de los genes comprendidos entre ambos (**Figura 8**) (De Keersmaecker & Cools, 2006; Delhommeau *et al*, 2006). *FIP1L1* codifica para una proteína aparentemente implicada en poliadenilación, pero de función poco clara (Preker *et al*, 1995). *PDGFR α* (*platelet-derived growth factor receptor alpha*) codifica para el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas de tipo alfa, corresponde a un receptor con

actividad TK de la familia III, y su producto interviene en los procesos de formación del hígado, vasos sanguíneos, pulmones y sistema nervioso central (Heldin *et al*, 1992; Kawagishi *et al*, 1995). Los puntos de rotura en *FIP1L1* son muy variables, mientras que en *PDGFRA* se mantienen constantes en el exón 12. En todos los casos, la proteína quimérica mantiene el dominio TK de *PDGFRA* que, al fusionarse con *FIP1L1*, rompe su dominio autoinhibitorio yuxtamembrana (Stover *et al*, 2006), dando lugar a una proteína con la actividad TK constitutivamente activa (Cools *et al*, 2003; Delhommeau *et al*, 2006; Tefferi & Gilliland, 2007). La incidencia de esta fusión es muy variable en las diversas series analizadas, probablemente debido a que existe una gran heterogeneidad en el diagnóstico de estas patologías. El trabajo inicial donde se describió esta alteración determinó que la fusión *FIP1L1-PDGFR* aparecía en el 56% de los casos diagnosticados con SHE/LEC (Cools *et al*, 2003), aunque actualmente el porcentaje medio se encuentra entre el 4-12% de LEC (Pardanani *et al*, 2006), con un rango de entre el 3-56% (Gotlib & Cools, 2008). La presencia de *FIP1L1-PDGFR* está considerada como marcador clonal en la variante mieloproliferativa de hipereosinofilia (Gotlib & Cools, 2008) y permite el uso racional de imatinib en los pacientes que la presentan, incluso a dosis inferiores a las suministradas en los pacientes con la fusión *BCR-ABL1* (Klion *et al*, 2004; De Keersmaecker & Cools, 2006; Baccarani *et al*, 2007).

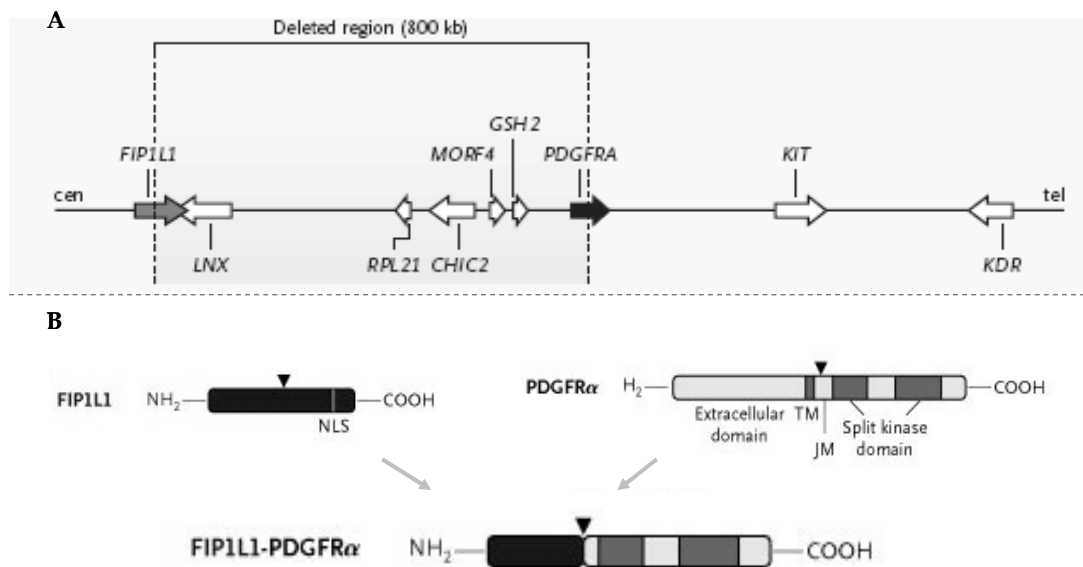


Figura 8. A) Representación del locus 4q12. La delección descrita por Cools y colaboradores corresponde a 800 Kb comprendidas entre los genes *FIP1L1* y *PDGFRA*. B) Puntos de rotura en la estructura de *FIP1L1* y *PDGFRA*. El resultado de la fusión es la formación de una TK quimérica constitutivamente activa, además de la pérdida de la copia correspondiente de los genes *LN X*, *RPL21*, *CHIC2*, *MORF4* y *GSH2*. Figura tomada de Cools *et al*, 2003.

Por otro lado, *PDGFRA* se ha visto implicado en otras cinco fusiones, resultado de translocaciones cromosómicas (Tefferi & Gilliland, 2007). La fusión *BCR-PDGFRA*, debida a la $t(4;22)(q12; q11)$ (Baxter *et al*, 2002), *KIF5B-PDGFRA* consecuencia de la $t(4;10)(q12;p11)$ (Score *et al*, 2006), *CDK5RAP2-PDGFRA* resultado de la $ins(9;4)(q33;q21q25)$ (Walz *et al*, 2006), *STRN-PDGFRA* resultado de la $t(2;4)(p24;q12)$ (Curtis *et al*, 2007) y *ETV6-PDGFRA* consecuencia de la $t(4;12)(q12;p13)$, (Curtis *et al*, 2007). Todas ellas son sensibles a imatinib (Walz *et al*, 2006), pero sólo *BCR-PDGFRA* ha mostrado recurrencia, por lo que la incidencia de estas alteraciones es extremadamente baja (Baxter *et al*, 2002; Trempat *et al*, 2003). A partir del año 2008, la clasificación de la OMS incluye a los pacientes con todas estas fusiones dentro de una entidad clínica diferenciada, denominada *neoplasias mieloides asociadas a eosinofilia con reordenamientos de PDGFRA* (Tefferi & Vardiman, 2008).

En el caso de la leucemia neutrofílica crónica (LNC), no se han identificado alteraciones moleculares importantes y existen muy pocos casos descritos en la bibliografía (Elliott *et al*, 2005). Sólo en un tercio de los pacientes se han detectado alteraciones citogenéticas, que incluyen la trisomía 8, la trisomía 9, del(20q) y del(11q) (Panani 2007), lo que dificulta la demostración de clonalidad (Elliott *et al*, 2005). En algunos casos raros se ha identificado también la mutación V617F/*JAK2*, pero se puede considerar que la causa de esta enfermedad se desconoce (Panani, 2007). Actualmente, su diagnóstico se basa en la ausencia de la fusión *BCR-ABL1* junto a una neutrofilia sostenida.

También en la mastocitosis sistémica (MS), sólo un pequeño porcentaje de los pacientes muestra alteraciones cromosómicas, aunque en ningún caso estas alteraciones han podido relacionarse con el desarrollo de la enfermedad (Swolin *et al*, 2000; Robyn & Metcalfe, 2006). El crecimiento y diferenciación de los mastocitos está regulado por varias citoquinas, entre las que destaca el factor de células madre (*cSCF*, *cytokine stem cell factor*), que actúa a través de *KIT* (*KIT*, 4q12), receptor de membrana con actividad TK. La elevada expresión de la proteína *KIT* en varias neoplasias mieloides condujo a la descripción de mutaciones activantes en una línea celular derivada de una mastocitosis humana (Furitsu *et al*, 1993; Tefferi & Gilliland, 2007). Posteriormente, se encontró una de estas alteraciones (p.D816V) en pacientes con MS (Nagata *et al*, 1995), que inducía un crecimiento independiente de factores de crecimiento y transformación neoplásica en líneas celulares de mastocitos (Piao & Bernstein, 1996). Actualmente, la demostración de clonalidad en la MS se basa en la presencia de mutaciones activantes en *KIT*, que explican el 93% de los casos (García-Montero *et al*, 2006; Patnaik *et al*, 2007). En algunos casos de MS que cursan con eosinofilia y que muestran características histológicas propias, también aparece *FIP1L1-PDGFRA*. Tanto *KIT* como *FIP1L1-PDGFRA* son sensibles a imatinib, lo que también justificaría su aplicación en esta enfermedad. Sin embargo, cerca de 90% de los casos de MS con mutaciones en *KIT* presentan la p.D816V, que es resistente a este medicamento

(Pardanani *et al*, 2003b; Tefferi *et al*, 2004; Delhommeau *et al*, 2006; De Keersmaecker & Cools 2006; Tefferi & Gilliland, 2007), pero parece sensible a algunos inhibidores de segunda generación como el dasatinib (Schittenhelm *et al*, 2006; Shah *et al*, 2006, Tefferi, 2010).

5.4 La causa molecular de otras neoplasias mieloides crónicas

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) y las neoplasias mieloproliferativas/mielodisplásicas (NMP/NMD), son enfermedades relacionadas con las anteriores, e incluso en ocasiones, algunas de ellas han sido consideradas NMPCs atípicas. En la mayoría de los casos su causa molecular se desconoce, aunque en los últimos años, se han identificado nuevos genes cuya alteración podría contribuir a la génesis de estas patologías.

Los SMD son un grupo muy heterogéneo de enfermedades. Los pacientes frecuentemente muestran deleciones de 5q y 7q, pero se desconoce qué genes de estas regiones podrían ser los realmente importantes (Haase *et al*, 2007). Entre el 10-15% de los pacientes presenta mutaciones en los genes *RAS*, que se asocian a un peor pronóstico (Paquette *et al*, 1993), aunque también se han visto casos con mutaciones en *JAK2*, *FLT3*, *EVI1*, *NPM1*, *TP53* y *AML1* (Nolte & Hofmann, 2008; Nimer, 2008).

En el caso de la leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), un tipo de NMP/NMD, sólo un tercio de los pacientes muestran alteraciones citogenéticas (Niemeyer *et al*, 1997). En esta enfermedad, los precursores mieloides desarrollan una hipersensibilidad selectiva al factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). El 70% de los casos muestran alguna alteración de la vía de señalización de *RAS*, con mutaciones en los genes *RAS*, *NF1*, y *PTPN11* (Emanuel, 2008; Koike & Matsuda, 2008). También se han descrito otras mutaciones de genes TK presentes en otras neoplasias mieloides, como la mutación ITD (*internal tandem duplication*) en *FLT3*, la V617F en *JAK2* (Tono *et al*, 2005; Emanuel, 2008; Koike & Matsuda, 2008.) o la fusión *HCMOGT1(CYTSB)-PDGFRB* en un paciente con t(5;17)(q33;p11.2) (Morerio *et al*, 2004). Recientemente, también se han encontrado mutaciones en *C-CBL* (Loh *et al*, 2009; Makishima *et al*, 2009; Muramatsu *et al*, 2010; Pérez 2010; Matsuda *et al*, 2010; Niemeyer *et al*, 2010) y en *ASXL1* (Sugimoto *et al*, 2010), que se comentarán posteriormente.

En el caso de la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) sólo un tercio de los pacientes muestran alteraciones cromosómicas (Vardiman *et al*, 2002), correspondientes en algunos casos a reordenamientos de 5q31 en el que se encuentra *PDGFRB*, codificante de una TK receptora. La única alteración que se ha podido caracterizar a nivel molecular es la fusión *ETV6-PDGFRB*, consecuencia de la t(5;12)(q31;p12) y que muestra recurrencia con una incidencia de 1-2% de los

casos (Golub *et al*, 1994). Sin embargo, como se ha indicado, la presencia de esta alteración en esta patología o en LMMJ, conduciría a que la enfermedad fuese considerada como otra entidad clínica diferenciada, la *neoplasia mielóide asociada con eosinofilia y reordenamientos en PDGFRB* (Tefferi & Vardiman, 2008). De la misma manera que en la LMMJ, la vía más afectada en esta enfermedad parece ser la RAS-MAPK, con mutaciones en alguno de sus genes en el 20-60% de los pacientes, según la serie analizada. Además, un 3-13% de los casos presentan la V617F de *JAK2* y en otro 3% de los casos se detecta *FLT3* mutado (Emanuel, 2008; Kralovics, 2008). También se han descrito mutaciones en *C-CBL*, que se cometerán posteriormente (Dunbar *et al*, 2008; Grand *et al*, 2009; Makishima *et al*, 2009; Schnittger *et al*, 2009; Kohlmann *et al*, 2010).

Clásicamente, la leucemia mielóide crónica atípica (LMCa) englobaba los pacientes con un fenotipo similar a la LMC pero sin fusión *BCR-ABL1* y que cursan con disgranulopoyesis (característica que no aparece en la LMC). Estos pacientes muestran características clínicas muy heterogéneas, que hacen que puedan ser incluidas en otras entidades ya mencionadas. En algunos casos aparece también eosinofilia. Casi el 80% de estos pacientes muestran alteraciones cariotípicas y, en algunos de ellos, se ha detectado la presencia de V617F en *JAK2* (Jones *et al*, 2005). Inicialmente, algún paciente con fusiones de *PDGFRA* y *PDGFRB* estaba diagnosticado con esta enfermedad, aunque ahora serían consideradas entidades clínicas distintas (Orazi & Germing, 2008; Tefferi & Vardiman, 2008). Otras alteraciones encontradas en este tipo de pacientes, son las fusiones *PCM1-JAK2*, consecuencia de la t(8;9)(p22;p24) (Bousquet *et al*, 2005), *BCR-JAK2*, resultado de la t(9;22)(p24;q11) (Griesinger *et al*, 2005; Cirmena *et al*, 2008; Lane *et al*, 2008), *ETV6-JAK2*, consecuencia de la t(9;12)(p24;p13) (Peeters *et al*, 1997), *ETV6-ABL1*, resultado de una inserción críptica en una t(12;14)(p12;q11-13) (Papadopoulos *et al*, 1995; Andreasson *et al*, 1997) y *SPTBN1-FLT3*, consecuencia de una t(2;13;2;21)(p13;q12;q33;q11.2) (Grand *et al*, 2007). Recientemente, se ha descrito que casi el 10% de los pacientes con LMCa presentarían UPD adquirida de 11q, lo que ha conducido a identificar mutaciones en los exones 8 y 9 de *C-CBL* (11q23) en el 8% (12/152) de los casos con esta patología (Grand *et al*, 2009).

5.5 Neoplasias mieloides con reordenamientos de *PDGFRB* y *FGFR1*

La eosinofilia aparece de manera recurrente en algunos casos de LNC, diversas NMPC atípicas, y NMP/NMD, además de en SHE/LEC. Algunas de ellas, se han asociado a translocaciones cromosómicas de las regiones 5q31-33 y 8p11, en las que se encuentran *PDGFRB* y *FGFR1*, respectivamente. Como hemos ido viendo, ambos genes codifican para receptores con actividad TK, *PDGFRB* para el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo beta y *FGFR1* para el receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos. Estas alteraciones, generan genes de fusión de estructura semejante a *BCR-ABL1* (Gotlib *et al*, 2006), en las que el gen fusionado

con el TK en 5' aporta elementos reguladores que permiten su expresión en células hematológicas y dominios de oligomerización, para provocar la activación constitutiva e independiente de ligando de la TK (Macdonald & Cross, 2007). Sin embargo, a pesar de la cantidad de fusiones descritas para ambos genes (**Tablas 3 y 4**), la incidencia global es muy baja e inferior al 1% (Cross & Reiter, 2008). En el caso de las fusiones de *FGFR1*, las fusiones se encuentran tanto en células mieloides como linfoides, lo que sugiere que ocurren en un precursor hematopoyético común a ambas células que condiciona unas características clínicas propias en estos pacientes (Macdonald & Cross, 2007; Cross & Reiter, 2008). Actualmente, la clasificación de la OMS incluye a los pacientes con estas fusiones, en el término *neoplasias mieloides asociadas con reordenamientos de PDGFRB, PDGFRA y FGFR1* (Tefferi & Vardiman, 2008).

Tabla 3. Fusiones descritas para *PDGFRB* en NMP que cursan con eosinofilia (Gotlib & Cools, 2008).

Gen de fusión	Alteración citogenética	Enfermedad	Referencia
<i>ETV6-PDGFRB</i>	t(5;12)(q33;p13)	LMMC con eosinofilia	Golub <i>et al</i> , 1994
<i>CEV14-PDGFRB</i>	t(5;14)(q33;q32)	LMA con eosinofilia	Abe <i>et al</i> , 1997
<i>HIP1-PDGFRB</i>	t(5;7)(q33;q11.2)	LMMC con eosinofilia	Ross <i>et al</i> , 1998
<i>H4-PDGFRB</i>	t(5;10)(q33;q21)	LMCa/MPN con eosinofilia	Schwaller <i>et al</i> , 2001 Kulkarni <i>et al</i> , 2000
<i>RABEP1-PDGFRB</i>	t(5;17)(q33;p13)	LMMC	Magnusson <i>et al</i> , 2001
<i>PDE4DIP-PDGFRB</i>	t(1;5)(q23;q33)	MPN/MDS con eosinofilia	Wilkinson <i>et al</i> , 2003
<i>NIN-PDGFRB</i>	t(5;14)(q33;q24)	MPN/MDS con eosinofilia	Vizmanos <i>et al</i> , 2004
<i>TP53BP1-PDGFRB</i>	t(5;15)(q33;q22)	LMCa con eosinofilia	Grand <i>et al</i> , 2004
<i>HCMOGT1-PDGFRB</i>	t(5;17)(q33;p11.2)	LMMJ con eosinofilia	Morerio <i>et al</i> , 2004
<i>KIAA1509-PDGFRB</i>	t(5;14)(q33;q32)	LMMC con eosinofilia	Levine <i>et al</i> , 2005
<i>TPM3-PDGFRB</i>	t(1;5)(q21;q33)	LEC	Rosati <i>et al</i> , 2006
<i>WDR48-PDGFRB</i>	t(1;3;5)p36;p21;q33	LEC	Curtis <i>et al</i> , 2007
<i>GOLGA4-PDGFRB</i>	t(3;5)(p21-25;q31-35)	LEC	Curtis <i>et al</i> , 2007
<i>PRKG2-PDGFRB</i>	t(4;5;5)(q23;q31;q33)	LBC	Walz <i>et al</i> , 2007
<i>GIT2-PDGFRB</i>	t(5;12)(q31-33;q24)	LEC	Walz <i>et al</i> , 2007
<i>GPIA1-PDGFRB</i>	der(1)t(1;5)(p34;q33), der(5)t(1;5)(p34;q33), der(11)ins(11;5)(p12;q15q33)	LEC	Walz <i>et al</i> , 2007
<i>NDE1-PDGFRB</i>	t(5;16)(q33;p13)	LMMC	La Starza <i>et al</i> , 2007
<i>KANK1-PDGFRB</i>	t(5;9)(q32;p24)	TE V617F/AK2 negativa	Medves <i>et al</i> , 2010
<i>SART3-PDGFRB</i>	Cariotipo nulo, 4 metafases normales	NMPC con eosinofilia	Erben <i>et al</i> , 2010
<i>GOLGA4-PDGFRB</i>	t(3;5)(p21;q31) t(3;5)(p21-25;q31-35)	NMPC atípica	Hidalgo-Curtis <i>et al</i> , 2010
<i>WDR48-PDGFRB</i>	t(1;3;5)(p36;p21;q33)	NMPC atípica	Hidalgo-Curtis <i>et al</i> , 2010
<i>BIN2-PDGFRB</i>	t(5;12)(q33;q13)	NMPC atípica	Hidalgo-Curtis <i>et al</i> , 2010

Tabla 4. Genes de fusión descritos para *FGFR1* en pacientes con NMPC y eosinofilia (*síndrome 8p11*).

Gen de fusión	Alteración cromosómica	Referencia
<i>ZMYM2(ZNF198)-FGFR1</i>	t(8;13)(p11;q12)	Xiao <i>et al</i> , 1998; Reiter <i>et al</i> , 1998; Smedley <i>et al</i> , 1998; Popovici <i>et al</i> , 1998
<i>FGFR1OP-FGFR1</i>	t(6;8)(q27;p11)	Popovici <i>et al</i> , 1999
<i>CEP110-FGFR1</i>	t(8;9)(p12;q33)	Guasch <i>et al</i> , 2000
<i>BCR-FGFR1</i>	t(8;22)(p11;q11)	Fioretos <i>et al</i> , 2001; Demiroglu <i>et al</i> , 2001
<i>NUP98-FGFR1</i>	t(8;11)(p11;p15)	Sohal <i>et al</i> , 2001 (postulada)
<i>HERVK-FGFR1</i>	t(8;19)(p11;q13)	Mugneret <i>et al</i> , 2000; Guasch <i>et al</i> , 2003
<i>FGFR1OP2-FGFR1</i>	ins(12;8)(p11;p11p22)	Grand E <i>et al</i> , 2004
<i>TRIM24-FGFR1</i>	t(7;8)(q34;p11)	Belloni <i>et al</i> , 2005
<i>MYO18A-FGFR1</i>	t(8;17)(p11;q23)	Walz <i>et al</i> , 2005
<i>CPSF6-FGFR1</i>	t(8;12)(p11;q15)	Hidalgo-Curtis <i>et al</i> , 2008
<i>LRRFIP1-FGFR1</i>	t(2;8)(q37;p11)	Soler <i>et al</i> , 2009

Como se ha ido señalando, también se han descrito otros genes de fusión similares a éstos, relacionados con la patogénesis de otras NMPCs y que implican también, en su extremo 3', a genes codificantes de TKs (**Figura 9**) (Skorsi, 2002; Cross & Reiter, 2002; Macdonald *et al*, 2002).

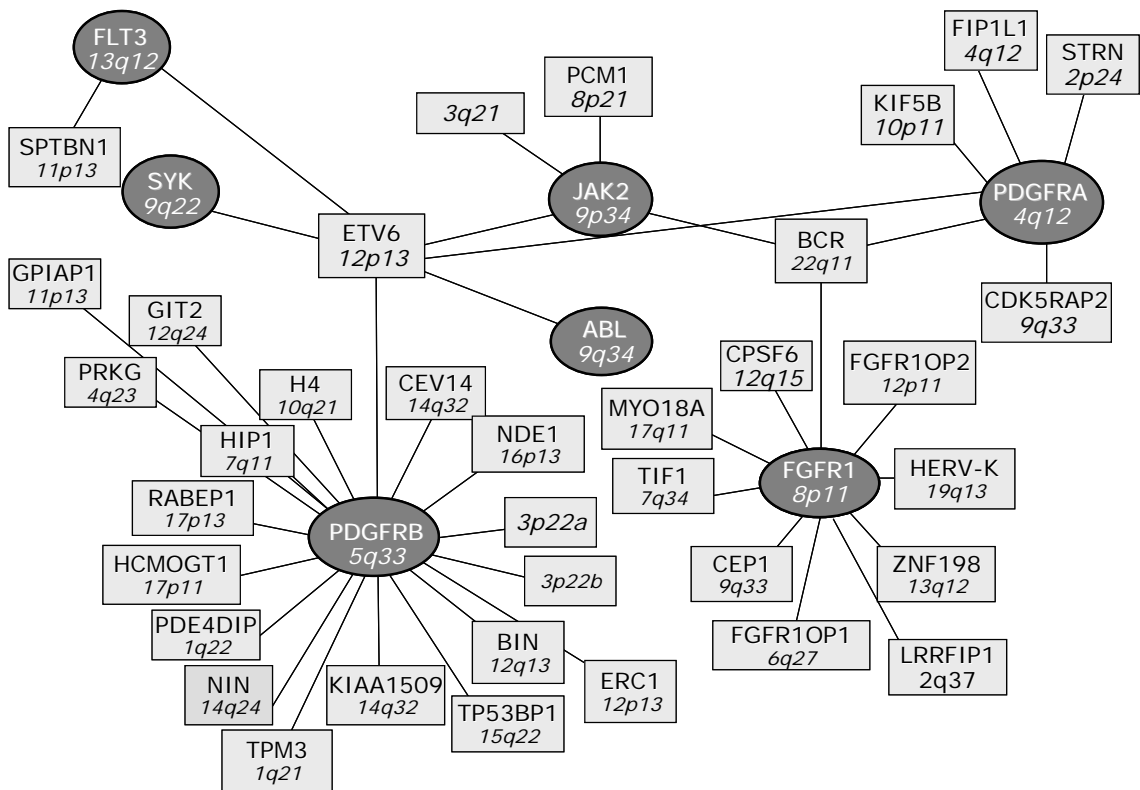


Figura 9. Fusiones descritas en la bibliografía en NMPCs que afectan a genes TK. Como puede observarse, algunos de los partners (cuadrados) se han visto implicados en fusiones con más de un gen TK (óvalos). Imagen modificada del original (Macdonald & Cross, 2007).

6 Las proteínas con actividad tirosínquinasa (TKs)

Las tirosín quinazas (TKs) son una amplia familia de proteínas fundamentales en la regulación de múltiples procesos fisiológicos como la proliferación y diferenciación celular, supervivencia, apoptosis, adhesión, migración, control del ciclo celular y angiogénesis (Schelssinger 2000; Hubbard & Till, 2000), a través de su participación en un gran número de vías de señalización intracelular (Robertson *et al*, 2000; Zwick *et al*, 2002; Steelman *et al*, 2004). Estas proteínas actúan transfiriendo un grupo γ -fosfato desde el ATP a residuos de tirosina determinados de otras moléculas, regulando de esta manera su activación e inactivación (Robertson *et al*, 2000; Gupta *et al*, 2002). Además, también son capaces de regular su propia activación mediante autofosforilación (Cowan-Jacob 2006; Walz *et al*, 2008).

De los más de 500 genes que codifican enzimas con actividad quinasa, más de 90 corresponden a las TKs. Estos genes se encuentran ampliamente distribuidos por todo el genoma y se expresan en una gran variedad de tejidos celulares (Robinson *et al*, 2000; Manning *et al*, 2002; Hanks, 2003). De acuerdo a su localización celular, estas proteínas son de dos tipos. Las tirosín quinazas receptoras (RTKs, *receptor tyrosine kinases*) son proteínas de membrana que actúan como receptores, mientras que las tirosín quinazas no receptoras o citoplasmáticas (CTKs, *cytoplasmic tyrosine kinases*) se localizan en el citosol (Hubbard & Till, 2000; Robertson *et al*, 2000), actuando como intermediarios. De los genes codificantes de TKs identificados hasta la fecha, 58 codifican para RTKs (agrupados en 20 familias) y 32 para CTKs (agrupados en 10 familias) (Robinson *et al*, 2000; Cowan-Jacob, 2006).

Se han descrito alteraciones en más de 30 genes codificantes de este tipo de proteínas en diversos cánceres humanos, especialmente en neoplasias hematológicas y en algunos tumores sólidos como los de mama y pulmón (Skorsi *et al*, 2002; Gupta *et al*, 2002; Zwick *et al*, 2002; Paul & Mukhopadhyay, 2004; Correll *et al*, 2006; Mitelman *et al*, 2007; Ruhe *et al*, 2007; Walz *et al*, 2008; Lahiry *et al*, 2010). Como ya hemos visto en puntos anteriores, la activación anormal de estas proteínas puede tener un efecto oncogénico, provocando la activación constante de ciertas vías de señalización como JAK-STAT, Ras/MAPK, PI3K y PLC γ . Esto puede suceder a través de diversos mecanismos (**Figura 10**). El primero de ellos es la formación de un gen de fusión (ya sea por translocaciones u otros reordenamientos cromosómicos), en el que la aparición de nuevos dominios en la proteína haga que esta se active de manera constitutiva, como son los casos de *BCR-ABL* y de *FIP1L1-PDGFR*. Por otro lado, se puede producir una amplificación génica que haga que el gen se sobreexpresa, como el caso de *EGFR* en diversos tipos de cáncer (Mitsudomi & Yatabe, 2010). También puede aparecer una mutación en la secuencia del gen que promueva la activación constitutiva de la proteína codificada, como es el caso de la mutación

V617F en *JAK2*. En todos los casos el resultado es una mayor actividad de la proteína TK (Blume-Jensen & Hunter, 2001; Skorski 2002; Penserga & Skorski 2007).

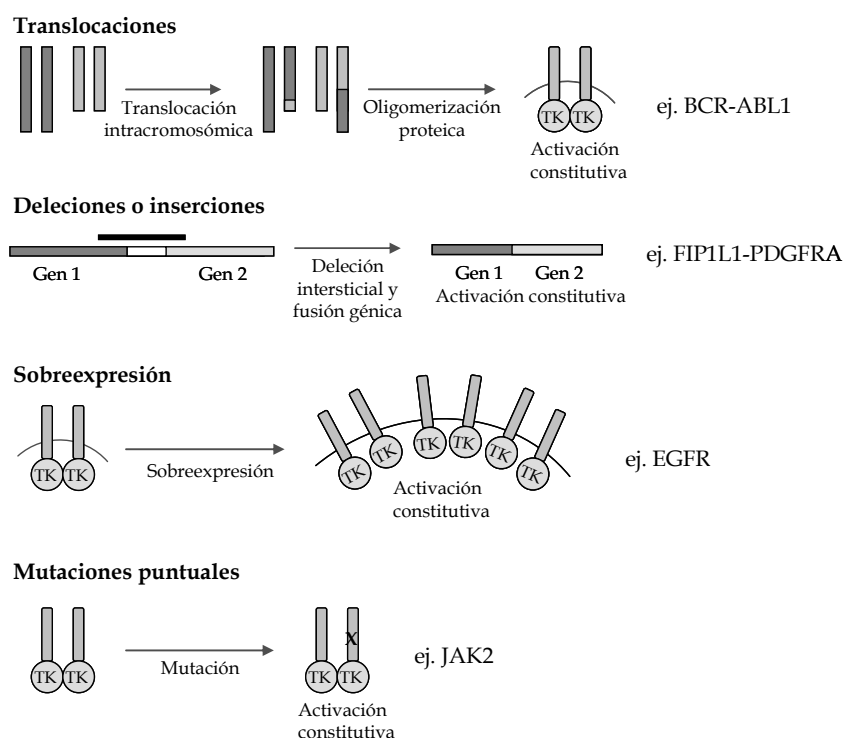


Figura 10. Tipos de alteraciones que sufren los genes TK como mecanismo promotor del desarrollo de diversos tipos de cáncer en humanos. En todos los casos el resultado es la activación constitutiva e independiente de estímulo de la actividad TK, que conduce a una ventaja proliferativa de la célula en la que tiene lugar (Imagen modificada a partir de Skorski, 2002).

6.1 Receptores con actividad tirosínquinasa (RTKs)

Las RTKs son glicoproteínas de membrana encargadas de reconocer y unirse a distintos ligandos extracelulares (citoquinas y factores de crecimiento) de manera específica. Esto conduce a su activación y a la transmisión de esta señal al interior de la célula a través de fosforilaciones sucesivas en una cascada de señalización molecular (Van der Geer *et al*, 1994; Hubbard & Till, 2000).

Estas proteínas tienen varias características comunes en su estructura (**Figura 11**). Todas ellas están formadas por un dominio extracelular aminoterminal, una α -hélice transmembrana (TM) de anclaje a membrana y un dominio citoplasmático carboxiterminal de longitud variable, en el que reside la actividad catalítica TK. Este dominio TK se encuentra separado de la membrana por una región yuxtamembrana (JM), de función autoinhibitoria. Los dominios TM, JM y TK están conservados en las distintas RTKs aunque, en algunos casos, el dominio TK está dividido

en dos por una inserción de unos 100 aminoácidos. Por el contrario, el dominio extracelular, encargado de unirse de manera específica a los diferentes ligandos, es variable y define distintas familias o clases dentro de estas proteínas (**Figura 11**). Esta región extracelular suele presentar dominios globulares como los dominios tipo inmunoglobulina (*Ig-like*), tipo fibronectina III, dominios ricos en cisteína y dominios EGF-*like* (Van der Geer *et al*, 1994; Robertson *et al*, 2000; Hubbard & Till, 2000; Gupta *et al*, 2002; Zwick *et al*, 2002). Finalmente, es importante destacar que la porción intracelular carboxiterminal contiene residuos de tirosina fundamentales para la propia activación de las RTKs, además de para la unión y reconocimiento de otras moléculas que intervienen en la cascada de señalización (Hubbard & Till, 2000; Blume-Jensen & Hunter, 2001).

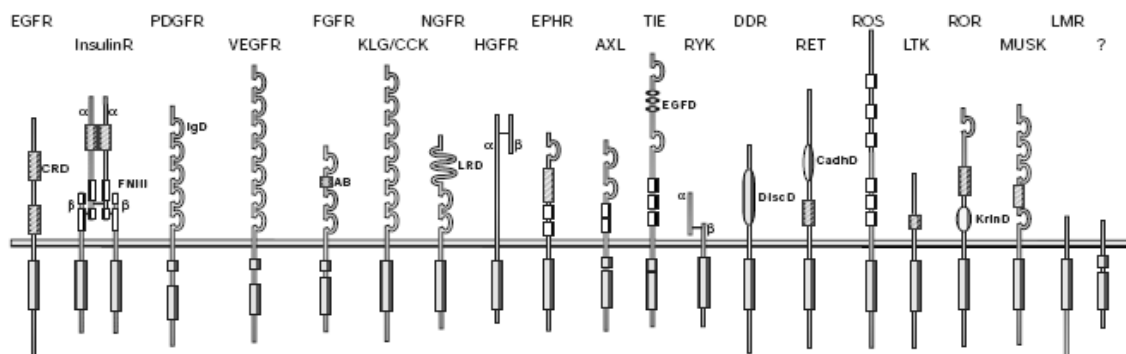


Figura 11. Esquema de la estructura de las distintas familias de RTKs humanas. Las 58 RTKs codificadas en el genoma humano se dividen en 20 familias. Todas ellas presentan un dominio extracelular de unión a ligando de estructura variable que define las familias, un dominio transmembrana, un dominio yuxtamembrana y un dominio catalítico intracelular tirosín quinasa que, en algunos casos, está dividido en dos. Figura tomada de Blume-Jensen & Hunter, 2001.

En condiciones basales y en ausencia de estímulo las RTKs se encuentran en una configuración que las mantiene inactivas, generalmente en forma de una única cadena polipeptídica (Hubbard & Till, 2000; Gupta *et al*, 2002). La unión de un ligando a su porción extracelular, provoca su homo o heterodimerización, un cambio conformacional mediado por el dominio TM y un acercamiento de los dominios TK de ambas cadenas polipeptídicas. Ello conduce a la fosforilación, mediante autofosforilación y transfosforilación entre ambos monómeros, de determinadas tirosinas situadas en la cola carboxiterminal. Ello provoca la activación completa del receptor (**Figura 12**) y la creación de una plataforma de activación de proteínas de señalización intracelular citoplasmáticas que, al reconocer determinadas fosfotirosinas del receptor y unirse a ellas, son también fosforiladas y activadas. Esta asociación tiene lugar a través de dominios específicos presentes en estas proteínas, como SH2 (*Src homology 2*), SH3 y TKB (*tyrosine kinase binding*) (Robertson *et al*, 2000; Schlessinger 2000; Rane 2000; Gupta *et al*, 2002). Las moléculas de señalización activadas son capaces de mediar, de esta manera, la respuesta de la célula a la señal recibida en el dominio extracelular, trasladándola

sucesivamente en cascada hacia el interior del núcleo a través de distintas vías de señalización (PI3K, la PLC γ , la Ras/MAPK o la JAK/STAT) (Fantl *et al*, 1993; Van der Geer *et al*, 1994; Robertson *et al*, 2000; Rane 2000; Hubbard & Till, 2000; Schlessinger 2000; Gupta *et al*, 2002; Zwick *et al*, 2002; Walz *et al*, 2008).

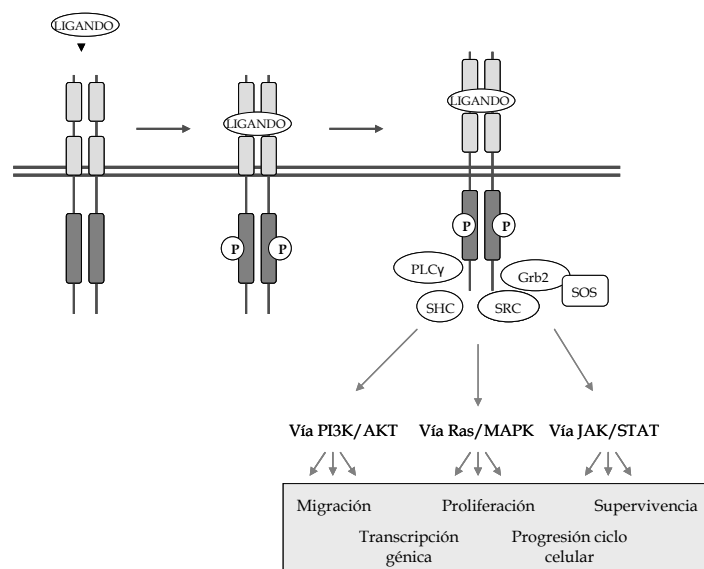


Figura 12. La unión del ligando a la RTK provoca su dimerización y fosforilación de algunos de los residuos de tirosina de la cola intracelular. Estas tirosinas, ahora fosforiladas, son reconocidas por numerosas moléculas de señalización con dominios SH2 y SH3, como Grb2, PLC, otras TKs como Src u otras moléculas reguladoras (como C-CBL). Ello provoca la activación de distintas vías de señalización, con efectos en distintos procesos fisiológicos. Figura modificada a partir de Zwick *et al*, 2002.

Una vez que el mensaje ha sido enviado al interior de la célula, la activación de la RTK debe cesar, en un proceso muy regulado. Para ello, las proteínas tirosín fosfatasas (PTPs, *phosphotyrosine phosphatases*) eliminan los grupos fosfato de las tirosinas esenciales para la activación de esta molécula. Esto provocará que el resto de las proteínas encargadas de la señalización no sean activadas y la transmisión de la señal cese (Sun & Tonks 1994; Mustelin & Tasken 2003). Pero, además, la estimulación da lugar a una rápida endocitosis y degradación tanto del receptor como del ligando, mecanismo fundamental para lograr la finalización de la señal del receptor (Thien & Langdon 1997; Schlessinger 2000; Hubbard & Till, 2000; Thien & Langdon 2001; Peschard & Park 2003; Cowan-Jacob, 2006), como se ha indicado en el punto 3.

6.1.1 Familia FGFR (RTKs de clase IV): componentes, estructura, funciones y alteraciones en enfermedades humanas

La familia IV de las RTKs está formada por cuatro proteínas FGFR (*fibroblast growth factor receptor*), codificadas por los genes *FGFR1* (8p11), *FGFR2* (10q26), *FGFR3* (4p16) y *FGFR4* (5q35) (Neufeld & Gospodavowicz, 1988). Todas ellas se expresan en una amplia variedad de tipos celulares (Olwin & Hauschka, 1989), participando en el control de múltiples procesos (Kouhara *et al*, 1997; Reiter *et al*, 1998).

Estos receptores presentan una estructura básica común, dividida en una región extracelular de reconocimiento del ligando y una región intracelular catalítica (**Figura 13**). En este caso, la porción extracelular contiene tres dominios tipo inmunoglobulina (*Ig-like* I, II y III), entre los que se encuentra una caja ácida (caja de 8 aminoácidos principalmente Asp o Glu), seguidos de un dominio transmembrana (TM). Ya en el interior celular, presentan un dominio JM relativamente largo (de unos 80 aminoácidos) y un dominio intracelular TK dividido en dos partes. En la porción más carboxiterminal hay varias tirosinas (de número variable) fundamentales para la activación del receptor (Givol & Yayon, 1992; Mason 1994).

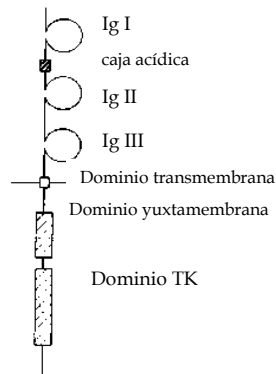


Figura 13. Estructura común de las proteínas FGFR. Todos ellos presentan una porción extracelular con tres dominios tipo inmunoglobulina y una región ácida. Tras el dominio TM se encuentra el dominio JM autoinhibitorio, seguido de un dominio TK dividido en dos partes. Figura modificada a partir de Mason *et al*, 1994.

Hasta la fecha se han descrito más de 23 factores de crecimiento FGFs (*fibroblast growth factors*) capaces de unirse a estos receptores, con mayor o menor afinidad según el receptor (Naski & Ornitz, 1998; L'Hôte *et al*, 2004; Acevedo *et al*, 2009) (**Figura 14**). Al igual que en el modelo general para RTKs, la activación provoca el aumento de su actividad quinasas y la formación de sitios de unión para otras moléculas como PLC γ , que promueve la activación de la vía de la PI3K, y FRS2, que recluta proteínas adaptadoras como Grb2, activando la vía Ras/MAPK y PI3K (Mason *et al*, 1994; Kouhara *et al*, 1997; Acevedo *et al*, 2009). La proteína adaptadora FRS2,

media también la interacción de los FGFRs con otras CTKs como Src, potenciando la señal (Acevedo *et al*, 2009).

Como el resto de RTKs, la activación de las FGFRs está muy regulada, tanto por PTPs como por E3-ubiquitina ligasas como C-CBL (Thien & Langdon 2001), que interaccionan con el receptor a través de FRS2 (Acevedo *et al*, 2009) (**Figura 14**). Otro mecanismo adicional para esta regulación es la expresión de SPRY (*Sprouty*) que, uniéndose a Grb2, bloquearía la interacción entre FRS2 y las moléculas de la vía MAPK (Acevedo *et al*, 2009). La pérdida de esta regulación por alteraciones inactivantes en las moléculas reguladoras, podría provocar un efecto similar a la activación anómala de los FGFRs.

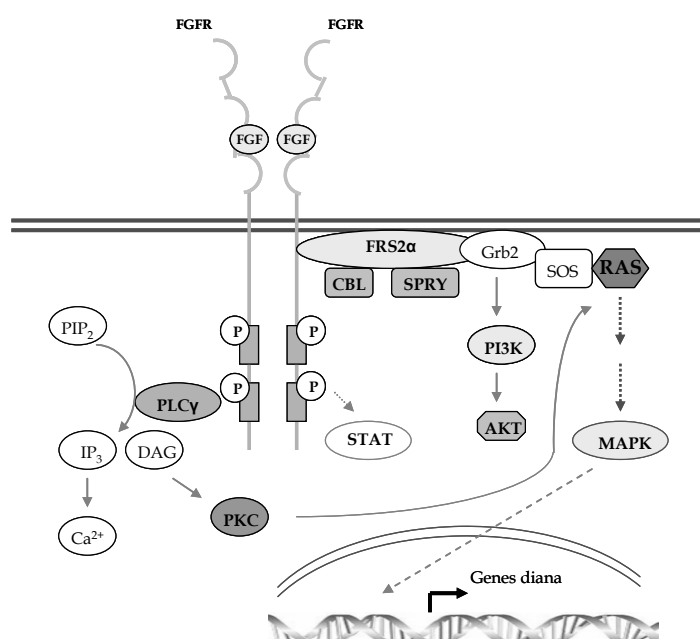


Figura 14. Señalización mediada por los receptores de la familia FGFR. Tras la estimulación por la unión del ligando y la fosforilación de determinadas tirosinas del receptor, se produce la activación de diversas moléculas de señalización, que dan lugar a la activación de las vías PLCγ, PI3K, Ras/MAPK ó JAK-STAT. Figura modificada a partir de Turner & Grose 2010.

Se han descrito múltiples alteraciones en los genes que codifican los FGFRs, en diversas enfermedades. Por un lado, se han descrito diversas alteraciones somáticas (fusiones génicas, mutaciones y el aumento de su expresión), relacionadas con el desarrollo de ciertos tipos de cáncer. Además, también se han descrito alteraciones germinales responsables de otro tipo de enfermedades (Turner & Grose, 2010).

FGFR1 (8p11) es el gen de la familia con mayor número de alteraciones descritas. Como ya se ha comentado anteriormente, las fusiones de *FGFR1* con otros genes están asociadas al *síndrome*

mieloproliferativo 8p11 (Macdonald *et al*, 1995; Inhorn *et al*, 1995; Macdonald *et al* 2002). Esta enfermedad se caracteriza por una hiperplasia mieloide semejante a la que aparece en la LMMC, eosinofilia en sangre periférica y una elevada incidencia de linfoma no-Hodgkin, frecuentemente de fenotipo linfobástico T. Hasta la fecha, se han descrito once fusiones distintas con este gen (**Tabla 4**), siendo la más frecuente (40-50% de los casos) la *ZMYM2(ZNF198)-FGFR1* consecuencia de la t(8;13)(p11;q12) (Xiao *et al*, 1998; Reiter *et al*, 1998; Popovici *et al* 1998, Smedley *et al* 1998). El resto de las fusiones, o no son recurrentes o presentan una frecuencia muy baja (Goradia *et al*, 2009, Jackson *et al*, 2010). Los pacientes con este tipo de alteraciones no suelen responder a la quimioterapia convencional y el trasplante de médula ósea parece ser la única medida terapéutica eficaz. *FGFR1* no es sensible a imatinib aunque sí a otros inhibidores de tirosina quinasas, como el PKC412 (Chen *et al*, 2004) y el TKI258 (Chase *et al*, 2007). Otras moléculas efectivas en esta enfermedad son el interferón α (Martínez-Climent *et al*, 1998) y el trióxido arsénico (Kunapuli *et al*, 2006).

Es interesante destacar que los distintos genes reordenados con *FGFR1* suelen aportar ciertas diferencias en el fenotipo clínico (Cross & Reiter, 2002; Jackson *et al*, 2010). Por ejemplo, la aparición de linfadenopatías y linfoma de células T es característica de los pacientes con la fusión *ZMYM2-FGFR1*, pero es infrecuente en pacientes con otras fusiones (Macdonald *et al*, 2002). Los pacientes con el gen de fusión *CEP110-FGFR1* presentan una clínica semejante a la LMMC, con trombocitosis y monocitosis en sangre periférica (Cross & Reiter, 2002). Algunos pacientes con la fusión *FGFR1OP-FGFR1* presentan características clínicas semejantes a la policitemia, con eosinofilia frecuente (Vizmanos *et al*, 2004). Finalmente, los pacientes con *BCR-FGFR1* presentan ciertas características clínicas y morfológicas semejantes a los pacientes con LMC *BCR-ABL1* positiva (Roumiantsev *et al*, 2004).

FGFR1 también puede encontrarse alterado en algunos tumores sólidos. Por ejemplo, entre un 10 y un 15% de los cánceres de mama presenta amplificación del *locus* 8p11, donde se localiza *FGFR1* (Gelsi-Boyer *et al*, 2005; Turner & Grose, 2010). También se ha encontrado amplificación de esta región en casos con carcinoma escamoso oral, cáncer de ovario, vejiga y rhabdomiosarcoma (Turner & Grose, 2010).

Hasta la fecha, el gen *FGFR2* (10q26) no se ha descrito alterado en neoplasias hematológicas. Sin embargo, aparece sobreexpresado y amplificado en el 5-10% de los casos con cáncer de mama (Easton *et al*, 2007) y sobreexpresado en el 10% de los pacientes con cáncer gástrico (Katoh, 2008; Turner & Grose, 2010). Además, también se ha propuesto que algunos polimorfismos de este gen (en concreto cuatro SNPs situados en el intrón 2: rs1219648, rs2981579, rs11200014 y rs2420946), podrían estar asociados al desarrollo del cáncer de mama y a un peor pronóstico de la enfermedad (Hunter *et al*, 2007; Katoh, 2008). Además, alrededor de un 12% de los pacientes

con cáncer de útero y el 30% de las líneas celulares de este tipo de neoplasia muestran mutaciones en este gen (Pollock *et al*, 2007).

La señalización mediada por la familia Fgfr es muy importante en condrocitos, jugando un papel fundamental en el desarrollo del esqueleto. Así, *FGFR2* se encuentra también mutado en anormalidades congénitas del esqueleto como los síndromes de Crouzon, Jackson-Weiss, Apert, Pfeiffer y Beare-Stevenson (Tartaglia *et al*, 1997; Ferreira *et al*, 1999; Katoh, 2008).

FGFR3 (4p16) sí se ha encontrado alterado en algunas neoplasias hematológicas. Entre 15-20% de los casos de mieloma múltiple (MM), muestran la t(4;14)(p16.3,q32.3), que fusiona *FGFR3* con el gen que codifica para la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGH*) (Chesi *et al* 1997; Chesi *et al*, 2001). Además, existen casos de esta enfermedad sin esta fusión que sobreexpresan *FGFR3* (Vatsveen *et al*, 2009), que estaría asociada a un peor pronóstico de la enfermedad (Keats *et al*, 2003; Chandesris *et al*, 2007). También se han descrito mutaciones activantes de este gen en estadios avanzados de la enfermedad (L'Hote *et al*, 2004; Claudio *et al*, 2007; Chesi *et al*, 2008). La t(4;14) ha sido descrita recientemente en dos pacientes con linfoma de células B con mal pronóstico (Bacher *et al*, 2010). Por último, este gen se ha encontrado fusionado con *ETV6* en una t(4;12)(p16;p13), identificada en un paciente con linfoma de células T periféricas (Yagasaki *et al*, 2001; Maeda *et al*, 2005).

Igualmente, *FGFR3* se ha visto alterado en otros tipos de cánceres. Se han encontrado mutaciones activantes en el 35% (9/26) de casos con carcinoma de vejiga, en el 25% (3/12) de casos con carcinoma de cuello del útero (Cappellen *et al*, 1999; Knowles 2007) y en algunos casos de cáncer de colon (L'Hote & Knowles, 2004). La mutación más frecuente es la p.S249C, que afectaría al dominio extracelular y que podría estabilizar la dimerización del receptor, provocando su activación constitutiva (L'Hote & Knowles, 2004; Tomlinson *et al*, 2007).

Al igual que *FGFR2*, *FGFR3* se encuentra alterado en anormalidades del desarrollo del esqueleto. La acondroplasia (forma de enanismo genético más común) y la displasia esquelética letal II (TDII), son dos enfermedades del esqueleto caracterizadas por la presencia de mutaciones en *FGFR3*. Se han descrito varias mutaciones en distintas regiones del gen, destacando p.G380R, que afecta al dominio transmembrana del receptor y que induce su activación independiente de ligando (Shiang *et al*, 1994; Tavormina *et al*, 1995; Rousseau *et al*, 1996; L'Hote & Knowles, 2004).

Hasta la fecha no se han encontrado alteraciones de *FGFR4* (5q35) relacionadas con neoplasias hematológicas, aunque sí en otro tipo de tumores. Se ha visto sobreexpresado en el rhabdomyosarcoma (RMS), un tipo de sarcoma infantil con origen en el músculo esquelético (Taylor *et al*, 2009), asociado a estadios avanzados de la enfermedad y a una menor

supervivencia. Recientemente, se han encontrado mutaciones de FGFR4 en el 7,5% de los casos (7/94) con esta enfermedad, destacando las posiciones p.K535 y p.E550, cuya alteración provoca un aumento de la autofosforilación del receptor y de la capacidad de metástasis (Taylor *et al*, 2009).

Como en el caso de *FGFR2*, también se ha descrito un SNP (p.G388R, rs351855) en *FGFR4* asociado con la progresión de la enfermedad y capacidad de metástasis en pacientes con cáncer de mama, aunque no tendría efectos en la población sana (Bange *et al*, 2002; Thussbas *et al*, 2006). Otros estudios han relacionado también la presencia de este alelo con un peor pronóstico en el cáncer de útero (Streit *et al*, 2004), cáncer de pulmón (Spinola *et al*, 2005) y cáncer de próstata (Wang *et al*, 2004), aunque existen bastantes discrepancias al respecto (Jezéquel *et al*, 2004; Fitzgerald *et al*, 2008; Ho *et al*, 2010).

6.1.2 Familia EGFR (RTKs de clase I): componentes, estructura, funciones y alteraciones en enfermedades humanas

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *epidermal growth factor receptor* o ERBB1/HER1) forma, junto con ERBB2/HER2, ERBB3/HER3 y ERBB4/HER4, una familia de RTKs ampliamente expresada en las células humanas (Aharonov *et al*, 1978; Wang & Hung, 2009) con actividad catalítica TK intracelular (a excepción de ErbB-3) (Mitsudomi & Yatabe, 2010). EGFR es una proteína de 170 kDa formada por una cadena polipeptídica de 1186 aminoácidos, codificada por *EGFR* (7p12), que se expresa en la mayor parte de las células de mamíferos (Voldborg *et al*, 1997). Este receptor, participa en importantes procesos celulares como la proliferación, evasión de la apoptosis, invasión y metástasis (Scaltriti & Baselga 2006; Wang & Hung 2009; Lurje & Lenz, 2009; Mitsudomi & Yatabe, 2010).

Al igual que otras RTKs, está constituida por un dominio extracelular de unión al ligando, un dominio transmembrana para su anclaje en la membrana y un dominio intracelular con actividad TK. El dominio extracelular se encuentra a su vez dividido en cuatro subdominios (I a IV), de los que el II es el encargado de reconocer y unir el ligando. Este receptor reconoce y une distintos ligandos, entre los que destaca el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*), pero también TGF- α (*transforming growth factor-a*), la anfirregulina, la betacelulina (BTC) y la epirregulina (Voldborg *et al*, 1997; Gschwind *et al*, 2004; Mitsudomi & Yatabe, 2010). Como en los casos anteriores, también existen diversas tirosinas en su extremo carboxiterminal fundamentales para su función y regulación (Voldborg *et al*, 1997; Mitsudomi & Yatabe, 2010).

La activación de EGFR por unión del ligando conduce a la estimulación de las vías de señalización Ras/MAPK, PI3K y JAK-STAT, pero también a la activación de otras TKs como Src

(Scaltriti & Baselga 2006; Lurje & Lenz, 2009). Al igual que otras RTKs, su actividad también se ve regulada por endocitosis mediada por CBL, modelo que ha sido ampliamente estudiado (Thien & Langdon, 1997; Waterman *et al*, 1999; Thien & Langdon 2001; Peschard & Park, 2003; Schmidt & Dikic, 2005).

Hasta la fecha no se han descrito alteraciones de *EGFR* en neoplasias hematológicas, pero sí en tumores sólidos (Salomon *et al*, 1995; Vlahovic & Crawford, 2003; Lurje & Lenz, 2009). Así, se ha detectado su sobreexpresión o mutación en algunos tipos de cáncer de pulmón, en carcinoma escamoso de cabeza y cuello, en cáncer de colon, mama, páncreas, próstata, ovario, útero, riñón, vejiga, hígado y en un tipo de gliomas. En la mayor parte de estas neoplasias la sobreexpresión de *EGFR* suele asociarse a un peor pronóstico de la enfermedad (Salomon *et al*, 1995; Vlahovic & Crawford, 2003; Mitsudomi & Yatabe, 2010).

En este gen se han descrito deleciones de distinto tipo que afectan a diversos puntos de su estructura (Salomon *et al*, 1995; Voldborg *et al*, 1997; Mitsudomi & Yatabe, 2010). En glioblastoma se han descrito tres tipos de deleciones en el dominio extracelular de *EGFR* (vI, vII y vIII) (Voldborg *et al*, 1997). La vI corresponde a una delección completa del dominio extracelular, que provoca que el receptor se active de manera independiente de su unión al ligando. La delección vII consiste en la pérdida de 83 aminoácidos del subdominio IV, aunque no se ha conseguido demostrar su papel en el desarrollo del glioblastoma. La delección más frecuente (30-50% de pacientes con glioblastomas y 5% de pacientes con carcinoma de pulmón de células escamosas) y mejor estudiada es la vIII, que surge por reordenamientos intragénicos y conduce a la sobreexpresión de transcritos de *EGFR* sin los exones 2 a 7 (801 pb). Esto lleva a la pérdida de los aminoácidos 6 a 237 en la proteína (dominios I y II extracelulares) y a su activación constitutiva (Ekstrand *et al*, 1992; Nagane *et al*, 1996; Voldborg *et al*, 1997; Mitsudomi & Yatabe, 2010). Por último, la delección vIV afecta a la porción carboxiterminal (dos o tres exones terminales) y, aunque no implica a residuos de tirosinas autofosforilables, también provoca la activación constitutiva de *EGFR* (Landau *et al*, 2004; Pines *et al*, 2010).

En cuanto a las mutaciones puntuales, en pacientes con glioblastoma se han descrito mutaciones en el dominio extracelular, como la p.R108K (subdominio I), p.R263P y p.A289V/D/T (subdominio II) y la p.G598V (subdominio IV) (Pines *et al*, 2010; Mitsudomi & Yatabe, 2010). Todas ellas provocan la activación del receptor. En el año 2004, varios grupos identificaron mutaciones puntuales en el dominio TK de *EGFR* en pacientes de carcinoma no microcítico de pulmón (NSCLC, *non-small cell lung cancer*,) (Lynch *et al*, 2004; Paez *et al*, 2004; Pao *et al*, 2004). Este tipo de alteraciones correspondían a pequeñas deleciones situadas entre los aminoácidos 746 y 750 (exón 19) o a la sustitución de Leu por Arg en la posición 858 (p.L858R) que causarían la activación constitutiva del receptor por desestabilización de su conformación

autoinhibitoria en ausencia de ligando (Rosell *et al*, 2009; Pines *et al*, 2010; Mitsudomi & Yatabe, 2010). Estas mutaciones parecen ser exclusivas de pacientes con cáncer de pulmón pero, al igual que el resto de cambios descritos en este gen, confieren hipersensibilidad a inhibidores de TKs como el gefitinib (Iressa®, Astra-Zeneca Pharmaceuticals LP; Wilmington, DE) o el erlotinib (Tarceva®, OSI Pharmaceuticals; Melville, NY, Genetech, CA). Esto hace que los pacientes que tengan estas mutaciones respondan a estos fármacos (Vlahovic & Crawford, 2003; Lynch *et al*, 2004; Gschwind *et al*, 2004; Krause & Van Etten, 2005; Choi *et al*, 2007; Lurje & Lenz, 2009), aunque en el caso de la p.L858R, la respuesta sea algo menor a la que presentan los pacientes con deleciones del exón 19 (Carey *et al*, 2006).

6.2 Proteínas citoplasmáticas con actividad tirosínquinasa (CTKs)

Estas proteínas no presentan un dominio extracelular de unión a ligando ni una región transmembrana para anclarse a la membrana, por lo que su localización es citoplasmática. En algunos casos presentan ciertas modificaciones en la región aminoterminal, como miristoilación y palmitoilación que les permiten anclarse a la membrana por el lado intracelular (Hubbard & Till, 2000). Finalmente, algunas de ellas como ABL1 o JAK2 (Van Etten *et al*, 1989; Dawson *et al*, 2009), también pueden localizarse en el núcleo. Al igual que las RTKs, también actúan fosforilando residuos de tirosina de moléculas intracelulares implicadas en vías de señalización, tras la estimulación de la vía por la unión de un ligando a su receptor.

La estructura de este tipo de proteínas difiere bastante entre las distintas familias (**Figura 15**) (Blume-Jensen & Hunter, 2001; Cowan-Jacob, 2006). Todas ellas presentan un dominio TK continuo en la región central o carboxiterminal y tirosinas específicas cuya fosforilación determina su activación/inactivación. Además contienen otros dominios que median la interacción con otras proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, como los dominios SH2 y SH3, fundamentales para la señalización intracelular. El primero es un dominio compacto de 100 aminoácidos, que se une específicamente a tirosinas fosforiladas, mientras que el segundo es algo menor (60 aminoácidos) y reconoce secuencias ricas en prolina. (Hubbard & Till, 2000; Blume-Jensen & Hunter, 2001). Algunas de las familias muestran dominios más específicos, como los de interacción con proteínas PH (*pleckstrein homology domain*) en la familia Tec, los de interacción con la actina (*actin binding domain*, McWhirter & Wang, 1993) y con el DNA (*DNA-binding domain*, Kipreos & Wang, 1992), ambos en Abl, o el dominio FERM en la familia Jak (Blume-Jensen & Hunter, 2001).

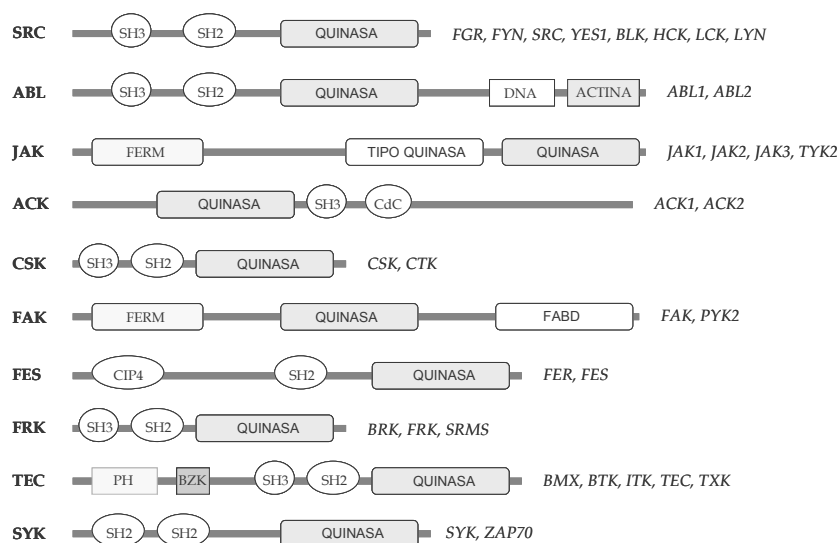


Figura 15. Estructura en dominios de las 10 familias de CTKs. Además de los dominios de interacción con proteínas (SH2, SH3 y PH) y del dominio TK, algunas CTKs presentan dominios específicos. Figura modificada a partir de Blume-Jensen & Hunter, 2001.

Como en las RTKs, las TKs citosólicas se encuentran desfosforiladas e inactivas en estado basal. La unión de un ligando a su receptor de membrana (con o sin actividad TK) provoca la fosforilación y activación de éste último. Esta fosforilación es reconocida por las CTKs a través de sus dominios SH2 y SH3, lo que provoca su activación por fosforilación y la fosforilación en cascada de sus sustratos diana (Imada & Leonard, 2000). Una de las familias de CTKs más importantes en esta activación es la familia de proteínas Src (formada por FYN, LYN, SRC, FGR, YES1, BLK, HCK, LCK), ya que pueden anclarse a los fosfolípidos de membrana a través su miristoilación aminoterminal y aproximarse a la porción intracelular de los receptores (Hubbard & Till, 2000; Krause & Van Etten, 2005). Estas proteínas reconocen mediante sus dominios SH2 determinadas fosfotirosinas del receptor, son activadas por fosforilación por éste (Hubbard & Till, 2000) y su vez fosforilan otras CTKs, como SYK (Sada, 2001) o ZAP70 (Chan *et al*, 1991; Brdicka, 2005), desencadenando la cascada de señalización (Hubbard & Till, 2000; Krause & Van Etten, 2005; Walz *et al*, 2008).

De manera análoga a las RTKs, también las CTKs deben inactivarse una vez que el estímulo haya sido enviado, bien mediante desfosforilación por PTPs, o mediante ubiquitinación para su posterior degradación por el proteosoma (Ota & Samelson, 1997; Thien & Langdon 1998; Hubbard & Till, 2000; Thien & Langdon 2001; Thien & Langdon 2005; Zyss *et al*, 2005).

6.2.1 Familia Abl: componentes, estructura, funciones y alteraciones en enfermedades humanas

La familia Abl está constituida por dos CTKs codificadas por los genes *ABL1* (9q34) y *ABL2* (1q25), que se expresan en diversos tejidos. *ABL1* (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*, Heisterkamp *et al*, 1983) se localiza en el citoplasma, donde se asocia a la señalización mediada por receptores de diversos factores de crecimiento (Taagepera *et al*, 1998) pero también en el núcleo, donde es activada en respuesta al daño en el DNA (Van Etten, 1994; Wang, 2000). En el caso de *ABL2* (o ARG, *Abelson-related gene*, Kruh *et al*, 1986) únicamente se conoce su localización citoplasmática (Kruh *et al*, 1990; Wang, 2000).

Ambas proteínas tienen una estructura común con dos dominios de interacción con proteínas SH3 y SH2 aminoterminales, un dominio catalítico TK en posición central y una larga porción carboxiterminal con dominios específicos de esta familia (**Figura 16**). Los dos genes que las codifican muestran corte y empalme alternativo en su exón 1, dando lugar a dos isoformas que difieren algo en su longitud (Renshaw *et al*, 1988). En *ABL1* destaca la presencia de un dominio de unión a la actina (*F-actin-binding domain*), que le permitiría interactuar con el citoesqueleto (McWhirter & Wang, 1993), un dominio de unión al DNA (*DNA-binding domain*) necesario para su unión a la cromatina (Kipreos & Wang, 1992), tres señales de localización nuclear (NLS, *nuclear localization signal*) y una señal de exportación nuclear (NES, *nuclear export signal*) (Taagepera *et al*, 1998). El dominio de unión al DNA no está bien conservado en *ABL2* que, además, carece de las señales de localización nuclear, lo que podría explicar su localización exclusivamente citoplasmática (Van Etten, 1994; Wen *et al*, 1996; Wang, 2000; Li *et al*, 2009). Tanto *ABL1* como *ABL2* presentan distintas tirosinas importantes para su activación por otras TKs en la región situada entre el dominio SH2 y el TK (Van Etten, 1994; Li *et al*, 2009).



Figura 16. Estructura de ABL1 dividida en dominios. ABL2 presenta la misma estructura, aunque el dominio de unión al DNA no está bien conservado.

De las dos proteínas de esta familia la más estudiada es *ABL1*, por su implicación en la patogénesis de distintos tipos de neoplasias. *ABL1* es activada en respuesta a diversos factores de crecimiento y citoquinas que se unen a sus receptores, así como mediante la activación de otras CTKs de la familia Src y por PLCγ (Plattner *et al*, 1999). Por ello, *ABL1* está implicada en una amplia variedad de procesos celulares como la reorganización del citoesqueleto, la

motilidad celular, la respuesta al estrés oxidativo y el daño en el DNA (Sawyers *et al*, 1994; Pendergast, 1996; Wang, 2000; Pendergast, 2002).

Como en el resto de TKs, la actividad de ABL1 y 2 está muy regulada. Por un lado, ambas son capaces de autoinhibir su activación a través de sus 80 primeros aminoácidos que, actuando como capuchón a través de uniones intramoleculares, podrían impedir la fosforilación de algunas de sus tirosinas. En el caso de la proteína de fusión BCR-ABL1, esta parte de la proteína se pierde (Pluk *et al*, 2002; Nagar *et al*, 2003). Por otro lado, ambas CTKs son reguladas por otras moléculas, que actúan fosforilando las tirosinas de sus extremos carboxiterminales, como la proteínquinasa C (PKC, Pendergast *et al*, 1987) o la cdc-2 quinasa (Kipreos & Wang, 1990). Además, estas fosfotirosinas sirven de sitios de unión a proteínas adaptadoras como Crk, Grb2 ó Nck (Ren *et al*, 1994; Wen *et al*, 1996; Lin & Arlinghaus, 2008). Por otro lado, también se ha demostrado que ABL1 puede regular su propia degradación por el proteosoma, favoreciendo su modificación por ubiquitinación a través de enzimas ubiquitina-ligasas (Andoniou *et al*, 1994; Thien & Langdon 2001; Liu *et al*, 2006).

ABL1 está alterado en distintas neoplasias hematológicas. Hasta la fecha, además de la t(9;22) descrita en LMC (Nowell & Hungerford, 1960; Prieto, 1970; Rowley, 1973), se han descrito cinco alteraciones citogenéticas que implican a *ABL1* en distintos casos de leucemia linfoblástica aguda (LLA). Todas ellas darían lugar a la formación de un gen de fusión que origina una proteína quimérica, con la actividad TK de *ABL1* constitutivamente activada (Hagemeijer & Graux, 2010) (**Figura 17**). Así, la t(9;12)(q34;p13), presente en casos raros de LLA y LMC (menos de 10 casos descritos) tiene como consecuencia la fusión de *ABL1* a *ETV6*, que codifica un factor de transcripción frecuentemente fusionado con otros genes codificantes de TKs (Papadopoulos *et al*, 1995; Golub *et al*, 1996). *ABL1* también se fusiona a *NUP214* en forma de episomas, en 5,6% de los pacientes y el 14% de las líneas celulares con LLA de células T, siendo la alteración molecular más frecuente en esta enfermedad (Graux *et al*, 2004; Hagemeijer & Graux, 2010). Además, se ha descrito la t(9;14)(q34;q32), con fusión *EML1-ABL1* en un paciente con LLA-T (De Keersmaecker *et al*, 2005), la t(1;9)(q24;q34), con fusión *RCSD1-ABL1* en un caso de LLA-B (De Braekeleer *et al*, 2007; Mustjoki *et al*, 2009) y la t(9;10)(q34;q23), con fusión *ZMIZ1-ABL1* en dos casos de LLA-B (Soler *et al*, 2008; Hagemeijer & Graux, 2010). En conjunto, todas estas fusiones son raras y poco recurrentes, afectando aproximadamente a 8% de los casos con LLA. De entre ellas, la más frecuente es la fusión *NUP214-ABL1*, específica de LLA de linaje T (Hagemeijer & Graux, 2010).

Es interesante destacar que, al igual que la BCR-ABL1, todas estas fusiones son sensibles a imatinib (Glivec®) y a otros inhibidores de segunda generación, lo que permite también aplicar

este tratamiento a este grupo de pacientes (Graux *et al*, 2004; De Keersmaecker *et al*, 2006; Mustjoki *et al*, 2009; Hagemeijer & Graux 2010).

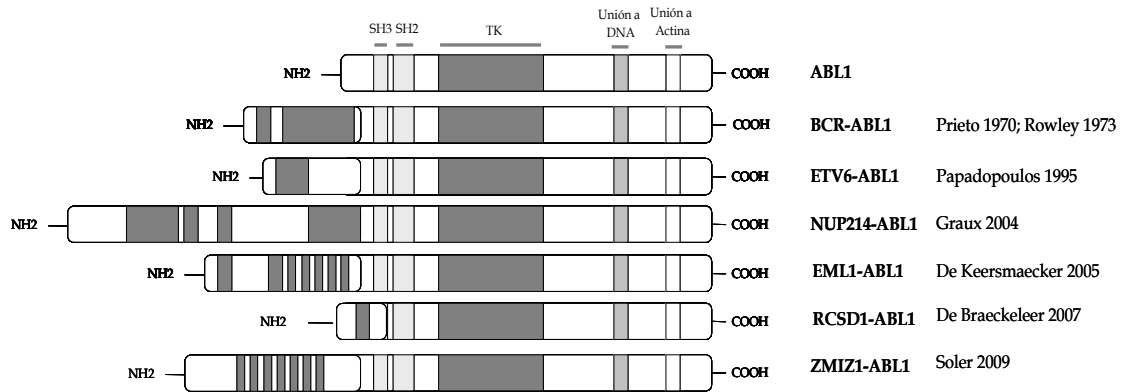


Figura 17. Genes de fusión descritos hasta la fecha en los que está implicado *ABL1*. En todos los casos, la proteína de fusión originada presenta los dominios de oligomerización codificados por el gen fusionado con *ABL1*, que mantiene la mayor parte de su secuencia, con los dominios de interacción con proteínas y su dominio catalítico TK. En todos los casos, salvo en la fusión con *RCSD1*, el punto de rotura en *ABL1* se sitúa en el intrón 1. Figura modificada a partir de Hagemeijer & Graux 2010.

Además de las fusiones mencionadas, también se han descrito mutaciones puntuales en *ABL1*. En algunos casos con LMC *BCR-ABL1* positiva, se han encontrado mutaciones puntuales en los exones codificantes del dominio TK asociadas a estadios avanzados de la enfermedad (Oehler *et al*, 2008) y que pueden provocar resistencias al tratamiento con imatinib. Salvo en el caso de la p.T315I, estas mutaciones son sensibles a los inhibidores de segunda generación, como el nilotinib (Tasigna®) y el dasatinib (Sprycel®) (Gorre *et al*, 2001; Wang, 2000; Oehler *et al*, 2008; An *et al*, 2010).

ABL2 también se ha descrito alterado en neoplasias hematológicas, aunque en mucha menor frecuencia. Al igual que *ABL1*, se ha encontrado fusionado a *ETV6* como consecuencia de una t(1;12)(q25;p13), detectada en un paciente con LMA-M4 con eosinofilia e inv(16) (Cazzaniga *et al*, 1999), en una línea celular de LMA-M3 (Iijima *et al*, 2000) y en una línea celular de LLA-T (Griesinger *et al*, 2002). La estructura de esta fusión es similar a la *ETV6-ABL1*, con los primeros cinco exones de *ETV6* codificantes del dominio de oligomerización fusionados con el exón 1 de *ABL2*, que mantiene por tanto la mayor parte de su secuencia y todos los dominios funcionales (Cazzaniga *et al*, 1999). La proteína de fusión, constitutivamente activa, también es sensible a imatinib (Glivec®) (Okuda *et al*, 2001).

6.2.2 La familia Syk: componentes, estructura, funciones y alteraciones en enfermedades humanas

Esta familia está formada por dos proteínas citoplasmáticas, codificadas por los genes *SYK* (9p22) y *ZAP70* (2q12), que se expresan en una amplia variedad de células hematopoyéticas, fundamentalmente en los linfocitos B, T y NK y, en menor medida, en células epiteliales y otros tipos celulares. Ambas proteínas juegan un papel fundamental como mediadores de la respuesta inmune, participando en la señalización mediada por receptores de citoquinas (Coopman & Mueller, 2006; Riccaboni *et al*, 2010) y regulando la proliferación, migración y diferenciación celular de linfocitos.

ZAP70 (*zeta-activated protein of 70 kDa*; Chan *et al*, 1991), se expresa principalmente en células T y NK, donde juega un papel importante en la señalización mediada por el TCR (*T-cell receptor*) (Chan *et al*, 1992). Por el contrario, *SYK* (*Spleen tyrosine kinase*, Taniguchi *et al*, 1991) se expresa principalmente en células B y la proteína que codifica participa en la señalización a través del BCR (*B-cell receptor*) (Hutchcroft *et al*, 1992), aunque también se expresa en células T inmaduras, mastocitos, leucocitos polimorfonucleares, plaquetas y macrófagos (Latour *et al*, 1996; Fütterer *et al*, 1998; Riccaboni *et al*, 2010).

SYK y *ZAP70* son proteínas citoplasmáticas de unos 70 kDa con una estructura común, caracterizada por dos dominios SH2 en tándem en el extremo aminoterminal y un dominio TK carboxiterminal, interrumpidos por dos interdominios A y B (**Figura 18**). Los dominios SH2 se encuentran altamente conservados y se unen selectivamente a determinadas tirosinas fosforiladas de los receptores BCR y TCR (Chan *et al*, 1991; Zhao & Weiss, 1996; Fütterer *et al*, 1998; Sada *et al*, 2001; Goodman *et al*, 2001; Brdicka *et al*, 2005; Béné 2006; Papp *et al*, 2007). El interdominio A forma una hélice en espiral importante para las interacciones entre proteínas, mientras que el interdominio B contiene sitios de autofosforilación que permiten la unión a dominios SH2 de otras moléculas que intervienen en la cascada de señalización (Zhao & Weiss, 1996; Sada *et al*, 2001; Brdicka *et al*, 2005). Pese a las similitudes estructurales entre ambas proteínas, el dominio catalítico TK es 100 veces más activo en *SYK* que en *ZAP70* (Fütterer *et al*, 1998).

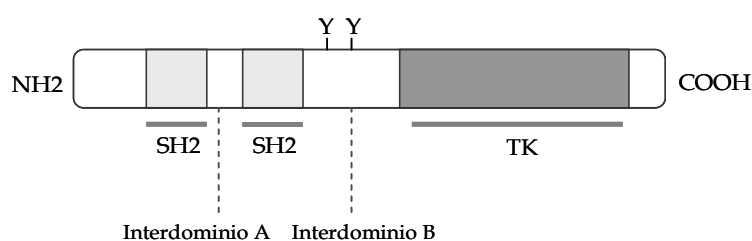


Figura 18. Estructura dividida en dominios de SYK y ZAP70.

Para que los linfocitos B y T se activen y proliferen deben reconocer determinados ligandos polipeptídicos como las inmunoglobulinas (Ig). Estas moléculas se unen al dominio extracelular de los receptores de membrana BCR (en linfocitos B) y TCR (en linfocitos T). Ambos receptores, están formados por varias cadenas polipeptídicas y contienen en su dominio citoplasmático los motivos ITAMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif*), responsables de transmitir la señal generada por la unión ligando-receptor. Una vez que la inmunoglobulina correspondiente se une a BCR o TCR se activan diferentes CTKs, como las pertenecientes a las familias Src (FYN o LCK). A su vez, estas proteínas activan al receptor mediante la fosforilación de tirosinas localizadas en los motivos ITAMs (**Figura 19**). Estas fosfotirosinas son reconocidas por SYK (en linfocitos B) y ZAP70 (en linfocitos T) a través de sus dominios SH2, lo que provoca su reclutamiento a la membrana y su activación por fosforilación de las tirosinas de sus interdominios B (tanto por autofosforilación como por fosforilación mediada por las Src). Una vez activadas, SYK y ZAP70 son capaces de fosforilar y activar otras moléculas implicadas en las vías Ras-MAPK, PLC γ ó PI3K (Chan *et al*, 1992; Zhao & Weiss, 1996; Beitz *et al*, 1999; Sada *et al*, 2001; Brdicka *et al*, 2005; Hivroz *et al*, 2005; Béné 2006).

De manera análoga a otras TKs, una vez realizadas sus funciones los niveles de SYK y ZAP70 activados deben disminuir. Para ello, además de los mecanismos de desfosforilación por fosfatasas, ambas moléculas se dirigen a su degradación por el proteosoma mediante su ubiquitinación (Figura 19) a través del reconocimiento de distintas fosfotirosinas (Y292 en ZAP70, Lupper *et al* 1997; y Y323 en SYK, Lupper *et al*, 1998) por las E3-ubiquitina ligasas (Ota & Samelson, 1997; Thien & Langdon 2001, Rao *et al*, 2001; Zyss *et al*, 2005; Brdicka *et al*, 2005).

La importancia de ambas proteínas en la señalización celular de linfocitos, hace que la pérdida o ganancia de su función de manera anómala, pueda ser causa o estar relacionada con el desarrollo de diversas neoplasias. En el caso de SYK, se han encontrado distintas alteraciones relacionadas con estas enfermedades. Por un lado, en LLA infantil se ha descrito que la actividad de SYK se encuentra anormalmente reducida en células pro-B CD19+ CD10+, debido a la presencia de transcritos aberrantes que generan proteínas truncadas (Goodman *et al*, 2001). Además, SYK se ha encontrado fusionado con *ETV6* como consecuencia de la t(9;12)(q22;p12), en un paciente con un síndrome mielodisplásico (SMD). Esta fusión mantiene las características de las otras fusiones de *ETV6* con otros genes TK, ya que contiene la porción de *ETV6* correspondiente al dominio de oligomerización y la parte de SYK correspondiente a parte del dominio SH2 carboxiterminal y al dominio TK completo (Kuno *et al*, 2001). Como en otras fusiones, la proteína quimérica resultante tiene una actividad TK constitutivamente activa, con efecto en la señalización de la serie mieloide (Kanie *et al*, 2004). SYK también ha encontrado fusionado con *ITK*, como consecuencia de la t(5;9)(q33;q22) en el 17% de los pacientes con linfoma de células periféricas inespecífico (U-PTCL) (Streubel *et al*, 2006). Hasta la fecha, este es

el único gen de fusión descrito que involucra a dos TKs. Además, diversos estudios han demostrado que hasta un 94% de los pacientes con U-PTCL muestran una sobreexpresión de SYK, independientemente de la presencia o no de la fusión *ITK-SYK* (Feldman *et al*, 2008).

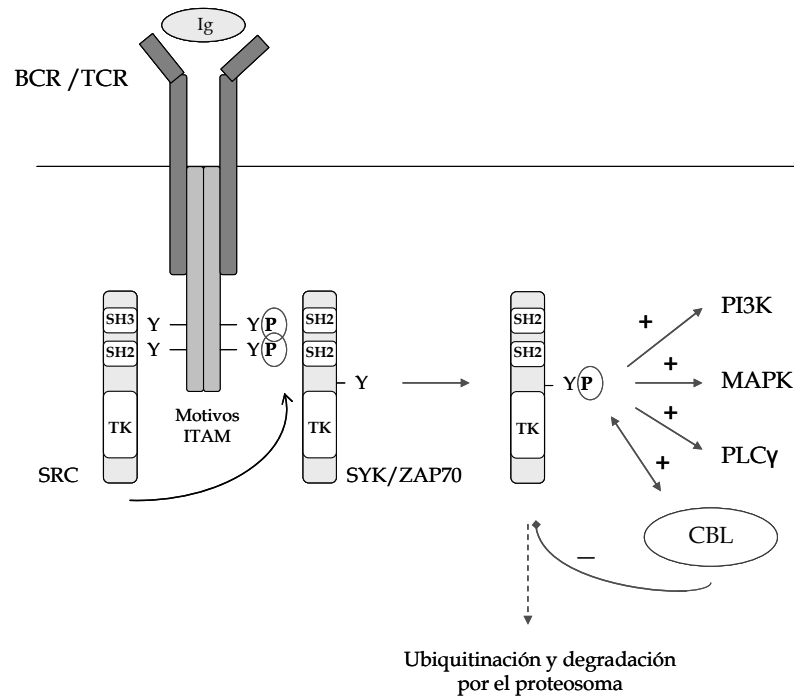


Figura 19. Señalización mediada por BCR ó TCR. Tras la unión de la inmunoglobulina a la región extracelular del receptor, se activan las CTKs de la familia Src, que se encargan de fosforilar tirosinas de los motivos ITAM del receptor. Estas fosfotirosinas son ahora reconocidas por SYK (en linfocitos B) o por ZAP70 (en linfocitos T) a través de sus dominios SH2. El acercamiento a la membrana supone la activación de estas proteínas (tanto por autofosforilación como por fosforilación por las Src), que activan a través de su dominio TK numerosas vías de señalización. Además, SYK y ZAP70 activadas fosforilan y activan a CBL, una proteína citosólica con actividad E3-ubiquitina ligasa, que se encarga de ubiquitinar a SYK y ZAP70 y dirigir las a su degradación por el proteosoma.

También se han encontrado alteraciones en SYK en otro tipo de tumores. Así, se ha propuesto que el producto de este gen sería un potente modulador del crecimiento de células epiteliales en carcinomas humanos de mama, ya que su expresión es normal en células epiteliales de este tejido en individuos sanos y en tumores benignos, pero es bajo o indetectable en carcinomas de mama invasivos y en líneas celulares de cáncer de mama. Por ello, parece que la disminución de expresión en este tipo de tumores puede estar asociado a un fenotipo con mayor capacidad invasiva y desarrollo de metástasis (Coopman *et al*, 2000; Toyama *et al*, 2002; Moroni *et al*, 2004; Coopman & Mueller 2006). Esto ha llevado a considerar a este gen como posible supresor tumoral (Coopman *et al*, 2000; Elkak *et al*, 2005). También se ha demostrado en cáncer gástrico que sus niveles de expresión son inferiores a los detectados en tejidos adyacentes no cancerosos.

Además, en los tumores más invasivos su expresión era indetectable, lo que reafirma la relación entre este gen y el desarrollo tumoral (Wang *et al*, 2004; Coopman & Mueller, 2006).

En el caso de *ZAP70* se ha descrito que diversas mutaciones en línea germinal de su dominio TK se encuentran asociadas a una forma característica de inmunodeficiencia combinada severa, demostrando el papel esencial de esta proteína en la correcta señalización de las células T humanas (Elder *et al*, 1994; Béné 2006). En cuanto a las neoplasias, se ha visto que un tipo de pacientes con leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B) muestran una expresión de este gen anormalmente elevada en sus linfocitos B, con niveles semejantes a los de células T de individuos sanos. La LLC-B se caracteriza por la acumulación de células B CD5+, con aparición de pequeños linfocitos maduros. Los pacientes con esta enfermedad se clasifican en dos grupos de distinto pronóstico, en función del estado mutacional de los genes que expresan la cadena pesada de la Ig (IgV_H) (Chen *et al*, 2002; Del Príncipe *et al*, 2006). La sobreexpresión de *ZAP70* en las células B podría aumentar la señalización a través de BCR (generalmente llevada a cabo por SYK) ya que *ZAP70* aparece sobreexpresado en el grupo de pacientes con IgV_H no mutada, que corresponde a la forma más agresiva de la enfermedad y con peor pronóstico (Rosenwald *et al*, 2001; Chen *et al*, 2002; Wiestner *et al*, 2003; Orchard *et al*, 2004; Del Príncipe *et al*, 2006; Gobessi *et al*, 2006; Amin *et al*, 2007; Kipps *et al*, 2007).

7 Otras alteraciones descritas en las NMPCs en los últimos años

Como hemos visto, las cascadas de señalización intracelular son muy complejas y requieren de la participación de muchas moléculas, además de las TKs. La alteración de cualquiera de ellas, ya sea por ganancia o pérdida de función, podría tener un efecto semejante en la activación constitutiva de estas vías. De hecho, se han descrito mutaciones con este efecto en otras proteínas reguladoras como serín/treonín quinasas, fosfatasas u otras implicadas en su regulación negativa. También se han encontrado alteraciones en numerosos factores de transcripción (ej, RUNX1), que son las dianas finales de las vías de señalización. La descripción de todas estas alteraciones, está suministrando nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento del proceso neoplásico.

7.1 La familia CBL

En los últimos años se ha descrito que un considerable número (entre un 6-33%) de pacientes con diversas neoplasias mieloides presentan mutaciones en el gen *C-BL*, codificante de una proteína implicada en la ubiquitinación y posterior degradación de las TKs (Sargin *et al*, 2007; Caligiuri *et al*, 2007; Abbas *et al*, 2007; Slape *et al*, 2008; Dunbar *et al*, 2008; Reindl *et al*, 2009;

Grand *et al*, 2009; Sanada *et al*, 2009; Loh *et al*, 2009; Makishima *et al*, 2009; Muramatsu *et al*, 2010; Barresi *et al*, 2010; Pérez *et al*, 2010; Fernandes *et al*, 2010; Matsuda *et al*, 2010; Kohlmann *et al*, 2010; Rocquain *et al*, 2010).

La familia Cbl (*Casitas B lineage Lymphoma*), comprende un grupo de proteínas con actividad E3 ubiquitina-ligasa codificadas por los genes *C-CBL* (o *CBL*, situado en 11q23), *CBL-B* (3q13) y *CBL-C* (19q13). *C-CBL* fue identificada por primera vez en estudios de tumores hematopoyéticos de ratón infectados con un retrovirus Cas-Br-M que inducía linfomas pre y pro-B y la transformación de fibroblastos. El retrovirus una vez aislado, se denominó Cas NS-1 y al oncogén responsable de dicha transformación *v-Cbl* (Langdon *et al*, 1989; Thien & Langdon, 2001). Se han encontrado un gran número de ortólogos de este gen en otras especies, como *Sli-1* en *C. elegans* o *D-cbl* en *D. melanogaster* (**Figura 20**) (Thien & Langdon, 1998).

En humanos, *C-CBL* y *CBL-B* se expresan ampliamente en todos los tejidos, mientras que la expresión de *CBL-C* parece ser característica de las células epiteliales (Kales *et al*, 2010). La proteína mejor conocida es *C-CBL* (o *CBL*), particularmente abundante en el timo (Thien & Langdon, 1998), que corresponde a una larga proteína citoplasmática de 120 KDa. Como se ha comentado en apartados anteriores, su función principal es regular negativamente muchas moléculas de señalización intracelular (en particular TKs) mediante su ubiquitinación. De esta manera, *CBL* ayuda a mantener el equilibrio fisiológico de la célula, por lo que la pérdida de su actividad puede resultar patológica (Thien & Langdon, 1998; Ryan *et al*, 2006).

Las CBLs humanas tienen una estructura común dividida en varios dominios (**Figura 20**). En el extremo aminoterminal presentan un dominio de unión a tirosinas fosforiladas (*tyrosine kinase binding domain*, TKB) de proteínas susceptibles de ser ubiquitinadas (RTKs y otras), por lo que se encarga de determinar la especificidad del sustrato (Thien & Langdon 2005). La actividad E3 ligasa reside en el dominio *RING finger* (*really interesting new gene*, *C3HC4 Zinc-binding finger domain*), que es capaz de reclutar las enzimas E2 (enzimas conjugadas a ubiquitina) necesarias para la transferencia de la molécula de ubiquitina al sustrato (Thien & Langdon, 2001; Swaminathan & Tsygankov, 2006). Las mutaciones en este dominio darían lugar a una proteína incapaz de llevar a cabo el proceso de ubiquitinación (Andoniou *et al*, 1994; Sargin *et al*, 2007). Entre el dominio TKB y el *RING finger* se encuentra la región de unión (*linker domain*), formada por una hélice- α muy conservada cuyos cambios conformacionales, mediados por interacciones entre determinadas Tyr (Y371) y el dominio TKB, regulan la orientación del *RING finger*. Las mutaciones en esta región producen una pérdida del plegamiento adecuado, impidiendo el reconocimiento de los sustratos. Finalmente, ya hacia el extremo carboxiterminal, las proteínas Cbl presentan un dominio rico en prolina (*proline-rich region*) de interacción con proteínas con dominios SH3, como muchas CTKs. Este dominio es más corto en *CBL-C* (Schmidt & Dikic,

2005). A continuación, C-CBL y CBL-B presentan una serie de residuos de tirosina fundamentales para su activación (Y700, 731 y 744 en C-CBL) que intervienen también en la interacción con múltiples proteínas adaptadoras con dominios SH2. C-CBL y CBL-B presentan además un dominio UBA que consiste en secuencias muy conservadas que interactúan con moléculas de ubiquitina, aunque no parecen imprescindibles para la ubiquitinación. Se cree que a través de estos dominios UBA, las proteínas Cbl pueden interactuar entre ellas mismas formando homodímeros (Thien & Langdon, 2005; Swaminathan & Tsygankov, 2006).

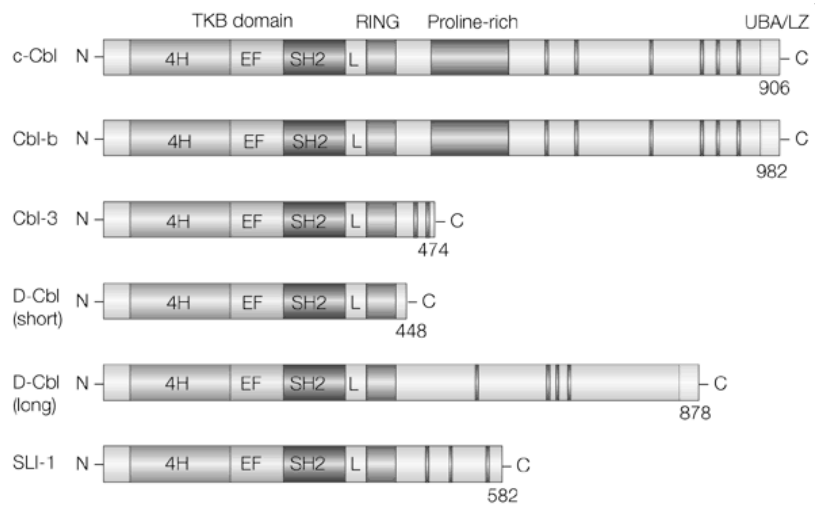


Figura 20. Estructura dividida en dominios de las proteínas de la familia Cbl en humanos (C-CBL, CBL-B y CBL-C). CBL-C también se conoce como CBL-3. D-cbl es el homólogo encontrado en *Drosophila*, que tiene dos isoformas (corta y larga), y Sli-1 el de *C. elegans*. Imagen obtenida de Thien & Langdon, 2001.

7.1.1 Papel de CBL en la señalización

Como se ha comentado anteriormente, las proteínas CBL son reguladores negativos de diversas proteínas de señalización a través de su ubiquitinación. De esta forma, una vez finalizada la transmisión de la señal al interior celular los niveles de proteínas vuelven a un estado basal.

En condiciones fisiológicas las RTKs permanecen catalíticamente inactivas en ausencia de ligando, mientras que la unión de éste promueve su oligomerización y activación. Esto conduce a la activación de proteínas intracelulares, entre ellas diversas CTKs que, conjuntamente con las RTKs estimuladas, activan C-CBL. C-CBL se activa tras la estimulación de una amplia variedad de receptores de membrana, como EGFR, FGFR, BCR y TCR, que se unen a su dominio TKB, reclutándola y fosforilando algunas de sus tirosinas, entre las que destacan las que ocupan las posiciones 700, 731 y 774 (Thien & Langdon, 1997; Feshchenko *et al*, 1998; Thien & Langdon 1998). En esta fosforilación participan también diversas CTKs como SYK (Ota & Samelson, 1997;

Deckert *et al*, 1998; Rao *et al*, 2001), las pertenecientes a la familia Src (como SRC y FYN) (Fukazawa *et al*, 1995) o ABL1 (en Y700 y Y774) (Andoniou *et al*, 1994), previamente activadas por la estimulación del receptor. Existen numerosos estudios que demuestran que la propia oncoproteína BCR-ABL1 es capaz de fosforilar y activar C-CBL (Andoniou *et al*, 1994; Andoniou *et al*, 1996). La fosforilación de C-CBL provoca un cambio conformacional que da lugar a la activación de su actividad E3 ligasa, por lo que es fundamental para llevar a cabo su función (Swaminathan & Tsygankov, 2006). Esta proteína es entonces capaz de reconocer determinadas tirosinas fosforiladas del receptor a través de su dominio TKB (ej, Y1045 de EGFR), interaccionar con él e inducirle su ubiquitinación. Algunos autores postulan que esta interacción entre el TKB y el receptor debe ser acompañada por proteínas adaptadoras como Grb2, que se unen a C-CBL a través de la interacción con el dominio rico en prolina (Swaminathan & Tsygankov, 2006). La ubiquitinación promueve la internalización del receptor y su degradación por la vía lisosomal (Levkowitz, 1999; Peschard & Park, 2003; Kales *et al*, 2010). Las moléculas de receptor que han sido internalizadas pero que no han sufrido ubiquitinación son recicladas de nuevo a la membrana y pueden volver a ser activadas. El ejemplo mejor conocido de este proceso es el de EGFR, cuyo mecanismo de regulación ha sido ampliamente descrito (**Figura 21**) (Thien & Langdon, 1997; Waterman *et al*, 1999; Schlessinger 2000; Hubbard & Till, 2000; Peschard & Park 2003; Schmidt & Dikic, 2005, Cowan-Jacob, 2006). C-CBL también es capaz de reconocer tirosinas fosforiladas específicas de CTKs, como SYK (Lupher *et al*, 1998; Deckert *et al*, 1998), ZAP70 (Lupher *et al*, 1997) y de miembros de la familia Src (LCK y FYN, Deckert *et al*, 1998), al parecer en este caso a través de la interacción con su región carboxi.

En el caso de las RTKs, la acción de C-CBL lleva a una mono-ubiquitinación de varios residuos de lisina diferentes (Levkowitz *et al*, 1999, Peschard & Park, 2003; Schmidt & Dikic, 2005). Sin embargo, en el caso de las CTKs, la unión de la ubiquitina se produce inicialmente en una de sus lisinas y posteriormente se le unen a ésta varias más, formando una única cadena de poliubiquitinas. Estas cadenas conducen a la degradación de la proteína por la subunidad 26S del proteosoma, a diferencia de la degradación lisosomal de las proteínas receptoras (Levkowitz, 1999; Peschard & Park, 2003).

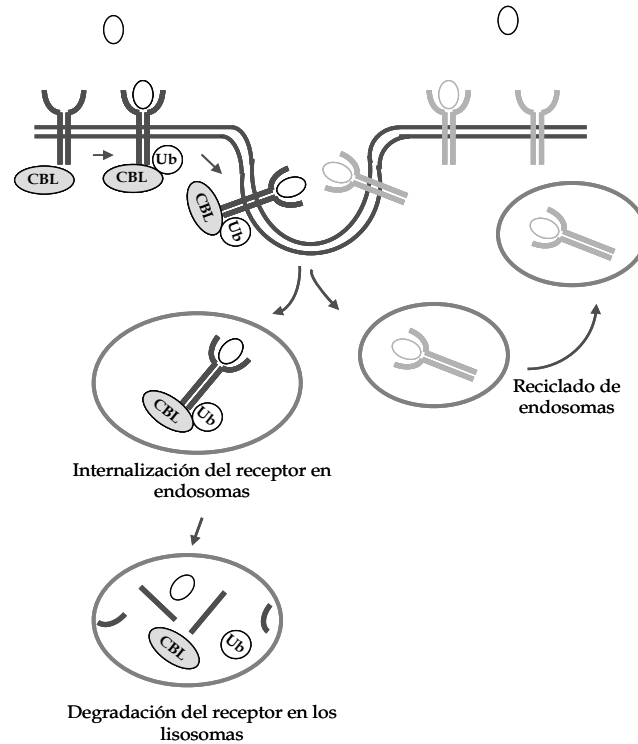


Figura 21. La unión ligando-RTK (por ejemplo EGF-EGFR) desencadena la cascada de señalización intracelular. Una de las moléculas activadas por esta cascada es C-CBL, que es reclutada por las fosfotirosinas del receptor pero no produce una activación posterior de otras moléculas, sino que transfiere una molécula de ubiquitina al receptor. Esto provoca que el receptor sea internalizado en vesículas y degradado por enzimas lisosomiales. Si el receptor no ha sido ubiquitinado por C-CBL la vesícula que lo contiene vuelve a fusionarse con la membrana y se recicla.

Por otro lado, se ha descrito una función reguladora positiva de CBL en estas vías de señalización por interacción con proteínas importantes. De hecho, C-CBL interacciona con la subunidad p85 de PI3K a través de la Y731, permitiendo su aproximación a la membrana plasmática y favoreciendo la señalización mediada por la vía PI3K-AKT.

Por último, C-CBL también está sometido a mecanismos reguladores que inhiben su función. Por un lado la fosfatasa SHP1 (*Src-homology-2-containing phosphatase-1*) puede unirse a esta proteína a través de su dominio SH2, promoviendo su desfosforilación e inactivación (Uddin *et al*, 1996). Pero C-CBL también puede ser ubiquitinado por otras proteínas E3 ubiquitín ligasa, como AIP4/Itch (*atrophin-1-interacting protein 4*) o NEDD4 (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*) (Magnifico *et al*, 2003) y ser degradado posteriormente por el proteosoma. Además, también puede ser degradado de manera indirecta por las proteínas de la familia Src, que fosforilan y estimulan la autoubiquitinación de C-CBL, facilitando así el aumento de la señalización por RTKs como EGFR (Peschard & Park, 2003). Otros reguladores como SPRY2 (*Sprouty 2*) mimetizan por fosforilación el sitio de unión de EGFR con C-CBL (Kim *et al*, 2004), impidiendo la unión entre ambos (Perschard & Park, 2003; Thien & Langdon, 2005; Schmidt & Dikic, 2005) y manteniendo la señalización mediada por este

receptor. Por ello, podemos decir que existe toda una red molecular de interacciones con CBL (Figura 22), lo que demuestra la enorme complejidad de los procesos que regulan estas proteínas.

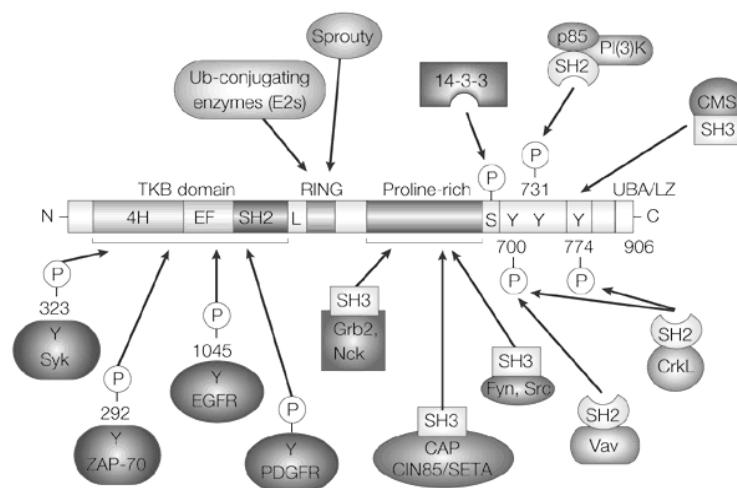


Figura 22. Red de interacciones de C-CBL. Para su activación, es necesaria la fosforilación de las tirosinas de las posiciones 700, 731 y 774, que sucede tras la estimulación del receptor de membrana. C-CBL interactúa a través de su dominio TKB con distintas TKs, como SYK, ZAP70 ó EGFR, ubiquitinándolas gracias al dominio *RING finger*. A través de su dominio rico en prolina reconoce dominios SH3 y SH2 de disitintas proteínas de señalización. Figura obtenida de Thien & Langdon, 2001.

7.1.2 Alteraciones en genes de la familia Cbl y enfermedad

La función fundamental de estas proteínas como reguladoras de la señalización hace que su alteración, mediante pérdida o ganancia de función, pueda tener efectos fisiológicos importantes. Por un lado, se ha demostrado que la pérdida de función en C-CBL y CBL-B y/o de cualquiera de sus mecanismos reguladores contribuye al desarrollo de enfermedades inmunológicas (Liu *et al*, 2004). Pero también se han descrito diversas mutaciones en C-CBL (localizadas entre la región SH2 y el dominio *RING finger*) que inactivan su actividad E3 ligasa y tienen poder transformante, impidiendo la internalización y/o degradación de sus moléculas diana (Waterman *et al*, 1999; Ryan *et al*, 2006). Por otro lado, recientemente se han descrito determinadas variantes alélicas de CBL-B que podrían estar asociadas al desarrollo de esclerosis múltiple (Sanna *et al*, 2010).

La primera mutación descrita de CBL fue la 70Z, encontrada en células murinas derivadas de linfomas pre-B inducidos de ratón. Esta forma de C-CBL carecía de 17 aminoácidos del dominio *RING finger* por mutación en una posición aceptora de *splicing* (Andoniou *et al*, 1994). Los

análisis funcionales demostraron que esta proteína mutada perdía la capacidad de ubiquitinar a EGFR, por lo que este receptor no se degradaba (Thien & Langdon, 1997). Posteriormente se describió una fusión entre *MLL* y *C-CBL* en un paciente con LMA *de novo* (FAB-M1), resultado de una deleción intersticial de la región comprendida entre ambos genes (11q). En la proteína de fusión, la región aminoterminal de *MLL* se fusiona con el dominio rico en prolina de *C-CBL*, formándose una proteína quimérica sin dominio *RING finger* y, por tanto, sin capacidad de ubiquitinación (Fu *et al*, 2003).

En el año 2007, se describieron nuevas mutaciones de *C-CBL* en neoplasias mieloides. Sargin y colaboradores, identificaron una mutación inactivante en el exón 9 (p.R420Q, c.1259G>A, Sargin *et al*, 2007) en este gen en un paciente con LMA (1/150). Los estudios *in vitro* realizados demostraron que esta mutación, que afectaba al dominio *RING finger*, daba lugar a una pérdida de función de *C-CBL*, que era incapaz de ubiquitinar RTKs como EGFR o FLT3, alterando así la señalización celular fisiológica (Sargin *et al*, 2007; Kales *et al*, 2010). Posteriormente, otros grupos encontraron otras mutaciones en las regiones codificantes del dominio *RING finger* (exones 8 y 9) en líneas celulares de LMA (MOLM-13 y MOLM-14) (Caligiuri *et al*, 2007; Abbas *et al*, 2008; Reindl *et al*, 2009). De entre ellas, las más frecuentes eran mutaciones con cambio de sentido como la p.R420Q (Sargin *et al*, 2007) y deleciones del exón 8 (entre otras, la p.Glu366_Gln409del, Caligiuri *et al*, 2007). La detección de estas mutaciones demostraba la posible implicación de la pérdida de función de este gen en el desarrollo de neoplasias mieloides agudas. De hecho, parece que mutaciones en *C-CBL* son particularmente frecuentes en pacientes con LMA con inv(16) o con la t(8;21) (Abbas *et al*, 2008).

De manera casi simultánea, Dunbar y colaboradores llevaron a cabo análisis para la detección de regiones con pérdida de heterocigosidad sobre distintas neoplasias mieloides sin causa molecular conocida, detectando UPD adquirida en 11q en un 4% de los casos. La secuenciación posterior de varios genes candidatos condujo a identificar de nuevo mutaciones en el dominio *RING finger* de *C-CBL* en la mayor parte de estos pacientes (Dunbar *et al*, 2008). Estudios simultáneos y más amplios realizados en distintas neoplasias mieloides demostraron que *C-CBL* se encontraba mutado en pacientes con pérdida de heterocigosidad en esta región (con frecuencias de entre el 60-90%), pero también en pacientes sin ella (2-10%) (Dunbar *et al*, 2008; Slape *et al*, 2008; Grand *et al*, 2009; Sanada *et al*, 2009). Los últimos análisis indican que las mutaciones en *C-CBL* son especialmente frecuentes en pacientes con LMA secundaria (Makishima *et al*, 2009; Fernandes *et al*, 2010; Barresi *et al*, 2010), SMD (Reindl *et al*, 2009; Barresi *et al*, 2010; Rocquain *et al*, 2010) y NMD/NMPs como LMMC (Makishima *et al*, 2009; Kohlmann *et al*, 2010) y LMMJ (Loh *et al*, 2009; Makishima *et al*, 2009; Maramatsu *et al*, 2010; Pérez *et al*, 2010; Matsuda *et al*, 2010; Niemeyer *et al*, 2010). Los análisis funcionales llevados a cabo en modelos celulares de ratón han demostrado que la mayoría de las mutaciones del dominio

RING finger conducen a la pérdida de actividad E3 ubiquitina ligasa (Sanada *et al*, 2009; Grand *et al*, 2009; Kales *et al*, 2010). Además, los estudios sobre modelos *in vivo* demuestran que los mutantes de *C-CBL* dan lugar al desarrollo de leucemia mieloide (Bandi *et al*, 2009). También se ha demostrado que las mutaciones en *C-CBL* detectadas en neoplasias mieloproliferativas se mantienen en su progresión a LMA, reforzando su papel oncogénico (Makishima *et al*, 2009) y un posible papel como supresor tumoral (Ogawa *et al*, 2010). Finalmente, un estudio reciente ha demostrado que este gen se encuentra desmetilado en pacientes con NMPCs *BCR-ABL1* negativas, aunque el papel de esta desmetilación en la patogénesis no está todavía claro (Chim *et al*, 2010).

Las mutaciones en *C-CBL* también son relativamente frecuentes (7%) en carcinoma no microcítico (NSCLC) (Tan *et al*, 2010), lo que sugiere que este gen podría estar alterado en tumores sólidos. También se ha descubierto recientemente que tanto *C-CBL* como *CBL-B* se encuentran sobreexpresados en cáncer de estómago, en el que se relacionan con la invasión y progresión de la enfermedad (Dong *et al*, 2010). Sin embargo, hasta la fecha la mayor parte de las mutaciones detectadas en *C-CBL* han sido descritas en pacientes con LMA y en distintas neoplasias mieloproliferativas *V617F/JAK2* negativas, principalmente SMD/NMP (LMMC y LMMJ). Esto ha llevado a la creencia de que las mutaciones en *C-CBL* y en otros genes descritos (*JAK2* y *MPL*) serían mutuamente excluyentes (Schnittger *et al*, 2009; Kales *et al*, 2010). Las mutaciones descritas hasta la fecha en *C-CBL* en las distintas neoplasias mieloides se recogen en el **Anexo 1**.

También se han descrito mutaciones en *CBL-B* (Caligiuri *et al*, 2007; Makishima *et al*, 2009) e incluso en *CBL-C* (Muramatsu *et al*, 2010) en neoplasias hematológicas, aunque en menor frecuencia y con significado desconocido. A pesar de que no se hayan realizado estudios funcionales, su localización sugiere que también podrían afectar a la función E3-ligasa de estas proteínas.

7.2 Otros genes implicados en las NMPCs

En el año 2009, el grupo de Vainchenker y colaboradores (Delhommeau *et al*, 2009) describió mutaciones con pérdida de función en *TET2* (4q24) en el 19% de pacientes con SMD, 24% de LMA secundarias, 22% de LMMC y 12% de NMPCs (Delhommeau *et al*, 2009; Bacher *et al*, 2010). Casi simultáneamente, otro grupo realizó un estudio similar en SMD, encontrando que el 26% de estos pacientes presentaban mutaciones o pérdidas de este gen (Langemeijer *et al*, 2009). *TET2* es uno de los tres genes de la familia TET (*ten-eleven-translocation*, *TET1*, *TET2* y *TET3*) llamados así por encontrarse *TET1* fusionado a *MLL* en una t(10;11)(q22;q23), encontrada en

LMA (Lorsbach *et al*, 2003). La función de TET2 se desconoce aunque, basándose en la función de TET1, diversos autores han postulado que estaría relacionada con la transformación de 5-metilcitosina en 5-hidroximetilcitosina, afectando a la regulación epigenética de la transcripción (Tahiliani *et al*, 2009; Levine & Carrol, 2009; Tefferi *et al*, 2010).

Las mutaciones descritas en *TET2* corresponden a deleciones y mutaciones puntuales con cambio de sentido, cambio en el marco de lectura o formación de codones de parada sin localizaciones concretas (Schaub *et al*, 2010; Bacher *et al*, 2010). Los diversos análisis realizados, han demostrado que estas mutaciones aparecen en el 50% de los pacientes con LMMC (Kosmider *et al*, 2009), en algunos pacientes con un tipo de SMD (anemia refractaria con sideroblastos en anillo, RARS-T) (Flach *et al*, 2009; Szpurka *et al*, 2010), en el 29% de los casos con MS (14/48) (Tefferi *et al*, 2009b), en el 20-42% de los casos con LMMC y en el 3-12% de los casos con LMA (Abdel-Wahab *et al*, 2009; Tefferi *et al*, 2009c; Couronné *et al*, 2010). Aunque son más frecuentes en SMD y LMMC, este tipo de mutaciones se han encontrado también en pacientes con NMPC clásicas, con y sin la mutación V617F/*JAK2* (17% y 7%, respectivamente) (Mullighan *et al*, 2009; Schaub *et al*, 2010; Tefferi 2010). Actualmente, se considera que el 16% de las PV, el 5% de las TE, el 17% de las MFI y el 14-17% de las mielofibrosis post-NMPC tendrían mutaciones en *TET2* (Tefferi *et al*, 2009; Tefferi 2010). Las mutaciones de este gen se asocian a una mayor tasa de supervivencia en SMD (Kosmider *et al*, 2009) y a una menor supervivencia en LMA (Abdel-Wahab *et al*, 2010) y LMMC (Kosmider *et al*, 2009).

Hoy en día es bastante controvertido si las mutaciones en *TET2* son hechos iniciales de la enfermedad o están relacionadas con su evolución (Tefferi, 2010). Un estudio reciente realizado sobre material de un paciente con PV identificó que *TET2* se encuentra mutado en células con y sin la mutación V617F/*JAK2*, lo que sugiere que la alteración de *TET2* es previa a la de *JAK2* (Schaub *et al*, 2010). Varios autores consideran que las mutaciones en *TET2* predisponen a la adquisición de mutaciones en *JAK2* (Mullighan *et al*, 2009; Levine & Carrol, 2009; Schaub *et al*, 2010).

ASXL1 (20q11, *additional sex combs like 1*), es otro gen que se ha encontrado alterado recientemente en las neoplasias mieloides crónicas. Este gen codifica para una proteína poco caracterizada que se expresa en la mayor parte de células hematológicas, aunque parece también implicada en el remodelamiento de la cromatina (Tefferi, 2010). Previamente se había encontrado que este gen participaba en una fusión *PAX5-ASXL1*, detectada en LLA de células B (An *et al*, 2008). Las mutaciones encontradas son pequeñas deleciones y mutaciones puntuales con cambio de sentido en el exón 12 de este gen (dominio PHD), en el 11-21% de los SMD, 33-43% de LMMC, 7-11% de LMA de novo, 30-47% de LMA secundarias y 2% LMMJ (Carbuccia *et al*, 2009; Gelsy-Boyer 2009; Carbuccia *et al*, 2010; Boulwood *et al*, 2010; Sugimoto *et al*, 2010;

Chou *et al*, 2010; Tefferi 2010; Rocquain *et al*, 2010). En algunos de estos casos, estas alteraciones estaban asociadas a una menor supervivencia (Chou *et al*, 2010).

IKZF1 (*Ikaros Zinc Finger 1*, 7p12), codifica una proteína que pertenece a una familia de factores de transcripción con dominios de zinc, importantes para la regulación de la diferenciación linfocítica. Su producto parece modular la expresión de genes específicos necesarios para el desarrollo linfocítico, a través de un mecanismo que implica el remodelamiento de la cromatina. Las mutaciones observadas provocarían la pérdida de su función en pacientes con LMC en crisis blástica, LLA infantil (Mulligan *et al*, 2009) y LLA *BCR-ABL1* positiva (Mulligan *et al*, 2008; Martinelli *et al*, 2009), lo que sugiere su contribución a la transformación leucémica. La mayor parte de estas mutaciones corresponden a deleciones del gran parte del gen (Martinelli *et al*, 2009) y, al parecer, provocarían la activación de la vía JAK-STAT (Tefferi *et al*, 2010). Las deleciones en *IKZF1* son raras en la fase crónica de las NMPCs, pero se detectan en el 19% de los pacientes en transformación a enfermedad aguda (Jager *et al*, 2010).

IDH1 (2q33) e *IDH2* (15q26) codifican para la isocitrato deshidrogenasa 1 y 2, respectivamente. Ambas son enzimas homodiméricas dependientes de NADP⁺, que catalizan la descarboxilación oxidativa del isocitrato a 2-oxoglutarato, generando NADPH a partir de NADP⁺. Estos genes se encuentran frecuentemente mutados en gliomas (Parsons, 2008) y han sido recientemente relacionados con la LMA (Mardis 2009; Gross *et al*, 2010). Las mutaciones, todas en heterocigosis, afectan a tres argininas distintas R132 (*IDH1*), R172 (*IDH2*, homólogo a R132 en *IDH1*) y R140 (*IDH2*), provocando la pérdida de la función de la proteína. Los análisis llevados a cabo en NMPCs indican que estas mutaciones no son frecuentes en fase crónica aunque sí en la agudización de la enfermedad, surgiendo durante el desarrollo de la LMA secundaria y de manera independiente de la presencia o ausencia de la mutación V617F/*JAK2* (Tefferi *et al*, 2010).

Finalmente, *EZH2* (7q36.1) es un gen codificante de la subunidad catalítica de la metiltransferasa de histonas H3 (H3K27, *polycomb repressive complex 2*, PRC2), cuya alteración se ha encontrado relacionada con LMA y SMD. En este tipo de patologías es frecuente detectar pérdidas o deleciones del cromosoma 7q, que están asociadas a un peor pronóstico. Recientemente se había observado que en los SMD es común la UPD adquirida de la región 7q (Grand *et al*, 2009; Gupta *et al*, 2008; Heinrichs *et al*, 2009) y se ha demostrado que el 75% de los pacientes con SMD que presentan disomía uniparental de 7q presentan mutaciones en homocigosis en *EZH2* (Ernst *et al*, 2010). Globalmente, este gen estaría alterado en el 12-14% de los SMD (Nikoloski *et al*, 2010; Ernst *et al*, 2010) y en el 13% de las MFI (Ernst *et al*, 2010). Las mutaciones detectadas son mutaciones sin sentido, mutaciones de sitios aceptores de *splicing* y deleciones que mantienen el marco de lectura. Al parecer, estas alteraciones surgen en las fases tempranas de la enfermedad (Ernst *et al*, 2010).

Sin embargo, a pesar de los hallazgos de los últimos años sobre la patogénesis molecular de las neoplasias mieloides crónicas, aún existen casos con estas enfermedades que no muestran ninguna de estas alteraciones descritas a nivel molecular.

Hipótesis

II. HIPÓTESIS

La causa molecular de las NMPCs *BCR-ABL1* negativas no se conoce en su totalidad. Sin embargo:

1. En las NMPCs las alteraciones genéticas encontradas afectan mayoritariamente a genes codificantes de proteínas con actividad TK, provocando su activación constitutiva e independiente de ligando. Ello conduce a una activación de las vías de señalización en las que participan. Estas alteraciones pueden ser fusiones génicas (detectables o no a nivel citogenético y relativamente infrecuentes) o mutaciones en la secuencia de los genes que codifican este tipo de proteínas, en muchos casos en los mismos genes que se han encontrado fusionados en algunos de estos pacientes.
2. Se ha demostrado que algunos pacientes con este tipo de enfermedades sin alteraciones genéticas conocidas son sensibles a fármacos inhibidores de la actividad tirosínquinasa, como el imatinib (Glivec®).

Por ello, nos planteamos que debían existir más alteraciones de este tipo en aquellos pacientes que no presentaran algunas de las ya descritas. Estas alteraciones debían afectar a otros genes codificantes de TKs o a genes que codificaran otro tipo de proteínas implicadas en las mismas vía de señalización o en su regulación.

Objetivos

III. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo consistió en determinar la causa molecular de un grupo de pacientes con diversas NMPCs que no presentaban las alteraciones genéticas más frecuentes encontradas en estas enfermedades. En concreto, nos centramos en la caracterización de alteraciones localizadas en genes codificantes de TKs y en otros genes implicados en su regulación, cuya alteración podría inducir un efecto similar al de la activación constitutiva de una TK.

Los objetivos concretos fueron:

1. Realizar un análisis exhaustivo de la posible presencia de alteraciones génicas en los genes TK pertenecientes a las familias Abl (*ABL1* y *ABL2*) y Syk (*SYK* y *ZAP70*) de CTKs y la familia IV (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* y *FGFR4*) de RTKs, en una serie seleccionada de pacientes sin fusión *BCR-ABL1* ni mutación *V617F/JAK2*. En todas las familias de genes seleccionadas, al menos uno de sus miembros se ha visto implicado previamente en la patogénesis de neoplasias hematológicas. Para ello:
 - a. Analizaremos la presencia de posibles reordenamientos cromosómicos crípticos que afecten a los genes TK seleccionados mediante FISH.
 - b. Analizaremos la presencia de posibles mutaciones activantes a nivel de secuencia mediante dHPLC en los exones codificantes de los principales dominios de estos mismos genes. Debido a su implicación en diversos tipos de tumores, en este estudio se incluyó el análisis de los dominios más importantes de *EGFR* (una RTK).
 - c. Analizaremos posibles patrones de expresión anómalos de estos genes TK mediante RQ-PCR.
2. Realizar un análisis de toda la secuencia codificante de los genes de la familia de E3-ubiquitin ligasas Cbl (*C-CBL*, *CBL-B* y *CBL-C*) mediante dHPLC en la serie de pacientes anterior. En caso de detectarse alteraciones en alguno de estos genes, ampliaríamos el análisis de las regiones afectadas a un mayor número de muestras.

En caso de detectar cambios posiblemente implicados en el desarrollo de la enfermedad en alguno de estos genes, realizaríamos ensayos funcionales *in vitro* para conocer el efecto de estas mutaciones en la proliferación celular.

Material y Métodos

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES

El material de nuestro estudio han sido muestras de sangre periférica y/o médula ósea, almacenadas en el banco de muestras del Servicio de Análisis Genéticos del Departamento de Genética de la Universidad de Navarra, que fueron anonimizadas por personal de este Servicio.

Inicialmente se seleccionaron 349 muestras de pacientes con NMPCs, en los que se analizó la presencia de la mutación V617F en *JAK2* (Vizmanos *et al*, 2006). Posteriormente, esta serie fue ampliada hasta 1076 muestras de pacientes con distintas neoplasias mieloides. Por último, de todo este grupo se seleccionaron 44 muestras con NMPCs de distinto tipo (clásicas y atípicas, ver **Tabla 1**), de las cuales hubiera almacenada una cantidad de material suficiente para realizar los análisis previstos. Las muestras seleccionadas cumplían las siguientes características: cariotipo normal, ausencia del transcrito de fusión *BCR-ABL1* detectado por RT-PCR y ausencia de la mutación V617F en *JAK2*. Estas muestras procedían de 13 hospitales distintos: Hospital Donostia de San Sebastián (7 casos), Hospital Txagorritxu de Vitoria (5 casos), Hospital Virgen del Camino de Pamplona (1 caso), Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza (2 casos), Hospital de Navarra de Pamplona (2 casos), Hospital San Pedro - San Millán de Logroño (5 casos), Hospital de Basurto (5 casos), Hospital de Barbastro (1 caso), Hospital General San Jorge de Huesca (1 caso), Hospital Royo Villanova de Zaragoza (1 caso), Hospital Universitario Lozano Blesa de Zaragoza (3 casos), Hospital de Cruces de Bilbao (3 casos), Hospital General Yagüe de Burgos (2 casos) y Clínica Universidad de Navarra de Pamplona (6 casos). A través del Servicio de Análisis Genéticos de nuestro centro se solicitó a los distintos hospitales información clínica complementaria (ver **Anexo 2**). Esta serie de 44 pacientes constituyó el grupo básico sobre el cual realizamos todos los análisis inicialmente previstos. Cualquier alteración encontrada sería posteriormente analizada en una serie mayor de muestras.

Tabla 1. Datos sobre el diagnóstico de los 44 pacientes seleccionados.

		Varones	Mujeres
Total	44	28	16
NMPC clásicas	23 (52%)	13	10
PV	4	3	1
TE	15	3	1
MFI	4	7	8
NMPC atípicas	21 (48%)	15	6
LMMC	16	12	4
SHE	1	1	0
NMPCs sin clasificar	4	2	2

A modo de resumen, el estudio inicial consistió en la búsqueda de alteraciones en los genes codificantes de la familia IV de RTKs (*FGFR1* en 8p11, *FGFR2* en 10q26, *FGFR3* en 4p16 y *FGFR4* en 5q35) y los codificantes de las familias de CTKs, Syk (*SYK* en 9q22 y *ZAP70* en 2q11) y Abl (*ABL1* en 9q34 y *ABL2* en 1q25). Para ello, en primer lugar se analizó mediante FISH la posible existencia de reordenamientos cromosómicos de estos genes que pudieran no haber sido detectados en el análisis citogenético de rutina. En este estudio se incluyó también *ETV6* (12p13), por ser uno de los genes más comúnmente fusionados con genes codificantes de TKs. A continuación, se realizó un estudio de la expresión mediante RQ-PCR de alguno de estos genes TK en los pacientes de los que se dispuso de material suficiente. En este estudio de expresión génica se incluyó *JAK2*, por su importancia en la génesis de estas enfermedades. Por último, se realizó mediante dHPLC un análisis sistemático de búsqueda de posibles mutaciones a nivel de secuencia de estos mismos genes, además de *EGFR*, codificante de una TK receptora. En este estudio se incluyó un grupo de 20 muestras control sin enfermedad, que nos permitieran comprobar si los cambios detectados eran variantes poblacionales.

Por otro lado, también se llevó a cabo un estudio mutacional mediante dHPLC de la secuencia completa de los genes de la familia Cbl (*C-CBL*, *CBL-B* y *CBL-C*). El efecto fisiológico de las mutaciones detectadas mediante dHPLC en esta última familia fue analizado mediante ensayos funcionales *in vitro*.

Debido a las limitaciones en cuanto a la calidad y cantidad de muestra disponible en cada uno de los casos, el número de pacientes analizados varió en función del gen estudiado y de la técnica empleada. Los resultados obtenidos en el caso de los genes de la familia Cbl condujeron a que, para este caso, el número de muestras de pacientes y controles sin enfermedad analizadas fuera mayor. La **Figura 1** resume el esquema global de trabajo.

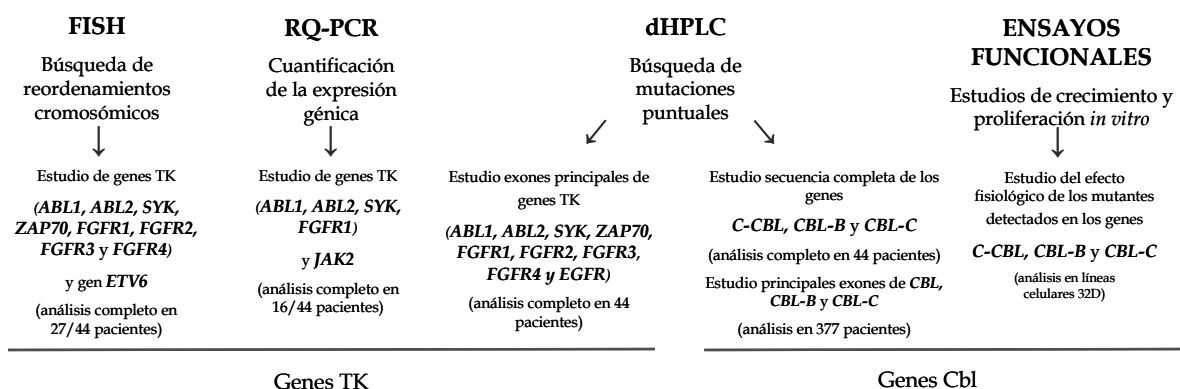


Figura 1. Esquema de trabajo del presente Proyecto. En el estudio inicial de los 44 pacientes seleccionados se han analizado los genes de las familias Abl, Syk y Fgfr mediante dHPLC, FISH (incluyendo *ETV6*) y RQ-PCR en las muestras de calidad y cantidad suficientes. En el análisis mutacional mediante dHPLC se incluyó además *EGFR* y los genes de la familia Cbl (*C-CBL*, *CBL-B* y *CBL-C*). Algunos de los exones de los genes de la familia Cbl fueron analizados en una serie mayor de pacientes (377 en total). El efecto fisiológico de las mutaciones detectadas en este último estudio fue analizado mediante ensayos funcionales *in vitro*.

MÉTODOS

1. Análisis citogenético

1.1 Citogenética convencional: cariotipo de bandas G

Inicialmente, se dispuso del cariotipo de bandas G (**Figura 2**) de los pacientes incluidos en el estudio, que fue realizado por el personal especializado del Servicio de Análisis Genéticos del Departamento de Genética (**Anexo 2**). Este análisis permite conocer si los pacientes presentan alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales.

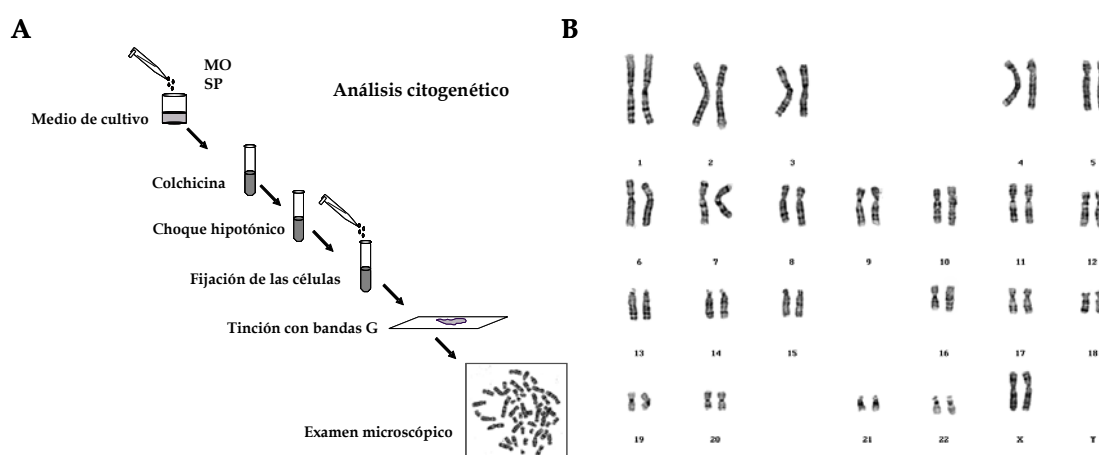


Figura 2: A) Procedimiento para la tinción de bandas G. B) Una vez obtenida la metafase, se procede a la elaboración del cariotipo, que informa de manera general de la presencia de alteraciones cromosómicas numéricas y/o estructurales.

1.2 Citogenética molecular: FISH

La hibridación *in situ* fluorescente o FISH (*fluorescence in situ hybridization*) es una técnica de citogenética molecular que consiste en la hibridación específica de fragmentos de DNA marcados con fluorocromos (sondas) sobre su secuencia complementaria en el genoma. La hibridación tiene lugar tanto en cromosomas en metafase, como en núcleos en interfase. Esta técnica se comenzó a aplicar en 1977 como complemento a los análisis de citogenética convencional, que sólo pueden realizarse en cromosomas en metafase. El FISH permite detectar alteraciones más sutiles, que pueden pasar desapercibidas en los análisis de bandas (alteraciones crípticas), aportando una mayor sensibilidad y especificidad a los análisis citogenéticos (Speicher & Carter, 2005; Bayani & Squire, 2007). Sin embargo, al igual que el resto de técnicas moleculares, sólo permite el análisis de regiones muy concretas del genoma. Para su realización, es necesario el uso de un microscopio de fluorescencia que permita observar la hibridación de las sondas sobre el material del paciente.

La aplicación del FISH ha permitido descubrir y analizar alteraciones genéticas no visibles a cariotipo, como microdeleciones (*FIP1L1-PDGFR*A, Cools *et al*, 2006) y amplificación por episomas (*NUP214-ABL1*, Graux *et al*, 2004). En la actualidad es una técnica ampliamente utilizada como complemento al cariotipo convencional en algunas patologías, especialmente en ciertos tumores sólidos, donde la obtención de metafases es técnicamente complicada (caso de *ERBB2* en cáncer de mama, p ej.; Sorlie *et al*, 2001).

Las sondas empleadas en el FISH pueden ser de distinto tipo en función del objetivo del análisis. Las sondas centroméricas reconocen secuencias específicas localizadas en los centrómeros y se emplean para detectar posibles aneuploidías (alteraciones en el número de cromosomas). Las sondas teloméricas hibridan en los extremos de los brazos cromosómicos. Las sondas de pintado cromosómico hibridan sobre varias regiones de un mismo cromosoma, lo que permite “teñirlo” por completo. El uso de sondas de este tipo, que reconocen de manera específica a cada uno de los cromosomas, ha dado lugar a la variante *SKY* (*spectral karyotyping*). Por último, las sondas de secuencia única están formadas por fragmentos de DNA que hibridan en una posición específica del genoma y permiten, por ejemplo, localizar un solo gen en el genoma de un individuo.

Dependiendo de la alteración que se desea analizar se pueden combinar sondas de secuencia única distintas, marcadas con fluorocromos diferentes. En la mayoría de los análisis de detección de fusiones génicas se usan sondas de doble fusión (*dual-fusion*) y sondas de rotura (*break apart*). Los ensayos de doble fusión se basan en el uso de sondas (fragmentos de DNA) que hibridan en cromosomas diferentes, marcadas con distintos fluorocromos (como *spectrum red*, *spectrum green*, *spectrum orange*, *DEAC*, *texas red* y *Cy5* entre otros). La presencia de una fusión entre ambas regiones daría lugar a la unión de ambas señales (señal de fusión). Por el contrario, en los ensayos de rotura, se escogen como sondas fragmentos que hibridan secuencias contiguas, por ejemplo flanqueando ambos extremos de un gen. La separación de las señales tras la hibridación indicaría la rotura de este gen (Ventura *et al*, 2006).

Para los análisis más frecuentemente realizados en el estudio de diversas enfermedades existen empresas que suministran la mezcla de sondas de FISH, ya validadas y marcadas para su uso directo (*sondas comerciales*). Sin embargo, en el caso de análisis de regiones de bajo interés comercial (alteraciones muy infrecuentes) o para el descubrimiento de nuevas alteraciones, es necesaria la utilización, como sondas, de fragmentos del genoma clonados en vectores sin marcar ni validar (*sondas no comerciales*). Estos fragmentos están disponibles en librerías que contienen todo genoma de diversos organismos, fragmentado y clonado en diferentes vectores como BACs (*bacterial artificial chromosome*), PACs (*bacteriophage P1-derived artificial chromosome*) o YACs (*yeast artificial chromosome*) según su tamaño. La utilización de estas últimas sondas requiere de un diseño previo mediante la utilización de visores del genoma humano

disponibles en internet. Una vez realizado el diseño, el ensayo debe ser validado (comprobando que la sonda hibrida en la posición esperada) y optimizado por el propio investigador.

Como se ha indicado, en este estudio nos propusimos analizar mediante FISH los genes de las familias Abl, Syk y Fgfr (*ABL1*, *ABL2*, *SYK*, *ZAP70*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* y *FGFR4*) y el gen *ETV6*, que codifica para un factor de transcripción frecuentemente fusionado con distintos genes TK. Para ello, empleamos tanto sondas *comerciales* como *no comerciales*, marcadas con *spectrum orange* (SO) y *spectrum green* (SG). De manera inicial validamos todas las sondas utilizadas, tanto *comerciales* como *no comerciales*, mediante su hibridación sobre metafases (para comprobar que la hibridación se producía en la región cromosómica adecuada) y núcleos en interfase (para estimar el valor umbral del ensayo) de individuos sanos. La **Figura 3** resume el esquema de trabajo seguido.

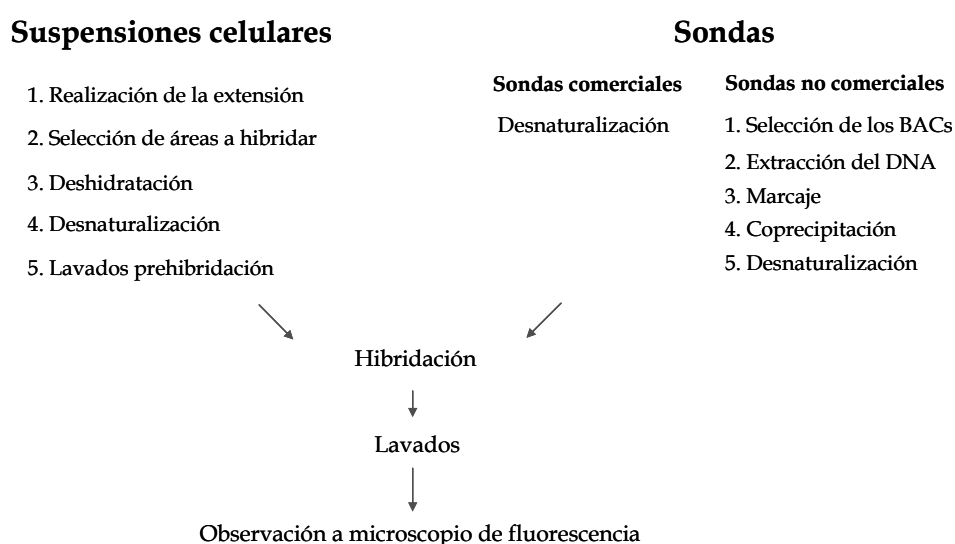


Figura 3. Esquema de trabajo del análisis de FISH.

1.2.1 Material de partida: suspensiones celulares

Los ensayos FISH se realizaron sobre el material sobrante almacenado del análisis citogenético convencional (muestras de sangre periférica y/o médula ósea cultivadas y fijadas en una mezcla metanol:ácido acético 3:1), conservado a -20°C . Antes de realizar la hibridación se realizó una extensión de las suspensiones sobre un portaobjetos. A pesar de la selección inicial, sólo se pudo disponer de material en suficiente calidad y cantidad para realizar los análisis FISH en 34 de los 44 individuos inicialmente previstos.

1.2.2 Sondas *no comerciales*

Como se ha indicado, las sondas *no comerciales* son fragmentos de DNA genómico de tamaño variable, resultado de la fragmentación del genoma y posterior clonado, que han sido utilizados

como herramientas para la secuenciación en el Proyecto Genoma Humano y que se encuentran disponibles en librerías públicas y/o comerciales. Para nuestro estudio, seleccionamos fragmentos de tamaños entre 50 y 300 Kb, clonados en BACs (pBACe3.6 con resistencia a cloranfenicol) y mantenidos en *E. coli*. Estos BACs presentan el inconveniente de su baja tasa de copia, lo que hace que su extracción tenga un rendimiento bajo.

La **Figura 4** representa brevemente el procedimiento llevado a cabo con este tipo de sondas. Una vez extraído el DNA de estos BACs, se procede a su marcaje y precipitación para obtener finalmente una sonda lista para ser hibridada en el material genómico del paciente.

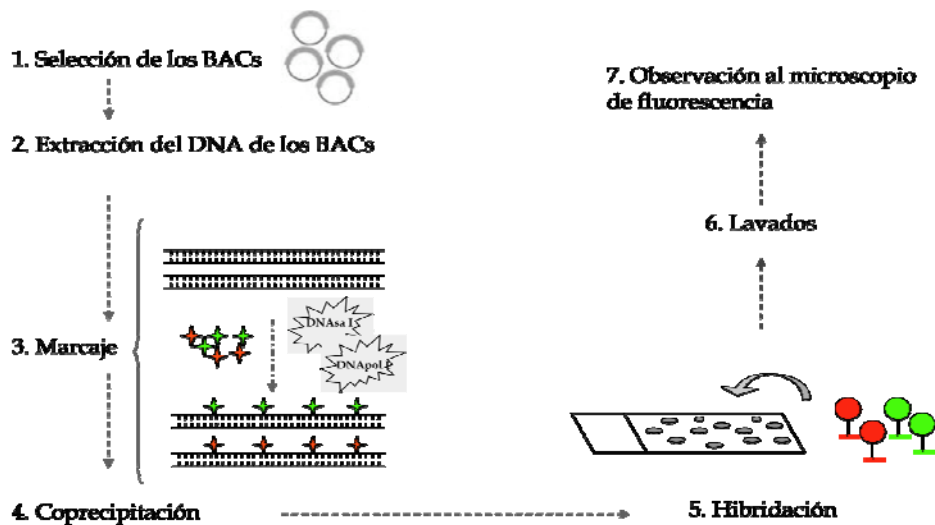


Figura 4. Esquema de las etapas del análisis FISH con sondas no comerciales.

1.2.2.1 Selección de los clones

De manera inicial fue necesario seleccionar los fragmentos que utilizaríamos como sondas. Actualmente, toda la información sobre la secuencia y posición de cada uno de los fragmentos clonados se encuentra disponible en bases de datos públicas, gratuitas y fácilmente accesibles a través de visores de genomas como *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu>) y *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>).

Para cada gen, diseñamos dos tipos de ensayos (A y B) (**Figura 5**). El ensayo A era de tipo rotura (*break-apart*), por lo que escogimos clones que contuvieran fragmentos de DNA que limitaran los genes de interés por ambos extremos y los marcamos con distintos fluorocromos (las sondas 5' en rojo con SO y las 3' en verde con SG). En la mayor parte de los casos, los fragmentos escogidos eran pequeños, por lo que seleccionamos dos clones en cada extremo con objeto de aumentar la intensidad de la señal de hibridación. Este ensayo nos permitiría detectar translocaciones y/o pérdidas o ganancias de material que afectarían a regiones flanqueantes al gen de interés. El ensayo B también fue de rotura, pero formado por un único fragmento que

abría el gen. Este ensayo nos permitiría detectar roturas de éste, deleciones y también posibles amplificaciones. La escasez de material para este y otros proyectos anexos, hizo que este ensayo B únicamente se realizara en los casos en los que obtuvimos resultados anómalos o difíciles de interpretar con el ensayo A.

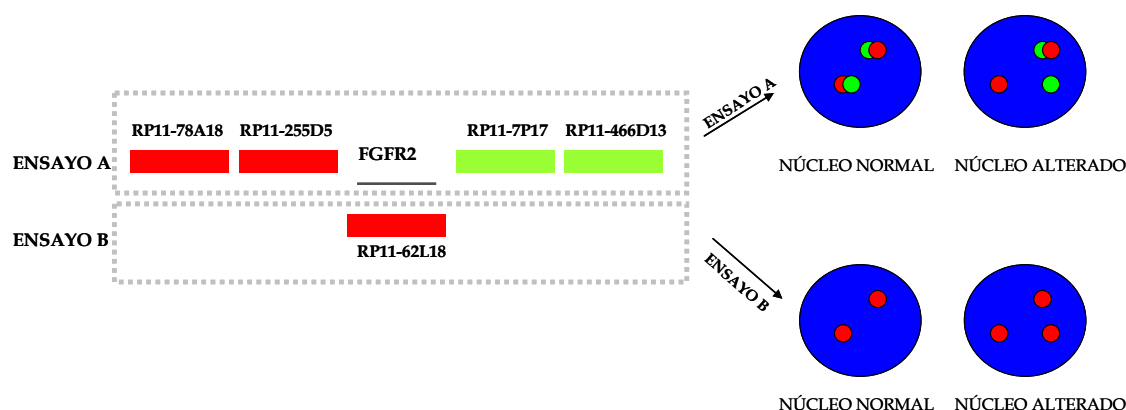


Figura 5. Diseño de los ensayos FISH de *FGFR2*. En el ensayo A empleamos cuatro clones que flanquean el gen, marcando en rojo los situados en el extremo 5' y en verde los del 3'. En caso de que el gen del estudio se encontrara roto (como consecuencia de una translocación) los extremos 5' y 3' estarían alejados, y las señales roja y verde aparecerían separadas. El ensayo B consiste en un único clon (RP11-62L18) que cubre el gen marcado en rojo. En este caso, cualquier resultado diferente de dos señales rojas indica la presencia de una alteración.

Los clones seleccionados para cada uno de los genes (Tabla 2), fueron suministrados por *BACPAC Resources Center* del *Children's Hospital Oakland Research Institute* (Oakland, CA, EE.UU) (<http://www.bacpac.chori.org>) y por *The Wellcome Trust Sanger Institute* (Hixton, Reino Unido).

Tabla 2. Clones seleccionados para los ensayos A y B de FISH:

GEN	POSICIÓN	CLONES ENSAYO A	CLON ENSAYO B
<i>ABL1</i>	9q34	RP11-544A12 SO RP11-643E14 SO--PR11-57C19 SG RP11-7M2 SG	RP11-83J21 SO
<i>ABL2</i>	1q25	RP11-1054P1 SO RP11-346D17SO--PR11-595C2SG RP11-177A2SG	RP11-152A16 SO
<i>FGFR1</i>	8P11	RP11-675F6 SO RP11-118H9 SO---PR11-265K5 SG RP11-90P5 SG	RP11-100B16 SO
<i>FGFR2</i>	10q26	RP11-78A18 SO RP11-255D5 SO--- PR11-7P17 SG RP11-466C13SG	RP11-62L18 SO
<i>FGFR3</i>	4p16	RP11-42F9 SO *----- PR11-262P20 SG	RP11-241P10 SO
<i>FGFR4</i>	5q35	RP11-606E24 SO CTC-340P19 SO---PR11-99N22 SG CTC-549A4 SG	RP11-286C20 SO
<i>SYK</i>	9q22	RP11-80J10 SO RP11-1108P17 SO-PR11-652P7 SG RP11-95G21SG	RP11-21P2 SO
<i>ZAP70</i>	2q2	RP11-1082A11 SO RP11-542D13 SO-PR11-973B20SG RP11-63L6SG	RP11-173M4 SO

* En el caso del gen *FGFR3* solo utilizamos dos clones para el ensayo A, ya que dos de los cuatro clones seleccionados no hibridaron en la posición genómica esperada.

1.2.2.2 Extracción del fragmento de DNA usado como sonda

Los BACs introducidos en *E. coli* se suministran en LB agar (*lysogeny broth*: compuesto por 10 g/L *bacto-tryptone*, 7,5 g/L *bacto-yeast extract*, 10 g/L NaCl a pH 7,5 con 15 g/L de agar

suplementado con 20 µg/mL de cloranfenicol). Los repositorios recomiendan realizar previamente una siembra por agotamiento por estrias en este mismo medio para seleccionar clones aislados, debido a la posibilidad de contaminación con otros clones. Varias de estas colonias se crecieron posteriormente durante toda la noche a 37 °C en LB (líquido, sin agar) con agitación, hasta conseguir una densidad de 5×10^7 células/mL. Parte de estos cultivos se conservaron a -80 °C en 15% de glicerol estéril, ya que probaríamos varios de los clones y escogeríamos para el análisis final el que mostrara una hibridación correcta. A partir del resto del cultivo, procedimos a la extracción del DNA del BAC. Para ello, empleamos el sistema comercial *PhasePrep™ BAC DNA Kit* (Sigma Aldrich Co, St Louis, MO, EE. UU.), basado en una extracción orgánica del DNA y posterior precipitación con etanol, según instrucciones del fabricante. Finalmente comprobamos la cantidad y calidad del DNA extraído en un equipo *Nanodrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE. UU.).

1.2.2.3 Marcaje de las sondas

En el BAC obtenido se encuentra el fragmento de DNA que vamos a utilizar como sonda, complementario a la zona de interés que se pretende estudiar. Esta sonda debe ser marcada con fluorescencia para detectar su hibridación sobre el material de los pacientes. Este marcaje se realizó mediante el método de *nick translation* o “desplazamiento de la mella”, que se basa en la acción de las enzimas DNAsa I y DNA polimerasa I. La DNAsa I actúa inicialmente introduciendo de manera aleatoria roturas (mellas o *nicks*) en los enlaces fosfodiéster internos en una de las cadenas de DNA. Posteriormente, la DNA polimerasa I, con actividad polimerasa 5'→3', incorpora nucleótidos al extremo 3'-OH libre, tomando como molde la hebra complementaria. El resultado final es la síntesis de nuevo DNA en dirección 5'→3' con los nucleótidos suministrados en la reacción, entre los cuales hay uno (dUTP) marcado con un fluorocromo. Inicialmente utilizamos el sistema comercial *Nick Translation Mix for in situ probes* (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). Sin embargo, los resultados con este método de marcaje no fueron satisfactorios, por lo que decidimos emplear el sistema *Nick Translation Kit* (Vysis-Abbott Molecular Inc; IL, EE.UU.), con eficiencias muy superiores. En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

En el ensayo A, marcamos las dos sondas del extremo 5' con dUTP marcado con fluorocromo rojo-naranja (*SO dUTP*, Vysis-Abbott Molecular Inc, IL, EE.UU.) y las dos del extremo 3' con dUTP marcado con fluorocromo verde (*SG dUTP*, Vysis-Abbott Molecular Inc, IL, EE.UU.). Como se ha señalado, decidimos utilizar dos sondas a cada lado del gen a analizar para obtener señales de hibridación más intensas. En el ensayo B, el fragmento de DNA escogido como sonda cubre el gen de interés y se marcó con el fluorocromo rojo-naranja (*SO dUTP*, Vysis-Abbott Molecular Inc IL, EE.UU.), porque proporciona señales más intensas.

1.2.2.4 Coprecipitación de las sondas

Una vez marcada la sonda es necesario resuspenderla en un medio adecuado para la hibridación, para lo cual debe precipitarse previamente. Este proceso nos permite, además, precipitar conjuntamente DNA procedente de distintas sondas con las que se desea realizar una misma hibridación (las cuatro en el caso del ensayo A o sólo una en el caso del ensayo B). A estas mezclas de sondas se añadió COT-*Human DNA* (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), que consiste en DNA humano con una elevada proporción de secuencias repetitivas. Este DNA, permite bloquear estas secuencias en la hibridación, impidiendo la unión inespecífica de las sondas a ellas. El proceso se realizó mezclando 200 ng de cada una de las sondas que se desean coprecipitar con 5 µL de COT-*Human DNA* (1 mg/mL). A esta mezcla se añadió 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M (pH 5,5) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se conservó 90 min a -80°C para favorecer la precipitación completa, se centrifugó, lavó y secó. El sedimento obtenido fue resuspendido en 25 µL de la mezcla de hibridación (*master-mix* 60%) compuesta por: 10% (p/v) dextran sulfato (PM=500.000, D8906, Sigma Aldrich Co, St Luis, MO, EE.UU), 60% (v/v) formamida (grado biología molecular, Calbiochem-Merck Biosciences, Darmstadt, Alemania) y 2 x SSC (0,3 M NaCl y 0,03 M citrato sódico dihidratado a pH 7,0). Para lograr a completa resuspensión, la mezcla se agitó durante 45 min en un agitador de mesa a temperatura ambiente y se conservó a -20 °C hasta su utilización, para favorecer el estado parcialmente desnaturalizado de la sonda.

Tanto el marcaje como la coprecipitación se realizaron en penumbra, sin luz directa, ya que ésta puede provocar una disminución en la intensidad de la señal de los fluorocromos.

1.2.3 Sondas comerciales

Aunque inicialmente diseñamos sondas *no comerciales* para todos los genes, los resultados de algunos de los ensayos hicieron que finalmente utilizáramos sondas *comerciales* para los genes *ABL2* (*LSI 1p36/LSI 1q25 and LSI 19q13/19p13 Dual Color Probe*, Cat No 32-231004 Vysis, Abbot Molecular, IL, EE. UU.), *ABL1* (*LSI BCR/ABL ES Dual Color Translocation*, Cat No 32-191022 Vysis, Abbot Molecular, IL, EE. UU.) y *ETV6* (*LSI ETV6-TEL Dual Color Breakapart Probe*, Cat No 32-231034 Vysis, Abbot Molecular, IL, EE. UU.). La sonda de *ABL1* permitió además excluir definitivamente la fusión *BCR-ABL1*, previamente analizada mediante cariotipo y RT-PCR. La preparación de estas sondas se realizó según instrucciones del fabricante, pero diluidas con *cDenHyb-2* (Cat. No. D002, InSitus Biotechnologies, Alburquerque, NM, EE. UU.).

1.2.4 Hibridación

La hibridación consiste en el emparejamiento de las sondas ya marcadas con sus secuencias complementarias en el genoma del paciente. Este proceso se realizó sobre las suspensiones de

las células fijadas sobrantes del análisis citogenético convencional, una vez extendidas sobre un portaobjetos con ayuda de una pipeta de vidrio de punta fina. Empleando un microscopio invertido de contraste de fases (*Nikon Eclipse TS100*, Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japón), se comprobó en todos los casos la calidad de la extensión y se seleccionaron las zonas donde hubiera mayor densidad de material y proporción de metafases.

Antes de llevar a cabo la desnaturalización del material del paciente, que realizamos separadamente de la desnaturalización de la sonda, la extensión se sometió a un tratamiento de deshidratación. Para ello, realizamos una serie de lavados de 2 min en alcoholes de concentración creciente (70-85-100%), que favorecen la eliminación de los lípidos de membrana nuclear y su permeabilización. Posteriormente, las extensiones se secaron en una placa a 40 °C. Tras ello, se añadió 100 µL de formamida al 70% en 2 x SSC (PH 7.0), se cubrieron con un cubreobjetos de 24 x 60 mm y se colocaron sobre una placa a 75 °C durante 2 min, para asegurar su completa desnaturalización. A continuación, se retiró el cubre con la formamida y la extensión se volvió a lavar en alcoholes de concentración creciente (70-85-100%), previamente enfriados a -20 °C. Por último, la extensión se secó a 40 °C. Este tratamiento frena la acción de la formamida y ayuda a preservar mejor la morfología de los núcleos y de los cromosomas metafásicos.

De manera simultánea a la desnaturalización de la extensión, se desnaturalizó también la sonda o mezcla de sondas a utilizar (*comerciales* y *no comerciales*), introduciéndola/s en un baño a 75 °C durante 10 min. Transcurrido ese tiempo, la sonda se añadió a un cubreobjetos de 12 mm de diámetro que se colocó sobre la región de la extensión seleccionada, una vez desnaturalizada y seca. La cantidad de sonda fue directamente proporcional al área de hibridación (en una proporción de 10 µL de la mezcla para un área de 24 x 24 mm). Para evitar la posterior evaporación de la sonda, la unión cubreobjetos-portaobjetos se selló con adhesivo de caucho (REMA tip.tp, Munich, Alemania). La preparación obtenida se colocó a 37°C en una cámara húmeda durante 24-48 h.

1.2.5 Lavados

Tras la hibridación, son necesarios una serie de lavados que eliminen las uniones inespecíficas de la sonda. Su restrictividad depende de la concentración del agente desnaturalizante, la fuerza iónica del medio, la concentración de detergente y la temperatura. Todos estos parámetros varían en función del tipo de sonda y generalmente son distintos para las sondas *comerciales* y las *no comerciales*.

En el caso de las sondas *no comerciales*, las preparaciones se lavaron dos veces en 0,1 x SSC y una vez en 0,4 x SSC, 5 min cada uno en un baño a 60°C. En el caso de las sondas *comerciales*, los lavados se realizaron a 73°C en tiempos de 2 min, añadiendo 2,4% y 0,9% de IGEPAL® CA-630

(Sigma Aldrich Co, St Louis, MO, EE.UU.) al 0,4 x SSC y al 0,1 x SSC, respectivamente. Este compuesto es un detergente que ayuda a eliminar las uniones inespecíficas. Finalmente, se lavó con 2 x SSC para eliminar los restos de detergente.

Previamente a la visualización de los resultados, fue necesario teñir la extensión con un colorante de contraste. En el caso de las sondas *no comerciales* se utilizó DAPI I y en el caso de las *comerciales* DAPI II (ambos de Vysis-Abbott Molecular Inc, IL, EE.UU). El DAPI se intercala en el DNA tiñéndolo de azul bajo una luz de longitud de onda determinada (aproximadamente 460 nm) y permite diferenciar los contornos nucleares y excluir el fondo. La preparación resultante se conservó a 4 °C (mínimo 30 min) hasta su observación.

1.2.6 Observación a microscopio, valor umbral del ensayo y análisis de los resultados

La preparación obtenida se observó en un microscopio de fluorescencia *Nikon Eclipse 80i* (Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japón), dotado de filtros individuales para el espectro de luz azul (DAPI I, Ex340-380, DMA400, BA 435-485), roja (TRITC, Ex540/25, DM565, BA605/55), verde (FITC, Ex465-495, DM505, BA 515-555) y un doble filtro rojo/verde. La captura de las imágenes se realizó mediante una cámara CCD (*charge-couple-device*) acoplada al microscopio. Para el tratamiento y análisis de las imágenes se utilizó el programa informático *In situ Imaging System* (ISIS) v 5.2.2 (Metasystems, Altlussheim, Alemania). Para cada uno de los ensayos se analizaron entre 150-200 núcleos en interfase por muestra y un número variable de metafases (en el caso de que existieran).

Como se ha mencionado anteriormente, previamente al análisis de las muestras de los pacientes fue necesario validar cada uno de los ensayos (*comerciales* y *no comerciales*), empleando material obtenido de individuos sanos. Esto permitió comprobar que las sondas marcadas hibridaban en la posición adecuada y optimizar individualmente algunas de las condiciones experimentales (fundamentalmente lavados y cantidad de sonda a utilizar). Además, se determinó el valor umbral (*cut-off*) de cada uno de ellos, que es el número aproximado de núcleos en interfase que presenta un patrón de hibridación anormal en el análisis de un individuo sano, evitando los falsos positivos del ensayo (Alpar, 2008). Para ello, analizamos 200 núcleos en interfase de 3 individuos sanos distintos, contamos el número de núcleos con patrón anómalo y establecimos como valor umbral la media de esos valores ± 3 DE.

2. Análisis molecular

2.1 Extracción y tratamiento de ácidos nucleicos

2.1.1 Obtención de células mononucleadas

Las muestras de sangre periférica y/o médula ósea extraídas de los pacientes incluidos en estudio y tratadas con EDTA y/o heparina, fueron recogidas por el personal del Servicio de Análisis Genéticos del Departamento de Genética de la Universidad de Navarra. Previamente a la extracción de los diferentes ácidos nucleicos para los análisis moleculares se separaron las células mononucleadas (monocitos y linfocitos) o PBLs (*peripheral blood lymphocytes*), mediante dilución 1:1 en suero fisiológico (NaCl 0.9% p/v) y adición del mismo volumen de Histopaque® (Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO, EE. UU). Este reactivo es una solución de polisacarosa y diatrizoato sódico ajustada a una densidad de $1,077 \pm 0,001$ g/mL, que facilita la separación de estas células, que fueron utilizadas directamente o conservadas a -80 °C.

2.1.2 Extracción de DNA genómico a partir de células mononucleadas

A partir de las células mononucleadas se obtuvo el DNA genómico (DNAg) de cada uno de los pacientes del estudio. Para ello, se utilizó el reactivo DNAzol® (Invitrogen-Life Technologies Ltd, Paisley, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se comprobó la cantidad y calidad del DNA extraído en un equipo Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE. UU). Además del DNAg de los pacientes, mediante este sistema se extrajo material de los 20 individuos sin enfermedad tomados como control.

2.1.3 Amplificación del genoma completo

Dado el número previsto de análisis moleculares a realizar a partir del DNA obtenido, procedimos a amplificarlo previamente mediante WGA (*whole genome amplification*). Para ello, utilizamos el sistema comercial *Illustra Genomiphi V2 DNA Amplification Kit* (GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, Reino Unido), que contiene la polimerasa del fago *Phi29*. La reacción se llevó a cabo según las instrucciones facilitadas por el fabricante. Para comprobar la eficiencia de la amplificación del DNAg realizamos electroforesis en geles de agarosa al 0.5% (p/v) con bromuro de etidio 50 µg/mL. En función de la cantidad de DNA observada en el gel de agarosa, el producto obtenido se diluyó con agua destilada (diluciones 1:1 a 1:3).

Todas las pruebas que hemos realizado y otras publicadas (Sato *et al*, 2004; Pan *et al* 2008), muestran que las alteraciones detectadas en la muestra amplificada de esta manera se encuentran presentes también en la muestra original. A pesar de todo, cualquier alteración

presumiblemente patogénica ha sido comprobada de manera independiente sobre muestra de DNA original sin ser sometida a WGA.

2.1.4 Extracción del RNA de células mononucleadas

Para analizar la expresión de un gen es necesario medir la cantidad de moléculas de RNAm transcritas que existen dentro de la célula. Por tanto, fue necesario también extraer RNA de los PBLs almacenados a -80°C. Para ello se empleó *TRIzol*® (Invitrogen-Life Technologies Ltd, Paisley, Reino Unido), con material libre de RNAsas y en un espacio destinado al efecto. El protocolo seguido fue también el indicado por el fabricante. La cantidad de RNA extraído fue comprobada en un equipo *Nanodrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.).

2.1.5 Tratamiento con DNAsa del RNA

El RNA extraído fue tratado con DNAsas para eliminar posibles contaminaciones con DNA genómico que pudieran quedar en la muestra y que pueden interferir en los análisis de cuantificación de la expresión génica. Para ello, realizamos un tratamiento con DNAsa I (*RQ1 RNase-Free DNase*, Promega Corp, Madison, WI, EE.UU), que degrada tanto las hebras de DNA de doble cadena como las de cadena simple. Las condiciones fueron las indicadas por el fabricante.

2.2 Cromatografía líquida de alta resolución desnaturizante (dHPLC)

La dHPLC (*denaturing high-performance liquid chromatography*), es una variante de la cromatografía líquida en fase reversa desarrollada en 1995 y empleada para la búsqueda sistemática de mutaciones. Existen numerosas publicaciones que muestran la utilidad de esta técnica en la detección de mutaciones en varias enfermedades (Underhill *et al*, 1997; Liu *et al*, 1998; Jones *et al*, 1999; Roberts *et al*, 2001; Hung *et al*, 2007). Este método permite detectar cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos con una sensibilidad superior al 10% (capaz de detectar al menos una molécula mutante entre cada diez normales). Esta sensibilidad, junto a su capacidad de procesamiento semiautomático, la hace especialmente indicada para este tipo de estudios en muestras tumorales (Underhill *et al*, 1997). Los ensayos mediante dHPLC, se han realizado con un equipo *WAVE®4500HT* de Transgenomic Ltd (Omaha, NE, EE.UU.) con una columna *DNASepHT*.

La detección de los cambios en la secuencia de nucleótidos se basa en la capacidad diferente de elución a lo largo de una columna sometida a gradiente desnaturizante que presentan las moléculas de DNA con distinta composición de nucleótidos. La fase estacionaria de la columna, inerte física y químicamente, está compuesta por partículas de poliestireno-divinilbenceno de 2-

3 μm de diámetro, eléctricamente neutras e hidrofóbicas. El DNA, cargado negativamente debido a los grupos fosfato de su cadena, no puede adsorberse a la matriz de la columna, pero sí lo hace junto a una molécula de carga positiva (acetato de trietilamonio, TEAA). La elución de las moléculas de DNA adsorbidas, se consigue haciendo pasar por la columna acetonitrilo como fase móvil, que provoca la separación de las moléculas bicatenarias de DNA de la matriz. Dicha elución puede ser detectada por absorción de luz ultravioleta a 254 nm, mediante un detector situado en la salida de la columna. A temperaturas inferiores a 50°C, la elución depende únicamente de la longitud del fragmento de DNA mientras que, a temperaturas superiores a 50 °C, se produce una desnaturalización parcial de los fragmentos y la elución depende también de su T_m (*melting*, fusión) (Oefner & UnderHill, 1995). De esta manera, el tamaño y composición de un fragmento hacen que, a una determinada temperatura cercana a su T_m , éste eluya en un determinado momento tras someterlo a un gradiente creciente de acetonitrilo. La presencia de cambios en su secuencia, aunque sean de un sólo nucleótido, modifican la T_m del fragmento, haciendo que muestre tiempos y perfiles de elución distintos.

Las diferencias en la elución de los fragmentos con secuencia distinta se incrementan cuando se generan moléculas heterodúplex. Si en una mezcla tenemos un mismo fragmento con dos secuencias distintas (normal y mutante), su desnaturalización y posterior renaturalización progresiva generará cuatro tipos de moléculas, dos homodúplex (formadas por dos hebras totalmente complementarias) y dos heterodúplex (formadas por dos hebras no complementarias en su totalidad por la presencia de un cambio de secuencia en una de ellas). Estas moléculas heterodúplex muestran diferencias importantes en los tiempos de elución respecto a las moléculas homodúplex (Xiao & Oefner, 2001; Roberts *et al*, 2001). La desnaturalización del DNA a más de 50°C es más extensa en los heterodúplex que en los correspondientes homodúplex, que tienen las bases completamente emparejadas. Por ello, los heterodúplex se retienen menos y eluyen antes que los homodúplex (**Figura 6**). Por tanto, para analizar una muestra en la que puede haber moléculas de secuencia normal y mutante (como una muestra tumoral), será conveniente someterla previamente a varios ciclos de desnaturalización y renaturalización, que separen las hebras y las mezclen, favoreciendo la formación de moléculas heterodúplex, además de las homodúplex.

La sensibilidad de la detección de posibles cambios de secuencia, depende de la temperatura de análisis, ya que ésta determina el tiempo de retención del DNA de doble hebra en la columna. Para seleccionar la temperatura óptima para el análisis de cada fragmento, se utiliza un algoritmo matemático, basado en la secuencia y longitud del fragmento amplificado, que predice la temperatura a la que el 50% del mismo permanece sin desnaturalizar (Kosaki *et al*, 2005). Este algoritmo está implementado en el programa informático suministrado en el equipo (*Navigator™ Software v1.7.0*, Transgenomic Ltd, Omaha, NE, EE. UU.). En varios casos fue

necesario realizar el análisis a varias temperaturas, para asegurarnos de que éramos capaces de detectar cualquier cambio de secuencia que afectara a la región del fragmento de interés.

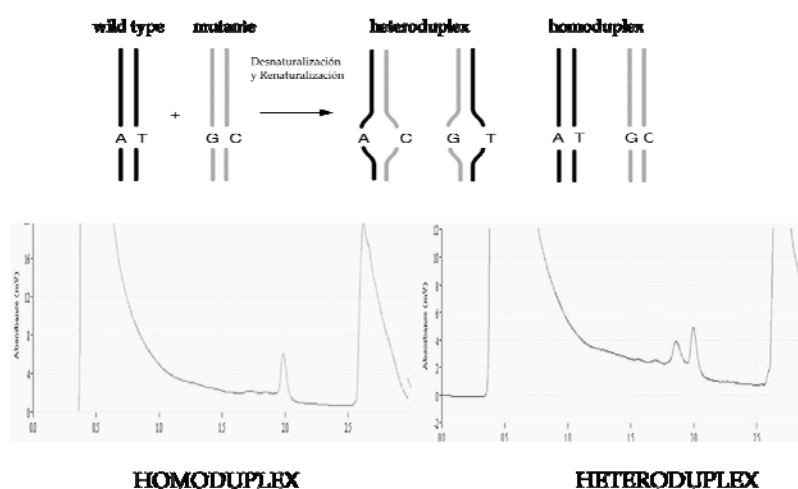


Figura 6. Cuando una muestra presenta un cambio en una única base en algunas de las moléculas presentes (por ejemplo, por una mutación somática), los sucesivos ciclos de desnaturalización y renaturalización crearán moléculas heterodúplex (en las que una base no empareja correctamente). Estas moléculas, muestran un perfil de elución a través de la columna diferente de las moléculas homodúplex, reflejado en la aparición de uno o varios picos adicionales en el cromatograma.

Otra condición experimental crítica es el gradiente aplicado de agente desnaturalizante (acetronitrilo) en acetato de trietilamonio (TEAA). Este gradiente se crea mediante la mezcla automática de dos soluciones distintas: *buffer A* (0.1 M de TEAA) y *buffer B* (0.1 M de TEAA y 25% de acetronitrilo). El programa informático suministrado con el equipo también calcula de manera automática la proporción y mezcla de estas soluciones, en función de las características del fragmento analizado (Roberts *et al*, 2001).

Para el análisis de las muestras fue necesario realizar previamente un diseño adecuado de las regiones del gen a estudiar (en nuestro caso, los exones de interés). Para cada uno de ellos, se diseñaron cebadores para su amplificación mediante PCR y se comprobó que el fragmento teóricamente amplificado tuviera un perfil de desnaturalización adecuado. Posteriormente, se optimizó cada una de las amplificaciones y se validaron experimentalmente las condiciones del análisis mediante dHPLC (temperatura/s y condiciones de gradiente predichas por el programa informático), que en algunos casos fueron levemente modificadas.

2.2.1 Diseño de cebadores para la amplificación de los fragmentos

Las secuencias genómicas de referencia de los genes objeto de estudio, se obtuvieron a partir de las bases de datos públicas (*Ensembl*, <http://www.ensembl.org>). En base a estas secuencias, seleccionamos los exones a analizar y diseñamos cebadores para su amplificación por PCR,

mediante el programa informático *Primer3*, desarrollado por el *Whitehead Institute* (MIT, EE.UU.) (Rozen & Skaletsky, 2000). En todos los casos, el fragmento amplificado contenía el exón completo, ya que los cebadores se situaron en los intrones adyacentes. Los fragmentos amplificados se encontraban en un rango de entre 200 y 430 pb de tamaño, adecuado para el análisis mediante dHPLC.

Como se ha indicado, mediante esta técnica se analizaron los exones funcionalmente más importantes de los genes de las familias de TKs Abl, Syk, Fgfr, y del gen *EGFR*, además de los genes de la familia Cbl en las muestras del grupo de 44 pacientes inicialmente previstos. Además, dados los resultados obtenidos, algunos de los exones más importantes de los genes de la familia Cbl se analizaron en una serie mayor de pacientes. En concreto, estos exones se analizaron en un total de 377 NMPCs (145 muestras de pacientes V617F/JAK2 negativas y 232 muestras de pacientes V617F/JAK2 positivas).

En el caso de los genes CTK (familias Abl y Syk), se seleccionaron los exones que codifican los dominios de interacción con proteínas (SH2 y SH3) y el dominio TK. En el caso de los genes RTK (familia Fgfr y gen *EGFR*), seleccionamos los exones codificantes del dominio transmembrana (TM) y el TK, ya que son las regiones funcionalmente más importantes y más frecuentemente alteradas (**Figura 7**).

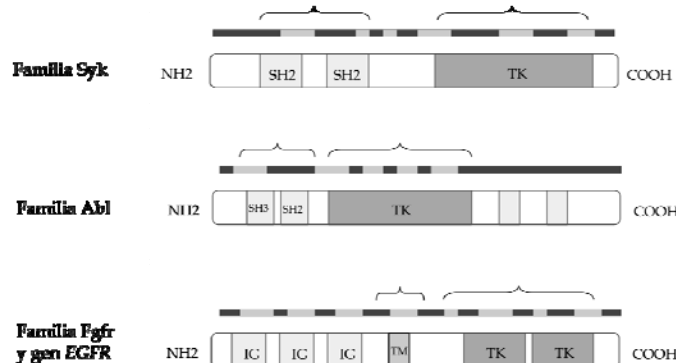


Figura 7: Regiones seleccionadas para el análisis de las posibles mutaciones en los distintos genes TK. En el caso de las CTKs (familias Syk y Abl), seleccionamos aquellos exones codificantes de los dominios de interacción con proteínas (SH2 y SH3) y del dominio TK. En las RTKs (familia Fgfr y *EGFR*) se seleccionaron los exones codificantes de los dominios TM y TK. En el caso de los genes de la familia Cbl (*C-CBL*, *CBL-B* y *CBL-C*) analizamos todos los exones codificantes.

En el caso de los genes de la familia Cbl, los datos inicialmente publicados por algunos grupos (Grand *et al*, 2009; Sanada *et al*, 2009; Ogawa *et al*, 2010; Kales *et al*, 2010) indicaban que las mutaciones detectadas se encontraban en el dominio *RING-finger*. Este dominio corresponde a los exones 8 y 9 de *C-CBL*, 9 y 10 de *CBL-B* y 7 y 8 de *CBL-C*. Sin embargo, dado que los análisis realizados eran escasos y se desconocía la posible implicación patogénica de la presencia de

alteraciones en otras regiones de estos genes, decidimos diseñar cebadores para analizar todos los exones codificantes de los genes de esta familia.

Además, para validar las condiciones experimentales de cada uno de los ensayos se crearon, de manera artificial, fragmentos con una mutación en cada uno de los casos. Para ello se introdujo un cambio de una base en uno de los cebadores (directo o reverso dependiendo del perfil de desnaturalización teórico), que se utilizó para la amplificación de un DNA control (de un individuo sano). La detección de un perfil de elución distinto, nos permitió asegurar que las condiciones del ensayo (gradiente y temperatura) eran las adecuadas (**Figura 8**). En los **Anexos 3** (genes TK) y **4** (genes Cbl), se muestran los cebadores y temperaturas empleados para el análisis. Todos los cebadores fueron sintetizados por Sigma-Genosys (Haverhill, Reino Unido).

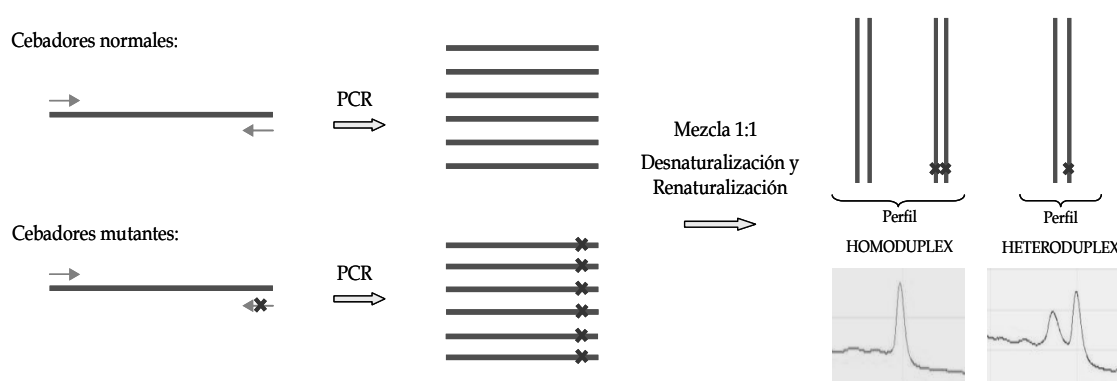


Figura 8: Creación del control mutante. Para cada fragmento hemos diseñado tres cebadores distintos: sentido, antisentido y mutante (sentido o antisentido en función del perfil de desnaturalización). La sustitución en una de las bases del cebador (mutante), hace que los productos generados presenten un cambio en la secuencia. La detección de esta alteración tras generar moléculas heterodúplex (mezclando ambos tipos de productos y sometiendo a ciclos de desnaturalización y renaturalización), permitió optimizar las condiciones del ensayo (temperatura y gradiente de análisis). La detección de una diferencia en el perfil de elución de los homo y heterodúplex, indicaba que las condiciones seleccionadas eran las adecuadas para dicho fragmento. En algunos casos, fue necesario modificar las condiciones (temperaturas) predichas por el programa informático suministrado con el equipo.

2.1.3 Amplificación por PCR y formación de moléculas heterodúplex

Las reacciones de amplificación mediante PCR se llevaron a cabo empleando termocicladores *Mastercycler®* (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) con *AmpliTaq® Gold DNA polymerase* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU). Las condiciones fueron una desnaturalización inicial de 7 min a 95°C, 35 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 57°C-59°C (según el fragmento, **anexos 3** y **4**) y 1 min a 72°C y un ciclo de extensión final de 10 min a 72°C. En algunos casos, fue necesario modificar las proporciones de MgCl₂ entre 1 y 2.5 mM.

Previamente al análisis por dHPLC, fue necesario comprobar que los productos generados en la amplificación por PCR tenían la calidad y tamaño adecuado. Para ello, se sometió a una fracción

de este producto a electroforesis en gel de agarosa entre 1 y 1,8 % (p/v) (Agarosa D-1 de baja EEO, Pronadisa-Laboratorios Conda SA, Madrid, España) con bromuro de etidio 50 µg/mL en tampón TBE 1x (8,9 mM Tris, 8,9 mM ácido bórico, 2 mM EDTA). El marcador de peso molecular de referencia fue en todos los casos *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen-Life Technologies, Paisley, Reino Unido). Tras la electroforesis los geles fueron visualizados y fotografiados con el sistema *ChemiDoc XRS* equipado con el programa *Quantity One®* v 4.6.3 (Bio-Rad Labs, Hercules, CA, EE.UU).

Una vez obtenida la amplificación en la calidad y cantidad adecuada, los productos se sometieron a una desnaturalización de 5 min a 95°C y un enfriamiento progresivo hasta 45°C, donde se incubó 30 min. Este procedimiento permite crear las posibles moléculas heterodúplex normal-mutante (en el caso de que éstas últimas existan), para su detección por dHPLC. Dado que nuestro interés se centraba en buscar mutaciones somáticas, se consideró que en todos los casos existirían moléculas de secuencia normal en la muestra, en mayor o menor proporción.

2.1.4 Predicción y validación de las temperaturas del análisis dHPLC

Como se ha señalado, tanto las condiciones de temperatura como del gradiente a aplicar son predichas por el programa informático suministrado por el equipo (*Navigator™ Software v1.7.0*, Transgenomic Ltd, Omaha, NE, EE. UU.). Para ello, el programa tiene en cuenta la longitud y composición de nucleótidos en cada caso y se recomienda que en esta temperatura la proporción de moléculas no desnaturalizadas de ese fragmento (fracción helical) se encuentre entre el 40 y el 95% (**Figura 9**). Esto hizo que, en algunos casos, fuera necesario aplicar varias condiciones experimentales (temperaturas) a un mismo fragmento para ser capaces de analizarlo con seguridad.

En todos los casos, las condiciones se validaron de manera experimental con controles normales y mutantes creados artificialmente (**Figura 10**). Esta comprobación se realizó también a $\pm 0.5^\circ\text{C}$ de la temperatura escogida, para comprobar que esta detección era robusta y evitar problemas en caso de posibles fluctuaciones de la temperatura del horno en el cual se encuentra situada la columna. Una vez validadas las condiciones para el análisis de todos los fragmentos, procedimos a analizar las muestras de los distintos pacientes.

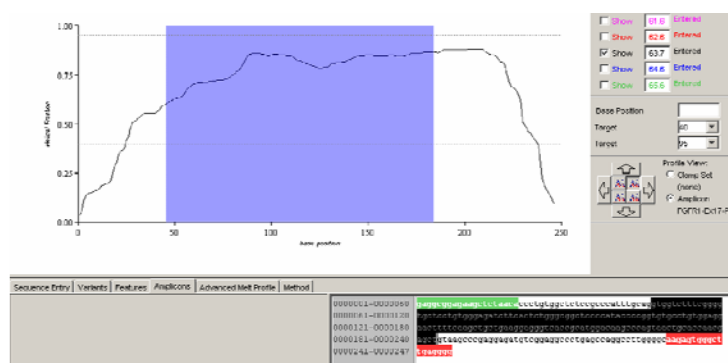


Figura 9. El programa *Navigator™ Software v1.7.0* (Transgenomic Ltd, Omaha, NE, EE. UU.) nos ofrece en la parte inferior una visión de la secuencia a amplificar, en azul la región correspondiente al exón (exón 17 de *FGFR1*, en este caso) y en rojo y verde las secuencias de los cebadores. En la parte superior nos muestra el perfil de desnaturalización del fragmento. Las líneas de puntos corresponden a los límites de la fracción helical (40 y 95 %) a esa temperatura. Como la región de nuestro exón (sombreada en azul) se encuentra entre esos valores límite, esa temperatura (63.7°) sería adecuada para detectar cualquier cambio de secuencia en el exón.

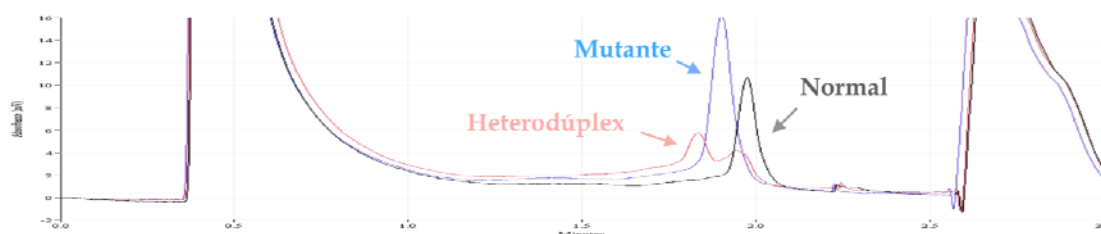


Figura 10: Perfiles de elución obtenidos en la validación del exón 25 de *EGFR*. Perfiles de los controles normales (negro) y mutantes (azul) por separado (homodúplex). Perfil de elución del heterodúplex (rosa), formado por la mezcla producto normal:mutante (proporción 1:1).

2.1.5 Análisis de las muestras

Tras la amplificación de las muestras mediante PCR, se llevó a cabo el análisis dHPLC a la/s temperatura/s específica/s y validada/s para cada uno de ellos. La observación de perfiles de elución distintos indicarían la presencia de un cambio en la secuencia de estos fragmentos. El programa *Navigator™ Software v1.7.0* (Transgenomic Ltd, Omaha, NE, EE.UU.), permite analizar de manera semiautomática estos perfiles, agrupándolos en función de sus tiempos de elución. Tras este agrupamiento se seleccionaron dos muestras al azar de cada uno de los perfiles, para su análisis mediante secuenciación (*Secugen*, Madrid, España). Esto nos permitiría conocer los cambios responsables de las diferencias en el perfil de elución. Previamente, los productos amplificados se purificaron mediante el sistema *Montage-PCR 25000* (Millipore Corp, Billerica, MA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones marcadas por el fabricante. Los resultados de la secuenciación se analizaron mediante el programa informático *Mutation Surveyor* (versiones 2.51 y 3.10) (SoftGenetics LLC, State College, PA, EE.UU.), comparándolas con la secuencia genómica de referencia (**Figura 11**). Para todos los cambios detectados se consultó si

estaban descritos como una variante poblacional en la base de datos *dbSNP* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

En los fragmentos para los cuales observamos perfiles de elución distintos, analizamos también un conjunto de 20 muestras procedentes de individuos sin enfermedad (controles), con objeto de comprobar si los cambios detectados eran variantes poblacionales no descritas. Además, esto nos permitiría estudiar (aunque de manera muy preliminar ya que los grupos de muestras eran muy pequeños), si estas variantes se encontraban distribuidas de manera diferente en ambos grupos (pacientes y controles). En total, se llevaron a cabo 18.060 análisis de dHPLC.

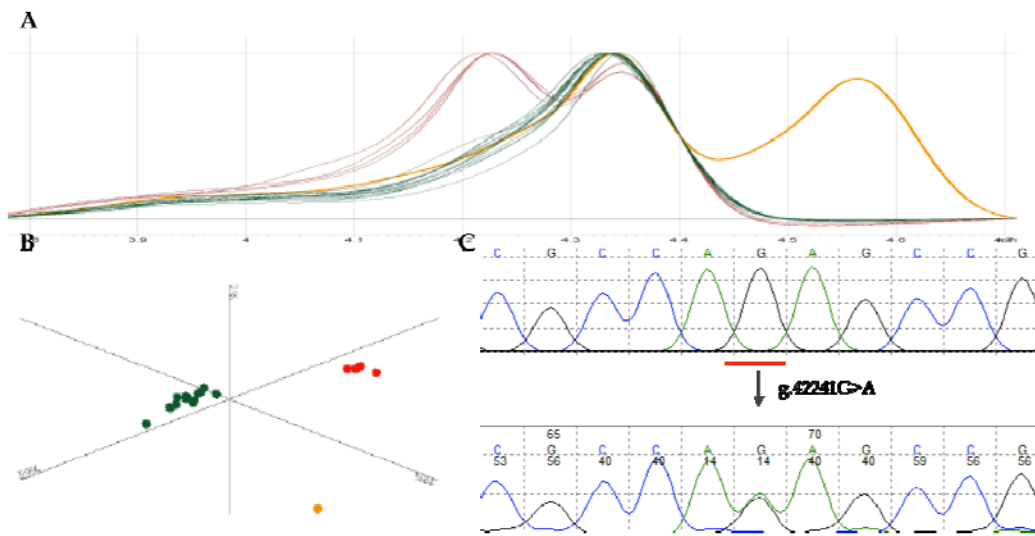


Figura 11: A) Perfiles de elución obtenidos en el análisis del exón 2 de SYK. B) El programa *Navigator™ Software v1.7.0*, Transgenomic Ltd, Omaha, NE, EE. UU.) representa las muestras agrupadas en dos perfiles (rojo y verde), además del heterodúplex control (naranja). C) Imagen obtenida con *Mutation Surveyor* (SoftGenetics LLC, State College, PA, EE.UU.). La reacción de secuenciación muestra que el cambio observado en el análisis dHPLC es debido a la presencia, en heterocigosis, del polimorfismo g.42241G>A (rs35758162).

2.1.6 Análisis estadístico de los resultados obtenidos por dHPLC

Durante los últimos años, diferentes estudios han demostrado que la presencia de ciertas variantes polimórficas podrían contribuir al desarrollo de determinadas enfermedades (Pastinen *et al*, 2006). En concreto, se han descrito variantes de este tipo en genes TK que podrían estar asociadas a una mayor predisposición a desarrollar neoplasias mieloproliferativas (Bange *et al*, 2002; Schnittger *et al*, 2006; Hunter *et al*, 2007; Pardanani *et al*, 2008; Tomasson *et al*, 2008; Jones *et al*, 2009). Por ello, aunque los grupos de muestras y controles eran muy pequeños como para obtener conclusiones definitivas, decidimos llevar a cabo un estudio estadístico de las variantes detectadas. Esto nos podría indicar, de manera preliminar, una posible asociación con el desarrollo de la enfermedad, que debería ser comprobada posteriormente en un grupo mayor de muestras de pacientes y controles normales.

Para ello, en primer lugar, calculamos las frecuencias alélicas y genotípicas de cada una de las variantes detectadas. A continuación, para comprobar el correcto genotipado de las muestras, determinamos si el grupo control (representante de la población general) se ajustaba al equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) mediante la herramienta *SNPStats* (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>; Iniesta, 2005; Sole, 2006) que utiliza una prueba de χ^2 con un grado de libertad. El equilibrio de HW determina que, si la transmisión de alelos de los progenitores a los descendientes es aleatoria, la probabilidad de observar una combinación de alelos concreta (genotipo) depende del producto de las frecuencias de cada uno de los alelos que lo forman.

En segundo lugar, se compararon las frecuencias alélicas del grupo de pacientes *vs* el grupo de controles. Para aumentar el tamaño de la muestra, en un segundo análisis se compararon las frecuencias alélicas del grupo de pacientes *vs* grupo de controles, sumando los datos de poblaciones caucásicas europeas depositados en *dbSNP* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) (controles + datos de *dbSNP*). Esta comparación entre el grupo de pacientes y controles, se realizó mediante una prueba exacta de Fisher 2 x 2 de dos colas, mediante la herramienta <http://statpages.org/ctab2x2.html>. Con esta herramienta calculamos también el cociente de verosimilitudes (OR, *Odds Ratio*) y el riesgo relativo (RR, *Relative Risk*), que relaciona la presencia de un determinado alelo con la enfermedad.

En tercer lugar, comparamos las frecuencias genotípicas entre los grupos de pacientes *vs* controles por un lado y pacientes *vs* controles con los datos de *dbSNP* por otro. Para ello se realizaron pruebas de contingencia 2 x 3 con dos grados de libertad con la herramienta <http://www.webcalculator.co.uk/statistics/x2f91.htm>.

2.1.7 Efecto en el ajuste (*splicing*) de los cambios detectados

Existen numerosos estudios realizados en los últimos años que demuestran que cambios de secuencia con/sin efecto en el aminoácido codificado o situados en intrones pueden tener un efecto importante en el proceso de ajuste (corte y empalme de exones) o *splicing*. Cuando los cambios implican sitios de ajuste, sitios de ramificación (*branch*) o sitios potenciadores o silenciadores de este proceso (Desmet *et al*, 2009), pueden alterar el producto proteico y contribuir así al desarrollo de enfermedad (Pagani & Baralle, 2004).

Este posible efecto se analizó *in silico* para cada una de las variantes encontradas (tanto SNPs como otros cambios no descritos) con *Human Splicing Finder* (HSF, <http://www.umd.be/SSF/>). Ésta es una herramienta informática que predice con fiabilidad el efecto de los cambios de secuencia en el proceso de ajuste y ha sido validada por sus creadores usando una serie de 118 mutaciones (83 intrónicas y 35 exónicas) de efecto conocido (Desmet *et al*, 2009).

2.1.8 Análisis de la delección de C-CBL

Recientemente se ha descrito que C-CBL puede sufrir diversas delecciones comprendidas entre los aminoácidos 359-477 (dominio *RING finger*, exones 8 y 9) de efecto oncogénico (Calligiuri *et al*, 2007; Abbas *et al*, 2008; Slape *et al*, 2008; Reindl *et al*, 2009; Loh *et al*, 2009; Matsuda *et al*, 2010). Dado que nuestro diseño del análisis mediante dHPLC no permitía detectar estas alteraciones (en el caso de que se encontrara en heterocigosis, sólo detectaríamos las hebras de DNA correspondientes al alelo normal), diseñamos un ensayo de PCR para amplificar un fragmento comprendido entre el exón 7 y el intrón 9 (Ceb-e7Fw: 5'-TCCTGATGGACGAAATCAGA-3'; Ceb-i9-Rv: 5'-CTCACAATGGATTTTGCCAGT-3'). El fragmento amplificado tendría un tamaño de 989 pb en el caso de que C-CBL se encontrara intacto y menor si hubiera una delección. Las condiciones de amplificación por PCR y electroforesis posterior fueron las mismas a las indicadas anteriormente.

2.2 PCR cuantitativa a tiempo real (RQ-PCR)

La PCR cuantitativa a tiempo real (RQ-PCR, *Real time Quantitative-PCR*) es la técnica más empleada para la medida de la expresión génica. Permite cuantificar los productos generados durante la fase exponencial de amplificación, que son directamente proporcionales a la cantidad de fragmentos de esa región presentes en el comienzo de la reacción. La PCR convencional, sin embargo, sólo permite analizar la cantidad de producto formado al final de la reacción (fase de *plateau*), en la que la cantidad de fragmentos generados ha alcanzado un máximo, que puede ser independiente del número de fragmentos iniciales.

Además, debido a la ventaja que supone el análisis de los productos amplificados sin necesidad de realizar una electroforesis posterior, esta técnica se utiliza masivamente tanto para análisis cualitativos (detección de patógenos, genotipado, discriminación alélica, etc) como cuantitativos (cuantificación viral, medida de la expresión génica, validación de los resultados de *microarrays*, seguimiento y monitorización de respuesta a tratamientos, etc) (Arya *et al*, 2005).

2.2.1 Principio de la RQ-PCR

Existen varias maneras para detectar de manera continua los fragmentos generados en una PCR. Uno de los más utilizados se basa en la actividad exonucleasa de la *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA polimerasa (Holland *et al*, 1991) y en el uso de sondas que hibridan específicamente con el producto de amplificación. Una vez formado el producto de amplificación, éste se desnaturaliza en el siguiente ciclo. Ello permite la hibridación de los cebadores en sus extremos y de una sonda específica en su parte central. Conforme la polimerasa lleva a cabo su réplica (síntesis del producto específico), se encuentra con esta sonda y la degrada en dirección 5' → 3'. Si no hay

amplificación la sonda no es degradada. Sin embargo si la hay, la sonda es degradada de manera proporcional al número de fragmentos generados (Arya *et al*, 2005), que pueden ser cuantificados en función de la fluorescencia emitida. Éste es el principio que utilizan las sondas *TaqMan*[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), unas de las más utilizadas en este tipo de ensayos y que forman parte de los *TaqMan*[®] *Gene Expression Assays*. La principal ventaja de este tipo de ensayos es su especificidad, ya que la reacción depende de la hibridación de tres fragmentos de DNA (los dos cebadores y la propia sonda). Las sondas *TaqMan*[®], contienen una molécula emisora de fluorescencia o fluoróforo FAM (*reporter*) en el extremo 5' y una molécula amortiguadora de esta fluorescencia (*quencher*) en el 3'. Cuando la sonda está intacta (antes de comenzar la amplificación), se une a su secuencia diana y la proximidad entre *quencher* y *reporter* provoca que el *reporter* no emita fluorescencia de manera significativa. Conforme se amplifica el fragmento a partir de los cebadores, la actividad exonucleasa de la *Taq* hace que la sonda se fragmente y el *reporter* se aleje del *quencher*, lo que permite la emisión de fluorescencia (Heid *et al*, 1996) (**Figura 12**) y que el fragmento se copie. De esta manera la cantidad de fluorescencia emitida será proporcional a la cantidad de ácidos nucleicos amplificados (Arya *et al*, 2005).

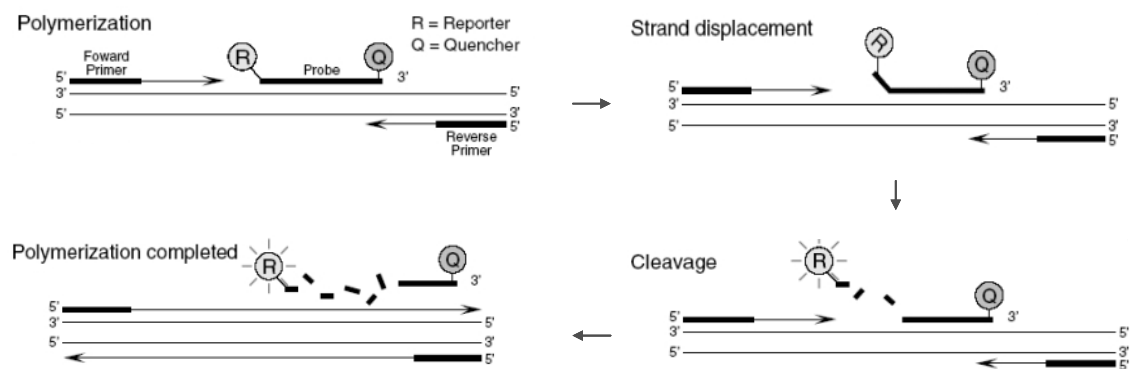


Figura 12. Principio de los ensayos *TaqMan*[®]. La *Taq* polimerasa sintetiza la hebra a partir de los cebadores. Cuando llega a la zona donde ha hibridado la sonda (dentro de la región comprendida entre los cebadores) la rompe, haciendo que el *reporter* se aleje del *quencher* y permitiendo la emisión de fluorescencia. Imagen modificada a partir de <http://www.dkfz.de/gpcf/lightcycler480.html>.

Otro método para medir la cantidad de producto generado es el marcaje mediante *SYBR Green*[®]. A medida que se produce la amplificación de la secuencia diana, el *SYBR Green*[®] se intercala en la doble cadena de los productos formados. Esto permite la emisión de fluorescencia de manera proporcional a la cantidad de producto generado. Este reactivo es independiente de la secuencia diana pero la fluorescencia detectada puede ser debida a productos inespecíficos, por lo que es conveniente el análisis posterior del producto generado mediante la comprobación de su perfil de fusión o mediante electroforesis.

En nuestro caso, hemos utilizado los ensayos con sondas *TaqMan*®, debido a su mayor especificidad y la baja calidad de las muestras disponibles para los análisis. Para llevar a cabo la reacción y la detección de la fluorescencia se ha utilizado el sistema *7500 Real-Time PCR System*, con el programa de análisis *System v1.3.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU).

2.2.2 Cuantificación absoluta y relativa

La fluorescencia emitida por cada muestra (R), es detectada y cuantificada por el programa informático de análisis empleado. Este valor es normalizado (R_n) frente a la fluorescencia emitida por una muestra de referencia (control, muestra de individuo sin enfermedad). Estos valores se representan gráficamente frente al número de ciclos de la reacción de PCR (C_s) (Figura 13).

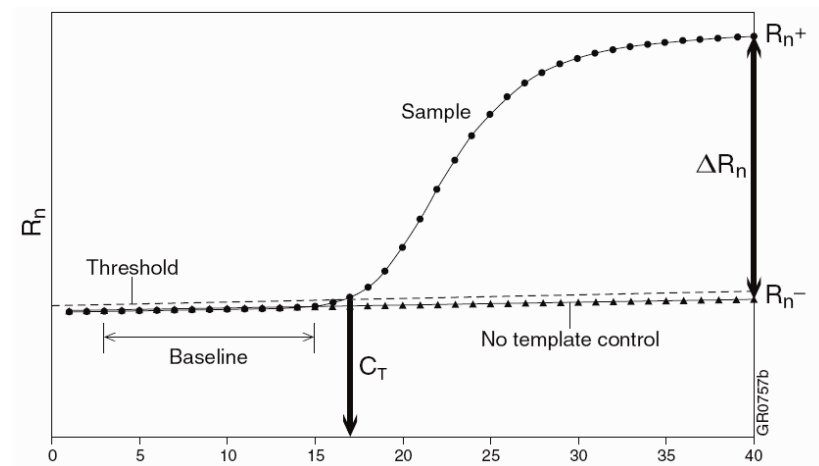


Figura 13. Gráfica tipo de los resultados obtenidos de una amplificación de un segmento mediante RQ-PCR. En el eje vertical se representa la cantidad de fluorescencia normalizada (R_n) y en el eje horizontal el número de ciclos (C_s). A partir de un determinado punto, la fluorescencia aumenta de manera exponencial, determinando el ciclo umbral o C_T .

Durante los primeros ciclos, la emisión de fluorescencia cambia poco (*baseline*, línea base). El programa calcula automáticamente la desviación media estándar de la emisión de fluorescencia emitida por una muestra de referencia en cada punto de medida, teniendo en cuenta un factor de ajuste, que es el valor umbral (*threshold*). Para una determinada muestra, el valor C_T (*threshold cycle*, ciclo en el que la emisión de fluorescencia supera ese valor umbral) es el ciclo a partir del cual se generan productos de amplificación de manera exponencial. C_T es un valor inversamente proporcional a la cantidad de fragmento diana inicial, por lo que es el que se utiliza para su cuantificación. Cuanta mayor cantidad haya de material inicial (secuencia diana), menor será el C_T . Dado que es una técnica muy sensible a errores de manipulación (pipeteo), es necesario realizar todos los ensayos por triplicado y comprobar que los C_T de los triplicados no muestran diferencias superiores a 0,5 unidades.

Según el tipo de análisis que se desee realizar, la cuantificación en un ensayo de RQ-PCR puede ser absoluta o relativa. Mediante la cuantificación absoluta conoceremos el número aproximado de moléculas que contienen la secuencia diana dentro de una muestra. Para ello, será necesario utilizar en el mismo ensayo medidas de fluorescencia emitidas por varias muestras de las que conocemos la cantidad de moléculas presentes, obteniendo una línea patrón de regresión. Extrapolando la medida de fluorescencia de nuestra muestra podremos calcular su cantidad, siempre que se encuentre dentro del rango de valores de la misma. En la cuantificación relativa no son necesarias las curvas estándar, ya que se analizan cambios en la expresión génica en una muestra en relación a otra muestra de referencia (calibrador), tomada como control. En este caso, los valores de expresión del gen de interés deben ser previamente normalizados frente a la expresión de un gen control (endógeno, C_{Te}), de expresión constitutiva en esa misma muestra. El método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (o método RQ) relaciona la diferencia entre la expresión del gen a estudiar y la expresión del gen endógeno de una muestra determinada frente a una muestra control o calibrador. Para ello, se emplea la relación matemática (Arya *et al*, 2005):

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{muestra}) - \Delta C_T (\text{calibrador})$$

Siendo:

$$\Delta C_T (\text{muestra}) = \Delta C_T \text{ gen problema} - C_{Te}$$

$$\Delta C_T (\text{calibrador}) = \Delta C_T \text{ gen problema} - C_{Te}$$

2.2.3 Ensayo de RQ-PCR

Para analizar la expresión de un gen es necesario medir la cantidad de moléculas de RNAm formadas a partir de él. La especificidad de este análisis dependerá del diseño adecuado de cebadores y sondas que permitan la amplificación únicamente de los transcritos de ese gen, sin interferencia de posibles trazas de DNA genómico que pudieran existir en la muestra.

2.2.3.1 Síntesis de cDNA: retrotranscripción

Las moléculas de RNA son muy lábiles y fácilmente degradables, por lo que para su análisis se sintetiza su DNA complementario (DNAc) mediante la reacción de retrotranscripción. Esto se realiza mediante la utilización de transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. En nuestro caso, empleamos el sistema comercial *SuperScript™ III First-Strand Syntesis System for RT-PCR* (Invitrogen-Life Technologies Ltd, Paisley, Reino Unido). Este sistema permite utilizar tres tipos de cebadores en función del tipo de análisis que se quiera realizar: cebadores de 6 nt de secuencia aleatoria (*random hexamers*) que emparejan en cualquier zona del RNA, cebadores *Oligo(dT)* que se unen a las colas poliA de los RNAm y sintetizan el cDNA a partir de ellas, y cebadores de secuencia específica que permiten obtener únicamente cDNA del gen objeto de estudio (Wacker & Godard, 2005). Dado que queríamos analizar varios genes a partir del mismo

cDNA empleamos los dos primeros tipos de cebadores siguiendo las instrucciones del fabricante (**Figura 14**), a partir de 1 μg de RNA.

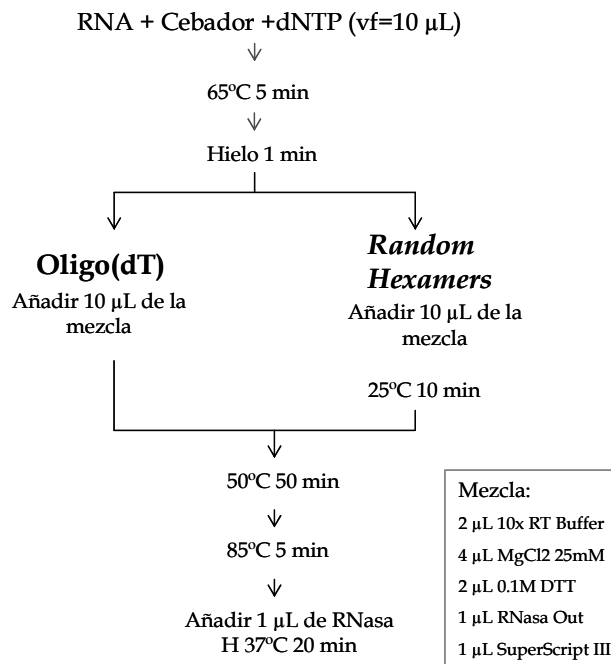
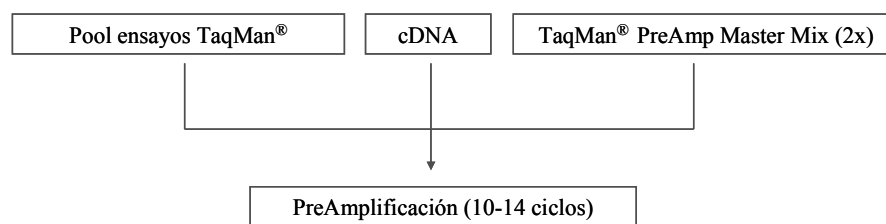


Figura 14. Reacción de retrotranscripción. En ambos casos se partió de 1 μg de RNA. En el caso de los cebadores de secuencia aleatoria (*random hexamers*) fue necesario realizar un paso adicional de 10 min a 25 $^{\circ}\text{C}$ para facilitar su emparejamiento.

Para comprobar que el cDNA obtenido era de calidad suficiente, amplificamos mediante PCR *multiplex* cuatro genes distintos de expresión constitutiva (*BCR*, *B2M*, *ABL1* y *HMBS*), según el método descrito por Watzinger y Lion (Watzinger & Lion, 1998) o el gen de la β -actina (*ACTB*), recomendado en el protocolo del sistema comercial utilizado para la retrotranscripción. Las condiciones de la PCR *multiplex* fueron 10 min a 94 $^{\circ}\text{C}$, 35 ciclos de 40 s a 94 $^{\circ}\text{C}$, 35 s a 55 $^{\circ}\text{C}$ y 45 s a 72 $^{\circ}\text{C}$, y 7 min a 72 $^{\circ}\text{C}$, con de 2,5 mM de Mg^{2+} . Las condiciones de la PCR para *ACTB* fueron 7 min a 95 $^{\circ}\text{C}$, 35 ciclos de 30 s a 94 $^{\circ}\text{C}$, 45 s a 59 $^{\circ}\text{C}$ y 1 min a 72 $^{\circ}\text{C}$, y 10 min a 72 $^{\circ}\text{C}$, con 1,5 mM de Mg^{2+} .

Únicamente pudimos obtener cDNA de calidad adecuada de 16 de los 44 pacientes inicialmente previstos en los ensayos. Además, dada su escasa cantidad, una vez obtenido el cDNA se realizó una preamplificación previa mediante el sistema comercial *TaqMan® Preamp Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), que permite obtener material suficiente para realizar varios ensayos a partir de sólo 1 ng de cDNA. Como cebadores para esta preamplificación se emplean, de manera conjunta, aquellos que posteriormente se van a usar en los análisis de RQ-PCR (“*pool* de ensayos *TaqMan®*”). Estas reacciones se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante (**Figura 15**).



	ACTIVACIÓN DE LA ENZIMA	PREAMPLIFICACIÓN	
	CALENTAMIENTO INICIAL	CICLOS (10-14)	
		DESNATURALIZACIÓN	ELONGACIÓN
T ^o	95°C	95°C	60°C
TIEMPO	10 min	15 s	4 min

Figura 15. Preamplificación de las muestras. Se denomina *pool* de ensayos a la mezcla diluida de todos los ensayos *TaqMan*® que se van a analizar mediante RQ-PCR en los distintos estudios (mezcla de todos los ensayos seleccionados de todos los genes). El *Master Mix*, contiene todos los reactivos necesarios para que tenga lugar la reacción. Esta reacción de preamplificación se llevó a cabo a partir de cada uno de los cDNAs obtenidos en la retrotranscripción.

2.2.3.2 Selección de cebadores y sondas

Nuestro objetivo consistía en medir la expresión de los genes de las familias Abl, Syk y Fgfr y de *JAK2* (por su importancia en el desarrollo de estas enfermedades) en nuestra serie inicial de muestras, a dos niveles. Por una parte, queríamos observar si existía una diferencia de su expresión en los mismos frente a individuos normales y por otra, si existía alguna parte del gen que se expresaba de manera diferencial al resto. Esto último podría indicar la existencia de una fusión génica o de transcritos alternativos cuya expresión aberrante pudiera estar relacionada con el desarrollo de la enfermedad (Erquiaga *et al*, 2010).

Por ello, seleccionamos dos ensayos *TaqMan*® distintos para cada gen, que pudieran permitirnos comparar la expresión de la región 3' -ensayo A- (codificante del dominio TK que se mantiene en las fusiones génicas), frente a una región situada en la porción 5' del gen - ensayo B- (codificante del dominio SH2 en las familias Syk, Abl y gen *JAK2* o del dominio yuxtamembrana en la familia Fgfr) (Figura 16).

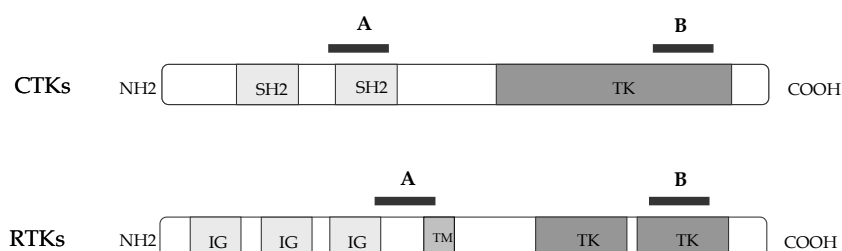


Figura 16. Posición relativa de los ensayos *TaqMan*® escogidos para el análisis de la expresión diferencial. Para cada gen escogimos dos ensayos: A (en posición 5' del gen) y B (en el dominio TK, en 3').

Estos ensayos se encontraban disponibles comercialmente (*TaqMan® Gene Expression Assays*, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU). Para evitar la detección de posibles trazas de DNA genómico que pudieran existir y que dieran lugar a medidas erróneas, se seleccionaron ensayos de tipo HsXXXXXXXXX_m1 (**Tabla 3**). En ellos al menos uno de los cebadores se encuentra situado sobre dos exones contiguos, impidiendo la amplificación de DNA genómico al quedar ambos separados por un intrón. Para los genes *FGFR3* y *FGFR4*, este tipo de ensayos no estaban disponibles y no fueron analizados. A pesar de ser de tipo HsXXXXXXXXX_m1, todos los ensayos utilizados fueron validados con DNA genómico de un individuo control previamente a su utilización para comprobar que efectivamente no existía amplificación con este tipo de material.

Tabla 3. Ensayos comerciales *TaqMan®* (*TaqMan® Gene Expression Assays*, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU) seleccionados para cada análisis. En todos los casos se seleccionaron ensayos HsXXXXXXXXX_m1 que no detectan DNA genómico.

Gen	Posición	Referencia	Exones	Tamaño (pb)
SYK	Ensayo 5'	Hs00374292_m1	3-4	87
	Ensayo 3'	Hs00895375_m1	11-12	60
ZAP70	Ensayo 5'	Hs00896350_m1	4-5	79
	Ensayo 3'	Hs00896347_m1	13-14	75
ABL1	Ensayo 5'	Hs00245445_m1	1-2	54
	Ensayo 3'	Hs01104728_m1	8-9	60
ABL2	Ensayo 5'	Hs00953648_m1	2-3	108
	Ensayo 3'	Hs00943653_m1	7-8	96
FGFR1	Ensayo 5'	Hs00241111_m1	5-6	81
	Ensayo 3'	Hs00915129_m1	12-13	96
FGFR2	Ensayo 5'	Hs01552926_m1	5-6	77
	Ensayo 3'	Hs01552919_m1	15-16	88
JAK2	Ensayo 5'	Hs01078134_m1	6-7	109
	Ensayo 3'	Hs01078128_m1	22-23	116

2.2.3.3 Selección del gen endógeno

Existen varios ensayos *TaqMan®* comercialmente disponibles de este tipo, que se suelen emplear para análisis de cuantificación relativa. Para un análisis correcto se recomienda que el gen endógeno escogido se exprese en un rango semejante al gen a analizar (que su C_T sea semejante a la C_T del gen de interés). Para su selección utilizamos un panel comercial que contiene los once genes más frecuentemente usados (*TaqMan® Human Endogenous Control Plate*, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Finalmente, escogimos el *TBP* como nuestro control endógeno y posteriormente lo analizamos con el ensayo Hs00427620_m1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU).

2.2.3.4 Realización de los ensayos de RQ-PCR

Las reacciones específicas para cada muestra y gen se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μL , con 10 μL de *Taqman® Gene Expresión Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), 1 μL de la mezcla de cebadores y sondas *Taqman®* específicas en cada caso (*TaqMan® Gene Expression Assays*; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) y 9 μL de la dilución de cDNA preamplificado (proporción de cDNA 1/10 del volumen final), en placas de 96 pocillos. La mezcla *Taqman® Gene Expresión Master Mix*, está compuesta por *AmpliTaq Gold®* DNA polimerasa, uracil-DNA glicosilasa (UDG) para evitar contaminaciones cruzadas y un compuesto fluorescente (ROX™), utilizado como referencia interna pasiva. En cada una de las placas se incluyeron dos muestras control de individuos sin enfermedad, una procedente de sangre periférica de un individuo control sin enfermedad, y otra de médula ósea, procedente de la médula ósea de 6 hombres y mujeres de raza caucásica (edades de 38-59, muerte súbita, ref.636548; Clontech-Takara Bio USA, Madison, WI). Además, en cada reacción de PCR (en una misma placa) incluimos una amplificación control del gen *TBP* (control endógeno) para cada uno de los pacientes y controles. Todas las reacciones se realizaron por triplicado. Las condiciones de reacción fueron en todos los casos: 50 °C 2 min para la acción de la UDG, seguida de una desnaturalización de 10 min a 95 °C para activar la *Taq* y 40 ciclos a 95 °C 15 s y 60 °C 1 min.

2.2.3.5 Análisis de los resultados

El programa informático *7500 Sequence Detection Software v1.3.1.21* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU) permite representar la fluorescencia obtenida en la reacción tras cada uno de los ciclos de amplificación, ofreciendo valores de C_T de cada uno de los pocillos de la placa. Los valores de los triplicados cuya desviación estándar fue $>0,5 C_T$ se eliminaron del análisis, al indicar un probable error en la preparación de la reacción. En todos los casos, se realizó una cuantificación relativa por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

2.2.3.6 Análisis estadístico de los resultados obtenidos por RQ-PCR

A partir de los datos obtenidos en los distintos ensayos mediante RQ-PCR, realizamos un estudio estadístico de los resultados. En primer lugar, para cada ensayo determinamos si existían diferencias significativas en los valores de ΔC_T observados en el grupo de pacientes frente al grupo de controles. Para ello, realizamos una prueba *t de Student* de dos colas para muestras independientes.

En segundo lugar, analizamos si existían diferencias entre los valores de observados en el ensayo A de cada gen frente a los del ensayo B del mismo. Para ello, puesto que se trata de valores pareados, es decir, cada individuo presenta un valor para los ensayos A y B

correspondientes, empleamos una *t de Student* de dos colas para muestras dependientes o pareadas.

En ambos tipos de análisis empleamos la herramienta UNStat, basada en Excel, diseñada por la Dra. Marta García-Granero, del Departamento de Genética de la Universidad de Navarra (<http://www.unav.es/departamento/genetica/unstat>).

3. Ensayos funcionales de las alteraciones en los genes de la familia Cbl

Los ensayos funcionales son una serie de análisis que tienen como objetivo determinar la función fisiológica de un determinado gen, proteína o RNA, y el posible efecto de una alteración génica en el funcionamiento celular. Estos estudios pueden realizarse *in vitro* con líneas celulares, o *in vivo*, empleando modelos animales (generalmente rata o ratón). En este Proyecto, hemos llevado a cabo ensayos funcionales *in vitro* para determinar el efecto de cada una de las mutaciones con cambio de sentido detectadas mediante dHPLC en los genes *C-CBL*, *CBL-B* y *CBL-C*. Para ello, hemos empleado líneas celulares derivadas de leucemia, a las que hemos introducido vectores de expresión con las ORFs (*opening reading frame*) correspondientes a los genes mencionados (vectores *WT* o *wild type*) y vectores similares con cada una de las mutaciones, creados mediante mutagénesis dirigida (vectores mutantes). Así, hemos comprobado el efecto de estas mutaciones en el crecimiento de las células mediante ensayos de proliferación celular, comparando los resultados obtenidos en células con los vectores *WT*, respecto a células en las que se introdujeron los vectores mutantes.

3.1 Líneas celulares

Todas las líneas celulares empleadas para los ensayos funcionales fueron hematológicas. La línea 32D (DSMZ ACC 411) es una línea celular mieloblástica inmortalizada, derivada de cultivos a largo plazo de médula ósea de ratones C3H/HeJ infectados con un virus de leucemia murina (FEV, *friend leukemia virus*) (Greenberger *et al*, 1983; Valtieri *et al*; 1987; Migliaccio *et al*, 1989) y es dependiente de factores de crecimiento como IL3. Esta línea es la más utilizada en los ensayos funcionales de *C-CBL* (Sargin *et al*, 2007). Por el contrario, la línea M-07e (DSMZ ACC 104) es una sublínea de M07 establecida a partir de la sangre periférica de una niña de 6 meses con leucemia aguda megacarioblástica M7 (Avanzi *et al*, 1988; Avanzi *et al*, 1990; Drexler *et al*, 1997). También es dependiente de IL3 para su crecimiento y no presenta la mutación V617FJAK2. Como modelo celular positivo para esta mutación escogimos la línea HEL (DSMZ ACC 11). Esta línea se estableció en 1980 a partir de la sangre periférica de un varón de 30 años con eritroleucemia (leucemia mieloide aguda M6) secundaria a tratamiento de un linfoma de

Hodgkin (Martin *et al*, 1982; Quentmeier *et al*, 2006). La **tabla 4** recoge las principales características de estas tres líneas celulares.

Tabla 4. Características de las líneas celulares empleadas para la realización de los ensayos funcionales.

	32D	M07e	HEL
ACC	ACC 411	ACC 104	ACC 11
Organismo	Ratón	Humano	Humano
Tipo celular	Linfoblasto de médula ósea	Leucemia Megacarioblástica aguda (LMA M7)	Eritroleucemia (LMA M6)
Requerimientos	RPMI + 10% suero fetal bovino + IL3 mouse (10ng/ml)	RPMI + 20% suero fetal bovino + IL3 humana (10ng/ml)	RPMI + 10% suero fetal bovino
Crecimiento	En suspensión	En suspensión	En suspensión, algunas adherentes
Tiempo de división	15h	40h	36h
V617F JAK2	Ausente	Ausente	En Homocigosis

Todas estas líneas fueron cultivadas y mantenidas en crecimiento exponencial en un incubador *Galaxy B* (RS Biotech Laboratory Equipment Ltd, Irvine, Reino Unido), a 37°C con un 5% de CO₂ y manipuladas en condiciones estériles en una campana de flujo laminar *Indelab SBL95B* (Labolan SL, Esparza de Galar, España). Los medios empleados para su cultivo fueron RPMI 1640 (1x) con L-Glutamina (GIBCO™ *RPMI-1640* Ref 21875-034, Invitrogen-Life Technologies, Paisley, Reino Unido) y suero fetal bovino (*HyClone Fetal Bovine Serum*, Thermo Fisher Scientific, Essex, UK), en las proporciones requeridas en cada caso. En el caso de las líneas M-07e y 32D, los medios fueron suplementados con IL3 humana (GIBCO™ *Recombinant Human IL3*, Ref PHC0035, Invitrogen-Life Technologies, Paisley, Reino Unido) y murina (GIBCO™ *Recombinant Mouse IL3*, Ref PMC0035, Invitrogen-Life Technologies, Paisley, Reino Unido) respectivamente, a una concentración final de 10 ng/mL. Los cultivos con densidades superiores a 3 × 10⁶ células/mL fueron congelados gradualmente con una solución con DMSO (GIBCO™ *Recovery™ Cell Culture Freezing Medium*, Ref 12648-010, Invitrogen-Life Technologies, Paisley, Reino Unido) y mantenidos en nitrógeno líquido.

3.2 Vectores de expresión

Los vectores de expresión utilizados fueron de tipo *pCMV6-AC-GFP*, adquiridos de *OriGene Technologies* (Rockville, MD, EE. UU.). Estos vectores contenían ya las ORFs de los genes de *C-CBL*, *CBL-B* y *CBL-C* (*TrueORF clones*) bajo el promotor CMV, además del gen de resistencia a la ampicilina (*Amp^R*) para su selección en bacterias. La presencia de una región codificante para la proteína verde fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*) en el extremo 3' del gen (**Figura 17**),

nos permitió confirmar la entrada y expresión del vector dentro de la célula, empleando un microscopio de fluorescencia. El **Anexo 5** recoge información sobre estos vectores.

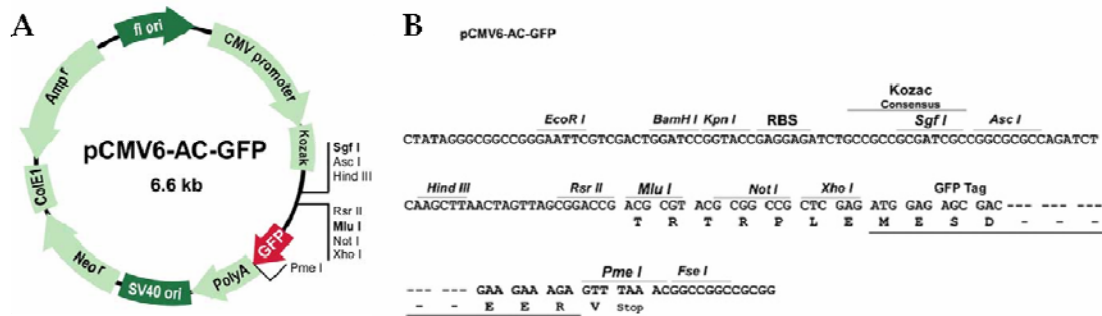


Figura 17: A) Esquema de los vectores *pCMV6-AC-GFP* utilizados en los ensayos funcionales de *C-CBL*, *CBL-B* y *CBL-C*. El gen se encuentra dentro de la caja de clonado, con dianas para distintas endonucleasas de restricción en posición anterior a la GFP. La proteína de interés se expresa fusionada a GFP en su extremo carboxiloterminial, permitiendo comprobar su presencia con un microscopio de fluorescencia. Además, este tipo de vectores confieren resistencia a la ampicilina y a la neomicina para facilitar su selección. B) Esquema de la caja de clonado de estos vectores.

Los datos publicados sobre los efectos oncogénicos de las mutaciones en *C-CBL* indicaban que, para poder observar un efecto rápido en la proliferación celular, era necesario que las células sobreexpresaran además una RTK como *FLT3* ya que *C-CBL* está implicada en su degradación (Sargin *et al*, 2007; Grand *et al*, 2009). Bajo esta hipótesis, la *C-CBL* mutada tendría una menor actividad en la degradación de este receptor y en estas condiciones se potenciaría el efecto transformante de la proteína mutada y se podría observar en el modelo *in vitro*.

Para la expresión de *FLT3*, adquirimos otro plásmido de expresión a la misma empresa de tipo *pCMV6-Entry*, con el gen de resistencia a la kanamicina (*Kan^R*). Posteriormente, transferimos la ORF de *FLT3* desde este vector a otro de tipo *pCMV6-AC-RFP* (*Red Fluorescent Protein*), con el gen de resistencia a la ampicilina (*Amp^R*), también suministrado por la misma casa comercial (ver punto 3.2.2). Además, dado que la función de las proteínas Cbl es ubiquitinar los sustratos correspondientes (proteínas de señalización), en el caso de las células murinas 32D fue necesario introducir también un vector que expresara la ubiquitina (UBI) humana (*pCMV-HA Ubiquitina*, facilitado por el Dr Francis Grand del *Wessex Regional Genetics Laboratory*, Salisbury, Reino Unido) (**Anexo 5**). En todos los casos se comprobó, mediante digestión enzimática y secuenciación, que los vectores suministrados eran los correctos y que la ORF de los distintos genes se encontraba intacta.

Todos los vectores suministrados por *OriGene* poseen además el gen de resistencia a la neomicina (*Neo^R*) o geneticina (*GIBCO™ Geneticin G418 sulphate*, Ref 11811-031, Invitrogen-Life Technologies, Paisley, Reino Unido), lo que permite la selección de las células eucariotas transfectadas con el vector y eliminar las que no lo han adquirido.

3.2.1 Mantenimiento de los vectores en cultivos bacterianos

Los distintos plásmidos con cada una de las ORFs (*pCMV6-AC-CCBL-GFP*, *pCMV6-AC-CBLB-GFP*, *pCMV6-AC-CBLC-GFP*, *pCMV6-AC-RFP*, *pCMV6-Entry-FLT3* y *pCMV6-HA-UBI*), se introdujeron en *E. coli* para su mantenimiento y almacenamiento. Para ello, transformamos 50 µl de bacterias químicamente competentes *One Shot® Chemically Competent TOP10 E. coli* (Invitrogen-Life Technologies, Paisley, Reino Unido) con 200 ng de vector y se sembraron en placas de LB Agar (ver punto 1.2.2.2 de material y métodos) suplementadas con 25 µg/mL de kanamicina ó 100 µg/mL de ampicilina. Tras su cultivo durante una noche a 37 °C, se seleccionaron varias colonias que se recrecieron en medio LB líquido con antibiótico a 37 °C con agitación constante. Parte de esos cultivos se conservaron a -80 °C con 15% de glicerol estéril. Del resto del cultivo se extrajo el DNA plasmídico (ver punto 1.2.2.2) para comprobar su secuencia (Secugen, Madrid, España) con cebadores específicos de los vectores (VP1.5 y XL39, OriGene Technologies, Rockville, MD, EE. UU.) y otros específicos de cada uno de los genes (Tabla 5).

Tabla 5. Cebadores empleados para la secuenciación de la ORF de los vectores.

Gen	Tipo	Secuencia (5'→3')	Gen	Tipo	Secuencia (5'→3')
C-CBL	Antisentido	TGATGGGATGCACTTCATGT	CBL-C	Antisentido	GCCTTGGTGAGCTGGTACAT
	Sentido	AAAGATTGAGCCCTGTGGAC		Sentido	AGGAGTGCCAACGACGAG
	Antisentido	GCTGCCACTCCCTCTAGGAT		Antisentido	GGTCTGGCTGTCCGAGTG
	Sentido	TGAATAGCAGCCATTAGTAGGT		Sentido	TGCTGAGAGCAACAAGGATG
	Antisentido	CGTAGAGGCTCGGAAGAGG		Antisentido	CTGGAACGCTCTCAGATATGC
	Sentido	GAGTCTTATTGCCCGTTTGA		Sentido	ACAGAAACCAAGCTGGAGA
CBL-B	Sentido	GAAAAAGTCAAAACGGGCAAT	FLT3	Antisentido	CACCCACTGTCCAAACACTTT
	Antisentido	GCCCACAAGGCTCAATCTT		Sentido	CCCATTACCATCTTGGACCT
	Sentido	GAAATGGGCTCCACTTTTCA		Antisentido	TCCTCTTCTCCAGCCTTTT
	Antisentido	TGGTAACTGGAGGAGGAGGA		Sentido	AGCATGCCTGGTTCAAGAGA
	Sentido	ACGCCATGATTTGCCTTTAG		Antisentido	GCCAGGGTAAGGATTCACAC
	Sentido	CACCTCCTGCAAGGCATAGT		Sentido	AAGCCTGTTTGAAGGCATCT

De manera simultánea comprobamos por digestión enzimática que cada uno de los clones suministrados por la casa comercial tenía el tamaño de inserto adecuado. Para ello, empleamos las enzimas de restricción *Mlu* I (#R6381, Promega Corp, Madison, WI, EE. UU.) y *Sgf* I (#R5104, Promega Corp, Madison, WI, EE. UU.), cuyas dianas están presentes en la caja de clonado del vector comercial pero son muy raras en las ORFs humanas (0.37% para *Sgf* I y 4% *Mlu* I). Esta digestión se llevó a cabo de manera simultánea empleando el tampón C (Promega Corp, Madison, WI, EE. UU.) con BSA (*Bovine Serum Albumine*), en el que la actividad de *Sgf* I y *Mlu* I es del 100% y 75 % respectivamente. El vector *pCMV-HA-UBI* se digirió con *Xba* I (#R0145S, New England BioLabs Inc, Ipswich, MA, EE. UU.) en las condiciones indicadas por el

fabricante. Todas estas reacciones se mantuvieron 4 h en un baño a 37 °C tras lo que se procedió a la inactivación de las enzimas de restricción por calentamiento a 65°C durante 20 min. Finalmente, se comprobó el tamaño del inserto por electroforesis en gel de agarosa al 0,5 %.

3.2.2 Obtención del vector pCMV6-AC-RFP-FLT3 a partir del pCMV6-Entry-FLT3

Para comprobar la entrada y expresión de FLT3 en las células, creímos conveniente que su producto estuviera marcado con una proteína fluorescente que nos permitiera observar su expresión en un microscopio de fluorescencia. Dado que las proteínas de la familia Cbl iban a ser marcadas con GFP, para poder distinguir ambos productos decidimos transferir la ORF de FLT3 a un vector pCMV6-AC-RFP, que permitiera su marcaje con RFP (*Red Fluorescent Protein*). Este paso, se facilita por el hecho de que ambos vectores (entrada y destino) muestran en su caja de clonado dianas para Sgf I y Mlu I (lo que permite mantener la orientación del inserto y su marco de lectura) y poseen genes de resistencia a antibióticos distintos (*Kan^R* en pCMV6-Entry y *Amp^R* en pCMV6-AC-RFP).

La **Figura 18** muestra un esquema del proceso llevado a cabo para la transferencia de la ORF de FLT3 de un vector a otro. En primer lugar, digerimos ambos vectores con las enzimas Mlu I y Sgf I (según las condiciones descritas en el apartado 3.2.1) y comprobamos el tamaño de los fragmentos obtenidos. Tras ello, procedimos a la ligación de los productos con T4 DNA ligasa (#15224-017, Invitrogen-Life Technologies, Paisley, Reino Unido), en las condiciones indicadas por el fabricante y una proporción 4:3 en volumen del producto de la digestión de pCMV6-Entry-FLT3 frente al de la digestión de pCMV6-AC-RFP. Como las dianas de Mlu I y Sgf I son distintas e incompatibles entre sí, los vectores sin inserto no pueden cerrarse. Posteriormente, con los productos obtenidos se procedió a la transformación de bacterias competentes (ver punto 3.2.1 de material y métodos) y se cultivaron en placas con LB Agar suplementado con ampicilina, que evita el crecimiento de las colonias con pCMV6-Entry-FLT3 que no hubieran sido digeridas. Las colonias obtenidas se cultivaron en medio líquido, parte del cual se conservó a -80 °C y del resto se extrajo el DNA plasmídico. Finalmente, se comprobó el tamaño del inserto mediante digestión enzimática y electroforesis y su secuencia mediante secuenciación (con los cebadores de la Tabla 5).

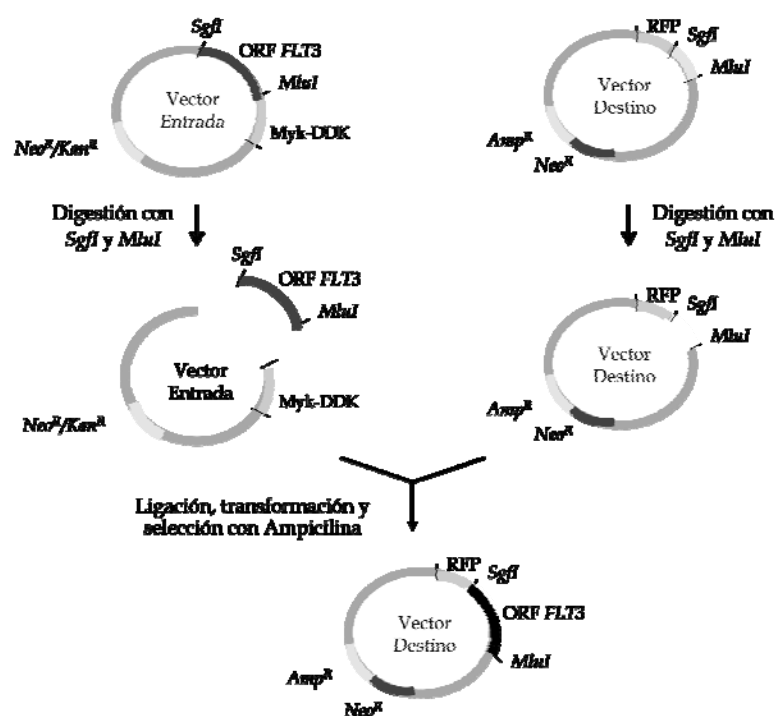


Figura 18. Esquema del sistema de lanzadera empleado para la transferencia de la ORF desde el vector de entrada (*pCMV6-Entry*) al de destino (*pCMV6-AC-RFP*). Ambos vectores fueron digeridos con las enzimas de restricción *SgfI* y *MluI*. La ligasa T4 une la ORF de *FLT3* digerida al vector de destino. Tras la transformación de bacterias competentes con el producto de la ligación, los clones transformados se seleccionan en placas con ampicilina.

3.2.3 Obtención de los vectores de expresión mutantes: mutagénesis dirigida

Los vectores de expresión de cada una de las mutaciones con cambio de sentido detectadas mediante los análisis dHPLC, se obtuvieron por mutagénesis dirigida a partir de los correspondientes vectores *WT* de los tres genes (*C-CBL*, *CBL-B* y *CBL-C*). En total, fueron cinco mutaciones de *C-CBL*, una de *CBL-B* y tres de *CBL-C*. Además, se incluyó como control positivo el cambio c.1397G>A (p.R420Q), que corresponde a la mutación transformante más frecuente descrita en *C-CBL* (ver Figura 20).

Para realizar la mutagénesis se empleó el sistema comercial *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene-Agilent Life Sciences, Wilmington, DE, EE. UU.), que permite introducir cambios en la secuencia de nucleótidos (inserciones, deleciones o sustituciones de uno o varios nucleótidos) a partir de un vector *WT* (Figura 19). Para ello fue necesario diseñar, de manera previa, una pareja de cebadores para cada una de las mutaciones (Figura 20 y Anexo 6). Este diseño se realizó mediante el programa *QuikChange® Primer Design Program*, disponible en la web <http://www.genomics.agilent.com/>. Los cebadores se obtuvieron purificados por PAGE (*Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) (Sigma-Genosys, Haverhill, Reino Unido).

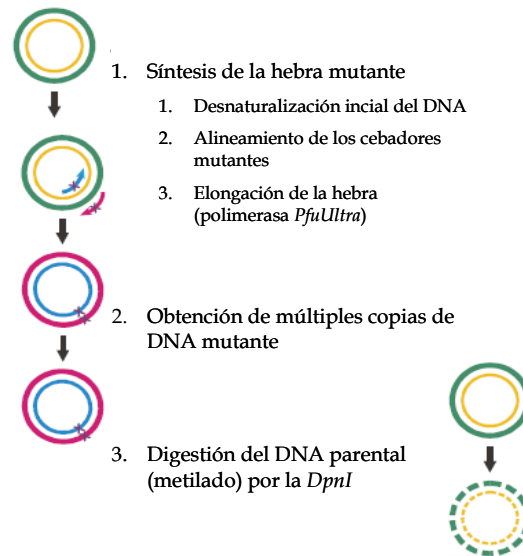


Figura 19. Proceso de mutagénesis dirigida mediante el sistema comercial *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene-Agilent Life Sciences, Wilmington, DE, EE. UU.). Mediante este sistema se obtienen, a partir de los vectores *WT*, los correspondientes vectores de expresión con cada una de las mutaciones. El proceso se realiza de manera semejante a una PCR convencional, utilizando una polimerasa de alta fidelidad (*PfuUltra high-fidelity DNA polymerase*) y cebadores específicos para cada mutación. Una vez amplificadas las hebras, se procede a la digestión del producto con la enzima de restricción *Dpn I*, específica para DNA metilado y hemimetilado, que nos permite eliminar el vector original de partida y seleccionar sólo los vectores mutantes formados (Imagen modificada a partir de <http://www.genomics.agilent.com/CollectionSubpage.aspx?PageType=Product&SubPageType=ProductData&PageID=384>).

Para la realización de la mutagénesis dirigida, se partió de 30 ng de DNA de cada uno de los vectores *WT* de *C-CBL*, *CBL-B* o *CBL-C*. Este vector debía ser extraído de bacterias *E. coli Dam+* (como TOP10 *E.coli*) que fueran capaces de metilarlo, ya que posteriormente, sería necesario diferenciar las moléculas de vector *WT* de partida de las moléculas mutantes generadas. Las condiciones de la reacción de mutagénesis (**Figura 19**) indicadas por el fabricante, varían en función del tipo de mutación y del tamaño del vector. En el caso de los vectores *C-CBL* y *CBL-B*, el tiempo de elongación a 68 °C fue de 9,5 min, ya que ambos tenían un tamaño similar. En el caso de *CBL-C*, al ser más pequeño, fue de 8 min. Una vez finalizada la reacción de polimerización, las moléculas *WT* originales son eliminadas por digestión con *Dpn I*, que degrada de manera específica el DNA metilado y hemimetilado, por lo que el producto final contiene únicamente las moléculas mutantes formadas en la reacción. Este vector mutante obtenido debe ser introducido de nuevo en bacterias (en este caso *E. coli XL1-Blue supercompetent cells*), para su mantenimiento y amplificación (ver punto 3.2.1). Como en los casos anteriores, las bacterias transformadas se cultivaron en placas de LB agar con ampicilina y se seleccionaron varias colonias aisladas que se recrecieron en LB líquido con ampicilina. Parte de este cultivo se conservó a -80°C y del resto se extrajo DNA plasmídico, para comprobar su secuencia mediante secuenciación.



Figura 20. Diseño de los cebadores para la mutación control en *C-BL* (c.1397G>A, p.Arg420Gln o R420Q). El cambio que deseamos introducir es la sustitución de G por A en la posición 1397, que en la hebra complementaria corresponde a un cambio C por T. Los cebadores muestran la modificación en el centro de la secuencia; esto no impide la hibridación con la secuencia normal, pero todas las moléculas que se formen a partir de estos cebadores tendrán este cambio en la secuencia (vectores mutantes).

3.2.4 Extracción del DNA libre de endotoxinas

Para la transfección de un vector de expresión a una célula eucariota el DNA debe estar libre de endotoxinas, lipopolisacáridos de la membrana de bacterias *gram* negativas, que disminuyen dramáticamente la eficiencia de este proceso. Por ello, a partir de los cultivos almacenados a -80°C de cada uno de los vectores (*WT* y mutantes) se realizó un cultivo líquido con LB-ampicilina y se procedió a la extracción del DNA de los mismos empleando el sistema comercial *EndoFree® Plasmid Maxi Kit #12362*, Qiagen GmbH, Hilden, Alemania), según el protocolo recomendado por el fabricante.

3.3 Transfección de los vectores a las células eucariotas: nucleofección

La transfección de una molécula de ácido nucleico al interior de células de mamífero es una herramienta fundamental en los estudios de la función génica, la regulación de la expresión de determinados genes y el desarrollo de agentes terapéuticos dirigidos a una diana genómica concreta (Bradburne *et al*, 2009). Existen varios métodos de transfección, basados en mecanismos químicos (fosfato cálcico, DEAE-dextrano, liposomas catiónicos) o físicos (electroporación, hidroporación, ultrasonidos y microinyección) (Neumann *et al*, 1982; Wong & Neumann, 1982; Gao & Huang, 1991; Weir & Meltzer, 1993; Luo & Saltzman, 2000). También se han utilizado adenovirus y retrovirus para infectar las células e introducir vectores dentro de la célula eucariota con eficiencias superiores (Curiel *et al*, 1991; Han *et al*, 2008; Bradburne *et al*, 2009). Sin embargo, la mayor parte de estas técnicas muestran bajas eficiencias, alta citotoxicidad

e incapacidad de introducir el ácido nucleico en el núcleo, lugar en el que se realiza la transcripción (Martinet *et al*, 2003; Han *et al*, 2007; Bradburne *et al*, 2009).

En este Proyecto, se ha utilizado un sistema de transfección denominado nucleofección (**Figura 21**) desarrollado por *Amaxa*® (Lonza Cologne AG, Colonia, Alemania). Este sistema combina la electroporación de alto voltaje con la utilización de reactivos químicos específicos al tipo celular empleado, que permite mejorar la transferencia de ácidos nucleicos al núcleo y reduce su toxicidad. La nucleofección se ha empleado de manera satisfactoria para la transfección de ácidos nucleicos en una amplia variedad de tipos celulares, incluidas las células madre, mioblastos, monocitos, queratinocitos humanos, células madre murinas y otras muchas (Martinet *et al*, 2003; Han *et al*, 2008; Hohelstein *et al*, 2008; Bradburne *et al*, 2009). En nuestro caso, utilizamos el equipo *Amaxa*® *Nucleofector*® II con la solución contenida en el *Cell Line Nucleofector*® Kit V (VCA-1003, Lonza Cologne AG, Colonia, Alemania). Para la línea celular 32D se empleó el programa E-032, para la M-07e el X-001 y para las HEL el X-005, todos ellos recomendados por la casa comercial (*Cell Transfection Database*, <http://www.lonzabio.com/6.html>).

3.3.1 Ensayos de nucleofección

3.3.1.1 Nucleofección de *FLT3*

La nucleofección de *FLT3* (*pCMV6-AC-FLT3-RFP*), se llevó a cabo tras obtener entre 15-30 x 10⁶ células, con entre 7-15 µg de vector, siguiendo el procedimiento indicado en la **Figura 21**. Tras ello, las células se mantuvieron en crecimiento con 25 µg/mL de geneticina (*GIBCO*™ *Geneticin G418 sulphate*, Ref 11811-031, Invitrogen-Life Technologies, Paisley, reino Unido) durante al menos una semana en placas de 6 pocillos, hasta obtener el número de células adecuado para la transfección de los distintos vectores *CBL* (*WT* y mutantes).

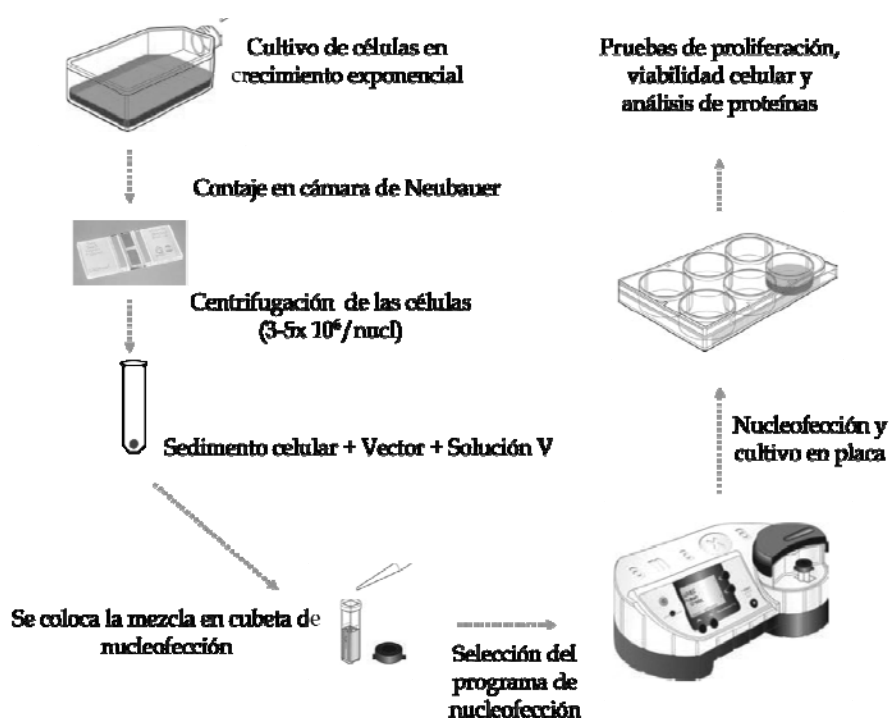


Figura 21. Esquema de la nucleofección empleando la tecnología *Amaxa*® (Lonza Cologne AG, Colonia, Alemania). Una vez cultivadas las células, se cuentan en una cámara de *Neubauer* para transfectar las células necesarias en cada caso. En función de éste número de células, se añade proporcionalmente una determinada cantidad de vector (generalmente 5 µg de vector para 5 x 10⁶ células). La mezcla se resuspende en la solución suministrada en el sistema comercial según el tipo celular (en nuestro caso solución V, *Cell Line Nucleofector*® Kit V) y se introduce en las cubetas de nucleofección, entre ambos electrodos. Una vez introducida ésta en el equipo *Amaxa*® *Nucleofector*® II, se selecciona el programa correspondiente al tipo celular empleado. El proceso de nucleofección dura apenas unos segundos; transcurrido ese tiempo la mezcla se recoge gracias a unas pipetas especiales suministradas en el sistema comercial y se cultiva en placas de 6 o 12 pocillos, con el medio de cultivo específico en cada caso. Imagen modificada a partir de https://www.lonza.com/go/shopdata/IMS_DOCS/DF/DF369C6F5F5D8AF18852001A4B525E10.pdf.

3.3.1.2 Nucleofección de los genes *CBL* (*C-CBL*, *CBL-B* y *CBL-C*)

Con cada una de las líneas celulares nucleofectadas previamente con *pCMV6-AC-FLT3-RFP*, realizamos una transfección de cada uno de los vectores mutantes (cinco más el mutante control para *C-CBL*, una para *CBL-B* y tres en el caso de *CBL-C*), además de los vectores *WT* de cada uno de ellos (*C-CBL*, *CBL-B* y *CBL-C*), con el fin de comparar el efecto en las células de los vectores mutantes respecto de los normales. En todos los casos, se incluyeron dos controles de nucleofección (células con el vector *pmaxGFP* control y células sin vector) (Figura 22). El vector *pmaxGFP* se suministra por la casa comercial como control positivo de la nucleofección, ya que expresa la proteína verde fluorescente. El control negativo (C-), nos daría información de la respuesta proliferativa de las células con *FLT3*, sin vector *CBL* alguno, pero sometidas a nucleofección.

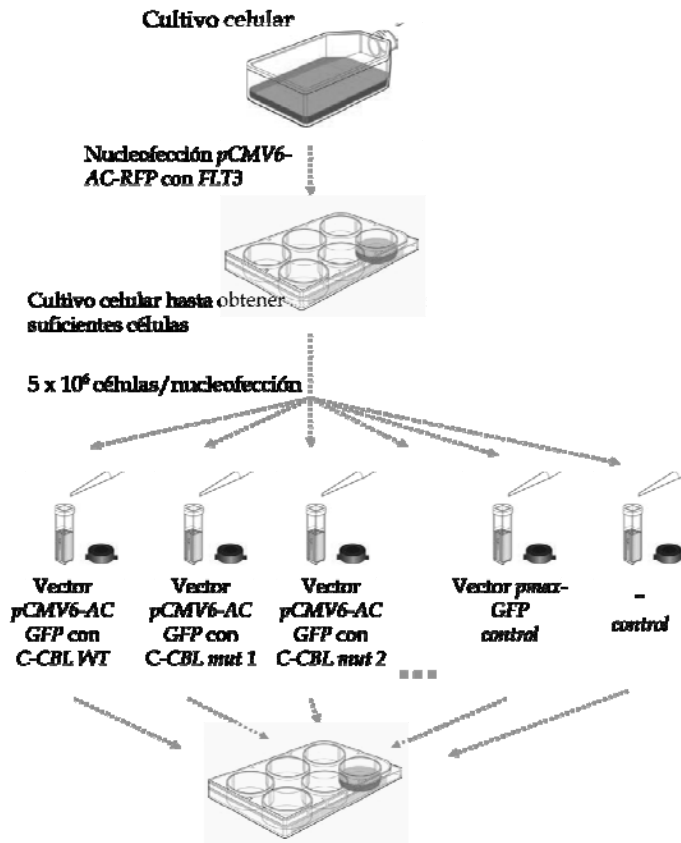


Figura 22. Esquema de los ensayos de transfección. Tras 5-6 días de cultivo de las células después de su descongelación se procedió a la nucleofección de *pCMV6-AC-FLT3-RFP*. Posteriormente las células fueron cultivadas con medio completo y geneticina hasta obtener el número de células necesario para la introducción de los diferentes vectores WT y mutantes de los genes *CBL*, además de los controles con el vector *pmaxGFP* y las células sin vector (control negativo). En cada uno de estos casos se emplearon 5×10^6 células y 5 μ g de vector. Las células se mantuvieron creciendo entre 48 y 72 h hasta la realización de los ensayos de proliferación y viabilidad celular.

La cantidad utilizada de cada uno de los vectores fue proporcional a 5 μ g de vector por cada 5×10^6 células. En el caso de las células 32D, al ser murinas, se introdujo de manera simultánea el vector de la ubiquitina, en una cantidad inferior por ser de menor tamaño (3 μ g por cada 5×10^6 células). Tras la nucleofección, las células se mantuvieron en cultivo en placas de 6 ó 12 pocillos (a 37°C, 5% CO₂), en medio completo hasta la realización de los ensayos de proliferación y viabilidad celular.

3.3.2 Eficiencia de la transfección y fluorescencia

Transcurridas 24 h tras la nucleofección se realizó una extensión con 15 μ L del cultivo celular para observar la eficiencia del proceso en el microscopio de fluorescencia (objetivo 20x, *Nikon Eclipse 80i*, Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japón) empleando el filtro verde (FITC, Ex465-495, DM505, BA 515-555) para observar la emisión de GFP y/o el rojo (TRITC, Ex540/25, DM565, BA605/55) para observar la emisión de RFP.

3.4 Ensayo de proliferación celular: MTS

Nuestro objetivo era determinar si las mutaciones encontradas en los genes de la familia Cbl afectaban a la función de estas proteínas, aumentándola o disminuyéndola. Esto se traduciría en un aumento o disminución, respectivamente, de la ubiquitinación de otras proteínas. La mayor parte de las mutaciones descritas hasta la fecha en *C-CBL* corresponden a mutaciones con cambio de sentido que conducen a la disminución o pérdida de la función de la proteína. Esto provoca una incapacidad de ubiquitinar proteínas como FLT3, lo que lleva a su aumento de la función de esta última, con un efecto transformante (Grand *et al*, 2009).

Una manera de comprobar este efecto es observar cambios en la proliferación celular. En principio, las mutaciones inactivantes de *C-CBL* deberían inducir un aumento en la proliferación celular y, en algunos casos, crecimiento independiente de factores de crecimiento en células dependientes de éstos. De esta manera, comparando la proliferación de las células con los plásmidos *WT* (*C-CBL*, *CBL-B* ó *CBL-C*) frente a las que tengan los plásmidos mutantes podremos determinar su posible efecto oncogénico.

Para ello, se empleó el sistema comercial *CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (#G3580, Promega Corp, Madison, WI), que consiste en un método colorimétrico no radiactivo que determina de manera rápida y sencilla el número de células viables en proliferación presentes en un cultivo. El reactivo contiene MTS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio, sal), análogo del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio bromuro), y un reactivo de acoplamiento de electrones (etosulfato de fenazina, PES *phenazine ethosulfate*). El MTS o reactivo de Owen es biorreducido por las células a un producto con color (formazán), soluble en el medio de cultivo gracias al PES. La cantidad de formazán producida por las células, cuya absorbancia se puede medir colorimétricamente a 490 nm, es directamente proporcional al número de células vivas (Cory *et al*, 1991; Buttke *et al*, 1993) (**Figura 23**).

La utilización de MTS frente a MTT tiene la ventaja de su sencillez y rapidez, ya que consiste en un único reactivo soluble y no es necesario añadir disolventes orgánicos posteriormente. Actualmente, este sistema es utilizado, además de para ensayos de proliferación y viabilidad celular, para ensayos de citotoxicidad, quimiosensibilidad y quimiotaxis (Soman *et al*, 2009; Wang *et al*, 2010).

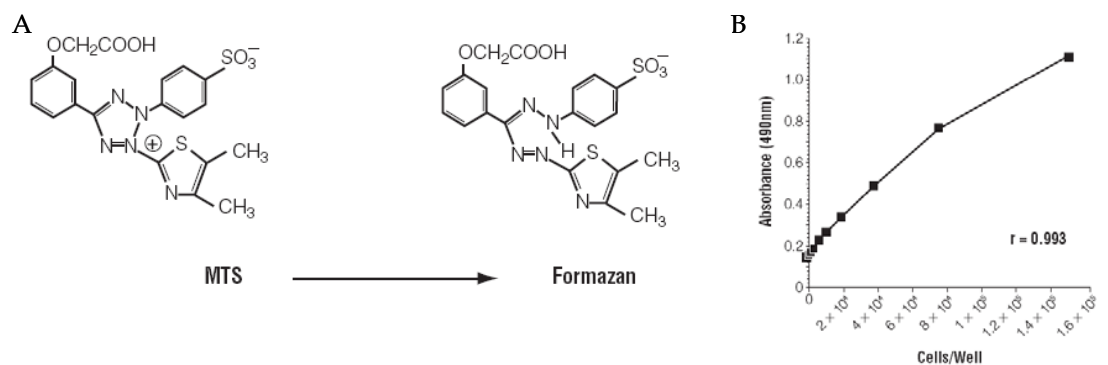


Figura 23: A) Reducción química del MTS a formazán que se lleva a cabo dentro de las células. Esta conversión va acompañada por una producción de NADPH o NADH por enzimas deshidrogenasas en las células metabólicamente activas. La cantidad de formazán producida depende de la actividad metabólica de las células del cultivo y es proporcional al número de células vivas. B) Ejemplo de un estudio de este tipo. Se ha medido la absorbancia del formazán (eje de ordenadas) producido a 490 nm, en varias diluciones de células $\beta 2$ hibridoma (eje de abscisas), tras 1 h de reacción con el MTS a 37°C. Imagen obtenida de <http://www.promega.com/tbs/tb245/tb245.pdf>.

En nuestro caso, realizamos los ensayos con MTS a partir de las 48-72 h posteriores a realizar cada una de las nucleofecciones (dependiendo del tipo celular), durante 4-6 días. Durante el primer día del ensayo contamos las células y las resuspendimos a una concentración de 100 células/ μL de medio. Con esta suspensión rellenamos las 6 primeras filas de una placa ELISA estéril de 96 pocillos (de tal manera que tuviéramos una fila por cada día de realización del ensayo MTS). Esto lo realizamos por triplicado con 10.000 células resuspendidas en 100 μL de medio en cada uno. De esta manera, el número de células de partida fue el mismo para cada ensayo (**Figura 24**). En tres de los pocillos vacíos de la placa se añadió 100 μL de medio de cultivo completo (el mismo en el que se encuentran las células), cuya absorbancia fue considerada como blanco de referencia. Una vez rellenada toda la placa, se añadieron 20 μL de reactivo MTS (previamente calentado a 37 °C) a cada uno de los pocillos de la primera fila (ensayo del día 1) y a los pocillos con medio completo sin células (blancos). Tras ello, la placa se incubó durante 3 h en la estufa a 37 °C/5 % CO_2 , tras lo cual se midió la absorbancia a 492 nm en un lector *Multiskan Ex Microplate Photometer* (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EE. UU.). Una vez realizada la medida, la placa se devolvió al incubador para que las células del resto de pocillos continuaran su crecimiento y realizar las medidas de los días posteriores con la misma metodología (**Figura 24**). En todos los casos se incluyó en el medio de cultivo geneticina (G418, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), para asegurarnos que observamos únicamente la proliferación correspondiente a las células transfectadas con el vector.

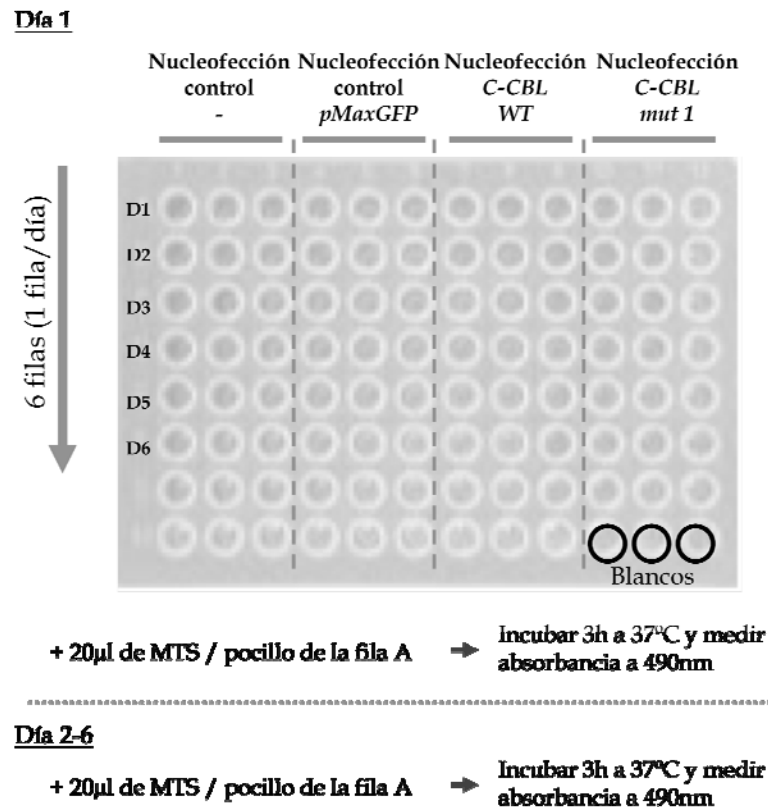


Figura 24. Ensayo MTS. Transcurridas 48-72 h tras la nucleofección (dependiendo del tipo celular) las células se reparten en una placa estéril ELISA de 96 pocillos. Para cada nucleofección se rellenan 6 filas (una por cada día de medida) correspondientes a tres columnas (triplicados). En cada pocillo se colocan 10.000 células resuspendidas en 100 µL de medio completo. Además, en tres de los pocillos se coloca el mismo medio en el que están resuspendidas las células y cuya medida será considerada como blanco de referencia. Antes de la medición de la absorbancia, se añade a cada fila (según el día) 20 µL de MTS y se deja 3 h en la estufa a 37 °C para que se lleve a cabo la bioreducción del MTS.

En el caso de las células 32D, dependientes de IL3, determinamos además si las mutaciones eran capaces de inducir su crecimiento de manera independiente a este factor de crecimiento. Para ello, los ensayos de MTS se realizaron de dos maneras, con y sin IL3 murina en el medio de cultivo de las células de cada pocillo.

3.5 Contaje celular mediante azul tripán

El azul tripán (*trypan blue*), azul de diamina o azul Niágara, es un colorante aniónico del grupo de los colorantes azoicos. Se trata de una molécula grande y coloidal capaz de introducirse en las células que presentan roturas en la membrana (que se observan de color azul), pero incapaz de atravesar la membrana de las células vivas (que permanecen blancas). De esta manera, observando las células a microscopio podemos diferenciar la viabilidad celular en función de su tinción (Allison & Ridolpho, 1980), lo que nos permite a su vez de una manera rápida y sencilla conocer el número de células vivas de un cultivo.

En nuestro caso, realizamos este análisis añadiendo azul de tripán en proporción 1:1 a las células transfectadas en cultivo a las 48 y 72h tras la nucleofección. A continuación, se colocan 10 μ L de la mezcla a cada lado de una cámara de recuento tipo *Neubauer* (BLAUBRAND®, Brand GmbH Co KG, Wertheim, Alemania) para contar las células vivas (blancas) y muertas (azules) con un microscopio de contraste de fases (*Nikon Eclipse TS100*, Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japón) (Figura 25) A pesar de que es un método mucho menos sensible que el MTS para determinar con exactitud la proliferación celular, nos permite confirmar los resultados obtenidos en los ensayos de MTS.

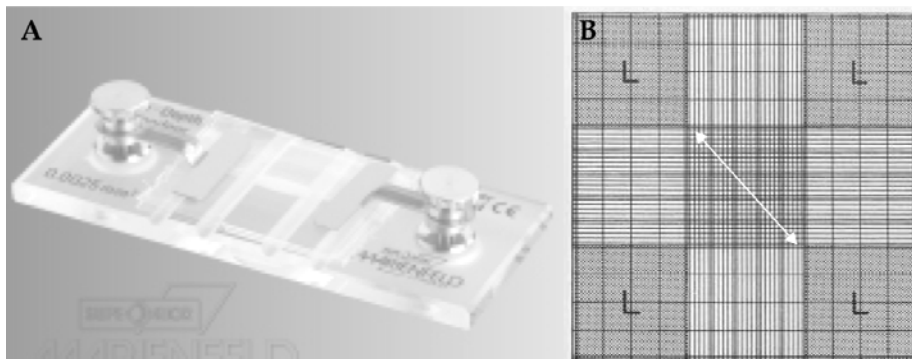


Figura: 25. A) Cámara de recuento celular similar a la utilizada. B) La cuadrícula de recuento muestra 9 cuadrados grandes, cada uno de 1 mm². Los cuatro cuadrados grandes de las esquinas (L) se encuentran divididos en 16 cuadrados más pequeños con aristas de 0,25 mm y se utilizan para el recuento de leucocitos. En cuadrado central grande se encuentra dividido en 25 cuadrados medianos con aristas de 0,2 mm. Cada cuadrado mediano está subdividido en 16 cuadrados pequeños con aristas de 0,05 mm y una superficie de 0,0025 mm². En nuestros ensayos, contamos el número de células vivas localizadas en la diagonal de la cuadrícula central, señalada con la flecha. Para conocer la proporción de las células vivas en el medio de cultivo empleamos la relación $X \times 5000 = \text{número de células} / \text{mL de medio}$, donde X es el número de células vivas contadas en la diagonal.

3.6 Análisis estadístico de los resultados de los ensayos funcionales

A partir de los datos obtenidos en los ensayos de proliferación, realizamos un análisis estadístico de los resultados. Determinamos si existían diferencias significativas en la tasa de crecimiento observada en cada una de las nucleofecciones en el grupo de pacientes frente al grupo control, mediante pruebas *t de Student* de una cola para muestras independientes. El valor de significación empleado fue de $p < 0,05$, empleando la herramienta UNStat anteriormente citada (<http://www.unav.es/departamento/genetica/unstat>).

Resultados

V. RESULTADOS

1 Análisis citogenético

1.1 Citogenética convencional: cariotipo de bandas G

El análisis citogenético convencional (cariotipo de bandas G) fue realizado por el personal especializado del Servicio de Análisis Genéticos del Departamento de Genética de la Universidad de Navarra. Los datos más significativos se recogen en el **Anexo 2**.

1.2 Citogenética molecular: FISH (hibridación *in situ* con fluorescencia)

De manera previa a la realización de estos ensayos sobre el material de los pacientes, fue necesario optimizar y validar cada uno de ellos. Esto se realizó sobre suspensiones celulares obtenidas a partir del cultivo de sangre periférica de individuos control sin enfermedad.

Las suspensiones celulares de los pacientes se obtuvieron del banco de muestras archivadas en el Departamento de Genética. A pesar de la selección inicial de 44 pacientes, únicamente se obtuvieron suspensiones celulares de calidad de 34 casos y sólo en 24 de ellos fue posible realizar el análisis completo de todos los genes (ver **Anexo 7**).

1.2.1 Optimización de los ensayos de FISH

Las sondas *no comerciales* fueron empleadas siguiendo las indicaciones recogidas en el apartado 1.2.2 de *Material y Métodos*. Además, como se ha comentado, la disponibilidad de ensayos *comerciales* validados para los genes *ABL1* y *ABL2* nos permitió sustituir los ensayos tipo A no comerciales inicialmente diseñados. También empleamos una sonda *comercial* para el estudio de *ETV6*. Estas sondas *comerciales* se suministran marcadas y listas para su uso y se prepararon conforme a las instrucciones del fabricante. Debido al gran número de ensayos a realizar y a su elevado coste, empleamos con todas ellas un diluyente comercial en proporción 1/8 para las sondas de *ABL2* y *ETV6*, y de 1/4 para la de *ABL1*.

En todos los casos las condiciones del ensayo fueron optimizadas de manera individual para cada una de las sondas o combinaciones de éstas, sobre suspensiones celulares de individuos sin enfermedad (apartado 1.2.4 de *Material y Métodos*). En todos los casos, los mejores resultados se obtuvieron desnaturalizando por separado el material del paciente y la sonda. Debido a la cantidad de genes que se pretendía analizar y a la poca cantidad de material disponible de cada

paciente, se realizaron hasta cinco ensayos distintos en una misma extensión, empleando cubreobjetos de 12 mm de diámetro para cada uno. En los casos en los que se emplearon sondas *comerciales* y *no comerciales* en una misma extensión, empleamos las condiciones de lavado de las sondas *no comerciales*, aumentando ligeramente la temperatura (62 °C).

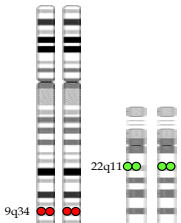
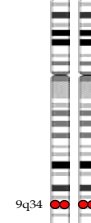
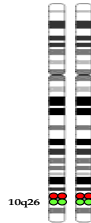


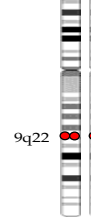


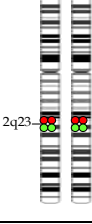




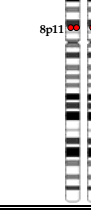
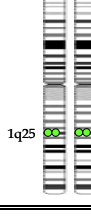
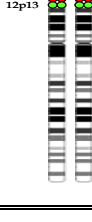
1.2.2 Validación de los ensayos FISH y estimación del valor umbral

De manera previa al análisis de los resultados en las muestras de pacientes, nos aseguramos de que las sondas hibridaban en la posición cromosómica correcta sobre metafases procedentes de individuos sanos.

Además, se estimó el valor umbral (*cut-off*) de cada ensayo, es decir, el número aproximado de núcleos en interfase procedentes de un individuo sano que presenta un patrón anormal de hibridación. Para ello, se analizaron 200 núcleos en interfase de 3 individuos sanos distintos, estableciendo como valor umbral la media de esos valores ± 3 DE. En la mayoría de los casos, este valor fue inferior al 5% (0,05) y sólo en el caso de la sonda *BCR-ABL1* (*comercial*) observamos un 6-10% de núcleos normales en los que se observaba una señal de fusión rojo-verde. Sin embargo, el diseño de esta sonda indica que un resultado positivo con la misma debería mostrar dos señales de fusión (para *BCR-ABL1* y *ABL1-BCR*), y dicho patrón no se observó en ningún caso control.

Como era de esperar, las sondas *comerciales* para *ABL2* y *ETV6* hibridaban en la posición adecuada. En el caso de las sondas *no comerciales* (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FGFR4*, *SYK* y *ZAP70*) también lo hicieron, excepto en el caso del ensayo A de *FGFR3*. En este caso, además de obtener hibridación en la posición correcta (4p16), se observaban dos señales separadas (una roja y una verde) e inespecíficas, correspondientes a las sondas derivadas de los clones RP11-572O17 y RP11-1150B4, que fueron eliminadas del ensayo definitivo. La **tabla 1** muestra las sondas empleadas para cada gen, el tipo de sonda y fluorocromo empleado y el patrón de hibridación característico de cada una.

Tabla 1: Sondas empleadas en el análisis mediante FISH de los genes TK. La tabla recoge el tipo de sonda y fluorocromo empleado y el patrón normal de hibridación en cada caso. La observación de un resultado distinto al presentado en la tabla, indicaría la presencia de una alteración en la región cromosómica donde se encuentran situados estos genes.

ENSAYO A	ENSAYO B	ENSAYO A	ENSAYO B
<p>ABL1 (9q34) comercial</p> <p>(LSI BCR/ABL ES Dual Color Translocation)*</p>  <p>9q34 22q11</p> <p>Resultado normal: dos señales rojas (ABL1) y dos verdes (BCR) separadas</p>	<p>ABL1 (9q34) No comercial RP11-83J21</p>  <p>9q34</p> <p>Resultado normal: dos señales rojas</p>	<p>FGFR2 (10q26) No comercial RP11-78A18 RP11-255D5 RP11-7P17 RP11-466C13</p>  <p>10q26</p> <p>Resultado normal: dos señales de fusión rojo (5')-verde (3')</p>	<p>FGFR2 (10q26) No comercial RP11-62L18</p>  <p>10q26</p> <p>Resultado normal: dos señales rojas</p>
<p>SYK (9q22) No comercial RP11-80J10 RP11-1108P17 PR11-652P7 RP11-95G21</p>  <p>9q22</p> <p>Resultado normal: dos señales de fusión rojo (5')-verde (3')</p>	<p>SYK (9q22) No comercial RP11-21P2</p>  <p>9q22</p> <p>Resultado normal: dos señales rojas</p>	<p>FGFR3 (4p16) No comercial RP11-42F9 PR11-262P20</p>  <p>4p16</p> <p>Resultado normal: dos señales de fusión rojo (5')-verde (3')</p>	<p>FGFR3 (4p16) No comercial RP11-241P10</p>  <p>4p16</p> <p>Resultado normal: dos señales rojas</p>
<p>ZAP70 (2q23) No comercial RP11-082A11 RP11-542D13 PR11-73B20S RP11-63L6</p>  <p>2q23</p> <p>Resultado normal: dos señales de fusión rojo (5')-verde (3')</p>	<p>ZAP70 (2q23) No comercial RP11-173M4</p>  <p>2q23</p> <p>Resultado normal: dos señales rojas</p>	<p>FGFR4 (5q35) No comercial RP11-606E24 CTC-340P19 PR11-99N22 CTC-549A4</p>  <p>5q35</p> <p>Resultado normal: dos señales de fusión rojo (5')-verde (3')</p>	<p>FGFR4 (5q35) No comercial RP11-286C20</p>  <p>5q35</p> <p>Resultado normal: dos señales rojas</p>
<p>FGFR1 (8p11) No comercial RP11-675F6 RP11-118H9 PR11-265K5 RP11-90P5</p>  <p>8p11</p> <p>Resultado normal: dos señales de fusión rojo (5')-verde (3')</p>	<p>FGFR1 (8p11) No comercial RP11-100B16</p>  <p>8p11</p> <p>Resultado normal: dos señales rojas</p>	<p>ABL2 (1q25) Comercial (LSI 1p36/LSI 1q25 and LSI 19q13/19p13 Dual Color Probe)</p>  <p>1p36 1q25</p> <p>Resultado normal: dos señales rojas (1p36) y dos verdes (ABL2)</p>	<p>ETV6 (12p13) Comercial (LSI ETV6-TEL Dual Color Breakapart Probe)***</p>  <p>12p13</p> <p>Resultado normal: dos señales de fusión rojo (5')-verde (3')</p>

1.2.3 Análisis FISH en muestras de pacientes

Una vez comprobada la correcta hibridación de cada una de las sondas y optimizado el proceso de hibridación, realizamos el estudio sobre extensiones celulares con material procedente de las muestras de los pacientes. En todos los casos se analizaron un mínimo de 200 núcleos en interfase, además de las metafases que se pudieron encontrar en las regiones hibridadas.

La sonda comercial de *ABL1* se analizó en los 34 pacientes de los que se disponía de suficiente material. Como se esperaba, ninguno de ellos mostró un resultado congruente con la presencia de la fusión *BCR-ABL1*. Ninguno mostró tampoco alteraciones en el patrón de hibridación de *ABL1* (**Figura 1B**, señal roja). En algún caso dudoso, se realizó el ensayo B con la sonda no comercial diseñada para este gen (**Figura 2**), que descartó la presencia de alteraciones en el *locus* 9q34.

Los ensayos comerciales empleados para comprobar la posible alteración de *ABL2* (**Figura 1A**, señal verde) o *ETV6* (**Figura 1C**), tampoco mostraron patrones alterados en ningún paciente.

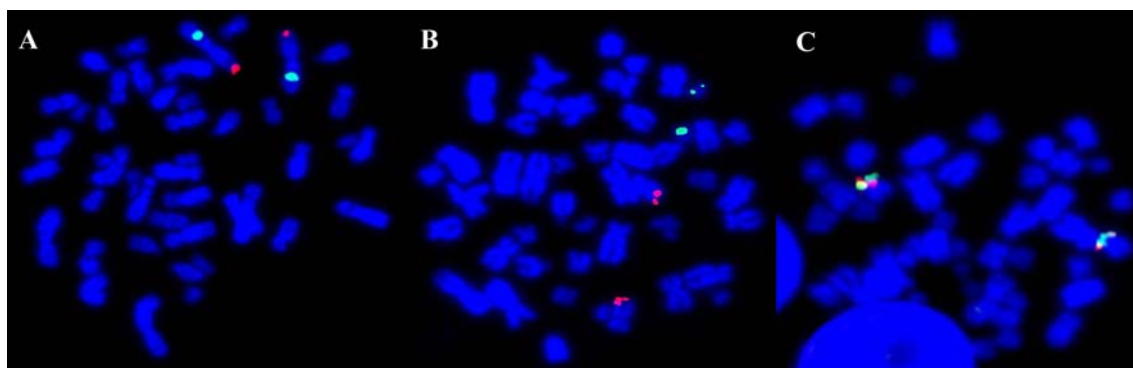


Figura 1: Resultados del análisis mediante FISH con las sondas comerciales en metafases de distintos pacientes. A) Patrón de hibridación característico de la sonda comercial utilizada para *ABL2*. En este ensayo *ABL2* (1q25) se marca en verde y la región 1p36 en rojo. Como puede observarse, los dos cromosomas 1 muestran ambas señales intactas. B) Hibridación de la sonda para la detección de la fusión *BCR-ABL1*. En este caso, el patrón de hibridación indica que *ABL1* (rojo) no se encuentra alterado (9q34), al igual que *BCR* (22q11). En caso de que el paciente presentara la fusión *BCR-ABL1*, deberíamos observar dos señales de fusión rojo-verde, correspondientes a *BCR-ABL1* y a su recíproco *ABL1-BCR*, además de una señal verde y una roja intactas correspondientes a los cromosomas no implicados en la translocación. C) Hibridación obtenida en un paciente con la sonda para *ETV6* (12p13). Al tratarse de una sonda *breakapart*, la presencia de las dos señales de fusión indican un resultado normal.

Ninguno de los pacientes presentó patrones anormales de hibridación distintos de los presentados en la tabla 1 para ninguna de las sondas empleadas (**Figura 3**). Todos estos resultados se recogen en el **Anexo 7**.

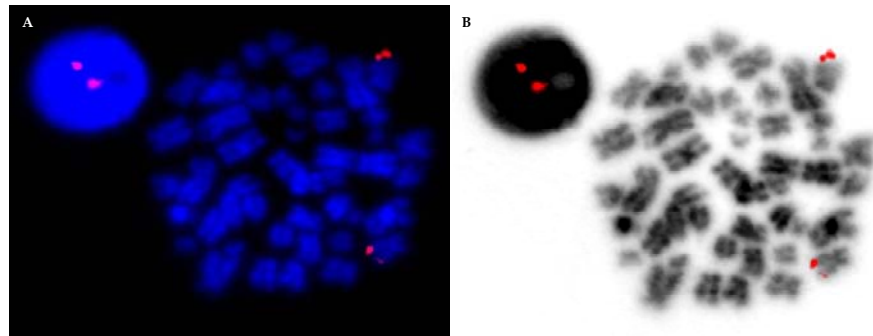


Figura 2: Hibridación de la sonda *no comercial* correspondiente al ensayo B de *ABL1* (9q34, marcada en rojo). La obtención de dos señales rojas en núcleos en interfase indica un resultado normal. A) Imagen capturada de forma normal, con el DAPI marcando todo el DNA. B) Imagen invertida en la que puede apreciarse mejor cada uno de los cromosomas. Las señales rojas corresponden a *ABL1* (9q34).

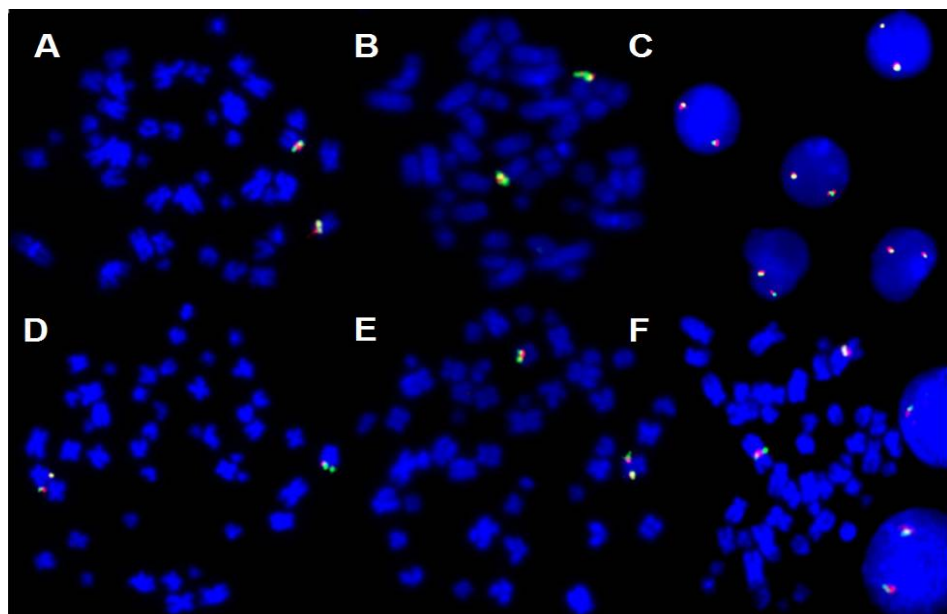


Figura 3: Resultados obtenidos en muestras de pacientes con el ensayo A de cada sonda *no comercial*. A) Hibridación en metafase característica de *FGFR1* (8p11). B) Hibridación en metafase característica de *FGFR2* (10q26). C) Núcleos en interfase con un patrón normal de hibridación para *FGFR3* (4p16). D) Hibridación en metafase característica de *FGFR4* (5q35). E) Hibridación en metafase característica de *SYK* (9p22). F) Hibridación en metafase característica de *ZAP70* (2q12). En ninguno de los casos se observó alteración en el patrón de hibridación superior al valor umbral o *cut-off* de cada uno de los ensayos.

2 Análisis molecular

2.1 dHPLC: cromatografía líquida de alta resolución desnaturizante

Además del análisis FISH, se llevó a cabo un análisis o cribado de posibles alteraciones en la secuencia de los genes TK (familias Abl, Syk, Fgfr y gen *EGFR*) y de la familia Cbl (genes *C-CBL*, *CBL-B* y *CBL-C*), en muestras de DNA genómico obtenidas de los mismos 44 pacientes seleccionados inicialmente. Para ello, empleamos la dHPLC o cromatografía líquida de alta resolución en gradiente desnaturizante. Esta técnica analítica permite detectar cambios a nivel de secuencia (sustituciones y pequeñas deleciones o inserciones) en el DNA.

2.1.1 Diseño, optimización y validación de los análisis mediante dHPLC

Como se ha indicado en el apartado 2.2.1 de *Material y Métodos*, la selección de los fragmentos a analizar en cada gen se realizó basándonos en los datos recogidos en *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>), sobre su estructura genómica y proteica. En primer lugar, fue necesario diseñar una pareja de cebadores para la amplificación mediante PCR de cada uno de los fragmentos. Además, para generar un fragmento control mutante se diseñó otro cebador a partir de uno de los anteriores, pero con un nucleótido cambiado (cebador mutante). La amplificación de una muestra de DNA normal con este cebador generaría un fragmento con una mutación (DNA mutante control).

El número de fragmentos analizados en cada caso de los genes TKs fueron 10 para *SYK*, 9 para *ZAP70*, 7 para *ABL1* y *ABL2*, 11 para *FGFR1* y *EGFR*, 9 para *FGFR3* y 10 para *FGFR2* y *FGFR4*. En el caso de los genes Cbl, el número de fragmentos analizados fueron 15 para *C-CBL*, 19 para *CBL-B* y 10 para *CBL-C*. La secuencia y longitud de los cebadores diseñados, las condiciones de las reacciones de PCR y las temperaturas de análisis mediante dHPLC para cada fragmento se recogen en los **anexos 3** (genes TK) y **4** (genes Cbl).

A continuación, optimizamos las condiciones de cada reacción de amplificación mediante PCR (apartado 2.2.2 de *Material y Métodos*) y realizamos la predicción de las temperaturas de análisis para cada fragmento, validándolas empleando los heterodúplex control-mutante. Estos heterodúplex se crearon mezclando, en proporción 1:1, los productos de PCR amplificados con los cebadores normales y con los mutantes, y sometidos a condiciones de desnaturización y renaturalización (apartado 2.2.2 de *Material y Métodos*). Todos estos ensayos de optimización y validación se realizaron empleando DNA genómico de individuos control sin enfermedad. Tras

ello, se procedió al estudio de las muestras procedentes de los pacientes a partir de DNA genómico previamente amplificado mediante WGA (apartado 2.1.3 de *Material y Métodos*). Las muestras que presentaron un perfil de elución diferente del resto se analizaron mediante secuenciación (Secugen, Madrid, España), con el fin de conocer el cambio en la secuencia que provocaba esa diferencia. En los fragmentos en los que fueron varias las muestras con un perfil distinto, se procedió a este análisis en dos muestras representativas de cada uno de los perfiles, ya que el perfil de elución suele ser específico del cambio.

Todos los fragmentos en los que se detectaron diferencias de elución fueron analizados posteriormente en 20 muestras control sin enfermedad, para comprobar si correspondían a polimorfismos poblacionales frecuentes. Teniendo en cuenta el número de fragmentos de cada gen analizados, las temperaturas de cada uno de ellos y el número de muestras finales analizadas para cada fragmento, los análisis finales realizados mediante dHPLC fue de 18.060 (**Tabla 2**).

Tabla 2. Análisis realizados mediante dHPLC para cada gen analizado, teniendo en cuenta el número de exones de cada gen, temperaturas y número de muestras analizadas de cada fragmento.

	Gen	Nº análisis dHPLC realizados*
Genes TK	<i>ABL1</i>	648
	<i>ABL2</i>	776
	<i>SYK</i>	1088
	<i>ZAP70</i>	708
	<i>FGFR1</i>	908
	<i>FGFR2</i>	844
	<i>FGFR3</i>	772
	<i>FGFR4</i>	924
	<i>EGFR</i>	884
	Genes Cbl	<i>C-CBL</i>
<i>CBL-B</i>		3468
<i>CBL-C</i>		2116
Total		18060

El análisis estadístico de los resultados (apartado 2.2.5 de *Material y Métodos*) se realizó empleando varias herramientas informáticas (pruebas de contingencia 2x2 y 2x3) con un umbral de significación de $p < 0.01$, dado el reducido tamaño de nuestros conjuntos de muestras. En el caso de los SNPs detectados para los que se disponía de datos sobre la frecuencia en la población europea recogidos en *dbSNP* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>), se añadieron estas frecuencias a los resultados obtenidos en el grupo de controles en un análisis separado.

Además, para cada uno de los cambios detectados se predijo el posible efecto en el *splicing* o ajuste de exones mediante la herramienta *Human Splicing Finder* (HSF, <http://www.umd.be/SSF/>) (apartado 2.2.6 de *Material y Métodos*).

2.1.2 Genes TK

2.1.2.1 Genes de la familia Abl

En el caso de *ABL1*, diseñamos ensayos para analizar los exones correspondientes a los dominios SH3, SH2 y TK (exones 4 a 10), la mayor parte de la región codificante del gen. En casi todos los fragmentos analizados las muestras se agruparon en un único perfil de elución, lo que indicaba la ausencia de cambios de secuencia. De hecho, sólo se detectaron tres cambios de secuencia (Tabla 3), correspondientes a un SNP ya descrito (rs2227985, g.166196A>G) y a dos variantes no descritas hasta el momento. Una de ellas (g.149123C>T), fue encontrada en un paciente con TE (i: 17826; c: 24241) y la otra (g.166228C>T) en un individuo control (i: 23695; c: 409.3). Ambos cambios se encuentran en intrones (5 y 10 respectivamente) y, según *Human Splicing Finder*, no parecen tener influencia en el corte y empalme de exones.

Tabla 3: Resultados obtenidos en análisis mediante dHPLC de *ABL1* en los 44 pacientes y 20 controles del estudio.

Localización	Tipo de cambio	Efecto	Frecuencias genotípicas en pacientes	Frecuencias genotípicas en sanos		Análisis estadístico (IC95%)	Análisis estadístico (controles+ <i>dbSNP</i>) (IC95%)
				Controles del estudio	Controles + datos <i>dbSNP</i>		
Intrón 5	g.149123C>T	Sin efecto importante en el <i>splicing</i> ²	1 TE				
		p.E499E				p= 0,580 ⁴	p= 0,284 ⁴
Exón 10	rs2227985 ¹	Crea un sitio potencial de <i>splicing</i> y una secuencia reguladora de <i>splicing</i> ²	AA:30/42 (0,71)	AA:16/200 (0,80)	AA:106/124 (0,85)*	p >0,05 ⁵	p = 0,2238 ⁵
	g.166196A>G		AG:12/42 (0,29)	AG:4/20 (0,20)	AG:17/124 (0,13)*	OR: 2,000	OR:1,611
			GG: 0/42 (0,00)	GG: 0/20 (0,00)	GG:1/124 (0,01)*	(0,939-4,266)	(0,728-3,570)
			p ³ : 0,57	p ³ : 1,00	p ³ : 0,51*	RR: 1,613	RR: 1,524
						(0,954-2,468)	(0,753-3,061)
Intrón 10	g.166228 C>T	Sin efecto importante en el <i>splicing</i> ²	1 Control				

* Datos referidos a las frecuencias genotípicas en normales sumando al grupo control los datos recogidos en *dbSNP* para población europea (*CEU-HapMap*).

¹ [http://www.ensembl.org/ \(ENSG00000097007\)](http://www.ensembl.org/ (ENSG00000097007))

² El efecto sobre el *splicing* se analizó mediante la herramienta [http://www.umd.be/SSF/ \(ENST00000318560\)](http://www.umd.be/SSF/ (ENST00000318560))

³ Análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. <http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>

⁴ Prueba de Fisher para comparar frecuencias alélicas. Valores y límites de Cociente de verosimilitudes (OR) y riesgo relativo (RR) observados <http://statpages.org/ctab2x2.html>

⁵ Prueba χ^2 de contingencia para comparar frecuencias genotípicas <http://www.webcalculator.co.uk/statistics/x2f91.htm>

El único SNP detectado en *ABL1* (rs2227985, g.166196A>G), se encuentra situado en el exón 10 (codificante para el dominio TK) y es silencioso (p.E499E). Sin embargo, HSF predice que este cambio rompe un sitio de ajuste y una secuencia reguladora de éste. El análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas no muestra diferencias ($p > 0,05$) en el grupo de pacientes frente al grupo control. Si sumamos a nuestras frecuencias alélicas y genotípicas control las recogidas para este polimorfismo en *dbSNP* para la población europea, tampoco se observan diferencias significativas con respecto al grupo de pacientes.

Como en el caso de *ABL1*, en *ABL2* también se analizaron los exones correspondientes a los dominios SH3, SH2 y TK (exones 5 a 11), obteniéndose también un único perfil de elución en la mayor parte de los fragmentos. Solo se encontraron dos variantes de secuencia (**Tabla 4**), correspondientes a SNPs ya descritos. El primero de ellos (rs2171959, g110886A>G), se encuentra situado en el intrón 7 y no parece tener efecto en el *splicing*. La posición de este SNP, en un extremo del fragmento a analizar, hizo que resultara imposible el correcto genotipado de todos los individuos ya que no fuimos capaces de diferenciar ambos tipos de homocigotos. El otro SNP (rs2274230, g114740A>C), está situado en el exón 10, que codifica el dominio TK. Este cambio de secuencia es también silencioso (p.L498L), aunque el análisis mediante la herramienta *HSF* predice una rotura de un sitio potencial de *splicing* y de una secuencia reguladora. Sin embargo, los análisis estadísticos de frecuencias alélicas y genotípicas entre el grupo de pacientes y controles no muestran diferencias de distribución entre ambos ($p > 0.05$).

Tabla 4: Resultados obtenidos en el análisis mediante dHPLC de *ABL2* en los 44 pacientes y 20 controles del estudio.

Localización	Tipo de cambio	Efecto	Frecuencias genotípicas en pacientes	Frecuencias genotípicas en sanos		Análisis estadístico (IC95%)	Análisis estadístico (controles+ <i>dbSNP</i>) (IC95%)
				Controles del estudio	Controles + datos <i>dbSNP</i>		
Intrón 7	rs2171959 ¹ g.110886A>G	Sin efecto importante en el <i>splicing</i> ²		No fue posible el correcto genotipado de este polimorfismo			
		p.L498L				p= 0,150 ⁴	p= 0,107 ⁴
Exón 10	rs2274230 ¹ g.114740 A>C	Rompe un sitio potencial de <i>splicing</i> y una secuencia reguladora de <i>splicing</i> ²	AA: 33/37 (0,89) AC: 4/37 (0,11) CC: 0/37 (0,00)	AA: 14/18 (0,78) AC: 3/18 (0,17) CC: 1/18 (0,06)	AA: 60/78 (0,77) * AC: 16/78 (0,21) * CC: 2/78(0,02) *	p= 0,2772 ⁵ OR:2,823 (0,763-10,418) RR:1,559 (0,921-3,681)	p= 0,2498 ⁵ OR:2,574 (0,883-7,456) RR:2,039 (0,920-5,188)
			p ³ : 1,00	p ³ : 0,25	p ³ : 0,35 *		

* Datos referidos a las frecuencias genotípicas en normales sumando al grupo control los datos recogidos en *dbSNP* para población europea (*CEU-HapMap*).

¹ <http://www.ensembl.org/> (ENSG00000143322)

² El efecto sobre el *splicing* se analizó mediante la herramienta <http://www.umd.be/SSF/> (ENST00000344730)

³ Análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. <http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>

⁴ Prueba de Fisher para comparar frecuencias alélicas. Valores y límites de Cociente de verosimilitudes (OR) y riesgo relativo (RR) observados <http://statpages.org/ctab2x2.html>

⁵ Prueba χ^2 de contingencia para comparar frecuencias genotípicas <http://www.webcalculator.co.uk/statistics/x2f91.htm>

2.1.2.2 Genes de la familia Syk

En el estudio mediante dHPLC de *ZAP70*, se analizaron los exones codificantes de los dominios SH2 y TK (exones 3, 4 y 9 a 15), de nuevo la mayor parte de su secuencia codificante. En este análisis se detectaron siete cambios de secuencia, de los que seis eran SNPs ya descritos (**Tabla 5**). El único cambio no descrito (g.10439_10440delC), fue detectado en el intrón 2 en un paciente con TE (i: 16659; c: 22291) y, según los resultados del análisis mediante la herramienta *HSF*, no parece tener efecto en el *splicing*. De los seis SNPs detectados en este gen, sólo el rs13002912 (g.21964T>C) podría tener un efecto en el *splicing*, ya que la herramienta *HSF* predice la formación de un nuevo sitio de ramificación. Sin embargo, este SNP se encuentra adyacente al rs34532595 (g.21636_21637delG), lo que hizo imposible diferenciar exactamente los genotipos

individuales en cada caso. Para el resto de SNPs, las frecuencias alélicas y genotípicas observadas en el grupo de pacientes no fueron diferentes de las obtenidas en los grupos de individuos sin enfermedad. En todos estos casos, cada uno de los grupos (pacientes y controles) cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg, indicando el correcto genotipado de los mismos.

Tabla 5: Resultados obtenidos en análisis mediante dHPLC de ZAP70 en los 44 pacientes y 20 controles del estudio.

Localización	Tipo de cambio	Efecto	Frecuencias genotípicas en pacientes	Frecuencias genotípicas en sanos		Análisis estadístico (IC95%)	Análisis estadístico (controles+ <i>dbSNP</i>) (IC95%)	
				Controles del estudio	Controles + datos <i>dbSNP</i>			
Intrón 2	g.10439_10440delC	No	1 TE					
			CC: 33/40 (0,828)	CC:16/20 (0,80)	CC:32/40 (0,80)	p=1,000 ³ p >0,05 ⁵	p=1,000 ⁴ p >0,05 ⁵	
Intrón 4	rs2289918 ¹	Sin efecto en <i>splicing</i> ²	CG: 7/40 (0,18)	CG: 4/20 (0,20)	CG: 8/40 (0,20)	OR ⁴ : 1,159 (0,340-3,980)	OR ⁴ : 1,159 (0,414-3,244)	
	g.11706 C>G		GG: 0/40 (0,00)	GG: 0/40 (0,00)	GG: 0/40 (0,00)			RR ⁴ : 1,052 (0,760-1,903)
			p ³ :1,00	p ³ :1,00	p ³ :1,00			
Intrón 9	rs34532595 ¹ g.21636_1637delG			No fue posible el correcto genotipado de este polimorfismo				
Intrón 10	rs13002912 ¹ g.21956T>C	Nuevo sitio de ramificación, Ruptura de secuencia reguladora de <i>splicing</i> ²		No fue posible el correcto genotipado de este polimorfismo				
Intrón 11	rs17488834 ¹ g.24117 G>T	Sin efecto importante en el <i>splicing</i> ²	GG:28/41 (0,68)	GG: 7/19 (0,37)	GG:35/78 (0,45)	p= 0,057 ⁴ p >0,05 ⁵ OR ⁴ :2,450 (1,006-5,978)	p=0,026 ⁴ p=0,0356 ⁵ OR ⁴ :2,220 (1,127-4,364)	
			GT:13/41 (0,32)	GT: 12/19 (0,63)	GT: 40/78 (0,51)			TT:0/41 (0,00)
			p ³ : 1,00	p ³ : 0,12	p ³ :0,058			
Exón 13	rs3192177 ¹ g.24481 G>A	p.E559E	GG: 23/40 (0,58)	GG: 7/20 (0,35)	GG: 36/78 (0,46)	p=0,135 ⁴ p=0,2475 ⁵ OR ⁴ : 1,926 (0,855-4,346)	p=0,359 ⁴ p=0,5062 ⁵ OR ⁴ : 1,384 (0,749-2,555)	
		Sin efecto importante en el <i>splicing</i> ²	GA: 15/40 (0,37)	GA: 11/20 (0,55)	GA: 37/78 (0,47)			AA:2/40 (0,05)
			p ³ : 1,00	p ³ : 0,65	p ³ : 0,42			
Exón 14	rs11678558 ¹ g.25960 G>A	SNP localizado en una región no codificante ²	GG: 24/39 (0,62)	GG: 9/20 (0,45)	GG: 37/78 (0,47)	p=0,351 ⁴ p >0,05 ⁵ OR ⁴ :1,593 (0,662-3,845)	p=0,153 ⁴ p = 0,2127 ⁵ OR ⁴ :1,650 (0,856-3,175)	
			GA: 15/39 (0,38)	GA: 11/20 (0,55)	GA: 38/78 (0,49)			AA:0/39 (0,00)
			p ³ :1,00	p ³ : 0,26	p ³ : 0,98			

* Datos referidos a las frecuencias genotípicas en normales sumando al grupo control los datos recogidos en *dbSNP* para población europea (CEU-HapMap).

¹ <http://www.ensembl.org/> (ENSG00000115085)

² El efecto sobre el *splicing* se analizó mediante la herramienta <http://www.umd.be/SSF/> (ENST00000264972)

³ Análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. <http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>

⁴ Prueba de Fisher para comparar frecuencias alélicas. Valores y límites de Cociente de verosimilitudes (OR) y riesgo relativo (RR) observados <http://statpages.org/ctab2x2.html>

⁵ Prueba χ^2 de contingencia para comparar frecuencias genotípicas <http://www.webcalculator.co.uk/statistics/x2f91.htm>

En el caso de *SYK* también se analizaron los exones correspondientes a los dominios SH2 y TK (exones 4 a 7 y 11 a 15). En este caso, se detectaron once cambios de secuencia, pero todos ellos eran SNPs previamente descritos (**Tabla 6**). En algunos fragmentos, como los que contienen los exones 12 y 13, el número de cambios detectados era tan numeroso que no fue posible diferenciar a qué cambio correspondía cada perfil de elución diferente. Esto impidió genotipar de manera exacta siete de los once SNPs detectados (cuatro en fragmento correspondiente al exón 12 y tres en el 13). Ninguno de los once polimorfismos tenía efecto en la proteína codificada ni diferencias en cuanto a la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas entre los grupos de individuos con y sin enfermedad. Sólo en el caso de rs158689 (g.93693A>T), situado en el intrón 14 del gen, se obtuvo un valor de cercano a la significación ($p=0.017$) al comparar las frecuencias alélicas del grupo de pacientes con el grupo de controles (una vez sumados los datos recogidos en *dbSNP*). Sin embargo, los datos de frecuencias genotípicas muestran claramente que estas diferencias son mínimas.

Tabla 6: Resultados obtenidos en el análisis mediante dHPLC de SYK en los 44 pacientes y 20 controles del estudio

Localización	Tipo de cambio	Efecto	Frecuencias genotípicas en pacientes	Frecuencias genotípicas en sanos		Análisis estadístico (IC95%)	Análisis estadístico (controles+ <i>dbSNP</i>) (IC95%)	
				Controles del estudio	Controles + datos <i>dbSNP</i>			
Exón 4	rs35758162 ¹ g.42241 G>A	p.Q42Q Se rompe un sitio potencial de <i>splicing</i> ²	GG: 30/43 (0,70)	GG: 11/20 (0,55)	GG: 32/46 (0,70)	p= 0,626 ⁴	p= 1,000 ⁴	
			GA: 11/43 (0,25)	GA: 9/20 (0,45)	GA: 12/46 (0,26)	p= 0,2221 ⁵	p= 0,9966 ⁵	
			AA: 2/43 (0,05)	AA: 0/20 (0,00)	AA: 2/46 (0,04)	OR*:1,374	OR*:1,004	
			p ³ : 0,59	p ³ : 0,53	p ³ : 0,60	(0,554-3,421)	(0,467-2,155)	
Intrón 6	rs914928 ¹ g.60687 T>C	Sin efecto en <i>splicing</i> ²	TT: 0/43 (0,00)	TT: 1/20 (0,05)	TT: 2/80 (0,02)	p= 1,000 ⁴	p= 0,621 ⁴	
			TC: 19/43 (0,44)	TC: 6/20 (0,30)	TC: 27/80 (0,34)	p= 0,2189 ⁵	p= 0,3365 ⁵	
			CC: 24/43 (0,56)	CC: 13/20 (0,65)	CC: 51/80 (0,64)	OR*:1,134	OR*:1,180	
			p ³ : 0,093	p ³ : 1,00	p ³ : 0,72	(0,456-2,807)	(0,624-2,232)	
Intrón 11	rs290223 ¹ g.75778 C>G	Sin efecto en <i>splicing</i> ²	No fue posible el correcto genotipado de este polimorfismo					
			No fue posible el correcto genotipado de este polimorfismo					
Intrón 11	rs2290889 ¹ g.75781 G>A	Crea un sitio de ramificación, Rompe una	No fue posible el correcto genotipado de este polimorfismo					
			No fue posible el correcto genotipado de este polimorfismo					
Exón 12	rs2290888 ¹ g.75905 G>C	p.R433R Sin efecto en <i>splicing</i> ²	No fue posible el correcto genotipado de este polimorfismo					
			No fue posible el correcto genotipado de este polimorfismo					
Exón 12	rs2290887 ¹ g.75941G>A	p.L445L Crea un sitio aceptor Rompe una secuencia reguladora ²	No fue posible el correcto genotipado de este polimorfismo					
			No fue posible el correcto genotipado de este polimorfismo					
Exón 13	rs2306041 ¹ g.77107 C>T	p.Y506Y Sin efecto en <i>splicing</i> ²	No fue posible el correcto genotipado de este polimorfismo					
			No fue posible el correcto genotipado de este polimorfismo					
Exón 13	rs34231418 ¹ g.77125 C>T	p.F512F Se rompe un sitio Branch, Crea una secuencia reguladora	No fue posible el correcto genotipado de este polimorfismo					
			No fue posible el correcto genotipado de este polimorfismo					
Exón 13	rs2306040 ¹ g.77131 T>C	p.L514L Sin efecto en <i>splicing</i>	No fue posible el correcto genotipado de este polimorfismo					
			No fue posible el correcto genotipado de este polimorfismo					
Intrón 13	rs2126053 ¹ g.85947 T>A	Sin efecto en <i>splicing</i>	TT: 27/44 (0,62)	TT: 11/19 (0,58)	TT: 16/79 (0,20)	p= 0,655 ⁴	p= 0,659 ⁴	
			TA: 11/44 (0,25)	TA: 8/19 (0,42)	TA: 37/79 (0,47)	p= 0,1419 ⁵	p= 0,0431 ⁵	
			AA: 6/44 (0,13)	AA: 0/19 (0,00)	AA: 26/79 (0,33)	OR*:1,327	OR*:1,197	
			p ³ : 0,042	p ³ : 0,54	p ³ : 0,65	(0,540-3,241)	(0,669-2,139)	
Intrón 15	rs158689 ¹ g.93693 A>T	Sin efecto en <i>splicing</i>	AA: 21/41 (0,51)	AA: 11/20 (0,55)	AA: 25/80 (0,31)	p= 1,000 ⁴	p= 0,017 ⁴	
			AT: 18/41 (0,44)	AT: 8/20 (0,40)	AT: 41/80 (0,51)	p= 0,9584 ⁵	p= 0,0406 ⁵	
			TT: 2/41 (0,05)	TT: 1/20 (0,05)	TT: 14/80 (0,18)	OR*:1,100	OR*:2,068	
			p ³ : 0,71	p ³ : 1,00	p ³ : 0,82	(0,468-2,577)	((1,162-3,679)	
					RR*:1,031	RR*:1,633		
					(0,757-1,300)	(1,105-2,506)		

* Datos referidos a las frecuencias genotípicas en normales sumando al grupo control los datos recogidos en *dbSNP* para población europea (*CEU-HapMap*).

¹ <http://www.ensembl.org/> (ENSG00000165025)

² El efecto sobre el *splicing* se analizó mediante la herramienta <http://www.umd.be/SSF/> (ENST00000375754)

³ Análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. <http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>

⁴ Prueba de Fisher para comparar frecuencias alélicas. Valores y límites de Cociente de verosimilitudes (OR) y riesgo relativo (RR) observados <http://statpages.org/ctab2x2.html>

⁵ Prueba χ^2 de contingencia para comparar frecuencias genotípicas <http://www.webcalculator.co.uk/statistics/x2f91.htm>

2.1.2.3 Genes de la familia Fgfr

En todos los genes de la familia Fgfr (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* y *FGFR4*), se analizaron los exones codificantes de los dominios TM y TK ya que, según la bibliografía consultada, son los más frecuentemente alterados.

Tabla 7: Resultados obtenidos en el estudio mediante dHPLC del gen *FGFR1* en los 44 pacientes y 20 controles del estudio.

Localización	Tipo de cambio	Efecto	Frecuencias genotípicas en pacientes	Frecuencias genotípicas en sanos		Análisis estadístico (CI95%)	Análisis estadístico (controles+ dbSNP) (CI95%)
				Controles del estudio	Controles + datos dbSNP		
Intrón 18	rs17176009 ¹ g.49556 _49557delT	Sin efecto en <i>splicing</i>	TT: 39/42 (0,93)	TT: 18/20 (0,90)	TT: 77/88 (0,88) *	p =0,657 ⁴	p =0,281 ⁴
			T/-:3/42 (0,07)	T/-: 2/20 (0,10)	T/-:9/88 (0,10) *	p >0,05 ⁵	p =0,5120 ⁵
			-/-:0/42 (0,00)	-/-: 0/20 (0,00)	-/-:2/88 (0,02) *	OR: 1,421	OR: 1,631
			p ³ : 1,00	p ³ : 1,00	p ³ : 0,75 *	(0,273-7,458)	(0,555-1,631)
Intrón 25	rs4647904 ¹ g.54806 C>T	Sin efecto en <i>splicing</i>	CC: 41/43 (0,95)	CC: 20/20 (1,00)	CC: 53/53 (1,00) *	p =1,0000 ⁴	p =0,5250 ⁴
			CT: 2/43 (0,05)	CT: 0/20 (0,00)	CT: 0/53 (0,00) *	p >0,05 ⁵	p >0,05 ⁵
			TT:0/43 (0,00)	TT:0/20 (0,00)	TT:0/53 (0,00) *	OR: ∞	OR:∞
			p ³ : 1,00	p ³ : 1,00	p ³ : 1,00*	(0,240-∞)	(0,320-∞)
Exón 26	rs56341011 ¹ g.54887 G>A	p.L754L	GG 36/40 (0,90)	GG 20/20 (1,00)	No hay datos en dbSNP	p =0,300 ⁴	No hay datos en dbSNP
		Crea un potencial sitio de <i>splicing</i> y un nuevo sitio de ramificación	GA, 4/40 (0,10)	GA, 0/20 (0,00)	No hay datos en dbSNP	p >0,05 ⁵	No hay datos en dbSNP
		AA 0/40 (0,00)	AA 0/20 (0,00)	No hay datos en dbSNP	OR: ∞	(0,529-∞)	
		p ³ : 1,00	p ³ : 1,00	RR:1,526 (0,77-1,526)			

* Datos referidos a las frecuencias genotípicas en normales sumando al grupo control los datos recogidos en dbSNP para población europea (*CEU-HapMap*).

¹ <http://www.ensembl.org/> (ENSG00000077782)

² El efecto sobre el *splicing* se analizó mediante la herramienta <http://www.umd.be/SSF/> (ENST00000397091)

³Análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. <http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>

⁴Prueba de Fisher para comparar frecuencias alélicas. Valores y límites de Cociente de verosimilitudes (OR) y riesgo relativo (RR) observados <http://statpages.org/ctab2x2.html>

⁵Prueba χ^2 de contingencia para comparar frecuencias genotípicas <http://www.webcalculator.co.uk/statistics/x2f91.htm>

Como en los casos anteriores, también en la mayor parte de los fragmentos analizados de *FGFR1* (exones 18 a 27) las muestras se agruparon en un único perfil de elución. En este caso, sólo se observaron tres cambios de secuencia, correspondientes a tres SNPs descritos (Tabla 7). El análisis mediante la herramienta *HSF* de los dos primeros, rs17176009 (g.49556_49557delT) y rs4647904 (g.54806C>T), ambos situados en intrones, no indicó que pudieran tener efecto en el *splicing*. Sin embargo, en el caso de rs56341011 (g.54889G>A, p.L754L), localizado en el exón 26 (dominio TK) pero silencioso, el mismo estudio predijo la creación de un posible sitio de ramificación. El análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas de los tres SNPs, tampoco mostró en este caso que existieran diferencias significativas en su distribución entre el grupo de

individuos con y sin enfermedad. Como en los casos anteriores, las frecuencias genotípicas en ambos grupos cumplían el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 8: Resultados del análisis mediante dHPLC de *FGFR2*.

Localización	Tipo de cambio	Efecto	Frecuencias genotípicas en pacientes	Frecuencias genotípicas en sanos		Análisis estadístico CI95%	Análisis estadístico (controles+ <i>dbSNP</i>) CI95%
				Controles del estudio	Controles + <i>dbSNP</i>		
Intrón 23	rs41293763 ¹ g.1101725 C>T	Sin efecto en <i>splicing</i>	CC: 43/44 (0,98)	CC: 20/20 (1,00)	CC: 41/42 (0,98)*	p =1,0000 ⁴	p =1,0000 ⁴
			CT: 1/44 (0,03)	CT: 0/20 (0,00)	CT: 1/42 (0,02) *	p >0,05 ⁵	p >0,05 ⁵
			TT: 0/44 (0,00)	TT: 0/20 (0,00)	TT: 0/42 (0,00) *	OR:∞	OR:∞
			p ³ : 1,00	p ³ : 1,00	p ³ : 0,52 *	(0,117-∞)	(0,108-10,200)
Intrón 25	rs2981460 ¹ g.110929 A>G	Sin efecto en <i>splicing</i>	GG: 25/40 (0,62)	GG: 9/17 (0,53)	GG, 15/38 (0,40) *	p =0,613 ⁴	p =0,126 ⁴
			AG: 15/40 (0,38)	AG: 8/17 (0,47)	AG, 22/38 (0,58) *	p >0,05 ⁵	p >0,05 ⁵
			AA: 0/40 (0,00)	AA: 0/17 (0,00)	AA, 1/38 (0,02) *	OR:∞	OR:∞
			p ³ : 0,31	p ³ : 1,00	p ³ : 0,4 *	(0,516-3,461)	(0,892-3,537)
Intrón 25	rs2981461 ¹ g.110936 G>A	Rompe un posible sitio de ramificación	AA: 17/40 (0,43)	AA: 5/17 (0,29)	AA, 22/75 (0,29) *	p =0,529 ⁴	p =0,265 ⁴
			AG: 17/40 (0,42)	AG: 9/17 (0,53)	AG, 40/75 (0,53) *	p >0,05 ⁵	p =0,3611 ⁵
			GG: 6/40 (0,15)	GG: 3/17 (0,18)	GG, 13/75 (0,04) *	OR:1,388	OR:1,382
			p ³ : 0,73	p ³ : 1,00	p ³ : 0,53 *	(0,619-3,116)	(0,793-0,408)
Intrón 27	rs1613776 ¹ g.113139 G>A	Se crea un posible sitio de ramificación	GG: 40/42 (0,95)	GG: 15/17 (0,88)	GG, 34/39 (0,87) *	p =0,578 ⁴	p =0,263 ⁴
			AG: 2/42 (0,05)	AG: 2/17 (0,12)	AG, 5/39 (0,13) *	p >0,05 ⁵	p >0,05 ⁵
			AA: 0/42 (0,00)	AA: 0/17 (0,00)	AA, 0/39 (0,00) *	OR:2,563	OR:2,808
			p ³ : 0,53	p ³ : 0,53	p ³ : 0,53 *	(0,433-15,191)	(0,606-12,897)
Intrón 28	rs2278202 ¹ g.114776 C>T	Sin efecto en <i>splicing</i>	CT: 0,39	CT: 0,60	CT: 0,43 *	NA	NA

* Datos referidos a las frecuencias genotípicas en normales sumando al grupo control los datos recogidos en *dbSNP* para población europea (*CEU-HapMap*).

¹ [http://www.ensembl.org/ \(ENSG00000066468\)](http://www.ensembl.org/ (ENSG00000066468))

² El efecto sobre el *splicing* se analizó mediante la herramienta [http://www.umd.be/SSF/ \(ENST00000358487\)](http://www.umd.be/SSF/ (ENST00000358487))

³ Análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. <http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>

⁴ Prueba de Fisher para comparar frecuencias alélicas. Valores y límites de Cociente de verosimilitudes (OR) y riesgo relativo (RR) observados <http://statpages.org/ctab2x2.html>

⁵ Prueba χ^2 de contingencia para comparar frecuencias genotípicas <http://www.webcalculator.co.uk/statistics/x2f91.htm>

En el análisis de las regiones codificantes de los dominios TM y TK de *FGFR2* (exones 18, 19 y 22 a 29) tampoco encontramos variantes de secuencia no descritas previamente. En este caso detectamos cinco cambios correspondientes a SNPs, situados en las regiones intrónicas adyacentes a los exones codificantes del dominio TK (Tabla 8). En el caso del rs2278202 (g.114776C>T, intrón 16) no fue posible diferenciar ambos grupos de homocigotos, pero sí los heterocigotos. El análisis mediante *HSF* sólo predijo posibles efectos en el *splicing* para los polimorfismos rs2981461 y rs1613776. Tampoco el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas entre ambos grupos de individuos mostró diferencias significativas para ninguna de

estas variantes. El análisis de los SNPs de este gen mediante la herramienta *SNPStats* mostró un bloque haplotípico en el exón 26 del gen, entre los polimorfismos rs2981460 (g.110929A>G) y rs2981461 (g.110936G>A), ya que la mayor parte de las muestras que presentan el alelo G para rs2981460 tienen el alelo A para rs2981461.

Tabla 9: Resultados del análisis mutacional mediante dHPLC de *FGFR3* en los 44 pacientes y 20 controles del estudio.

Localización	Tipo de cambio	Efecto	Frecuencias genotípicas en pacientes	Frecuencias genotípicas en sanos			Análisis estadístico CI95%	Análisis estadístico (controles+ <i>dbSNP</i>) CI95%
				Controles del estudio	Controles + <i>dbSNP</i>			
Exón 10	rs17881656 ¹ g.11098 T>C	p.F384L Sin efecto en <i>splicing</i>	TT: 39/40 (0,98)	TT: 18/18 (0,10)	TT: 117/118 (0,99) *	p=1,000 ⁴	p=0,254 ⁴	
			TC: 1/40 (0,02)	TC: 0/18 (0,00)	TC: 1/118 (0,01) *	p>0,05 ⁵	p>0,05 ⁵	
			CC: 0/40 (0,00)	CC: 0/18 (0,00)	CC: 0/118 (0,00) *	OR:∞	OR:∞	
			p ³ :1,00	p ³ : 1,00	p ³ : 1,00*	(0,116-∞)	(0,766-∞)	
						RR:1,456	RR: 3,975	
						(0,299-1,456)	(0,815-3,975)	
Intrón 11	g.12225_12226i nsGCC	Sin efecto en <i>splicing</i>	1 TE					
Exón 13	rs3135897 ¹ g.12445 G>T	Sin efecto en <i>splicing</i>	GG: 37/39 (0,95)	GG: 16/17 (0,94)	GG: 100/104 (0,96) *	p=1,000 ⁴	p=0,666 ⁴	
			GT: 2/39 (0,05)	GT: 1/17 (0,06)	GT: 4/104 (0,04) *	p>0,05 ⁵	p>0,05 ⁵	
			TT: 0/39 (0,00)	TT: 0/17 (0,00)	TT: 0/104 (0,00) *	OR:1,152	OR:1,342	
			p ³ : 1,00	p ³ : 1,00	p ³ : 1,00*	(0,147-9,177)	(0,282-6,421)	
						RR:1,046	RR:1,333	
						(0,735-3,373)	(0,287-6,131)	
Exón 14	rs7688609 ¹ g.12861 G>A	Sin efecto en <i>splicing</i>	GG: 0/44 (0,00)	GG: 0/20 (0,00)	GG: 0/80 (0,000) *	Todas las muestras son AA	Todas las muestras son AA	
			GA: 0/44 (0,00)	GA: 0/20 (0,00)	GA: 0/80 (0,000) *			
			AA: 44/44 (1,00)	AA: 20/20 (1,00)	AA: 80/80 (1,000) *			
Intrón 16	rs3135899 ¹ g.13490 G>A	Sin efecto en <i>splicing</i>	GG: 40/42 (0,95)	GG: 17/18 (0,94)	GG: 36/38 (0,95) *	p=1,000 ⁴	p=1,000 ⁴	
			GA: 2/42 (0,05)	GA: 1/18 (0,06)	GA: 2/38 (0,05) *	p>0,05 ⁵	p>0,05 ⁵	
			AA: 0/42 (0,00)	AA: 0/18 (0,00)	AA: 0/38 (0,00) *	OR:1,171	OR:1-108	
			p ³ : 1,00	p ³ : 1,00	p ³ : 1,00*	(0,149-9,311)	(0,190-6,447)	
						RR:1,051	RR:1,051	
						(0,740-3,389)	(0,609-3,535)	

* Datos referidos a las frecuencias genotípicas en normales sumando al grupo control los datos recogidos en *dbSNP* para población europea (*CEU-HapMap*).

¹ <http://www.ensembl.org/> (ENSG00000068078)

² El efecto sobre el *splicing* se analizó mediante la herramienta <http://www.umd.be/SSF/> (ENST00000260795)

³ Análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. <http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>

⁴ Prueba de Fisher para comparar frecuencias alélicas. Valores y límites de Cociente de verosimilitudes (OR) y riesgo relativo (RR) observados <http://statpages.org/ctab2x2.html>

⁵ Prueba χ^2 de contingencia para comparar frecuencias genotípicas <http://www.webcalculator.co.uk/statistics/x2f91.htm>

En el análisis de *FGFR3* (exones 9 a 18) detectamos una variante no descrita como SNP en un paciente con TE (i: 16547; c: 22109). Este cambio, situado en el intrón 11, consistía en una inserción en heterocigosis de tres nucleótidos (g.12225_12226insGCC) sin efecto en el *splicing* (mediante análisis *HSF*). El resto de cambios detectados en este gen fueron SNPs ya descritos, sin efecto en la traducción o en el *splicing* (Tabla 9). Como en los casos anteriores, en todos los casos las frecuencias genotípicas cumplían el equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que indicaba su

correcto genotipado. El análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas no mostró, de nuevo, diferencias en la distribución de los distintos alelos entre los grupos de individuos con y sin enfermedad.

Por último, en *FGFR4* (exones 8 a 16) se detectaron siete cambios de secuencia, cinco correspondientes a SNPs descritos y dos a variantes de secuencia no descritas. La primera de estas variantes se detectó en el exón 10 (dominio TM) en un paciente con TE (i: 18708; c: 25667) y era silenciosa (g.6574 C>T, p.G435G) (**Figura 4**). La segunda variante, también silenciosa (g.6874 C>T, p.A501A), se encontró en el exón 11 (dominio TK) de otro paciente con TE (i: 14886; c: 19492). En este último caso, el análisis mediante *HSF* predijo un posible efecto en el *splicing* por pérdida de una secuencia de ramificación. En cuanto a los SNPs descritos, como en los casos anteriores, el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas no mostró diferencias entre los grupos de individuos con y sin enfermedad. Para todos ellos las frecuencias genotípicas se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que indicaba su correcto genotipado. En ninguno de los casos la herramienta *HSF* predijo efectos relevantes en el *splicing* (ver **Tabla 10**).

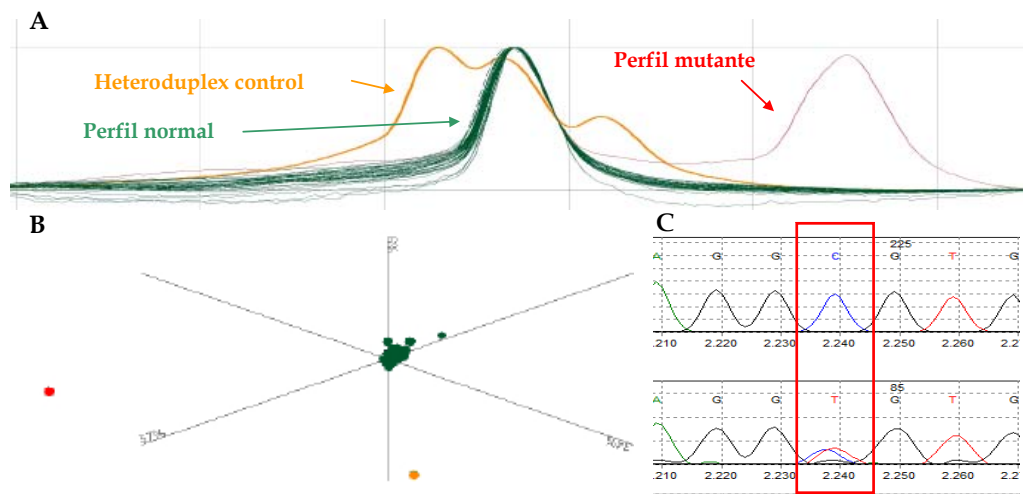


Figura 4: A) Perfil de elución de las muestras analizadas mediante dHPLC para el exón 10 de *FGFR4*. B) Diagrama de dispersión mostrado por el programa de análisis, que muestra el agrupamiento de los perfiles de elución anteriores. Como se puede observar, todas las muestras aparecen agrupadas (verde), excepto la correspondiente al i: 18708 (c: 25667; rojo). C) La secuenciación de la muestra con el perfil distinto muestra un cambio C>T en heterocigosis (parte superior perfil secuencia de referencia, parte inferior secuencia de la muestra).

Tabla 10: Resultados del análisis mediante dHPLC de *FGFR4* en los 44 pacientes y 20 controles del estudio.

Localización	Tipo de cambio	Efecto	Frecuencias genotípicas en pacientes	Frecuencias genotípicas en sanos		Análisis estadístico (IC95%)	Análisis estadístico (controles+)
				Controles del estudio	Controles + datos <i>dbSNP</i>		
Exón 9	rs351855 ¹ g.6357 G>A	p.G388R Sin efecto en <i>splicing</i>	GG, 12/41 (0,30)	GG, 6/19 (0,32)	GG, 42/94 (0,47) *	p= 0,324 ⁴	p=0,218
			GA, 24/41 (0,59)	GA, 6/19 (0,32)	GA, 41/94 (0,44) *	p=0,0536 ⁵	p=2208 ⁵
			AA, 5/41 (0,10)	AA, 7/19 (0,37)	AA, 11/94 (0,12) *	OR:1,569	OR:1,405
			p ³ : 0,33	p ³ : 0,16	p ³ : 0,82*	(0,729-3,378)	(0,826-2,391)
					RR:1,155	RR:1,232	
					(0,906-1,477)	(0,884-1,692)	
Exón 10	g.6574 C>T	p.G435G Sin efecto en <i>splicing</i>	1 TE				
Exón 11	g.6874 C>T	p.A501A Se rompe un sitio de ramificación	1 TE				
Exón 12	rs351854 ¹ g.8676 C>T	p.A553A Sin efecto en <i>splicing</i>	CC, 39/40 (0,98)	CC, 20/20 (1,00)	CC, 41/41 (1,00) *	p= 1,000 ⁴	p=0,494 ⁴
			CT, 1/40 (0,02)	CT, 0/20 (0,00)	CT, 0/41 (0,00) *	p >0,05 ⁵	p >0,05 ⁵
			TT, 0/40 (0,00)	TT, 0/20 (0,00)	TT, 0/41 (0,00) *	OR:∞	OR:∞
			p ³ : 1,00	p ³ : 1,00	p ³ : 1,00*	(0,129-∞)	(0,266-∞)
					RR:1,506	RR:2,038	
					(0,310-1,506)	(0,418-2,038)	
Intrón 12	rs42409 ¹ g.8842 C>T	Sin efecto en <i>splicing</i>	CC, 0/40 (0,00)	CC, 0/20 (0,00)	CC, 0/34 (0,0000) *	p= 0,800 ⁴	p= 0,660 ⁴
			CT, 15/40 (0,38)	CT, 6/20 (0,30)	CT, 10/34 (0,29) *	p >0,05 ⁵	p >0,05 ⁵
			TT, 25/40 (0,62)	TT, 14/20 (0,70)	TT, 24/34 (0,71) *	OR:1,308	OR:1,338
			p ³ : 0,31	p ³ : 1,00	p ³ : 1,00*	(0,477-3,560)	(0,567-3,155)
					RR:1,088	RR:1,135	
					(0,751-1,367)	(0,750-1,524)	
Intrón 14	rs31776 ¹ g.9711 A>G	Sin efecto en <i>splicing</i>	AA: 1/44 (0,02)	AA: 0/20 (0,00)	No hay datos en <i>dbSNP</i>	p= 1,000 ⁴	No hay datos en <i>dbSNP</i>
			AG: 15/44 (0,34)	AG: 7/20 (0,35)		p >0,05 ⁵	
			GG: 28/44 (0,64)	GG: 13/20 (0,65)		OR:1,129	
			p ³ : 1,00	p ³ : 1,00		(0,436-2,908)	
					RR:1,038		
					(0,736-1,297)		
Intrón 17	rs168446 ¹ g.9912 T>G	Sin efecto en <i>splicing</i>	TT: 40/43 (0,93)	TT: 20/20 (1,00)	TT: 79/79 (1,00) *	p= 0,551	p= 0,551
			TG: 3/43 (0,07)	TG: 0/20 (0,00)	TG: 0/79 (0,00) *	p = 0,7938 ⁵	p = 0,7938 ⁵
			GG:0/43 (0,00)	GG:0/20 (0,00)	GG:0/79 (0,00) *	OR:∞	OR:∞
			p ³ : 1,00	p ³ : 1,00	p ³ : 1,00*	(0,364-∞)	(0,726-∞)
					RR:1,482	RR:1,952	
					(0,647-1,482)	(0,848-1,952)	

* Datos referidos a las frecuencias genotípicas en normales sumando al grupo control los datos recogidos en *dbSNP* para población europea (*CEU-HapMap*).

¹ <http://www.ensembl.org/> (ENSG00000160867)

² El efecto sobre el *splicing* se analizó mediante la herramienta <http://www.umd.be/SSF/> (ENST00000292408)

³ Análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. <http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>

⁴ Prueba de Fisher para comparar frecuencias alélicas. Valores y límites de Cociente de verosimilitudes (OR) y riesgo relativo (RR) observados <http://statpages.org/ctab2x2.html>

⁵ Prueba χ^2 de contingencia para comparar frecuencias genotípicas <http://www.webcalculator.co.uk/statistics/x2f91.htm>

2.1.2.4 EGFR

Al igual que en los genes de la familia anterior, el estudio mutacional de *EGFR* se centró en los exones correspondientes a los dominios TM y TK (exones 17 a 27). Los resultados mostraron la existencia de dos variantes de secuencia no descritas previamente como SNPs, ambas localizadas en intrones (Tabla 11).

Tabla 11: Resultados obtenidos en el análisis mediante dHPLC de *EGFR* en los 44 pacientes y 20 controles del estudio.

Localización	Tipo de cambio	Efecto	Frecuencias genotípicas en pacientes	Frecuencias genotípicas en sanos		Análisis estadístico (IC95%)	Análisis estadístico (controles+ dbSNP) (IC95%)
				Controles del estudio	Controles + datos dbSNP		
Intrón 18	rs17337107 ¹ g.155042 G>A	Se crea un nuevo sitio de ramificación	GG:41/43 (0,95)	GG:14/19 (0,74)	GG:43/49 (0,88) *	p= 0,028 ⁴ 0,01<p<0,05 OR*:6,264 (1,342-29,757) RR*:2,513 (1,104-8,762)	p= 0,287 ⁴ p>0,05 ⁵ OR*:2,739 (0,611-12,159) RR*:1,909 (0,791-6,743)
			GA: 2/43 (0,05)	GA: 5/19 (0,26)	GA: 6/49 (0,12) *		
			AA: 0/43 (0,00)	AA: 0/19 (0,00)	AA: 0/49 (0,00) *		
			p ³ = 1,00	p ³ = 1,00	p ³ = 1,00		
Exón 20	rs1050171 ¹ g.162350 G>A	p.Q787Q Rompe un sitio potencial de <i>splicing</i> y se crea un enhancer	GA: 24/44 (0,54)	GA: 8/18 (0,44)	GA: 28/60 (0,4667) *		
		Intrón 20	g.162480 G>A	Sin efecto en el <i>splicing</i>	1 NMPCa		
Exón 21	rs17290559 ¹ g.172737 C>T	p.R836R Se crea un sitio potencial de <i>splicing</i> y se crea un sitio de ramificación	CC: 40/41 (0,98)	CC: 20/20 (1,00)	CC: 78/79 (0,99) *	p=1,0000 ⁴ p>0,05 ⁵ OR*:∞ (0,062-∞) RR*:1,247 (0,257-1,247)	p=1,0000 ⁴ p>0,05 ⁵ OR*:1,938 (0,200-18,801) RR*:1,469 (0,276-2,687)
		CT:1/41 (0,02)	CT:0/20 (0,00)	CT:1/79 (0,01) *			
		TT: 0/41 (0,00)	TT: 0/20 (0,00)	TT: 0/79 (0,00) *			
		p ³ = 1,00	p ³ = 1,00	p ³ = 1,00			
Intrón 21	g.172917 A>G	Se rompe un nuevo sitio de ramificación	1 control				
		Exón 23	rs1140475 ¹ g.179704 T>C	p.T903T Sin efecto en el <i>splicing</i>	TT : 0/43 (0,00)	TT : 0/20 (0,00)	TT : 1/80 (0,01) *
TC: 9/43 (0,21)	TC: 7/20 (0,35)			TC: 19/80 (0,24) *			
CC: 34/43 (0,79)	CC: 13/20 (0,65)			CC: 60/80 (0,75) *			
p ³ = 1,00	p ³ = 1,00			p ³ = 0,59			
Exón 25	rs2293347 ¹ g.182203 C>T	p.D994D Sin efecto en el <i>splicing</i>	CC: 31/43 (0,72)	CC: 15/20 (0,75)	CC: 60/79 (0,76) *	p=1,0000 ⁴ p>0,05 ⁵ OR*:1,135 (0,384-3,328) RR*:1,040 (0,685-1,319)	p= 0,843 ⁴ p= 0,638 ⁶ OR*:1,119 (0,525-2,387) RR*:1,074 (0,637-1,645)
		CT:12/43 (0,28)	CT:5/20 (0,25)	CT:18/79 (0,23) *			
		TT: 0/43 (0,00)	TT: 0/20 (0,00)	TT: 1/79 (0,01) *			
		p ³ = 0,58	p ³ = 1,00	p ³ = 1,00			

* Datos referidos a las frecuencias genotípicas en normales sumando al grupo control los datos recogidos en *dbSNP* para población europea (*CEU-HapMap*).

¹ <http://www.ensembl.org/> (ENSG00000146648)

² El efecto sobre el *splicing* se analizó mediante la herramienta <http://www.umd.be/SSF/> (ENST00000275493)

³ Análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. <http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>

⁴ Prueba de Fisher para comparar frecuencias alélicas. Valores y límites de Cociente de verosimilitudes (OR) y riesgo relativo (RR) observados <http://statpages.org/ctab2x2.html>

⁵ Prueba χ^2 de contingencia para comparar frecuencias genotípicas <http://www.webcalculator.co.uk/statistics/x2f91.htm>

La primera de ellas (g.162480G>A), se detectó en un paciente con NMPCa (i: 18148; c: 25848), sin efectos aparentes en el *splicing* (análisis *HSF*). La segunda (g.17291A>G) se detectó en uno de los individuos del grupo control (i:23681; c: 407.3) y el análisis mediante *HSF* predijo un posible efecto en el *splicing*, por rotura de un sitio de ramificación.

Además, se encontraron cinco variantes descritas como SNPs, en algunos casos con un posible efecto en el *splicing* según *HSF* (**Tabla 11**). Sin embargo, tampoco en este caso el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas mostró diferencias en la distribución de ninguna de estas variantes de secuencia entre ambos grupos de individuos. En el caso del SNP rs1050171, no fue posible diferenciar ambos grupos de homocigotos, por lo que únicamente pudimos determinar la frecuencia de heterocigotos, que fue muy similar en ambos grupos y respecto a los datos recogidos en *dbSNP*. En el resto de SNPs, las frecuencias genotípicas cumplían el equilibrio de Hardy-Weinberg, indicando un correcto genotipado.

2.1.3 Genes de la familia Cbl

Inicialmente, el análisis de los genes de la familia Cbl (*C-CBL*, *CBL-B* y *CBL-C*) se llevó a cabo en los 44 individuos seleccionados para el estudio de los genes anteriores. Además, dada su reciente descripción como genes alterados en estas enfermedades, se decidió analizar toda su secuencia codificante. De la misma manera que para el resto de los genes analizados, en los fragmentos en los que se observaron varios perfiles de elución se incluyeron en el análisis muestras de 20 individuos control, con objeto de comprobar si los cambios podían ser debidos a variantes poblacionales frecuentes. Por último, y de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio inicial y a los recogidos en la bibliografía, los exones que consideramos más importantes se analizaron en una serie mayor de pacientes (101 muestras con NMPCs V617F/JAK2 negativas adicionales y 232 muestras con NMPCs V617F/JAK2 positivas). También se incluyeron en este análisis cuatro líneas celulares (M07e, SET-2, HEL y UKE-1) de leucemias mieloides humanas (**tabla 12**).

Tabla 12: Líneas celulares derivadas de leucemias humanas incluídas en el estudio de los principales exones de los genes *Cbl*.

	SET-2	M07e	HEL	UKE-1
ACC	ACC 608	ACC 104	ACC 11	
Diagnóstico	Trombocitemia Esencial (TE) transformada	Leucemia megacarioblástica aguda (LMA M7)	Eritroleucemia (LMA M6)	Trombocitemia Esencial (TE) transformada a LMA
V617F/JAK2	Heterocigosis	Ausente	Homocigosis	Homocigosis

2.1.3.1 C-CBL

En el análisis de la secuencia codificante completa de este gen en las 44 muestras iniciales, encontramos seis variantes de secuencia, de las que tres correspondían a SNPs ya descritos previamente (**Tabla 13**).

Tabla 13: Resultados del análisis de C-CBL en la serie inicial de 44 pacientes y 20 individuos sin enfermedad.

Localización (dominio)	Tipo de cambio	Efecto	Frecuencias genotípicas en pacientes	Frecuencias genotípicas en sanos		Análisis estadístico (IC95%)	Análisis estadístico controles+ dbSNP (IC95%)
				Controles del estudio	Controles + datos <i>dbSNP</i>		
Intrón 3	g.67580 C>A	Sin efecto en <i>splicing</i>	1 MFI V617F/JAK2-				
Intrón 5	rs67283560 g.68717_68718insT	Sin efecto en <i>splicing</i>	-/T: 0,36	-/T: 0,30	No hay datos en <i>dbSNP</i>		NA
Intrón 5	rs2511854 g.69670 G>C	Se crea un sitio potencial de ramificación. se rompe un ESE y se crea un EIE	GC: 0,39	GC:0,35	GG: 16/60 (0,27) GC: 35/60 (0,58) CC: 9/60 (0,15)		NA
Intrón 7	rs2510152 g.71584 G>T	Sin efecto en <i>splicing</i>			No fue posible genotipar este SNP		
Exón 9 (RING finger)	g.72251 T>G	p.C416W Sin efecto en <i>splicing</i>	1 NMPCa V617F/JAK2-				
Exón 12 (dominio rico en Pro)	g.81664 C>T	p.A678V Se crea un sitio de ramificación y un lugar de <i>splicing</i> potencial	1 NMPCa V617F/JAK2-				

* Datos referidos a las frecuencias genotípicas en normales sumando al grupo control los datos recogidos en *dbSNP* para población europea (CEU-HapMap).

¹ <http://www.ensembl.org/> (ENSG00000110395)

² El efecto sobre el *splicing* se analizó mediante la herramienta <http://www.umd.be/SSF/> (ENST00000264033)

³ Análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. <http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>

⁴ Prueba de Fisher para comparar frecuencias alélicas. Valores y límites de Cociente de verosimilitudes (OR) y riesgo relativo (RR) observados <http://statpages.org/ctab2x2.html>

⁵ Prueba χ^2 de contingencia para comparar frecuencias genotípicas <http://www.webcalculator.co.uk/statistics/x2f91.htm>

Los polimorfismos rs67283560 (g.68717_68718insT) y rs2511854 (g.68670G>C) se encuentran en el intrón 5 y el rs2510152 (g.71584G>T) en el intrón 7. El análisis mediante la herramienta *HSF* sólo predijo un posible efecto para rs2511854, por creación de un potencial sitio de *splicing*. En ninguno de estos casos fue posible el genotipado correcto en cada una de las muestras. En el caso de los dos primeros, no se pudieron identificar de manera inequívoca ambos grupos de homocigotos, aunque sí los heterocigotos, mientras que en el tercero, el cambio se encontraba en un extremo del fragmento analizado lo que provocaba diferencias de perfil de elución casi imperceptibles. Esto impidió realizar el análisis estadístico de la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas.

Las otras tres variantes de secuencia encontradas no estaban descritas previamente y únicamente se observaron en el grupo de pacientes. La primera, observada en un paciente con una MFI V617F/JAK2 negativa (i: 9606; c: 27238), corresponde a una sustitución g.67580C>A en heterocigosis en el intrón 3. El análisis mediante *HSF* no predijo efectos en el *splicing*.

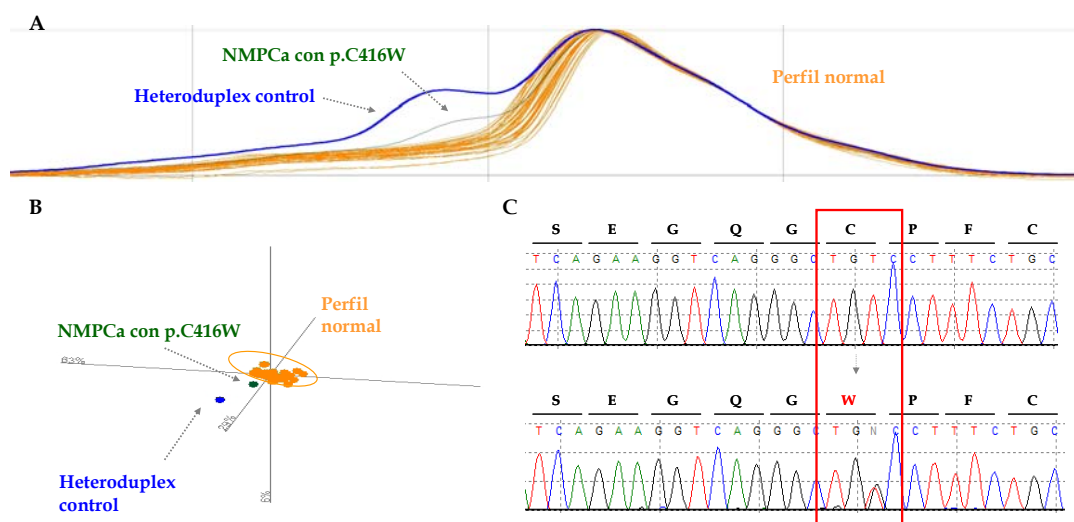


Figura 5. Sustitución en heterocigosis g.72251T>G en el exón 9 de *C-CBL*, detectada en un paciente con NMPCa V617F/JAK2 negativa (i: 18927; c: 25856), que provoca el cambio p.C416W a nivel proteico en el dominio *RING finger* de *C-CBL*. A) Perfil de elución de las muestras de los 44 pacientes en el análisis mediante dHPLC del fragmento correspondiente al exón 9. B) Diagrama de dispersión de las muestras. Como puede observarse, todas las muestras se agrupan en un solo perfil (rojo), a excepción del heterodúplex control (amarillo) y de la muestra correspondiente al paciente (verde) con esta mutación. C) Secuenciación del DNAg correspondiente a la muestra con la mutación (abajo), en comparación con el DNA de referencia (arriba).

Los otros dos cambios, detectados en dos pacientes NMPCa distintos, producen cambios en el aminoácido codificado. El primero de ellos (g.72251T>G) se localiza en el exón 9, que codifica para el dominio *RING finger* y provoca el cambio de Cys (C) por Trp (W) en la posición 416 de la

proteína (p.C416W). Esta sustitución se detectó en el individuo 18927 (c: 25856) (**Figura 5**). El segundo cambio no silencioso (g.81664C>T), afecta al exón 12 y provoca la sustitución de la Ala en posición 678 de la proteína por Val (p.A678V), situada en el dominio rico en prolina. Este cambio se encontró en el individuo 10750 (c: 15458) (**Figura 6**).

El hecho de haber encontrado variantes de secuencia con cambio de sentido en *C-CBL* en los 44 pacientes de la serie inicial, nos llevó a realizar este análisis en una serie mayor de 333 pacientes (101 muestras V617F/JAK2 negativas y 232 V617F/JAK2 positivas). Partiendo de la posición de los cambios que habíamos encontrado y de los descritos en la bibliografía, decidimos centrar este segundo análisis en los fragmentos correspondientes a los exones 8, 9 (dominio *RING finger*) y 12 (dominio rico en prolina).

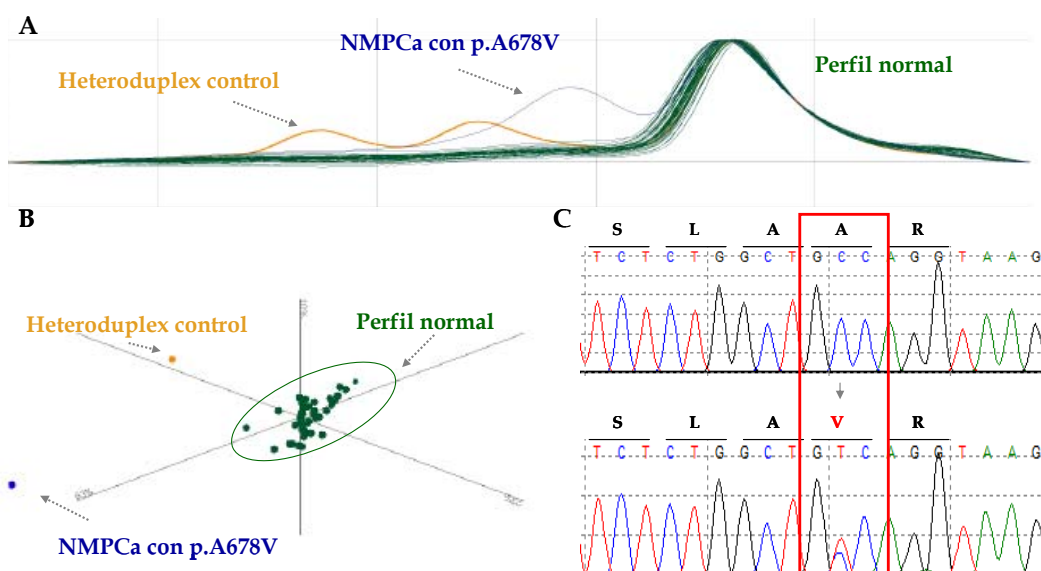


Figura 6: Sustitución g.81664C>T en el exón 12 de *C-CBL* en un paciente con NMPCa (i: 10730; c: 15458), que provoca el cambio p.A678V a nivel de proteína (dominio rico en prolina). A) Perfil de elución que mostraron las muestras de los 44 pacientes en el análisis mediante dHPLC del fragmento correspondiente al exón 12. B) Diagrama de dispersión de las muestras. La muestra coloreada en azul corresponde al paciente con la mutación p.A678V, y su perfil de elución puede diferenciarse claramente de las muestras con perfil normal (verde) y del heterodúplex control (amarillo). C) Secuenciación del DNA correspondiente a la muestra con la mutación (abajo), en comparación con el DNA de referencia (arriba).

En esta nueva serie de pacientes se detectaron tres nuevos cambios de secuencia (**Tabla 14**), todos ellos en pacientes V617F/JAK2 positivos. El primero de ellos, se detectó en un paciente con TE (i: 15291; cultivo 20149) y corresponde a la delección de una A en el exón 8 (g.71955_71956delA). Este cambio tiene como consecuencia la sustitución de Thr por His en la posición 402 de la proteína (dominio *RING finger*) pero también a un cambio en el marco de lectura que provoca la terminación prematura de la traducción (p.T402HfsX29) y la formación de

una proteína de 430 aminoácidos (ver **Figura 7**). Esta nueva proteína tendría un dominio *RING finger* alterado y perdería todo el dominio rico en prolina y el dominio UBA.

Tabla 14: Resultados obtenidos para el gen *C-CBL* en la serie ampliada de 338 muestras: 101 pacientes *JAK2 V617F* negativos y 232 *JAK2 V617F* positivos.

Localización (dominio)	Tipo de cambio	Efecto	Frecuencias en pacientes
Exón 8 (<i>RING finger</i>)	g.71955_71955delA	p.T402HfsX29 Rompe el marco de lectura posteriormente Se rompe un sitio de ramificación	1 TE V617F/JAK2+
Exón 9 (<i>RING finger</i>)	g.72253 C>G	p.P417R Sin efecto en <i>splicing</i>	1 MFI V617F/JAK2+
Exón 12 (dominio rico en Pro)	g.81655 C>G	p.S675C Sin efecto en <i>splicing</i>	1 PV V617F/JAK2+ 1TE V617F/JAK2+

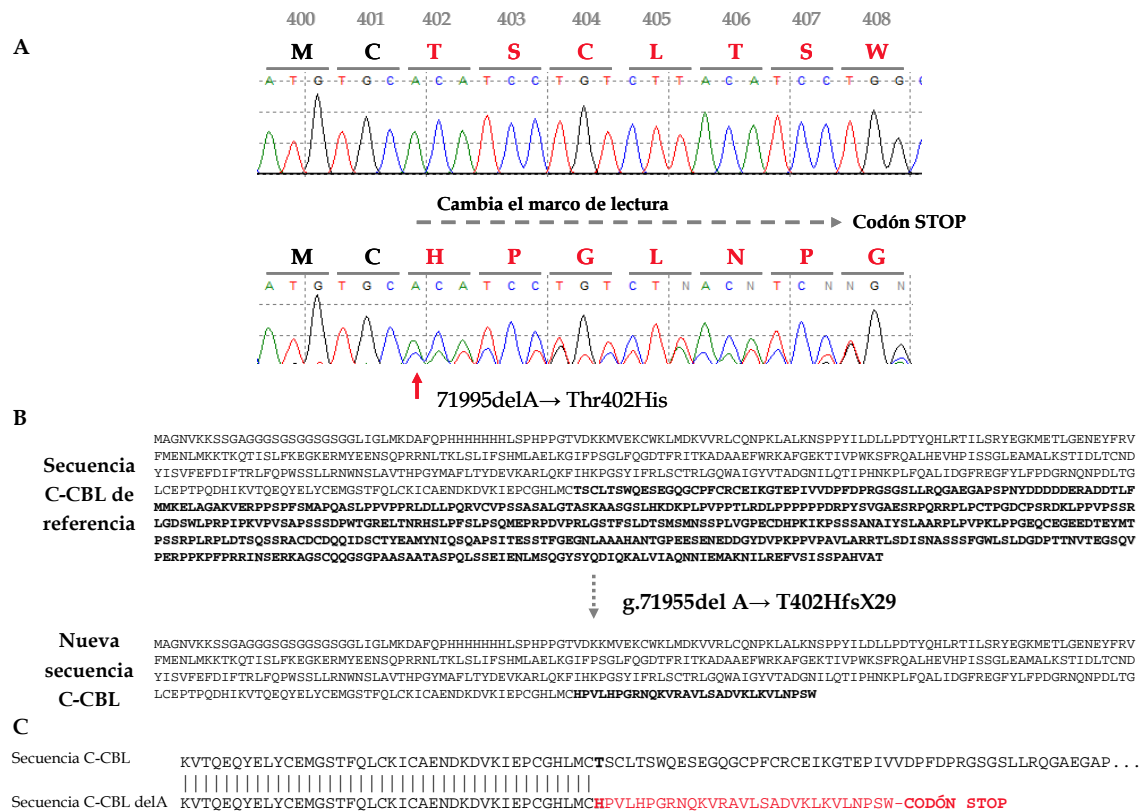


Figura 7. A) Resultados de la secuenciación de la muestra con la mutación p.Thr402HisfsX29 (paciente con TE i:15291; c:20149). Arriba, secuencia de referencia de la región del exón 8 de *C-CBL*. Abajo, delección de A en la posición 71995, que da lugar a un cambio de marco de lectura a partir del aminoácido 402. B) Secuencia proteica de *C-CBL* y secuencia proteica resultado de la mutación p.T402HfsX29. El cambio de lectura provoca una proteína de secuencia diferente, más corta, causada por la aparición de un codón de parada en la posición 430. C) Alineamiento de la proteína *C-CBL* y *C-CBL* con g.71995delA. Como puede observarse, la homología se pierde a partir del aminoácido T402. Esta nueva proteína truncada presenta un dominio *RING finger* alterado, y carece de los dominios rico en prolina y UBA.

El segundo de los cambios, encontrado en un paciente con MFI (i: 11163; cultivo 13855), también afecta al dominio *RING finger* (g.72253C>G, p.P417R) (**figura 8A**). Este cambio había sido observado previamente por Matsuda y colaboradores en un paciente con LMMJ (Matsuda et al, 2010). Por último, otros dos pacientes distintos (PV, i: 15229; cultivo 20051 y TE, i: 10227; cultivo 12462), presentaron una misma variante de secuencia en el exón 12 (g.81655C>G, p.S675C), afectando al dominio rico en prolina (**figura 8B**).

Ninguno de estos cambios fue observado en el grupo de 20 individuos control sin enfermedad. Debido a la recurrencia de este último cambio (p.S675C), decidimos analizar el exón 12 en una serie mayor de controles, para asegurarnos de que no se trataba de una variante poblacional poco frecuente. Analizamos un total de 220 muestras control sin enfermedad, no detectando dicha variante en ninguno de ellos.

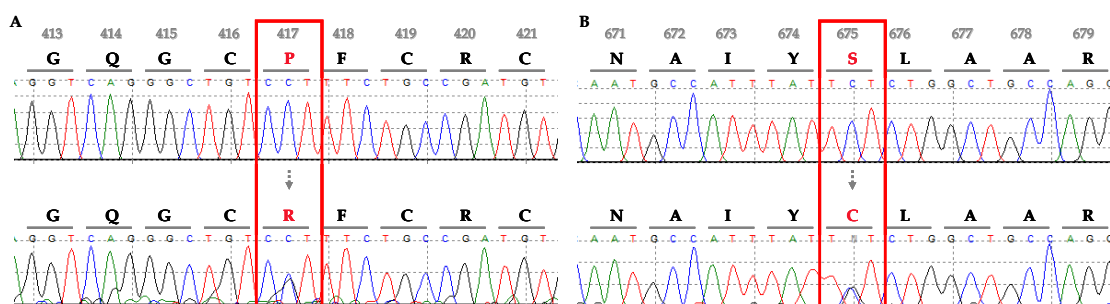


Figura 8: A) Sustitución en heterocigosis g.72253C>G (exón 9 de *C-BL*) que presentó el paciente con MFI (i: 11163; c: 13855). El cambio provoca la sustitución de prolina en la posición 417 por arginina (p.P417R), en el dominio *RING Finger* de *C-BL*. B) Sustitución en heterocigosis g.81655C>G (exón 12 de *C-BL*) que presentaron un paciente con PV (i:15229; c:20051) y un paciente con TE (i: 10227; c:12462), que provoca el cambio p.S675C a nivel de proteína (dominio rico en Prolina).

Debido a que habíamos encontrado cambios potencialmente oncogénicos en *C-BL* tanto en las muestras V617F/*AK2* negativas como en las positivas, decidimos analizar también estos exones (exones 8, 9 y 12) en las cuatro líneas celulares anteriormente citadas (**Tabla 12**) aunque con resultados negativos.

La **figura 9** muestra la localización de todos los cambios detectados en el análisis mediante dHPLC de este gen.

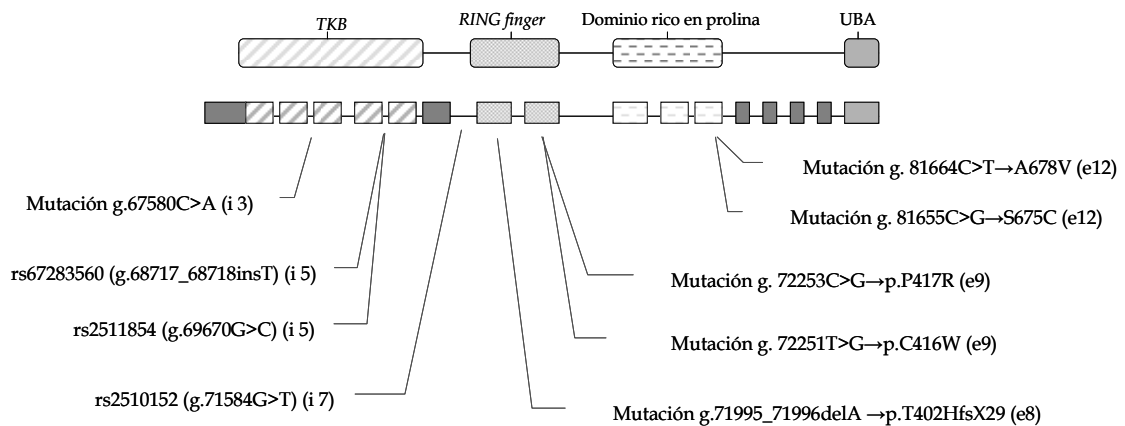


Figura 9. Posición de los cambios de secuencia detectados mediante dHPLC en la estructura proteica (parte superior, dividida en dominios) y genómica (parte inferior, dividida en exones) en *C-CBL*. Además de los polimorfismos y la mutación detectados en intrones, este análisis reveló cinco cambios de secuencia con efecto en la traducción (p.C416W, p.P417R, p.T402HfsX29, p.S675C y p.A678V). Los dos últimos se detectaron en el dominio rico en prolina.

2.1.3.2 *CBL-B*

Como en *C-CBL*, de manera inicial se analizaron todos los exones codificantes de este gen en la serie de 44 pacientes *V617FJAK2* negativos. En ellos se detectaron doce variantes de secuencia, de las que sólo dos no estaban descritas previamente como SNPs (**Tabla 15**).

La primera corresponde a un cambio silencioso (g.93068A>C, p.A158A), en el exón 4 (dominio *N-adaptor*) y se detectó en paciente con MFI (i: 13036; c: 16629). Este cambio tampoco parece tener efecto en el *splicing* (análisis con *HSF*). El otro cambio no descrito (g.128853C>A) y encontrado en un paciente con NMPC atípica (i: 14171; c: 18415) afectaba al intrón 6 y tampoco parecía tener un efecto en el *splicing*.

Las otras diez variantes de secuencia detectadas correspondían a SNPs ya descritos como tales. En el caso de rs9657906, rs9657924, rs34801525 y rs2034157, el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas no mostró diferencias en su distribución entre el grupo de pacientes y controles. Para el resto de SNPs, este análisis no pudo realizarse debido a que fue imposible diferenciar los dos grupos de homocigotos. El análisis mediante la herramienta *HSF* sólo predijo un posible efecto en el *splicing* para rs9657906 y rs2034157.

Tabla 15: Resultados obtenidos en el análisis mediante dHPLC de *CBL-B* en la serie de 44 pacientes y 20 controles.

Localización (dominio)	Tipo de cambio	Efecto	Frecuencias genotípicas en pacientes	Frecuencias genotípicas en sanos			Análisis estadístico (IC95%)	Análisis estadístico (controles+ <i>dbSNP</i>) (IC95%)
				Controles del estudio	Controles + datos <i>dbSNP</i>			
Exón 4 (<i>N-adaptor</i>)	g.93068 A>C	p.A158A Sin efecto	1 MFI V617F/IAK2 -					
Exón 6 (<i>EF Hand like</i>)	rs9657906 g.123631 C>T	p.P279P Se crean potenciales sitios de <i>splicing</i> y se rompe un sitio de ramificación	CC: 39/42 (0,93) CT: 3/42 (0,07) TT: 0/42 (0,0) p ³ : 1,00	CC: 18/20 (0,90) CT: 2/20 (0,10) TT: 0/20 (0,00) p ³ : 1,00	CC: 76/80 (0,95) * CT: 4/80 (0,05) * TT: 0/80 (0,00) * p ³ : 1,00	p= 0,245 p >0,05 ⁵ OR*:3,000 (0,559-16,336) RR*:1,364 (0,914-3,508)	p= 0,695 p >0,05 ⁵ OR*:1,444 (0,353-5,923) RR*:1,254 (0,456-2,247)	
Intrón 6	g.128853 C>A	Sin efecto	1 NMPCa V617F/IAK2 -					
Intrón 8	rs2289746 g.132442 A>G	Se crean potenciales sitios de <i>splicing</i>		No fue posible el correcto genotipado de este SNP				
Intrón 8	rs9657924 g.135328 G>A	Sin efecto	GG: 36/40 (0,90) GA: 4/40 (0,10) AA: 0/40 (0,00) p ³ : 1,00	GG: 18/20 (0,90) GA: 2/20 (0,10) AA: 0/20 (0,00) p ³ : 1,00	GG: 75/80 (0,94) * GA: 5/80 (0,06) * AA: 0/80 (0,00) * p ³ : 1,00*	p= 1,0000 ⁴ p >0,05 ⁵ OR*:1,000 (0,205-4,926) RR*:1,000 (0,725-2,234)	p=0,486 ⁴ p >0,05 ⁵ OR*:1,632 (0,461-5,790) RR*:1,351 (0,564-2,295)	
Intrón 8	rs6768096 g.135363 T>C	Sin efecto en el <i>splicing</i>	TT: 0/40 (0,00) TC: 0/40 (0,00) CC: 40/40 (1,00)	TT: 0/20 (0,00) TC: 0/20 (0,00) CC: 20/20 (1,00)	TT: 0/80 (0,00) * TC: 0/80 (0,00) * CC: 80/80 (1,00) *	Todas las muestras son CC	Todas las muestras son CC	
Exón 10 (<i>RING Finger</i>)	rs2305035 g.149371 C>T	p.D423D Sin efecto	CT: 0,36	CT: 0,12	CT: 0,433*			
Exón 10 (<i>RING Finger</i>)	rs2305036 g.149440 A>C	p.L446L Se rompe una secuencia reguladora de <i>splicing</i>	AC: 0,36	AC: 0,12	AC: 0,400*			
Exón 11 (<i>D, Prolina</i>)	rs2305037 g.165553 G>A	p.T526T Sin efecto	GA: 0,39	GA: 0,26	GA: 0,53*			
Exón 14 (<i>D, Prolina</i>)	rs34801525 g.184099 G>A	p.P688P Sin efecto en el <i>splicing</i>	GG: 38/40 (0,90) GA: 2/40 (0,05) AA: 0/40 (0,00) p ³ : 1,00	GG: 17/18 (0,90) GA: 1/18 (0,10) AA: 0/18 (0,00) p ³ : 1,00	GG: 55/57 (0,96) * GA: 2/57 (0,04) * AA: 0/57 (0,00) * p ³ : 1,00*	p= 1,0000 ⁴ p >0,05 ⁵ OR*:1,842 (0,263-12,608) RR*:1,168 (0,546-1,423)	p=0,232 ⁴ p >0,05 ⁵ OR*:2,947 (0,613-14,086) RR*:1,649 (0,730-2,275)	
Exón 15 (<i>D, Prolina</i>)	rs2034157 g.187551 T>C	SNP no codificante	TT: 0/41 (0,00) TC: 21/41 (0,51) CC: 20/41 (0,49) p ³ : 0,041	TT: 0/17 (0,00) TC: 10/17 (0,59) CC: 7/17 (0,41) p ³ : 0,24	TT: 5/75 (0,07) * TC: 37/75 (0,49) * CC: 33/75 (0,44) * p ³ : 0,29	p= 0,654 ⁴ p >0,05 ⁵ OR*:1,210 (0,505-2,910) RR*:1,059 (0,838-1,440)	p= 0,451 ⁴ p =0,2364 ⁵ OR*:1,325 (0,727-2,414) RR*:1,204 (0,818-1,837)	
Exón 17 (<i>D, Prolina</i>)	rs11713094 g.199244 T>C	p.P870P Se crea un nuevo sitio de ramificación	TC: 0,28	TC: 0,21	TC: 0,22*			

* Datos referidos a las frecuencias genotípicas en normales sumando al grupo control los datos recogidos en *dbSNP* para población europea (*CEU-HapMap*).

¹ <http://www.ensembl.org/> (ENSG00000114423)

² El efecto sobre el *splicing* se analizó mediante la herramienta <http://www.umd.be/SSF/> (ENST00000264122)

³ Análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. <http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>

⁴ Prueba de Fisher para comparar frecuencias alélicas. Valores y límites de Cociente de verosimilitudes (OR) y riesgo relativo (RR) observados <http://statpages.org/ctab2x2.html>

⁵ Prueba χ^2 de contingencia para comparar frecuencias genotípicas <http://www.webcalculator.co.uk/statistics/x2f91.htm>

A pesar de no encontrar variantes de secuencia potencialmente interesantes, los resultados obtenidos en el análisis de *C-CBL*, nos llevaron a analizar los exones correspondientes al dominio *RING finger* de *CBL-B* (en este caso exones 9 y 10), en el grupo ampliado de 333 muestras de pacientes V617F/*JAK2* negativas (101) y positivas (232). En esta nueva serie se detectaron dos nuevos cambios de secuencia no descritos previamente en pacientes positivos para la mutación V617F/*JAK2* (**Tabla 16**).

Tabla 16: Nuevas variantes de secuencia detectadas en *CBL-B* en la serie ampliada de 333 pacientes con NMPCs .

Localización (dominio)	Tipo de cambio	Efecto	Frecuencias en pacientes
Exón 10 (<i>RING finger</i>)	g.149452 C>T	p.D450D Sin efecto en el <i>splicing</i>	1 TE <i>JAK2</i> V617F+ (i:17952; c:24465)
Exón 10 (<i>RING finger</i>)	g.149486 C>T	p.R462W Sin efecto en el <i>splicing</i>	1 PV <i>JAK2</i> V617F + (i:14626; c:19099)

El primero de ellos fue un cambio silencioso (g.149452 C>T, p.D450D) y se detectó en un paciente con TE (i: 17952; c: 24465) (**Figura 10A**). El segundo no era silencioso (g.149486C>T, p.R462W) y se detectó en un paciente con PV (i: 14626; c: 19099) (**Figura 10B**). Ninguno de los controles sin enfermedad presentó dichos cambios.

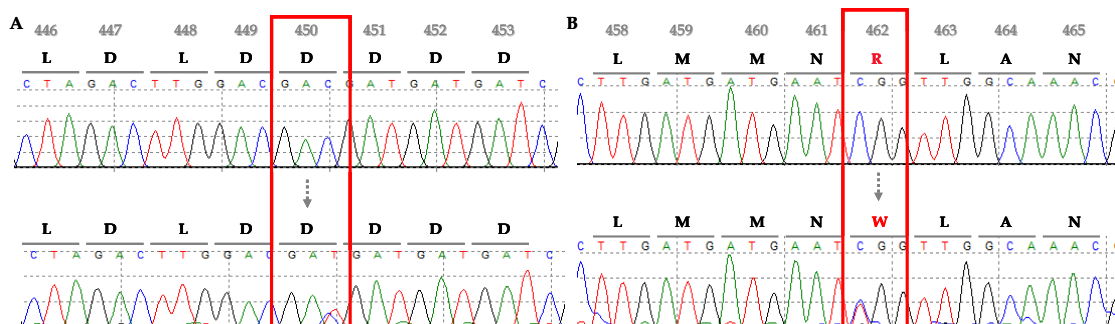


Figura 10. A) Sustitución g.149452 C>T (p.D450D) detectada en un paciente con TE V617F/*JAK2* positivo (i: 17952; c: 24465). B) Sustitución g.149486C>T (p.R462W) detectada en un paciente con PV V617F/*JAK2* positiva (i: 14626; c: 19099) y que afecta al dominio *RING finger* de *CBL-B*.

Los análisis de los exones 9 y 10 de *CBL-B* en las cuatro líneas celulares anteriores (M07e, HEL, UKE-1 y SET-2) tampoco permitieron detectar ninguna variante de secuencia. La **figura 11** representa la posición genómica y proteica de todos los cambios detectados en el análisis del *CBL-B*.

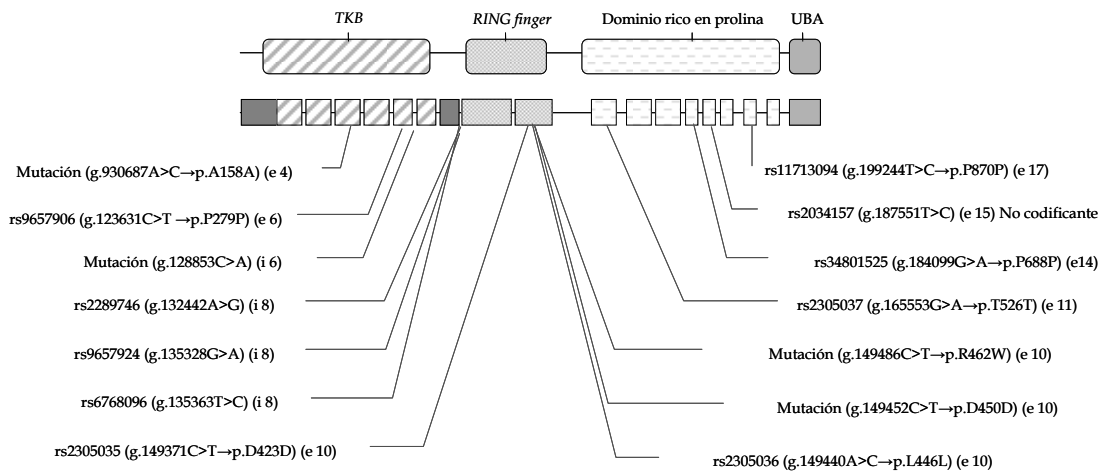


Figura 11. Posición de los cambios de secuencia detectados mediante dHPLC en la estructura proteica (parte superior, dividida en dominios) y genómica (parte inferior, dividida en exones) en *CBL-B*.

2.1.3.3 *CBL-C*

El análisis completo de este gen en la serie inicial de 44 pacientes reveló siete cambios de secuencia, cinco de ellos descritos previamente como SNPs (**Tabla 17**). Curiosamente tres de estos SNPs localizados en el dominio *RING finger* provocan la sustitución del aminoácido codificado. Sin embargo, el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas de los grupos de pacientes y controles no mostró diferencias en la distribución de ninguno de ellos.

De las dos variantes de secuencia no descritas previamente, una de ellas estaba localizada en el exón 9 (codificante para el dominio rico en prolina) y producía cambio de aminoácido (g.16354C>T, p.P435S) (**Figura 12**). Este cambio se detecto en el 11,6% (5/43) de los pacientes, pero también en el 10% (2/20) de los controles, por lo que parece tratarse de un polimorfismo no descrito hasta la fecha.

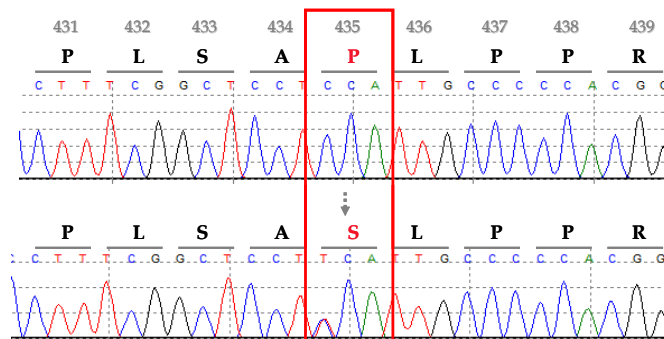


Figura 12. Resultado de la secuenciación de las muestras que presentaron la variante g.16354C>T (p.P435S) (11.6% de pacientes y 10% de controles) en *CBL-C*. Arriba, secuencia genómica de referencia. Abajo, secuencia con la variante.

Tabla 17: Resultados del análisis de CBL-C en la serie de 44 pacientes con NMPCs y los 20 controles sin enfermedad.

Localización (dominio)	Tipo de cambio	Efecto	Frecuencias genotípicas en pacientes	Frecuencias genotípicas en sanos		Análisis estadístico (IC95%)	Análisis estadístico (controles+ dbSNP) (IC95%)
				Controles del estudio	Controles + datos dbSNP		
Exón 2 (EF Hand like)	rs35106910 g.3141 A>C	p.K153T Rompe un sitio de ramificación y una secuencia reguladora de <i>splicing</i>	AA: 39/41 (0,95)	AA: 19/20 (0,95)	AA: 57/59 (0,97)	p= 1,0000 ⁴	p= 1,0000 ⁴
			AC: 2/41 (0,05)	AC: 1/20 (0,05)	AC: 2/59 (0,03)	p >0,05 ⁵	p >0,05 ⁵
			CC: 0/41 (0,00)	CC: 0/20 (0,00)	CC: 0/59 (0,00)	OR*:1,026 (0,131-8,130)	OR*:1,450 (0,250-8,397)
			p ³ : 1,00	p ³ : 1,00	p ³ : 1,00	RR*:1,008 (0,709-3,255)	RR*:1,225 (0,364-2,117)
Exón 8 (RING finger)	rs35457630 g.15642 G>A	p.E392K Sin efecto en el <i>splicing</i>	GG: 41/44 (0,93)	GG: 19/20 (0,95)	No hay datos en dbSNP	p= 1,0000 ⁴	No hay datos en dbSNP
			GA: 3/44 (0,07)	GA: 1/20 (0,05)		p >0,05 ⁵	
			AA:0/44 (0,00)	AA:0/20 (0,00)		OR*:1,376 (0,189-9,855)	
			p ³ : 1,00	p ³ : 1,00		RR*:1,094 (0,437-1,405)	
Exón 8 (RING finger)	rs3208856 g.15681 C>T	p.H405Y Sin efecto en el <i>splicing</i>	CC: 40/44 (0,91)	CC: 20/20 (1,00)	CC: 76/80 (0,95)	p= 0,309	p= 0,459
			TC: 4/44 (0,09)	TC: 0/20 (0,00)	TC: 4/80 (0,05)	p >0,05 ⁵	p >0,05 ⁵
			TT:0/44 (0,00)	TT:0/20 (0,00)	TT:0/80 (0,00)	OR*:∞ (0,479-∞)	OR*:1,857 (0,496-6,961)
			p ³ : 1,00	p ³ : 1,00	p ³ : 1,00	RR*:1,476 (0,750-1,476)	RR*:1,429 (0,605-2,297)
Exón 8 (RING finger)	rs61750955 g.15707 A>G	p.S413S	AA:40/44 (0,91)	AA:18/20 (0,90)	No hay datos en dbSNP	p= 1,0000 ⁴	No hay datos en dbSNP
			AG: 4/44 (0,09)	AG: 2/20 (0,10)		p >0,05 ⁵	
			GG: 0/44 (0,00)	GG: 0/20 (0,00)		OR*:1,105 (0,227-5,435)	
			p ³ :0,12	p ³ : 1,00		RR*:1,033 (0,750-2,303)	
Intrón 8	rs1903831 g.16329 A>C	Se rompe un sitio de ramificación	AA:39/43 (0,91)	AA:18/20 (0,90)	AA:76/80 (0,95)	p= 1,0000 ⁴	p= 0,284
			AC: 3/43 (0,07)	AC: 2/20 (0,10)	AC: 4/80 (0,05)	p= 0,7322 ⁵	p= 0,2036 ⁵
			CC: 1/43 (0,02)	CC: 0/20 (0,00)	CC: 0/80 (0,00)	OR*:1,173 (0,248-5,459)	OR*:2,407 (0,679-8,518)
			p ³ : 1,00	p ³ : 1,00	p ³ : 1,00	RR*:1,049 (0,525-1,371)	RR*:1,626 (0,766-2,436)
Exón 9 (Dominio rico en Prolina)	g.16354 C>T	p.P435S	CC: 38/43 (0,88)	CC: 18/20 (0,90)	Variante no descrita	p= 1,0000 ⁴	Variante no descrita
			CT: 4/43 (0,1)	CT: 2/20 (0,10)		p= 0,7881 ⁵	
			TT: 1/43 (0,02)	TT: 0/44 (0,0)		OR*:1,500 (0,328-6,765)	
						RR*:1,465 (0,354-6,267)	
Intrón 10	g.22619 C>A	Se crea un nuevo sitio de ramificación	1 NMPCa V617F/AK2 -				

* Datos referidos a las frecuencias genotípicas en normales sumando al grupo control los datos recogidos en dbSNP para población europea (CEU-HapMap).

¹ <http://www.ensembl.org/> (ENSG00000142273)

² El efecto sobre el *splicing* se analizó mediante la herramienta <http://www.umd.be/SSF/> (ENST00000270279)

³ Análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. <http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>

⁴ Prueba de Fisher para comparar frecuencias alélicas. Valores y límites de Cociente de verosimilitudes (OR) y riesgo relativo (RR) observados <http://statpages.org/ctab2x2.html>

⁵ Prueba χ^2 de contingencia para comparar frecuencias genotípicas <http://www.webcalculator.co.uk/statistics/x2f91.htm>⁵ Prueba χ^2 de contingencia para comparar frecuencias genotípicas <http://www.webcalculator.co.uk/statistics/x2f91.htm>

La otra variante (g.22619C>A), se encontró en el intrón 10 de un paciente con NMPC atípica (i:13633; c:17586) y, según *HSF*, podría tener efecto en el *splicing* por formación de un nuevo punto de ramificación.

También en este caso, el análisis de la serie ampliada de muestras (101 pacientes *JAK2V617F* negativos y 232 *JAK2V617F* positivos) lo centramos en los exones codificantes del dominio *RING finger* (exones 7 y 8). Esto nos permitió detectar un cambio de secuencia, con efecto en la traducción, en el exón 8 (g.15702_15702insC, p.Q419PfsX81) en un paciente con PV V617F/*JAK2* negativa (i: 18670; c:25616). Esta inserción provoca un cambio en el marco de lectura a partir de la Gln en posición 419 y daría lugar a una proteína con 24 aminoácidos más que la *CBL-C* humana normal (**Figura 13**). Sin embargo, este cambio está descrito como polimorfismo (rs66944506), correspondiente al cambio c.1254dupC. No hay datos en *dbSNP* sobre frecuencias poblacionales de este SNP.

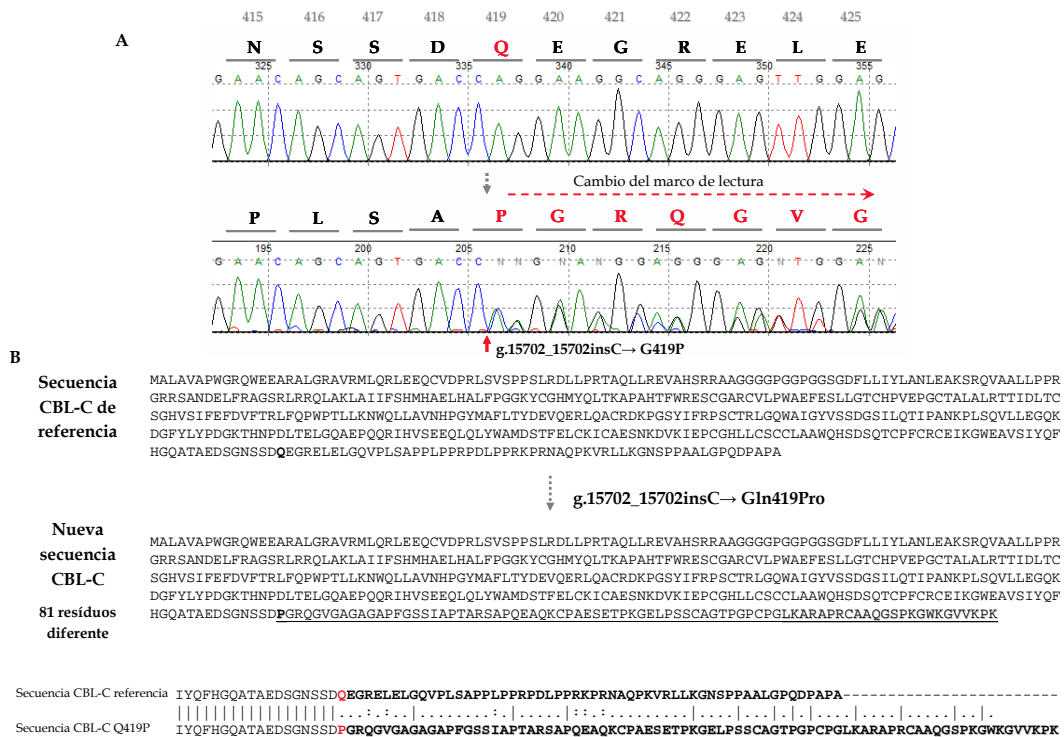


Figura 13. Mutación g.15702_15702insC, p.Gln419ProfsX81 o Q419P de CBL-C. A) Resultados de la secuenciación que presentó el paciente con PV V617F/*JAK2* negativa (i: 18670; c: 25613). Arriba, secuencia de referencia, con un residuo de Gln en la posición 419 de la proteína. Abajo, secuencia del paciente, que presenta una inserción en heterocigosis de una citosina en la posición 15702_15703, lo que provoca el cambio en el marco de lectura de la proteína. B) La inserción de la citosina da lugar a un cambio en la proteína a partir del residuo Q419, ya que a partir de ese punto se pierde la homología de los 81 residuos finales y, además, aparecen 24 residuos adicionales (subrayado).

Al igual que en los dos genes anteriores, se analizaron los exones más importantes de este gen (exones 7 y 8) en las cuatro líneas celulares anteriores (M07e, HEL, UKE-1 y SET-2) y tampoco encontramos variantes de secuencia.

La **figura 14** recoge todos los cambios detectados en el análisis mediante dHPLC de *CBL-C* en el total de pacientes (145 muestras *V617F/JAK2* negativas y 232 positivas) y controles.

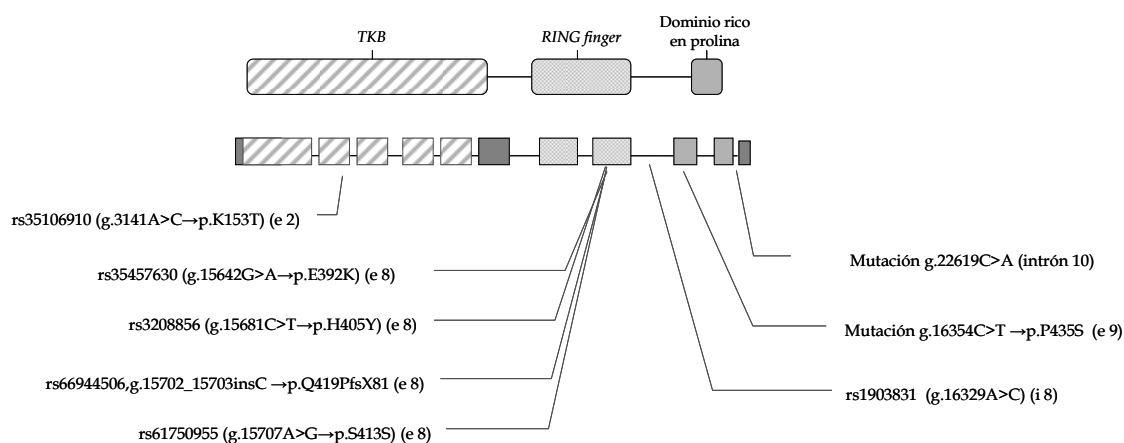


Figura 14. Posición de los cambios de secuencia detectados mediante dHPLC en la estructura proteica (parte superior, dividida en dominios) y genómica (parte inferior, dividida en exones) de *CBL-C*.

2.1.3.4 Análisis mediante PCR de la delección del exón 8 de *C-CBL*

Una de las alteraciones de *C-CBL* más frecuentemente descritas en la bibliografía, consistía en deleciones de distinta longitud en el exón 8 (dominio *RING finger*). Como nuestro diseño inicial de análisis de mutaciones mediante dHPLC no nos permitiría detectar grandes deleciones en las muestras, diseñamos un nuevo ensayo de PCR para amplificar dicha región, empleando cebadores que la delimitaran (ver apartado 2.2.7 de *Material y Métodos*).

Con este diseño, amplificamos el DNAg de todas las muestras de los pacientes incluidos en el estudio (145 muestras *V617F/JAK2* negativas y 232 positivas) y de las cuatro líneas celulares anteriores (M07e, HEL, UKE-1 y SET-2). La diferencia en el tamaño amplificado en un gel de agarosa, nos permitiría observar este tipo de deleciones. Según este diseño, el fragmento a amplificar de manera normal tendría un tamaño de 989 pb y, en el caso de que existiera una delección, sería menor. Como control del diseño del ensayo, empleamos DNA procedente de la línea celular de LMA humana MOLM-13 (ACC 554), de la que ya se ha descrito que presenta una delección de los aminoácidos $\Delta 366-409$ (p.E366_Q409del) (Caligiuri et al, 2007) con efecto oncogénico (ver **Figura 15**).

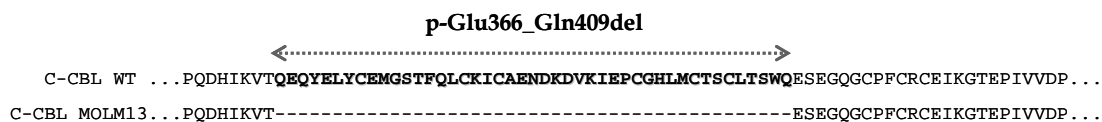


Figura 15. Secuencia proteica de la región correspondiente al exón 8 de C-CBL. Se han señalado los residuos delecionados en la línea celular MOLM-13 (p.Glu366_Gln409del), que corresponde a la mayor parte del exón 8 (dominio *RING Finger*) de C-CBL.

A pesar de que este tipo de delecciones aparecen con cierta recurrencia (Calligiuri et al, 2007; Abbas et al, 2008; Slape et al, 2008; Reindl et al, 2009; Loh et al, 2009; Matsuda et al, 2010), ninguno de los pacientes estudiados (145 NMPCs V617F/JAK2 negativas y 232 positivas), ni las líneas celulares mencionadas, mostraron delecciones. Únicamente detectamos la delección característica de la línea celular MOLM-13, lo que indicaba el correcto diseño del ensayo.

2.2 Ensayos RQ-PCR

Además de los reordenamientos cromosómicos y de las mutaciones puntuales con ganancia de función, se ha observado en diversos tumores que algunos genes TK podrían estar sobreexpresados. Por este motivo, además de la búsqueda de alteraciones citogenéticas mediante FISH y de mutaciones puntuales mediante dHPLC, decidimos analizar la posible sobreexpresión de los genes TK objeto de nuestro estudio inicial (familias Abl, Syk y Fgfr), sobre material de la serie de 44 pacientes. La sobreexpresión de alguno de estos genes o de alguno de sus dominios, daría lugar a un aumento patológico de su producto proteico, lo que podría explicar el desarrollo del proceso neoplásico. Además, y debido a su importancia en este tipo de enfermedades, incluimos también en este análisis el gen *JAK2*. A pesar de ser pacientes negativos para la mutación V617F, una sobreexpresión de este gen podría tener un efecto similar al de la mutación a nivel celular, lo que explicaría por qué estos pacientes presentan los mismos rasgos clínicos que los positivos para la mutación.

Para realizar los estudios de expresión, como se ha indicado en el apartado 2.3 de *Material y Métodos*, empleamos la PCR cuantitativa a tiempo real (RQ-PCR).

Dado el material disponible, decidimos realizar una cuantificación relativa basada en el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (apartado 2.3.2 de *Material y Métodos*). Este método permite cuantificar la expresión de un determinado gen problema a partir del ciclo en el cual su amplificación supera un valor umbral de fluorescencia (*threshold cycle* o C_T), en función de los valores obtenidos para un gen control (de expresión constitutiva) en la misma muestra (gen endógeno, C_{Te}). El valor ΔC_T ($\Delta C_T = C_T$ gen problema - C_{Te}) normaliza, en la misma muestra, el valor de expresión del gen problema

respecto a la expresión del gen endógeno. Cuanto mayor es la expresión de un gen, antes sobrepasa el valor umbral y, por tanto, su valor de C_T es menor. La cuantificación relativa compara, a su vez, los valores ΔC_T de cada una de las muestras (cDNA de cada paciente) con la ΔC_T que presenta una muestra control sin enfermedad, denominada calibrador ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ muestra - ΔC_T calibrador). En nuestro caso, el calibrador empleado fueron muestras de sangre periférica (de un individuo sano) y médula ósea (comercial) sin enfermedad.

Para comparar la expresión de las muestras con respecto a los controles, hemos centrado nuestro análisis en los valores de ΔC_T ($\Delta C_T = C_T$ gen problema - C_T endógeno) de cada uno de los individuos (pacientes y controles). Una mayor expresión del gen problema respecto del endógeno en las muestras de pacientes (ΔC_T muestra) y respecto de los valores obtenidos en las muestras control (ΔC_T control), podría ser indicativo de una sobreexpresión aberrante de dicho gen. Además, los valores de RQ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) nos dan una idea del número de veces que esta expresión es diferente, en función de cada control.

Por último, el estudio de cada gen problema se realizó empleando dos ensayos distintos (apartado 2.3.3.2 de *Material y Métodos*), ya que deseábamos conocer también si existían diferencias en la expresión de distintas partes del gen (extremos 5' y 3') y si esas diferencias se detectaban también en las muestras control. Una expresión diferencial del dominio TK (situado en 3') respecto de los dominios situados en 5', podría indicar una amplificación de la actividad TK que, en caso de no detectarse en los controles, también podría contribuir a explicar el fenotipo neoplásico de dichos pacientes.

2.2.1 Ensayo de RQ-PCR

Previamente a la realización de estos ensayos, fue necesario llevar a cabo la retrotranscripción de la muestra de RNA del paciente a cDNA, más estable (apartado 2.3.3.1 de *Material y Métodos*). A continuación, comprobamos su calidad mediante PCR *multiplex* y/o amplificación de la β -actina, seleccionamos aquellos cebadores y sondas idóneos para el análisis (ensayos *TaqMan*®) y realizamos los ensayos de RQ-PCR.

2.2.1.1 Síntesis de cDNA: retrotranscripción (RT)

Esta reacción se realizó mediante el sistema comercial *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen-Life Technologies Ltd, Paisley, Reino Unido), a partir de 1 μ g de RNA de los pacientes de los que dispusimos de material suficiente. Para ello, utilizamos cebadores *oligo(dT)* (apartado 2.3.3.1 de *Material y Métodos*), que nos permiten seleccionar los RNAm y mejorar así el rendimiento de las reacciones posteriores. Previamente habíamos

comprobado como las C_{TS} observadas con una muestra control retrotranscrita con *oligo(dT)* eran entre uno y dos ciclos inferiores a las C_{TS} de la misma muestra retrotranscrita con *random primers*, por lo que la eficiencia de esta reacción para nuestros análisis parecía superior con *oligo(dT)*. Posteriormente, como se ha indicado, se comprobó la calidad del material obtenido (apartado 2.3.3.1 de *Material y Métodos*). La escasez y antigüedad de algunas de estas muestras hizo que en varios casos el cDNA obtenido fuera de muy baja calidad. Esto llevó a que, finalmente, sólo pudieran realizarse los ensayos de RQ-PCR en 16 de las 44 muestras inicialmente previstas (2 MFI, 1 PV, 7 TE y 5 NMPCa, **Tabla 18**). Como puede observarse, el material de la mayor parte de las muestras procedía de médula ósea (MO), excepto en el caso del paciente 16572 (cultivo 23455), que procedía de sangre periférica (SP).

Tabla 18. Muestras analizadas mediante RQ-PCR para el estudio de expresión de los genes TK.

Muestra	Nombre	Individuo	Cultivo	Tipo de material
Paciente 1	MFI-1	9606	27238	MO
Paciente 2	MFI-2	16544	22106	MO
Paciente 3	PV-1	18630	25548	MO
Paciente 4	TE-1	14886	23055	MO
Paciente 5	TE-2	15676	20740	MO
Paciente 6	TE-3	16659	22291	MO
Paciente 7	TE-4	16737	22419	MO
Paciente 8	TE-5	16787	22502	MO
Paciente 9	TE-6	18708	25667	MO
Paciente 10	TE-7	18714	25676	MO
Paciente 11	NMPCa-1	14920	19550	MO
Paciente 12	NMPCa-2	15938	21160	MO
Paciente 13	NMPCa-3	16572	23455	SP
Paciente 14	NMPCa-4	17865	24315	MO
Paciente 15	NMPCa-5	18634	25553	MO
Paciente 16	NMPCa-6	18927	25856	MO
Control 1	SP-C1	Control 1	Control 1	SP
Control 2	MO-P1	MO comercial	MO comercial	MO

2.2.1.2 Selección de cebadores y sondas

Para el análisis RQ-PCR se emplearon ensayos con sondas *TaqMan*[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) (apartado 2.3.3.2 de *Material y Métodos*). Para cada gen seleccionamos dos ensayos *TaqMan*[®] (ensayos A y B), de manera que nos permitieran determinar la existencia de diferencias de expresión entre distintas regiones del gen dentro de un mismo individuo y comprobar así si existe un dominio diferencialmente expresado en los individuos con patología frente a los controles sin enfermedad.

Así, para cada gen, uno de los ensayos seleccionados se situó en la zona codificante del dominio TK (ensayo B o 3') y el otro (ensayo A o 5'), en una de las zonas codificantes de los dominios situados en 5', distinto según cada familia de TKs. En el caso de los genes de la familia Syk y de

JAK2, el ensayo A o 5' se situó en la región codificante del dominio SH2. En los genes de la familia *Abl*, en la región codificante del dominio SH3, y en los genes de la familia *Fgfr* en la región codificante del dominio extracelular.

En todos los casos seleccionamos aquellos ensayos que hubieran sido validados por la casa comercial suministradora, de manera que no detectaran DNA genómico (ensayos "HsXXXXXXXX_m1") por estar diseñados entre dos exones diferentes o separados por un intrón de gran tamaño (Tabla 3 de *Material y Métodos*). Debido a que esta casa comercial no ofrecía ensayos de este tipo para *FGFR3* y *FGFR4* en ese momento decidimos excluir estos genes de este análisis.

2.2.1.3 Selección del gen endógeno de expresión constitutiva

En todo ensayo de RQ-PCR es necesario comparar la expresión del gen diana con la de un gen control (endógeno) de expresión constitutiva. De esta manera, se dispone de un control interno de la expresión general de la propia muestra, que nos permite normalizar los datos obtenidos en nuestro gen problema. En nuestro caso, seleccionamos como endógeno el *TBP* (*TATA box binding protein*, Hs00427620_m1), cuyo C_T correspondió al ciclo 28 en esa muestra control.

2.2.1.4 Validación de los ensayos *TaqMan*® y detección de DNA genómico

En algunos casos, a pesar del tratamiento con DNAsa, se detectaron trazas de DNA genómico en el material de los pacientes que podrían interferir en nuestros resultados. Aunque según la casa comercial, los ensayos *TaqMan*® adquiridos de tipo "_m1" no presentaban problemas por este tipo de contaminación, decidimos comprobar que efectivamente esto era así mediante un ensayo en el cual se añadía únicamente DNA genómico. En esta reacción, dado que no añadíamos cDNA, no se debería detectar ningún tipo de emisión de fluorescencia por encima del fondo de la reacción. Esto fue así para todos los ensayos salvo el Hs00412753_m1 (ensayo 5' del dominio SH2 de *ZAP70*), en el que se obtuvo señal a partir del ciclo 38. A pesar de que era un ciclo muy elevado, se decidió excluir este gen de los análisis finales.

2.2.1.5 Preamplificación de las muestras

Por otra parte, debido a la poca cantidad de cDNA de cada paciente y el elevado número de ensayos planteados (que además debían realizarse por triplicado), decidimos emplear el sistema de preamplificación *TaqMan*® *Preamp Master Mix*, que nos permitía obtener mayor cantidad de material de partida (apartado 2.3.3.1 de *Material y Métodos*). Los ensayos preliminares realizados

con cDNA control, en los que comparamos los resultados obtenidos con cDNA original y con cDNA preamplificado sin diluir, mostraban valores similares de C_T .

2.2.1.6 Amplificación por RQ-PCR

Las condiciones de los ensayos de RQ-PCR se realizaron como se ha indicado (apartado 2.3.3.4 de *Material y Métodos*). En todos ellos, se incluyó la amplificación en cada muestra problema de *TBP* (ensayo Hs00427620_m1) como referencia endógena, y dos muestras control sin enfermedad, una procedente de sangre periférica (control 1) y otra de médula ósea (control 2).

2.2.2 Análisis de los resultados

Todas las reacciones de amplificación RQ-PCR se llevaron a cabo con las condiciones indicadas anteriormente (apartado 2.3.3.4 de *Material y Métodos*). Los resultados obtenidos fueron recogidos y analizados con el programa *7500 Sequence Detection Software v1.3.1.21* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU). El **Anexo 8** recoge los valores de ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$ y RQ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) obtenidos en los distintos pacientes y controles en cada uno de los análisis.

Para el análisis final de los resultados no se incluyeron los ensayos de los triplicados que mostraban diferencias entre ellos superiores a 0,5 C_T . Es importante destacar que, en general, en todos los análisis se obtuvieron C_{TS} en un rango de 26-34 (semejantes al endógeno), tanto para los pacientes como con las muestras control sin enfermedad. Esto indicaba unos niveles de expresión relativamente bajos para los genes problema. En el caso de *FGFR2*, se superaban estos valores. Los estudios realizados sobre esta técnica analítica sugieren que a ciclos tan elevados la expresión es tan baja que no se pueden confirmar las diferencias de expresión entre las muestras, por lo que decidimos descartar también este gen del estudio final.

Por ello, el análisis final mediante RQ-PCR se realizó únicamente en los genes *ABL1*, *ABL2*, *SYK*, *FGFR1* y *JAK2*. En estos casos comparamos los valores ΔC_{TS} (C_T gen - C_T endógeno) de cada uno en el grupo de pacientes entre sí (mediante una prueba *t de Student* para muestras pareadas) y frente a las muestras control (mediante una prueba *t de Student* para muestras independientes). De esta manera, los genes con valores de ΔC_T muy elevados mostrarían una expresión baja en comparación al gen de expresión constitutiva *TBP*, mientras que los valores ΔC_T negativos indicarían una expresión superior al gen control. Además, los valores de $\Delta\Delta C_T$ (normalización frente al calibrador) muy diferentes a cero indicarían que la expresión de nuestro gen diana es muy distinta en los pacientes respecto a los controles. Si fueran mayores a cero, significaría que la expresión del ensayo es superior en pacientes que en el control (calibradores). El número de veces en que esa expresión es mayor se representa con el valor RQ ($RQ = 2^{\Delta\Delta C_T}$). Finalmente, una

mayor expresión del ensayo 3' frente al 5' de cada gen, podría indicarnos la presencia de una fusión no observada mediante los ensayos FISH (por una microdelección, por ejemplo), o la presencia de transcritos alternativos, con un posible papel en la génesis de la enfermedad.

2.2.2.1 Análisis de SYK

La expresión de *SYK* se analizó en los 16 pacientes y los dos controles antes indicados (datos en el Anexo 8), mediante los ensayos *TaqMan*® Hs00374292_m1 (dominio SH2, ensayo A) y Hs00895375_m1 (dominio TK, ensayo B).

La **Figura 16A** muestra gráficamente los valores de ΔC_T (C_T *SYK* - C_T *TBP*) de cada una de las muestras, para ambos ensayos de *SYK*. En la mayor parte de los casos, tanto de pacientes (MFI, PV, TE y NMPCa) como de controles (SP-C1 y MO-C2), los valores ΔC_T son inferiores a 0. Esto indica que en las muestras de estos individuos *SYK* se expresa más que *TBP*. Únicamente el individuo MFI-1 (i: 9606; c: 27238), presenta una expresión menor que la de *TBP*.

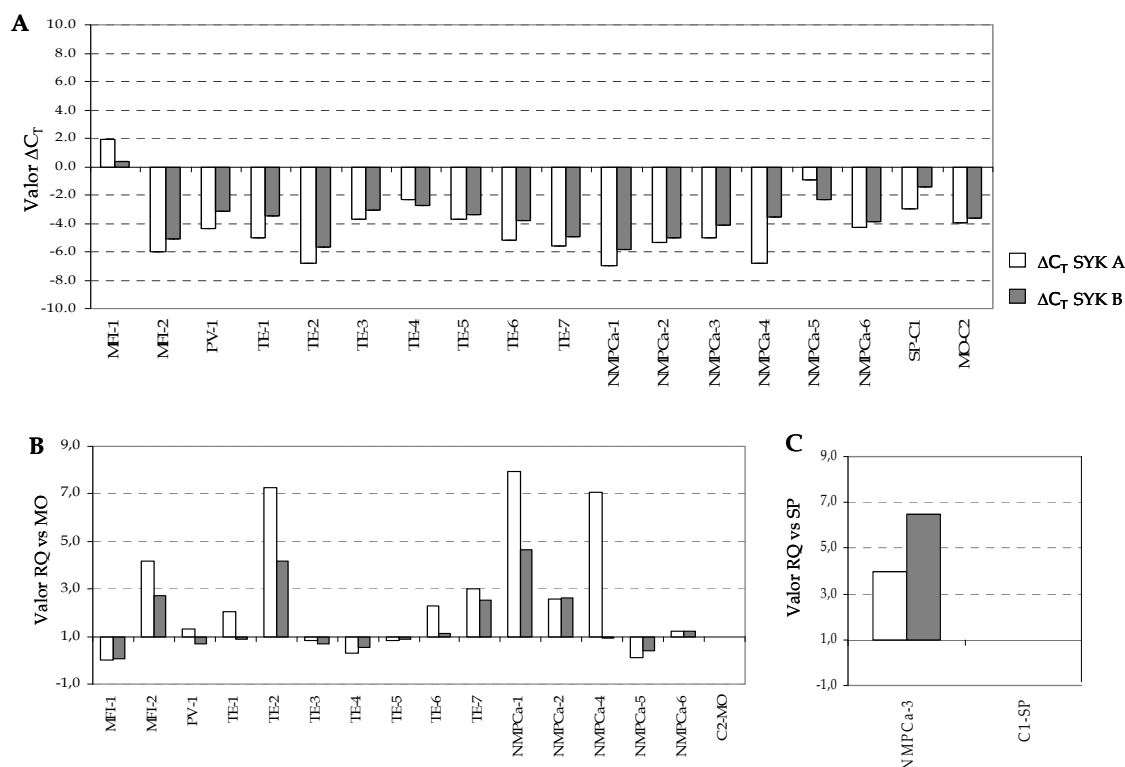


Figura 16. Representación gráfica de los resultados del análisis mediante RQ-PCR para *SYK*. A) Representación del valor de ΔC_T (C_T *SYK* - C_T *TBP*), que compara la expresión de los ensayos de *SYK* (A o 5' en blanco, B o 3' en gris oscuro) frente a la de *TBP*. Ambos ensayos de *SYK* presentan una mayor expresión que el *TBP* (los resultados de ΔC_T son valores negativos) en pacientes y controles (excepto en el caso de MFI-1). B) Representación del valor RQ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) de las muestras de MO, tomando como calibrador control el C2-MO. C) Representación del valor RQ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) de la muestra SP, tomando como calibrador control el C1-SP.

La mayor parte de muestras y controles presentaron una mayor expresión del ensayo situado en 5' (dominio SH2 o ensayo A) (Figura 16A, blanco), que la del situado en 3' (dominio TK o ensayo B) (Figura 16A, color gris oscuro), pero sin diferencias significativas (*t de Student* de dos colas para muestras pareadas, $p > 0.05$). Por el contrario, en los individuos MFI-1 (i: 9606; c: 27238) y NMPCa-5 (i: 18634; c: 25553) se detectó una mayor expresión del ensayo 3' (dominio TK) frente al 5' (SH2).

En las **figuras 16B** y **16C**, se muestran los valores $2^{-\Delta\Delta CT}$ (RQ) para los ensayos A y B de SYK tomando como calibradores las muestras control de MO y SP, respectivamente. La muestra control de MO presenta una mayor expresión de este gen que la muestra control de SP. Puesto que únicamente disponemos de una muestra (NMPCa-3) cuyo material procedía de SP, comparamos el valor de RQ respecto del control C1-SP sólo en este caso (Figura 16C). Para este individuo, la expresión de SYK (especialmente del ensayo B) es muy superior a la del control. Como se puede observar en la figura 16B, también algunos pacientes de MO (MFI-2, TE-2, NMPCa-1 y NMPCa-4) presentan una expresión mayor a la del control C1-MO, especialmente en el ensayo A.

2.2.2.2 Análisis de ABL1

Para el análisis de *ABL1* empleamos los ensayos *TaqMan*® Hs00245445_m1 (dominio SH3, ensayo A) y Hs01104728_m1 (dominio TK, ensayo B) (datos en el **Anexo 8**). Dos de las 16 muestras (TE-2 y NMPCa-2) mostraron resultados nulos, posiblemente debido a la baja calidad del material. Como puede verse en la **figura 17A**, los resultados obtenidos son más heterogéneos que en el caso de SYK.

Si observamos los resultados de los controles empleados (SP y MO) (**Figura 17**) se puede comprobar que en ambos casos la expresión de *ABL1* es mayor que la de *TBP*. Este patrón de expresión se cumple también en las muestras de algunos pacientes, pero no en todos. En el caso de las muestras MFI-1, NMPCa-5 y NMPCa6, la expresión de *ABL1* es muy inferior a la del *TBP*, con valores de ΔC_T muy elevados.

En este caso, la expresión diferencial de ambas regiones génicas de *ABL1* (ensayo A o B) no coincide en los controles, aunque las diferencias en ambos casos son inferiores a una unidad de C_T (**Anexo 8**). En el caso de las muestras de los pacientes no hay un patrón definido, aunque de nuevo la diferencia entre ambos ensayos tampoco supera la unidad de C_T . Sólo en algunos casos (MFI-1, TE-6, NMPCa-5 y NMPCa-6) la expresión del ensayo B (dominio TK) se muestra superior a la del A (dominio SH3). En la figura 21 se representa también el valor $2^{-\Delta\Delta CT}$ de las

muestras tomando como calibrador la MO y la SP respectivamente, en función del tipo de muestra de partida.

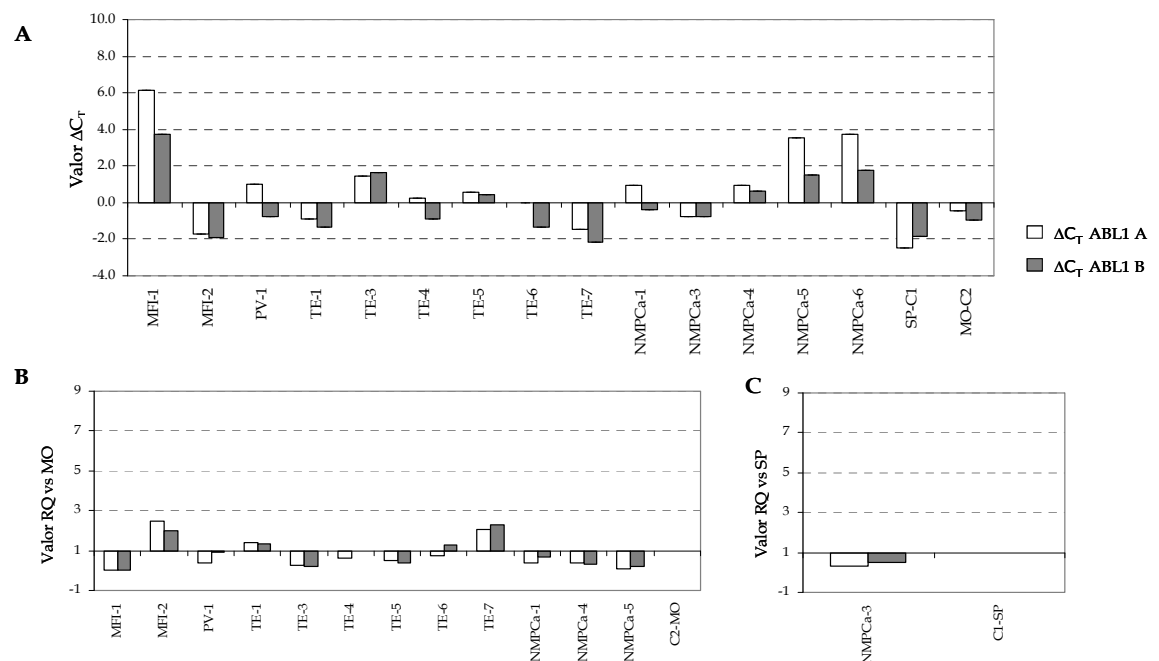


Figura 17. Representación gráfica de los resultados del análisis mediante RQ-PCR para *ABL1*. A) Representación del valor de ΔC_T ($C_{T\ ABL1} - C_{T\ TBP}$), que compara la expresión de los ensayos de *ABL1* (A o 5' en blanco, B o 3' en gris oscuro) frente a la de *TBP*. Los resultados son muy heterogéneos, aunque por lo general la expresión de *ABL1* es mayor a la del *TBP*. No hay diferencias significativas entre la expresión del ensayo A y B en las distintas muestras. B) Representación del valor $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de las muestras de MO tomando como calibrador el control C2-MO. C) Representación del valor $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de la muestra de SP tomando como calibrador el control C1-SP.

2.2.2.3 Análisis de *ABL2*

Para el análisis de *ABL2* (datos en el **Anexo 8**) se emplearon los ensayos *TaqMan*® Hs00943648_m1 (dominio SH3, ensayo A) y Hs00943653_m1 (dominio TK, ensayo B). Como se puede observar en la **figura 18A**, la expresión de este gen es muy baja respecto a *TBP*, tanto en pacientes como en controles. Esto probablemente sea la causa de que, para este gen, varias muestras resultaran nulas en este análisis (MFI-2, TE-2, TE-4, TE-6, NMPCa-2).

Excepto en el caso del control SP y de la NMPCa-4, donde la expresión de A es menor a la de B, en el resto de pacientes y en el control MO la expresión del ensayo A es significativamente mayor que la del ensayo B (prueba *t* de Student de dos colas para muestras pareadas, $p = 0.001$) (**Figura 21A**). Es destacable el caso del paciente NMPCa-4 (i: 17865; c: 24315), que muestra los valores mayores de expresión de este gen con valores de RQ cercanos a 5, en función de la MO

(Figura 18B). También el paciente NMPCa-3, procedente de SP, presenta una expresión mayor de ABL2 que el control correspondiente C2-SP (Figura 18C).

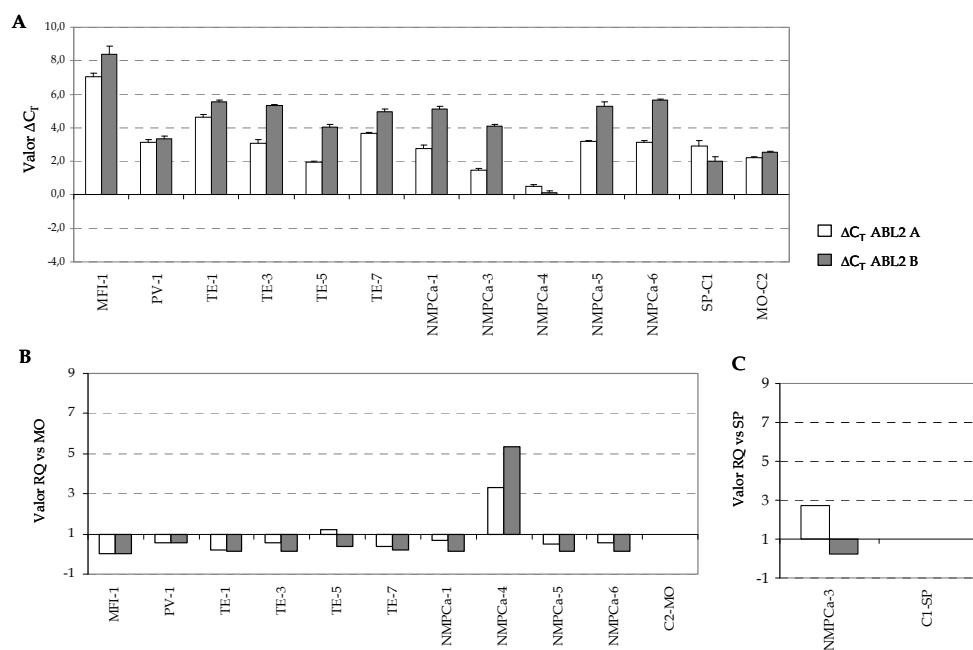


Figura 18. Representación gráfica de los resultados del análisis mediante RQ-PCR para ABL2. A) Representación del valor de ΔC_T (C_T ABL2 - C_T TBP), que compara la expresión de los ensayos de ABL2 (A o 5' en blanco, B o 3' en gris oscuro) frente a la de TBP. La baja expresión de este gen en las muestras hace que los valores de ΔC_T sean mayores a 0 (en la mayoría de los casos con más de 2 C_T de diferencia con respecto a TBP). En general, la expresión del ensayo A (dominio SH3) es significativamente mayor a la del B (dominio TK) ($p=0.001$), excepto en la NMPCa-4 y en el control SP. B) Representación del valor $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de las muestras de MO tomando como calibrador el control C2-MO. C) Representación del valor $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de la muestra NMPCa-3 (procedente de sangre periférica) tomando como calibrador el control C1-SP. Esta muestra presenta una expresión del ensayo A 2.7 veces mayor a la del control SP.

2.2.2.4 Análisis de FGFR1

Para el estudio de *FGFR1* (datos en anexo 8) se utilizaron los ensayos *TaqMan*® Hs00241111_m1 (dominio extracelular, ensayo A) y Hs00915129_m1 (dominio TK, ensayo B), sobre 11 de las 16 muestras de los pacientes. En cinco casos los resultados fueron nulos (MFI-1, TE-2, TE-5, NMPCa-3 y NMPCa-5) ya que los valores de C_T obtenidos fueron demasiado elevados (incluso superiores a 39).

Como en *ABL1*, los resultados son bastante heterogéneos (figura 19A). En algunos casos, la expresión de *FGFR1* es mayor a la del *TBP* (incluido el control MO), pero en otros es menor (incluido el control SP). Como se puede apreciar, en este caso el control MO muestra una expresión más elevada de este gen que el control SP. En el caso de los pacientes (todos ellos procedentes de MO) presentan una menor expresión de *FGFR1* que el correspondiente control

C1-MO (ver **Figura 19B**), aunque en muchos casos mayor a la SP (C2-SP, **Figura 19C**). Únicamente la muestra TE-7, con una expresión general de *FGFR1* muy elevada, presenta una mayor expresión del dominio A que el control MO.

Por lo general, tanto los pacientes como los controles presentan una expresión significativamente mayor del ensayo B respecto del A (prueba *t de Student* de dos colas para muestras pareadas, $p=0.004$) (**Figura 21B**). Esta diferencia es más acusada en algunas muestras, como las correspondientes a los pacientes TE-1 (i: 14886; c: 23055), TE-4 (i: 16737; c: 22419), TE-6 (i: 18708; c: 25667) y NMPCa-6 (i: 18927; c: 25856), pero también se cumple en el control MO.

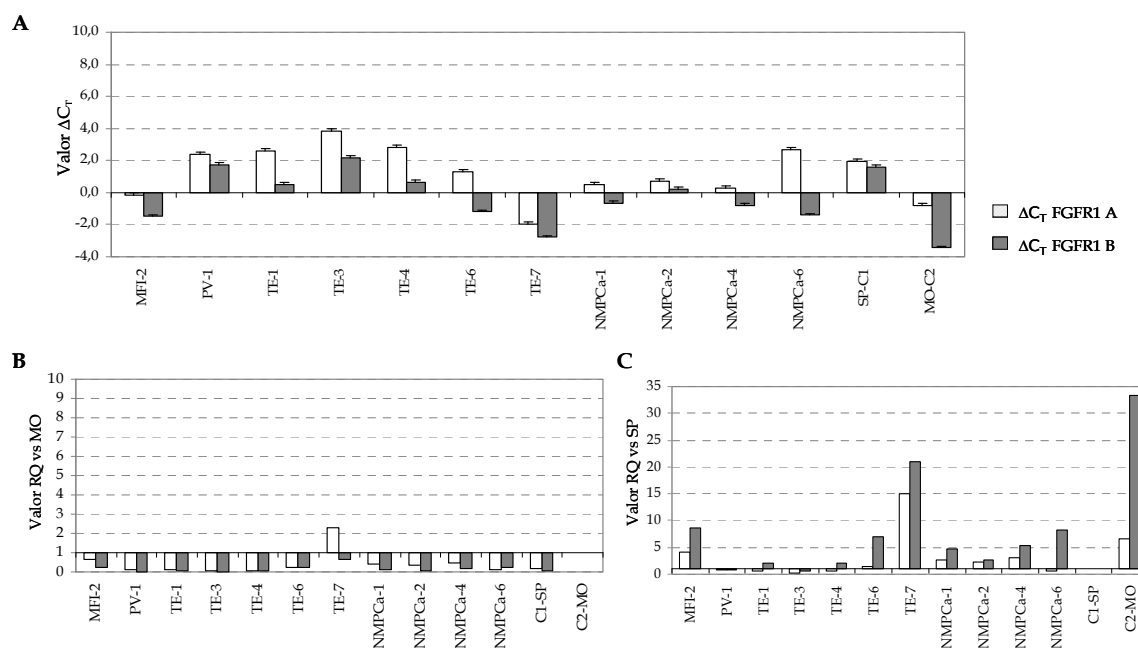


Figura 19: Representación gráfica de los resultados del análisis mediante RQ-PCR para *FGFR1*. A) Representación del valor de ΔC_T ($C_{T\text{ }FGFR1} - C_{T\text{ }TBP}$), que compara la expresión de los ensayos de *FGFR1* (A o 5' en blanco, B o 3' en gris oscuro) frente a la de *TBP*. Como puede observarse, algunos pacientes y controles presentan una mayor expresión de *FGFR1* con respecto a *TBP*, pero en otros casos esta expresión es inferior. La expresión del ensayo B (dominio TK) es significativamente mayor ($p=0.004$) que la del A (dominio extracelular). B) Representación del valor $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de las muestras tomando como calibrador el control MO. C) Representación del valor $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de las muestras tomando como calibrador el control SP.

2.2.2.5 Análisis de JAK2

Para *JAK2* (resultados en **Anexo 8**) utilizamos los ensayos *TaqMan*® Hs01078134_m1 (dominio SH2, ensayo A) y Hs01078128_m1 (dominio TK, ensayo B). En este caso, sólo los resultados de un paciente fueron nulos (NMPCa-5, i: 18634; c: 25553).

Como puede observarse en la **figura 20A**, la expresión de *JAK2* en los dos controles es muy parecida a la del *TBP*, especialmente en el caso de la SP. Además, la expresión de los ensayos A y B no difiere significativamente en los controles. En el grupo de pacientes, sin embargo, la expresión de *JAK2* es bastante variable. Como puede observarse, la mayor parte de los pacientes presenta una expresión significativamente mayor (prueba *t de Student* de dos colas para muestras pareadas, $p < 0.01$) de B con respecto al A (**Figura 21C**). Si analizamos los valores de RQ de las muestras procedentes de MO con respecto al C2-MO (**Figura 20B**), se puede observar como algunos pacientes presentan una expresión muy superior a los controles, especialmente del ensayo B. Destaca el caso de la TE-2, en la que la expresión del ensayo B es 14 veces mayor que en el control MO correspondiente. También destaca la NMPCa-3 (**Figura 20C**), cuya expresión global de *JAK2* es al menos dos C_T s superior a la de su control correspondiente (C1-SP).

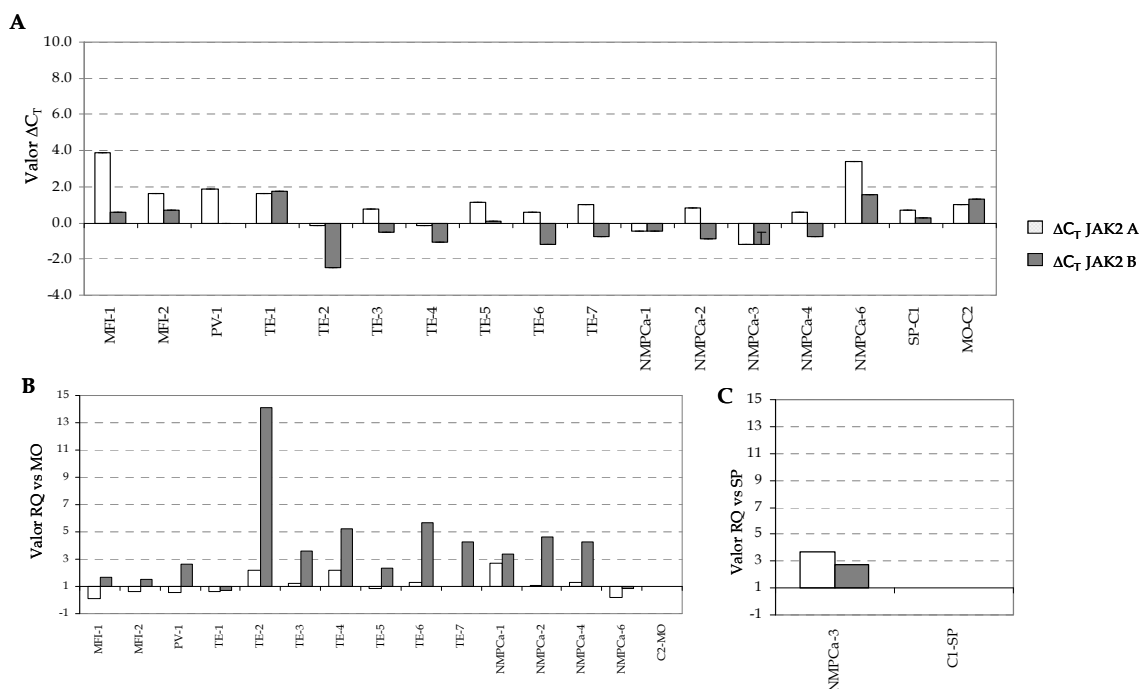


Figura 20: Representación gráfica de los resultados del análisis mediante RQ-PCR para *JAK2*. A) Representación del valor de ΔC_T (C_T *JAK2* - C_T *TBP*), que compara la expresión de los ensayos de *JAK2* (A o 5' en blanco, B o 3' en gris oscuro) frente a la de *TBP*. En el caso de los controles y algunos pacientes, la expresión de *JAK2* es muy similar a la del *TBP*. Sin embargo, en la mayor parte de las TE y en todas las NMPCa, la expresión del dominio TK (ensayo B) es significativamente mayor que la del *TBP* y que la del ensayo A (dominio SH2) ($p < 0.01$). B) Valor $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de las muestras de médula ósea tomando como calibrador el control C2-MO. C) Valor $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de la muestra de sangre periférica NMPCa-3 tomando como calibrador el control C1-SP.

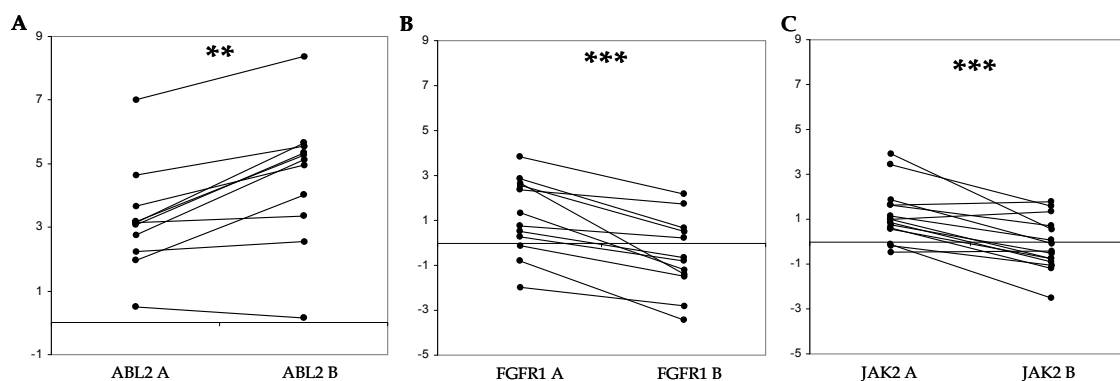


Figura 21. Representación del emparejamiento de los valores de expresión obtenidos para los ensayos A (ΔC_T A) y B (ΔC_T B) de cada una de las muestras de MO para los genes *ABL2*, *FGFR1* y *JAK2*. A) Emparejamiento de *ABL2*. Excepto en el caso de la NMPCa-4 y el control C1-SP, las muestras presentaron una expresión de A (dominio SH3, exones 2-3) significativamente superior a la de B (dominio TK, exones 7-8) (prueba *t* de Student de dos colas para muestras pareadas $p = 0.001$). B) Emparejamiento de *FGFR1*. Los valores de ΔC_T para el ensayo B (dominio TK, exones 12-13) fueron inferiores a los del ensayo A (dominio extracelular, exones 5-6) mostrando diferencias significativas (prueba *t* de Student de dos colas de las medias para muestras pareadas $p = 0.0004$), lo que indica una mayor expresión de esta zona. C) Emparejamiento de *JAK2*. Como puede observarse, los pacientes presentan valores de ΔC_T inferiores en el ensayo B (dominio TK, exones 22-23) que en el A (dominio extracelular, exones 6-7) mostrando diferencias altamente significativas (prueba *t* de Student para muestras pareadas $p < 0.001$), lo que indica una mayor expresión del dominio TK en los pacientes. Esta expresión diferencial del ensayo B sobre el A no se observó en los controles.

3 Ensayos funcionales de las alteraciones en los genes de la familia Cbl

El estudio mediante dHPLC de los genes de la familia Cbl en la serie de pacientes identificó una serie de cambios con efecto en la traducción, la mayor parte no descritos previamente. Con el fin de conocer el efecto que estos cambios podrían producir a nivel fisiológico, se han llevado a cabo una serie de ensayos funcionales *in vitro* con líneas celulares derivadas de leucemia. Estos ensayos han consistido en ensayos de proliferación con células transfectadas con vectores de expresión correspondientes a las ORFs de los genes de esta familia (mutantes y *wild type*).

3.1 Líneas celulares

Las líneas celulares seleccionadas para estos ensayos fueron las derivadas de leucemia M07e y HEL, como modelo humano, y las 32D como murino. Las principales características de estas líneas celulares y las condiciones para su crecimiento se recogen en el anexo 6. Todas ellas fueron cultivadas y mantenidas según se describe en el apartado 3.1 de *Material y Métodos*.

3.1.1 Contaje celular mediante azul tripán

En todos los experimentos realizados con líneas celulares es fundamental conocer el número de células viables de partida. Para medir esta viabilidad empleamos el azul tripán (*trypan blue*), que es un colorante que tiñe las células muertas y nos permite diferenciarlas de las vivas. Esta tinción y un contaje celular en la cámara de Neubauer nos permitieron contabilizar las células viables de partida en todos los ensayos.

3.2 Vectores de expresión

Para la realización de los ensayos funcionales adquirimos los vectores de expresión con la ORF de los genes *C-CBL* (pCMV6-AC-CBL-GFP), *CBL-B* (pCMV6-AC-CBLB-GFP), *CBL-C* (pCMV6-AC-CBLC-GFP), *FLT3* (pCMV6-Entry-FLT3 posteriormente subclonado en pCMV6-AC-FLT3-RFP), Ubiquitina (pCMV6-HA-UBI) y el vector pCMV6-AC-RFP (apartado 3.2 de *Material y Métodos*). A partir de los vectores para *C-CBL*, *CBL-B* y *CBL-C* (vectores *wild type*), obtuvimos mediante mutagénesis dirigida los vectores con las mutaciones deseadas (con cada uno de los cambios detectados previamente en el análisis dHPLC). Estos cambios fueron las sustituciones p.C416W, p.P417R, p.T402HfsX29, p.S675C y p.A678V de *C-CBL*, la sustitución p.R462W de *CBL-B* y las sustituciones p.Q419PfsX81, p.P435S y p.E392K de *CBL-C*.

En el caso de *C-CBL* también creamos un vector mutante para la mutación control p.R420Q, que nos permitiría tener un control positivo con el que optimizar los ensayos. En el caso de *CBL-B* y *CBL-C* no se dispuso de una mutación que nos permitiera tener un control positivo.

Una vez realizadas las reacciones de mutagénesis, se procedió a la transformación de bacterias competentes *E. coli XL1-Blue* con todos los vectores y a la extracción del plásmido de los mismos (apartado 3.2.1. de *Material y Métodos*). Para comprobar que la mutagénesis había sido efectiva y se había introducido el cambio deseado se secuenció completamente la ORF (con los cebadores de la tabla 5 de *Material y Métodos*). Una vez comprobada la secuencia se volvió a cultivar de nuevo los clones adecuados para extraer el plásmido en un medio libre de endotoxinas mediante el kit *EndoFree® Plasmid Maxi Kit* (ver apartado 3.2.4 de *Material y Métodos*).

3.3 Ensayos funcionales de las alteraciones encontradas

Los vectores de expresión (*wild type* y mutantes) se introdujeron en las líneas celulares seleccionadas mediante nucleofección (apartado 3.3 de *Material y Métodos*). Para ello, empleamos el equipo *Amaxa® Nucleofector®II* con la solución V y los programas X-001 para la línea celular M07e, X-005 para la HEL y E-032 para la 32D, según las recomendaciones del fabricante. Para comprobar que estas condiciones eran adecuadas, utilizamos 2 µg de vector

vector *pmax-GFP* suministrado por el fabricante y 2×10^6 millones de células (figura 21 de *Material y Métodos*), que posteriormente se mantuvieron en medio completo (con los requerimientos de cada línea celular) a 37°C con 5% CO_2 . Transcurridas 24 h después de la nucleofección se realizó una extensión de este cultivo y se observó en un microscopio de fluorescencia (apartado 3.3.2 de *Material y Métodos*) (objetivo 20x, *Nikon Eclipse 80i*, Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japón), empleando el filtro verde (Figura 22).

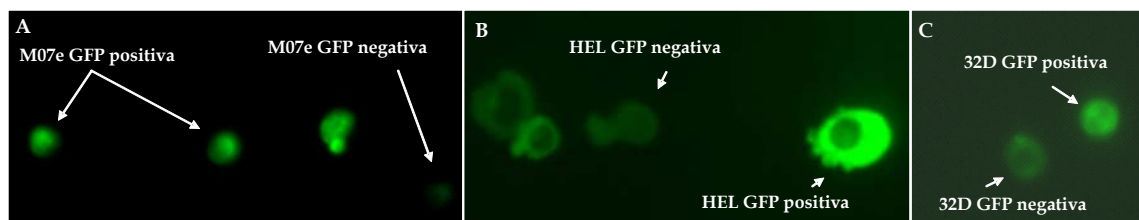


Figura 22. Observación a microscopio de fluorescencia de las células transfectadas con el vector control *pmax-GFP* 24 h después de la nucleofección. Las células que han adquirido y expresan el vector se observan verde brillante, a diferencia de aquellas que no lo expresan, que permanecen oscuras. A) Ensayo con células M07e (programa X-001). B) Ensayo con células HEL (programa X-005). C) reensayo con células 32D (programa E-032).

Una vez comprobado que la nucleofección había tenido lugar y que el vector se expresaba dentro de la célula, calculamos la eficiencia del proceso, es decir, el porcentaje de células que habían adquirido el vector (células verde-brillante) respecto del total. En todos los casos obtuvimos porcentajes de eficiencia alrededor de 70-80%, lo que coincide con los datos indicados por los protocolos del fabricante del equipo de nucleofección (76% en el caso de M07e, 88% en el caso de HEL y 80% en 32D).

3.3.1 Optimización de los ensayos de proliferación: MTS

En todos los casos los ensayos de proliferación con MTS se llevaron a cabo en las condiciones indicadas por el fabricante (apartado 3.4 de *Material y Métodos*).

De manera inicial determinamos la relación entre el número de células y la medida de absorbancia a 492 nm con la línea celular 32D, en los rangos 0 - 10^4 células cada 1000 células (Figura 23A), 0 - 2×10^5 cada 20.000 células (Figura 23B) y 10^5 - 6×10^5 cada 50.000 células (Figura 23C). Las células fueron contabilizadas previamente mediante una cámara de Neubauer y tinción de azul tripán. Como se observa en la figura 28, pequeñas diferencias en los valores de absorbancia reflejan grandes diferencias en el número de células. El valor de absorbancia (generalmente cercano a 0.2) del triplicado correspondiente al blanco (0 células) es debido a la absorbancia basal que presentan los componentes del medio.

La eficiencia de la nucleofección (porcentaje de células que han adquirido el vector) es variable en función del tipo celular, el programa escogido y el vector introducido. Además, los ensayos posteriores de proliferación (MTS) pueden verse afectados por el crecimiento diferencial de las células que no hayan adquirido dicho vector. Por ello, dado que los vectores utilizados son *Neo^R* (con resistencia a la neomicina y derivados) todos los medios de cultivo fueron suplementados 24 h después de la nucleofección con Geneticina G418 (GIBCO™ *Geneticin G418 sulphate*, Ref 11811-031, Invitrogen-Life Technologies, Paisley, Reino Unido). Según nuestros ensayos iniciales, las concentraciones elevadas de este compuesto (superiores a 400 µg/mL) se mostraban muy eficaces en la eliminación de las células que no hubieran adquirido el vector. Sin embargo, en nuestro caso debíamos introducir dos vectores de manera sucesiva: en primer lugar uno con la ORF de *FLT3* (pCMV6-AC-FLT3-RFP) y posteriormente los distintos vectores con *CBL* (controles y mutantes). Tras la introducción del primer vector era necesario mantener las células en crecimiento durante al menos siete días y así obtener un número suficiente para la realización de la segunda nucleofección. El mantenimiento de cultivos celulares durante tantos días con concentraciones elevadas de G418 podía provocar la generación de resistencias a este compuesto, por lo que comprobamos si el tratamiento era efectivo a concentraciones menores, aplicadas durante más tiempo. Los resultados mostraron que este compuesto era eficaz a partir de 25 µg/mL. Por ello, determinamos tratar con esta concentración a las células transfectadas con pCMV6-AC-FLT3-RFP hasta la transfección de los vectores *CBL*. Una vez comenzados los ensayos de MTS la concentración se redujo a 10 µg/mL, suficiente para mantener las células seleccionadas durante varios días.

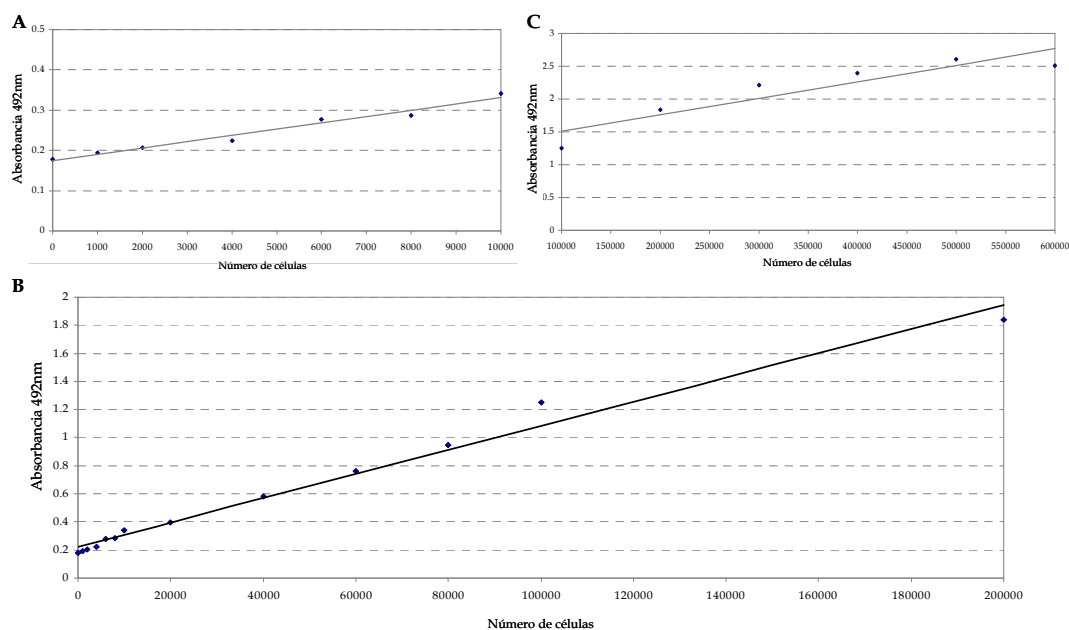


Figura 23. Representación de la relación lineal entre el número de células (eje X,) y la absorbancia a 492 nm (eje Y). A) Rango de 0-10.000 células, con medida cada 1000 ($y = 2E-05x + 0.1746$; $R^2 = 0.9747$). B) Rango de 0 - 200.000 células, con medida cada 20.000 ($y = 9E-06x + 0.2303$; $R^2 = 0.9842$). C) Rango de 100.000 - 600.000, con medida cada 50.000 ($y = 3E-06x + 1.257$; $R^2 = 0.8443$).

3.3.2 Resultados obtenidos en el modelo humano: nucleofección de M07e y HEL

Con el fin de conocer el efecto que inducen las mutaciones de CBL en la proliferación de una línea celular los primeros ensayos se realizaron comparando los resultados del ensayo MTS obtenidos en las células transfectadas con el vector pCMV6-AC-CBL-GFP *wild type* (al que denominaremos “*CBL WT*”) con los obtenidos en las células transfectadas con el vector mutante control (“*CBL R420Q*”), creado mediante mutagénesis.

Los análisis funcionales publicados con las mutaciones en CBL realizados en células 32D murinas indicaban que previamente parecía necesario introducir *FLT3* o *KIT* para potenciar su efecto proliferativo. Sin embargo, no se han publicado estudios de este tipo sobre líneas celulares humanas, por lo que consideramos que quizá en el caso de las líneas M07e y HEL (modelos humanos seleccionados) esto no sería necesario. Por ello, realizamos estos ensayos directamente con los vectores *CBL WT* y *CBL R420Q*, además del vector pmaxGFP como control de la nucleofección. Dado que la mutación p.R420Q tiene efecto en promover la proliferación en el modelo 32D (Sargin et al, 2007), deberíamos observar un mayor crecimiento de las células transfectadas con dicho vector que en las transfectadas con el vector *CBL WT*.

Los resultados obtenidos no mostraron ningún tipo de diferencia en la proliferación de las células transfectadas con los distintos vectores (**Figura 24A y B**). En ninguno de los grupos celulares (M07e o HEL) obtuvimos crecimiento alguno, incluido el control con GFP. Por ello, procedimos a realizar nuevos ensayos con la introducción previa de *FLT3* (vector pCMV6-AC-FLT3-RFP) para favorecer su sobreexpresión. En todos los casos, se utilizó la solución V con los programas específicos de cada tipo celular (X-001 en M07e, X-005 en HEL). A continuación, las células obtenidas se mantuvieron en cultivo con medio completo y 25 µg/mL de G418 a 37°C y 5% CO₂, durante al menos siete días, antes de la introducción de los vectores CBL (*CBL WT* y *CBL R420Q*). La entrada y expresión del vector fue comprobada en todos los casos con un microscopio de fluorescencia. Tras la nucleofección de los vectores *CBL WT*, *CBL R420Q* y pmaxGFP, las células se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂ en medio completo durante 72 h para asegurarnos de que el vector se estaba expresando. Tras ello se realizaron los ensayos MTS colocando en una placa de 96 pocillos estériles 10.000 células por pocillo resuspendidas en 100 µL de medio. El medio contenía los requerimientos de cada línea celular (10 ng/mL de IL3 humana en el caso de M07e), 10 µg/mL de G418 y 10 ng/mL de ligando de FLT3 (*FLT3L human*) para estimular el receptor FLT3. Los ensayos MTS se llevaron a cabo durante 5 - 8 días aplicando el reactivo durante 3 h. Los resultados se muestran en la **figuras 24C** (células M07e) y **24D** (células HEL).

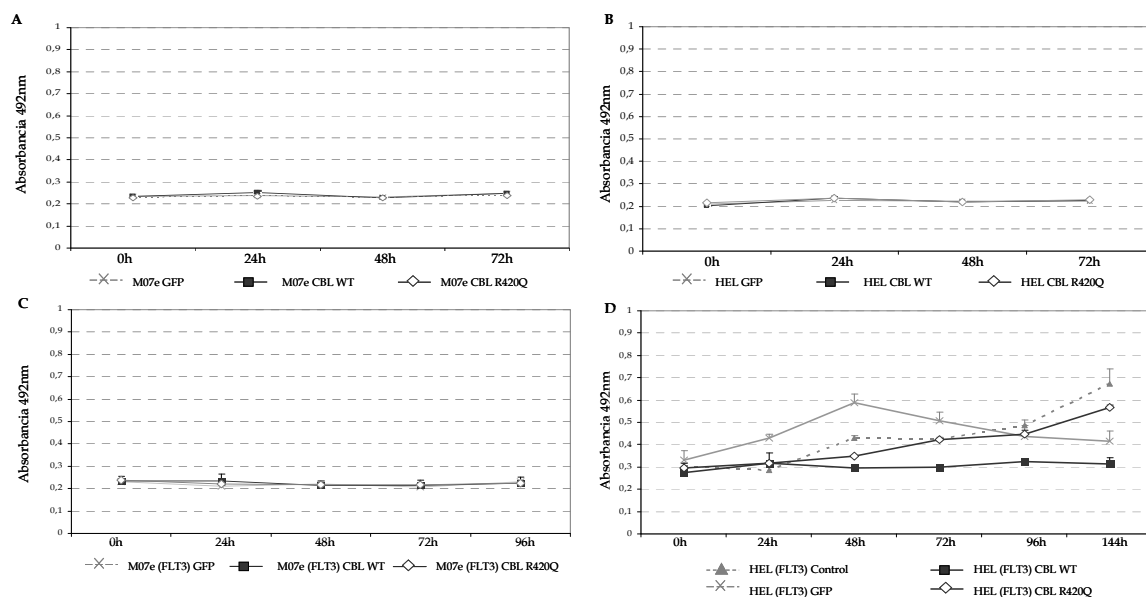


Figura 24. Resultados de los ensayos de proliferación obtenidos tras la nucleofección de los vectores control (pmaxGFP, CBL WT y CBL R420Q) sobre líneas celulares de origen humano. A) Resultado del ensayo de MTS observado en las células M07e tras la nucleofección directa de los vectores pmaxGFP, CBL WT y CBL R420Q (2 µg de vector) sobre 2 x 10⁶ células. Ninguno de los grupos celulares mostró crecimiento durante los cuatro días de medida. B) Resultado del ensayo de MTS en las células HEL tras la nucleofección directa de los vectores pmaxGFP, CBL WT y CBL R420Q (2 µg de vector) sobre 2 x 10⁶ células. Tampoco en este caso las células mostraron crecimiento alguno. C) Resultado del ensayo de MTS observado en las células M07e, previamente transfectadas con pCMV6-AC-FLT3-RFP. Las medidas de absorbancia, que comenzaron 72 h tras la nucleofección, se realizaron durante cinco días. En ningún caso se observan diferencias en la proliferación. D) Resultado del ensayo de MTS observado en las células HEL previamente transfectadas con pCMV6-AC-FLT3-RFP. Las medidas de absorbancia, que comenzaron 72 h tras la nucleofección, se realizaron durante ocho días. En la medida observada del día 8 las células transfectadas con CBL R420Q presentan un ligero aumento en la proliferación, en comparación con las células con CBL WT, que no muestran aumento en la proliferación. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de los valores obtenidos en los distintos triplicados de cada medida de MTS.

En el caso de la línea M07e no se observó ninguna diferencia en la proliferación celular en ninguna de las situaciones (previa o no nucleofección de FLT3), por lo que esta línea no parece muy adecuada para comprobar los efectos de las mutaciones en CBL. En el caso de la línea HEL se puede comprobar cómo las células transfectadas con el vector CBL R420Q mostraban una mayor tasa de proliferación que las transfectadas con el vector CBL WT, aunque este efecto no se hace evidente hasta el octavo día del ensayo MTS.

Una vez observado el efecto inducido por la mutación p.R420Q en la proliferación de las HEL, realizamos el mismo ensayo con el resto de mutaciones encontradas en C-CBL (p.C416W, p.P417R, p.T402HfsX29, p.S675C y p.A678V). La **figura 25** representa los resultados obtenidos.

Como puede apreciarse, también en esta segunda prueba la mutación control p.R420Q mostró, a partir de las 96 h, un aumento de proliferación de las HEL con respecto al control WT (**Figura 25A**). Las mutaciones localizadas en el dominio RING finger de C-CBL (p.C416W, p.P417R y

p.T402HfsX29) mostraron un perfil semejante al de esa mutación control, induciendo un aumento en la proliferación celular en el día 8 de medida (**Figura 25B**). También las mutaciones localizadas en el dominio rico en prolina (p.S675C y p.A678V) provocaron este aumento en la proliferación de las HEL a partir de las 96 h (**Figura 25C**). Cabe destacar los resultados obtenidos con la mutación p.C416W, ya que induce un aumento en la proliferación de las células HEL(FLT3) a partir de las 48 h del comienzo del ensayo (**Figura 25D**), antes incluso que la mutación utilizada como control.

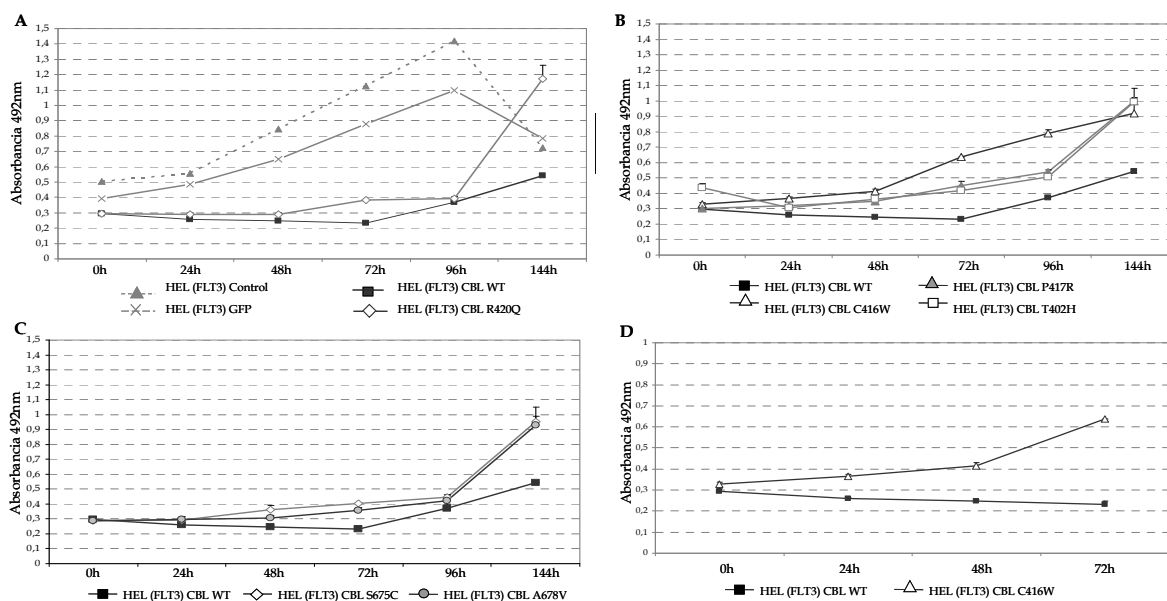


Figura 25. Resultados obtenidos en el ensayo de proliferación de las células HEL tras la nucleofección de los mutantes detectados en nuestro estudio mediante dHPLC. Las nucleofecciones y posterior ensayo de MTS se realizaron de manera similar a los ensayos cuyos resultados se muestran en la figura 29. En primer lugar introdujimos *FLT3* (pCMV6-AC-*FLT3*-RFP), tras lo cual las células se mantuvieron en cultivo durante varios días hasta obtener un número suficiente para realizar el resto de nucleofecciones. Durante ese tiempo, el medio de cultivo fue suplementado con G418 (25 μ g/ml) y ligando de *FLT3* (*FLT3L*, 10 ng/ml). Una vez obtenido el número de células necesario, se realizó la nucleofección de los vectores *CBL* mutantes y *wild type* (4 μ g de vector) en 3.5×10^6 células HEL(*FLT3*). En este caso incluimos un control de células transfectadas sin vector *CBL* y otro control de células transfectadas con el vector pmaxGFP. A) Resultado del ensayo de MTS con la mutación control p.R420Q. Los controles de la nucleofección (HEL control y GFP) mostraron un aumento en la proliferación mayor que las células transfectadas con los vectores *CBL*, pero a partir de las 96 h comienzan a morir. La mutación control induce, a partir de las 96 h, un aumento en la proliferación de las HEL(*FLT3*) con respecto a las que tienen el vector *CBL WT*. B) Resultado del ensayo de MTS observado con los mutantes detectados en el dominio *RING finger* (p.C416W, p.P417R y p.T402H). También en estos casos a partir de las 96 h presentan un aumento de proliferación con respecto a las que tienen el vector *CBL WT*. C) Resultado del ensayo de MTS observado con los mutantes del dominio rico en prolina (p.S675C y p.A678V), que también inducen un aumento en la proliferación de las HEL semejante al de los mutantes en la región *RING finger*. D) Destaca el caso de la mutación p.C416W, detectada en un paciente con NMPCa V617F/*JAK2* negativa, cuyo efecto en la proliferación de las HEL se observa a partir de las 48 h tras el comienzo del ensayo MTS. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de los valores obtenidos en los distintos triplicados de cada medida de MTS.

Todas las mutaciones detectadas en nuestro estudio actúan de manera semejante a la mutación control de *C-CBL* (p.R420Q). En el caso de la mutación p.C416W, además, la inducción del aumento en la proliferación celular se hace evidente antes. La **figura 26A** representa la tasa de proliferación o crecimiento observada en cada grupo de células HEL(FLT3) transfectadas con los vectores *C-CBL*. Esta tasa de crecimiento ha sido calculada comparando la absorbancia medida en el día 8 (absorbancia máxima) con la absorbancia inicial. En todos los casos el crecimiento inducido por los vectores mutantes en las células HEL(FLT3) fue al menos dos veces superior al inducido por el vector *CBL WT* (**Figura 26B**).

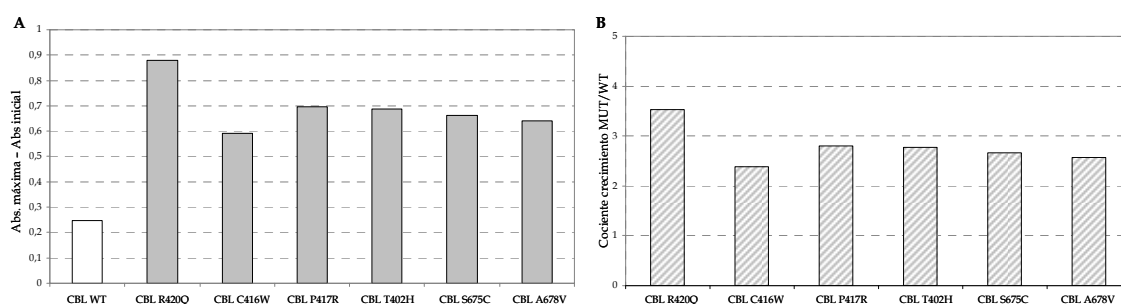


Figura 26. A) Tasa de crecimiento inducida en las células HEL(FLT3) por cada uno de los vectores *CBL* (WT y mutantes). La tasa de crecimiento se calcula como la absorbancia máxima (día 8) menos la absorbancia inicial. B) Representación del cociente entre el crecimiento de las células con los vectores mutantes y con el vector *CBL WT*. Como puede observarse, todas las células mutantes presentaban, al menos, un crecimiento dos veces mayor al de las células con *CBL WT*.

A pesar de que el efecto inducido por los mutantes *C-CBL* en las HEL(FLT3) era muy tardío (a partir de las 96 h tras el comienzo del MTS), decidimos repetir este experimento para demostrar que era reproducible. Sin embargo, no fue posible obtener un resultado semejante, ya que en el resto de ensayos las células no mostraron crecimiento alguno tras la nucleofección de ninguno de los vectores *C-CBL*, incluido el control p.R420Q. Tras la nucleofección de los vectores *C-CBL* en las HEL(FLT3) las células morían, mostrando constantemente valores de absorbancia a 492 nm cercanos a 0,3.

Debido a que el tiempo de división de la línea HEL es menor a las células 32D, especialmente tras la nucleofección del vector FLT3, resultaba más rápido y sencillo obtener grandes cantidades de células en el caso de esta línea murina. Por ello, los estudios funcionales de los mutantes de *CBL-B* y *CBL-C* fueron analizados únicamente en las células 32D.

3.3.3 Resultados obtenidos en el modelo murino: 32D

Al igual que en el caso de las células humanas (M07e y HEL), tal como indican los estudios realizados con la línea celular 32D en la bibliografía, las nucleofecciones de los vectores *C-CBL* (*WT* y mutantes) se realizaron tras la nucleofección previa de *FLT3* (programa E-032 y solución V). Posteriormente, las células se mantuvieron en cultivo durante una semana, con los requerimientos propios de esta línea celular hasta la nucleofección de los vectores *C-CBL* (IL3 murina 10 ng/mL, G418 25 µg/mL y FLT3L 10 ng/mL).

3.3.3.1 Mutaciones en el dominio *RING finger* de *C-CBL*

De la misma manera que en los modelos humanos, en primer lugar se llevó a cabo la nucleofección de los vectores *CBL WT* y *CBL R420Q* como mutante control, con el fin de comprobar que el ensayo era el adecuado sobre las células 32D(*FLT3*). Además en esta línea celular, por ser murina, la nucleofección de los vectores *CBL WT* y *CBL R420Q* se realizó simultáneamente a la de un vector de expresión de ubiquitina humana (pCMV-HA-UBI) necesaria para la actividad ubiquitin-ligasa de *C-CBL*. Como se trata de un vector de menor tamaño, la cantidad añadida de este vector fue menor. También en este caso se incluyeron en los ensayos dos controles, correspondientes a células nucleofectadas con el vector pmaxGFP (“32D GFP”) y células sometidas a nucleofección sin vector *CBL* ni ubiquitina, denominadas “32D control”. En ambos casos estas células 32D habían sido previamente nucleofectadas con *FLT3*. Tras las nucleofecciones, las células se mantuvieron durante 48 h en cultivo con medio completo antes del comienzo de los ensayos de MTS, que fueron realizados en las mismas condiciones descritas anteriormente.

El resultado de los ensayos de MTS con el vector mutante *CBL R420Q* en presencia de IL3 murina se muestran en la **figura 27A**. Se puede observar como, a partir de las 48 horas del inicio del ensayo, las células nucleofectadas con *CBL R420Q* experimentan un aumento de su proliferación con respecto a las células nucleofectadas con *CBL WT*. Esta mayor proliferación se comprobó en cuatro ensayos distintos (figura 32A). Agrupando los resultados se puede observar como la absorbancia máxima media observada en las células con *CBL R420Q* (valor medio máximo de 1,43) era 1,97 veces mayor a la de las células con *CBL WT* (valor medio máximo de 0,72), lo que supone una diferencia estadísticamente significativa (prueba *t de Student* de 1 cola para muestras independientes, $p=0,034$). Teniendo en cuenta la regresión correspondiente a la ecuación de la figura 28B ($y = 9E-06x + 0.2303$; $R^2 = 0,9842$), podemos determinar el número de células aproximado al que corresponde esa diferencia en función de la medida de absorbancia máxima media observada en ambos grupos (**Figura 28A**). El número de células con el vector *CBL R420Q* observadas en el día 4 (n° células = 133.200), es 2,45 veces mayor al de las células con el

vector *CBL WT* (n° células = 54.300). Es importante tener en cuenta que el medio en el que se encontraban las células en el ensayo de MTS contenía los factores de crecimiento requeridos por las células 32D (IL3m, 10 ng/mL), G481 (10µg/ml) y FLT3L (10 ng/mL). Por ello, estos resultados indican que la mutación p.R420Q utilizada como control provoca un aumento en la proliferación en esta línea celular, aunque no demuestran que induzca a las 32D un crecimiento independiente de IL3m y FLT3L.

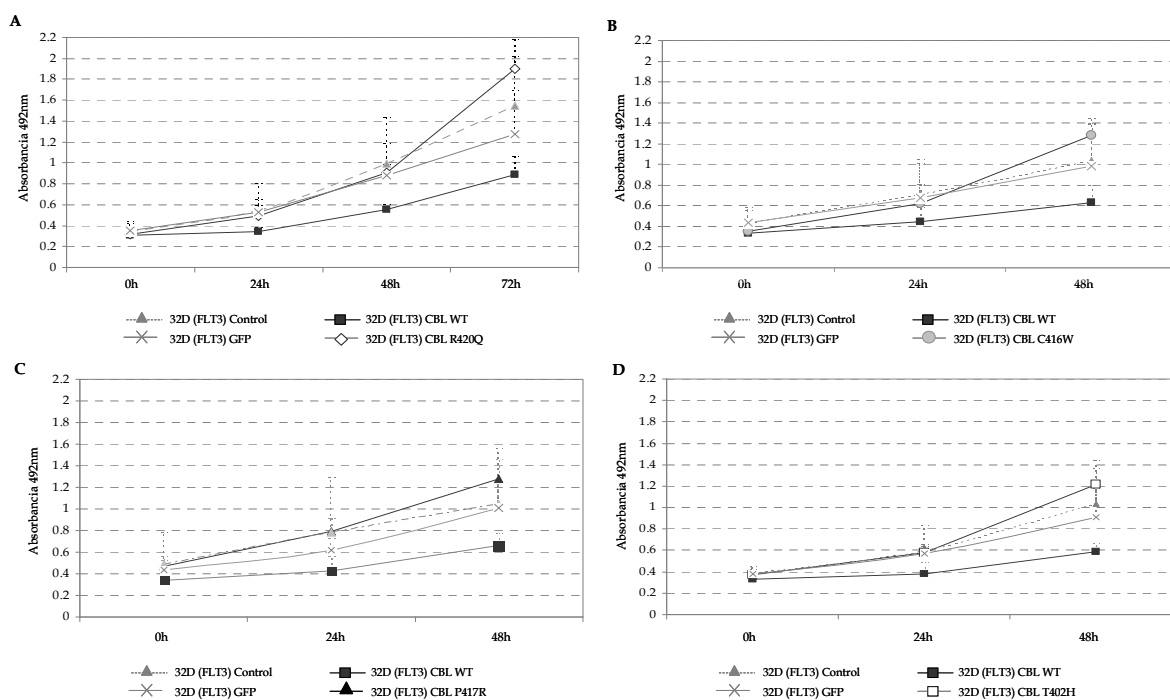


Figura 27. Representación gráfica de los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación con MTS correspondientes a cuatro nucleofecciones distintas en cada caso con los vectores *CBL R420Q*, *CBL C416W*, *CBL P417R* y *CBL T402H* sobre células 32D previamente nucleofectadas con *FLT3*. A) Resultados de los ensayos con *CBL R420Q* en la que el aumento de proliferación con respecto a las células *CBL WT* es significativamente superior (prueba *t de Student 1 cola*, $p = 0,034$) a las 72 h del comienzo del ensayo MTS. B) Resultados de los ensayos con *CBL C416W*. En este caso ya a las 48 h se induce un aumento en la proliferación muy significativo (prueba *t de Student 1 cola*, $p = 0,003$) con respecto a las células con *CBL WT*. C) Resultados de los ensayos con *CBL P417R*. También en este caso a las 48 h se induce un aumento en la proliferación muy significativo (prueba *t de Student 1 cola*, $p = 0,003$) en comparación con las células con *CBL WT*. D) Resultados de los ensayos con *CBL T402H*. Los resultados también muestran la inducción a las 48 h de un aumento en la proliferación muy significativo (prueba *t de Student 1 cola*, $p = 0,001$) con respecto a las células con *CBL WT*

Una vez comprobado el efecto de la mutación control en la proliferación de las células 32D(FLT3), realizamos los mismos ensayos para comprobar si las mutaciones detectadas en el mismo dominio *RING finger* de *C-CBL* (p.C416W, p.P417R y p.T402HfsX29) desencadenaban un efecto similar al de la R420Q. La **figura 27** representa las medidas de absorbancia media obtenidas en los ensayos de MTS, correspondientes a cuatro nucleofecciones distintas, con los vectores *CBL C416W* (Figura 27B), *CBL P417R* (Figura 27C) y *CBL T402H* (Figura 27D).

De la misma manera que en el caso de la p.R420Q, existen diferencias significativas entre el valor de absorbancia observado en las células mutantes y el de las células WT, que se hace evidente ya a las 48 h de medida de MTS. La **figura 28** (B, C y D) representa el número de células al que corresponde la absorbancia máxima media obtenida con cada vector, en comparación al WT. Como puede observarse, el valor de absorbancia máxima media obtenida con los mutantes p.R420Q, p.C416W, p.P417R y p.T402HfsX29 es prácticamente el doble (1,99, 1,92, 1,90 y 2,02 veces, respectivamente) de la absorbancia máxima media observada en las células WT. Observando la figura 28, comprobamos que esta diferencia es mayor en cuanto al número de células correspondiente, que es 2,45, 2,4, 2,4 y 2,7 veces mayor al número de células WT respectivamente.

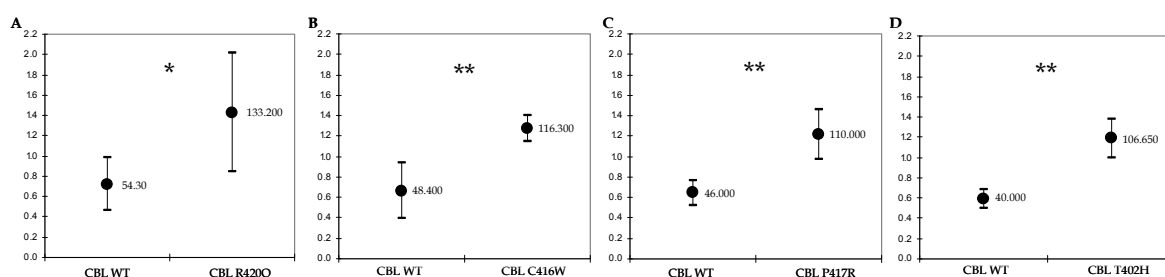


Figura 28. Representación del número de células (según la ecuación correspondiente a la figura 28B, $y = 9E-06x + 0,2303$; $R^2 = 0,9842$), al que corresponde la medida de absorbancia máxima media de 4 nucleofecciones observada con cada grupo de células. A) El valor de absorbancia máxima media observado en las células mutantes R420Q fue de 1,43, que corresponde a 133.200 células y difiere significativamente (prueba *t de Student* 1 cola, $p=0,034$) del valor de absorbancia máxima medio de las células WT (0,72), correspondiente a 54.300 células. B) Valor de absorbancia máxima observado en las células mutantes C416W (1,28) correspondiente a 116.300 células, que difieren significativamente (prueba *t de Student* 1 cola, $p= 0,003$) de las 48.400 correspondientes al valor máximo de absorbancia de las WT (0,67). C) Valor de absorbancia máxima observado en las células mutantes P417R (1,22) correspondiente a 110.000 células, que difieren significativamente (prueba *t de Student* 1 cola, $p= 0,003$) de las 46.000 correspondientes al valor máximo de absorbancia de las WT (0,64). D) El valor de absorbancia máxima observado en las células mutantes T402H (1,19) correspondiente a 106.600 células, difiere significativamente (prueba *t de Student* 1 cola, $p= 0,001$) del valor máximo de absorbancia de las WT (0,59), correspondiente a 40.000 células.

Las tres mutaciones p.C416W (figura 27B, detectada en un paciente con NMPC atípica V617F/JAK2 negativa), p.P417R y p.T402HfsX29 (figura 27C y D, ambas detectadas en pacientes V617F/JAK2 positivos), inducen un aumento en la proliferación de las células 32D con respecto a las CBL WT, observable incluso antes que las que poseen el vector con la mutación control.

La **figura 29** recoge los resultados de la tasa de proliferación o crecimiento que induce cada una de las mutaciones. Esta tasa de proliferación se calcula comparando en cada uno de los ensayos la absorbancia máxima observada con el valor inicial mostrado por ese mismo grupo de células (Abs. máxima - Abs. inicial). En todos los casos, el crecimiento experimentado por las células transfectadas con los vectores con las mutaciones del dominio *RING finger* (p.R420Q, p.C416W,

p.P417R y p.T402HfsX29) fue significativamente superior al de las células transfectadas con el vector *CBL WT* (prueba *t de Student* de 1 cola, con $p= 0,040$, $p= 0,023$, $p= 0,003$ y $p<0,001$, respectivamente).

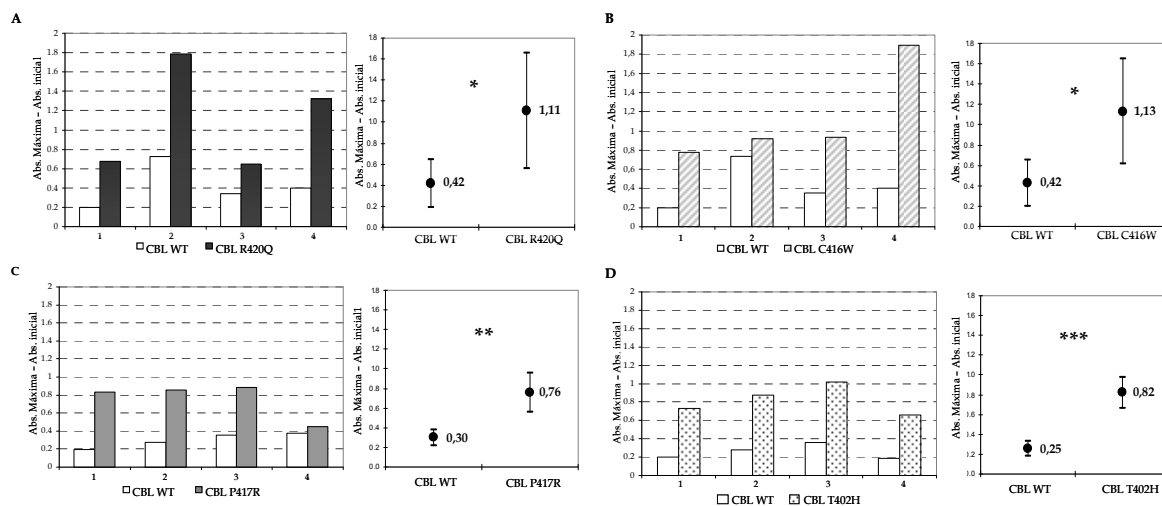


Figura 29. Tasa de proliferación o crecimiento (Abs. máxima - Abs. inicial) inducida por cada una de las mutaciones analizadas. En cada una de las partes se muestran los resultados obtenidos en cuatro ensayos MTS de nucleofecciones independientes, en comparación a los resultados con las células *CBL WT*. Se representa también el crecimiento medio con las desviaciones estándar observado para cada grupo. A) Resultados de la mutación control p.R420Q en el que se observa un crecimiento significativamente superior (prueba *t de Student* de 1 cola, $p= 0,040$) al de las células con *CBL WT*. B) Resultados de la mutación p.C416W, en este caso también se observa un crecimiento significativamente superior (prueba *t de Student* de 1 cola, $p= 0,023$) al de las células con *CBL WT*. C) Resultados de la mutación p.P417R, aquí la diferencia con respecto al crecimiento observado con las células con *CBL WT* es muy significativa (prueba *t de Student* de 1 cola, $p= 0,003$). D) Resultados de la mutación p.T402HfsX29, en este caso las diferencias de crecimiento son altamente significativas (prueba *t de Student* de 1 cola, $p<0,001$).

La **figura 30** compara, ensayo por ensayo, los cocientes entre la tasa de crecimiento de las células con el vector mutante y la tasa de crecimiento de las células con *CBL WT*, que en todos los casos se encontraron en el rango entre 2,74 y 3,31 (**Figura 30**).

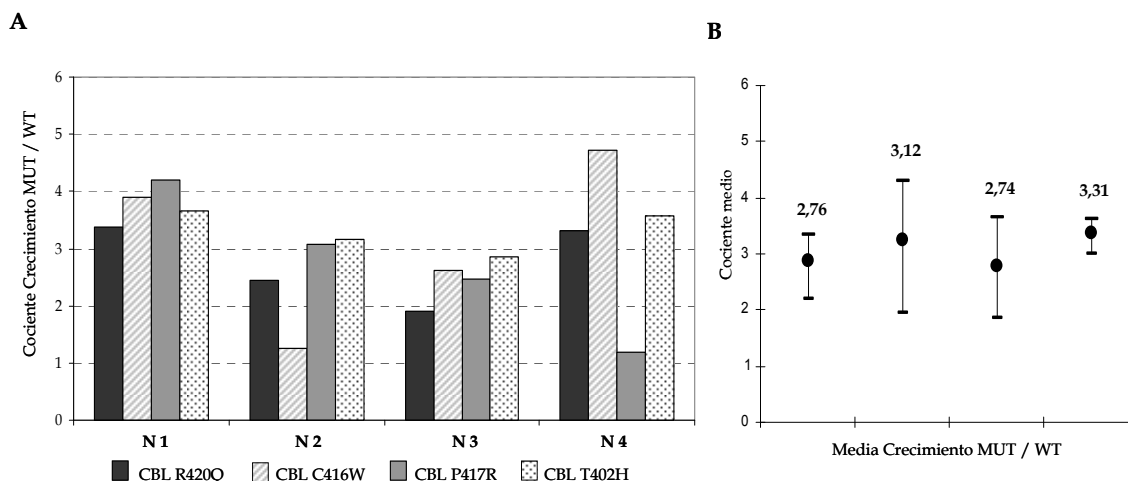


Figura 30. A) Cociente entre el crecimiento obtenido en las células nucleofectadas con los vectores mutantes (*R420Q*, *C416W*, *P417R* y *T402H*) respecto del *WT* en cuatro nucleofecciones distintas. B) Representación de la media de estos cocientes, con las desviaciones estándar típicas. El crecimiento celular inducido por la mutación p.*R420Q* es 2,76 veces mayor, el de p.*C416W* es 3,12 veces mayor, el de la p.*P417R* es 2,74 veces mayor y el de p.*T402H* es 3,31 veces superior.

3.3.3.2 Mutaciones en el dominio rico en Prolina de *C-CBL*

A pesar de que los estudios publicados sobre el papel de *C-CBL* en el desarrollo neoplásico indicaban que las mutaciones se encuentran localizadas en el dominio *RING finger*, nuestro estudio inicial de los 44 pacientes *V617FJAK2* negativos identificó la sustitución p.*A678V* (g.81664C>T) en un paciente con NMPC atípica (i: 10750; c: 15458) que afectaba al dominio rico en prolina. Este resultado nos llevó a analizar esta región en la serie ampliada de pacientes en los que encontramos también la sustitución p.*S675C* (g.81655C>G) en dos pacientes *V617FJAK2* positivos, uno con PV (i: 15229; c: 20051) y el otro con TE (i: 10227; c: 12462).

Los ensayos sobre el modelo celular 32D se realizaron en las mismas condiciones anteriores. La **figura 31** muestra los resultados obtenidos (agrupando los datos de cuatro nucleofecciones distintas), en los que se puede observar como ambos cambios inducen un aumento en la proliferación celular semejante a las mutaciones del dominio *RING finger*, ya en el tercer día de medida. En función de la diferencia de absorbancia máxima obtenida en las células transfectadas con estos mutantes, con respecto a las células transfectadas con el vector *CBL WT*, calculamos el número de células al que corresponde esa diferencia de absorbancia (ecuación $y=9E-06x+0,2303$). Como puede observarse en la **figura 32**, la absorbancia máxima media del mutante *S675C* (valor 1,10), es 1,87 veces superior al valor de absorbancia máxima media en el *WT* (0,59), lo que supone 2,43 veces más en el número de células observadas a las 48h del comienzo de MTS. En el caso del mutante *A678V*, el valor de absorbancia máxima (1,28) es 2,2 veces mayor al del *WT* (0,59), lo que supone casi tres veces (2,92) el número de células.

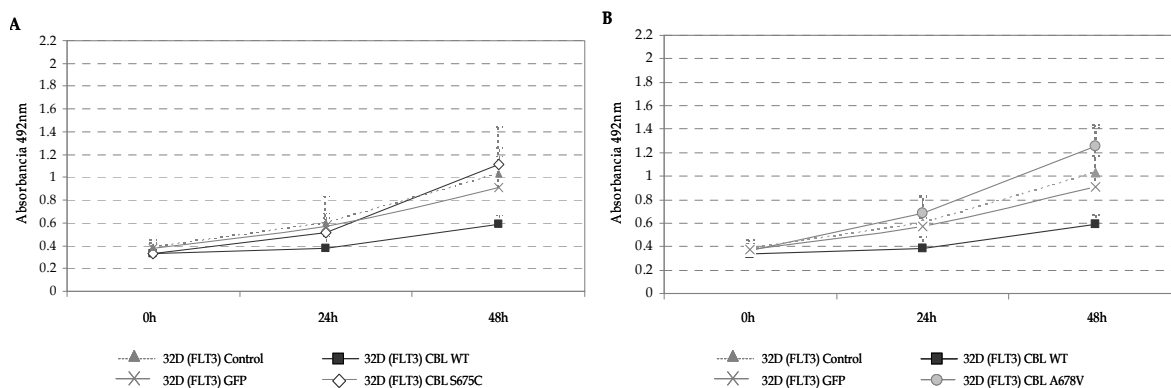


Figura 31. Representación gráfica de los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación con MTS correspondientes a cuatro nucleofecciones distintas en cada caso con los vectores *CBL A678V* y *CBL S675C* sobre células 32D(FLT3). A) Resultados de los ensayos con *CBL S675C* en la que el aumento de proliferación con respecto a las células *CBL WT* es significativamente superior (prueba *t de Student* de 1 cola, $p < 0,001$), a las 48 h del comienzo del ensayo MTS. B) Resultados de los ensayos con *CBL A678V*, en la que el aumento de proliferación con respecto a las células *CBL WT* es significativamente superior (prueba *t de Student* de 1 cola, $p < 0,001$) a las 48 h del comienzo del ensayo MTS. En ambos casos el efecto es semejante al observado con las mutaciones del dominio *RING finger*.

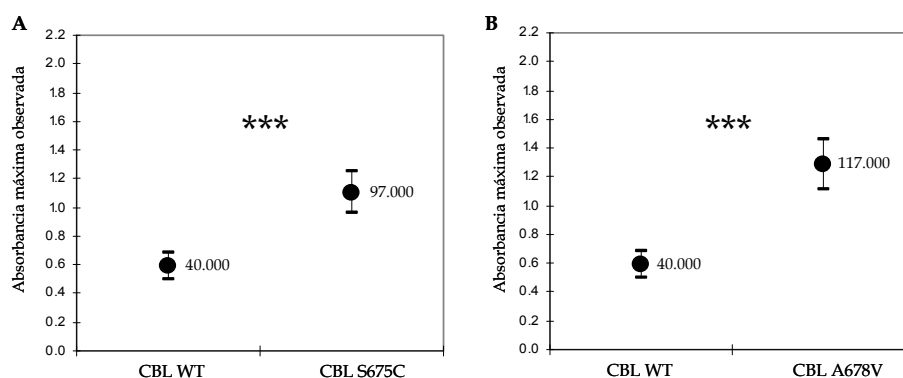


Figura 32. Representación del número de células (según la ecuación correspondiente a la figura 28B, $y = 9E-06x + 0.2303$; $R^2 = 0,9842$) al que corresponde la medida de absorbancia máxima media de 4 nucleofecciones, observada con cada grupo de células. A) Valor de absorbancia máxima observada en las células con p.S675C (1,10) correspondiente a 97.000 células, que difieren significativamente (prueba *t de Student* de 1 cola, $p < 0,001$) de las 40.000 correspondientes al valor máximo de absorbancia de las WT (0,59). B) El valor de absorbancia máxima observada en las células con p.A678V (1,28) correspondiente a 117.000 células, difiere significativamente (prueba *t de Student* de 1 cola, $p < 0,001$) del valor máximo de absorbancia de las WT (0,59), correspondiente a 40.000 células.

De la misma manera que con los mutantes *RING finger*, calculamos para cada una de las mutaciones su tasa de proliferación o crecimiento, comparando la absorbancia máxima observada con el valor inicial mostrado por esas células (figura 33). Los resultados muestran que, en ambos casos, el crecimiento experimentado por las células transfectadas con los vectores mutantes *S675C* y *A678V* fue significativamente superior al de las células transfectadas con el vector *CBL WT* (prueba *t de Student* de 1 cola, $p < 0,001$ y $p = 0,001$, respectivamente). Los cocientes

de las tasas de crecimiento, ensayo por ensayo, fueron superiores a 3 en ambos casos (figura 33C).

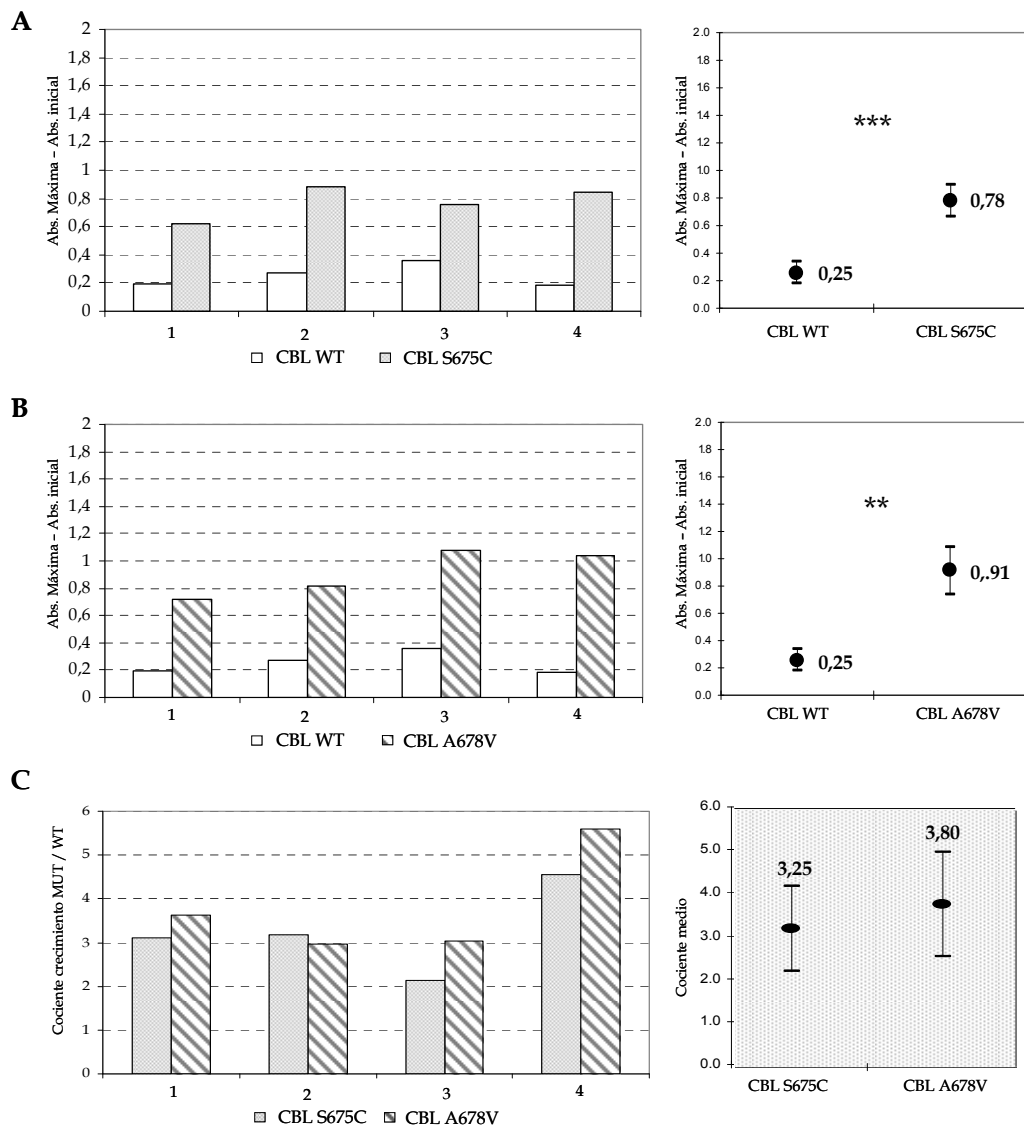


Figura 33. Tasa de proliferación o crecimiento (Abs. máxima - Abs. inicial) inducida por cada una de las mutaciones analizadas. En cada una de las partes se muestran los resultados obtenidos en cuatro ensayos MTS y nucleofecciones independientes y se comparan respecto a los resultados con las células con *CBL WT*. A) Resultados de la mutación p.S675C, en el que se observa un crecimiento significativamente superior (prueba *t de Student* 1 cola, $p < 0.001$) al de las células con *CBL WT*. B) Resultados de la mutación p.A678V en el que también se observa un crecimiento significativamente superior (prueba *t de Student* 1 cola, $p = 0.001$) al de las células con *WT*. C) Cociente entre el crecimiento obtenido en las células nucleofectadas con los vectores mutantes (S678C, A678V) respecto del *WT* en cuatro nucleofecciones distintas, con la media de estos cocientes. El crecimiento celular inducido por la mutación p.R420Q era 2.76 veces mayor (figura 35), mientras que el de p.S675C es 3.25 veces mayor y el de la p.A678V es 3.80 veces mayor.

3.3.3.3 Contaje celular mediante azul tripan

Durante los primeros ensayos de MTS que realizamos y a modo de control de los mismos, determinamos el número de células vivas por mL de medio a las 48 y 72 h de la nucleofección. Para ello, empleamos el azul tripan o *trypan blue* y el posterior contaje celular en la cámara de Neubauer (apartado 3.5 de *Material y Métodos*) que, aunque de una manera menos específica que el MTS, nos permite hacernos una idea de la diferencia en cuanto al número de células de cada grupo celular. La **figura 34** representa los resultados obtenidos en las células 32D(*FLT3*) transfectadas con los vectores *WT*, *R420Q*, *C416W*, *P417R*, *T402H*, *S675C* y *A678V*. Como puede observarse, ya a las 48h de la nucleofección la concentración celular observada con los mutantes es mayor que con el *WT*, aunque a las 72 h esta diferencia es muy superior.

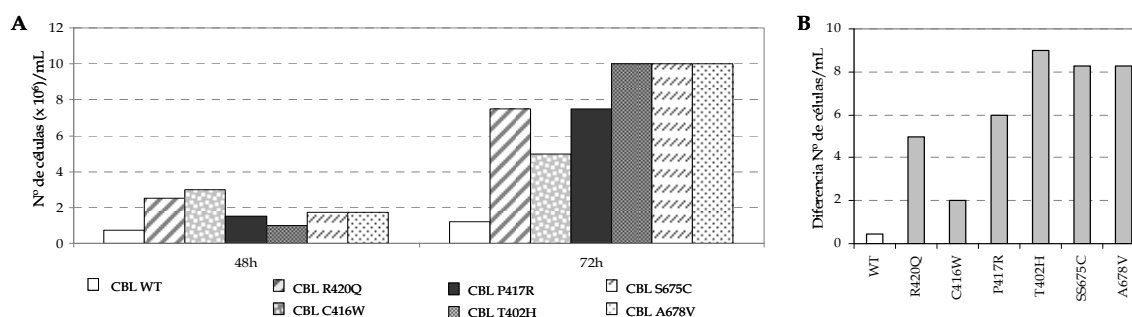


Figura 34. A) Medida del número de células vivas/mL a las 48h y 72h, tras la nucleofección de cada vector. Como puede observarse, a las 48 h de la introducción de los vectores CBL mutantes se observa un mayor número de células vivas por mL, efecto que se hace mayor a las 72 h. B) Diferencia en el número de células vivas por mL de las 48 a las 72 h. El análisis del número de células vivas/mL en este momento demuestra que la cantidad de células vivas en los mutantes es muy superior mayor al de las células con el vector *WT*.

3.3.3.4 Independencia a factores de crecimiento de las mutaciones en *C-CBL*

Hasta ahora, los resultados demuestran el efecto de las alteraciones encontradas en *C-CBL* sobre la proliferación celular, un proceso característico del fenotipo neoplásico. Tras la estimulación con citoquinas (IL3m y FLT3Lh), las células que han sido transfectadas con los vectores *CBL mutantes* presentan una respuesta proliferativa significativamente mayor a la de las transfectadas con el vector *CBL WT*. Sin embargo no queda demostrado si estas mutaciones inducen un crecimiento independiente de factores de crecimiento en células que, como la línea 32D, son dependientes de ellos. Algunos autores han demostrado que mutaciones en el dominio *RING finger* de *C-CBL* (como la p.R420Q utilizada como control en nuestros ensayos) inducen independencia a factores de crecimiento, permitiendo el crecimiento de esta línea celular en ausencia de IL3m (Sargin *et al*, 2007; Reindl *et al*, 2008; Grand *et al*, 2009).

De esta manera, basándonos en los resultados obtenidos por otros autores y empleando el vector mutante de *R420Q* como control, decidimos comprobar si las mutaciones p.C416W, p.P417R, p.T402H, p.S675C y p.A678V encontradas por nosotros inducían el mismo efecto. En primer lugar, comprobamos que nuestras células 32D efectivamente dependían de IL3. Para ello, comprobamos mediante un ensayo de MTS realizado durante cuatro días, la diferencia en la proliferación de células 32D cultivadas en medio completo frente a la proliferación de células 32D en medio sin esta citoquina (**figura 35**).

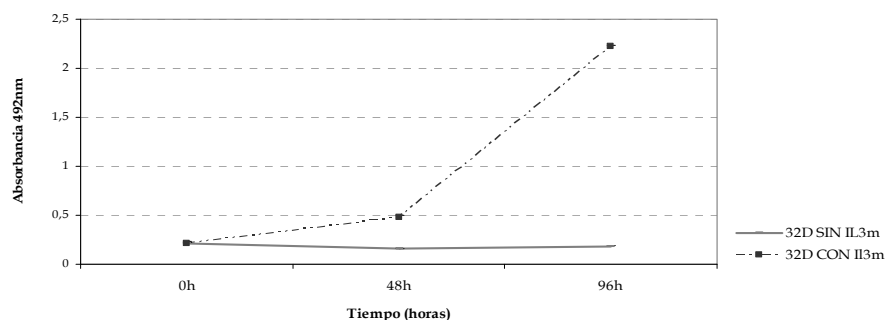


Figura 35. Ensayo de proliferación (MTS) realizado durante cuatro días con células 32D puestas en cultivo con y sin IL3m. Estos ensayos se realizaron por triplicado en cada uno de los intervalos de tiempo. En cada pocillo de la placa se colocaron 2.000 células con el medio de cultivo correspondiente (con y sin IL3m). Las células se mantuvieron durante 96 h en un incubador a 37°C y 5% de CO₂ y las medidas se realizaron a las 48 y 96 h. Como puede observarse, las células con IL3 crecen rápidamente, mientras que sin esta citoquina no presentan crecimiento alguno. Estos resultados demuestran la dependencia de estas células a IL3 murina.

Una vez comprobado que las células 32D que estábamos empleando eran efectivamente dependientes a IL3, realizamos la nucleofección del vector pCMV6-AC-RFP-FLT3. Las células obtenidas se mantuvieron en cultivo durante al menos una semana en medio completo, hasta la introducción de los distintos vectores *C-CBL* (*CBL WT*, *CBL R420Q* y resto de *CBL* mutantes). A las 48 h de esta segunda nucleofección, se comenzaron a realizar los ensayos de MTS (**figura 36**) de la misma manera que en los casos anteriores pero eliminando tanto la IL-3 murina como el ligando de FLT3 humano, de manera que, en caso de observar crecimiento, sería debido a la expresión de los vectores introducidos.

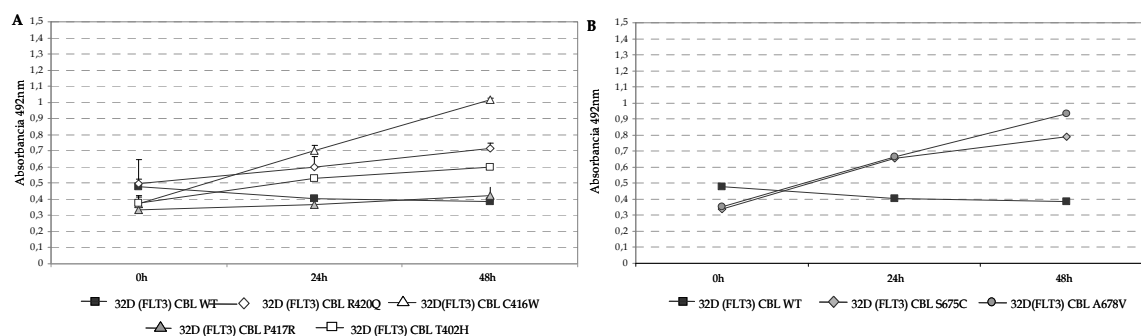


Figura 36. Resultado de los ensayos de MTS realizados tras la nucleofección de cada uno de los vectores de C-CBL (*CBL WT* y mutantes) para demostrar la inducción de independencia a factores de crecimiento. En cada caso se nucleofectaron 2.5×10^6 células 32D(FLT3) con 4 μg de cada vector *CBL* y 3 μg de vector ubiquitina. A las 48 comenzamos a realizar las medidas de MTS eliminando los factores de crecimiento del medio (IL3m y FLT3Lh). A) Resultados obtenidos con las mutaciones del dominio *RING finger* (incluido el control p.R420Q). Las células transfectadas con *CBL WT* no son capaces de crecer en ausencia de factores de crecimiento, mientras que las células transfectadas con *CBL R420Q*, *C416W* y *T402H* sí lo hacen a partir del día 2 (con un menor efecto en el caso de p.T402HfsX29). La mutación p.P417R muestra un comportamiento similar a *CBL WT*. B) Resultados obtenidos con las mutaciones del dominio rico en prolina. En este caso las células transfectadas con *CBL S675C* y *A678V* mostraron crecimiento, no así las transfectadas con *CBL WT*. El crecimiento observado con estas mutaciones es incluso superior a los valores obtenidos con la mutación p.R420Q.

La **figura 37** muestra la tasa de crecimiento inducida por estas mutaciones (Abs. máxima – Abs. inicial en cada grupo).

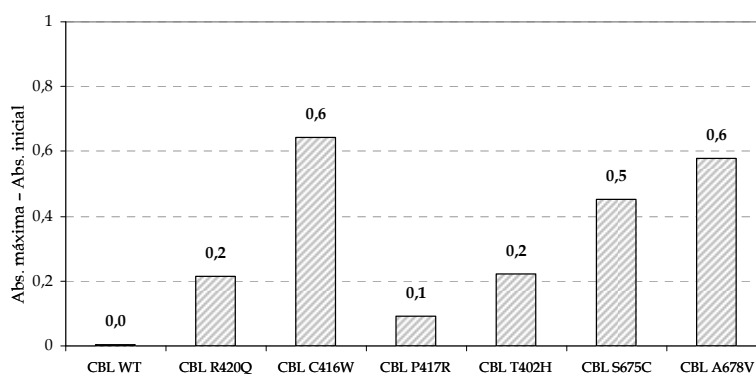


Figura 37. Tasa de proliferación o crecimiento (Abs. máxima – Abs. inicial en cada grupo celular) obtenida en los ensayos de MTS para demostrar la independencia a factores de crecimiento inducida por las distintas mutaciones encontradas en C-CBL. En ausencia de IL3m las células 32D con *CBL WT* no presentan crecimiento, al igual que las células con *CBL P417R*. Sin embargo el resto de las mutaciones sí favorecen un mayor crecimiento en ausencia de IL3m. De hecho, las mutaciones p.C416W, p.S675C y p.A678V muestran valores superiores a los inducidos por la mutación control p.R420Q.

A pesar del resultado, no fue posible reproducir este experimento posteriormente. En algunos casos, el hecho de mantener las células en crecimiento durante un largo tiempo (hasta la nucleofección de los vectores *CBL*), provocaba que las células 32D(FLT3) se volvieran, por sí mismas, independientes a IL3m. En otros casos, la nucleofección de los vectores *CBL* no inducía

respuesta de ningún tipo. Sin embargo, es importante destacar que en todas estas pruebas, los distintos mutantes se comportaron de igual manera al control *CBL R420Q* (mutación cuya capacidad transformante ya ha sido demostrada).

3.3.4 Mutaciones en *CBL-B*

En el análisis de *CBL-B* habíamos encontrado un cambio g.149486C>T en el exón 10 en uno de los pacientes con PV con la mutación V617F/JAK2 (i: 14626; c: 19099). Este cambio no estaba descrito previamente y provocaba la sustitución de Arg por Trp en la posición 462 (p.R462W) del dominio *RING finger* de *CBL-B*. Puesto que, debido a su localización, podía dar lugar a una pérdida de función de la actividad E3-ligasa de *CBL-B*, decidimos incluir esta mutación en los análisis funcionales. Para ello, empleamos la línea celular 32D, de manera semejante a los realizados con las mutaciones en *C-CBL*, aunque en este caso se carecía de control positivo. El vector mutante de *CBL-B R462W* se obtuvo mediante mutagénesis dirigida a partir de un vector con la ORF de *CBL-B wild type* (pCMV6-AC-*CBL-B*-GFP) y los ensayos se realizaron de manera semejante a los anteriormente mencionados: con introducción previa de pCMV6-AC-FLT3-RFP y posteriormente, con nucleofección control sin vector, con pmaxGFP, y los vectores *CBL-B WT* y *CBL-B R462W*, en estos dos últimos casos de manera simultánea a la introducción del vector de ubiquitina. El medio de cultivo de las células fue suplementado con IL3 murina y FLT3L. El ensayo de MTS comenzó 48 h tras la nucleofección, y se llevó a cabo durante tres días. Los resultados del primero de los ensayos se muestran en la **figura 38**.

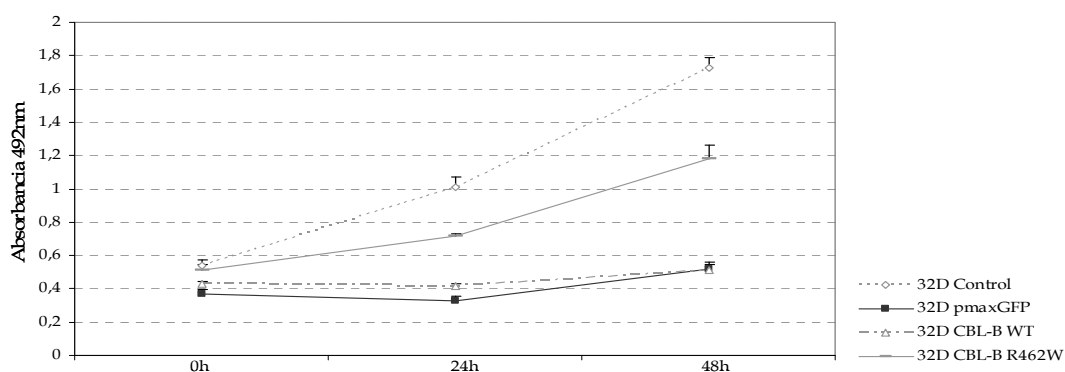


Figura 38. Resultados obtenidos en uno de los ensayos de proliferación mediante MTS realizado tras la nucleofección de *CBL-B R462W* con respecto a *CBL-B WT*. En todos los casos se partió de 2×10^6 células, previamente nucleofectadas con pCMV6-AC-FLT3-RFP, 2,5 μ g de vector (pmaxGFP, *CBLB WT* ó *CBLB R462W*) y 2 μ g de vector ubiquitina. Posteriormente las células se mantuvieron 48 h a 37°C con 5% CO₂ hasta el comienzo de las medidas de absorbancia, realizada durante tres días sucesivos.

Sin embargo, a diferencia de las mutaciones de *C-CBL*, no pudimos reproducir este resultado varias veces. Sólo en dos de los cinco ensayos replicados obtuvimos una mayor proliferación de las células con *CBLB R462W* con respecto a *CBLB WT* (**figura 39**). Agrupando los datos de los cinco ensayos, la tasa de crecimiento experimentada por las células con *CBLB R462W* no fue significativamente superior (prueba *t de Student* de 1 cola, $p=0,192$) a la de las células con *CBLB WT*. Dados estos resultados, no se llevaron a cabo los ensayos de independencia a IL3m.

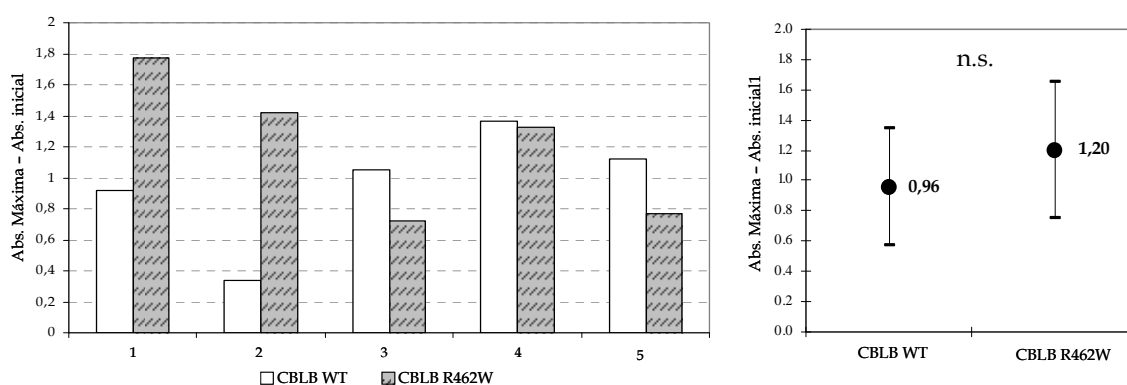


Figura 39. Tasa de crecimiento (Abs. máxima - Abs. inicial) obtenida en los cinco ensayos independientes de nucleofección con los vectores *CBLB WT* (blanco) y *CBLB R462W* (gris). A pesar de que en los dos primeros ensayos la tasa de proliferación obtenida con las células *CBLB R462W* fue superior a la de las células *CBLB WT* estos resultados no volvieron a obtenerse. Teniendo en cuenta los datos de los cinco ensayos se observa como las células *CBLB R462W* muestran una tasa de crecimiento superior a las células *CBLB WT* pero no hay diferencias estadísticamente significativas entre ambas (prueba *t de Student* de 1 cola, $p=0,192$).

3.3.5 Mutaciones en *CBL-C*

De la misma manera, analizamos el efecto en la proliferación sobre el mismo modelo celular de tres de los cambios detectados en *CBL-C*. Uno de ellos, recientemente descrito ya por Muramatsu y colaboradores (Muramatsu et al, 2010), fue el polimorfismo g.15702_15702insC (rs66944596) detectado en un paciente con PV V617F/*JAK2* negativa. Este cambio, además de una sustitución, induce un cambio en el marco de lectura generando una proteína 81 residuos distinta de *CBL-C* humano (p.Q419PfsX81). El segundo cambio, no descrito previamente, fue g.16354 C>T que provocaba la sustitución p.Pro435Ser (p.P435S). Este cambio fue detectado también en dos de los controles sanos pero decidimos analizar su posible efecto, ya que podría tener algún efecto también a nivel proliferativo. En el último mes, este cambio ha sido descrito como polimorfismo (rs116023028), con una frecuencia alélica similar a la observada por nosotros. El último de los cambios fue el SNP rs35457630 (g.15642G>A), infrecuente y que también la sustitución p.E392K. Este cambio podría ayudarnos a validar el modelo como control negativo infrecuente.

De la misma manera que en los casos anteriores, se introdujeron los vectores *CBL-C WT*, *CBL-C Q419P*, *CBL-C P435S* y *CBL-C E392K* de manera simultánea al vector de la ubiquitina, sobre células 32D a las que previamente se les introdujo *FLT3* crecidas en medio completo con IL3m, FLT3L y G418. En todos los casos se utilizaron simultáneamente controles de células sometidas a nucleofección sin vector y células transfectadas con pmaxGFP. Los ensayos de MTS para las medidas de la proliferación celular, se realizaron 48 h después de la nucleofección durante 4 - 5 días (**figura 40**). Como puede observarse, en ningún caso estas mutaciones inducen una diferencia en la proliferación con respecto a *CBL-C WT*.

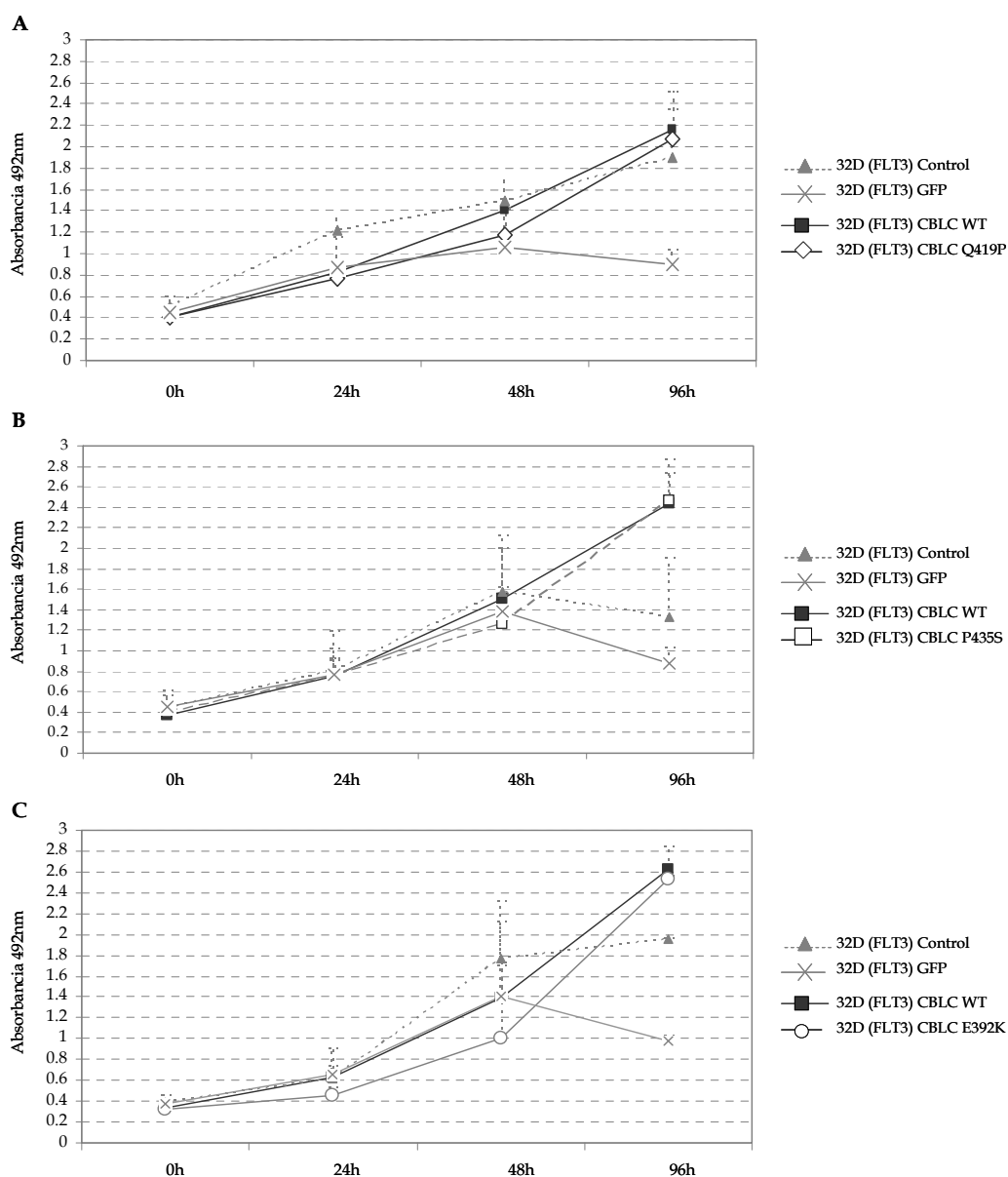


Figura 40. Resultados obtenidos en los ensayos de proliferación con MTS correspondientes a cuatro nucleofecciones distintas para comprobar el efecto de las mutaciones de *CBL-C* en la proliferación de las células 32D. A) Resultado obtenido de los ensayos con *CBL-C Q419P* y *CBL-C WT*. B) Resultado obtenido de los ensayos con *CBL-C P435S* y *CBL-C WT*. C) Resultado obtenido de los ensayos con *CBL-C E392K* y *CBL-C WT*. En ninguno de los tres casos se observa una diferencia en la proliferación de las células transfectadas con el vector con la mutación y con el vector *CBL-C WT*.

De la misma manera que en el caso de las mutaciones de *C-CBL* y *CBL-B*, calculamos en todos los casos la tasa de proliferación o crecimiento observada en cada ensayo, comparando las células a las que se les había introducido el vector mutante de manera inicial y al cabo de los días con las células a las que se les introdujo *CBL-C WT* (**Figura 41**). En ninguno de los casos se observa un aumento en la tasa de crecimiento con respecto a *CBL-C WT*. Dado estos resultados no se realizaron los ensayos de inducción a la independencia de factores de crecimiento.

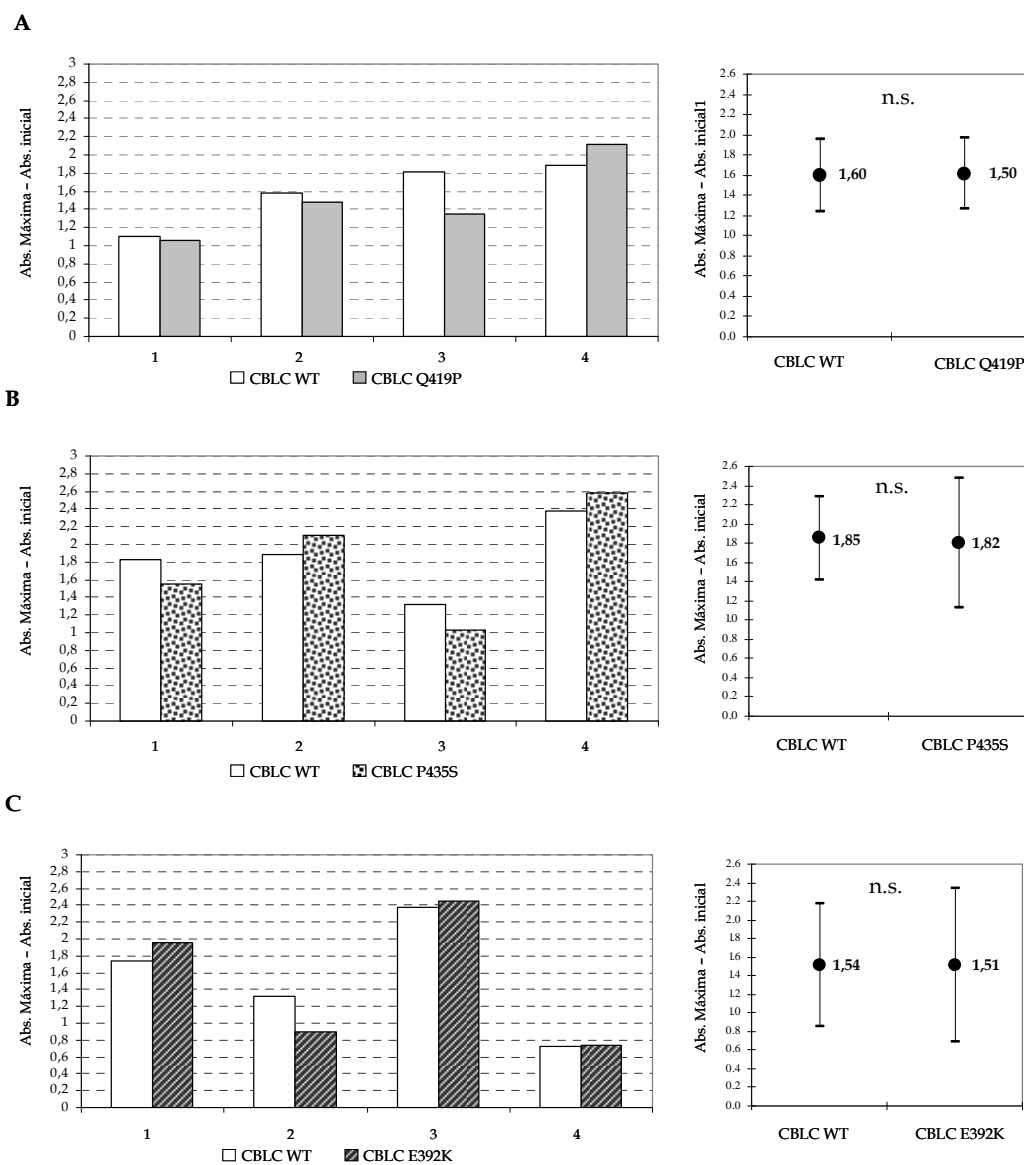


Figura 41. A) Tasa de crecimiento (Abs. máxima - Abs. inicial) observada en las células transfectadas con *CBLC Q419P* y *CBLC WT* en cuatro ensayos distintos. El crecimiento medio de ambos grupos de células no presenta diferencias significativas (prueba *t de Student* de 1 cola, $p=0,377$). B) Tasa de crecimiento (Abs. máxima - Abs. inicial) observada en las células transfectadas con *CBLC P435S* y *CBLC WT* en cuatro ensayos distintos. El crecimiento medio de ambos grupos de células no presenta diferencias significativas (prueba *t de Student* de 1 cola, $p=0,465$). C) Tasa de crecimiento (Abs. máxima - Abs. inicial) observada en las células transfectadas con *CBLC E392K* y *CBLC WT* en cuatro ensayos distintos. El crecimiento medio de ambos grupos de células no presenta diferencias significativas (prueba *t de Student* de 1 cola, $p=0,479$).

Discusión

VI. DISCUSIÓN

El cáncer es el resultado de la pérdida de la regulación fisiológica de la proliferación celular, como consecuencia de la adquisición de alteraciones en su material genético. Estas alteraciones pueden provocar una ganancia o una pérdida de la función de la/s proteína/s codificadas. En ambos casos, el cambio puede conducir a que la célula adquiriera una ventaja proliferativa y pierda su capacidad de diferenciación, pudiendo también evadirse de la muerte celular programada o apoptosis. Estas alteraciones genéticas pueden encontrarse en la línea germinal, provocando una predisposición heredable al desarrollo del fenotipo neoplásico, o ser somáticas, dando lugar a la formación de tumores esporádicos (Vogelstein & Kinzler, 2004; Bernheim, 2010). A su vez, estas alteraciones también pueden ser primarias o generadoras del tumor (“*drivers*”) o secundarias (“*passenger*”), que son las que surgen posteriormente de manera acumulativa y que pueden conducir a la evolución de la enfermedad (Mitelman *et al*, 2007; Waltz, 2008).

Las leucemias o neoplasias hematológicas son el cáncer de las células de la sangre. Dentro de este grupo de enfermedades tan heterogéneas, nuestro Proyecto se centró en el análisis de un grupo de neoplasias mieloides de carácter crónico cuya alteración genética primaria se desconoce. Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPCs), son un conjunto de enfermedades clonales de las células madre hematopoyéticas, que conducen a la expansión de uno o más linajes mieloides. Dentro de estas enfermedades se distingue la LMC, las NMPCs clásicas (PV, TE y MFI) y las NMPCs atípicas (SHE, LEC, LNC, MS). Todas ellas muestran una fase crónica más o menos estable, tras la que suelen desembocar en una fase final acelerada de agudización y transformación en leucemia mieloide aguda (LMA secundaria). Estas patologías se encuentran también relacionadas con los síndromes mielodisplásicos (SMD). Entre las enfermedades mieloproliferativas y mielodisplásicas, existe también un grupo de neoplasias que comparten características de ambos grupos, las neoplasias mieloproliferativas / mielodisplásicas (LMMC, LMMJ, LMCa, y SMD/NMP inclasificables).

A pesar de los esfuerzos por determinar la causa molecular de estas enfermedades, no se conoce completamente. Como se ha explicado anteriormente, la LMC surge por la formación del gen de fusión *BCR-ABL1*, resultado de la translocación recíproca t(9;22)(q34;q11) o cromosoma *Philadelphia*. El descubrimiento de esta alteración fue uno de los avances más importantes en el conocimiento de la génesis de un proceso neoplásico del siglo XX y permitió mejorar el diagnóstico y el desarrollo de terapias más específicas frente a esta enfermedad. En el resto de las NMPCs, tanto clásicas como atípicas, se han descrito diversas alteraciones cromosómicas como ganancias en 9p, deleciones en 20q y 13q, duplicaciones en 1q, trisomías 8 y 9, y reordenamientos en 5q33 y 8p11, en algunos casos. A pesar de que no se ha detectado

una alteración característica y específica como el cromosoma *Philadelphia*, estas alteraciones han permitido caracterizar mejor algunas de estas patologías. De hecho, en algunos casos, se ha demostrado la existencia de genes de fusión semejantes a *BCR-ABL1* que implican otros genes codificantes de proteínas con actividad tirosínquinasa.

Las tirosínquinasas (TKs) son proteínas receptoras (RTKs) o citosólicas (CTKs) con un papel fundamental en las vías de señalización celular, donde intervienen en procesos importantes como la proliferación, diferenciación, crecimiento, migración y apoptosis. Todos ellos deben estar perfectamente regulados para el desarrollo celular, por lo que determinadas alteraciones de estas moléculas puedan conferir una ventaja proliferativa a las células que las posean. Existen varios mecanismos por los cuales se forman proteínas TK de carácter oncogénico, como la formación de genes de fusión (ej. *BCR-ABL1*), su sobreexpresión (ej. *EGFR* sobreexpresado en diversos tipos de cáncer), o por mutaciones a nivel de secuencia que hagan que las proteínas formadas tengan una mayor actividad o pierdan la capacidad de ser reguladas (ej. *JAK2*, *KIT*). Pero además, el aumento de la actividad de las proteínas TK puede ser debida a la pérdida de función de otras proteínas que las regulen. Por ejemplo, se ha comprobado que alteraciones de este tipo en *C-CBL*, que codifica una proteína de actividad E3-ubiquitin ligasa, pueden encontrarse relacionadas con el proceso neoplásico de la línea mieloide por pérdida de su capacidad en la degradación de algunas TKs.

1. Muestras del estudio

La serie principal de muestras seleccionadas para llevar a cabo este Proyecto procedían de un grupo de 44 pacientes (28 varones y 16 mujeres) con NMPCs de diverso tipo (4 PV, 15 TE, 4 MFI y 21 NMPCs atípicas). Esta selección se realizó en base a la ausencia de las dos alteraciones genéticas más importantes descritas en ese momento para estas enfermedades, la fusión *BCR-ABL1* y la mutación V617F de *JAK2* (Jones *et al*, 2005) (**Anexo 2**). El análisis citogenético del que se disponía tampoco mostraba las alteraciones cromosómicas más frecuentes en este tipo de neoplasias, como ganancias en 9p, delección de 13q, duplicaciones en 1q, trisomía 8 o trisomía 9. Además, tampoco parecían existir translocaciones visibles a cariotipo en las regiones 8p11 (*FGFR1*) ni 5q33 (*PDGFRB*), que corresponden a las regiones más frecuentemente implicadas en la generación de genes de fusión en las neoplasias mieloproliferativas no-LMC. Sólo el individuo 16572 (c: 22149), mostraba una trisomía 11 (47,XY,+11) en el 53% (25/47) de las metafases analizadas.

Durante la realización del presente Proyecto, otros estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio analizaron sobre estas mismas muestras otros genes que se han demostrado alterados en este tipo de neoplasias. Entre ellos, cabe destacar el análisis mediante FISH de los

genes de las familias Pdgfr y Jak y el análisis mutacional de la secuencia codificante completa de los genes de las familias Pdgfr, Jak y el gen *MPL*, el exón 15 de *BRAF*, los exones 2 y 5 de *NRAS*, los exones 2 y 3 de *KRAS*, la mutación D816 de *KIT* y la identificación de dos de las alteraciones más frecuentes en *FLT3* (la duplicación en tándem *FLT3-ITD* y la mutación *FLT3-D835*). Esto llevó a la identificación de la mutación W515K en *MPL* en uno de los pacientes con TE (i: 18059; c: 24700) y la mutación D835 de *FLT3* en un paciente con NMPC atípica /o posible LMMC (i: 18148; c: 24769). También se detectó mediante FISH la fusión *FIP1L1-PDGFR*A en un paciente con NMPC atípica/SHE (i: 15081; c: 19799) y una mutación en el exón 8 de *JAK2* (p.R340Q, que afecta al dominio FERM) en otro paciente con NMPC atípica (i: 16572; c: 23455) (Aranaz & Ormazábal, 2010). Todos estos datos se recogen en el **Anexo 2**.

Por último, la identificación de cambios de secuencia con efecto en la traducción en *C-CBL* nos llevó a analizar los exones principales de los genes de la familia Cbl en una serie mayor de pacientes. Esta serie estaba formada por 101 muestras V617F/*JAK2* negativas y 232 V617F/*JAK2* positivas. El grupo de las 101 muestras negativas, de las cuales 46 eran mujeres y 55 hombres, estaba formado por 5 MFI, 16 PV y 80 TE (**Anexo 9A**). El grupo de las 232 positivas, de las cuales 94 eran mujeres y 138 hombres, estaba formado por 14 MFI, 69 PV y 149 TE (**Anexo 9B**).

2. Estudio de los genes TK

2.1 Análisis mediante FISH de genes TK

Los reordenamientos cromosómicos constituyen un mecanismo oncogénico frecuente en determinados tipos de cáncer, especialmente en leucemias, donde en muchos casos dan lugar a la formación de genes de fusión (Mitelman *et al*, 2007; Bernheim, 2010). Hasta la fecha se ha descrito un gran número de fusiones que afectan a genes TK en diversos tipos de tumores, aunque de manera especial en las neoplasias mieloides. Estas fusiones dan lugar a proteínas quiméricas capaces de activar de manera constitutiva e independiente de estímulo externo las vías de señalización en las que participan. Esto provoca que estas células sean hipersensibles o incluso independientes de factores de crecimiento y citoquinas, promoviendo la proliferación celular, la invasión y la metástasis. Además, estas TKs oncogénicas favorecen la resistencia celular a la quimio y radioterapia (Skorski *et al*, 2002).

La existencia de la fusión *BCR-ABL1*, junto a la descripción entre los años 1995 a 2007 de otras fusiones que afectaban a otros genes codificantes de TKs en algunos pacientes con estas enfermedades (Cross & Reiter, 2002; Bench & Pahl, 2005; De Keersmaecker & Cools, 2006; MacDonald & Cross, 2007), hacía suponer que éste podía ser un mecanismo oncogénico más

frecuente. Esta hipótesis nos llevó en un primer lugar a analizar la existencia de posibles reordenamientos genéticos que condujeran a la formación de genes de fusión con TKs relacionadas con las anteriores. El análisis cromosómico convencional no había revelado alteraciones (translocaciones, deleciones o inserciones), pero podían existir otros reordenamientos crípticos (no visibles por esta técnica, como la fusión *FIP1L1-PDGFR*A formada por una deleción intersticial de 4q12). Muchas alteraciones son demasiado pequeñas para ser determinadas mediante citogenética convencional, por lo que es necesario aplicar otras técnicas más sensibles.

Por ello, analizamos mediante FISH la posible existencia de dichas alteraciones. Esta técnica presenta varias ventajas frente al análisis citogenético convencional. A pesar de que no permite analizar el estado general del genoma, permite detectar alteraciones presentes en un menor porcentaje de células (permite el análisis de núcleos en interfase) y de regiones genómicas más concretas (Bayani *et al*, 2007; Bernheim, 2010).

El análisis FISH se centró en los genes de las familias Abl, Syk y Fgfr. En todas ellas, al menos uno de sus miembros (*ABL1*, *ABL2*, *SYK* y *FGFR1*) se había mostrado implicado en una fusión encontrada en una neoplasia hematológica. Además, también incluimos *ETV6* (*TEL*, 12p13), gen que codifica un factor de transcripción, ya que se encuentra implicado como *partner* en numerosas fusiones con genes TK en este tipo de neoplasias (*ETV6-ABL1*, *ETV6-ABL2*, *ETV6-PDGFRB*, *ETV6-PDGFR*A, *ETV6-SYK*, *ETV6-JAK2*, *ETV6-LYN* y *ETV6-FLT3*), por lo que podría indicarnos la existencia de una alteración de este tipo de manera indirecta. Simultáneamente, el estudio con la sonda comercial empleada para *ABL1* nos permitió confirmar la ausencia de la fusión *BCR-ABL1*. Estos análisis sólo se pudieron realizar sobre material de 34 de los 44 pacientes inicialmente previstos, debido a la calidad y escasa cantidad final de material archivado.

El diseño inicial de los ensayos FISH consistía en la realización de dos tipos de análisis: un ensayo A de doble fusión y un ensayo B con una única sonda que cubre el gen. Aunque todos los ensayos fueron validados experimentalmente, debido a las limitaciones de cantidad de material para éste y otros Proyectos, se optó por realizar el ensayo B únicamente en los casos en los que se obtuvieron resultados dudosos con el A. El ensayo B más empleado fue el de *ABL1* (con la sonda derivada del clon RP11-83J21), debido a la mayor complejidad en la interpretación del resultado obtenido con la sonda comercial y a los valores de falsos negativos de este análisis. En ninguno de los casos analizados se encontraron alteraciones, a pesar de la hipótesis inicial de trabajo.

Estudios similares publicados en los últimos años han obtenido resultados semejantes (La Starza *et al*, 2005; Cross & Reiter 2008; Haferlach *et al*, 2008; Bacher *et al*, 2009), llevando a la

conclusión de que, aunque hay muchos genes de fusión distintos publicados en este tipo de pacientes, su recurrencia y frecuencia global es muy baja. Esto es lo que ocurre, por ejemplo, con los reordenamientos en *PDGFRB* y *FGFR1*, en los que, a pesar del elevado número de fusiones descritas, no se encuentran en un porcentaje relevante de los casos de neoplasias mieloides (Jackson *et al*, 2010). Sólo la fusión *FIP1L1-PDGFR*A (críptica a nivel citogenético y que requiere análisis mediante técnicas moleculares o de FISH) se ha encontrado con una cierta recurrencia (entre 12-47% de los pacientes con SHE/LEC) (Cools *et al*, 2003; De Keersmaecker & Cools, 2006; Delhommeau *et al*, 2006; Pardanani *et al*, 2006). Por ello, no parece que la formación de genes de fusión con genes codificantes de TKs sea el mecanismo oncogénico que explique el desarrollo neoplásico de la mayor parte de estos pacientes.

2.2 Búsqueda de mutaciones mediante dHPLC en genes TK

La aplicación de técnicas masivas de barrido a nivel molecular permite la caracterización de alteraciones genéticas a nivel de secuencia. Ya que estos genes no parecían estar fusionados en las distintas neoplasias mieloides, quizá estuvieran mutados a nivel de secuencia. De hecho, esta fue la hipótesis que condujo en 2005 a varios de los grupos que describieron la mutación V617F en *JAK2* a encontrar este cambio (Baxter *et al*, 2005; Levine *et al*, 2005; Zhao *et al*, 2005). Hasta la fecha, esta mutación es la alteración genética más frecuente en este tipo de enfermedades, aunque también se han descrito otras alteraciones de este tipo en genes TK, como mutaciones en el exón 12 del mismo *JAK2* en pacientes con PV o mutaciones en *FLT3* y *KIT*. Sin embargo, existían otros genes TK que no estaban siendo analizados de manera sistemática por técnicas sensibles apropiadas para el análisis de muestras tumorales, en las que el número de moléculas mutadas puede ser inferior al 50% y, en algunos casos, inferiores al nivel de sensibilidad de la secuenciación. Por ello, parte de este Proyecto se dedicó a la búsqueda de posibles mutaciones activantes de secuencia en los genes TK que habían sido analizados mediante FISH (*SYK*, *ZAP70*, *ABL1*, *ABL2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* y *FGFR4*). En este análisis incluimos también *EGFR*, que codifica para un receptor con actividad TK no implicado hasta la fecha en el desarrollo de neoplasias hematológicas, pero sí en otras neoplasias (entre otros, pulmón, mama, ovario, páncreas, riñón, hígado y próstata). *EGFR* participa en numerosas vías de señalización y se expresa en una variedad muy amplia de tejidos.

Para el análisis mutacional dispusimos de material (DNA genómico preamplificado) de los 44 pacientes inicialmente seleccionados. Nuestro estudio se centró en los exones codificantes de los dominios funcionalmente más importantes, que corresponden al dominio TK de todas las proteínas, y a los dominios SH2, SH3 para las CTKs y el dominio transmembrana para las

RTKs. Una alteración en el dominio TK de estas proteínas podría dar lugar a la activación constitutiva de su actividad quinasa por cambios conformacionales en la misma. Cambios en los dominios SH2 y SH3 de las CTKs (SYK, ZAP70, ABL1 y ABL2), podrían alterar las interacciones de estas proteínas con otras implicadas en la señalización, lo que también podría conducir a una pérdida de la regulación de su actividad. En el caso de las RTKs (FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 y EGFR), los cambios en su dominio transmembrana podrían provocar cambios conformacionales que indujeran su oligomerización y activación constitutiva. Ya que los fragmentos amplificados para cada uno de los exones contenían segmentos de los intrones adyacentes, este análisis también nos permitió analizar estas zonas. Aunque la hipótesis original se basaba en la caracterización de alteraciones con efecto a nivel traduccional, también realizamos una predicción *in silico* del posible efecto de estos cambios en el corte y empalme de exones o *splicing*.

Para el análisis de mutaciones empleamos la técnica dHPLC. Ésta es una técnica analítica de una gran sensibilidad, lo que la hace especialmente indicada para la búsqueda de mutaciones somáticas en neoplasias. A pesar de que se estima que es capaz de detectar mutaciones presentes en el 10% de las moléculas de la muestra, análisis realizados por nuestro grupo demuestran que la sensibilidad de esta técnica puede llegar al 3-5% (Ormazábal C, tesis doctoral).

2.2.1 Cambios de secuencia detectados en los genes TK

En contra de lo inicialmente esperado, las alteraciones a nivel de secuencia que detectamos fueron muy escasas y de relevancia dudosa. La mayor parte de los cambios que observamos correspondieron a polimorfismos de tipo SNP ya descritos. También detectamos algunas variantes de secuencia no descritas (ver **Tabla 1**), pero la mayor parte localizadas en intrones, en las regiones adyacentes a los exones analizados (ver **Figura 1**). De hecho, en todo este análisis (9 genes TK estudiados en un total de 84 fragmentos), sólo encontramos dos variantes de secuencia no descritas situadas en regiones codificantes del gen y ambas fueron silenciosas, por lo que su poder patogénico es potencialmente nulo (a no ser que afectara a la estabilidad o integridad del RNAm). Ambas variantes se encontraron en *FGFR4*, un gen que hasta la fecha no se ha encontrado implicado en las neoplasias mieloides. La primera (g.6574C>T, p.G435G), se detectó en un individuo con TE (i: 18708; c: 25667) en el exón 10 (codificante del dominio transmembrana). La segunda (g.6874C>T, p.A501A) se detectó en un otro paciente con TE (i: 14886; c: 19492) en el exón 11 (codificante del dominio TK). El resto de las variantes no descritas se encontraron en intrones y por tanto, sin efecto en la secuencia de aminoácidos de

la proteína codificada (ver **Tabla 1**). Dos de ellos (g.166228C>T en *ABL1* y g.172917A>G en *EGFR*), se encontraron en muestras procedentes de individuos control sin enfermedad.

Tabla 1. Cambios no descritos como polimorfismos detectados en el análisis mediante dHPLC de los genes TKs (*ABL1*, *ABL2*, *SYK*, *ZAP70*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FGFR4* y *EGFR*).

Gen	Cambio	Posición	Efecto en splicing (HSF)	Individuo
<i>ABL1</i>	g.149123C>T	Intrón 5	Sin efecto	1 TE (1/15, 6.7%)
	g.166228C>T	Intrón 10	Sin efecto	1 control (1/20, 5%)
<i>ZAP70</i>	g.10439_10440delC	Intrón 2	Sin efecto	1 TE (1/15, 6.7%)
<i>FGFR3</i>	g.12225_12226insGCC	Intrón 11	Sin efecto	1 TE (1/15, 6.7%)
<i>FGFR4</i>	g.6574C>T (p.G435G)	Exón 10	Sin efecto	1 TE (1/15, 6.7%)
	g.6874C>T (p.A501A)	Exón 11	Se rompe un sitio de ramificación	1 TE (1/15, 6.7%)
<i>EGFR</i>	g.162480G>A	Intrón 20	Sin efecto	1 NMPCa (1/21, 4.8%)
	g.172917A>G	Intrón 21	Se rompe un nuevo sitio de ramificación	1 control (1/20, 5%)

Cabe destacar que, de las seis variantes totales encontradas en pacientes con enfermedad, cinco fueron detectadas en distintos pacientes con TE (5/15, 33%) (*ABL1*, *ZAP70*, *FGFR3* y *FGFR4*) y una en un caso de NMPCa (1/21, 5%) (*EGFR*). También puede observarse cómo las sustituciones de un único nucleótido (detectamos seis en *ABL1*, *FGFR4* y *EGFR*) son más frecuentes que las inserciones (una en *FGFR3*) o las deleciones (una en *ZAP70*). Esto se cumple también en los SNPs detectados, donde de los 42 SNPs observados en las regiones analizadas de estos genes TKs, 40 (40/42, 95.2%) correspondieron a sustituciones de un nucleótido por otro, y 2 (2/42, 4.8%) a deleciones de una base. Por otro lado, de las seis sustituciones no descritas como SNPs, cuatro de ellas correspondieron al cambio citosina por timina (C>T). A pesar de estas observaciones, estas variantes son probablemente variantes polimórficas raras o únicas (*singletons*), sin efecto en la enfermedad.

El análisis realizado *in silico* de los posibles efectos de estas variantes en el *splicing*, ya fuera por afectar a sitios reguladores o a secuencias aceptoras o donadoras, se analizó mediante la herramienta *HSF*. De los seis cambios encontrados situados en intrones, sólo g.172917A>G (intrón 21 de *EGFR*), parecía presentar un efecto en el corte y empalme de exones, por promover la rotura de un sitio de ramificación. Sin embargo, este cambio se detectó en uno de los individuos control sin enfermedad. Esta herramienta también predecía la pérdida de un lugar de ramificación de *splicing* para la variante g.6874C>T (p.A501A) en *FGFR4*, aunque este cambio se encuentra en un exón. Estos resultados deberían, en todo caso, validarse con ensayos de amplificación diferencial a partir del RNAm de estos individuos.

De los resultados obtenidos en nuestro análisis mediante dHPLC, podemos concluir que no existen mutaciones frecuentes en las regiones analizadas de los genes codificantes de TKs incluidos en este estudio (*SYK*, *ZAP70*, *ABL1*, *ABL2*, *FGFR1-4* y *EGFR*) que permitan explicar el desarrollo de las neoplasias mieloproliferativas crónicas *BCR-ABL1* negativas y *V617F/JAK2* negativas. Por ello, a pesar de la hipótesis inicial de este y otros grupos, las mutaciones puntuales de estos genes TKs no parecen constituir un mecanismo frecuente en el desarrollo de este tipo de neoplasias.

A lo largo de estos últimos años y desde el descubrimiento de la *V617F* de *JAK2*, varios investigadores han realizado análisis a gran escala genes TK, basándose en esta misma hipótesis (Levine *et al*, 2005; Arena *et al*, 2005; Greenman *et al*, 2007; Ruhe *et al*, 2007; Brown *et al*, 2008; Loriaux *et al*, 2008; Tomasson *et al*, 2008; Tyner *et al*, 2008; Cross *et al*, 2008; Kreil *et al*, 2009). Tomasson y colaboradores analizaron mediante secuenciación el dominio TK de 26 tirosín quinasas distintas seleccionadas en función de su expresión diferencial en mastocitos de LMA, determinadas mediante estudios de *arrays* de expresión. Encontraron cuatro variantes no descritas como SNP, dos en *JAK1*, una en *NTRK1* y otra en *DDR1*, todas en pacientes distintos (Tomasson *et al*, 2008) y sin efecto transformante en la línea celular murina BaF3 (Xiang *et al*, 2008). También identificaron un SNP en *TYK2* con una distribución genotípica significativamente diferente en los pacientes con LMA frente a la población normal (Tomasson *et al*, 2008). En el estudio realizado por Loriaux y colaboradores, en el que analizaron 85 genes TKs en 188 muestras de LMA, identificaron nuevas variantes no descritas, aunque sólo una variante ya descrita en *FLT3* parecía ser oncogénica (p.D835Y) (Loriaux *et al*, 2008). El grupo de Tyner y colaboradores no encontró ningún cambio de secuencia en los 90 genes codificantes de TKs que analizaron en 26 muestras de LMMC y 5 de LMCa (Tyner *et al*, 2008). Finalmente, en un estudio mayor de muestras (390 NMP y 145 LLC) realizado por Kreil y colaboradores, el análisis de 13 genes TKs permitió detectar un único cambio no sinónimo en *TYK2* (p.A659P) en un caso de LLC y de capacidad transformante desconocida (Kreil *et al*, 2009).

Por tanto, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por otros grupos. Según todos estos datos, a excepción de variantes como la *V617F/JAK2* y mutaciones del exón 12 de *JAK2* en NMPs, la mutación p.D835Y de *FLT3* en LMA y la p.D816V de *KIT* en la MS, no se han encontrado variantes de secuencia recurrentes en los genes codificantes de TKs que permitan explicar la génesis molecular de las neoplasias mieloides.

2.2.2 Relación de los SNPs detectados en los genes TK con la predisposición a la enfermedad

Como se ha comentado, la mayor parte de los cambios detectados en el análisis mediante dHPLC de estos genes, correspondían a variantes de tipo SNPs ya descritas en *dbSNP*. Diversos estudios han demostrado que existen variantes genéticas poblacionales asociadas con una mayor probabilidad o predisposición a desarrollar cierto tipo de enfermedades. En concreto, y como se ha comentado en la *Introducción*, existen cuatro SNPs de *FGFR2* (rs1219648, rs2981579, rs11200014 y rs2420946) para los que se ha descrito asociación con el desarrollo de cáncer de mama, especialmente con los casos de peor pronóstico (Hunter *et al*, 2007; Katoh *et al*, 2008). En el caso de *FGFR4*, también se ha descrito un SNP (rs351855, p.Gly388Arg) asociado con el desarrollo y evolución del cáncer de mama (Bange *et al*, 2002) y otros tumores (Streit *et al*, 2004; Spinola *et al*, 2005; Wang *et al*, 2004).

También en el caso de las NMPCs se ha observado la importancia en el desarrollo de la enfermedad de la variación genética germinal de cada individuo. Diversos grupos han descrito la existencia de un haplotipo en *JAK2* (no analizado en este Proyecto) relacionado con la existencia de mutaciones en este gen (Pardanani *et al*, 2008; Olcaydu *et al*, 2009; Kilpivaara *et al*, 2009; Jones *et al*, 2009) y asociado al desarrollo de la enfermedad. Este haplotipo, presente en el 50% de la población, se denomina 46/1 o GGCC y predispone a la adquisición de una NMP V617F/*JAK2* positiva. También se ha visto asociado al desarrollo de mutaciones en el exón 12 de este gen, la aparición de la W515MPL en TE y MFI o incluso a casos de TE con *JAK2* no mutado (Olcaydu *et al*, 2009b; Pardanani *et al*, 2010; Jones *et al*, 2010), lo que sugiere que este alelo aumenta el riesgo a padecer NMPCs en general, aunque esta asociación no se cumple para la LMC (Spolverini *et al*, 2010).

Debido a que habíamos detectado algún SNP, decidimos analizar su posible asociación con el desarrollo de la enfermedad de los pacientes. A pesar de que el número de individuos analizado era muy pequeño como para encontrar algún tipo de asociación significativamente estadística, analizamos las frecuencias alélicas y genotípicas para todos de manera que pudiéramos comparar la distribución de estos polimorfismos con respecto al grupo de pacientes, incluyendo los datos de un grupo de 20 individuos control sin enfermedad. Así, podríamos determinar si existían variantes poblacionales con una distribución diferente en el grupo de pacientes con respecto al grupo control. Si fuera así, podría existir alguna relación entre la presencia o ausencia de una de las variantes del polimorfismo y el desarrollo de la enfermedad. Obviamente, en caso de detectarse algún tipo de tendencia, debería analizarse una serie mayor de pacientes y de controles con objeto de validar esta asociación. Para llevar a cabo un análisis que compare los grupos de pacientes y controles, las frecuencias genotípicas

de ambos grupos deben cumplir el equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W), es decir, que las frecuencias observadas se ajusten a las esperadas para ese grupo. Esto garantiza que el genotipado de las muestras ha sido correcto. En algunos casos no pudimos diferenciar ambos grupos de homocigotos, por lo que no se realizó este tipo de análisis.

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas entre ambos grupos para ninguno de los SNPs detectados, empleando tests de Fisher 2x2 y tests de contingencia 2x3. Debido al escaso tamaño muestral de nuestro estudio (la selección inicial de las muestras no se realizó con este objetivo), consideramos como valor de significación $p < 0,01$. Para aumentar el tamaño muestral en el caso del grupo de controles, se añadieron los datos para poblaciones europeas depositados en *dbSNP* cuando fue posible. A pesar de que en algunos casos los valores de p obtenidos se acercaban a la significación estadística, al sumar al grupo de controles los datos recogidos en *dbSNP* sobre la población europea el valor p aumentaba. En algunos casos, como el SNP rs158689 (g.93693A>T) de *SYK*, se observaron que las frecuencias poblacionales de nuestros grupos de pacientes y controles eran similares entre ellas pero distintas a las depositadas en *dbSNP* para la población europea, por lo que puede existir una cierta variabilidad geográfica. Nuestro análisis incluyó el SNP rs351855 (p.G388R) de *FGFR4* que, a pesar de estar relacionado con el desarrollo de ciertos tipos de cáncer (Bange *et al*, 2002; Streit *et al*, 2004; Spinola *et al*, 2005; Wang *et al*, 2004), en nuestro caso no encontramos diferencias significativas entre el grupo de pacientes y controles.

Según la herramienta *HSF*, algunos de los SNPs detectados en intrones parecían presentar un efecto en el *splicing*. Sin embargo, tampoco encontramos diferencias en su distribución en ambos grupos, por lo que la posible alteración del corte y empalme de exones no se consideró importante.

Un hecho curioso es que la variabilidad de los genes analizados es muy distinta (ver **Figura 1**). Por ejemplo, en los 10 fragmentos analizados para *SYK* detectamos 11 SNPs, mientras que sólo uno en los siete fragmentos analizados para *ABL1*. En este último caso, el hecho de haber encontrado un único SNP (rs2227985, g.166196A>C) en prácticamente toda la secuencia codificante del gen (dominios SH3, SH2, TK) parecía indicar que se trata de un gen muy poco polimórfico, aunque en las bases de datos existe una gran cantidad de polimorfismos descritos para este gen. Sin embargo, con los datos de *HapMap* (<http://www.hapmap.org>) se puede comprobar cómo la mayor parte de los individuos de origen europeo son homocigotos para la mayor parte de estos SNPs, lo que explica nuestro resultado.

Por todo ello, podemos concluir que nuestros resultados no muestran la existencia de una asociación importante entre las variantes polimórficas encontradas en los genes TKs y el desarrollo de la enfermedad de nuestros pacientes. Dado que el genotipado de estas variantes

no era uno de los objetivos iniciales de nuestro estudio, nuestros resultados pueden ser debidos a que los polimorfismos que hemos encontrado no capturen adecuadamente los haplotipos asociados (no son *tag*-SNPs).

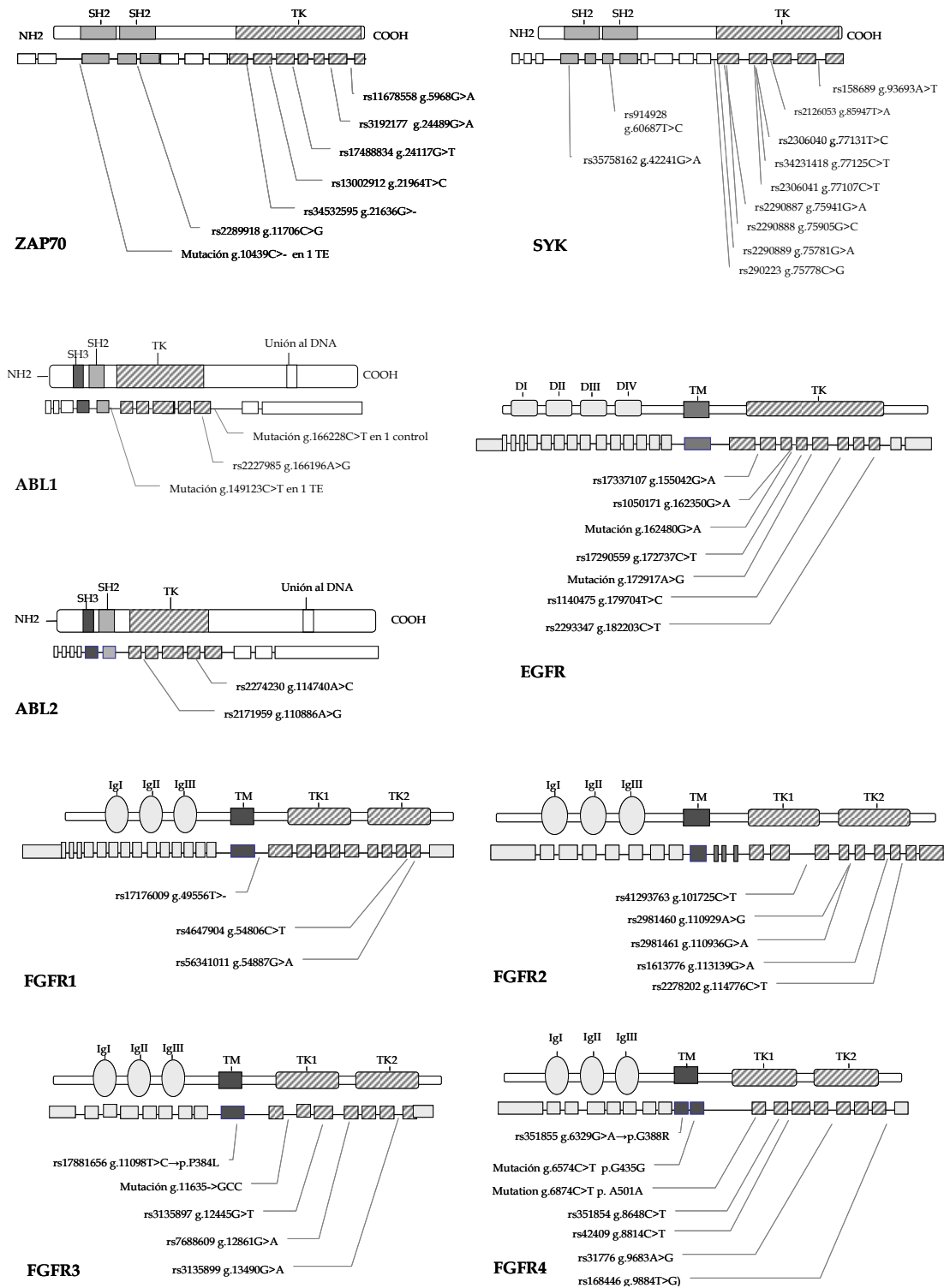


Figura 1: Representación de todos los cambios detectados mediante dHPLC en la secuencia proteica (arriba) y genómica (abajo) de las distintas TKs.

2.3 Análisis de la expresión de genes TK: RQ-PCR

Una de las alteraciones oncogénicas frecuentes de los genes TK y por la que puede haber una ganancia de función es su sobreexpresión. De hecho, se ha observado que varios de los genes seleccionados inicialmente para nuestro estudio (familias Syk, Abl y Fgfr), se encuentran sobreexpresados en diversos tipos de neoplasias (Gelsi-Boyer, 2005; Coopman & Mueller, 2006; Del Principe, 2006; Kipps *et al*, 2007; Feldman *et al*, 2008; Turner & Grose, 2010; Hagemeyer & Graux, 2010). Por ello, puesto que no habíamos encontrado alteraciones citogenéticas ni de secuencia en estos genes, decidimos analizar su expresión en nuestra serie de pacientes y compararla con la de muestras control. Además, el empleo de dos ensayos situados en los extremos 5' y 3' del gen nos permitiría descartar definitivamente la existencia de posibles fusiones génicas.

Este estudio se realizó mediante la amplificación del cDNA por PCR en tiempo real (RQ-PCR). Los resultados se analizaron mediante cuantificación relativa o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (o valor RQ). Como control interno de cada muestra empleamos la expresión del gen *TBP* y, además, añadimos dos muestras control sin enfermedad o calibradores (una muestra de de sangre periférica SP-C1 y otra de médula ósea MO-C2). Cuanto mayor es la expresión de un gen, antes sobrepasa el valor umbral (*threshold*) y muestra un valor C_T menor, por lo que su valor de ΔC_T (con respecto al gen control o endógeno) será menor. La cuantificación relativa compara los valores de ΔC_T de las muestras problema respecto a los valores de ΔC_T obtenidos en las muestras controles sin enfermedad ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ muestra} - \Delta C_T \text{ calibrador}$). El valor $2^{-\Delta\Delta C_T}$ o valor RQ, corresponde al número de veces que se expresa más un gen en la muestra problema con respecto a la expresión en el calibrador.

La antigüedad de algunas de las muestras y su baja calidad para la obtención de RNA nos llevó a tener que eliminar varias de las muestras inicialmente seleccionadas. Finalmente, sólo pudimos analizar muestras de 16 de los 44 pacientes inicialmente seleccionados (además de los dos controles sanos). A pesar de ser un número muy reducido de muestras, nuestro objetivo consistía en determinar la existencia de patrones de expresión llamativos y uniformes en el grupo de pacientes, que posteriormente pudieran ser analizados en un mayor número de muestras. Debido a que también las cantidades de material obtenidas fueron muy escasas, redujimos considerablemente el número de ensayos previstos. Finalmente, decidimos emplear ensayos de tipo “_m1”, que únicamente reconocen DNAC y que no estaban disponibles para *FGFR3*, *FGFR4* y *ZAP70*, por lo que estos genes fueron eliminados del análisis. Tampoco se incluyó *FGFR2* ya que su expresión fue extremadamente baja.

El gen que mostró mayores valores de expresión fue *SYK* (Figura 16 de *Resultados* y Anexo 8), con valores ΔC_T negativos (mayor expresión que el *TBP* endógeno) salvo en el caso de la

muestra MFI-1. La expresión de este gen es importante en las células hematopoyéticas, especialmente en los linfocitos B y T, donde participa en señalización mediada por BCR y TCR. A nivel global, no se observaron diferencias de expresión de este gen entre las muestras y controles (prueba *t* de *Student* para muestras independientes de 1 cola, $p > 0,05$), ya que también los controles presentaban una elevada expresión de SYK (valor ΔC_T negativo). En el caso de la muestra cuyo material procedía de sangre periférica (NMPCa-3), su expresión sí fue superior a la del control C1-SP (Figura 16C de *Resultados*). También en algunos casos individuales de MO, la expresión de SYK fue superior al control C2-MO (muestras MFI-2, TE-2, NMPCa-1 y NMPCa-4), como se ve en la figura 16B. La sobreexpresión de SYK se ha asociado al desarrollo de linfomas de células T periféricas inespecíficos (U-PTCL) (Feldman *et al*, 2008). Sólo en las muestras de los individuos MFI-1 (i: 9606; c: 27238) y NMPCa-5 (i: 18634; c: 25553) detectamos una baja expresión de SYK. La pérdida de expresión de este gen está asociada al desarrollo de LLA infantil (Goodman *et al*, 2001) y a un aumento en la capacidad de metástasis en otro tipo de tumores (mama y carcinoma gástrico) (Coopman *et al*, 2000; Toyama *et al*, 2002; Moroni *et al*, 2004; Coopman & Mueller 2006).

Aunque de manera variable entre los distintos pacientes, en general el ensayo A (5', dominio SH2) mostró valores de expresión más elevados que el B (3', dominio TK) en las muestras obtenidas de pacientes, salvo NMPCa-5 y TE-4. Sin embargo, estas diferencias no son significativas (prueba *t* de *Student* para muestras pareadas de dos colas ΔC_{TA} frente a ΔC_{TB} , $p = 0,0537$).

Para poder confirmar una expresión aberrante de SYK en algunos de estos pacientes, deberíamos repetir estos ensayos en una serie mayor para confirmar si el aumento (en el caso de la MFI-2, TE-2, NMPCa-1, NMPCa-3 y NMPCa-4) o la disminución (en el caso de MFI-1 y NMPCa-5) de la expresión de este gen son patrones recurrentes. De la misma forma, deberíamos aumentar el número de controles del ensayo de manera que nos permitan obtener una medida media de la expresión normal de este gen en individuos sanos.

El análisis de *ABL1* sólo fue posible sobre muestras de 14 de los 16 pacientes anteriormente mencionados (Figura 17 de *Resultados* y Anexo 8). En este caso los ensayos *TaqMan*® se situaron en los dominios SH3 (ensayo A o 5') y TK (ensayo B o 3'). En las muestras control SP y MO ambos ensayos presentaban valores de ΔC_T similares y mayores a *TBP*, aunque los valores en SP fueron superiores (menor C_T). Los resultados obtenidos en las muestras fueron muy heterogéneos respecto al control endógeno. En algunos casos y como ocurría en los controles, la expresión de *ABL1* fue superior a la de *TBP*, pero en otros la situación fue la inversa. No se observaron diferencias significativas en la expresión de *ABL1* en los controles con respecto a los pacientes (prueba *t* de *Student* para muestras independientes de 1 cola,

$p>0,05$). Únicamente cabría destacar dos de las muestras (MFI-2 y TE-7) que mostraron valores RQ (en función de MO) cercanos a 2 para ambos ensayos, lo que significa que en estos pacientes la expresión de *ABL1* es prácticamente el doble que la observada en el control de MO, aunque inferior al ensayo A en SP y similar al ensayo B de SP.

Por otro lado, no hay una expresión diferencial de los ensayos A y B característica entre los distintos individuos, ni tampoco en los controles (prueba *t de Student* para muestras pareadas de dos colas, $p>0,05$). Mientras que en algunos pacientes la expresión del ensayo B superó al ensayo A, en otros fue al contrario. Por todo ello, no se puede concluir que este gen presente un patrón aberrante y recurrente de expresión con respecto a los controles sanos. Tampoco hemos detectado una expresión variable significativa entre sus distintas regiones.

A pesar de que *ABL2* no se ha visto sobreexpresado en neoplasias mieloides, la única fusión descrita hasta la fecha que afecte a este gen (*ETV6-ABL2*, Cazzaniga *et al*, 1999; Iijima *et al*, 2000; Griesinger *et al*, 2002) resulta ser sensible a imatinib (Okuda *et al*, 2001), por lo que en caso de que la sobreexpresión de este gen se encontrase implicada en la enfermedad podría ser eficaz la terapia con dicho fármaco. Los resultados obtenidos en el estudio de *ABL2* indicaron que se trata de un gen de baja expresión en las células hematológicas, ya que en todos los casos los valores ΔC_T (expresión frente al *TBP*) fueron positivos (Figura 18 de *Resultados* y Anexo 8) e incluso, en algunos casos, se obtuvieron valores de C_T superiores a 38, por lo que se consideraron nulos.

No se observaron diferencias significativas en la expresión de *ABL2* en pacientes y controles (prueba *t de Student* para muestras independientes de 1 cola, $p>0,05$). Destaca el caso del paciente NMPCa-4 (MO), cuya expresión es muy superior a la del control C2-MO, y a la del resto de muestras y controles. En esta muestra la expresión observada en el ensayo A (dominio SH3) es tres veces superior al mismo ensayo en la MO y más de cinco veces superior en el caso del ensayo B (dominio TK). La muestra NMPCa-3 (SP) también presentó una expresión mayor que el correspondiente control C1-SP. Como en el caso de *SYK*, para confirmar si la sobreexpresión de *ABL2* se encuentra relacionada con el desarrollo de la enfermedad sería necesario realizar este análisis en una serie mayor de muestras (pacientes y controles) y comprobar si el patrón de expresión es recurrente.

En cuanto a la expresión diferencial de las distintas regiones de *ABL2*, salvo en una de las muestras (NMPCa-4) y el control SP, el ensayo A (dominio SH3) presentó una expresión significativamente superior (prueba *t de Student* de 2 colas para muestras pareadas, $p=0,001$) a la del ensayo B (dominio TK) (Figura 21A de *Resultados*). Para analizar si esta diferencia de expresión del dominio SH3 sobre el TK podía deberse a la expresión de transcritos alternativos, consultamos distintas bases de datos. Los resultados no eran compatibles con una

expresión diferencial de los ocho transcritos descritos para *ABL2* en *EntrezGene* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/27>) o los once de *Ensembl* (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000143322), pero sí con otros predichos por *ASPIcDb* (*Alternative Splicing Prediction Database*, <http://t.caspur.it/ASPIcDB/>). La expresión diferencial de estos transcritos cortos, que contienen únicamente la porción 5' del gen y no la 3', podría ser la responsable de las diferencias de expresión observadas entre los ensayos A y B.

Pese a esta observación, el control C2-MO presentó una expresión diferencial de A sobre B muy similar a la de los pacientes, por lo que la expresión de estos transcritos cortos no parece estar relacionada con el desarrollo del fenotipo neoplásico. Además, la expresión global de este gen fue muy baja.

En el caso de *FGFR1*, el locus 8p11 se ha visto amplificado en cáncer de mama (Gelsi-Boyer 2005), carcinoma escamoso oral, cáncer de ovario, vejiga y rhabdomyosarcoma (Turner & Grose, 2010). Los resultados obtenidos en el análisis de este gen (Figura 19 de *Resultados* y Anexo 8) son bastante heterogéneos entre las distintas muestras. En algunos casos (entre los que se encuentra C2-MO), la expresión de los ensayos A y B de *FGFR1* es mayor que la de *TBP*, mientras que en otros (la mayoría, además del control C1-SP) esta expresión es menor. Es destacable que la expresión de este gen en el control MO sea muy superior a la del control SP, sobre todo en lo que respecta al ensayo B. Puesto que todas las muestras de los pacientes analizados en el estudio de *FGFR1* correspondían a muestras procedentes de MO, podemos decir que no hay diferencias significativas en la expresión de este gen con respecto al control (C2-MO, prueba *t* de *Student* para muestras independientes de 1 cola, $p > 0,05$). Únicamente en el caso de la TE-7, la expresión del ensayo A es mayor a la del ensayo A en la MO (RQ= 2,3).

Si tenemos en cuenta la expresión diferencial de los distintos dominios, observamos que existen diferencias significativas entre la expresión de A y B en todos los pacientes (prueba *t* de *Student* de 2 colas para muestras pareadas, $p = 0,004$). En todos los casos la expresión del ensayo B (dominio TK) fue mayor que la expresión del ensayo A (dominio extracelular) (Figura 21B de *Resultados*). Esto fue más acusado en algunos casos (con diferencias de 2 C_T s en TE-1, TE-4, TE-6 y NMPCa-6 y más de 4 C_T s en la NMPCa-6). Sin embargo, también se observa una expresión diferencial del dominio TK respecto del extracelular en los controles, especialmente en el C2-MO, por lo que no podemos considerar que sea un hecho implicado en el desarrollo de la enfermedad. De hecho, la diferencia de expresión de ambas regiones del gen podría explicarse por la existencia de transcritos alternativos de expresión diferencial. Según *EntrezGene* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2260>), este gen tendría nueve transcritos distintos, que no explicarían estos resultados. Sin embargo, según *Ensembl* el

número de transcritos sería de 42 (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000077782) y, según *ASPICdb* (*Alternative Splicing Prediction Database*, <http://t.caspur.it/ASPicDB/>), de 116. Algunos de los transcritos de estas dos bases de datos únicamente serían detectados por el ensayo B (dominio TK), por lo que podrían explicar nuestros resultados.

Debido a la importancia de *JAK2* en la génesis de las neoplasias mieloproliferativas, se incluyó también el análisis de este gen en estos ensayos. La función tirosínica de *JAK2* es fundamental para la activación óptima de numerosas cascadas de activación de las células hematológicas, especialmente en la vía *JAK-STAT*, aunque también participa activamente en las vías de señalización *PI3K-AKT*, *Ras-MAPK*, e incluso en la activación de otras *CTKs* como las *Src*. Alteraciones en la actividad de *JAK2*, como ocurre con la *V617FJAK2*, desencadenan una activación anómala de estas vías, lo que puede provocar la alteración de procesos celulares importantes e inducir el desarrollo de neoplasias (Rane, 2000; Imada & Leonard, 2000; Ward *et al*, 2000; Ferrajoli *et al*, 2006; Khwaja *et al*, 2006).

En el año 2001, Bentz y colaboradores observaron que el 56% de los casos de linfoma primario de células B del mediastino (PMBL) presentaban ganancias de material en el *locus* 9p34 (Bentz *et al*, 2001). Análisis posteriores sobre *JAK2* indicaron que sus niveles de RNAm se encuentran aumentados en este tipo de neoplasias (Savage *et al*, 2003) de manera independiente de la presencia o no de la mutación p.V617F (Renné *et al*, 2007). Además, *JAK2* también se ha visto sobreexpresado en el 85% de los casos de linfoma Hodgkin (Mottok *et al*, 2007). Sin embargo, y a pesar de la importancia de este gen, existen pocos datos sobre su expresión en las neoplasias mieloides. Por ello, nos pareció interesante incluir el estudio de este gen en este tipo de análisis.

En este caso la expresión de ambos ensayos A y B en los controles de MO y SP eran inferiores a los valores de *TBP* y muy similares entre ellos. Algunas muestras del grupo de pacientes también mostraban estos resultados (figura 20 de *Resultados* y Anexo 8). Sin embargo, en la mayor parte de los pacientes la expresión del ensayo B de *JAK2* es superior a la de *TBP*, y difiere significativamente de la expresión del ensayo A (prueba *t de Student* de 2 colas para muestras pareadas, $p < 0,001$) (Figura 21C de *Resultados*). En muchos de ellos la diferencia del ensayo B con respecto al A es mayor de 2 C_T s.

Esta mayor expresión en el ensayo B sobre el A no se observó en los controles, aunque si comparamos las medias de los ensayos A y B para ambos grupos de muestras, no obtuvimos diferencias significativas (prueba *t de Student* de 2 colas para muestras pareadas, $p = 0,231$). Sin embargo, cuando analizamos estos valores de manera individual (figura 20B de *Resultados*), se observa cómo la expresión del ensayo B de varios pacientes (TE-2, TE-4 y TE-6) es hasta cinco veces superior de la del control MO. También en el caso de la NMPCa-3, muestra procedente

de SP, la expresión general de *JAK2* es superior a la del control C1-SP (figura 20C de *Resultados*).

Cabe destacar el caso de la muestra TE-2 (i:15676; c:20740). Observando la gráfica 20B, se puede observar que la expresión del ensayo A es dos veces mayor a la del control MO, pero esta diferencia es superior en el ensayo B (14 veces). Según *EntrezGene* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3717>), *JAK2* sólo tiene un transcrito posible y según *Ensembl* cuatro, aunque detectables mediante el ensayo B sólo uno (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000096968). Aunque *ASPICdb* (*Alternative Splicing Prediction Database*, <http://t.caspur.it/ASPicDB/>) predice ocho transcritos alternativos para este gen, ninguno de ellos sería detectable por el ensayo B y no por el A, por lo que la expresión diferencial de los transcritos alternativos no explicaría estos resultados (**Figura 2**).

Una posible explicación sería la existencia de una fusión de la parte final de *JAK2* con otro gen en este paciente (TE-2). Desafortunadamente, no se dispone de la muestra necesaria para analizar esta posibilidad mediante FISH, y el RNA de este individuo se ha agotado, lo que dificulta continuar con este análisis.

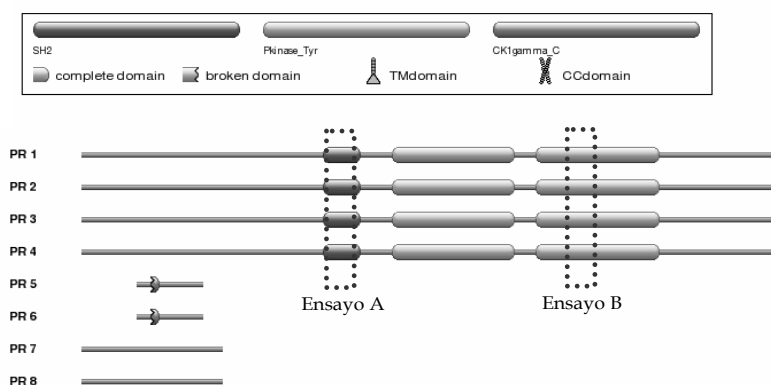


Figura 2. Transcritos predichos por *ASPICdb* para *JAK2*. Como puede observarse, la mayor expresión del ensayo B (dominio TK, exones 22-23) sobre el A (dominio SH2, exones 6 y 7) no puede explicarse por la presencia de transcritos cortos correspondientes al dominio TK, ya que serían igualmente detectados por el ensayo A.

En resumen, los resultados obtenidos en el análisis de RQ-PCR no permiten afirmar que este tipo de pacientes presenten una expresión aberrante general de alguno de los genes analizados. Sin embargo, sí que existen casos particulares que podrían conformar subgrupos, como es el caso de la muestra NMPCa-4 en el estudio de *ABL2*, la muestra TE-7 en *FGFR1* o la posible sobreexpresión de *JAK2* en varios pacientes, siempre que estas alteraciones se encontraran en el análisis de un mayor grupo de muestras. Además, salvo en el caso señalado de *JAK2*, las diferencias de expresión encontradas entre los ensayos A y B de cada gen podrían

explicarse por la expresión diferencial de distintos transcritos alternativos, detectables únicamente mediante uno de los dos ensayos diseñados.

A pesar de que en algunos casos aislados la expresión diferencial de estos genes se ha visto relacionada con la patogénesis de diversos tipos de tumores (Gelsi-Boyer, 2005; Coopman & Mueller, 2006; Del Principe, 2006; Kipps *et al*, 2007; Feldman *et al*, 2008; Turner & Grose, 2010, Hagemeyer & Graux, 2010) e incluso de neoplasias hematológicas de la serie linfóide (Bentz *et al*, 2001; Savage *et al*, 2003; Renné *et al*, 2007; Mottok *et al*, 2007), existen muy pocos estudios acerca de su implicación en las neoplasias mieloides.

Pese a que el tamaño muestral del grupo de pacientes y controles era muy reducido, nuestro objetivo con este estudio era determinar si podía existir un patrón de expresión diferencial en alguno de estos genes. En caso de que esto hubiera sido así, el paso siguiente hubiera sido ampliar el estudio a un número mayor de muestras, seleccionando aquellas que tuvieran una mejor calidad del material, y ampliando a su vez el número de controles sanos, para realizar una comparación estadística adecuada. Esto podría ser importante en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes que la presentan, ya que haría a algunos de ellos candidatos a recibir terapias con moléculas inhibitoras de la actividad TK.

2.4 Conclusiones del estudio de los genes TK

En conclusión, no hemos encontrado reordenamientos cromosómicos ni mutaciones de secuencia recurrentes en los genes analizados que puedan explicar el desarrollo neoplásico de los pacientes estudiados. Por ello, parece que las alteraciones moleculares causantes de las NMPs *BCR-ABL1* y *V617FJAK2* negativas deben encontrarse en otro/s grupos/s de genes, ya sean codificantes de proteínas con actividad TK o codificantes de otras proteínas que participan en las mismas vías de señalización celular. Estos resultados fueron publicados en *Cancer Genetics & Cytogenetics* en mayo de 2010 (Aranaz & Ormazábal, 2010).

Como se ha comentado anteriormente, en el caso de los estudios de expresión génica, tampoco hemos determinado un patrón de expresión diferencial generalizado en las muestras de pacientes distinto significativamente de los controles. En el caso de *JAK2* podría ser interesante analizar una serie mayor de pacientes y controles, con el fin de comprobar si efectivamente existe una mayor expresión del dominio TK en las muestras de NMPCs con respecto a muestras de individuos sanos, como ocurre en ciertos tipos de linfomas (Bentz *et al*, 2001; Savage *et al*, 2003; Renné *et al*, 2007; Mottok *et al*, 2007). Además, podría incluirse en el estudio material procedente de líneas celulares de la serie mieloide, cuyo material es fácil de obtener y de mejor calidad.

3. Genes de la familia Cbl

La búsqueda de nuevos genes candidatos a estar alterados desde el punto de vista funcional no es sencilla dada la cantidad de moléculas que intervienen en las vías de señalización que se han encontrado alteradas. Por ello, en los últimos años se están aplicando aproximaciones experimentales de análisis genómico masivo como los *arrays* de SNPs y de CGH.

Los análisis de *arrays* de SNPs se han convertido en una herramienta de gran utilidad ya que han permitido dirigir los estudios directamente a genes candidatos a estar alterados por estar situados en regiones que presentan deleciones y/o pérdida de heterocigosidad de manera recurrente. La pérdida de heterocigosidad, o disomía uniparental adquirida, es el resultado de la recombinación mitótica por el intercambio de DNA entre cromátidas no hermanas. El análisis de una de las regiones con pérdida de heterocigosidad ya llevó a uno de los grupos a descubrir la mutación V617F en *JAK2* (Kralovics *et al*, 2005) y a otros a detectar alteraciones en *TET2* (Delhommeau *et al*, 2008; Abdel-Wahab *et al*, 2009; Delhommeau *et al*, 2009; Tefferi *et al*, 2009; Tefferi *et al*, 2009b; Tefferi *et al*, 2009c; Couronné *et al*, 2010), *IKZF1* (Jäger *et al*, 2008; Mulligan *et al*, 2008; Martinelli *et al*, 2009), *EZH2* (Ernst *et al*, 2010; Nikoloski *et al*, 2010) *IDH1* e *IDH2* (Mardis *et al*, 2009; Ward *et al*, 2010).

De manera semejante, los *arrays* de CGH (*comparative genomic hybridization*, hibridación genómica comparada) han conducido a la identificación de mutaciones en *ASXL1* en 10% de NMPCs y 40% de LMMC, 10% LMA de novo, 40% LMA secundarias y 2% LMMJ (Carbuccia *et al*, 2009; Gelsi-Boyer *et al*, 2009; Carbuccia *et al*, 2010; Boulwood *et al*, 2010; Sugimoto *et al*, 2010; Chou *et al*, 2010; Tefferi 2010; Rocquain *et al*, 2010). Este gen, localizado en 20q11, codifica una proteína poco caracterizada que parece estar implicada en la regulación de la remodelación de la cromatina (Tefferi, 2010a).

TET2 es un gen supresor tumoral localizado en 4q24 cuya función se desconoce, pero que se ha encontrado mutado en aproximadamente el 12% de las NMPCs, 22%-50% de LMMC, 24% de LMA secundarias y en el 20% de las mielodisplasias (Delhommeau *et al*, 2009; Kosmider *et al*, 2009; Mullighan *et al*, 2009b; Bacher *et al*, 2010; Shaub *et al*, 2010; Tefferi 2010). También se ha encontrado mutado en el 26% de los casos de anemia refractaria con sideroblastos en anillo (RARS-T) (Flach *et al*, 2010; Szpurka *et al*, 2010). *IKZF1* es también un gen supresor tumoral localizado en 7p12 e implicado en la diferenciación hematopoyética normal, más concretamente en la proliferación del linaje linfóide y codifica una proteína de la familia de factores de transcripción con dominios de zinc. Parece que sus mutaciones se asocian con la transformación aguda de la enfermedad, lo que hace que se encuentren principalmente en casos de LLA (Mullighan *et al*, 2007; Mulligan *et al*, 2009; Martinelli *et al*, 2009) y algún caso con MFI (Jäger *et al*, 2008). *IDH1* (2q33) e *IDH2* (15q26) codifican para la isocitrato

deshidrogenasa 1 y 2, respectivamente y catalizan la descarboxilación oxidativa del isocitrato a 2-oxoglutarato, generando NADPH. Sus mutaciones llevan a la pérdida de función de estas proteínas, y se han encontrado principalmente en la transformación aguda de las NMPCs, pero no en la fase crónica (Tefferi *et al*, 2010). Finalmente, *EZH2* (7q36.1) codifica la subunidad catalítica de la metiltransferasa de histonas H3 (H3K27, *polycomb repressive complex*, PRC2), y sus mutaciones se han encontrado asociadas a fases tempranas de los SMD (Nikoloski *et al*, 2010, Ernst *et al*, 2010) y de MFI (Ernst *et al*, 2010).

Sin embargo, excepto en algunos casos, la función de estos genes y su posible papel en la patogénesis de la enfermedad no está clara, por lo que existen dudas acerca de si las alteraciones encontradas son causa real de la enfermedad o constituyen marcadores de progresión. Además, también se desconoce su relación con la presencia o no de la mutación V617F/JAK2. De hecho, la descripción de todas estas nuevas alteraciones está generando nuevas hipótesis acerca del papel real de la mutación de *JAK2* en la patogénesis de la enfermedad. Por ejemplo, estudios realizados en clones V617F/JAK2 positivos y negativos de un mismo paciente han demostrado que ambos presentaban mutaciones en *TET2*. Esto sugiere que este gen se encontraría alterado en una fase temprana de la enfermedad y de manera previa a la aparición de la V617F (Schaub, 2010, Mulligan *et al*, 2010). Varios autores consideran que las mutaciones en *TET2* predisponen a la adquisición de mutaciones en *JAK2* (Mulligan *et al*, 2009; Levine & Carroll, 2009; Schaub *et al*, 2010). Sin embargo, en otros pacientes el orden es al revés, las mutaciones en *TET2* aparecen posteriormente a las mutaciones en *JAK2* (Schaub *et al*, 2010; Bacher *et al*, 2010).

Este tipo de análisis también ha permitido encontrar mutaciones en *C-CBL* (Dunbar, 2008; Grand, 2009; Sanada *et al*, 2009; Loh *et al*, 2009; Makishima *et al*, 2009; Muramatsu, 2010; Barresi, 2010). Este gen se encuentra en 11q23.3 y se ha encontrado mutado en 8% de pacientes con LMCA, 5-22% de LMMC, 1-33% de LMA secundaria, 5-33% de LMMJ, 1% de SMD y 1-7% de NMP (Sargin *et al*, 2007; Caligiuri *et al*, 2007; Abbas *et al*, 2008; Dunbar *et al*, 2008; Reidl *et al*, 2008; Grand *et al*, 2009; Sanada *et al*, 2009; Loh *et al*, 2009; Makishima *et al*, 2009; Muramatsu *et al*, 2010; Barresi *et al*, 2010; Pérez *et al*, 2010; Fernandes *et al*, 2010; Martsuda *et al*, 2010; Kohlman *et al*, 2010; Rocquain *et al*, 2010).

C-CBL forma, junto con *CBL-B* y *CBL-C*, una familia de proteínas E3-ubiquitin ligasas implicadas en la regulación de numerosas vías de señalización celular. De hecho, se han descrito como reguladores negativos fundamentales de diversas moléculas implicadas en estas vías, en especial de TKs, tanto receptoras (como EGFR, FLT3, C-KIT o FGFR), como citoplasmáticas (como SRC, FYN, LYN o SYK). Esto es, directamente relacionadas con los productos de varios de los genes de nuestro análisis inicial. Excepto *CBL-C*, cuya expresión

parece ser específica de células epiteliales, *CBL* y *CBL-B* se expresan en una amplia variedad de células, entre las que destacan las células hematopoyéticas.

Las proteínas Cbl actúan uniendo una molécula de ubiquitina procedente de una enzima E2 a su sustrato correspondiente (generalmente proteínas con actividad TK). Esta ubiquitinación dirige a estas moléculas a su posterior degradación a través de la vía lisosomal o del proteosoma. Dada su función reguladora, las mutaciones inactivantes de Cbl provocarían una alteración en la señalización celular que podría ser similar a la activación anómala de una TK, por lo que se ha considerado que los genes *CBL* serían supresores tumorales potenciales.

Desde la descripción de la primera mutación inactivante de *C-CBL*, detectada por Sargin y colaboradores en un paciente de LMA (p.R420Q, Sargin *et al*, 2007), diversos grupos han descrito mutaciones en *C-CBL* en otras neoplasias mieloides (ver **Anexo 1**) (Sargin *et al*, 2007; Caligiuri *et al*, 2007; Abbas *et al*, 2008; Dunbar *et al*, 2008; Reidl *et al*, 2008; Grand *et al*, 2009; Sanada *et al*, 2009; Loh *et al*, 2009; Makishima *et al*, 2009; Muramatsu *et al*, 2010; Barresi *et al*, 2010; Pérez *et al*, 2010; Fernandes *et al*, 2010; Martsuda *et al*, 2010; Kohlman *et al*, 2010; Rocquain *et al*, 2010). Entre el 4-10% de pacientes con neoplasias mieloides presentan disomía uniparental en 11q, de los cuales el 85-90% tienen mutaciones en *C-CBL* (Dunbar *et al*, 2008; Grand *et al*, 2009; Sanada *et al*, 2009; Makishima *et al*, 2009; Muramatsu *et al*, 2010; Barresi *et al*, 2010). La aparición de estos cambios de secuencia en *C-CBL* nos condujo a analizar este gen en nuestra serie inicial de 44 pacientes, basándonos en su relación con la señalización mediada por las TKs. Posteriormente, se han encontrado mutaciones en casos de LMA secundarias, SMD, SMD/NMP y otras NMPCs. Las mayores frecuencias de alteraciones en *C-CBL* se han descrito en pacientes con LMMC (hasta un 22%) y LMMJ (hasta un 33%). En el caso de la LMA, la frecuencia más elevada se observó en una serie de muy pocos pacientes (4/12, Caligiuri *et al*, 2007) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Frecuencias de mutaciones en C-CBL observadas por distintos grupos en diversas neoplasias mieloides.

Neoplas	Frecuencia	Autor	Neoplasia	Frecuencia	Autor
LMA 2 ^a	0.7% (1/150)	Sargin <i>et al</i> , 2007	LMMC	7% (4/52)	Dunbar <i>et al</i> ,
	33% (4/12)	Caligiuri <i>et al</i> , 2007		13% (10/78)	Grand <i>et al</i> , 2009
	1.6% (2/139)	Abbas <i>et al</i> , 2008		19% (16/84)	Sanada <i>et al</i> ,
	1.4% (3/279)	Reindl <i>et al</i> , 2008		5% (2/38)	Makishima <i>et al</i> ,
	7.2% (2/28)	Sanada <i>et al</i> , 2009		10% (5/49)	Muramatsu <i>et al</i> ,
	9% (10/110)	Makishima <i>et al</i> , 2009		22% (N/N)	Kohlman <i>et al</i> ,
	5% (2/43)	Fernandes <i>et al</i> , 2010	LMMJ	17% (27/159)	Loh <i>et al</i> , 2009
SMD	1.4% (1/67)	Dunbar <i>et al</i> , 2009		5% (N/N)	Makishima <i>et al</i> ,
	1.9% (2/105)	Sanada <i>et al</i> , 2009		6% (4/65)	Pérez <i>et al</i> , 2010
NMP	7% (2/28)	Dunbar <i>et al</i> , 2008		33% (4/12)	Matsuda <i>et al</i> ,
	6% (MFI) (3/53)	Grand <i>et al</i> , 2009	LMCa	8% (12/152)	Grand <i>et al</i> , 2009
	1% (NMPCa) (1/96)	Grand <i>et al</i> , 2009			

Una característica de las mutaciones en C-CBL es que, según varios autores, serían excluyentes de otras alteraciones frecuentemente descritas en este tipo de enfermedades, como las mutaciones en *NRAS*, *KRAS*, *NF1* y *PTPN1* en LMMJ (Loh *et al*, 2009), mutaciones en *FLT3* en LMA, en *MPL* o *JAK2* en NMCPs (Schnittger *et al*, 2009; Ogawa *et al*, 2010). Además estarían asociadas a un peor pronóstico de la enfermedad (Grand *et al*, 2009). Algunos estudios han mostrado que en pacientes con LMA existe una asociación entre las mutaciones en C-CBL y las alteraciones en CBF (*core-binding factor*), ya que la mayor parte de los casos de LMA con mutaciones en C-CBL tendrían además alteraciones citogenéticas, como son la inv(16)(p13q22) (con fusión *CBFB - MYH11*, que implica el gen codificante de la subunidad beta de CBF) y la t(8;21)(q22;q22) (con fusión *RUNX1 - RUNX1T1*, que implica al gen de la subunidad alfa de CBF) (Abbas *et al*, 2008; Reindl *et al*, 2008, Sanada *et al*, 2009; Ogawa *et al*, 2010). Además, en una de las series analizadas (Sanada *et al*, 2009), la mitad de los pacientes con mutaciones en C-CBL también presentaban mutaciones en *RUNX1*, el otro gen implicado en la fusión t(8;21)(q22;q22) (Sanada *et al*, 2009; Schnittger, 2009).

Una de las mutaciones más frecuentes y caracterizadas es la p.R420Q que provoca la pérdida de función de C-CBL, induciendo una hiperrespuesta celular a citoquinas *in vitro* e incluso, un crecimiento celular independiente de factores de crecimiento (Sargin *et al*, 2007). La mayor parte de las mutaciones encontradas hasta la fecha en C-CBL son mutaciones con cambio de sentido (*misense*), pero también se han encontrado alteraciones que provocan un cambio en el marco de lectura (*frameshift*) y deleciones (como la p.E366_Q409del que afecta a todo el exón 8 en la línea celular MOLM-13, Caligiuri *et al*, 2007). La mayor parte de las mutaciones descritas se localizan en el dominio *RING finger* y en la región de unión (*linker region*) entre este dominio

y el dominio de reconocimiento de TKs receptoras (TKB, *tyrosine kinase binding*) (Grand *et al*, 2009; Ogawa *et al*, 2009; Kales *et al*, 2010; Tefferi 2010). Estas alteraciones inducen una pérdida de actividad ubiquitin ligasa, lo que indica que se tratan de dominios fundamentales para que C-CBL realice su función reguladora (Sargin *et al*, 2007; Grand *et al*, 2009; Ogawa *et al*, 2010). Sin embargo, es muy importante señalar que la mayor parte de los estudios han centrado sus análisis exclusivamente en estos dominios, por lo que no podemos descartar que existan otras alteraciones que afecten a otras regiones de la proteína. C-CBL es una proteína con múltiples dominios y todos ellos son importantes para su interacción con otras proteínas indispensables para una correcta función.

En el caso de *CBL-B* y *CBL-C* también se han observado mutaciones en neoplasias mieloides en el primero de ellos, aunque mucho más infrecuentemente (Caligiuri *et al*, 2007; Makishima *et al*, 2009; Kales *et al*, 2010). La función de *CBL-B* parece ser muy similar a la de *C-CBL* en células hematológicas (Elly *et al*, 1999; Ettenberg *et al*, 2001; Paolino & Penninger 2010; Kales *et al*, 2010). A pesar de que estas mutaciones no han sido caracterizadas funcionalmente, su localización (también en el dominio *RING finger*) podrían afectar a su función E3-ligasa. Dos estudios publicados recientemente han descrito SNPs con cambio de sentido en el dominio *RING finger* de *CBL-C* en pacientes con neoplasias mieloides (Makishima *et al*, 2009; Muramatsu *et al*, 2010), pero su importancia se desconoce ya que parece que la expresión de este gen estaría restringida a las células epiteliales (Kales *et al*, 2010).

3.1 Mutaciones en los genes de la familia Cbl

El descubrimiento de alteraciones en *C-CBL* en neoplasias mieloides nos llevó a la idea de que, a pesar de no haber encontrado mutaciones en los genes TK, en nuestra serie inicial de pacientes la señalización a través de TKs podría estar alterada por este otro mecanismo.

Cuando se analiza la bibliografía respecto a este tipo de proteínas se puede comprobar como la función reguladora de *C-CBL* no reside exclusivamente en el dominio *RING finger*. En condiciones basales, *C-CBL* se encuentra en un estado plegado que mantiene oculto este dominio *RING finger* y el TKB. Para que *C-CBL* realice su función, requiere de una activación mediada por la fosforilación de determinadas tirosinas (Y700, Y731 y Y744), localizadas en su región C-terminal. La estimulación de RTKs (como FLT3, KIT o EGFR) por el ligando correspondiente, provoca su activación y la posterior cascada de señalización intracelular, en la que intervienen varias CTKs. Estas moléculas, entre las que se encuentran las de la familias Src, Abl y Syk, fosforilan las tirosinas implicadas en la activación de *C-CBL* (Y700, Y731 y Y744), lo que induce en *C-CBL* un cambio conformacional que hace que su dominio TKB sea accesible para el reconocimiento de regiones específicas de las RTKs que habían iniciado la

señalización. C-CBL se une entonces a través de ese dominio TKB a los receptores y, a través del dominio *RING finger*, les transfiere una molécula de ubiquitina que capta de una proteína E2 conjugada a ubiquitina (ej. UbcH7 y UbcH5B) (Watermann *et al*, 1999; Thien & Langdon, 2001; Peschard & Park, 2003, Thien & Langdon 2005; Schmidt & Dikic, 2005; Swaminathan & Tsygankov, 2006). Para que este reconocimiento tenga lugar sería necesaria también la participación de ciertas moléculas adaptadoras. En el caso de EGFR una de estas proteínas adaptadoras es Grb2, aunque se han descrito otras para otras RTKs, como la FRS2 en los FGFRs. La interacción entre las proteínas adaptadoras y C-CBL tiene lugar a través del dominio rico en prolina (Swaminathan & Tsygankov, 2006) que reconoce específicamente el dominio SH3 de las proteínas adaptadoras. A su vez, algunas de las tirosinas de la región C-terminal de C-CBL también le permiten a ésta interaccionar los dominios SH2 de otras proteínas que intervienen en la señalización (ver figura 22 de la *Introducción*) (Thien & Langdon, 2005).

Además de promover la degradación de las RTKs por ubiquitinación, C-CBL también regula la actividad de ciertas CTKs (como Syk, Zap70, Fyn y Src). Se piensa que la interacción entre ambas moléculas se produce a través del reconocimiento de los dominios SH2 y SH3 de las CTKs por las tirosinas C-terminales y el dominio rico en prolina de C-CBL, respectivamente (Schmidt & Dikic, 2005; Swaminathan & Tsygankov, 2006).

Por todo ello, nos pareció importante realizar la búsqueda de mutaciones en toda la secuencia codificante de *C-CBL* en la serie inicial de 44 pacientes con diversas NMPCs. A pesar de tratarse de un grupo reducido y a que no habíamos realizado un análisis previo de posible pérdida de heterocigosidad (LOH) en 11q, consideramos que sería posible que alguno de nuestros pacientes presentara una mutación en *C-CBL*, o en alguno de los miembros de esta familia. En caso de detectarse alguna variante no descrita, procederíamos a analizar la región afectada en una serie mayor de muestras, además de en las líneas celulares derivadas de leucemia disponibles más relacionadas con las NMPCs. Pese a que el número de mutaciones descritas en la bibliografía en *CBL-B* y *CBL-C* es muy inferior, su importancia funcional y su homología con *C-CBL* nos llevó a incluirlos también en nuestro análisis. De nuevo, se analizó toda la secuencia codificante en la serie inicial para, posteriormente, ampliar el número de muestras en sólo las regiones encontradas alteradas.

Al igual que en el análisis de los genes TK, el estudio mutacional de los genes *Cbl* se llevó a cabo mediante dHPLC. En aquellos fragmentos en los cuales se observaron distintos perfiles de elución, se analizaron también al menos 20 muestras control sin enfermedad para descartar que fueran posibles variantes poblacionales.

3.1.1 C-CBL

El análisis de este gen en la serie inicial de pacientes detectó dos mutaciones con cambio de sentido (2/44, 4.5%), ambas en muestras de pacientes inicialmente diagnosticados de NMPC atípica (2/21, 9.5%). Ninguna de ellas había sido descrita previamente. La primera de ellas corresponde a la sustitución g.72251T>G (p.C416W) en el exón 9 (i: 18927; c: 25856) y afectaba al dominio *RING finger*. La segunda, fue un cambio g.81664C>T (p.A678V) situado en el exón 12 que afectaba al dominio rico en prolina. Esta mutación se encontró en un paciente que posteriormente fue diagnosticado de LMMC (i: 10730; c: 15458, Anexo 2). Ninguno de los 20 individuos sin enfermedad tomados como control presentó cualquiera de estos cambios.

Además de estas variantes con cambio de sentido, también pudimos identificar el cambio g.67580C>A (intrón 3) en la muestra procedente de un paciente con MFI (i: 9606; c: 27238), que no parecía tener efectos sobre el *splicing* en un análisis *in silico* mediante la herramienta HSF. De la misma manera también detectamos tres SNPs ya descritos en intrones, para los cuales no pudimos realizar el análisis estadístico de los resultados debido a que no fuimos capaces de diferenciar ambos grupos de homocigotos. Sin embargo, al menos en el caso de rs67283560 y rs2511854, las frecuencias de heterocigotos observadas en el grupo de pacientes no diferían de las del grupo control. En el caso de rs2510152, al encontrarse en uno de los extremos del fragmento, no fue posible diferenciar claramente los perfiles correspondientes a cada genotipo, por lo que no pudimos realizar su genotipado completo. Sin embargo, se encontraba en un intrón (el 7) y tampoco presentaba ningún posible efecto sobre el *splicing*.

Los datos publicados hasta la fecha indican que las enfermedades que presentan una mayor frecuencia de mutaciones en C-CBL son los SMD/NMPs (LMMC, LMMJ) y la LMA secundaria, con frecuencias de 2-22%, 5-33% y 1-33%, respectivamente (Sargin *et al*, 2007; Caligiuri *et al*, 2007; Abbas *et al*, 2008; Reindl *et al*, 2008; Dunbar *et al*, 2008; Grand *et al*, 2009; Sanada *et al*, 2009; Loh *et al*, 2009; Makishima *et al*, 2009; Muramatsu *et al*, 2010; Kohlman *et al*, 2010; Pérez *et al*, 2010; Matsuda *et al*, 2010; Fernandes *et al*, 2010). En total, nosotros pudimos observar mutaciones en dos casos de 44 (4.5%) y ambos en NMPCs atípicas (de un total de 21, 9.5%), superior a la publicada con anterioridad (1%, 1/96, Grand *et al*, 2009). Uno de estos pacientes fue posteriormente reclasificado en LMMC. Hemos de tener en cuenta que en muchas situaciones es difícil la diferenciación entre ambos tipos de patologías, ya que las NMPC atípicas muestran rasgos semejantes a los SMD/NMPs. Ninguno de estos pacientes presentaba mutaciones en *FLT3* o *JAK2* ni alteraciones citogenéticas como deleciones 20q o ganancias en 9p, lo que concuerda con lo publicado por otros grupos.

Es destacable la existencia de una de estas mutaciones en el exón 12, codificante del dominio rico en prolina. En este dominio no se habían encontrado mutaciones en C-CBL de manera

previa a este análisis, ya que los datos publicados indicaban que las mutaciones se encontraban en los dominios *RING finger* y *linker region*. Este es el caso de la mutación p.C416W, que se encuentra en el dominio *RING finger* y afecta a una posición situada sólo 4 aminoácidos antes que la p.R420Q, por lo que cabría esperar que produjera un efecto similar.

El hecho de haber encontrado estas alteraciones nos llevó a analizar los exones 8 y 9 (dominio *RING finger*), así como el 12 (por la mutación p.A678V), en una serie ampliada de muestras. Esta serie estaba formada por 101 muestras V617FJAK2 negativas clásicas (PV, TE y MFI) y 232 muestras V617FJAK2 positivas clásicas (PV, TE y MFI) (**Anexo 9**). A pesar de que los estudios realizados por otros grupos sugerían que las mutaciones en *C-CBL* son excluyentes de la mutación V617FJAK2, decidimos comprobarlo. A su vez, puesto que se había descrito una delección en este gen en la línea celular MOLM-13 (Caligiuri *et al*, 2007) derivada de LMA humana, decidimos comprobar su estado en las líneas HEL, SET-2, UKE-1 y M07e.

En este segundo análisis encontramos tres cambios de secuencia. Dos de ellos afectaban de nuevo al dominio *RING finger* y el otro (en dos muestras de pacientes distintos) al dominio rico en prolina. El primero de ellos (g.71955_71955delA, exón 8), no descrito previamente, se detectó en un paciente con TE (i: 15291, c: 20149) (1/149, 0.7%) y daba lugar a la ruptura del marco de lectura a partir del aminoácido 402, con la formación de una proteína de secuencia diferente a partir de ese punto y truncada en el codón 430 (p.T402HfsX29). Esta proteína presentaría un dominio *RING finger* alterado pero también carecería de los dominios rico en prolina y UBA, además de las tirosinas de la región C-terminal necesarias para la activación de C-CBL. El segundo cambio, (g.72253C>G, exón 8) fue detectado en un paciente con MFI (i: 11163, c: 13855) (1/14; 7.1%). Este cambio provoca la sustitución p.P417R, afectando a la posición contigua a la mutación observada en la serie anterior (p.C416W) y ha sido recientemente descrito en un paciente con LMMJ (Matsuda *et al*, 2010). Ninguno de estos cambios se detectó en los controles sin enfermedad. La última alteración (g.81655C>G, exón 12), se detectó de manera recurrente en dos pacientes, uno con PV (i: 15229; c: 20051) (1/69, 1.5%) y otro con TE (i: 10227; c: 12462) (1/149, 0.7%). Este cambio afecta de nuevo al dominio rico en prolina (p.S675C), tres aminoácidos antes que la mutación detectada en la serie anterior. Su recurrencia nos hizo pensar que podría tratarse de un polimorfismo poblacional no descrito, pero el análisis de un total de 220 muestras de individuos control sin enfermedad para este exón no identificó dicho cambio en ninguno de ellos.

Es destacable el hecho de que los cuatro cambios descritos en este segundo análisis se detectaran en pacientes con los tres tipos de NMPCs clásicas estudiadas (PV, TE y MFI) y además, en casos positivos para la mutación V617FJAK2. Globalmente, la frecuencia observada de mutaciones en *C-CBL* en nuestras series es de 1.4% en los pacientes sin

V617F/JAK2 (2/145) y de 1.7% en los pacientes con V617F/JAK2 (4/232). Esto es, la frecuencia de alteraciones en este gen en ambos tipos de pacientes es similar, algo no observado previamente. A su vez, en el caso de los pacientes negativos para la V617F, las mutaciones en C-CBL se observan en pacientes con NMPC atípicas y no en pacientes con NMPCs clásicas. No se dispuso de muestras de pacientes con NMPCs atípicas positivos para la V617F/JAK2 (de frecuencia muy baja). Estudios realizados previamente sí mostraban la existencia de mutaciones en este gen en casos de MFI V617F/JAK2 negativas, con frecuencias de entre el 1-7% (ver Tabla 2) (Dunbar *et al*, 2008; Grand *et al*, 2009).

El estudio más semejante al nuestro publicado es el de Grand y colaboradores (Grand *et al*, 2009), que analizaron un grupo de 151 NMPCs clásicas (74 PV, 53 MFI y 24 TE) y 165 NMPCs atípicas (60 MS, 96 HES/CEL y 9 LNC), todas ellas V617F/JAK2 negativas. Únicamente encontraron mutaciones en C-CBL en 3 NMPCs clásicas (3/53 MFI, 6%) y en una NMPC atípica (1/96 HES/CEL; 1%). Por tanto, a pesar de que este estudio únicamente se realizó en muestras JAK2 negativas, sus frecuencias son similares a las nuestras.

Las mutaciones encontradas en el dominio *RING finger* se encontraron en posiciones de secuencia muy conservadas (**Figura 3A**). Debido a su similitud con mutaciones encontradas en otros análisis, eran firmes candidatas a afectar a la función de C-CBL, ya que este dominio debe encontrarse intacto (Thien & Langdon, 2005). Sin embargo, no se habían descrito hasta la fecha mutaciones en el dominio rico en prolina, que afectan también a posiciones muy conservadas (**Figura 3B**).

Por otro lado, no detectamos ninguna deleción del exón 8 o parte de él. Estas alteraciones, en especial la que afecta a las posiciones 366 a 409 (p.E366_Q409del), se han detectado principalmente en casos de SMD, SMD/NMP y LMA secundarias (Caligiuri *et al*, 2007; Abbas *et al*, 2008; Slape *et al*, 2008; Reindl *et al*, 2008, Makishima *et al*, 2009; Muramatsu *et al*, 2010; Loh *et al*, 2010; Fernandes *et al*, 2010; Matsuda *et al*, 2010; Rocquain *et al*, 2010) pero no en NMPCs. Esto parece confirmar la idea de que el patrón mutacional de C-CBL es distinto en las diferentes enfermedades. En el caso de las NMPCs clásicas y LMA serían más frecuentes las sustituciones en el dominio *RING finger* (Sargin *et al*, 2007; Dunbar *et al*, 2008; Grand *et al*, 2009). Por otro lado, las alteraciones en la región *linker* (Y371) estarían asociadas a enfermedades como la LMMJ (Loh *et al*, 2009; Makishima *et al*, 2009; Pérez *et al*, 2010). De hecho, ciertos estudios en LMMJ describen el *síndrome CBL* (Pérez *et al*, 2010), para referirse a los casos con mutaciones de C-CBL en homocigosis que no presentan otras alteraciones típicas de esta enfermedad (como mutaciones en los genes *RAS*, *NF1*, *PTPN11*, etc). Estos pacientes muestran características fenotípicas propias y comunes entre ellos.

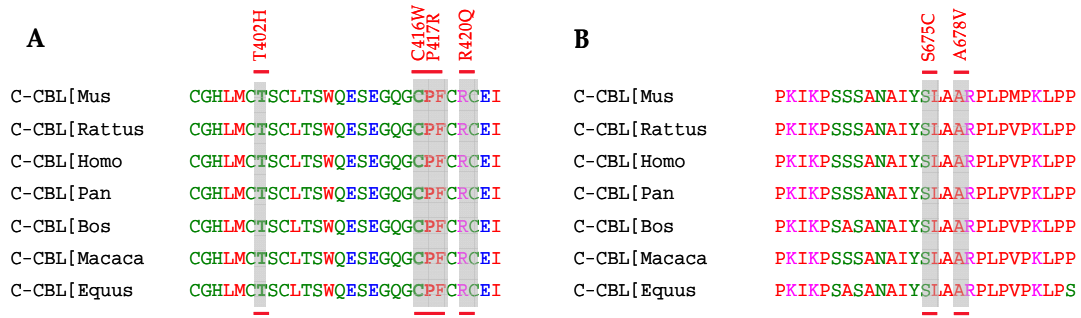


Figura 3. A) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos correspondiente a parte del dominio *RING finger* en diversas especies de mamíferos. Como puede observarse, esta región se encuentra muy conservada, lo que indica una importancia funcional. Los aminoácidos T402, C416 y P417 se encuentran conservados en todas las especies, como el R420 (p.R420Q, Sargin *et al*, 2007). B) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos correspondiente a parte del dominio rico en prolina. También esta región se encuentra conservada y las posiciones S675 y A678 son iguales en todas las especies.

C-CBL también se encuentra mutado en otro tipo de tumores. Un estudio realizado recientemente en pacientes con un tipo de cáncer de pulmón ha detectado que el 22% (8/37) de los pacientes presentaban pérdida de heterocigosidad en 11q, identificando 8 mutaciones en este gen en pacientes de diversos orígenes raciales. Estas mutaciones se distribuían en las regiones TKB, *RING finger*, dominio rico en prolina y extremo C-terminal, por lo que podrían contribuir al potencial patogénico de *EGFR* en cáncer de pulmón, haciendo aumentar significativamente la viabilidad y motilidad celular (Tan *et al*, 2010).

Tanto *C-CBL* como *CBL-B* se han visto implicados también en cáncer de estómago aunque por sobreexpresión, hecho que se ha relacionado con la progresión del tumor y su capacidad invasiva (Dong *et al*, 2010). Por último, y aunque no se trate de una neoplasia, se han descubierto mutaciones en los dominios *linker* y *RING finger* asociadas con un fenotipo similar al síndrome de Noonan. Este síndrome está caracterizado por dismorfismo facial, enfermedades cardíacas, crecimiento reducido, deficiencias cognitivas, anormalidades del ectodermo y musculoesqueleto, y aumento del riesgo a desarrollar otras enfermedades. Al parecer, esta enfermedad está causada por la pérdida de la regulación de la señalización mediada por la vía MAPK, que podría explicarse por la aparición de mutaciones inactivantes de *C-CBL* (Martinelli *et al*, 2010).

3.1.2 *CBL-B* y *CBL-C*

En el análisis mutacional del gen *CBL-B* identificamos 12 variantes de secuencia, diez de las cuales eran polimorfismos descritos previamente. En los casos en los que fue posible el análisis de distribución de las frecuencias alélicas o genotípicas de estos SNPs, no observamos

diferencias entre los grupos de pacientes y controles. En los casos en los que no fue posible diferenciar ambos tipos de homocigotos, tampoco se observaron diferencias en la frecuencia de heterocigotos en ambos grupos. Las dos variantes de secuencia no descritas previamente fueron la g.93068A>C, identificada en una MFI y la g.128853C>A, en una NMPCa. Ninguna de ellas tenía efectos en la traducción ni en el *splicing* mediante análisis *in silico*.

Estudios semejantes al nuestro han descrito mutaciones de este gen en casos de LMA secundaria (Caligiuri *et al*, 2007, Makishima *et al*, 2009) con una baja frecuencia (4/442, 0.9%) (Makishima *et al*, 2009). Hasta la fecha, se conoce que CBL-B actúa también como E3-ubiquitina ligasa en numerosas vías de señalización (Ettenberg *et al*, 2001; Adams *et al*, 2010; Qu *et al*, 2010), entre las que destaca la mediada por TCR en la respuesta inmune (Elly *et al*, 1999; Paolino & Penninger, 2010). Los estudios *in vivo* muestran que los ratones *Cbl-b*^{-/-} presentan reacciones autoinmunes severas por la activación anormal de las células T (Bachmaier *et al*, 2000; Chiang *et al*, 2000) y desarrollan enfermedades autoinmunes con una señalización ineficaz a través del TCR. Se han descrito mutaciones de este gen (alguna inactivante) en pacientes con diabetes en Japón (Yokoi *et al*, 2008) y el SNP rs3772534 (p.A621A, exón 12) también se ha asociado al desarrollo de diabetes tipo 1 en la población danesa (Berghold *et al*, 2005; Ryan *et al*, 2006). Un estudio reciente realizado sobre células tumorales CD8⁺ reactivas, ha demostrado que la disminución de CBL-B podría aumentar la eficacia de la inmunoterapia y permite un descenso en el desarrollo leucémico de ratones (Strommes *et al*, 2010) por disminución de la activación de linfocitos.

A pesar de que ninguno de nuestros 44 pacientes presentó mutaciones con cambio de sentido en *CBL-B*, la homología estructural y de función entre C-CBL y CBL-B nos llevó a analizar también este último gen en la serie ampliada de pacientes. Dado que no habíamos encontrado alteraciones en la serie inicial, únicamente se analizaron los exones 9 y 10 (codificantes del dominio *RING finger*) en la serie ampliada de pacientes y las líneas celulares mieloides. Este nuevo análisis mostró la presencia de dos mutaciones en el exón 10. Una de ellas (g.149452C>T), se detectó en un paciente con TE V617FJAK2 positivo (i: 17952; c:24465) sin efecto en la traducción (p.D450D) ni en el *splicing*. El segundo cambio (g.149486C>T) se detectó en un caso de PV V617FJAK2 positiva (i: 14626; c:19099) y daba lugar a la sustitución p.R462W. Este cambio no se había descrito previamente y afectaba a un residuo altamente conservado del dominio *RING finger* de CBLB (**Figura 4**). Su localización y el hecho de que afectara a una posición muy conservada hicieron que esta alteración (p.R462W) se incluyera en los análisis funcionales posteriores.

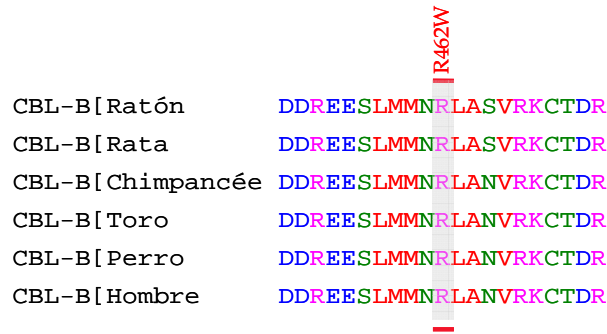


Figura 4. Alineamiento de las secuencias aminoácidas de CBL-B entre distintas especies de mamíferos (ratón, rata, chimpancé, toro y perro). La posición indicada en rojo (R462) corresponde a un residuo conservado entre todas ellas. En realidad toda la región está altamente conservada, lo que resaltaría su importancia funcional.

En cuanto a *CBL-C*, la función de la proteína que codifica en las células hematológicas se desconoce ya que parece que su expresión se encuentra restringida al tejido epitelial. Sin embargo, su homología con el resto de miembros de la familia ha llevado a algunos investigadores a analizar su dominio *RING finger* en neoplasias mieloides. Así, se ha encontrado que una variante del SNP rs3208856, situado en este dominio y no sinónimo (p.H405Y), se encuentra presente en el 7% de pacientes con neoplasias mieloides, frente a sólo 1% de la población normal (Makishima *et al*, 2009). Otro estudio relacionado ha identificado también otra variante polimórfica germinal rara (SNP rs66944506), que provoca un cambio en el marco de lectura en el 14.3% (7/49) de los pacientes con LMMJ (Muramatsu *et al*, 2010). Es curioso como, en el caso de este gen, existen varios polimorfismos en su dominio *RING finger* que o son no sinónimos (rs35457630, rs112128460 rs3208856 rs17852620, rs61750955, y rs116023028) o conducen a un cambio en el marco de lectura (rs112439822, rs66944506 y rs77920506). Este es un hecho poco frecuente.

Nuestro análisis inicial de toda la secuencia codificante de este gen identificó cinco polimorfismos, tres de ellos (rs35106910, rs35457630, rs3208856) con efecto en la traducción (p.K153T, p.E392K y p.H405Y, respectivamente), los dos últimos situados en el dominio *RING finger*. En ninguno de los casos las frecuencias alélicas y genotípicas detectadas fueron significativamente distintas en el grupo de pacientes y controles aunque se trataban de cambios poco frecuentes. Además, también se detectó la variante rs1903831 (g.16329A>C, intrón 8) para el que la herramienta *HSF* predecía la pérdida de un punto de ramificación del *splicing* pero cuyas frecuencias alélicas y genotípicas tampoco mostraron diferencias entre ambos grupos.

También detectamos dos cambios no descritos como polimorfismos. El primero fue una sustitución g.16354C>T en el exón 9 (dominio rico en prolina) y con efecto en la traducción

(p.P435S). Este cambio se detectó en 12% de las muestras de pacientes (5/43), pero también en el 10% de las muestras de los individuos sin enfermedad (2/20), por lo que parece una variante polimórfica no descrita. El otro cambio detectado fue una sustitución g.22619C>A en el intrón 10 que sólo se detectó en la muestra de un paciente con NMPCa (i: 13633; c: 17586). Según *HSE*, este cambio podría crear un nuevo sitio de ramificación en el *splicing*, pero el siguiente exón no es codificante.

La existencia de varios SNPs con efecto en la traducción en un dominio funcional tan importante nos llevó a analizar los exones 7 y 8 de *CBL-C* (dominio *RING finger*) en la serie ampliada de muestras de pacientes y líneas celulares. Este análisis identificó un cambio en el exón 8, correspondiente a una inserción de una citosina (g.15722dupC), detectado en un paciente con PV (i: 18670; c: 25616) positivo para la mutación V617JAK2 (1/101, 1%). Esta inserción provoca la ruptura del marco de lectura a partir del codón Q419, formándose una proteína con 81 aminoácidos distintos y 24 adicionales (p.Q419fsX81). Este cambio había sido descrito en una serie de LMMJ (Muramatsu *et al*, 2010) y no existen datos sobre frecuencias poblacionales en *dbSNP*. Ninguna de las muestras control sin enfermedad presentó dicho cambio.

Puesto que desconocíamos las consecuencias de las variantes encontradas en la funcionalidad del dominio *RING finger*, decidimos incluir los cambios p.E392K y p.Q419PfsX81 en nuestros ensayos funcionales. No se incluyó p.H405Y por estar descrita en *dbSNP* en el 5% de los individuos de ancestros europeos. Además, incluimos la variante poblacional detectada en nuestra serie en el dominio rico en prolina (p.P435S), no descrita previamente.

3.2 Análisis en modelos celulares de las mutaciones en los genes *Cbl*

La pérdida de función de C-CBL y de los mecanismos que regulan y controlan su actividad contribuye al desarrollo de enfermedades inmunológicas, debido a su papel en la señalización de los linfocitos B (Rao *et al*, 2001) y T (Thien & Langdon, 2001). Los estudios realizados *in vivo*, demuestran que los ratones *Cbl*^{-/-} desarrollan mastocitosis, síndrome mieloproliferativo y transformación a leucemia mieloide, acompañada de un agrandamiento del timo y esplenomegalia con hematopoyesis extramedular (Sanada *et al*, 2009; Bandi *et al*, 2009). Además, sus células madre hematopoyéticas aumentan de tamaño y muestran una hiperproliferación, mayor capacidad de repoblación celular e hipersensibilidad a la trombopoyetina y a otras citoquinas (Naramura *et al*, 2010), que se acompaña de un aumento de la fosforilación de STAT5 (Rathiman *et al*, 2008).

Los primeros estudios que analizaron el efecto de las mutaciones en el dominio *RING finger* en modelos *in vitro* sobre células 32D, observaron que las proteínas C-CBL mutadas eran incapaces de internalizar el receptor FLT3 por pérdida de su función ubiquitín ligasa, lo que daba lugar a un aumento en la proliferación celular. Estas mutaciones producirían la pérdida de la capacidad de C-CBL de unirse a las enzimas E2 conjugadas a ubiquitina, como la UbcH7 o la UbcH5B y haría que las C-CBL mutadas no pudieran transferir las moléculas de ubiquitina desde las proteínas E2 al sustrato correspondiente (ej. una RTK). Esto conduciría a una respuesta más prolongada a la estimulación con citoquinas y al consiguiente aumento en la proliferación celular que, a largo plazo, provocaría independencia a factores de crecimiento (Sargin *et al*, 2007). Según estos autores, para comprobar este efecto es necesario que las células sobreexpresen también una RTK, como KIT o FLT3 (Sargin *et al*, 2009; Reindl *et al*, 2008).

Las mutaciones de la región *linker* también han demostrado ser oncogénicas, ya que parece que esta región (y en especial la Y371) se encarga de mediar la activación de C-CBL. Como se ha comentado anteriormente, en estado basal esta región se encuentra plegada, haciendo que el dominio TKB se aproxime al *RING finger*, que queda oculto. La fosforilación de las tirosinas Y700, Y731 y Y744 y consiguiente activación de CBL, haría que esta región se desplegara, facilitando la unión del dominio TKB a determinadas tirosinas fosforiladas de la RTK que va a ser ubiquitinada. Por tanto, las mutaciones del dominio *linker* podrían impedir esta conformación desplegada y, por consiguiente, el reconocimiento del sustrato.

Todas estas mutaciones descritas hasta la fecha provocan la pérdida de función de la proteína, por lo que harían a C-CBL un supresor tumoral. Varios autores postulan que esta pérdida de función podría ser un requisito (aunque no suficiente) para la transformación leucémica. Sin embargo, la activación independiente de ligando de determinadas RTKs (EGFR o FLT3) no quedaría explicada por este modelo pero podría ser consecuencia de un efecto positivo pro-oncogénico de C-CBL, desenmascarado al perder su función E3 ubiquitín ligasa (Kales *et al*, 2010; Ogawa, 2010). Una posibilidad sería que las moléculas C-CBL mutadas ejercieran una función dominante negativa sobre las C-CBL no mutadas, impidiendo su función (Sanada *et al*, 2009; Ogawa *et al*, 2010). También es posible que los mutantes C-CBL fueran también capaces de inhibir la función de la actividad E3-ubiquitín ligasa de CBL-B, que se expresa en las células hematopoyéticas (Ogawa, 2010). Sin embargo, otra explicación está relacionada con su actividad como proteína reguladora positiva en algunas vías de señalización. A través de su región C-terminal, C-CBL es capaz de interactuar con diversas moléculas favoreciendo su activación. Por ejemplo, a través del dominio rico en prolina reconoce dominios SH3 de diversas proteínas de señalización, lo que le permite formar plataformas moleculares. A través de estas plataformas es capaz de reclutar moléculas adaptadoras implicadas en la degradación del receptor, como CIN85 y CD2AP, que se unen al dominio rico en prolina de C-CBL. De esta

manera, C-CBL permite que CIN85 se aproxime al receptor, donde forma un complejo con proteínas implicadas en las primeras fases de su endocitosis. Por tanto, además de ubiquitinar al receptor, C-CBL se encuentra implicado en la endocitosis del mismo (Schmidt & Dikic, 2005; Swaminathan & Tsygankov, 2006). Por otro lado, la Y731 (exclusiva de C-CBL) es capaz de reconocer dominios SH2 de, por ejemplo, la subunidad p85 de la PI3K (Thien & Langdon, 1997). Esto permite el acercamiento de esta molécula a la membrana plasmática, estimulando la señalización por esta vía PI3K-AKT. Esta función podría quedar enmascarada por su función reguladora negativa de otras vías, pero se haría evidente al perder la capacidad ubiquitin ligasa como consecuencia de una mutación. Además, esta última hipótesis explicaría la mayor frecuencia de mutaciones en C-CBL frente a CBL-B, el cual no presenta esta función reguladora positiva (Ogawa *et al*, 2010). Por lo tanto C-CBL puede tener una doble cara, como supresor tumoral y como protooncogén (Shannon & Loh, 2009; Ogawa, 2010).

Los ensayos de las mutaciones encontradas en nuestras series sobre modelos celulares fueron estudios de proliferación celular, en los que se transfieren los vectores con la mutación a un grupo de células y con la secuencia normal a otro. La diferencia en la proliferación de ambos grupos celulares nos indicaría el potencial patogénico de estas alteraciones. En el caso de C-CBL se dispuso como control positivo la mutación p.R420Q, sobre la cual había datos publicados que la describían como patogénica, que nos permitió validar nuestro modelo y poder así comparar los resultados que obteníamos con el resto de cambios de secuencia. Debido a que este tipo de ensayos no habían sido realizados con anterioridad en nuestro Departamento, fue necesario optimizar y validar cada una de las condiciones y etapas del proceso.

3.2.1 Efecto de las mutaciones de C-CBL sobre líneas celulares humanas

La mayor parte de estudios funcionales publicados sobre las mutaciones de C-CBL se habían realizado sobre líneas celulares murinas, como la 32D. Sin embargo, creímos que podría ser interesante analizar el efecto de los mutantes de la familia Cbl en líneas celulares humanas, por varias razones. Por un lado, no sería necesario introducir vectores de expresión de ubiquitina humana ni, quizá, *FLT3*. Por otro lado, disponíamos de líneas celulares positivas para la mutación V617F/*JAK2*, por lo que reproducirían el modelo neoplásico de algunos de los pacientes en los que se encontraron mutaciones, y podríamos comparar el efecto con los resultados en las líneas negativas para la mutación de *JAK2*. Como modelo de leucemia humana sin la mutación V617F/*JAK2* seleccionamos la línea celular M07e, dependiente de IL3h, que originalmente fue aislada de un paciente con leucemia megacarioblástica aguda (LMA-M7). Como modelo con la mutación V617F/*JAK2* seleccionamos la línea celular HEL,

originalmente aislada de un paciente con eritroleucemia (LMA-M6). Ambas líneas celulares presentaban un crecimiento en suspensión.

Los primeros ensayos los realizamos sin introducir previamente *FLT3*, aunque sí añadimos su ligando al medio de cultivo para favorecer su expresión. Sin embargo, los resultados indicaban que no se producía un aumento en el crecimiento de las células, ni con *CBL R420Q* ni con *CBL WT*. Ni siquiera las células control con el vector pmaxGFP presentaban evidencias de proliferación, es decir, las células morían tras la nucleofección.

En el caso de las células M07e, cuando repetimos estos experimentos transfectando previamente *FLT3* tampoco observamos crecimiento. Esto se debía probablemente a dos factores. Por un lado, esta línea celular presenta un tiempo de división muy largo en comparación con el de las células 32D (40 h frente a 15 h), por lo que no es de extrañar que el efecto inducido en el crecimiento (si lo hay) no sea inmediato. Pero además comprobamos como la viabilidad celular (porcentaje de células vivas) obtenida tras cada nucleofección era muy baja (del orden de 30-40%), por lo que es posible que estas células no puedan recuperarse de manera adecuada tras la introducción de los distintos vectores. De hecho, revisando la bibliografía observamos que esta línea celular no suele utilizarse en este tipo de ensayos.

En el caso de las células HEL, sí que pudimos observar crecimiento tras la transfección de *FLT3*. Sin embargo, este crecimiento era muy lento, ya que se observaba al cabo de una semana de realizar los ensayos MTS. Esto puede ser debido a las mismas razones que en el caso de las células M07e. Por un lado, presentan un tiempo de división de 36 h y por otro, la viabilidad alcanzada tras la nucleofección es del 60%. Dado que el efecto observado era demasiado tardío como para poder asegurar que se debía al efecto de los vectores introducidos, decidimos concentrar nuestros esfuerzos en los ensayos con células 32D. Es interesante destacar el caso de la mutación p.C416W que, como puede observarse en la figura 25D de *Resultados*, promueve un aumento en el crecimiento con respecto al *WT* en el cuarto día de medida. Sin embargo, estos resultados no pudieron replicarse.

Por lo tanto, parece que estas líneas celulares no constituyen buenos modelos para comprobar el efecto de las mutaciones en este tipo de genes. Por un lado, su tiempo de división es alto, pero además, la eficiencia de nucleofección no es elevada (son necesarias al menos dos, para *FLT3* y para *C-CBL*) y las alteraciones en *C-CBL* no presentan un potencial oncogénico lo suficientemente grande como para provocar cambios muy importantes en el fenotipo celular.

3.2.2 Efecto de las mutaciones de C-CBL sobre la línea murina 32D

La línea celular murina 32D es una línea celular de fenotipo mieloblástico derivada de médula ósea que crece en suspensión dependiente de factores de crecimiento externos (IL3m). Presenta dos características importantes que le hace ser un buen modelo celular en los ensayos que se pretenden realizar: un tiempo de división corto (15 h) y una eficiencia de nucleofección elevada (cerca al 80%) con la tecnología que empleamos. Ambos hechos permiten observar en un tiempo relativamente pequeño el efecto inducido por las mutaciones, en caso de que éstas induzcan un aumento de proliferación.

Como se ha señalado, de manera previa fue necesario introducir *FLT3*, ya que el producto de *C-CBL* sin mutación debería controlar el crecimiento inducido por la sobreexpresión de *FLT3* (Sargin *et al*, 2007; Rathiman *et al*, 2010). Esto se realizó de manera previa en todos los casos, tras lo cual las células se mantuvieron en cultivo en medio completo con G418 hasta que el número de células fue suficiente como para introducir los distintos vectores de *C-CBL* (*WT* y mutantes) (generalmente una semana) que se introdujeron de manera simultánea a los vectores de ubiquitina humana (*UBI*). En todos los casos los ensayos se repitieron varias veces, con objeto de validar los resultados. Además, se incluyeron como controles células sometidas a nucleofección pero sin añadir vector *CBL* y células nucleofectadas con el plásmido control pmaxGFP. En todos los casos, el número de células y cantidad de vector fue el mismo, de manera que no obtuviéramos diferencias debidas a una mayor o menor cantidad de células ni de vector de partida en los distintos grupos de células.

3.2.2.1 Mutaciones en el dominio RING finger

Para hacernos una idea del efecto en la proliferación de los mutantes de *C-CBL*, en primer lugar determinamos el efecto que inducía la mutación control (p.R420Q) en las células 32D(*FLT3*) frente a las células 32(*FLT3*) con *CBL WT*. Para asegurarnos de que la nucleofección había sido efectiva y de que las células expresaban el vector, se esperó 24 h para comenzar las medidas de proliferación mediante MTS. Posteriormente comprobamos que, si este tipo de ensayos se comenzaban 48 h más tarde, los resultados eran mejores ya que se disminuía el número de células muertas. En todos los ensayos de proliferación, el número de células colocadas en cada pocillo fue el mismo (10.000 células por pocillo resuspendidas en 100 μ L de medio).

Los primeros resultados comparando los efectos de *CBL R420Q* y *CBL WT* fueron satisfactorios, ya que a partir del día 3 se podía observar un mayor crecimiento en las células transfectadas con el vector mutante (Figura 27A de *Resultados*), con una absorbancia a 492 nm

en el día 4 de 1,43, frente al valor 0,72 de las células con *CBL WT*. Esta diferencia de absorbancia correspondía a una diferencia significativa (prueba *t de Student* 1 cola, $p=0,034$) en el número de células. Así, en el día 4, el número de células medio del grupo *CBL R420Q* es 2,45 veces mayor al de las células del grupo *CBL WT* (Figura 28 de *Resultados*). Este resultado confirma que, en nuestras condiciones del ensayo, la mutación p.R420Q induce una hiperreactividad de esta línea celular a factores de crecimiento como IL3 murina y FLT3L humano, produciendo un aumento en la proliferación significativamente mayor. Para asegurarnos de que la reproducibilidad de los resultados, este experimento se repitió tres veces más. Teniendo en cuenta los cuatro ensayos distintos, comprobamos como la tasa de proliferación o crecimiento observado con las células con *CBL WT* de 0,42, significativamente distinto del 1,11 observado en las células con *CBL R420Q* (prueba *t de Student* 1 cola, $p=0,04$) (Figura 29A de *Resultados*). Esto supone un crecimiento 2,76 veces mayor en las células transfectadas con el vector mutante control con respecto a las transfectadas con el mutante *CBL WT* (Figura 30 de *Resultados*).

Este mismo ensayo se repitió con el resto de las alteraciones que habíamos encontrado en este dominio *RING finger* en nuestros análisis. En principio, cabría esperar que este tipo de alteraciones indujeran un efecto similar al observado para la p.R420Q. Sin embargo, los datos publicados hasta el momento indican que no todas las mutaciones descritas en esta región inducen una mayor respuesta a citoquinas (Grand *et al*, 2009; Ogawa *et al*, 2010), probablemente porque no todos los aminoácidos que componen el dominio *RING finger* están implicados de manera directa en la interacción con la enzima E2 conjugada a ubiquitina. En nuestro caso, todas las mutaciones encontradas afectaban a aminoácidos conservados en especies relacionadas (T402, C416 y P417, figura 3).

Si agrupamos las medidas de MTS de cuatro nucleofecciones distintas para cada una de las mutaciones (p.C416W, p.P417R y p.T402H, Figura 27 de *Resultados*), se puede observar como en el día 3 la absorbancia máxima alcanzada en todos los casos por las células con los vectores mutantes es prácticamente el doble (1,92, 1,90 y 2,02, respectivamente) que la absorbancia máxima de las células con el vector *CBL WT*, lo que supone diferencias estadísticamente muy significativas (prueba *t de Student* 1 cola, $p=0,003$, $p= 0,003$ y $p=0,001$, respectivamente) en cuanto al número de células (Figura 28 de *Resultados*). Esta absorbancia máximar es semejante a la alcanzada con la mutación control, pero observado un día antes. En el caso de la mutación p.T420HfsX29, la diferencia en el número de células observado en el tercer día en comparación a las *CBL WT* es incluso mayor a la de la mutación p.R420Q (2,7 veces más de células que en *CBL WT*).

Si, al igual que en el caso de la p.R420Q, analizamos la tasa de crecimiento observada para los mutantes (p.C416W, p.P417R y p.T402HfsX29) (Figura 29 de *Resultados*), comprobamos como ésta es significativamente superior a la de las células con el vector *WT* (prueba *t de Student* 1 cola, $p=0,023$, $p=0,003$, $p<0,001$, respectivamente). Estas tasas de proliferación corresponden a un crecimiento 3,12, 2,74 y 3,31 veces mayor con respecto a las células con *CBL WT*, respectivamente (Figura 30 de *Resultados*), lo que supone valores superiores a los observados con la p.R420Q para las mutaciones p.T402HfsX29 y p.C416W.

Estos resultados permiten concluir que las tres mutaciones encontradas en el dominio *RING finger* de C-CBL, dos ellas detectadas en pacientes positivos para la mutación V617F/JAK2 (p.P417R y p.T402HfsX29) y una (p.C416W) en un paciente negativo, inducen la proliferación celular y provocan hipersensibilidad a factores de crecimiento de manera semejante o superior a los efectos producidos por la mutación p.R420Q. Sin embargo, serían necesarios análisis de *western-blot* para determinar si estos efectos son debidos a una pérdida de función del dominio *RING finger* que diera lugar una disminución de la capacidad de ubiquitinación.

3.2.2.2 Mutaciones en el dominio rico en prolina

A pesar de que la función del dominio rico en prolina no está muy clara, sí parece fundamental para la función adaptadora y reguladora positiva de C-CBL, reconociendo otras proteínas implicadas en la señalización con dominios SH3. Además, parece que media las interacciones con proteínas adaptadoras que favorecen el reconocimiento de los sustratos (ej. Grb2). Dado que también es un dominio altamente conservado, los cambios en la secuencia de aminoácidos podrían provocar cambios conformacionales que alteraran la función de la proteína. Esta hipótesis nos llevó a incluir las mutaciones p.A678V y p.S675C en los ensayos de proliferación y viabilidad celular con la línea celular 32D, a la que previamente se le había introducido también *FLT3*, como en los casos anteriores. En este caso no se disponía de una mutación control que afectara a este dominio ya que no se han descrito alteraciones en él en neoplasias mieloides, por lo que de nuevo se tomó como referencia los resultados obtenidos con el mutante p.R420Q.

Los resultados indicaron que en el tercer día de los ensayos MTS, las medidas de absorbancia a 492 nm de las células a las que se había introducido los vectores mutantes, eran claramente superiores a las obtenidas en las células con *CBL WT*. Estos ensayos se realizaron cuatro veces, obteniendo resultados similares en todos ellos (ver Figura 31 de *Resultados*). La absorbancia máxima media observada a las 72 h en las células mutantes con *CBL S675C* y *CBL A678V*, era 1,87 y 2,2 veces mayor que la absorbancia máxima media de las células con *CBL WT*, respectivamente. Esta diferencia de absorbancia obtenida ya en el tercer día de medida,

supone diferencias altamente significativas con respecto al grupo WT (prueba *t de Student* 1 cola, $p < 0,001$ en ambos casos) en cuanto en el número de células correspondiente (ver Figura 32 de *Resultados*). De hecho, supone una cantidad de células 2,43 (p.S675C) y 2,92 (p.A678V) veces mayor en el grupo mutante que en el WT. El cociente obtenido con el mutante p.A678V fue el mayor de todos los observados. De nuevo calculamos la tasa de crecimiento observada con cada uno de los vectores mutantes, frente a la observada en células con *CBL WT* (figura 33A y B de *Resultados*). En todos los ensayos la tasa de crecimiento inducida por ambas mutaciones presentó una diferencia muy significativa frente a la tasa observada en las células con *CBL WT* (prueba *t de Student* 1 cola, $p < 0,001$ para *CBL S675C* y $p = 0,001$ para *CBL A678V*). El cociente del crecimiento medio observado en las células con *CBL A675C* y *CBL A678V* frente a las *CBL WT* fue de 3,25 y 3,80 veces, valores superiores a los obtenidos con la mutación control p.R420Q (2,76) (ver Figura 33C de *Resultados*).

Estos resultados concuerdan con los datos del conteo celular realizado en la cámara de *Neubauer* tras la aplicación del azul tripan. A pesar de que este método de conteo celular es mucho menos sensible que el MTS (ver apartado 3.5 de *Material y Métodos*), lo llevamos a cabo de manera simultánea para comprobar que efectivamente los ensayos de proliferación estaban siendo realizados adecuadamente. Como se puede observar en la figura 34 de *Resultados*, todos los mutantes presentaron un aumento en el número de células entre las 24 y 72 h del comienzo del MTS, a diferencia del WT, cuyo aumento fue muy inferior .

En resumen, parece evidente que ambos tipos de mutaciones, las presentes en el dominio *RING finger* y las presentes en el dominio rico en prolina, inducen un aumento significativo de la proliferación en el modelo 32D(FLT3) en presencia de factores de crecimiento, confiriendo a las células hipersensibilidad a éstos. Nuestros resultados contrastan con la idea de que el dominio rico en prolina no tiene un papel fundamental para la función reguladora de C-CBL. Sin embargo, para que ésta actúe adecuadamente debe interactuar con otras moléculas de señalización. Para ello, tanto el dominio rico en prolina (por unión a proteínas adaptadoras con dominios SH3) como la región más C-terminal (a través de la cual realiza funciones reguladoras de las TKs citoplasmáticas), parecen regiones fundamentales para la correcta actividad de C-CBL.

3.2.2.3 Independencia a factores de crecimiento

Los resultados obtenidos demuestran que todas las mutaciones encontradas en *C-CBL* en la serie de pacientes analizados inducen una hipersensibilidad a citoquinas. Sin embargo, no demuestran su capacidad transformante, esto es, que sean capaces de inducir crecimiento celular en ausencia de factores de crecimiento en una línea celular dependiente de ellos (como son las células 32D con la IL3). Este hecho se ha publicado en algunas de las mutaciones (como p.R420Q, p.Y371H y p.H398Y) (Sargin *et al*, 2007, Grand *et al*, 2009) pero no en todas. Algunos estudios simplemente determinan si se induce o no una mayor respuesta, como es nuestro caso, demostrando que la señalización celular desencadenada por los receptores de estas citoquinas es más prolongada debido a la pérdida de actividad de un regulador como *C-CBL*, que sería incapaz de regular el proceso y terminar la señalización.

Una de las mutaciones en las cuales se ha demostrado que tiene la capacidad de inducir independencia a factores de crecimiento es la p.R420Q, utilizada por nosotros como mutación control (Sargin *et al*, 2007). Por ello, empleando también este control realizamos los ensayos anteriores eliminando del medio de cultivo los factores de crecimiento (IL3 y FLT3L).

La prueba inicial demostró que las células con *CBL WT* morían rápidamente y las células con *CBL C416W*, *T402H*, *S675C*, *A678V*, y el control *CBL R420Q* se mantenían en crecimiento, aunque no muy acusado. Por el contrario, las células con *CBL P417R* mostraron un comportamiento semejante a las *CBL WT* (figura 36 de *Resultados*), a pesar de que en los resultados de proliferación anteriores no lo había hecho. Estos resultados mostraban que las mutaciones p.C416W, p.S675C, p.A678V y, en menor medida, el p.T402HfsX29, inducían a las células 32D(FLT3) un crecimiento independiente de factores de crecimiento, ya que no mueren durante los tres días del ensayo, como hacen las *WT*. Por el contrario, la mutación p.P417R no era capaz de producir este efecto. Es interesante observar como el crecimiento observado en este ensayo con las mutaciones del dominio rico en prolina (p.S675C y p.A678V) fue superior al observado con la mutación p.R420Q control. La mutación de mayor poder transformante fue la p.C416W, detectada en un paciente sin la V617F/JAK2. Cabe recordar que esta mutación fue la que mayor respuesta obtuvo en el modelo celular HEL.

Sin embargo, estos resultados no fueron reproducibles. En algunos casos, tras la nucleofección de *FLT3*, las células se volvieron independientes a IL3. En otros casos, ambos tipos de células morían en el primer día de ensayo. Es importante destacar que, en todos estos casos, los distintos mutantes se comportaron de igual manera al control *CBL R420Q*. A pesar de ello, la no reproducibilidad de nuestros resultados no nos permite concluir que estas alteraciones tengan capacidad transformante. Hará falta un nuevo diseño del experimento para poder realizar esta comprobación.

3.2.3 Efecto de los mutantes *CBL-B* y *C* sobre la línea murina 32D

Puesto que los ensayos realizados con las mutaciones en *C-CBL* en las líneas celulares humanas no habían sido satisfactorios, decidimos analizar el efecto de las mutaciones en *CBL-B* y *CBL-C* únicamente en la línea celular 32D. De nuevo, para estos experimentos se emplearon células 32D a las que previamente se introdujo *FLT3* y, simultáneamente a los vectores *CBL*, el vector de la ubiquitina humana.

3.2.3.1 Mutaciones en *CBL-B*

Los datos recogidos en la bibliografía indican que *CBL-B* presenta una función reguladora importante en las células hematológicas. Sin embargo, la frecuencia de mutaciones observadas en este gen es muy inferior al de la frecuencia observada en *C-CBL*. Además, no se han realizado ensayos funcionales *in vitro* sobre líneas celulares que expliquen sus posibles efectos. Dado que el cambio que detectamos p.R462W se encontraba en una secuencia altamente conservada del dominio *RING finger* de *CBL-B*, realizamos ensayos similares a los realizados para *C-CBL*.

Los resultados obtenidos tampoco fueron reproducibles en este caso (figuras 38 y 39 de *Resultados*). En dos ocasiones el crecimiento inducido por el vector *CBLB R462W* fue superior al inducido por *CBLB WT* pero en otras tres no, no obteniendo diferencias significativas (prueba *t de Student* de 1 cola, $p=0,192$). Por ello, no podemos afirmar que esta mutación induzca una hipersensibilidad o un aumento de respuesta a citoquinas como es el caso de las mutaciones en el mismo dominio funcional de *CBL-B*.

Estos resultados pueden deberse o bien a que efectivamente no se trate de una mutación implicada en el proceso neoplásico, a que la pérdida de la función de *CBL-B* no sea importante o bien a que el modelo celular de análisis no sea el adecuado para observar su efecto. A diferencia de *C-CBL*, *CBL-B* parece que carece del efecto regulador positivo de carácter protooncogénico (Thien & Langdon, 2001; Ogawa, 2010) por lo que quizá la simple pérdida de su función no sea suficiente para conferir una ventaja proliferativa a la célula.

3.2.3.2 Mutaciones en *CBL-C*

De la misma manera que en *CBL-B*, no se han publicado ensayos funcionales con mutaciones de este gen, por lo que basamos nuestros ensayos en los realizados con *C-CBL*. Así, comparamos los resultados obtenidos con las células transfectadas con los vectores *CBLC E392K*, *Q419P* y *P435S* frente a las células transfectadas con *CBLC WT*.

En el caso de *CBL-C*, ninguno de los tres cambios analizados demostró inducir una diferencia en el crecimiento de las 32D con respecto al *CBLC WT* (figuras 40 y 41 de *Resultados*, *t de Student* de 1 cola, $p > 0,05$ en todos los casos). La tasa de crecimiento obtenida con los tres vectores mutantes fue muy similar e incluso algo inferior a la tasa de crecimiento observada con *CBLC WT*. Sin embargo, también se puede comprobar como las células transfectadas con los vectores *CBLC WT* y *CBLC mutantes* siempre presentan una tasa de crecimiento mayor a la obtenida en experimentos anteriores con el *CBL WT*. Esto lleva a pensar que en realidad, el *CBL-C* introducido en las células no está ejerciendo una función reguladora del crecimiento inducido por la sobreexpresión de *FLT3* en nuestro modelo, por lo que sería difícil ver el efecto inverso.

Estos resultados eran esperables, en parte, por dos razones. En primer lugar, se conoce que *CBL-C* no tiene la misma función reguladora que *C-CBL* y *CBL-B* en las células hematológicas. En segundo lugar, a pesar de que los cambios analizados se encontraban en dominios importantes de la proteína, son variantes tipo SNP descritas, aunque se desconozcan sus efectos a nivel fisiológico. A pesar de esto, los resultados no descartan que, en el modelo adecuado, estas variantes tengan algún tipo de efecto sobre la señalización intracelular, por ejemplo sobre líneas celulares de fibroblastos como la NIH-3T3 (Scaife *et al*, 2003; Teckchandani *et al*, 2005).

A pesar de las hipótesis iniciales de que la causa molecular de la mayor parte de las NMPCs debían ser alteraciones en genes codificantes de TKs como *BCR-ABL1* o la mutación V617F de *JAK2*, éste y otros estudios demuestran que no es así. No se han encontrado alteraciones recurrentes de tipo reordenamientos cromosómicos crípticos, mutaciones puntuales o sobreexpresión de los genes pertenecientes a las familias de TKs analizadas. Tampoco hemos encontrado alteraciones en *EGFR*, frecuentemente alterado en cáncer de pulmón y otros tumores sólidos y frente al cual hay diseñados fármacos específicos. Además, a pesar de que no era uno de los objetivos iniciales del presente Proyecto, tampoco se ha encontrado una tendencia a la asociación entre diversos polimorfismos en estos genes y el desarrollo de la enfermedad.

El descubrimiento en 2005 de la mutación V617F en *JAK2* abrió grandes expectativas sobre la patogénesis molecular de las NMPCs que no presentaban la fusión *BCR-ABL1* y la mejora en el diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades. Desde el principio surgió la duda de por qué una misma alteración molecular podía causar fenotipos distintos. Algunos autores han postulado que el desarrollo de un tipo u otro de NMPC depende de la carga alélica mutada. Una mayor proporción de alelos mutantes conduciría a PV y favorecería un fenotipo eritroide, mientras que una menor carga alélica mutada conduciría a un fenotipo megacariocítico (Bumm *et al*, 2006; Lacout *et al*, 2006; Wernig *et al*, 2006; Zaleskas *et al*, 2006; Levine *et al*, 2007; Shide *et al*, 2008; Tiedt *et al*, 2008; Xiang *et al*, 2008; Levine & Gilliland 2008; Tefferi, 2010). También se ha propuesto que el fenotipo final podría estar condicionado por la presencia de ciertas variantes genéticas en la línea germinal que conducirían a una mayor predisposición a desarrollar un tipo u otro de enfermedad. La existencia de este tipo de variantes en *JAK2*, como el haplotipo 46/1 se ha descrito asociado a la mayor presencia de la mutación somática V617F en este gen (Pardanani *et al*, 2008; Jones *et al*, 2009; Kilpivaara *et al*, 2009; Olcaydu *et al*, 2009; Olcaydu *et al*, 2009b; Pardanani *et al*, 2010; Jones *et al*, 2010). Pero otra posibilidad es que el fenotipo esté condicionado por la presencia de otras alteraciones genéticas adquiridas, algunas todavía sin caracterizar, que aparecerían de manera conjunta o independiente a la V617F y que podrían condicionar el desarrollo de un fenotipo u otro (Pardanani *et al*, 2006a; Pikman *et al*, 2006; Staerk *et al*, 2007; Kralovics, 2008; Tefferi, 2010a). De hecho, existe la posibilidad de que la V617F/*JAK2* no sea la verdadera desencadenante del proceso neoplásico y que existan otras alteraciones previas, simultáneas o posteriores que, de manera conjunta, condicionen el fenotipo neoplásico (Abdel-Wahab *et al*, 2009; Delhommeau *et al*, 2009; Tefferi *et al*, 2009; Tefferi, 2010). Se ha visto que pacientes con leucemia aguda secundaria a una NMPC con la mutación V617F/*JAK2*, pueden perder esta mutación en la transformación de la enfermedad (Campbell *et al*, 2006; Theocharides *et al*, 2007).

Recientemente se ha planteado la hipótesis de que la proliferación mieloide suceda posiblemente de una manera oligoclonal y no monoclonal. Esta idea rivalizaría con la hipótesis de la existencia de un clon ancestral con una mutación iniciadora y apoyaría la idea de que aparezcan múltiples clones alterados de manera independiente, con alteraciones en diversos genes y desencadenando fenotipos determinados en función de los genes afectados. La descripción de múltiples mutaciones en distintos genes, con productos de diversas funciones (*TET2*, *CBL*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *EZH2*, *IZKF1*), podría apoyar esta hipótesis (Schaub *et al*, 2009; James *et al*, 2008; Beer *et al*, 2009; Mulligan *et al*, 2009; Tefferi, 2010; Bacher *et al*, 2010).

Hasta ahora, muchas de estas nuevas mutaciones aparecen en pacientes sin la V617F/*JAK2*, como ocurría con los datos publicados sobre *C-CBL*. En nuestro trabajo hemos encontrado alteraciones en *C-CBL* en la misma proporción de pacientes con y sin esta alteración por lo que no parecen ser alteraciones mutuamente excluyentes. Sin embargo, la muestra disponible no permite comprobar si ambas alteraciones afectan al mismo clon celular. Es importante destacar que muchos de los estudios publicados analizan grupos previamente seleccionados sin la V617F, como nuestra serie original de pacientes.

De la misma manera que otros estudios publicados (Dunbar *et al*, 2008; Grand *et al*, 2009; Sanada *et al*, 2009), hemos encontrado que los pacientes sin la V617F/*JAK2* con alteraciones en *C-CBL* fueron en todos los casos NMPCs atípicas y no clásicas. Este tipo de enfermedades están fenotípicamente más relacionadas con los SMD/NMP, grupo en el que se han encontrado la mayor frecuencia de mutaciones en este gen.

El análisis de manera completa de la región codificante de los genes de la familia *Cbl* ha permitido encontrar mutaciones en estos genes que pueden encontrarse relacionadas con el desarrollo de la enfermedad de algunos de los pacientes del estudio. De nuevo, la muestra disponible no ha permitido comprobar que los cambios encontrados sean somáticos, ya que no se ha dispuesto de muestras de otros tejidos de los pacientes para ello. Sin embargo, el efecto sobre la proliferación celular permite suponer que estos cambios son adquiridos y no germinales. Además, este estudio ha demostrado que la frecuencia de alteraciones en *C-CBL* es probablemente más elevada que la publicada hasta ahora, tanto por afectar a pacientes con V617F como por encontrarse en regiones del gen no analizadas de manera frecuente. Por tanto, en estos análisis deberían incluirse al menos las regiones codificantes de los dominios funcionales, y no únicamente los dominios *RING finger* y *linker*.

De los resultados obtenidos parece evidente que la participación de *C-CBL* en la señalización celular es un proceso complejo, y no restringido sólo a su actividad como E3 ubiquitin ligasa. Sin embargo esto requiere un estudio más exhaustivo a nivel proteico, que deberemos realizar

en el futuro y que permitiría confirmar el mecanismo por el que la actividad de C-CBL se ve afectada en cada uno de los casos.

En contra de lo esperado, el mutante p.R462W del dominio *RING finger* de CBL-B no provocó un aumento en la tasa de proliferación celular en los ensayos realizados de manera tan evidente como en el caso de las mutaciones en C-CBL. Esto ha podido ser debido a que, o bien este cambio no es funcionalmente importante o a que el modelo celular no era el adecuado. Además, en vista de los resultados obtenidos parece evidente concluir que CBL-C no ejerce una función reguladora negativa en la señalización de células hematológicas, confirmando la idea de que su función quedaría restringida a células epiteliales. Para comprobar definitivamente el efecto de los diversos SNPs con efecto en la traducción, sería útil utilizar una línea celular más adecuada, como la NIH3T3 procedente de fibroblastos de ratón (Scaife *et al*, 2003; Teckchandani *et al*, 2005).

Los productos de los genes TK son potenciales dianas terapéuticas y los inhibidores de estas proteínas se están utilizando con éxito. De la misma manera, dado que C-CBL está implicada en su regulación, los pacientes con mutaciones en este gen también podrían ser susceptibles de tratamientos anti-TK (Grand *et al*, 2009). De hecho, el piceatannol (un compuesto fenólico análogo natural del resveratrol encontrado en vinos tintos) es una molécula efectiva frente a diversas mutaciones de C-CBL (Klimowicz *et al*, 2009). Se ha demostrado que esta molécula inhibe un gran espectro de TKs como SRC, SYK, LCK o FAK, así como algunas serín/treonín quinasas, aunque se desconoce su mecanismo de actuación (Ogawa *et al*, 2010). Por otro lado, algunos estudios indican que el midostaurín (PKC412, Novartis, una molécula anti-FLT3) también podría ser efectivo en el tratamiento de pacientes con mutaciones de C-CBL, ya que reduce el crecimiento de la línea celular BaF3 que expresa mutaciones en este gen (Fernandes *et al*, 2010). En los modelos *in vivo*, los ratones con mutaciones en C-CBL desarrollan una enfermedad mieloproliferativa con progresión a LMA (Sanada *et al*, 2009; Bandi *et al*, 2009), en los que sus precursores hematopoyéticos muestran una señalización aumentada de FLT3. Si se inhibe esta señalización se reprime el desarrollo leucémico, por lo que el efecto de las mutaciones de C-CBL sería dependiente de la señalización de FLT3 (Rathiman *et al*, 2010) y la terapia frente a ambos tipos de alteraciones podría ser similar.

En resumen, podemos decir que el estudio de moléculas implicadas en la señalización celular mediada por las diversas TKs, como C-CBL u otras proteínas reguladoras, puede ser de gran importancia en el estudio de la patogénesis molecular de las NMPCs. La detección de mutaciones con potencial oncogénico en este tipo de moléculas puede conducir a un mayor conocimiento de la patogénesis de estas enfermedades, permitiendo una mejora en el diagnóstico y tratamiento de estos pacientes.

Conclusiones

VII. CONCLUSIONES

Con respecto al análisis de los genes TK de las familias Abl, Syk, Fgfr y gen *EGFR* en muestras de pacientes con NMPCs *BCR-ABL1* y *V617FJAK2* negativas, se puede concluir:

1. El análisis de FISH indica que no existen reordenamientos cromosómicos frecuentes que afecten a estos genes y que den lugar a la formación de genes de fusión. A pesar de que se han publicado numerosas fusiones en las que se ven implicadas algunas de estas TKs, corresponden a casos aislados de rara recurrencia, por lo que no se trata de un mecanismo frecuente en este tipo de neoplasias.
2. El análisis mediante dHPLC indica que no existen cambios relevantes a nivel de secuencia en las regiones analizadas de estos genes que pudieran dar lugar a un cambio en su actividad, como ocurre con la *V617FJAK2*. Tampoco hemos identificado ninguna variable polimórfica asociada a una mayor predisposición a desarrollar este tipo de enfermedades en ninguno de los genes.
3. La expresión de los genes *SYK*, *ABL1*, *ABL2* y *FGFR1* en 16 de estos pacientes no mostró diferencias significativas frente a muestras control. Por lo general, los patrones de expresión diferencial de los distintos dominios de estas TKs se pueden explicar por la presencia de transcritos alternativos, cuyo patrón de expresión general no difiere entre pacientes y controles.
4. Sin embargo, en el análisis de expresión de *JAK2*, realizado por su importante relación con la patogénesis de estas enfermedades, algunas muestras de pacientes presentaron una mayor expresión que los controles utilizados. Sería interesante realizar este mismo análisis en una serie mayor de muestras de pacientes y controles, con el objeto de determinar si este hecho puede diferenciar subgrupos clínicos o pronósticos dentro de estas enfermedades.

Con respecto al análisis de los genes Cbl (*C-CBL*, *CBL-B* y *CBL-C*) en muestras de pacientes con NMPCs negativos y positivos para la *V617FJAK2*, se puede concluir:

1. Tanto las NMPCs *V617FJAK2* negativas como las positivas presentan mutaciones en *C-CBL* en frecuencia similar, a diferencia de lo publicado hasta ahora. Esto indica que las mutaciones de *C-CBL* no son excluyentes de otras frecuentemente detectadas en estas enfermedades, abriendo nuevas hipótesis de trabajo sobre la relación temporal y patogénica de todas ellas.

2. Tanto las mutaciones del dominio *RING finger* como las mutaciones del dominio rico en prolina de C-CBL encontradas en el presente trabajo inducen una mayor respuesta proliferativa a factores de crecimiento en la línea celular 32D, previamente nucleofectada con *FLT3*. Sería interesante la realización de análisis a nivel de proteína para determinar sus su efecto sobre la función de C-CBL.
3. Con base en que las mutaciones de C-CBL pueden estar localizadas en dominios diferentes del *RING finger* y *linker* y afectar a pacientes con la mutación V617F/JAK2, es posible que su incidencia sea superior a la publicada hasta la fecha. La posibilidad de tratamientos más específicos para este tipo de pacientes deberá plantear, en el futuro, análisis más exhaustivos de alteraciones en este gen en las diversas neoplasias mieloides.
4. A pesar de que no hemos sido capaces de demostrar la capacidad transformante de los mutantes detectados en C-CBL, el hecho de obtener unos resultados iniciales similares a la mutación control p.R420Q hace que se plantee la necesidad de repetir dichos ensayos o de comprobarlo en otro modelo experimental.
5. En el modelo utilizado, las mutaciones del dominio *RING finger* de CBL-B no inducen el mismo efecto en la proliferación celular que las mutantes de C-CBL. Esto puede ser debido a que estas mutaciones no son relevantes en el proceso oncogénico o a que el modelo celular no es el adecuado, ya que puede que CBL-B no presente las mismas funciones celulares que C-CBL. Esto último podría ser la causa por la que el número de mutaciones descritas en neoplasias mieloides en CBL-B sea mucho menor.
6. En el modelo utilizado no ha sido posible determinar el efecto de los polimorfismos con efecto en la traducción del dominio *RING finger* de CBL-C. Esto podría deberse a que esta proteína no presente un efecto importante en la señalización de las células hematológicas, por lo que sería necesario llevar a cabo el análisis en otros modelos celulares.

Anexos

Anexo 1. Mutaciones de C-CBL descritas en neoplasias mieloides.

AA	CAMBIO	NEOPLASIA	AUTOR Y FECHA
K287	p.K287R	1 LMA	Fernandes 2010
R343	p.R343X	1 LMMC 1	Sanada, 2009
E366	p.E366K	1 RAEB21 SMD	Rocquain, 2010
	Splice site c.1096-1G>C	1 LMMJ	Loh, 2009
	Splice site c.1096-1G>T CODON STOP	1 LMMJ	Matsuda, 2010
	E366_E367(ins GAA 1099	1 LMMC 1	Makishima 2009
	p.366_367InsSK (insTCAAAG)	1 LMA	Fernandes,2010
	Δ366-398 (del. 297pb)	1 LNLNUO98-HOXD13	Slape, 2008
	Δ366-409	1 LMAMOLM-13	Caligiuri, 2007
		3 LMA inv(16) 2 LMA t(8;21)	Abbas, 2008
		1 LMA/SMD t(8;21)1 LMA/SMD	Reindl, 2009
Δ366-477	1 LMA/SMD inv(16)	Reindl, 2009	
Del 1106 66pb	1 LMMJ	Muramatsu 2010	
Q367	p.Q367P	1 LMMC 11 LMMC 2	Sanada, 2009
	p.Q367K	1 LMMC 1	Sanada, 2009
	p.Q367R	1 LMMC	Kohlmann,2010
Y368	p.Y368C	1 LMA	Sanada, 2009
	Δ368-382	1 LMA	Sanada, 2009
	Y368X	1 RAEB2	Rocquain, 2010
E369	Δ369-371	1 LMMC 1	Sanada, 2009
Y371	p.Y371H CODÓN STOP	1 LMCa	Grand, 2009
		10 LMMJ	Loh, 2009
		2 LMMJ	Muramatsu, 2010
		3 LMMJ	Pérez, 2010
		1 LMA	Fernandes, 2010
		1 LMMJ	Matsuda, 2010
		1 LMMC	Kohlmann,2010
	p.Y371S	1 LMMC 1, 1 RAEB1	Sanada, 2009
	p.Y371D	2 LMMJ	Loh, 2009
		1 LMMC	Kohlmann,2010
p.Y371C	1 LMMC 2	Sanada, 2009	
	1 LMMJ	Loh, 2009	
G375	p.G375P	1 LMA	Caligiuri, 2007
	p.G375S	1 LMA	Caligiuri, 2007
S376	p.S376A	1 LMA	Caligiuri, 2007
	p.S376F	1 LMCa	Grand, 2009
L380	p.L380P	2 LMCa 1MFI	Grand, 2009
		1 LMMJ	Loh, 2009
		1 LMMC	Kohlmann,2010
		1 RAEB2	Rocquain, 2010
C381	p.C381Y(1 LMMC	Grand, 2009
	p.C381R	1 LMMJ	Loh, 2009
		1 RAEB2	Rocquain, 2010
K382	p.K382E	1 SMD/LMA	Barreli, 2010
I383	p.I383R	1 LMMC 2	
	p.I383L 1285A>C	1 LMMC 2	
C384	p.C384Y	1 LMMC2 (LMA 2 ^a)1 SMD-MPD inesp.	Dunbar, 2007
		1 LMMC	Grand, 2009
		2LMMC/LMA	Makishima, 2009
	p.C384G	1 LMMC 1	Sanada, 2009
		1 LMMC 2	Sanada, 2009
	p.C384R	1 LMMC	Grand, 2009
		4 LMMJ	Loh, 2009
		1 LMMC	Kohlmann,2010

Anexo 1. Mutaciones de C-CBL descritas en neoplasias mieloides (continuación)

AA	CAMBIO	NEOPLASIA	AUTOR Y FECHA
C396	p.C396G	1 LMMC	Grand, 2009
	p.C396Y	1 LMMC	Sanada, 2009
	p.C396R	1 LMMJ	Loh, 2009
		1 LMMC	Kohlmann,2010
G397	1190 del99bp Deletion 99pb	1 LMMJ	Loh, 2009
H398	p.H398Y	1 LMMC	Grand, 2009
	p.H398R	1 LMMC 2	Sanada, 2009
		1 LMMC	Kohlmann,2010
L399	p.L399P	1 LMMC 1	Sanada, 2009
M400	p.M400R	1 LMMC	Kohlmann, 2010
C401	p.C401S	1 LMMJ	Muramatsu, 2010
	p.C401Y	1 LMMC	Kohlmann, 2010
C404	p.C404S	11LMMC2/LMA 1RAEB2/LMAs	Dunbar, 2007
		2 LMMC/LMA 2 ^a	Makishima 2009
	p.C404Y	1 LMMC1 (LMA 2 ^a)	Dunbar, 2007
		1 LMMC 1	Sanada, 2009
		1 LMMC/LMA 2 ^a	Makishima 2009
	p.C404R	1 LMMC	Kohlmann,2010
W408	p.W408C	1 LMCA	Grand, 2009
	p.W408R	1 LMMJ	Loh, 2009
	p.W408S	1 LMMC	Kohlmann,2010
Q409 Splice site	1227+4C>T	1 LMMJ	Loh, 2009
	1227G+64pb CODÓN STOP	1 LMA 2 ^a (SMD)	Makishima, 2009
	1228-2A>G	1 LMMJ	Loh, 2009
1 LMMJ		Muramatsu, 2010	
G415	p.G415V	1 LMMJ	Loh, 2009
C416	p.C416R	1 LMMC 2	Sanada, 2009
	p.C416Y	1 LMMC	Kohlmann,2010
P417	p.P417A	2 LMCA	Grand, 2009
	p.P417L	1 LMMC	Grand, 2009
	p.P417R	1 LMMJ	Matsuda, 2010
F418	p.F418L	1 LMCA	Grand, 2009
		1 LMMJ	Pérez, 2010
	p.F418V	1 LMMC 1	Sanada, 2009
p.F418S(1 LMMC	Kohlmann, 2010	
C419	p.C419R	1 LMMJ	Matsuda, 2010
	p.C419R	1 LMMJ	Matsuda, 2010
R420	p.R420Q	1 LMA	Sargin, 2007
		1 MFI (LMA 2 ^a)	Dunbar, 2008
		2 LMCA2 MFI	Grand, 2009
		2 LMMC/LMA	Makishima 2009
		1 LMMC	Kohlmann, 2010
	p.R420P	1 SMD-RAEB1	Dunbar, 2007
		1 LMMC/LMA	Makishima 2009
	p.R420G	1 LMA/SMD	Reindl, 2009
		1 LMMC 1	Sanada, 2009
p.R420L	1 LMCA	Grand, 2009	
I429	I429-F434del fsX19	1 LMMC	Kohlmann, 2010
N454	p.N454D	1 LMMC	Grand, 2009
R462	p.R462X	1 LMCA	Grand, 2009
R499	p.R499L	1 LMA	Fernandes, 2010

Anexo 2. Datos clínicos de los 44 pacientes seleccionados para el Proyecto.

Caso	Cultivo	NMPC	EDAD	Datos hematológicos	Cariotipo	Otros análisis	Tratamiento	Respuesta	Otros datos
9606	27238	MFI	52	Hb 13,3 g/dl; Pla _q 95 x 10 ⁹ /l; Leuc 5,6 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo	No	Remisión completa	Esplenomegalia
13036	16629	MFI	81	Hb 7,4 g/dl; Pla _q 30 x 10 ⁹ /l; Leuc 2,5 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo	Transfusión, esteroides	No respuesta	Esplenomegalia Hepatomegalia Exitus
14629	19102	MFI	50	Hb 11,9 g/dl; Pla _q 172 x 10 ⁹ /l Leuc 9,4 x 10 ⁹ /l	46,XX	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo	Hidroxiurea		Esplenomegalia
16544	22106	MFI		No disponible	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR)			Exitus
18630	25548 29698	PV	65	Hb 16,8 g/dl Pla _q 208 x 10 ⁹ /l; Leuc 5,2 x 10 ⁹ /l	46,XX	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo	Sangrías periféricas	Parcial	
18882	25784	PV	58	Hb 18,1 g/dl Pla _q 222 x 10 ⁹ /l Leuc 8,54 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR)	Sangría terapéutica	Remisión completa	
19537	26717	PV	48	Hb 18,5 g/dl Pla _q 276 x 10 ⁹ /l; Leuc 5,8 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo	Sangría terapéutica	Estable	Esplenomegalia
21762	30217	PV	51	No disponible	46,XY	V617F JAK2 no mutado BCR-ABL negativo (RT-PCR)			
14837	19416	TE	62	Hb 12,2 g/dl Pla _q 828 x 10 ⁹ /l; Leuc 8,8 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo			Esplenomegalia
14886	19492 23055	TE	66	Hb 11,3 g/dl Pla _q 866 x 10 ⁹ /l Leuc 5,9 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR)	Hidroxiurea	Parcial	Esplenomegalia Hepatomegalia Exitus
15676	20740	TE	78	Hb 11,5 g/dl Pla _q 229 x 10 ⁹ /l Leuc 8,9 x 10 ⁹ /l	46,XX	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR)	Hidroxiurea y AAS/ Anagrelida e hidroxiurea	Remisión completa	Exitus
15703	20792	TE	25	Hb 15,2 g/dl Pla _q 746 x 10 ⁹ /l Leuc 7,7 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR)			
16547	22109	TE		Hb 13,1 g/dl Pla _q 766 x 10 ⁹ /l Leuc no disponible	46,XX	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo	Anagrelida Hidroxiurea	Respuesta parcial Remisión completa	

Anexo 2. Datos clínicos de los 44 pacientes seleccionados para el Protocolo (continuación).

Caso	Cultivo	NMPC	EDAD	Datos hematológicos	Cariotipo	Otros análisis	Tratamiento	Respuesta	Otros datos
16659	22291	TE	41	Hb 13,5 g/dl Plaq 954 x 10 ⁹ /l Leuc 6,3 x 10 ⁹ /l	46,XX	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR)	Anagrelida		
16732	22837 22413	TE	56	Hb 15,1 g/dl Plaq 887 x 10 ⁹ /l Leuc 8,1 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR)	Adiro 100		
16737	22419	TE	43	Hb 13,2 g/dl Plaq 552 x 10 ⁹ /l Leuc 9,7 x 10 ⁹ /l	46,XX	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR)	Adiro 100	Estable	
16737	22419	TE	43	Hb 13,2 g/dl Plaq 552 x 10 ⁹ /l Leuc 9,7 x 10 ⁹ /l	46,XX	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR)	Adiro 100	Estable	
16787	22502	TE	76	No datos disponibles	46,XX	V617F JAK2 no mutado BCR-ABL negativo (RT-PCR)			
17157	23323	TE	43	Hb 14,6 g/dl Plaq 783 x 10 ⁹ /l Leuc 5,5 x 10 ⁹ /l	46,XX	V617F JAK2 no mutado	Hidroxiurea y adiro 100	Remisión completa	
17503	23739	TE	56	Hb 14,5 g/dl Plaq 1225 x 10 ⁹ /l Leuc 12,3 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo	Hidroxiurea	Remisión completa	
17826	24241	TE	73	Hb 16,3 g/dl Plaq 653 x 10 ⁹ /l Leuc 9,7 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo	Hidroxiurea	Remisión completa	
18059	24700 24632	TE	65	Hb 11,8 g/dl Plaq >1000 x 10 ⁹ /l Leuc 6,7 x 10 ⁹ /l	46,XX	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo MPL mutado (W515K)	Hidroxiurea y adiro 100	Remisión parcial	Esplenomegalia
18708	25667	TE	82	Hb 12,8 g/dl Plaq 989x 10 ⁹ /l Leuc 5,7 x 10 ⁹ /l	46,XX	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo	Hidroxiurea Anagrelida	No respuesta	
18714	25676	TE	40	Hb 14 g/dl Plaq 858 x 10 ⁹ /l Leuc 6,4 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR)	Adiro 100	Estable	Esplenomegalia

Anexo 2. Datos clínicos de los 44 pacientes seleccionados para el Protocolo (continuación).

Caso	Cultivo	NMPC	EDAD	Datos hematológicos	Cariotipo	Otros análisis	Tratamiento	Respuesta	Otros datos
13674	17657 19506	NMPCa/LMMC	65	Hb 12,9 g/dl Pla _q 359 × 10 ⁹ /l Leuc 37,9 × 10 ⁹ /l	46,XX	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo D816V KIT negativo NRAS no mutado (exón 2 y 5)	Hidroxiurea	Respuesta parcial	Esplenomegalia Progresión LMA
14171	18415 19656	NMPCa/LMMC	52	Hb 8,8 g/dl Pla _q 158 × 10 ⁹ /l Leuc 42,6 × 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo D816V KIT negativo NRAS no mutado (exón 2 y 5)	Hidroxiurea		Esplenomegalia
14549	18977	NMPCa	62	Hb 11,5 g/dl Pla _q 347 × 10 ⁹ /l Leuc 22,3 × 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo D816V KIT negativo NRAS no mutado (exón 2 y 5)	Ara C	Recaída	Progresión LANL M4 Exitus
14752	19306	NMPCa/LMMC	76	Hb 9,3 g/dl Pla _q 149 × 10 ⁹ /l Leuc 1,7 × 10 ⁹ /l	46,XX	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo D816V KIT negativo NRAS no mutado (exón 2 y 5)			Hepatomegalia
14895	19515 25032	NMPCa/LMMC	70	Hb 11,2 g/dl Pla _q 121 × 10 ⁹ /l Leuc 23,4 × 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo D816V KIT negativo NRAS no mutado (exón 2 y 3) KRAS no mutado (exón 2 y 3) BRAF exón 15 no mutado	Hidroxiurea		Esplenomegalia Progresión Exitus
14920	19550	NMPCa/LMMC	76	Hb 10,2 g/dl Pla _q 50 × 10 ⁹ /l Leuc 79 × 10 ⁹ /l	46,XX	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR) D816V KIT negativo NRAS no mutado (exón 2 y 5)	No tratamiento		Exitus
15081	19799	NMPCa/SHE		Hb 11,6 g/dl Pla _q 88,8 × 10 ⁹ /l Leuc 23,3 × 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR) F11L1-PDGFRA	Hidroxiurea Interferón Glivec		Esplenomegalia Hepatomegalia
15938	21160	NMPCa	78	Hb 13,5 g/dl Pla _q 213 × 10 ⁹ /l Leuc 124 × 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR)	Hidroxiurea	Respuesta parcial	Hepatomegalia Exitus

Anexo 2. Datos clínicos de los 44 pacientes seleccionados para el Protocolo (continuación).

Caso	Cultivo	NMPC	EDAD	Datos hematológicos	Cariotipo	Otros análisis	Tratamiento	Respuesta	Otros datos
16572	23455 22149	NMPCa	80	Hb 9,1 g/dl Pla _q 227 x 10 ⁹ /l Leuc 19,8 x 10 ⁹ /l	46,XX 46,XX [25]/47,XX, +11[5]	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR) Mutación dom. FERM p-R340 JAK2	Hidroxiurea	Respuesta parcial	Esplenomegalia Hepatomegalia Progresión a MFI <i>Exitus</i>
17865	24315 26785	NMPCa/LMMC	69	No disponible	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR) D816V KIT negativo NRAS no mutado (exón 2 y 5) KRAS no mutado (exón 2 y 3) BRAF exón 15 no mutado			
18148	24769 25649 25848	NMPCa/LMMC	72	Hb 8,5 g/dl Pla _q 118 x 10 ⁹ /l Leuc 90,3 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) positivo D816V KIT negativo NRAS no mutado (exón 2 y 5)	Hidroxiurea y Anagrelida	Respuesta parcial	Esplenomegalia Progresión a LMA <i>Exitus</i>
18331	25054	NMPCa/LMMC	68	Hb 6,2 g/dl Pla _q 106 x 10 ⁹ /l Leuc 2,7 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo D816V KIT negativo NRAS no mutado (exón 2 y 5) KRAS no mutado (exón 2 y 3) BRAF exón 15 no mutado			<i>Exitus</i> Progresión a LMA
18634	25553	NMPCa/LMMC	67	Hb 6,2 g/dl Pla _q 106 x 10 ⁹ /l Leuc 2,7 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo D816V KIT negativo NRAS no mutado (exón 2 y 5) KRAS no mutado (exón 2 y 3) BRAF exón 15 no mutado			Transformación a LMA
10750	15458 13242	NMPCa/LMMC	65	Hb 11,1 g/dl Pla _q 16 x 10 ⁹ /l Leuc 60,6 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo D816V KIT negativo NRAS no mutado (exón 2 y 5) KRAS no mutado (exón 2 y 3) BRAF exón 15 no mutado	Hidroxiurea	Respuesta parcial	Esplenomegalia <i>Exitus</i>

Anexo 2. Datos clínicos de los 44 pacientes seleccionados para el Protocolo (continuación).

Caso	Cultivo	NMPC	EDAD	Datos hematológicos	Cariotipo	Otros análisis	Tratamiento	Respuesta	Otros datos
11134	13795	NMPCa/LMMC	81	Hb 13,8 g/dl Pla _q 67 x 10 ⁹ /l Leuc 23,8 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo D816V KIT negativo NRAS no mutado (exón 2 y 5)	Hidroxiurea	Respuesta parcial	Progresión Exitus
11363	14133	NMPCa/LMMC		Hb 5,4 g/dl Pla _q 82 x 10 ⁹ /l Leuc 29,8 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo D816V KIT negativo NRAS no mutado (exón 2 y 5)	Hidroxiurea	No respuesta	Exitus
11615	14507	NMPCa/LMMC	78	Hb 11,2 g/dl Pla _q 180 x 10 ⁹ /l Leuc 31,4 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR) D816V KIT negativo NRAS no mutado (exón 2 y 5)	Hidroxiurea	No respuesta	Exitus
13633	17586 18715	NMPCa	80	No disponible	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR)			Exitus
16899	22720	NMPCa/LMMC	74	Hb 10,6 g/dl Pla _q 180 x 10 ⁹ /l Leuc 18,5 x 10 ⁹ /l	46,XY	V617F JAK2 negativo FLT3(ITD-D835) negativo BCR-ABL negativo (RT-PCR)	No tratamiento		Hepatomegalia Exitus
18912	25833	NMPCa/LMMC		No disponible	46,XX	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo			Exitus
18927	25856	NMPCa	84	No disponible	46,XY	V617F JAK2 no mutado FLT3(ITD-D835) negativo			

Anexo 3. Condiciones de los análisis de dHPLC realizados para cada uno de los genes tirosín quinasa. Detalle de los cebadores empleados, tamaños de los fragmentos, temperaturas optimizadas de amplificación por PCR, temperaturas de análisis en el dHPLC y porcentajes de buffer empleadas y número de pacientes en los que se ha llevado a cabo el estudio.

Gen	Exón	Tamaño (pb)	Cebadores	Muestras	Condiciones de análisis		
					% Tampón A	% Tampón B	T ^a dHPLC (°C)
SYK	4A (SH2)	303	Fw:GGGGTCCTACCAAAGTCT Rv:CGCCGCGTAGGTGCCATTCAGCTC Rvm:CGCCGCGTAGGTGCCATTCAGCTC	44 pacientes 20 controles	39.5	60.6	64.0
	4B (SH2)	416	Fw:CGGGAGGAGGCAGAAGATTA Rv:GGAAGTCTGTGGGGTTCAC Rvm:GGAAGTCTGTGGGGTTCAC	44 pacientes 20 controles	37.0 37.0 37.0	63.1 63.1 63.1	61.8 63.5 65.0
	5 (SH2)	290	Fw:TCTGCTTTGCTCTCCATGTG Rv:CCCTCTCCAGGGTCATGT Fwm:TCTGCTTTGCTCTCCATGTG	44 pacientes 20 controles	39.9 39.9	60.2 60.2	60.0 60.5
	6 (SH2)	332	Fw:TGATGCAGTTCATCTCTCT Rv:TIGGTCAGGTGTGTGTGTT Fwm:TGATGCAGTTCATCTCTCT	44 pacientes 20 controles	41.2	58.9	62.7
	7 (SH2)	292	Fw:TTATGTGTCTTGGGGCCACT Rv:TCCTCATCCAACCAATCT Fwm:TTATGTGTCTTGGGGCCACT	44 pacientes 20 controles	42.3	57.8	58.0
	11 (TK)	300	Fw:AAAAGTGAGGCATTTTGAAAG Rv:CGCCGCGCGGGGATAGCTTCCAGATGTG Rvm:CGCCGCGCGGGGATAGCTTCCAGATGTG	44 pacientes 20 controles	39.3 39.3	60.8 60.8	59.0 61.3
	12 (TK)	300	Fw:GAGCATGGTTTGTGTGTA Rv:TTTACCACCTGCTGCTCGA Rvm:TTTACCACCTGCTGCTCGA	44 pacientes 20 controles	39.6 39.6	60.5 60.5	57.2 59.0
	13 (TK)	315	Fw:GCCCCCGCGTCAAGCTCCGATCTCAAGT Rv:TGTTCTAATGGCCCCACAGT Rvm:TGTTCTAATGGCCCCACAGT	44 pacientes 20 controles	39.2	60.9	60.2
	14 (TK)	341	Fw:TGACCCAACTGACTCCAACA Rv:CCCAACCATTTACCTGTTT Rvm:CCCAACCATTTACCTGTTT	44 pacientes 20 controles	41.0 41.0	59.1 59.1	59.1 60.5
	15 (TK)	333	Fw:GCCCTAGAGTTAGCCACCAG Rv:TGACAAGTTGTGGCAGTGT Rvm:TGACAAGTTGTGGCAGTGT	44 pacientes 20 controles	38.7 38.7	61.4 61.4	61.0 62.0
ZAP70	3A (SH2)	428	Fw:AGGTTCAGGAAGCCCTGAC Rv:TCTCGCAGGCAGTCGAAGAC Rvm:TCTCGCAGGCAGTCGAAGAC	44 pacientes 20 controles	36.8	63.3	66.4
	3B (SH2)	339	Fw:ATGTGCGCTTCCACCCTTT Rv:ACGACCTTTTCTCCCTCT Fwm:ATGTGCGCTTCCACCCTTT	44 pacientes 20 controles	38.5 38.5	61.6 61.6	66.8 67.8
	4 (SH2)	271	Fw:CTCCTCGCCTCTCTTTCT Rv:CAACTGCACACTCAGTCTG Fwm:CTCCTCGCCTCTCTTTCT	44 pacientes 20 controles	40.5	59.6	65.0
	9 (TK)	279	Fw:AGCAGGCATCTAGCAGAGAG Rv:GTGAAGCCACTCCCCTCTG Rvm:GTGAAGCCACTCCCCTCTG	44 pacientes 20 controles	40.2	59.9	63.6 65.6
	10 (TK)	429	Fw:CCACACAACCTCAAGGGAGAAG Rv:GTCCACGATGGTGTGGAAGT Rvm:GTCCACGATGGTGTGGAAGT	44 pacientes 20 controles	36.8	63.3	65.3
	11 (TK)	385	Fw:CCTGGGAACCTGGCTAGTCTT Rv:ACATGGTGACCCCATAGCTC Fwm:CCTGGGAACCTGGCTAGTCTT	44 pacientes 20 controles	37.5	62.6	63.0
	12-13 (TK)	233	Fw:GCGCTGATCCAGCAGCATCTCC Rv:CCAGTGTCTCTCTCATC GCGCTGATCCAGCAGCATCTCC	44 pacientes 20 controles	42.0 42.0	58.1 58.1	64.6 65.0
	14 (TK)	302	Fw:CGGCTTGAGCAGAAGATGA Rv:AACCTGGTGTGTGGAGAG Rvm:AACCTGGTGTGTGGAGAG	44 pacientes 20 controles	39.5	60.6	63.5
15 (TK)	298	Fw:TCTACCTCAGCCAAGCACAG Rv:CTCAGCCAGACTGCAGGAC Rvm:CTCAGCCAGACTGCAGGAC	44 pacientes 20 controles	39.6 39.6	60.5 60.5	65.5 65.7	

Anexo 3. Continuación.

Gen	Exón	Tamaño (pb)	Cebadores	Muestras	Condiciones de análisis		
					% Tampón A	% Tampón B	Tª dHPLC (°C)
ABL1	4 (SH2)	413	Fw:AACGAAGCTGGTTCCAAAG Rv:GACAGCAGGACCTCGGTTTC Rvm:GACAGCAGGGCCCTCGGTTTC	44 pacientes 20 controles	37.0 37.0 37.0	63.1 63.1 63.1	58.6 60.5 61.9
			Fw:GCTGTTCCTGTTCCCTTCA Rv:CAGCAGGCAGGAGGTAGACT Rvm:CAGCAGGCATGAGGTAGACT	44 pacientes 20 controles	37.4 37.4	62.7 62.7	61.8 62.9
	6 (TK)	257	Fw:AGCAATGIGGCTGTACAAA Rv:CGCGAGACCCCTCTCTCA Rvm:CGCGAGACACTCTCTCA	44 pacientes 20 controles	41.0	59.1	60.3
	7 (TK)	295	Fw:AGCCACGIGTGAAGTCTC Rv:TAGGCTGGGGCTTTTGTA Fwm:AGCCACGIGTGAAGTCTC	44 pacientes 20 controles	39.7	60.4	62.4
	8 (TK)	294	Fw:TGGTGGATTGTGAAGTGA Rv:TCTGTAGTCAGGAAGGACCA Rvm:TCTGTAGTLAGGAAGGACCA	44 pacientes 20 controles	39.8 39.8	60.3 60.3	60.1 61.7
	9 (TK)	294	Fw:TGAGGTCTGCTGCAAAGTIA Rv:TTCCTGGAATGCCACATA Rvm:TTCCTGGAATGCCACATA	44 pacientes 20 controles	42.3 42.3	57.8 57.8	58.5 61.5
	10 (TK)	244	Fw:GAAGTCTGAGCCCGTATIG Rv:ACCAGGAAGTGAACCGAATG Rvm:ACCAGGAATGAACCGAATG	44 pacientes 20 controles	41.5	58.6	60.9
ABL2	5 (SH2)	358	Fw:CATCGTTTCTTTCATCTGTGA Rv:AAAGGTGGTACCAGGGAGT Rvm:AAAGGTGGGACCAGGGAGT	44 pacientes 20 controles	40.6 40.6	59.5 59.5	59.0 61.6
			Fw:AGCTTTTCTCTTCTTACCAG Rv:TCCAAGTGTAGACACAAAA Fwm:AGCTTTTCTCTTCTTACCAG	44 pacientes 20 controles	40.6 40.6 40.6	59.5 59.5 59.5	58.5 59.8 60.7
	7 (TK)	254	Fw:GGGTTTTCCTCTCGTTT Rv:CAACAGAGCAGAGCCCTGIC Fwm:GGGTTTTCCTCTCGTTT	44 pacientes 20 controles	43.6	56.5	57.6
	8 (TK)	281	Fw:GCCAAAGTGGTITGGAGTIG Rv:AGATGGCTTATGTTGGTIC Rvm:AGATGGCTTATGTTGGTIC	44 pacientes 20 controles	42.7 42.7	57.4 57.4	57.6 59.9
	9 (TK)	317	Fw:TTAGGGTCTCTTCCCACAG Rv:TGGCAGGTAAAGGTAGAGGA Fwm:TTAGGGTCTCTTCCCACAG	44 pacientes 20 controles	41.6 41.6	58.5 58.5	57.8 58.4
	10 (TK)	311	Fw:TGTGTGTAAACAGTGTGAATG Rv:TGCTAGCTTATGCTTCAAAA Fwm:TGTGTGTAAACAGTGTGAATG	44 pacientes 20 controles	41.8 41.8	58.3 58.3	56.5 57.7
	11 (TK)	287	Fw:TGGTATGTGCTATCATGTG Rv:ACCACCACACTACCCAGAA Rvm:ACCACCACACTACCCAGAA	44 pacientes 20 controles	42.5 42.5	57.6 57.6	58.9 60.5
FGFR1	18A (TM)	295	Fw:CAAGCCTGCTAACCCCTGT Rv:GCATTAGAGGCCAGAGAGA Fwm:CAAGCCTGCTAACCCCTGT	44 pacientes 20 controles	39.7	60.4	61.9
	18B (TM)	253	Fw:GACTCCTGGGACATGGATIG Rv:TTTGGCTTCTGCAATTGIG Rvm:TTTGGCTTCTGCAATTGIG	44 pacientes 20 controles	43.7	56.4	59.4
	19 (TM)	317	Fw:TGGGAAGCCCTGACTAAGAA Rv:CCGCCAGAAAGGTGTAGTA Rvm:CCGCCAGAAAGGTGTAGTA	44 pacientes 20 controles	44.1	56.0	62.5
	20 (TK)	302	Fw:TGCCTGCAGAAACATTCATT Rv:TGCTTGGAAATGGGACAAGAT Rvm:TGCCTGCAGAAACATTCATT	44 pacientes 20 controles	42.0 42.0	58.1 58.1	59.5 61.9
	21 (TK)	252	Fw:CCTCCTCCCTTCCAAGTAA Rv:CTTCCCTAGCTGTGGCTGAG Rvm:CTTCCCTTCCAAGTAA	44 pacientes 20 controles	46.2 46.2	53.9 53.9	63.5 59.5
	22 (TK)	310	Fw:GTGGGGTTTCTTTGAGGTGA Rv:GTTCCACCCCTGGCATTAC Fwm:GTGGGGTTTCTTTGAGGTGA	44 pacientes 20 controles	39.3 39.3	60.8 60.8	62.5 63.6
	23 (TK)	285	Fw:CAGAGCAGTGGCAGAAAT Rv:TCAGATGAAACCACCAGCAC Rvm:TCAGATGAAACCACCAGCAC	44 pacientes 20 controles	40.0	60.1	61.8
	24 (TK)	248	Fw:CCAGTCCCTTCCCACCTGT Rv:CTCTGGGCAGAAAGAGGAC Fwm:CCAGTCCCTTCCCACCTGT	44 pacientes 20 controles	43.8 43.8	56.3 56.3	61.0 63.0
	25 (TK)	247	Fw:GAGCGGAGAAAGCTTAACA Rv:CCCTCAAAGCCACTCTT Rvm:CCCTCAAAGCCACTCTT	44 pacientes 20 controles	41.4	58.7	63.7
	26 (TK)	286	Fw:GCCAGGGGGCTAGACTAGAG Rv:CTGTGATGGGCGAGAGGA Rvm:CTGTGATGGGCGAGAGGA	44 pacientes 20 controles	42.5	57.6	63.5
27 (TK)	416	Fw:CTTCTCTCGCCCATCAC Rv:GATCTGCCTTTGCACTTC Rvm:GATCTGCCTTTGCACTTC	44 pacientes 20 controles	37.0 37.0 37.0	63.1 63.1 63.1	62.0 63.5 65.0	

Anexo 3. Continuación.

Gen	Exón	Tamaño (pb)	Cebadores	Muestras	Condiciones de análisis		
					% Tampón A	% Tampón B	T ^a dHPLC (°C)
FGFR2	18 (TM)	316	Fw:GCGTCAGTCGGTGTGCTAA Rv:GGTCATGGGGAGGAGTAAA Fwm:GCGTCAGTCGGTGTGCTAA	44 pacientes 20 controles	39.1 39.1 44.1	61.0 61.0 56.0	57.0 60.0 62.3
	19 (TM)	300	Fw:TTCTCAGATGGAGCCAGGAT Rv:ACCTTTGTGGCTAAGGGTCA Fwm:TTCTCAGATGGAGCCAGGAT	44 pacientes 20 controles	39.6 44.6	60.5 55.5	59.5 62.0
	22 (TK)	303	Fw:TGCTTTAGTAAGCCGCTGAA Rv:TCACATGCCACAAAAGGAAC Rvm:TCACATGCCCAAAGGAAC	44 pacientes 20 controles	44.5	55.6	62.0 63.0
	23 (TK)	244	Fw:GCTGCCCATGAGTTAGAGGA Rv:GGAAGCCAGCCATTCTA Rvm:GGAAGCCCGCCATTCTA	44 pacientes 20 controles	41.5	58.6	58.0 59.0
	24 (TK)	277	Fw:AGGGGAGACCCTGGATTCT Rv:ATTCCACCCAGCCAAGTAGA AGGGGAGATCCTGGATTCT	44 pacientes 20 controles	40.3 45.3	59.8 54.8	59.0 61.5
	25 (TK)	240	Fw:CCGGCCACACTGTATTCTT Rv:CCCTGCCCACTGTGTTACTG Rvm:CCCTGCCCACTGTGTTACTG	44 pacientes 20 controles	41.7	58.4	56.7
	26 (TK)	321	Fw:TGGTCCTCATITGGGACTGAT Rv:GTGAAATGCAGCAGCCACTA Rvm:GTGAAATGCGGCAGCCACTA	44 pacientes 20 controles	44.0	56.1	59.0
	27 (TK)	302	Fw:GTAATGCCGTGCTTTCCT Rv:CCAGAGAGCTTCAGCCATTC Fwm:GTAATGCCGGCTTTCCT	44 pacientes 20 controles	39.5	60.6	61.0
	28 (TK)	295	Fw:CACGTCCCATATTCCTAT Rv:CACAGACTCCAACCAACAGC Rvm:CACAGACTCAAACCAACAGC	44 pacientes 20 controles	39.7 42.2	60.4 57.9	58.0 60.0
	29 (TK)	364	Fw:CGTCCAATACCCACATCTCA Rv:GTTCCCACTGCTGCTCTGT Rvm:GTTCCCACTGCTGCTCTGT	44 pacientes 20 controles	38.0 38.0	62.1 62.1	58.0 58.8
FGFR3	9 (TM)	315	Fw:CCTCAACGCCCAITGCTTT Rv:CAGAGAGGGCTCACACAGC Rvm:CAGAGAGGACTCACACAGC	44 pacientes 20 controles	39.2	60.9	64.4
	10 (TM)	332	Fw:CAATGCTGGTGGAAAGTCAGA Rv:CCTCTGACTGGTGGCTGTT Fwm:CAATGCTGGGCGGAAGTCAGA	44 pacientes 20 controles	38.7	61.4	65.4
	11-12 (TK)	413	Fw:GGTCCCTCTGCTCCACT Rv:GACACGGGCTCCTCAGAC Rvm:GACACGGCTCCTCAGAC	44 pacientes 20 controles	37.0 37.0 39.5	63.1 63.1 60.6	62.0 64.6 65.5
	13 (TK)	300	Fw:GTCTGAGGAGCCCGTGT Rv:CTGAAGCCTCTCCACTCTC Fwm:GTCTGAGGAGCCCGTGT	44 pacientes 20 controles	39.6 42.1	60.5 58.0	65.1 66.6
	14 (TK)	271	Fw:GAGTACTTGGCCTCCAGAA Rv:GGCGTCTACTGGCATGA Rvm:GGCGTCTCTGGCATGA	44 pacientes 20 controles	40.5	59.6	64.9
	15 (TK)	244	Fw:GTGGGGTTCATGCCAGTA Rv:GGTAGAAACCACCCAGGAG Fwm:GTGGGGTTCATGCCAGTA	44 pacientes 20 controles	41.5	58.6	65.1
	16 (TK)	208	Fw:CAGGTGTCTGCTGGGAGT Rv:TATTCGGGAACAGCCTGAAG Rvm:TATTCGGGAGCAGCCTGAAG	44 pacientes 20 controles	43.1 45.6	57.0 54.5	63.8 65.0
	17 (TK)	259	Fw:TCAGGCTGTTCCCGAATAAG Rv:CCCACACCTCAGCACTCTG Rvm:CCCACACCGCAGCACTCTG	44 pacientes 20 controles	40.9	59.2	66.1
	18 (TK)	243	Fw:GAGGTGGCTGTGCGAAGA Rv:TAGGGACCCCTCACATTGTT Fwm:GAGGTGGCGGTGCGAAGA	44 pacientes 20 controles	41.5	58.6	66.5

Anexo 3. Continuación.

Gen	Exón	Tamaño (pb)	Cebadores	Muestras	Condiciones de análisis		
					% Tampón A	% Tampón B	T ^a dHPLC (°C)
FGFR4	8A (TM)	274	Fw:TTGTCTGTCTGTGTGTGTC Rv:CTGGAGTCAGGCTGTACAT Fwm TTGTCTGTCTGTGTGTGTC	44 pacientes 20 controles	40.4 42.9	59.7 57.2	65.3 67.4
	8B (TM)	255	Fw:AGCAGGCAGAACCAAGTCTC Rv:CAGACCTCCGAGTCACCTCT Rvm:CAGACCTCTAGTACTCTCT	44 pacientes 20 controles	41.1 41.1	59.0 59.0	62.7 65.0
	9 (TK)	303	Fw:TCGACCCACTATGGGAGTTC Rv:AAAGTGTCTGGCGTACAGGT Fwm TCGACCCACTATGGGAGTTC	44 pacientes 20 controles	39.5	60.6	64.2
	10 (TK)	308	Fw:CTTTTCAAGGCCACACAGC Rv:CTTTGGCTCTGCACCTAAC Rvm:CTTTGGCTCTGCACCTAAC	44 pacientes 20 controles	39.3	60.8	63.8
	11 (TK)	305	Fw:GTTAGGGTGCAGAGCCAAAG Rv:CTGAGAGTGGAGCTGAGAGA Fwm GTTAGGGTGCAGAGCCAAAG	44 pacientes 20 controles	39.4 44.4 44.4	60.7 55.7 55.7	64.2 65.2 67.3
	12 (TK)	272	Fw:GGTGGTGTGTGTCTCAACT Rv:AGTGCAGAGTCCACAGGTC Rvm:AGTGCAGAGTCCACAGGTC	44 pacientes 20 controles	40.5 40.5	59.6 59.6	62.6 63.6
	13 (TK)	300	Fw:CAGCAACGTGAGGGAGATG Rv:GGTCCAGACCAAATCTGAA Fwm CAGCAACGTGAGGGAGATG	44 pacientes 20 controles	39.6	60.5	64.8
	14 (TK)	296	Fw:CTGTGGTGGTCTATGCTGT RV:GGAGGAGGAGACTGGAAAG FWM CTGTGGTGGTCTATGCTGT	44 pacientes 20 controles	39.7	60.4	64.6
	15 (TK)	248	Fw:TCAAACCTCCCACCAA Rv:GAGCAGGCAGAGGGAGGT Rvm:GAGCAGGCAGAGGGAGGT	44 pacientes 20 controles	41.3 41.3	58.8 58.8	65.1 66.0
	16 (TK)	299	Fw:GCTGACCAGCTCCGTCC Rv:GACACGGCACAGCAACTCT Rvm:GACACGGCACAGCAACTCT	44 pacientes 20 controles	39.6	60.5	64.0
EGFR	17 (TM)	237	Fw:ACCTCACCTTCCTGTCTCC Rv:CTGGCCCTGTCTCTGTCTC Rvm:CTGGCCCTGTCTCTGTCTC	44 pacientes 20 controles	41.8 41.8	58.3 58.3	62.0 65.6
	18 (TM)	225	Fw:GCTGAGGTGACCCTGTCTC Rv:CTCCCACCCAGACCATGA Rvm:CTCCCACCCAGACCATGA	44 pacientes 20 controles	42.3 44.8	57.8 55.3	61.0 64.0
	19 (TM)	252	Fw:GCATCGCTGTAAACATCCAC Rv:GAGAAAAGGTGGGCTGAG Rvm:GAGAAAAGGTGGGCTGAG	44 pacientes 20 controles	41.2	58.9	60.3
	20 (TM)	252	Fw:CCACACTGACGTGCTCTC Rv:TTATCTCCCTCCCGTATC Fwm CCACACTGACGTGCTCTC	44 pacientes 20 controles	41.2 43.7 43.7	58.9 56.4 56.4	61.2 64.8 65.5
	21 (TM)	309	Fw:GCAGAGCTTCTCCCATGAT Rv:ATCTCCCTGCATGTGTA Fwm GCAGAGCTTCTCCCATGAT	44 pacientes 20 controles	39.3 41.8	60.8 58.3	61.4 63.0
	22 (TK)	216	Fw:TGTGTACTCTGTAATTAGGTCCA Rv:AGCTTGGCCTCAGTACAAACTC Rvm:AGCTTGGCCTCAGTACAAACTC	44 pacientes 20 controles	42.7	57.4	59.2
	23 (TK)	254	Fw:CCCACTGCCTTCTTCTGTG Rv:GCCTCAGCTGTGTGGCTAAG Rvm:GCCTCAGCTGTGTGGCTAAG	44 pacientes 20 controles	41.1	59.0	60.5
	24 (TK)	284	Fw:GAAGTGTGCATACCAATG RV:GCTGGCATGTGACAGAACAC RVM:GCTGGCATGTGACAGAACAC	44 pacientes 20 controles	40.1	60.0	60.5
	25 (TK)	250	FW:AGCATCTTACGGCCATTC RV:CAGCTTGAGAGAGAGAGAGAGA CA RVM:CAGCTTGAGAGAAAGAGAGAG ACA	44 pacientes 20 controles	41.3 43.8	58.8 56.3	60.5 63.5
	26 (TK)	256	FW:CCATGGGCAACTTCTCTGT RV:CCAGGAGTCACGCTTTGAAC FWM CCAATGGGCAACTTCTCTGT	44 pacientes 20 controles	41.0	59.1	57.5
	27 (TK)	183	FW:CCGGAGTAACCTTCCCTCAT RV:AGGAGGTTGAGAGCAGGAC RVM:AGGAGGTTGAGAGCAGGAC	44 pacientes 20 controles	44.6	55.5	63.0

Anexo 4. Condiciones de los análisis de dHPLC realizados para cada uno de los genes de la familia CBL. Detalle de los cebadores empleados, tamaños de los fragmentos, temperaturas optimizadas de amplificación por PCR, temperaturas de análisis en el dHPLC y porcentajes de buffer empleadas y número de pacientes en los que se ha llevado a cabo el estudio.

Gen	Exón	Tamaño (pb)	Cebadores	Muestras	Condiciones de análisis		
					% Tampón A	% Tampón B	T ^a dHPLC (°C)
C-CBL	2 (N-adaptor)	319	Fw:GCCCTTCCTTTTCATTGTG Rv:GGCAGTCACAGACCTGCATA Fwm GCCCTTCCTTTTCATTGTG	44 pacientes 20 controles	39.0 39.0 46.5	61.1 61.1 53.6	56.7 58.0 60.7
	3 (EF-Hand like)	324	Fw:ATGGTGAATTTGGTGCATTT Rv:TTTTTCAGAGTCCCAAATTTTA Fwm ATGGTGAATTTGGTGCATTT	44 pacientes 20 controles	41.4 43.9	58.7 56.2	56.5 58.7
	4 (EF-Hand like)	290	Fw:GCTCTCCTTCCTTCCTTGA Rv:TCACCGAAGTAGCAGTAACCAG Fwm GCTCTCCTTCCTTCCTTGA	44 pacientes 20 controles	39.9 42.4	60.2 57.7	57.1 60.7
	5 (SH2 adaptor)	291	Fw:TGCCCTCTGAGTGGTGTGA Rv:AACCTTGGCTATIGCGAAAC Fwm TGCCCTCTGAGTGGTGTGA	44 pacientes 20 controles	39.8	60.3	59.8
	6 (SH2 adaptor)	265	Fw:TAICTTGCCTTGCCTTCCAC Rv:AGGTGGACAGCCCCTAAGT Rvm:AGGTGGAAAGCCCCTAAGT	44 pacientes 20 controles	40.7	59.4	57.5
	7 (SH2 adaptor)	243	Fw:ACACCAGTTGCCCTTTTAG Rv:AAGCTTGTGTCAGTGATATGG Rvm:AAGCTTGTGTCAGTGATATGG	44 pacientes 20 controles	41.5	58.6	58.5
	8 (Ring Finger)	386	Fw:GGACCAGACTAGATGCTTCT Rv:GGCCACCCCTGTATCAGTA Rvm:GGCCACCCCTGTATCAGTA	382 pacientes 20 controles	37.5 40.0 45.0	62.6 60.1 55.1	53.2 55.5 59.5
	9 (Ring Finger)	364	Fw:CTGGCTTTTGGGGTTAGGTT Rv:AATGGATTTGCCAGTCTCC RVM:AATGGATTTGCCAGTCTCC	382 pacientes 20 controles	40.5 40.5 43.0	59.6 59.6 57.1	58.5 59.5 61.5
	10 (dom. prolina)	260	Fw:CCATTTCCCAAACGAAAGT Rv:GCAGGGTGAAGCAAATCAG Rvm:GCAGGGTGAAGCAAATCAG	44 pacientes 20 controles	40.9 43.4 45.9	59.2 56.7 54.2	58.0 61.0 63.8
	11 (dom. prolina)	452	Fw:CTTTCACCTGCTTCCACAG Rv:CCTGGCCACACATATTTCTT Fwm CTTTCACCTGCTTCCACAG	44 pacientes 20 controles	36.4 36.4 38.9	63.7 63.7 61.2	59.5 60.6 62.4
	12 (dom. prolina)	240	Fw:CAGAGGCTCAGCTGTGGTAA Rv:ACACTTTTCIGGGTTTCTCAA Fwm CAGAGGCTCAGCTGTGGTAA	382 pacientes 220 controles	41.7 46.7	58.4 53.4	57.5 59.5
	13	263	Fw:GGTGACATGATTTTGTCTGTTC Rv:CCCCAAAAGGGTGTGTGTA Rvm:CCCCAAAAGGGTGTGTGTA	44 pacientes 20 controles	43.3 45.8	56.8 54.3	60.5 61.5
	14	267	Fw:TGGCAAAACGAGAAGATGAA Rv:CAAGCTATCTCAATGCCAAATA Rvm:CAAGCTATCTCAATGCCAAATA	44 pacientes 20 controles	43.1 45.6	57.0 54.5	59.0 60.0
	15	272	Fw:GATGAAGTCCGTCAGAAGAAGA Rv:CACACTGCCATTCAGGACAA Rvm:CACACTGCCATTCAGGACAA	44 pacientes 20 controles	40.5 40.5 48.0	59.6 59.6 52.1	60.0 61.8 66.0
	16 (UBA)	249	Fw:AAATGAGGATTTCCCAAGATT Rv:AAGCTTTCTGGATGCTCTGGT Rvm:AAGCTTTCTGGATGCTCTGGT	44 pacientes 20 controles	41.3 43.8 43.8 46.3	58.8 56.3 56.3 53.8	58.1 62.0 63.0 64.5

Anexo 4. Continuación.

Gen	Exón	Tamaño (pb)	Cebadores	Muestras	Condiciones de análisis		
					% Tampón A	% Tampón B	T ^a dHPLC (°C)
CBL-B	2 (N-adaptor)	316	Fw:CCCCGCCCATGGAGGAAGATGCAGTGGT Rv:CAGGCAACGTCAGACAGAAC Rvm:CAGGCAACGGCAGACAGAAC	44 pacientes 20 controles	39.1 41.6 44.1	61.0 58.5 56.0	56.0 59.0 61.5
	3 (N-adaptor)	385	Fw:TGGAAAATGAAGAAATAGGACA Rv:TGACCTTTACACAAAACATCTG Rvm:TGACCTTTACGCCAAAACATCTG	44 pacientes 20 controles	37.5 40.0	62.6 60.1	55.0 56.0
	4 (N-adaptor)	211	Fw:TTTTCCCTTGTCCTACAG Rv:CCTTGAAAGATAGATCCACAGC Fwm:TTTTCCCTCGTGCTACAG	44 pacientes 20 controles	43.0 45.5	57.1 54.6	56.5 58.8
	5 (EF-Hand like)	277	Fw:TGCTGCTTCAAAGGGAGGTA Rv:GGGAGAGAGAAGAAGGGAATG Rvm:GGGAGAGAGAGCGAAGGGAATG	44 pacientes 20 controles	40.3 42.8 45.3	59.8 57.3 54.8	55.5 58.0 59.5
	6 (EF-Hand like)	353	Fw:TGACCTAAACCACATAAGGTGAGA Rv:ATCAGCGGGTATTGCTGACT Rvm:ATCAGCGGGCTTGCTGACT	44 pacientes 20 controles	40.7	59.4	57.2
	7 (SH2 adaptor)	322	Fw:CCGCCGATGGAGAAGTACATTGTGCTAAA Rv:GCACTCCAACCTCCATTTCCTC Rvm:GCACTCCAACCTCCATTTCCTC	44 pacientes 20 controles	39.0 44.0	61.1 56.1	55.0 58.6
	8 (SH2 adaptor)	296	Fw:TGAAAAGGAAACATCCAATGTGA Rv:ATTTATTTCAAGGGCATTATGG Rvm:ATTTATTTCAAGGGCATTATGG	44 pacientes 20 controles	39.7 42.2	60.4 57.9	53.7 55.0
	9 (Ring Finger)	348	Fw:TCGACAAGGTCAATTGTGAGAT Rv:CGGCGCCAGCATTACTTCTAAACCAT Fwm:TCGACAAGGTCAATTGTGAGAT	382 pacientes 20 controles	40.8 43.3	59.3 56.8	56.3 58.4
	10 (Ring Finger)	294	Fw:TCCATGCATTTTCTATTGTTTAG Rv:GCCGCCGATCATTTCTTTTCATATGGT Fwm:TCCATGCATTTTCTATTGTTTAG	382 pacientes 20 controles	39.8 42.3	60.3 57.8	58.3 60.5
	11	375	Fw:CAGCGGCATCTTCTCTTTT Rv:CGGCCGAATGIGGGCTACCATAAA Fwm:CAGCGGCATCTTCTCTTTT	44 pacientes 20 controles	40.2 45.2	59.9 54.9	58.4 61.1
	12A	256	Fw:TGTCAGTGCATGGTACAACCT Rv:GGGACCATGCTTCAAGA Rvm:GGGACCATGCTTCAAGA	44 pacientes 20 controles	41.0 43.5	59.1 56.6	57.4 61.2
	12B	302	Fw:CACCAATCCCACCAGACAAT Rv:GCCGCCGCTTCTGCTTTGGCTATTCTT Fwm:CACCAATCCCACCAGACAAT	44 pacientes 20 controles	39.5 39.5	60.6 60.6	60.3 61.5
	13 (dom. prolina)	301	Fw:TTGGGCAGTGGTGAATCAT Rv:CAAGTGATCTCCAAATCAACAA Rvm:CAAGTGATCTCCAAATCAACAA	44 pacientes 20 controles	39.5 44.5	60.6 55.6	57.1 59.7
	14 (dom. prolina)	242	Fw:TGTCACATCAGACTTGCCTGT Rv:GTGGCAAAAATCTGCCATA Rvm:GTGGCAAAAATCTGCCATA	44 pacientes 20 controles	41.6	58.5	58.2
	15 (dom. prolina)	400	Fw:TTGTGGCCCTTGTAATCTTG Rv:TGCCITTTAAATCTGACCATTAAAG Rvm:TGCCITTTAAAGCTGACCATTAAAG	44 pacientes 20 controles	37.3 44.8	62.8 55.3	54.0 56.6
	16 (dom. prolina)	248	Fw:TGGTCAGAATTTAAAGGCAAAA Rv:GCCGCCAGGGGTGGTGTTCAAAA Rvm:GGCGGCAGGGGTGGTGTTCAAAA	44 pacientes 20 controles	41.3 43.8	58.8 56.3	57.6 61.0
	17 (dom. prolina)	298	Fw:CTGCTGATATCGACCTTCTTT Rv:CACCCAGGGATTTTCTGT Fwm:CTGCTGATATCGACCTTCTTT	44 pacientes 20 controles	42.1 44.6	58.0 55.5	58.5 60.8
	18	287	Fw:TCAGCCAATCAACAGAGATCA Rv:TCTTGGGIGGACAACATTCA Fwm:TCAGCCAATCAACAGAGATCA	44 pacientes 20 controles	40.0 45.0	60.1 55.1	55.5 58.5
	19 (UBA)	357	Fw:TTGCCTTCATTTTATTTCAGT Rv:GGCGGCTTGCTTCCATTTGGTGTCT Rvm:GGCGGCTTGCTTCCATTTGGTGTCT	44 pacientes 20 controles	38.1 38.1 40.6	62.0 62.0 59.5	59.5 60.0 62.0

Anexo 4. Continuación.

Gen	Exón	Tamaño (pb)	Cebadores	Muestras	Condiciones de análisis		
					% Tampón A	% Tampón B	T ^a dHPLC (°C)
CBL-C T ^a emp. PCR 59 °C ; 1,5 mM de MgCl ₂	1 (N-adaptor)	397	Fw:GAGGCTCCCATGGCTCTG Rv:ACCCAGAGGACTTTGTCTG Fwm GAGGCTCCATGGCTCTG	44 pacientes 20 controles	37.3 37.3 37.3	62.8 62.8 62.8	65.0 66.8 69.0
	2 (N-adaptor)	294	Fw:CCCAAGGATAGCCAGAGTCC Rv:AGCCTATGATGGGAGGGTCT Fwm CCCAAGGATCCGACAGATCC	44 pacientes 20 controles	39.8	60.3	64.2
	3 (EF-Hand like)	264	Fw:ACCCTCCCATCATAGGCTCT Rv:TCCTCTGGACCCAAGTCTA Fwm ACCCTCCCATATAGGCTCT	44 pacientes 20 controles	40.7 43.2	59.4 56.9	63.0 65.1
	4 (EF-Hand like)	250	Fw:AAGGAGGTGGTTGGATCCTC Rv:GCAGCCTGTCTGCTGAG Rvm:GCAGCCTGTCTGCTGAG	44 pacientes 20 controles	41.3	58.8	63.5
	5 (SH2 adaptor)	300	Fw:ACAAAAGGGATGGCAGTGAC Rv:GAATGGTIGCACCCCTCAAAC Fwm ACAAAGGGATGGCAGTGAC	44 pacientes 20 controles	39.6 39.6	60.5 60.5	62.0 63.2
	6 (SH2 adaptor)	315	Fw:TGGATTTGGGACAGATCCTC Rv:AGAGCCACCAAGCCAACAT Rvm:AGAGCCACCAAGCCAACAT	44 pacientes 20 controles	39.2 44.2	60.9 55.9	62.5 65.0
	7 (Ring Finger)	296	Fw:CCGAGGTTTGGGATTTTCTT Rv:GAGATCCTTTTGGGCTTTC Rvm:GAGATCCTTTTGGGCTTTC	382 pacientes 20 controles	39.7 44.7	60.4 55.4	63.0 65.5
	8 (Ring Finger)	307	Fw:CGTCTCCCTTCTCTGCTG RV:AGGAATTTGGATTCAGCTC RVM:AGGAATTTGATTCAGCTC	382 pacientes 20 controles	39.4 41.9	60.7 58.2	64.0 64.5
	9 (dom. prolina)	245	Fw:CGAGAAGAAAATGGCAGCTC Rv:ATGGGTGCCAAGGATGAGT Rvm:ATGGGTGCCAAGGATGAGT	44 pacientes 20 controles	41.5	58.6	64.5
	10 (dom. Prolina)	243	Fw:ACAAAGGGACAGGAAGAG Rv:GGAGAGAGGGTGGTTAGA Rvm:GGAGAGAGGATGGTTAGA	44 pacientes 20 controles	41.5 46.5	58.6 53.6	61.5 65.0

Anexo 5. Características de los vectores empleados en cada caso. Excepto el vector para la Ubiquitina, el resto fue obtenido de la casa comercial Origene.

	C-CBL	CBL-B	CBL-C	FLT3	RFP	UBI
Tipo Vector	pCMV6-AC-GFP	pCMV6-AC-GFP	pCMV6-AC-GFP	pCMV6-Entry	pCMV6-AC-RFP	pCMV-HA
Tamaño vector	6.6 kb	6.6 kb	6.6 kb	4.9 kb	6.6 kb	3.8 kb
Referencia Origen	RG214069	RG206047	RG205130	RC211459	PS100034	-
RefSeq	NM_005188	NM_170662	NM_012116	NM_004119	-	NM_021009
Tamaño ORF	2721 pb	2949 pb	1425 pb	2982 pb	-	2058 pb
Enzimas restricción	<i>SgfI</i> - <i>Mlu</i> I	<i>SgfI</i> - <i>Mlu</i> I	<i>SgfI</i> - <i>Mlu</i> I	<i>SgfI</i> - <i>Mlu</i> I	<i>SgfI</i> - <i>Mlu</i> I	<i>Xba</i> I
Gen de selección	Amp ^R	Amp ^R	Amp ^R	Kan ^R	Amp ^R	Amp ^R
Neo^R	SI	SI	SI	SI	SI	NO

Anexo 6. Cebadores diseñados mediante mutagénesis dirigida con el programa *QuikChange® Primer Design* (<http://www.genomics.agilent.com/>). Empleando estos cebadores pudimos obtener los vectores de expresión con cada una de las mutaciones detectadas previamente mediante dHPLC para los ensayos funcionales de los genes C-CBL, CBL-B y CBL-C.

Gen	Cambio		Secuencia 5'→3'	Tamaño (pb)	T _m	% G+C
C-CBL	p.R420Q (1397 G>A)	Fw	GGGCTGTCTTCTGCCAATGTGAAATTAAGGTAC	36	78.19°C	41.7%
		Rv	GTACCTTTAATTCACATIGGCAGAAAGGACAGCCC	36	78.19°C	44.4%
	p.C416W (1386 T>G)	Fw	GAAGGTCAGGGCTGGCCCTTCTGCCGATG	29	78.81°C	62.1%
		Rv	CATCGGCAGAAAGGCCAGCCCTGACCTTC	29	78.81°C	62.1%
	p.P417R (1388 C>G)	Fw	AGGTCAGGGCTGTCGTTCTGCCGATGTG	29	78.81°C	58.6%
		Rv	CACATCGGCAGAAACGACAGCCCTGACCT	29	78.81°C	58.6%
p.T402HfsX29 (1342A>-)	Fw	GTGGACACCTCATGTGCCATCCTGTCTTACATCC	34	80.41°C	52.9%	
	Rv	GGATGTAAGACAGGATGGCACATGAGGTGCCAC	34	80.41°C	52.9%	
p.S675C (2162 C>G)	Fw	CTCATCTGCCAATGCCATTTATIGTCTGGCTGCCAG	36	80.47°C	50%	
	Rv	CTGGCAGCCAGACAATAAATGGCATTGGCAGATGAG	36	80.47°C	50%	
p.A678V (2171 T>G)	Fw	CATTTATCTCTGGCTGTGACACCTCTTCCTGTGC	35	79.27°C	48.6%	
	Rv	GCACAGGAAGAGGCTGACAGCCAGAGAATAAATG	35	79.27°C	48.6%	
CBL-B	p.R462W (1709 C>T)	Fw	GTGAGGAGTCCTTGATGATGAATGGTTGGCAAACG	36	79.33°C	47.2%
		Rv	CGTTTGCCAACCAATTCATCAAGGACTCCTCAC	36	79.33°C	47.2%
CBL-C	p.E392K (1237 G>A)	Fw	CCTTCGCGCTGCAAGATCAAGGGCTGG	29	80.22°C	62.1%
		Rv	CCAGCCCTTGATCTTGCAGCGCAGAAAGG	29	80.22°C	62.1%
	p.Q419P (1316 ->C)	Fw	GAACAGCAGTGACCAGGAAGGCAGGGAG	29	78.71°C	62.1%
		Rv	CTCCCTGCCTTCTGGGTCACITGCTGTTTC	29	78.71°C	62.1%
	p.P435S (1366 C>T)	Fw	CCTTCGGCTCCTTCATGCCCCACG	27	78.61°C	63%
		Rv	CGTGGGGCAATGAAGGAGCCGAAAGG	27	78.61°C	63%

Anexo 7. Resultados obtenidos en el análisis de FISH de los 34 pacientes.

Individuo	Cultivo	NMPC	Gen								
			ETV6	ABL1	ABL2	SYK	ZAP70	FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGFR4
9606	27238	MFI	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
16544	22106	MFI	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
19537	26717	PV	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	No analizado*	No analizado*	Normal	No analizado*
21762	30217	PV	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	No analizado*	No analizado*	Normal	No analizado*
14886	19492	TE	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
15703	20792	TE	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	No analizado*	No analizado*	No analizado*	No analizado*
16659	22291	TE	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
16732	22837	TE	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
16737	22419	TE	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
16787	22502	TE	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
17157	23323	TE	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
17503	23739	TE	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
18059	24700	TE	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	No analizado*	No analizado*	Normal	No analizado*
18714	25676	TE	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	No analizado*	No analizado*	Normal	No analizado*
13674	17657	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
14171	18415	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
14549	18977	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	No analizado*	No analizado*	No analizado*	No analizado*
14752	19306	NMPCa	Normal	Normal	Normal	No analizado*	Normal	No analizado*	No analizado*	No analizado*	No analizado*
14895	19515	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
14920	19550	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
15081	19799	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
15938	21160	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
16572	23455	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
17865	24315	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
18148	24769	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
18331	25054	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
18634	25553	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
10750	15458	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
11134	13795	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
11615	14507	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
13633	17586	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
16899	22720	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
18912	25833	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
18927	25856	NMPCa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

* No analizado por carecer de material suficiente para realizar todos los ensayos de FISH

Anexo 8. Resultados obtenidos en la cuantificación relativa mediante RQ-PCR de la expresión los genes *SYK*, *ABL1*, *ABL2*, *FGFR1* y *JAK2*. La tabla recoge los datos de C_T obtenidos (la media del triplicado), el valor ΔC_T^* , y los valores de $\Delta\Delta C_T^{**}$ y RQ^{***} , tomando como calibrador la sangre periférica (C1-SP, columnas 4 y 8) y tomando como calibrador la médula ósea (C2-MO, columnas 5 y 9), para cada muestra (filas).

SYK									
	ENSAYO A Hs00374292_m1				ENSAYO B Hs00895375_m1				TBP Hs00427620_m1
MUESTRA	Avg Ct (Ct std err)	ΔC_T (Ct std err)	$\Delta\Delta C_T$ RQ (vs SP)	$\Delta\Delta C_T$ RQ (vs MO)	Avg Ct (Ct std err)	ΔC_T (Ct std err)	$\Delta\Delta C_T$ RQ (vs SP)	$\Delta\Delta C_T$ RQ (vs MO)	Avg Ct (Ct std err)
MFI-1	32.178 (0.123)	1.882 (0.135)	4.884 0.034	5.961 0.017	30.635 (0.32)	0.339 (0.089)	0.486 0.714	3.964 0.064	30.296 (0.054)
MFI-2	31.032 (0.041)	-6.036 (0.047)	-3.033 8.191	-2.057 4.161	31.989 (0.038)	-5.079 (0.045)	-3.643 12.497	-1.454 2.740	37.068 (0.024)
PV-1	30.424 (0.002)	-4.360 (0.083)	-1.358 2.563	-0.381 1.302	31.647 (0.078)	-3.137 (0.094)	-2.015 4.041	0.488 0.713	34.784 (0.083)
TE-1	22.207 (0.006)	-4.993 (0.021)	-1.991 3.975	-1.014 2.020	23.740 (0.002)	-3.460 (0.022)	-2.635 6.210	0.165 0.892	27.200 (0.019)
TE-2	31.343 (0.012)	-6.843 (0.120)	-3.840 14.323	-2.863 7.275	32.498 (0.067)	-5.687 (0.137)	-4.252 19.048	-2.062 4.176	38.185 (0.120)
TE-3	29.492 (0.039)	-3.746 (0.039)	-0.743 1.674	0.233 0.851	30.141 (0.041)	-3.097 (0.041)	-1.662 3.165	0.528 0.694	33.238 (0.005)
TE-4	32.727 (0.024)	-2.309 (0.194)	-0.467 1.382	1.670 0.314	32.307 (0.023)	-2.729 (0.195)	-1.294 2.452	0.896 0.537	35.036 (0.085)
TE-5	30.315 (0.007)	-3.750 (0.226)	-0.747 1.679	0.229 0.853	30.643 (0.052)	-3.422 (0.232)	-1.987 3.964	0.203 0.869	34.065 (0.225)
TE-6	30.084 (0.024)	-5.165 (0.028)	-2.162 4.477	-1.185 2.274	31.434 (0.066)	-3.814 (0.068)	-2.379 5.201	-0.189 1.140	35.248 (0.015)
TE-7	19.957 (0.068)	-5.573 (0.069)	-2.571 5.942	-1.595 3.021	20.582 (0.001)	-4.948 (0.009)	-3.513 11.424	-1.324 2.504	25.531 (0.009)
NMPCa-1	26.072 (0.015)	-6.970 (0.030)	-3.967 15.643	-2.991 7.950	27.199 (0.027)	-5.843 (0.038)	-4.408 21.230	-2.218 4.652	33.042 (0.026)
NMPCa-2	30.564 (0.006)	-5.356 (0.126)	-2.354 5.111	-1.377 2.597	30.902 (0.017)	-5.018 (0.127)	-3.583 11.982	-1.393 2.626	35.920 (0.125)
NMPCa-3	29.850 (0.043)	-4.990 (0.115)	-1.988 3.967	-1.011 2.015	30.706 (0.002)	-4.134 (0.107)	-2.699 6.494	-0.509 1.423	34.840 (0.107)
NMPCa-4	19.892 (0.030)	-6.796 (0.041)	-3.794 13.871	-2.817 7.047	23.176 (0.049)	-3.512 (0.056)	-2.076 4.217	0.113 0.925	26.688 (0.028)
NMPCa-5	31.340 (0.063)	-0.943 (0.078)	2.059 0.240	3.036 0.122	29.954 (0.031)	-2.329 (0.055)	-0.893 1.858	1.296 0.407	32.283 (0.046)
NMPCa-6	25.034 (0.075)	-4.290 (0.076)	-1.288 2.442	-0.311 1.241	25.437 (0.005)	-3.887 (0.009)	-2.452 5.473	-0.262 1.199	29.324 (0.008)
C1-SP	25.467 (0.084)	-3.002 (0.100)	0.000 1.000	0.977 0.508	27.034 (0.005)	-1.436 (0.055)	0.000 1.000	2.190 0.219	28.469 (0.054)
C2-MO	27.175 (0.012)	-3.979 (0.187)	-0.977 1.968	0.000 1.000	27.529 (0.032)	-3.625 (0.046)	-2.190 4.563	0.000 1.000	31.154 (0.006)

* Valor ΔC_T de cada muestra: $\Delta C_T = (C_T \text{ gen diana} - C_T \text{ TBP})$

** Valor $\Delta\Delta C_T$ de cada muestra: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ muestra} - \Delta C_T \text{ calibrador}$

*** Valor RQ de cada muestra: $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$, tomando como calibrador la SP (C1-SP) y la MO (C2-MO)

Anexo 8. Continuación

ABL1									
	ENSAYO A Hs00943648_m1				ENSAYO B Hs00943653_m1				TBP Hs00427620_m1
MUESTRA	Avg Ct (Ct std err)	Δ Ct (Ct std err)	$\Delta\Delta$ Ct RQ (vs SP)	$\Delta\Delta$ Ct RQ (vs MO)	Avg Ct (Ct std err)	Δ Ct (Ct std err)	$\Delta\Delta$ Ct RQ (vs SP)	$\Delta\Delta$ Ct RQ (vs MO)	Avg Ct (Ct std err)
MFI-1	37.705 (0.220)	6.161 (0.226)	8.616 0.003	6.591 0.010	35.261 (0.102)	3.718 (0.127)	5.556 0.021	4.663 0.039	31.544 (0.075)
MFI-2	37.467 (0.080)	-1.725 (0.232)	0.730 0.603	-1.295 2.454	37.253 (0.106)	-1.939 (0.242)	-0.101 1.072	-0.993 1.990	39.192 (0.217)
PV-1	35.988 (0.121)	0.996 (0.250)	3.451 0.091	1.426 0.372	34.217 (0.193)	-0.775 (0.226)	1.063 0.479	0.171 0.888	34.992 (0.010)
TE-1	26.550 (0.042)	-0.887 (0.048)	1.568 0.337	-0.457 1.373	26.074 (0.010)	-1.363 (0.026)	0.476 0.719	-0.417 1.335	27.437 (0.024)
TE-3	32.983 (0.027)	1.424 (0.190)	3.880 0.068	1.855 0.276	33.169 (0.124)	1.611 (0.225)	3.449 0.092	2.557 0.170	31.558 (0.188)
TE-4	35.844 (0.035)	0.219 (0.089)	2.674 0.157	0.648 0.638	34.726 (0.148)	-0.900 (0.169)	0.939 0.522	0.046 0.969	35.626 (0.082)
TE-5	36.109 (0.075)	0.565 (0.241)	3.020 0.123	0.995 0.502	36.009 (0.009)	0.465 (0.230)	2.304 0.203	1.411 0.376	35.544 (0.229)
TE-6	34.388 (0.093)	-0.011 (0.173)	2.444 0.184	0.419 0.748	33.078 (0.042)	-1.321 (0.152)	0.518 0.699	-0.375 1.297	34.399 (0.146)
TE-7	24.249 (0.010)	-1.468 (0.043)	0.987 0.504	-1.038 2.053	23.559 (0.020)	-2.158 (0.046)	-0.319 1.248	-1.212 2.317	25.717 (0.042)
NMPCa-1	34.013 (0.051)	0.926 (0.229)	3.381 0.096	1.356 0.391	32.717 (0.042)	-0.370 (0.227)	1.468 0.361	0.576 0.671	33.087 (0.223)
NMPCa-3	34.087 (0.050)	-0.755 (0.112)	1.700 0.308	-0.325 1.253	34.067 (0.002)	-0.775 (0.101)	1.064 0.478	0.171 0.888	34.842 (0.101)
NMPCa-4	29.508 (0.024)	0.915 (0.037)	3.370 0.097	1.356 0.391	29.187 (0.134)	0.594 (0.137)	2.432 0.185	1.540 0.344	28.593 (0.027)
NMPCa-5	38.121 (0.029)	3.506 (0.047)	5.962 0.016	3.937 0.066	36.110 (0.075)	1.496 (0.084)	3.334 0.099	2.442 0.184	34.614 (0.037)
NMPCa-6	35.916 (0.021)	3.739 (0.213)	6.194 0.013	4.169 0.056	33.963 (0.142)	1.786 (0.215)	3.624 0.081	2.732 0.151	32.177 (0.047)
C1-SP	26.014 (0.001)	-2.455 (0.054)	0.000 1.000	-2.025 4.070	26.631 (0.004)	-1.838 (0.055)	0.000 1.000	-0.892 1.856	28.469 (0.054)
C2-MO	29.751 (0.085)	-0.430 (0.140)	2.025 0.246	0.000 1.000	29.235 (0.057)	-0.946 (0.176)	0.892 0.539	0.000 1.000	30.181 (0.254)

* Valor ΔC_T de cada muestra: $\Delta C_T = (C_T \text{ gen diana} - C_T \text{ TBP})$

** Valor $\Delta\Delta C_T$ de cada muestra: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ muestra} - \Delta C_T \text{ calibrador}$

*** Valor RQ de cada muestra: $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$, tomando como calibrador la SP (C1-SP) y la MO (C2-MO)

Anexo 8. Continuación

ABL2									
	ENSAYO A Hs00943648_m1				ENSAYO B Hs00943653_m1				TBP Hs00427620_ m1
MUESTRA	Avg Ct (Ct std err)	Δ Ct (Ct std err)	$\Delta\Delta$ Ct RQ (vs SP)	$\Delta\Delta$ Ct RQ (vs MO)	Avg Ct (Ct std err)	Δ Ct (Ct std err)	$\Delta\Delta$ Ct RQ (vs SP)	$\Delta\Delta$ Ct RQ (vs MO)	Avg Ct (Ct std err)
MFI-1	38.188 (0.194)	7.025 (0.221)	4.128 0.057	4.786 0.036	39.544 (0.216)	8.381 (0.485)	6.356 0.012	5.824 0.018	31.163 (0.106)
PV-1	38.138 (0.155)	3.136 (0.136)	0.239 0.847	0.897 0.537	38.353 (0.176)	3.352 (0.176)	1.327 0.399	0.794 0.577	35.002 (0.002)
TE-1	31.294 (0.098)	4.645 (0.129)	1.748 0.298	2.406 0.189	32.204 (0.084)	5.555 (0.119)	3.530 0.087	2.998 0.125	26.649 (0.084)
TE-3	34.065 (0.193)	3.083 (0.201)	0.186 0.880	0.843 0.557	36.317 (0.056)	5.335 (0.077)	3.310 0.101	2.777 0.146	30.983 (0.053)
TE-5	38.404 (0.012)	1.961 (0.068)	-0.936 1.914	-0.278 1.213	38.472 (0.158)	4.029 (0.172)	2.004 0.249	1.472 0.360	34.443 (0.067)
TE-7	29.508 (0.031)	3.653 (0.097)	0.756 0.592	1.414 0.375	30.804 (0.117)	4.948 (0.149)	2.923 0.132	2.392 0.191	25.855 (0.092)
NMPCa-1	35.640 (0.202)	2.775 (0.203)	-0.122 1.088	0.536 0.690	38.008 (0.117)	5.143 (0.118)	3.118 0.115	2.586 0.167	32.965 (0.019)
NMPCa-3	38.580 (0.040)	1.465 (0.126)	-1.432 2.700	-0.775 1.711	39.211 (0.124)	4.095 (0.129)	2.070 0.238	1.538 0.344	35.116 (0.012)
NMPCa-4	28.663 (0.093)	0.502 (0.100)	-2.394 5.258	-1.737 3.333	28.302 (0.116)	0.141 (0.122)	-1.884 3.691	-2.416 5.337	28.161 (0.038)
NMPCa-5	37.533 (0.049)	3.185 (0.061)	0.288 0.819	0.946 0.519	39.632 (0.236)	5.284 (0.239)	3.259 0.104	2.727 0.151	34.348 (0.035)
NMPCa-6	35.237 (0.045)	3.146 (0.072)	0.250 0.841	0.907 0.533	37.748 (0.011)	5.658 (0.057)	3.633 0.081	3.100 0.117	32.091 (0.056)
C1-SP	32.188 (0.240)	2.897 (0.342)	0.000 1.000	0.658 0.634	31.316 (0.116)	2.025 (0.269)	0.000 1.000	-0.532 1.446	29.291 (0.243)
C2-MO	34.091 (0.017)	2.239 (0.062)	-0.658 1.578	0.000 1.000	34.409 (0.068)	2.557 (0.065)	0.532 0.692	0.000 1.000	31.852 (0.021)

* Valor ΔC_T de cada muestra: $\Delta C_T = (C_T \text{ gen diana} - C_T \text{ TBP})$

** Valor $\Delta\Delta C_T$ de cada muestra: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ muestra} - \Delta C_T \text{ calibrador}$

*** Valor RQ de cada muestra: $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$, tomando como calibrador la SP (C1-SP) y la MO (C2-MO)

Anexo 8. Continuación.

FGFR1									
	ENSAYO A Hs00241111_m1				ENSAYO B Hs00915129_m1				TBP Hs00427620_m1
MUESTRA	Avg Ct (Ct std err)	Δ Ct (Ct std err)	$\Delta\Delta$ Ct RQ (vs SP)	$\Delta\Delta$ Ct RQ (vs MO)	Avg Ct (Ct std err)	Δ Ct (Ct std err)	$\Delta\Delta$ Ct RQ (vs SP)	$\Delta\Delta$ Ct RQ (vs MO)	Avg Ct (Ct std err)
MFI-2	37.415 (0.145)	-0.137 (0.149)	-2.052 4.147	0.649 0.638	36.064 (0.212)	-1.488 (0.214)	-3.102 8.586	1.956 0.258	37.552 (0.033)
PV-1	37.855 (0.064)	2.386 (0.087)	0.470 0.722	3.171 0.111	37.219 (0.040)	1.749 (0.071)	0.135 0.911	5.193 0.027	35.470 (0.058)
TE-1	29.910 (0.030)	2.578 (0.111)	0.663 0.632	3.364 0.097	27.863 (0.007)	0.531 (0.107)	-1.083 2.118	3.975 0.064	27.332 (0.106)
TE-3	35.396 (0.176)	3.845 (0.184)	1.931 0.262	4.632 0.040	33.741 (0.103)	2.191 (0.115)	0.577 0.670	5.635 0.020	31.550 (0.053)
TE-4	38.763 (0.220)	2.848 (0.263)	0.933 0.524	3.634 0.081	36.558 (0.132)	0.644 (0.196)	-0.971 1.960	4.087 0.059	35.915 (0.145)
TE-6	36.311 (0.132)	1.326 (0.151)	-0.590 1.505	2.111 0.231	33.785 (0.075)	-1.200 (0.104)	-2.815 7.037	2.243 0.211	34.986 (0.073)
TE-7	25.427 (0.008)	-1.987 (0.197)	-3.902 14.945	-1.200 2.297	24.630 (0.003)	-2.783 (0.196)	-4.398 21.076	0.661 0.632	27.413 (0.196)
NMPCa-1	35.078 (0.004)	0.513 (0.119)	-1.402 2.643	1.299 0.406	33.922 (0.046)	-0.643 (0.127)	-2.257 4.780	2.801 0.143	34.565 (0.119)
NMPCa-2	37.627 (0.119)	0.747 (0.320)	-1.168 2.247	1.534 0.345	37.079 (0.071)	0.200 (0.305)	-1.414 2.665	3.644 0.080	36.879 (0.297)
NMPCa-4	27.910 (0.010)	0.245 (0.144)	-1.670 3.182	1.032 0.489	26.873 (0.057)	-0.791 (0.154)	-2.405 5.298	2.653 0.159	27.664 (0.144)
NMPCa-6	32.870 (0.024)	2.681 (0.089)	0.766 0.588	3.467 0.090	28.777 (0.020)	-1.412 (0.088)	-3.026 8.147	2.032 0.245	30.189 (0.085)
C1-SP	31.206 (0.045)	1.915 (0.247)	0.000 1.000	2.701 0.154	30.905 (0.045)	1.614 (0.247)	0.000 1.000	5.058 0.030	29.291 (0.243)
C2-MO	32.008 (0.025)	-0.786 (0.144)	-2.701 6.504	0.000 1.000	29.350 (0.112)	-3.444 (0.120)	-5.058 33.31	0.000 1.000	32.794 (0.141)

* Valor ΔC_T de cada muestra: $\Delta C_T = (C_T \text{ gen diana} - C_T \text{ TBP})$

** Valor $\Delta\Delta C_T$ de cada muestra: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ muestra} - \Delta C_T \text{ calibrador}$

*** Valor RQ de cada muestra: $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$, tomando como calibrador la SP (C1-SP) y la MO (C2-MO)

Anexo 8. Continuación.

JAK2									
MUESTRA	ENSAYO A Hs01078134_m1				ENSAYO B Hs01078128_m1				TBP Hs00427620_ m1
	Avg Ct (Ct std err)	Δ Ct (Ct std err)	$\Delta\Delta$ Ct RQ (vs SP)	$\Delta\Delta$ Ct RQ (vs MO)	Avg Ct (Ct std err)	Δ Ct (Ct std err)	$\Delta\Delta$ Ct RQ (vs SP)	$\Delta\Delta$ Ct RQ (vs MO)	Avg Ct (Ct std err)
MFI-1	35.610 (0.105)	3.906 (0.085)	3.195 0.109	2.917 0.132	32.289 (0.076)	0.585 (0.114)	0.294 0.816	-0.737 1.667	31.704 (0.085)
MFI-2	37.906 (0.035)	1.852 (0.244)	0.941 0.521	0.663 0.632	36.958 (0.055)	0.704 (0.247)	0.413 0.751	-0.618 1.535	36.254 (0.241)
PV-1	37.085 (0.180)	1.861 (0.150)	1.150 0.451	0.872 0.546	35.169 (0.029)	-0.055 (0.193)	-0.346 1.271	-1.377 2.597	35.224 (0.191)
TE-1	28.364 (0.012)	1.623 (0.097)	0.912 0.531	0.634 0.644	28.498 (0.020)	1.756 (0.098)	1.466 0.362	0.435 0.740	26.741 (0.096)
TE-2	36.074 (0.019)	-0.142 (0.020)	-0.853 1.806	-1.131 2.190	33.716 (0.091)	-2.500 (0.091)	-2.791 6.921	-3.822 14.143	36.216 (0.005)
TE-3	32.163 (0.097)	0.742 (0.145)	0.031 0.979	-0.247 1.187	30.905 (0.039)	-0.516 (0.115)	-0.807 1.750	-1.838 3.575	31.421 (0.108)
TE-4	36.075 (0.039)	-0.153 (0.048)	-0.864 1.820	-1.142 2.207	35.170 (0.083)	-1.059 (0.088)	-1.349 2.547	-2.380 5.205	36.228 (0.028)
TE-5	36.332 (0.283)	1.159 (0.299)	0.448 0.733	0.170 0.889	35.270 (0.128)	0.097 (0.160)	-0.194 1.144	-1.225 2.338	35.173 (0.096)
TE-6	35.313 (0.019)	0.586 (0.165)	-0.125 1.091	-0.403 1.322	33.551 (0.024)	-1.176 (0.166)	-1.467 2.764	-2.498 5.649	34.727 (0.164)
TE-7	27.143 (0.083)	1.005 (0.102)	0.294 0.816	-0.016 0.989	25.364 (0.078)	-0.774 (0.098)	-1.065 2.092	-2.096 4.275	26.138 (0.060)
NMPCa-1	32.553 (0.019)	-0.465 (0.107)	-1.176 2.259	-1.454 2.740	32.591 (0.180)	-0.426 (0.209)	-0.718 1.645	-1.749 3.361	33.018 (0.105)
NMPCa-2	38.108 (0.222)	0.859 (0.277)	0.148 0.903	-0.130 1.094	36.358 (0.412)	-0.892 (0.443)	-1.182 2.269	-2.213 4.636	37.249 (0.165)
NMPCa-3	34.150 (0.129)	-1.190 (0.174)	-1.901 3.735	-2.179 4.528	34.172 (0.629)	-1.168 (0.630)	-1.459 2.749	-2.490 5.618	35.340 (0.116)
NMPCa-4	28.515 (0.024)	0.580 (0.173)	-0.131 1.095	-0.409 1.328	27.162 (0.087)	-0.774 (0.192)	-1.064 2.091	-2.095 4.272	27.935 (0.172)
NMPCa-6	35.537 (0.064)	3.424 (0.084)	2.713 0.153	2.435 0.185	33.686 (0.023)	1.573 (0.059)	1.282 0.411	-0.251 0.840	32.113 (0.054)
C1-SP	29.180 (0.058)	0.711 (0.079)	0.000 1.000	-0.278 1.213	28.760 (0.070)	0.291 (0.089)	0.000 1.000	-1.031 2.043	28.469 (0.054)
C2-MO	31.601 (0.088)	0.989 (0.111)	0.278 0.825	0.000 1.000	31.934 (0.065)	1.322 (0.217)	1.031 0.489	0.000 1.000	30.612 (0.128)

* Valor ΔC_T de cada muestra: $\Delta C_T = (C_T \text{ gen diana} - C_T \text{ TBP})$

** Valor $\Delta\Delta C_T$ de cada muestra: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ muestra} - \Delta C_T \text{ calibrador}$

*** Valor RQ de cada muestra: $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$, tomando como calibrador la SP (C1-SP) y la MO (C2-MO)

Anexo 9. A) Datos de los pacientes de la serie ampliada de 101 V617F/JAK2 negativas.

Individuo	Cultivo	NMPC	Cariotipo	Individuo	Cultivo	NMPC	Cariotipo
10939	13521	MFI	46,XX	12937	16477	TE	46,XX
11183	13867	MFI	46,XY	13029	16621	TE	Nulo sin mitosis
11393	18958	MFI	46,XY 46,XY,del(1)(p33)	13138	16781m	TE	Nulo (muestra coagulada)
12566	15920	MFI	46,XX	13385	17201	TE	46,XX
14457	18918	MFI	46,XX 46,XX,t(12;12)(p11;q13)	13476	17335	TE	46,XX
9720	11673	PV	46,XY	13523	17405	TE	46,XX
9768	11753	PV	46,XY 46,XY,del(20)(q13)	13528	17411	TE	46,XY
9915	11967	PV	46,XY	13540	17436	TE	46,XX
10501	12893	PV	46,XY	13746	17775	TE	46,XY 46,XY,del(5)(q23q33)
11306	22429	PV	46,XX	13813	17882	TE	46,XY
11562	14432	PV	46,XYqh+	13819	17895	TE	46,XY
11696	14624	PV	46,XX,t(6;8)(q27;p12)	13904	18011	TE	46,XX
12057	15160	PV	46,XY	13933	18051	TE	46,XY 47,XY,+8
13432	17266	PV	46,XY	14400	18755	TE	46,XY
13567	17478	PV	Nulo sin mitosis	14559	18995	TE	46,XY
14964	19613	PV	46,XY	14829	19407	TE	46,XX
16519	22068	PV	46,XY	15396	20308	TE	Nulo (muestra coagulada)
17139	23112	PV	46,XY	15633	20677	TE	46,XX
17702	24050	PV	46,XY	15848	21020	TE	46,XX
18139	24760	PV	46,XY	15861	21041	TE	46,XX
18670	25613	PV	46,XY	15885	21078	TE	46,XY
9124	19020	TE	46,XX	15905	21103	TE	Nulo, sin mitosis
9702	11643	TE	46,XX	16018	21287	TE	46,XX
9731	15493	TE	46,XY 45,XY,-7	16092	22929	TE	Nulo, sin mitosis
10017	12151	TE	46,XY	16097	21419	TE	46,XX
10136	12321	TE	46,XX	16154	21504	TE	46,XX
10181	12393	TE	46,XY	16179	21539	TE	46,XX
10206	12432	TE	46,XX	16218	21605	TE	46,XY
10253	12502	TE	46,XX	16405	21894	TE	46,XX
10273	12537	TE	46,XY	16565	22139	TE	46,XY
10310	12600	TE	46,XX	16721	22400	TE	46,XX
10551	12967	TE	46,XX	17076	23004	TE	46,XY
10559	15885	TE	46,XX	17144	23120	TE	Nulo, sin mitosis
10600	13033	TE	46,XY	17145	23387	TE	Nulo, sin mitosis (coagulada)
10655	13112	TE	46,XY	17307	23388	TE	Nulo, sin mitosis (coagulada)
10727	13214	TE	46,XX	17337	23234	TE	Nulo, sin mitosis
10730	13219	TE	46,XY	17386	23804	TE	Nulo, sin mitosis
10964	13552	TE	46,XY	17392	23549	TE	Nulo, sin mitosis
11087	13723	TE	46,XX	17791	24189	TE	46,XY
11137	13800	TE	46,XY	17874	24327	TE	Nulo, sin mitosis
11249	13966	TE	46,XX	17971	24498	TE	46,XX
11358	14126	TE	46,XX	18095	24693	TE	46,XX[97%] 47,XX,+12 [3%]
11378	14155	TE	46,XX	18215	24882	TE	Nulo, sin mitosis
11385	14163	TE	46,XX	18555	25420	TE	Nulo, sin mitosis
11461	14290	TE	46,X,-Y	18643	25572	TE	nulo, sin mitosis
11783	14736	TE	46,XY	18645	25574	TE	Nulo, sin mitosis
11846	14828	TE	46,XY	18749	25727	TE	46,XY
11890	14893	TE	Nulo sin mitosis	19067	26091	TE	46,XX
12159	15317	TE	46,XY	19163	26247	TE	46,XY
12352	15603	TE	46,XX	19222	26353	TE	46,XX
12370	15630	TE	46,XX				

Anexo 9. B) Datos de los pacientes de la serie ampliada de 232 V617F/JAK2 positivas.

Individuo	Cultivo	NMPC	Cariotipo	Individuo	Cultivo	NMPC	Cariotipo
8157	15119	TE	46,XY	12736	16175	TE	Nulo sin células
8398	16565	TE	Nulo sin mitosis	12931	16468	TE	46,XY
8519	14968	TE	46,XY	13074	16680	TE	46,XX
9019	21048	TE	46,XX / 45,XX,- 5,del(9)(q22?),1dmin	13128	16763	TE	46,XX
9447	11273	TE	46,XX,del(5)(q14q22)	13228	16927	TE	46,XX
9856	18957	TE	46,XX	13233	16932	TE	Nulo sin mitosis
10227	12462	TE	46,XY	13333	17109	TE	46,XY / 46,XY,del(9)(q12q22)
10315	12606	TE	46,XX	13434	17270	TE	46,XX
10321	12617	TE	46,XYqh+	13531	17418	TE	46,XY / 47,XY,+9
10353	12667	TE	46,XX	13585	17503	TE	46,XY
10424	20273	TE	46,XY 47,XY,+8	13591	17514	TE	46,XX
10513	12916	TE	46,XX	13627	17579	TE	46,XY
10538	12948	TE	46,XYqh+	13852	17941	TE	Nulo sin células
10619	13061	TE	46,XX	14011	18185	TE	46,XY
10695	13176	TE	46,XX	14107	23524	TE	46,XY
10701	13182	TE	46,XX	14161	18400	TE	46,XX
10751	13243	TE	46,XX / 46,XX,+der(15)t(1;15) (q12;p13),-15	14202	18460	TE	46,XX
10755	13251	TE	Nulo sin mitosis	14246	18526	TE	46,XX
10777	13290	TE	46,XX	14283	18578	TE	46,XX
10861	13413	TE	46,XX,inv(9)(p12;q13)	14304	24720	TE	46,XY
10916	13493	TE	46,XY	14391	18744	TE	Nulo sin mitosis
10958	13544	TE	46,XY	14437	18807	TE	46,XY
11035	13654	TE	46,XY	14720	19256	TE	46,XY
11140	13803	TE	46,XX	14749	19302	TE	46,XX
11239	13951	TE	46,XX,del(20)(q3)	14884	19490	TE	Nulo sin mitosis
11356	14124	TE	46,XX	14952	19593	TE	46,XX
11398	14187	TE	46,XX	15013	19686	TE	46,XX
11441	14263	TE	Nulo sin mitosis	15032	19718	TE	46,XX
11467	14297	PV	46,XY	15033	19719	TE	46,XY
11506	14357	TE	46,XY	15141	19904	TE	46,XX
11515	14371	TE	46,XY	15214	20025	TE	46,XY
11554	14421	TE	46,XX	15291	20149	TE	46,XY
11576	14449	TE	46,XY	15368	20259	TE	46,XY
11589	14470	TE	46,XY	15444	21383	TE	46,XY
11601	14485	TE	46,XX	15518	20491	TE	46,XY
11608	14500	TE	46,XY	15562	20563	TE	46,XY
11648	14553	TE	46,XY	15675	20739	TE	46,XY
11775	14727	TE	46,XY	15689	20761	TE	46,XX
11798	14759	TE	46,XY	15700	20989	TE	46,XY
11805	21870	TE	Nulo, sin mitosis	15734	20836	TE	46,XY
11840	14821	TE	46,XX	15771	20898	TE	46,XY
11851	14835	TE	Nulo sin mitosis	15790	20925	TE	Nulo, sin mitosis
11852	14836	TE	46,XY	16015	21282	TE	46,XY; 47,XY,+9
11861	14847	TE	46,XX	16109	21435	TE	46,XY
11933	14960	TE	46,XX	16142	21487	TE	46,XX
11941	14976	TE	46,XX; 45,XX,-21	16214	21600	TE	46,XY
11998	15059	TE	46,XY	16227	21618	TE	46,XY
12299	15533	TE	46,XY	16421	21912	TE	46,XX
12330	15569	TE	46,XY	16431	21925	TE	46,XX
12445	15739	TE	46,XX	16441	21940	TE	46,XY
12516	15849	TE	46,XY	16636	22255	TE	Nulo, sin mitosis

Anexo 9. B) Datos de los pacientes de la serie ampliada de 232 V617F/JAK2 positivas (continuación).

Individuo	Cultivo	NMPC	Cariotipo	Individuo	Cultivo	NMPC	Cariotipo
16639	22259	TE	Nulo, sin mitosis	16578	22158	TE	46,XX
16703	22368	TE	46,XX	8704	12471	MFI	46,XX
16738	22420	TE	Nulo, sin mitosis	10226	12459	MFI	46,XYqh+
16810	22548	TE	46,XX	10507	12906	MFI	46,XX
16910	22739	TE	46,XY	10696	13177	MFI	46,XY
17037	22938	TE	46,XX	10898	13470	PV	46,XY
17054	22970	TE	Nulo, sin mitosis	11163	13855	MFI	46,XY
17134	23105	TE	46,XX	11296	14039	MFI	46,XX
17201	23214	TE	46,XY	11577	14451	MFI	46,XY
17267	23322	TE	46,XY	11708	14640	MFI	46,XY
17280	23339	TE	Nulo, sin mitosis	12880	16391	MFI	Nulo sin células
17286	23349	TE	Nulo, sin mitosis (coagulada)	13747	17776	MFI	Nulo (muestra coagulada)
17406	23569	TE	46,XY	14125	18353	MFI	Nulo sin mitosis
17428	23611	TE	Nulo, sin mitosis	14910	19536	MFI	46,XX
17444	23641	TE	Nuli, sin mitosis	15438	20371	MFI	46,XY
17461	23673	TE	Nulo, sin mitosis	15444	20380	MFI	46,XY
17586	23873	TE	46,XX	10051	12197	PV	46,XY
17629	23943	TE	46,XY	10077	12236	PV	46,XX
17749	24119	TE	46,XY	10508	12907	PV	46,XX
17816	24227	TE	Nulo, sin mitosis	10688	13162	PV	46,XY
17889	24347	TE	Nulo, sin mitosis	10703	13184	PV	46,XX
17952	24465	TE	46,XX	10789	13305	PV	46,XY
17953	24471	TE	46,XY	10844	13390	PV	46,XY
17978	24508	TE	Nulo, sin mitosis	10867	13422	PV	46,XY / 47,XY,+9
17981	24514	TE	46,XY	10875	13434	PV	46,XY / 45,X,-Y
18005	24557	TE	Nulo, sin mitosis	11319	14070	PV	46,XY
18015	24571	TE	Nulo, sin mitosis	11495	14343	PV	46,XY
18084	24669	TE	46,XY	11540	14404	PV	46,XYqh+
18259	24951	TE	46,XX	11619	14512	PV	46,XY / 46,XY,del(20)(q13)
18352	25089	TE	Nulo, sin mitosis	11762	14708	PV	46,XX
18416	25198	TE	46,XX	12013	15089	PV	46,XYqh+
18506	25349	TE	46,XX	12044	15145	PV	46,XX
18539	25397	TE	46,XY	12347	15595	PV	46,XY
18563	25439	TE	Nulo, sin mitosis	12661	16059	PV	46,XX / 47,XY,+9
18568	25450	TE	Nulo, sin mitosis	12682	16095	PV	46,XX
18569	25451	TE	Nulo, sin mitosis	13176	16842	PV	46,XX
18599	25501	TE	46,XX	13276	17002	PV	46,XX
18729	25697	TE	46,XY	13315	17076	PV	46,XY / 45,X,-Y
18756	25736	TE	46,XX	13421	17250	PV	46,XX
19036	26042	TE	46,XY	13491	17358	PV	46,XX
19072	26126	TE	46,XY	13501	21985	PV	46,XY
19079	26110	TE	46,XY	13530	17413	PV	46,XY
19162	26246	TE	46,XX	13837	17920	PV	46,XY / 47,XY,+9
19165	26255	TE	47,XX,+9	14080	18286	PV	46,XY / 47,XY,+9
19180	26280	TE	46,XY	14113	18336	PV	46,XY
19196	26309	TE	46,XY	14561	18998	PV	46,XY
19223	26355	TE	Nulo, sin mitosis	14626	19099	PV	46,XY

Anexo 9. B) Datos de los pacientes de la serie ampliada de 232 V617F/JAK2 positivas (continuación).

Individuo	Cultivo	NMPC	Cariotipo	Individuo	Cultivo	NMPC	Cariotipo
14652	19136	PV	46,XY 46,XY,del(20)(q12)	17197	23207	PV	46,XY
14705	19231	PV	46,XY	17229	23258	PV	46,XX
14742	19294	PV	46,XY	17251	23294	PV	46,XX
14828	19404	PV	47,XY,+8	17369	23502	PV	46,XX
14948	19588	PV	46,XY	17591	23881	PV	46,XY
14987	19645	PV	46,XX	17662	23986	PV	Nulo, sin mitosis
15065	19778	PV	46,XY	17766	24145	PV	46,XX
15133	19891	PV	46,XY	17930	24419	PV	46,XY
15229	20051	PV	46,XX	17995	24543	PV	46,XY
15254	22968	PV	46,XX	18028	24585	PV	46,XY
15888	21081	PV	Nulo, sin mitosis	18225	24900	PV	46,XX
15889	21082	PV	46,XY	18426	25216	PV	46,XY
15956	21192	PV	46,XY	18513	25357	PV	46,XY
16220	21608	PV	45,X,-Y	18544	25404	PV	46,XX
16752	22440	PV	Nulo, sin mitosis	18549	25412	PV	Nulo, sin mitosis
16873	22661	PV	46,XX	18741	25712	PV	46,XY
17133	23103	PV	Nulo, sin mitosis	18950	25898	PV	46,XX
17146	23123	PV	46,XX	19216	26339	PV	46,XY,del(20)(q12)

Referencias

- Abbas S, Rotmans G, Lowenberg B, Valk PJ. Exon 8 splice site mutations in the gene encoding the E3-ligase CBL are associated with core binding factor acute myeloid leukemias. *Haematologica* 2008 Oct;93(10):1595-1597.
- Abdel-Wahab O, Kilpivaara O, Patel J, Busque L, Levine RL. The most commonly reported variant in ASXL1 (c.1934dupG;p.Gly646TrpfsX12) is not a somatic alteration. *Leukemia* 2010 Jul 1.
- Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood* 2009 Jul 2;114(1):144-147.
- Abe A, Emi N, Tanimoto M, Terasaki H, Marunouchi T, Saito H. Fusion of the platelet-derived growth factor receptor beta to a novel gene CEV14 in acute myelogenous leukemia after clonal evolution. *Blood* 1997 Dec 1;90(11):4271-4277.
- Acevedo VD, Ittmann M, Spencer DM. Paths of FGFR-driven tumorigenesis. *Cell Cycle* 2009 Feb 15;8(4):580-588.
- Adams CO, Housley WJ, Bhowmick S, Cone RE, Rajan TV, Forouhar F, et al. Cbl-b(-/-) T cells demonstrate in vivo resistance to regulatory T cells but a context-dependent resistance to TGF-beta. *J Immunol* 2010 Aug 15;185(4):2051-2058.
- Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med* 1976 Oct 21;295(17):913-916.
- Adapala NS, Barbe MF, Langdon WY, Tsygankov AY, Sanjay A. Cbl-phosphatidylinositol 3 kinase interaction differentially regulates macrophage colony-stimulating factor-mediated osteoclast survival and cytoskeletal reorganization. *Ann N Y Acad Sci* 2010 Mar;1192(1):376-384.
- Adelaide J, Perot C, Gelsi-Boyer V, Pautas C, Murati A, Copie-Bergman C, et al. A t(8;9) translocation with PCM1-JAK2 fusion in a patient with T-cell lymphoma. *Leukemia* 2006 Mar;20(3):536-537.
- Aguiar RC, Macdonald D, Mason PJ, Cross NC, Goldman JM. Myeloproliferative disorder associated with 8p11 translocations. *Blood* 1995 Jul 15;86(2):834-835.
- Aharonov A, Passovoy DS, Herschman HR. Mitogenic response to epidermal growth factor: relationship to number, affinity, and down-regulation of EGF receptors in three murine embryo cell lines. *J Supramol Struct* 1978;9(1):41-45.
- Allison DC, Ridolpho P. Use of a trypan blue assay to measure the deoxyribonucleic acid content and radioactive labeling of viable cells. *J Histochem Cytochem* 1980 Jul;28(7):700-703.
- Alpar D, Hermes J, Poto L, Laszlo R, Kereskai L, Jakso P, et al. Automated FISH analysis using dual-fusion and break-apart probes on paraffin-embedded tissue sections. *Cytometry A* 2008 Jul;73(7):651-657.
- Amin S, Parker A, Mann J. ZAP70 in chronic lymphocytic leukaemia. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(9):1654-1658.
- An Q, Wright SL, Konn ZJ, Matheson E, Minto L, Moorman AV, et al. Variable breakpoints target PAX5 in patients with dicentric chromosomes: a model for the basis of unbalanced translocations in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Nov 4;105(44):17050-17054.

- An X, Tiwari AK, Sun Y, Ding PR, Ashby CR, Jr, Chen ZS. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leuk Res* 2010 Oct;34(10):1255-1268.
- Andoniou CE, Thien CB, Langdon WY. The two major sites of cbl tyrosine phosphorylation in abl-transformed cells select the crkL SH2 domain. *Oncogene* 1996 May 2;12(9):1981-1989.
- Andoniou CE, Thien CB, Langdon WY. Tumour induction by activated abl involves tyrosine phosphorylation of the product of the cbl oncogene. *EMBO J* 1994 Oct 3;13(19):4515-4523.
- Andreasson P, Johansson B, Carlsson M, Jarlsfelt I, Fioretos T, Mitelman F, et al. BCR/ABL-negative chronic myeloid leukemia with ETV6/ABL fusion. *Genes Chromosomes Cancer* 1997 Nov;20(3):299-304.
- Aranaz P, Ormazabal C, Hurtado C, Erquiaga I, Calasanz MJ, Garcia-Delgado M, et al. A new potential oncogenic mutation in the FERM domain of JAK2 in BCR/ABL1-negative and V617F-negative chronic myeloproliferative neoplasms revealed by a comprehensive screening of 17 tyrosine kinase coding genes. *Cancer Genet Cytogenet* 2010 May;199(1):1-8.
- Arena S, Benvenuti S, Bardelli A. Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2005 Sep;62(18):2092-2099.
- Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2005 Mar;5(2):209-219.
- Avanzi GC, Brizzi MF, Giannotti J, Ciarletta A, Yang YC, Pegoraro L, et al. M-07e human leukemic factor-dependent cell line provides a rapid and sensitive bioassay for the human cytokines GM-CSF and IL-3. *J Cell Physiol* 1990 Dec;145(3):458-464.
- Avanzi GC, Lista P, Giovanazzo B, Miniero R, Saglio G, Benetton G, et al. Selective growth response to IL-3 of a human leukaemic cell line with megakaryoblastic features. *Br J Haematol* 1988 Jul;69(3):359-366.
- Baccarani M, Cilloni D, Rondoni M, Ottaviani E, Messa F, Merante S, et al. The efficacy of imatinib mesylate in patients with FIP1L1-PDGFRalpha-positive hypereosinophilic syndrome. Results of a multicenter prospective study. *Haematologica* 2007 Sep;92(9):1173-1179.
- Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Kohlmann A, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TET2 and CBL genes: novel molecular markers in myeloid malignancies. *Ann Hematol* 2010 Mar 2.
- Bacher U, Haferlach T, Schnittger S, Weiss T, Burkhard O, Bechtel B, et al. Detection of a t(4;14)(p16;q32) in two cases of lymphoma showing both the immunophenotype of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2010 Jul 15;200(2):170-174.
- Bacher U, Schnittger S, Kern W, Weiss T, Haferlach T, Haferlach C. Distribution of cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes, Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms, and the overlap MDS/MPN category. *Ann Hematol* 2009 Dec;88(12):1207-1213.
- Bachmaier K, Krawczyk C, Kozieradzki I, Kong YY, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos A, et al. Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature* 2000 Jan 13;403(6766):211-216.
- Baker SJ, Rane SG, Reddy EP. Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene* 2007 Oct 15;26(47):6724-6737.

- Bandi SR, Brandts C, Rensinghoff M, Grundler R, Tickenbrock L, Kohler G, et al. E3 ligase-defective Cbl mutants lead to a generalized mastocytosis and a myeloproliferative disease. *Blood* 2009 Sep 4.
- Bange J, Prechtel D, Cheburkin Y, Specht K, Harbeck N, Schmitt M, et al. Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. *Cancer Res* 2002 Feb 1;62(3):840-847.
- Barresi V, Palumbo GA, Musso N, Consoli C, Capizzi C, Meli CR, et al. Clonal selection of 11q CN-LOH and CBL gene mutation in a serially studied patient during MDS progression to AML. *Leuk Res* 2010 Nov;34(11):1539-1542.
- Baxter EJ, Hochhaus A, Bolufer P, Reiter A, Fernandez JM, Senent L, et al. The t(4;22)(q12;q11) in atypical chronic myeloid leukaemia fuses BCR to PDGFRA. *Hum Mol Genet* 2002 Jun 1;11(12):1391-1397.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005 Mar 19-25;365(9464):1054-1061.
- Bayani J, Squire JA. Application and interpretation of FISH in biomarker studies. *Cancer Lett* 2007 Apr 28;249(1):97-109.
- Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008 Jul 1;112(1):141-149.
- Beer PA, Delhommeau F, LeCouedic JP, Dawson MA, Chen E, Bareford D, et al. Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood* 2010 Apr 8;115(14):2891-2900.
- Beitz LO, Fruman DA, Kurosaki T, Cantley LC, Scharenberg AM. SYK is upstream of phosphoinositide 3-kinase in B cell receptor signaling. *J Biol Chem* 1999 Nov 12;274(46):32662-32666.
- Belloni E, Trubia M, Gasparini P, Micucci C, Tapinassi C, Confalonieri S, et al. 8p11 myeloproliferative syndrome with a novel t(7;8) translocation leading to fusion of the FGFR1 and TIF1 genes. *Genes Chromosomes Cancer* 2005 Mar;42(3):320-325.
- Bench AJ, Nacheva EP, Champion KM, Green AR. Molecular genetics and cytogenetics of myeloproliferative disorders. *Baillieres Clin Haematol* 1998 Dec;11(4):819-848.
- Bench AJ, Pahl HL. Chromosomal abnormalities and molecular markers in myeloproliferative disorders. *Semin Hematol* 2005 Oct;42(4):196-205.
- Bene MC. What is ZAP-70? *Cytometry B Clin Cytom* 2006 Jul 15;70(4):204-208.
- Bentz M, Barth TF, Bruderlein S, Bock D, Schwerer MJ, Baudis M, et al. Gain of chromosome arm 9p is characteristic of primary mediastinal B-cell lymphoma (MBL): comprehensive molecular cytogenetic analysis and presentation of a novel MBL cell line. *Genes Chromosomes Cancer* 2001 Apr;30(4):393-401.
- Bernheim A. Cytogenomics of cancers: from chromosome to sequence. *Mol Oncol* 2010 Aug;4(4):309-322.
- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001 May 17;411(6835):355-365.
- Boulwood J, Perry J, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, Fernandez-Santamaria C, Calasanz MJ, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the

- myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2010 May;24(5):1062-1065.
- Bousquet M, Quelen C, De Mas V, Duchayne E, Roquefeuil B, Delsol G, et al. The t(8;9)(p22;p24) translocation in atypical chronic myeloid leukaemia yields a new PCM1-JAK2 fusion gene. *Oncogene* 2005 Nov 3;24(48):7248-7252.
- Bradburne C, Robertson K, Thach D. Assessment of methods and analysis of outcomes for comprehensive optimization of nucleofection. *Genet Vaccines Ther* 2009 May 11;7:6.
- Brdicka T, Kadlecěk TA, Roose JP, Pastuszak AW, Weiss A. Intramolecular regulatory switch in ZAP-70: analogy with receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 2005 Jun;25(12):4924-4933.
- Brown JR, Levine RL, Thompson C, Basile G, Gilliland DG, Freedman AS. Systematic genomic screen for tyrosine kinase mutations in CLL. *Leukemia* 2008 Aug 28.
- Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000 Oct;295(1):139-145.
- Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Müller M, Druker BJ, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 1996 Jan 1;56(1):100-104.
- Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Müller M, Regenass U, et al. Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Mar 28;92(7):2558-2562.
- Butcher CM, Hahn U, To LB, Gecz J, Wilkins EJ, Scott HS, et al. Two novel JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythaemia vera patients. *Leukemia* 2008 Apr;22(4):870-873.
- Caligiuri MA, Briesewitz R, Yu J, Wang L, Wei M, Arnoczky KJ, et al. Novel c-CBL and CBL-b ubiquitin ligase mutations in human acute myeloid leukemia. *Blood* 2007 Aug 1;110(3):1022-1024.
- Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2006 Dec 7;355(23):2452-2466.
- Campbell PJ, Green AR. Management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:201-208.
- Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, et al. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 1999 Sep;23(1):18-20.
- Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, Brecqueville M, Adelaide J, Rey J, et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2009 Nov;23(11):2183-2186.
- Carbuccia N, Trouplin V, Gelsi-Boyer V, Murati A, Rocquain J, Adelaide J, et al. Mutual exclusion of ASXL1 and NPM1 mutations in a series of acute myeloid leukemias. *Leukemia* 2010 Feb;24(2):469-473.
- Carey KD, Garton AJ, Romero MS, Kahler J, Thomson S, Ross S, et al. Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. *Cancer Res* 2006 Aug 15;66(16):8163-8171.

- Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, Buchdunger E, Zimmermann J, Lydon NB, et al. CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood* 1997 Dec 15;90(12):4947-4952.
- Cazzaniga G, Tosi S, Aloisi A, Giudici G, Daniotti M, Pioltelli P, et al. The tyrosine kinase abl-related gene ARG is fused to ETV6 in an AML-M4Eo patient with a t(1;12)(q25;p13): molecular cloning of both reciprocal transcripts. *Blood* 1999 Dec 15;94(12):4370-4373.
- Chaligne R, James C, Tonetti C, Besancenot R, Le Couedic JP, Fava F, et al. Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood* 2007 Nov 15;110(10):3735-3743.
- Chaligne R, Tonetti C, Besancenot R, Roy L, Marty C, Mossuz P, et al. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia* 2008 Aug;22(8):1557-1566.
- Chan AC, Irving BA, Fraser JD, Weiss A. The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Oct 15;88(20):9166-9170.
- Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 1992 Nov 13;71(4):649-662.
- Chandesris MO, Soulier J, Labaume S, Crinquette A, Repellini L, Chemin K, et al. Detection and follow-up of fibroblast growth factor receptor 3 expression on bone marrow and circulating plasma cells by flow cytometry in patients with t(4;14) multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007 Feb;136(4):609-614.
- Chase A, Grand FH, Cross NC. Activity of TKI258 against primary cells and cell lines with FGFR1 fusion genes associated with the 8p11 myeloproliferative syndrome. *Blood* 2007 Nov 15;110(10):3729-3734.
- Chase A, Huntly BJ, Cross NC. Cytogenetics of chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001 Sep;14(3):553-571.
- Checquolo S, Palermo R, Cialfi S, Ferrara G, Oliviero C, Talora C, et al. Differential subcellular localization regulates c-Cbl E3 ligase activity upon Notch3 protein in T-cell leukemia. *Oncogene* 2010 Mar 11;29(10):1463-1474.
- Chen J, Deangelo DJ, Kutok JL, Williams IR, Lee BH, Wadleigh M, et al. PKC412 inhibits the zinc finger 198-fibroblast growth factor receptor 1 fusion tyrosine kinase and is active in treatment of stem cell myeloproliferative disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Oct 5;101(40):14479-14484.
- Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002 Dec 15;100(13):4609-4614.
- Chesi M, Brents LA, Ely SA, Bais C, Robbiani DF, Mesri EA, et al. Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma. *Blood* 2001 Feb 1;97(3):729-736.
- Chesi M, Nardini E, Brents LA, Schrock E, Ried T, Kuehl WM, et al. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 1997 Jul;16(3):260-264.

- Chesi M, Robbiani DF, Sebag M, Chng WJ, Affer M, Tiedemann R, et al. AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies. *Cancer Cell* 2008 Feb;13(2):167-180.
- Chiang YJ, Kole HK, Brown K, Naramura M, Fukuhara S, Hu RJ, et al. Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature* 2000 Jan 13;403(6766):216-220.
- Chim CS, Wan TS, Fung TK, Wong KF. Methylation of TET2, CBL and CEBPA in Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *J Clin Pathol* 2010 Oct;63(10):942-946.
- Choi JS, Leong KW, Yoo HS. In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). *Biomaterials* 2008 Feb;29(5):587-596.
- Chou WC, Huang HH, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, et al. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. *Blood* 2010 Aug 6.
- Chusid MJ, Dale DC. Eosinophilic leukemia. Remission with vincristine and hydroxyurea. *Am J Med* 1975 Aug;59(2):297-300.
- Cirmena G, Aliano S, Fugazza G, Bruzzone R, Garuti A, Bocciardi R, et al. A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11) in a patient with acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2008 Jun;183(2):105-108.
- Claudio JO, Zhan F, Zhuang L, Khaja R, Zhu YX, Sivananthan K, et al. Expression and mutation status of candidate kinases in multiple myeloma. *Leukemia* 2007 May;21(5):1124-1127.
- Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J, et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 2003 Mar 27;348(13):1201-1214.
- Coopman PJ, Do MT, Barth M, Bowden ET, Hayes AJ, Basyuk E, et al. The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* 2000 Aug 17;406(6797):742-747.
- Coopman PJ, Mueller SC. The Syk tyrosine kinase: a new negative regulator in tumor growth and progression. *Cancer Lett* 2006 Sep 28;241(2):159-173.
- Correa PN, Eskinazi D, Axelrad AA. Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum-free medium. *Blood* 1994 Jan 1;83(1):99-112.
- Correll PH, Paulson RF, Wei X. Molecular regulation of receptor tyrosine kinases in hematopoietic malignancies. *Gene* 2006 Jun 7;374:26-38.
- Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 1991 Jul;3(7):207-212.
- Couronne L, Lippert E, Andrieux J, Kosmider O, Radford-Weiss I, Penther D, et al. Analyses of TET2 mutations in post-myeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemias. *Leukemia* 2010 Jan;24(1):201-203.
- Cowan-Jacob SW. Structural biology of protein tyrosine kinases. *Cell Mol Life Sci* 2006 Nov;63(22):2608-2625.
- Cross NC. Hitchhikers' guide to the leukemia genome. *Blood* 2008 May 1;111(9):4428-4429.

- Cross NC, Reiter A. Fibroblast growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor abnormalities in eosinophilic myeloproliferative disorders. *Acta Haematol* 2008;119(4):199-206.
- Cross NC, Reiter A. Tyrosine kinase fusion genes in chronic myeloproliferative diseases. *Leukemia* 2002 Jul;16(7):1207-1212.
- Curtis CE, Grand FH, Musto P, Clark A, Murphy J, Perla G, et al. Two novel imatinib-responsive PDGFRA fusion genes in chronic eosinophilic leukaemia. *Br J Haematol* 2007 Jul;138(1):77-81.
- Dai CH, Krantz SB, Koury ST, Kollar K. Polycythaemia vera. IV. Specific binding of stem cell factor to normal and polycythaemia vera highly purified erythroid progenitor cells. *Br J Haematol* 1994 Nov;88(3):497-505.
- Dai CH, Krantz SB, Means RT, Jr, Horn ST, Gilbert HS. Polycythemia vera blood burst-forming units-erythroid are hypersensitive to interleukin-3. *J Clin Invest* 1991 Feb;87(2):391-396.
- DAMESHEK W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951 Apr;6(4):372-375.
- Dawson MA, Bannister AJ, Gottgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature* 2009 Oct 8;461(7265):819-822.
- De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Berthou C, Morel F, De Braekeleer M. A new partner gene fused to ABL1 in a t(1;9)(q24;q34)-associated B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2007 Oct;21(10):2220-2221.
- De Keersmaecker K, Cools J. Chronic myeloproliferative disorders: a tyrosine kinase tale. *Leukemia* 2006 Feb;20(2):200-205.
- De Keersmaecker K, Graux C, Odero MD, Mentens N, Somers R, Maertens J, et al. Fusion of EML1 to ABL1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia with cryptic t(9;14)(q34;q32). *Blood* 2005 Jun 15;105(12):4849-4852.
- Deckert M, Elly C, Altman A, Liu YC. Coordinated regulation of the tyrosine phosphorylation of Cbl by Fyn and Syk tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1998 Apr 10;273(15):8867-8874.
- Del Principe MI, Del Poeta G, Buccisano F, Maurillo L, Venditti A, Zucchetto A, et al. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006 Aug 1;108(3):853-861.
- Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009 May 28;360(22):2289-2301.
- Delhommeau F, Pisani DF, James C, Casadevall N, Constantinescu S, Vainchenker W. Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell Mol Life Sci* 2006 Dec;63(24):2939-2953.
- Demiroglu A, Steer EJ, Heath C, Taylor K, Bentley M, Allen SL, et al. The t(8;22) in chronic myeloid leukemia fuses BCR to FGFR1: transforming activity and specific inhibition of FGFR1 fusion proteins. *Blood* 2001 Dec 15;98(13):3778-3783.
- Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 2009 May;37(9):e67.

- Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* 2004 Jun 1;103(11):4198-4200.
- Dong Q, Liu YP, Qu XJ, Hou KZ, Li LL. Expression of c-Cbl, Cbl-b, and epidermal growth factor receptor in gastric carcinoma and their clinical significance. *Ai Zheng* 2010 Jan;29(1):59-64.
- Drexler HG, Zaborski M, Quentmeier H. Cytokine response profiles of human myeloid factor-dependent leukemia cell lines. *Leukemia* 1997 May;11(5):701-708.
- Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* 2008 Dec 15;112(13):4808-4817.
- Dunbar AJ, Gondek LP, O'Keefe CL, Makishima H, Rataul MS, Szpurka H, et al. 250K single nucleotide polymorphism array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous mutations, including novel missense substitutions of c-Cbl, in myeloid malignancies. *Cancer Res* 2008 Dec 15;68(24):10349-10357.
- Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 2007 Jun 28;447(7148):1087-1093.
- Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 May 15;89(10):4309-4313.
- Elder ME, Lin D, Clever J, Chan AC, Hope TJ, Weiss A, et al. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* 1994 Jun 10;264(5165):1596-1599.
- Elkak A, Al Sarakbi W, Mokbel K. SYK expression in human breast cancer. *J Carcinog* 2005 Apr 20;4(1):7.
- Elliot V, Marin D, Horncastle D, Elderfield K, Apperley JF, Lampert IA, et al. Percentage of CD34 cells in a minimum 500-cell count in bone marrow trephines of patients with chronic myeloid leukaemia provides the best correlation with aspirate blast count. *Br J Haematol* 2005 Aug;130(3):460-461.
- Elly C, Witte S, Zhang Z, Rosnet O, Lipkowitz S, Altman A, et al. Tyrosine phosphorylation and complex formation of Cbl-b upon T cell receptor stimulation. *Oncogene* 1999 Feb 4;18(5):1147-1156.
- Emanuel PD. RAS pathway mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Acta Haematol* 2008;119(4):207-211.
- Erben P, Gosenca D, Muller MC, Reinhard J, Score J, Del Valle F, et al. Screening for diverse PDGFRA or PDGFRB fusion genes is facilitated by generic quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Haematologica* 2010 May;95(5):738-744.
- Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* 2010 Aug;42(8):722-726.
- Erquiaga I, Ormazabal C, Hurtado C, Aranaz P, Calasanz MJ, Garcia-Delgado M, et al. Quantification of PDGFRA alternative transcripts improves the screening for X-PDGFRB

- fusions by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Leuk Lymphoma* 2010 Sep;51(9):1720-1726.
- Ettenberg SA, Magnifico A, Cuello M, Nau MM, Rubinstein YR, Yarden Y, et al. Cbl-b-dependent coordinated degradation of the epidermal growth factor receptor signaling complex. *J Biol Chem* 2001 Jul 20;276(29):27677-27684.
- Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Ann Intern Med* 1999 Aug 3;131(3):207-219.
- Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 1993;62:453-481.
- Feldman AL, Sun DX, Law ME, Novak AJ, Attygalle AD, Thorland EC, et al. Overexpression of Syk tyrosine kinase in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia* 2008 Jun;22(6):1139-1143.
- Fernandes MS, Reddy MM, Croteau NJ, Walz C, Weisbach H, Podar K, et al. Novel oncogenic mutations of CBL in human acute myeloid leukemia that activate growth and survival pathways depend on increased metabolism. *J Biol Chem* 2010 Oct 15;285(42):32596-32605.
- Ferrajoli A, Faderl S, Ravandi F, Estrov Z. The JAK-STAT pathway: a therapeutic target in hematological malignancies. *Curr Cancer Drug Targets* 2006 Dec;6(8):671-679.
- Ferreira JC, Carter SM, Bernstein PS, Jabs EW, Glickstein JS, Marion RW, et al. Second-trimester molecular prenatal diagnosis of sporadic Apert syndrome following suspicious ultrasound findings. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999 Dec;14(6):426-430.
- Feshchenko EA, Langdon WY, Tsygankov AY. Fyn, Yes, and Syk phosphorylation sites in c-Cbl map to the same tyrosine residues that become phosphorylated in activated T cells. *J Biol Chem* 1998 Apr 3;273(14):8323-8331.
- Fitzgerald LM, Karlins E, Karyadi DM, Kwon EM, Koopmeiners JS, Stanford JL, et al. Association of FGFR4 genetic polymorphisms with prostate cancer risk and prognosis. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2008 Sep 2.
- Flach J, Dicker F, Schnittger S, Kohlmann A, Haferlach T, Haferlach C. Mutations of JAK2 and TET2, but not CBL are detectable in a high portion of patients with refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis (RARS-T). *Haematologica* 2009 Nov 10.
- Fu JF, Hsu JJ, Tang TC, Shih LY. Identification of CBL, a proto-oncogene at 11q23.3, as a novel MLL fusion partner in a patient with de novo acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2003 Jun;37(2):214-219.
- Fukazawa T, Miyake S, Band V, Band H. Tyrosine phosphorylation of Cbl upon epidermal growth factor (EGF) stimulation and its association with EGF receptor and downstream signaling proteins. *J Biol Chem* 1996 Jun 14;271(24):14554-14559.
- Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest* 1993 Oct;92(4):1736-1744.
- Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, et al. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 2004 Mar;4(3):177-183.
- Futterer K, Wong J, Grucza RA, Chan AC, Waksman G. Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its

- regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide. *J Mol Biol* 1998 Aug 21;281(3):523-537.
- Gao X, Huang L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 Aug 30;179(1):280-285.
- Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006 Oct 1;108(7):2366-2372.
- Gelsi-Boyer V, Orsetti B, Cervera N, Finetti P, Sircoulomb F, Rouge C, et al. Comprehensive profiling of 8p11-12 amplification in breast cancer. *Mol Cancer Res* 2005 Dec;3(12):655-667.
- Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, Bonansea J, Cervera N, Carbuca N, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009 Jun;145(6):788-800.
- Givol D, Yayon A. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J* 1992 Dec;6(15):3362-3369.
- Gleich GJ, Leiferman KM. The hypereosinophilic syndromes: still more heterogeneity. *Curr Opin Immunol* 2005 Dec;17(6):679-684.
- Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Sica S, Leone G, Efremov DG. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood* 2007 Mar 1;109(5):2032-2039.
- Golas JM, Arndt K, Etienne C, Lucas J, Nardin D, Gibbons J, et al. SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. *Cancer Res* 2003 Jan 15;63(2):375-381.
- Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 1994 Apr 22;77(2):307-316.
- Golub TR, Goga A, Barker GF, Afar DE, McLaughlin J, Bohlander SK, et al. Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol Cell Biol* 1996 Aug;16(8):4107-4116.
- Gondek LP, Dunbar AJ, Szpurka H, McDevitt MA, Maciejewski JP. SNP Array Karyotyping Allows for the Detection of Uniparental Disomy and Cryptic Chromosomal Abnormalities in MDS/MPD-U and MPD. *PLoS ONE* 2007 Nov 21;2(11):e1225.
- Goodman PA, Wood CM, Vassilev A, Mao C, Uckun FM. Spleen tyrosine kinase (Syk) deficiency in childhood pro-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* 2001 Jul 5;20(30):3969-3978.
- Goradia A, Bayerl M, Cornfield D. The 8p11 myeloproliferative syndrome: review of literature and an illustrative case report. *Int J Clin Exp Pathol* 2008 Jan 1;1(5):448-456.
- Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001 Aug 3;293(5531):876-880.

- Gotlib J, Cools J. Five years since the discovery of FIP1L1-PDGFR: what we have learned about the fusion and other molecularly defined eosinophilias. *Leukemia* 2008 Nov;22(11):1999-2010.
- Gotlib J, Cross NC, Gilliland DG. Eosinophilic disorders: molecular pathogenesis, new classification, and modern therapy. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006;19(3):535-569.
- Grand EK, Grand FH, Chase AJ, Ross FM, Corcoran MM, Oscier DG, et al. Identification of a novel gene, FGFR1OP2, fused to FGFR1 in 8p11 myeloproliferative syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 2004 May;40(1):78-83.
- Grand FH, Burgstaller S, Kuhr T, Baxter EJ, Webersinke G, Thaler J, et al. p53-Binding protein 1 is fused to the platelet-derived growth factor receptor beta in a patient with a t(5;15)(q33;q22) and an imatinib-responsive eosinophilic myeloproliferative disorder. *Cancer Res* 2004 Oct 15;64(20):7216-7219.
- Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, Zoi K, Zoi C, McGuire C, et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009 Apr 22.
- Grand FH, Iqbal S, Zhang L, Russell NH, Chase A, Cross NC. A constitutively active SPTBN1-FLT3 fusion in atypical chronic myeloid leukemia is sensitive to tyrosine kinase inhibitors and immunotherapy. *Exp Hematol* 2007 Nov;35(11):1723-1727.
- Graux C, Cools J, Melotte C, Quentmeier H, Ferrando A, Levine R, et al. Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2004 Oct;36(10):1084-1089.
- Greenberger JS, Eckner RJ, Sakakeeny M, Marks P, Reid D, Nabel G, et al. Interleukin 3-dependent hematopoietic progenitor cell lines. *Fed Proc* 1983 Jul;42(10):2762-2771.
- Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 2007 Mar 8;446(7132):153-158.
- Griesinger F, Hennig H, Hillmer F, Podleschny M, Steffens R, Pies A, et al. A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2) translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2005 Nov;44(3):329-333.
- Griesinger F, Janke A, Podleschny M, Bohlander SK. Identification of an ETV6-ABL2 fusion transcript in combination with an ETV6 point mutation in a T-cell acute lymphoblastic leukaemia cell line. *Br J Haematol* 2002 Nov;119(2):454-458.
- Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 1984 Jan;36(1):93-99.
- Grunebach F, Bross-Bach U, Kanz L, Brossart P. Detection of a new JAK2 D620E mutation in addition to V617F in a patient with polycythemia vera. *Leukemia* 2006 Dec;20(12):2210-2211.
- Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004 May;4(5):361-370.
- Guasch G, Mack GJ, Popovici C, Dastugue N, Birnbaum D, Rattner JB, et al. FGFR1 is fused to the centrosome-associated protein CEP110 in the 8p12 stem cell myeloproliferative disorder with t(8;9)(p12;q33). *Blood* 2000 Mar 1;95(5):1788-1796.

- Guasch G, Popovici C, Mugneret F, Chaffanet M, Pontarotti P, Birnbaum D, et al. Endogenous retroviral sequence is fused to FGFR1 kinase in the 8p12 stem-cell myeloproliferative disorder with t(8;19)(p12;q13.3). *Blood* 2003 Jan 1;101(1):286-288.
- Gupta R, Knight CL, Bain BJ. Receptor tyrosine kinase mutations in myeloid neoplasms. *Br J Haematol* 2002 Jun;117(3):489-508.
- Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstocker M, Nosslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007 Dec 15;110(13):4385-4395.
- Haferlach T, Bacher U, Haferlach C, Kern W, Schnittger S. Insight into the molecular pathogenesis of myeloid malignancies. *Curr Opin Hematol* 2007 Mar;14(2):90-97.
- Haferlach T, Bacher U, Kern W, Schnittger S, Haferlach C. The diagnosis of BCR/ABL-negative chronic myeloproliferative diseases (CMPD): a comprehensive approach based on morphology, cytogenetics, and molecular markers. *Ann Hematol* 2008 Jan;87(1):1-10.
- Hagemeyer A, Graux C. ABL1 rearrangements in T-Cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2010 Apr;49(4):299-308.
- Han SY, Gai W, Yancovitz M, Osman I, Di Como CJ, Polsky D. Nucleofection is a highly effective gene transfer technique for human melanoma cell lines. *Exp Dermatol* 2008 May;17(5):405-411.
- Hanks SK. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol* 2003;4(5):111.
- Hardy WR, Anderson RE. The hypereosinophilic syndromes. *Ann Intern Med* 1968 Jun;68(6):1220-1229.
- Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M, European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 2007 Jul 28;370(9584):342-350.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996 Oct;6(10):986-994.
- Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 2000 Aug 1;96(3):925-932.
- Heinrichs S, Kulkarni RV, Bueso-Ramos CE, Levine RL, Loh ML, Li C, et al. Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. *Leukemia* 2009 Sep;23(9):1605-1613.
- Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR. The human v-abl cellular homologue. *J Mol Appl Genet* 1983;2(1):57-68.
- Heldin CH. Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. *EMBO J* 1992 Dec;11(12):4251-4259.
- Hess G, Rose P, Gamm H, Papadileris S, Huber C, Seliger B. Molecular analysis of the erythropoietin receptor system in patients with polycythaemia vera. *Br J Haematol* 1994 Dec;88(4):794-802.
- Hexner EO, Serdikoff C, Jan M, Swider CR, Robinson C, Yang S, et al. Lestaurtinib (CEP701) is a JAK2 inhibitor that suppresses JAK2/STAT5 signaling and the proliferation of primary erythroid cells from patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 2008 Jun 15;111(12):5663-5671.

- Hidalgo-Curtis C, Apperley JF, Stark A, Jeng M, Gotlib J, Chase A, et al. Fusion of PDGFRB to two distinct loci at 3p21 and a third at 12q13 in imatinib-responsive myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol* 2010 Jan;148(2):268-273.
- Hidalgo-Curtis C, Chase A, Drachenberg M, Roberts MW, Finkelstein JZ, Mould S, et al. The t(1;9)(p34;q34) and t(8;12)(p11;q15) fuse pre-mRNA processing proteins SFPQ (PSF) and CPSF6 to ABL and FGFR1. *Genes Chromosomes Cancer* 2008 May;47(5):379-385.
- Hivroz C. Everything you ever wanted to know about ZAP-70. *Med Sci (Paris)* 2005 Feb;21(2):150-155.
- Ho CK, Anwar S, Nanda J, Habib FK. FGFR4 Gly388Arg polymorphism and prostate cancer risk in Scottish men. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2010 Mar;13(1):94-96.
- Hohenstein KA, Pyle AD, Chern JY, Lock LF, Donovan PJ. Nucleofection mediates high-efficiency stable gene knockdown and transgene expression in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2008 Jun;26(6):1436-1443.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Aug 15;88(16):7276-7280.
- Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* 2000;69:373-398.
- Hung CC, Lee CN, Chen CP, Jong YJ, Hsieh WS, Lin WL, et al. Molecular assay of -alpha(3.7) and -alpha(4.2) deletions causing alpha-thalassemia by denaturing high-performance liquid chromatography. *Clin Biochem* 2007 Jul;40(11):817-821.
- Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB, Cox DG, Yeager M, Hankinson SE, et al. A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet* 2007 Jul;39(7):870-874.
- Hutchcroft JE, Harrison ML, Geahlen RL. Association of the 72-kDa protein-tyrosine kinase PTK72 with the B cell antigen receptor. *J Biol Chem* 1992 Apr 25;267(12):8613-8619.
- Iijima Y, Ito T, Oikawa T, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Kamada N, et al. A new ETV6/TEL partner gene, ARG (ABL-related gene or ABL2), identified in an AML-M3 cell line with a t(1;12)(q25;p13) translocation. *Blood* 2000 Mar 15;95(6):2126-2131.
- Imada K, Leonard WJ. The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* 2000 Jan-Feb;37(1-2):1-11.
- Inhorn RC, Aster JC, Roach SA, Slapak CA, Soiffer R, Tantravahi R, et al. A syndrome of lymphoblastic lymphoma, eosinophilia, and myeloid hyperplasia/malignancy associated with t(8;13)(p11;q11): description of a distinctive clinicopathologic entity. *Blood* 1995 Apr 1;85(7):1881-1887.
- Iniesta R, Guino E, Moreno V. Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies]. *Gac Sanit* 2005 Jul-Aug;19(4):333-341.
- Jackson CC, Medeiros LJ, Miranda RN. 8p11 Myeloproliferative Syndrome: a Review. *Hum Pathol* 2010 Apr;41(4):461-476.
- Jager R, Gisslinger H, Passamonti F, Rumi E, Berg T, Gisslinger B, et al. Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2010 Jul;24(7):1290-1298.

- James C, Mazurier F, Dupont S, Chaligne R, Lamrissi-Garcia I, Tulliez M, et al. The hematopoietic stem cell compartment of JAK2V617F-positive myeloproliferative disorders is a reflection of disease heterogeneity. *Blood* 2008 Sep 15;112(6):2429-2438.
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005 Apr 28;434(7037):1144-1148.
- Jezequel P, Champion L, Joalland MP, Millour M, Dravet F, Classe JM, et al. G388R mutation of the FGFR4 gene is not relevant to breast cancer prognosis. *Br J Cancer* 2004 Jan 12;90(1):189-193.
- Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Levenson JD, Hunter T, Liu YC. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 1999 Oct 8;286(5438):309-312.
- Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol* 2002;107(2):76-94.
- Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, et al. Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clin Chem* 1999 Aug;45(8 Pt 1):1133-1140.
- Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL, et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009 Apr;41(4):446-449.
- Kales SC, Ryan PE, Nau MM, Lipkowitz S. Cbl and Human Myeloid Neoplasms: The Cbl Oncogene Comes of Age. *Cancer Res* 2010 May 25.
- Kanie T, Abe A, Matsuda T, Kuno Y, Towatari M, Yamamoto T, et al. TEL-Syk fusion constitutively activates PI3-K/Akt, MAPK and JAK2-independent STAT5 signal pathways. *Leukemia* 2004 Mar;18(3):548-555.
- Karow A, Waller C, Reimann C, Niemeyer CM, Kratz CP. JAK2 mutations other than V617F: a novel mutation and mini review. *Leuk Res* 2008 Feb;32(2):365-366.
- Katoh M. Cancer genomics and genetics of FGFR2 (Review). *Int J Oncol* 2008 Aug;33(2):233-237.
- Kawagishi J, Kumabe T, Yoshimoto T, Yamamoto T. Structure, organization, and transcription units of the human alpha-platelet-derived growth factor receptor gene, PDGFRA. *Genomics* 1995 Nov 20;30(2):224-232.
- Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA, Taylor BJ, Larratt LM, Mant MJ, et al. In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood* 2003 Feb 15;101(4):1520-1529.
- Khwaja A. The role of Janus kinases in haemopoiesis and haematological malignancy. *Br J Haematol* 2006 Aug;134(4):366-384.
- Kilpivaara O, Levine RL. JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. *Leukemia* 2008 Aug 28.
- Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM, Wadleigh M, Mullally A, Ebert BL, et al. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009 Apr;41(4):455-459.

- Kim M, Tezuka T, Tanaka K, Yamamoto T. Cbl-c suppresses v-Src-induced transformation through ubiquitin-dependent protein degradation. *Oncogene* 2004 Mar 4;23(9):1645-1655.
- Kipps TJ. The B-cell receptor and ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007 Sep;20(3):415-424.
- Kipreos ET, Wang JY. Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science* 1992 Apr 17;256(5055):382-385.
- Klion AD, Bochner BS, Gleich GJ, Nutman TB, Rothenberg ME, Simon HU, et al. Approaches to the treatment of hypereosinophilic syndromes: a workshop summary report. *J Allergy Clin Immunol* 2006 Jun;117(6):1292-1302.
- Klion AD, Robyn J, Akin C, Noel P, Brown M, Law M, et al. Molecular remission and reversal of myelofibrosis in response to imatinib mesylate treatment in patients with the myeloproliferative variant of hypereosinophilic syndrome. *Blood* 2004 Jan 15;103(2):473-478.
- Klippel S, Strunck E, Temerinac S, Bench AJ, Meinhardt G, Mohr U, et al. Quantification of PRV-1 mRNA distinguishes polycythemia vera from secondary erythrocytosis. *Blood* 2003 Nov 15;102(10):3569-3574.
- Knowles MA. Role of FGFR3 in urothelial cell carcinoma: biomarker and potential therapeutic target. *World J Urol* 2007 Dec;25(6):581-593.
- Kohlmann A, Grossmann V, Klein HU, Schindela S, Weiss T, Kazak B, et al. Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *J Clin Oncol* 2010 Aug 20;28(24):3858-3865.
- Koike K, Matsuda K. Recent advances in the pathogenesis and management of juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2008 May;141(5):567-575.
- Kosaki K, Udaka T, Okuyama T. DHPLC in clinical molecular diagnostic services. *Mol Genet Metab* 2005 Sep-Oct;86(1-2):117-123.
- Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Ciudad M, Racoeur C, Jooste V, Vey N, et al. TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 2009 Dec;94(12):1676-1681.
- Kota J, Caceres N, Constantinescu SN. Aberrant signal transduction pathways in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2008 Oct;22(10):1828-1840.
- Kouhara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I, et al. A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* 1997 May 30;89(5):693-702.
- Kralovics R. Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2008 Aug 28.
- Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2002 Mar;30(3):229-236.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005 Apr 28;352(17):1779-1790.
- Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 2005 Jul 14;353(2):172-187.

- Kreil S, Hochhaus A, Cross NC, Chase A. A high-throughput candidate gene mutation screen in lymphoproliferative and myeloproliferative neoplasias. *Leuk Res* 2009 Sep;33(9):e168-9.
- Kruh GD, King CR, Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh SC, McBride WO, et al. A novel human gene closely related to the abl proto-oncogene. *Science* 1986 Dec 19;234(4783):1545-1548.
- Kruh GD, Perego R, Miki T, Aaronson SA. The complete coding sequence of arg defines the Abelson subfamily of cytoplasmic tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Aug;87(15):5802-5806.
- Kulkarni S, Heath C, Parker S, Chase A, Iqbal S, Pocock CF, et al. Fusion of H4/D10S170 to the platelet-derived growth factor receptor beta in BCR-ABL-negative myeloproliferative disorders with a t(5;10)(q33;q21). *Cancer Res* 2000 Jul 1;60(13):3592-3598.
- Kunapuli P, Kasyapa CS, Chin SF, Caldas C, Cowell JK. ZNF198, a zinc finger protein rearranged in myeloproliferative disease, localizes to the PML nuclear bodies and interacts with SUMO-1 and PML. *Exp Cell Res* 2006 Nov 15;312(19):3739-3751.
- Kuno Y, Abe A, Emi N, Iida M, Yokozawa T, Towatari M, et al. Constitutive kinase activation of the TEL-Syk fusion gene in myelodysplastic syndrome with t(9;12)(q22;p12). *Blood* 2001 Feb 15;97(4):1050-1055.
- La Starza R, Rosati R, Roti G, Gorello P, Bardi A, Crescenzi B, et al. A new NDE1/PDGFRB fusion transcript underlying chronic myelomonocytic leukaemia in Noonan Syndrome. *Leukemia* 2007 Apr;21(4):830-833.
- La Starza R, Specchia G, Cuneo A, Beacci D, Nozzoli C, Luciano L, et al. The hypereosinophilic syndrome: fluorescence in situ hybridization detects the del(4)(q12)-FIP1L1/PDGFRB but not genomic rearrangements of other tyrosine kinases. *Haematologica* 2005 May;90(5):596-601.
- Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* 2006 Sep 1;108(5):1652-1660.
- Lahiry P, Torkamani A, Schork NJ, Hegele RA. Kinase mutations in human disease: interpreting genotype-phenotype relationships. *Nat Rev Genet* 2010 Jan;11(1):60-74.
- Landau M, Fleishman SJ, Ben-Tal N. A putative mechanism for downregulation of the catalytic activity of the EGF receptor via direct contact between its kinase and C-terminal domains. *Structure* 2004 Dec;12(12):2265-2275.
- Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY, Helgadottir EA, Samuelsson J, Bjorkholm M. Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24,577 first-degree relatives of 11,039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood* 2008 Sep 15;112(6):2199-2204.
- Lane SW, Fairbairn DJ, McCarthy C, Nandini A, Perry-Keene J, Kennedy GA. Leukaemia cutis in atypical chronic myeloid leukaemia with a t(9;22) (p24;q11.2) leading to BCR-JAK2 fusion. *Br J Haematol* 2008 Aug;142(4):503.
- Langdon WY, Hyland CD, Grumont RJ, Morse HC, 3rd. The c-cbl proto-oncogene is preferentially expressed in thymus and testis tissue and encodes a nuclear protein. *J Virol* 1989 Dec;63(12):5420-5424.
- Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 2009 Jul;41(7):838-842.

- Lasho TL, Tefferi A, Hood JD, Verstovsek S, Gilliland DG, Pardanani A. TG101348, a JAK2-selective antagonist, inhibits primary hematopoietic cells derived from myeloproliferative disorder patients with JAK2V617F, MPLW515K or JAK2 exon 12 mutations as well as mutation negative patients. *Leukemia* 2008 Sep;22(9):1790-1792.
- Latour S, Chow LM, Veillette A. Differential intrinsic enzymatic activity of Syk and Zap-70 protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1996 Sep 13;271(37):22782-22790.
- Le Couedic JP, Mitjavila MT, Villeval JL, Feger F, Gobert S, Mayeux P, et al. Missense mutation of the erythropoietin receptor is a rare event in human erythroid malignancies. *Blood* 1996 Feb 15;87(4):1502-1511.
- Levine RL, Carroll M. A common genetic mechanism in malignant bone marrow diseases. *N Engl J Med* 2009 May 28;360(22):2355-2357.
- Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood* 2008 Sep 15;112(6):2190-2198.
- Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 2007 Sep;7(9):673-683.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005 Apr;7(4):387-397.
- Levine RL, Wadleigh M, Sternberg DW, Wlodarska I, Galinsky I, Stone RM, et al. KIAA1509 is a novel PDGFRB fusion partner in imatinib-responsive myeloproliferative disease associated with a t(5;14)(q33;q32). *Leukemia* 2005 Jan;19(1):27-30.
- Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, et al. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 1999 Dec;4(6):1029-1040.
- L'Hote CG, Knowles MA. Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis. *Exp Cell Res* 2005 Apr 1;304(2):417-431.
- Li JM, Shen X, Hu PP, Wang XF. Transforming growth factor beta stimulates the human immunodeficiency virus 1 enhancer and requires NF-kappaB activity. *Mol Cell Biol* 1998 Jan;18(1):110-121.
- Li X, Liu X, Wang G, Zhu X, Qu X, Li X, et al. Non-receptor tyrosine kinases c-Abl and Arg regulate the activity of C/EBPbeta. *J Mol Biol* 2009 Aug 28;391(4):729-743.
- Lin J, Arlinghaus R. Activated c-Abl tyrosine kinase in malignant solid tumors. *Oncogene* 2008 Jul 24;27(32):4385-4391.
- Liu W, Smith DI, Rehtz KJ, Thibodeau SN, James CD. Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations. *Nucleic Acids Res* 1998 Mar 15;26(6):1396-1400.
- Liu X, Huang W, Li C, Li P, Yuan J, Li X, et al. Interaction between c-Abl and Arg tyrosine kinases and proteasome subunit PSMA7 regulates proteasome degradation. *Mol Cell* 2006 May 5;22(3):317-327.
- Liu YC. Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004;22:81-127.
- Loh ML, Sakai DS, Flotho C, Kang M, Fliegauf M, Archambeault S, et al. Mutations in CBL occur frequently in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 2009 Aug 27;114(9):1859-1863.

- Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem* 2004 Dec 30;47(27):6658-6661.
- Loriaux MM, Levine RL, Tyner JW, Frohling S, Scholl C, Stoffregen EP, et al. High-throughput sequence analysis of the tyrosine kinome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008 May 1;111(9):4788-4796.
- Lorsbach RB, Moore J, Mathew S, Raimondi SC, Mukatira ST, Downing JR. TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia* 2003 Mar;17(3):637-641.
- Luo D, Saltzman WM. Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface. *Nat Biotechnol* 2000 Aug;18(8):893-895.
- Lupher ML, Jr, Andoniou CE, Bonita D, Miyake S, Band H. The c-Cbl oncoprotein. *Int J Biochem Cell Biol* 1998 Apr;30(4):439-444.
- Lupher ML, Jr, Rao N, Lill NL, Andoniou CE, Miyake S, Clark EA, et al. Cbl-mediated negative regulation of the Syk tyrosine kinase. A critical role for Cbl phosphotyrosine-binding domain binding to Syk phosphotyrosine 323. *J Biol Chem* 1998 Dec 25;273(52):35273-35281.
- Lupher ML, Jr, Songyang Z, Shoelson SE, Cantley LC, Band H. The Cbl phosphotyrosine-binding domain selects a D(N/D)XpY motif and binds to the Tyr292 negative regulatory phosphorylation site of ZAP-70. *J Biol Chem* 1997 Dec 26;272(52):33140-33144.
- Lurje G, Lenz HJ. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* 2009;77(6):400-410.
- Lynch TJ. The evolving story of the epidermal growth factor receptor as a target for non-small-cell lung cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2004 Dec;2(12):786-787.
- Macdonald D, Aguiar RC, Mason PJ, Goldman JM, Cross NC. A new myeloproliferative disorder associated with chromosomal translocations involving 8p11: a review. *Leukemia* 1995 Oct;9(10):1628-1630.
- Macdonald D, Cross NC. Chronic myeloproliferative disorders: the role of tyrosine kinases in pathogenesis, diagnosis and therapy. *Pathobiology* 2007;74(2):81-88.
- Macdonald D, Reiter A, Cross NC. The 8p11 myeloproliferative syndrome: a distinct clinical entity caused by constitutive activation of FGFR1. *Acta Haematol* 2002;107(2):101-107.
- Maeda T, Yagasaki F, Ishikawa M, Takahashi N, Bessho M. Transforming property of TEL-FGFR3 mediated through PI3-K in a T-cell lymphoma that subsequently progressed to AML. *Blood* 2005 Mar 1;105(5):2115-2123.
- Magnifico A, Ettenberg S, Yang C, Mariano J, Tiwari S, Fang S, et al. WW domain HECT E3s target Cbl RING finger E3s for proteasomal degradation. *J Biol Chem* 2003 Oct 31;278(44):43169-43177.
- Magnusson MK, Meade KE, Brown KE, Arthur DC, Krueger LA, Barrett AJ, et al. Rabaptin-5 is a novel fusion partner to platelet-derived growth factor beta receptor in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2001 Oct 15;98(8):2518-2525.
- Makishima H, Cazzolli H, Szpurka H, Dunbar A, Tiu R, Huh J, et al. Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies. *J Clin Oncol* 2009 Dec 20;27(36):6109-6116.

- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002 Dec 6;298(5600):1912-1934.
- Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009 Sep 10;361(11):1058-1066.
- Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009 Sep 10;361(11):1058-1066.
- Martin P, Papayannopoulou T. HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. *Science* 1982 Jun 11;216(4551):1233-1235.
- Martinelli G, Iacobucci I, Storlazzi CT, Vignetti M, Paoloni F, Cilloni D, et al. IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report. *J Clin Oncol* 2009 Nov 1;27(31):5202-5207.
- Martinelli S, De Luca A, Stellacci E, Rossi C, Checquolo S, Lepri F, et al. Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype. *Am J Hum Genet* 2010 Aug 13;87(2):250-257.
- Martinet W, Schrijvers DM, Kockx MM. Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells. *Biotechnol Lett* 2003 Jul;25(13):1025-1029.
- Martinez-Aviles L, Besses C, Alvarez-Larran A, Cervantes F, Hernandez-Boluda JC, Bellosillo B. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis. *Haematologica* 2007 Dec;92(12):1717-1718.
- Martinez-Climent JA, Vizcarra E, Benet I, Marugan I, Terol MJ, Solano C, et al. Cytogenetic response induced by interferon alpha in the myeloproliferative disorder with eosinophilia, T cell lymphoma and the chromosomal translocation t(8;13)(p11;q12). *Leukemia* 1998 Jun;12(6):999-1000.
- Mason IJ. The ins and outs of fibroblast growth factors. *Cell* 1994 Aug 26;78(4):547-552.
- Matsuda K, Taira C, Sakashita K, Saito S, Tanaka-Yanagisawa M, Yanagisawa R, et al. Long-term survival after nonintensive chemotherapy in some juvenile myelomonocytic leukemia patients with CBL mutations, and the possible presence of healthy persons with the mutations. *Blood* 2010 Jul 1;115(26):5429-5431.
- McWhirter JR, Wang JY. An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO J* 1993 Apr;12(4):1533-1546.
- Medves S, Duhoux FP, Ferrant A, Toffalini F, Ameye G, Libouton JM, et al. KANK1, a candidate tumor suppressor gene, is fused to PDGFRB in an imatinib-responsive myeloid neoplasm with severe thrombocythemia. *Leukemia* 2010 May;24(5):1052-1055.
- Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood* 2008 Jan 15;111(2):485-491.
- Michiels JJ, Commandeur S, Hoogenboom GJ, Wegman JJ, Scholten L, van Rijssel RH, et al. JAK2(V617F) positive early stage myeloproliferative disease (essential thrombocythemia) as the cause of portal vein thrombosis in two middle-aged women: therapeutic implications in view of the literature. *Ann Hematol* 2007 Nov;86(11):793-800.

- Michl P, Spoettl G, Engelhardt D, Weber MM. Alterations of the insulin-like growth factor system in patients with polycythemia vera. *Mol Cell Endocrinol* 2001 Jul 5;181(1-2):189-197.
- Migliaccio G, Migliaccio AR, Kreider BL, Rovera G, Adamson JW. Selection of lineage-restricted cell lines immortalized at different stages of hematopoietic differentiation from the murine cell line 32D. *J Cell Biol* 1989 Aug;109(2):833-841.
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 2007 Apr;7(4):233-245.
- Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J* 2010 Jan;277(2):301-308.
- Mittelman M, Gardyn J, Carmel M, Malovani H, Barak Y, Nir U. Analysis of the erythropoietin receptor gene in patients with myeloproliferative and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 1996 Jun;20(6):459-466.
- Montagna C, Massaro P, Morali F, Foa P, Maiolo AT, Eridani S. In vitro sensitivity of human erythroid progenitors to hemopoietic growth factors: studies on primary and secondary polycythemia. *Haematologica* 1994 Jul-Aug;79(4):311-318.
- Morerio C, Aquila M, Rosanda C, Rapella A, Dufour C, Locatelli F, et al. HCMOGT-1 is a novel fusion partner to PDGFRB in juvenile myelomonocytic leukemia with t(5;17)(q33;p11.2). *Cancer Res* 2004 Apr 15;64(8):2649-2651.
- Moroni M, Soldatenkov V, Zhang L, Zhang Y, Stoica G, Gehan E, et al. Progressive loss of Syk and abnormal proliferation in breast cancer cells. *Cancer Res* 2004 Oct 15;64(20):7346-7354.
- Mottok A, Renne C, Willenbrock K, Hansmann ML, Brauninger A. Somatic hypermutation of SOCS1 in lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma is accompanied by high JAK2 expression and activation of STAT6. *Blood* 2007 Nov 1;110(9):3387-3390.
- Mughal T, Goldman JM. Optimal management of patients with newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia in 2007. *Clin Lymphoma Myeloma* 2007 Mar;7 Suppl 3:S95-101.
- Mughal TI, Goldman JM. Emerging strategies for the treatment of mutant Bcr-Abl T315I myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2007 Mar;7 Suppl 2:S81-4.
- Mugneret F, Chaffanet M, Maynadie M, Guasch G, Favre B, Casasnovas O, et al. The 8p12 myeloproliferative disorder. t(8;19)(p12;q13.3): a novel translocation involving the FGFR1 gene. *Br J Haematol* 2000 Nov;111(2):647-649.
- Mullighan CG. TET2 mutations in myelodysplasia and myeloid malignancies. *Nat Genet* 2009 Jul;41(7):766-767.
- Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J, et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 2008 May 1;453(7191):110-114.
- Muramatsu H, Makishima H, Jankowska AM, Cazzolli H, O'Keefe C, Yoshida N, et al. Mutations of E3 ubiquitin ligase Cbl family members but not TET2 mutations are pathogenic in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 2009 Dec 11.

- Murati A, Gelsi-Boyer V, Adelaide J, Perot C, Talmant P, Giraudier S, et al. PCM1-JAK2 fusion in myeloproliferative disorders and acute erythroid leukemia with t(8;9) translocation. *Leukemia* 2005 Sep;19(9):1692-1696.
- Mustelin T, Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem J* 2003 Apr 1;371(Pt 1):15-27.
- Mustjoki S, Hernesniemi S, Rauhala A, Kahkonen M, Almqvist A, Lundan T, et al. A novel dasatinib-sensitive RCSD1-ABL1 fusion transcript in chemotherapy-refractory adult pre-B lymphoblastic leukemia with t(1;9)(q24;q34). *Haematologica* 2009 Oct;94(10):1469-1471.
- Nagane M, Coufal F, Lin H, Bogler O, Cavenee WK, Huang HJ. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res* 1996 Nov 1;56(21):5079-5086.
- Nagar B, Hantschel O, Young MA, Scheffzek K, Veach D, Bornmann W, et al. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 2003 Mar 21;112(6):859-871.
- Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Nov 7;92(23):10560-10564.
- Najfeld V, Montella L, Scalise A, Fruchtman S. Exploring polycythaemia vera with fluorescence in situ hybridization: additional cryptic 9p is the most frequent abnormality detected. *Br J Haematol* 2002 Nov;119(2):558-566.
- Naramura M, Nandwani N, Gu H, Band V, Band H. Rapidly fatal myeloproliferative disorders in mice with deletion of Casitas B-cell lymphoma (Cbl) and Cbl-b in hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Sep 14;107(37):16274-16279.
- Naski MC, Ornitz DM. FGF signaling in skeletal development. *Front Biosci* 1998 Aug 1;3:d781-94.
- Neufeld G, Gospodarowicz D. Identification of the fibroblast growth factor receptor in human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 1988 Sep;136(3):537-542.
- Neumann AW, Absolom DR, Francis DW, Zingg W, van Oss CJ. Surface thermodynamics of phagocytic ingestion of non-opsonized bacteria by granulocytes in liquids of different surface tensions. *Cell Biophys* 1982 Dec;4(4):285-293.
- Niemeyer CM, Arico M, Basso G, Biondi A, Cantu Rajnoldi A, Creutzig U, et al. Chronic myelomonocytic leukemia in childhood: a retrospective analysis of 110 cases. European Working Group on Myelodysplastic Syndromes in Childhood (EWOG-MDS). *Blood* 1997 May 15;89(10):3534-3543.
- Niemeyer CM, Kang MW, Shin DH, Furlan I, Erlacher M, Bunin NJ, et al. Germline CBL mutations cause developmental abnormalities and predispose to juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet* 2010 Sep;42(9):794-800.
- Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tonnisson ER, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 2010 Aug;42(8):665-667.
- Nimer SD. MDS: a stem cell disorder--but what exactly is wrong with the primitive hematopoietic cells in this disease? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008:43-51.

- Nolte F, Hofmann WK. Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. *Ann Hematol* 2008 Oct;87(10):777-795.
- NOWELL PC, HUNGERFORD DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 1960 Jul;25:85-109.
- Oehler VG, Qin J, Ramakrishnan R, Facer G, Ananthnarayan S, Cummings C, et al. Absolute quantitative detection of ABL tyrosine kinase domain point mutations in chronic myeloid leukemia using a novel nanofluidic platform and mutation-specific PCR. *Leukemia* 2009 Feb;23(2):396-399.
- Ogawa S, Sanada M, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, et al. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. *Cell Cycle* 2010 Mar 23;9(6).
- Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koefler HP, et al. Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms. *Clin Cancer Res* 2010 Aug 1;16(15):3825-3831.
- Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG, Griffin JD. ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood* 2001 Apr 15;97(8):2440-2448.
- Olcaydu D, Harutyunyan A, Jager R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009 Apr;41(4):450-454.
- Olcaydu D, Skoda RC, Looser R, Li S, Cazzola M, Pietra D, et al. The 'GGCC' haplotype of JAK2 confers susceptibility to JAK2 exon 12 mutation-positive polycythemia vera. *Leukemia* 2009 Oct;23(10):1924-1926.
- Olwin BB, Hauschka SD. Cell type and tissue distribution of the fibroblast growth factor receptor. *J Cell Biochem* 1989 Apr;39(4):443-454.
- Orazi A, Germing U. The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features. *Leukemia* 2008 Jul;22(7):1308-1319.
- Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004 Jan 10;363(9403):105-111.
- Ormazabal C, Hurtado C, Aranaz P, Erquiaga I, Garcia-Delgado M, Calasanz MJ, et al. Low frequency of JAK2 exon 12 mutations in classic and atypical CMPDs. *Leuk Res* 2008 Sep;32(9):1485-1487.
- Ormazabal C, Tesis Doctoral. Análisis de alteraciones en genes codificantes de proteínas con actividad tirosín quinasa de las familias Pdgfr y Jak en neoplasias mieloproliferativas crónicas BCR-ABL1 negativas.
- Ota Y, Samelson LE. The product of the proto-oncogene c-cbl: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase. *Science* 1997 Apr 18;276(5311):418-420.
- Ottmann OG, Wassmann B. Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:118-122.
- Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004 Jun 4;304(5676):1497-1500.

- Pagani F, Baralle FE. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet* 2004 May;5(5):389-396.
- Pan X, Urban AE, Palejev D, Schulz V, Grubert F, Hu Y, et al. A procedure for highly specific, sensitive, and unbiased whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Oct 7;105(40):15499-15504.
- Panani AD. Cytogenetic and molecular aspects of Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders: clinical implications. *Cancer Lett* 2007 Sep 18;255(1):12-25.
- Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Sep 7;101(36):13306-13311.
- Paolino M, Penninger JM. Cbl-b in T-cell activation. *Semin Immunopathol* 2010 Jun;32(2):137-148.
- Papadopoulos P, Ridge SA, Boucher CA, Stocking C, Wiedemann LM. The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL. *Cancer Res* 1995 Jan 1;55(1):34-38.
- Paquette RL, Landaw EM, Pierre RV, Kahan J, Lubbert M, Lazcano O, et al. N-ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome. *Blood* 1993 Jul 15;82(2):590-599.
- Pardanani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood* 2008 Mar 1;111(5):2785-2789.
- Pardanani A, Ketterling RP, Li CY, Patnaik MM, Wolanskyj AP, Elliott MA, et al. FIP1L1-PDGFR α in eosinophilic disorders: prevalence in routine clinical practice, long-term experience with imatinib therapy, and a critical review of the literature. *Leuk Res* 2006 Aug;30(8):965-970.
- Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Hanson CA, Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia* 2007 Sep;21(9):1960-1963.
- Pardanani A, Patnaik MM, Lasho TL, Mai M, Knudson RA, Finke C, et al. Recurrent IDH mutations in high-risk myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia with isolated del(5q). *Leukemia* 2010 May 20.
- Pardanani A, Tefferi A. Imatinib targets other than bcr/abl and their clinical relevance in myeloid disorders. *Blood* 2004 Oct 1;104(7):1931-1939.
- Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006 Nov 15;108(10):3472-3476.
- Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, et al. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med* 2004 Nov 15;117(10):755-761.
- Pastinen T, Ge B, Hudson TJ. Influence of human genome polymorphism on gene expression. *Hum Mol Genet* 2006 Apr 15;15 Spec No 1:R9-16.

- Patnaik MM, Tefferi A, Pardanani A. Kit: molecule of interest for the diagnosis and treatment of mastocytosis and other neoplastic disorders. *Curr Cancer Drug Targets* 2007 Aug;7(5):492-503.
- Paul MK, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase - Role and significance in Cancer. *Int J Med Sci* 2004;1(2):101-115.
- Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature* 1995 Feb 16;373(6515):573-580.
- Peeters P, Raynaud SD, Cools J, Wlodarska I, Grosgeorge J, Philip P, et al. Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood* 1997 Oct 1;90(7):2535-2540.
- Pendergast AM. The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Adv Cancer Res* 2002;85:51-100.
- Pendergast AM. Nuclear tyrosine kinases: from Abl to WEE1. *Curr Opin Cell Biol* 1996 Apr;8(2):174-181.
- Pendergast AM, Traugh JA, Witte ON. Normal cellular and transformation-associated abl proteins share common sites for protein kinase C phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1987 Dec;7(12):4280-4289.
- Penserga ET, Skorski T. Fusion tyrosine kinases: a result and cause of genomic instability. *Oncogene* 2007 Jan 4;26(1):11-20.
- Percy MJ, Scott LM, Erber WN, Harrison CN, Reilly JT, Jones FG, et al. The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. *Haematologica* 2007 Dec;92(12):1607-1614.
- Perez B, Kosmider O, Cassinat B, Renneville A, Lachenaud J, Kaltenbach S, et al. Genetic typing of CBL, ASXL1, RUNX1, TET2 and JAK2 in juvenile myelomonocytic leukaemia reveals a genetic profile distinct from chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2010 Dec;151(5):460-468.
- Peschard P, Park M. Escape from Cbl-mediated downregulation: a recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases. *Cancer Cell* 2003 Jun;3(6):519-523.
- Piao X, Bernstein A. A point mutation in the catalytic domain of c-kit induces growth factor independence, tumorigenicity, and differentiation of mast cells. *Blood* 1996 Apr 15;87(8):3117-3123.
- Piccaluga PP, Rondoni M, Paolini S, Rosti G, Martinelli G, Baccarani M. Imatinib mesylate in the treatment of hematologic malignancies. *Expert Opin Biol Ther* 2007 Oct;7(10):1597-1611.
- Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocharides A, et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2008 Feb 1;111(3):1686-1689.
- Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006 Jul;3(7):e270.
- Pines G, Kostler WJ, Yarden Y. Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS Lett* 2010 Jun 18;584(12):2699-2706.
- Plattner R, Kadlec L, DeMali KA, Kazlauskas A, Pendergast AM. c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes Dev* 1999 Sep 15;13(18):2400-2411.

- Pluk H, Dorey K, Superti-Furga G. Autoinhibition of c-Abl. *Cell* 2002 Jan 25;108(2):247-259.
- Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, Powell MA, Mallon MA, Davies H, et al. Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. *Oncogene* 2007 Nov 1;26(50):7158-7162.
- Popovici C, Adelaide J, Ollendorff V, Chaffanet M, Guasch G, Jacrot M, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 is fused to FIM in stem-cell myeloproliferative disorder with t(8;13). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 May 12;95(10):5712-5717.
- Popovici C, Zhang B, Gregoire MJ, Jonveaux P, Lafage-Pochitaloff M, Birnbaum D, et al. The t(6;8)(q27;p11) translocation in a stem cell myeloproliferative disorder fuses a novel gene, FOP, to fibroblast growth factor receptor 1. *Blood* 1999 Feb 15;93(4):1381-1389.
- Prchal JF, Axelrad AA. Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med* 1974 Jun 13;290(24):1382.
- Preker PJ, Lingner J, Minvielle-Sebastia L, Keller W. The FIP1 gene encodes a component of a yeast pre-mRNA polyadenylation factor that directly interacts with poly(A) polymerase. *Cell* 1995 May 5;81(3):379-389.
- Prieto F, Egozcue J, Forteza G, Marco F. Identification of the Philadelphia (Ph-1) chromosome. *Blood* 1970 Jan;35(1):23-27.
- Qu X, Li Y, Liu J, Xu L, Zhang Y, Hu X, et al. Cbl-b promotes chemotherapy-induced apoptosis in rat basophilic leukemia cells by suppressing PI3K/Akt activation and enhancing MEK/ERK activation. *Mol Cell Biochem* 2010 Jul;340(1-2):107-114.
- Quentmeier H, MacLeod RA, Zaborski M, Drexler HG. JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in cell lines derived from myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2006 Mar;20(3):471-476.
- Quintas-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009 Feb 19;113(8):1619-1630.
- Radich JP. Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2001 Feb;15(1):21-36.
- Radich JP, Gooley T, Bryant E, Chauncey T, Clift R, Beppu L, et al. The significance of bcr-abl molecular detection in chronic myeloid leukemia patients "late," 18 months or more after transplantation. *Blood* 2001 Sep 15;98(6):1701-1707.
- Rane SG, Reddy EP. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 2000 Nov 20;19(49):5662-5679.
- Rao N, Ghosh AK, Ota S, Zhou P, Reddi AL, Hakezi K, et al. The non-receptor tyrosine kinase Syk is a target of Cbl-mediated ubiquitylation upon B-cell receptor stimulation. *EMBO J* 2001 Dec 17;20(24):7085-7095.
- Rathinam C, Thien CB, Flavell RA, Langdon WY. Myeloid leukemia development in c-Cbl RING finger mutant mice is dependent on FLT3 signaling. *Cancer Cell* 2010 Oct 19;18(4):341-352.
- Rathinam C, Thien CB, Langdon WY, Gu H, Flavell RA. The E3 ubiquitin ligase c-Cbl restricts development and functions of hematopoietic stem cells. *Genes Dev* 2008 Apr 15;22(8):992-997.
- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 2004 Mar 15;117(Pt 8):1281-1283.

- Reindl C, Quentmeier H, Petropoulos K, Greif PA, Benthaus T, Argiropoulos B, et al. CBL exon 8/9 mutants activate the FLT3 pathway and cluster in core binding factor/11q deletion acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res* 2009 Apr 1;15(7):2238-2247.
- Reiter A, Sohal J, Kulkarni S, Chase A, Macdonald DH, Aguiar RC, et al. Consistent fusion of ZNF198 to the fibroblast growth factor receptor-1 in the t(8;13)(p11;q12) myeloproliferative syndrome. *Blood* 1998 Sep 1;92(5):1735-1742.
- Reiter A, Walz C, Watmore A, Schoch C, Blau I, Schlegelberger B, et al. The t(8;9)(p22;p24) is a recurrent abnormality in chronic and acute leukemia that fuses PCM1 to JAK2. *Cancer Res* 2005 Apr 1;65(7):2662-2667.
- Reither A, Hehlmann R, Goldman JM, Cross NC. The 8p11 myeloproliferative syndrome. *Med Klin (Munich)* 1999 Apr 15;94(4):207-210.
- Ren R, Ye ZS, Baltimore D. Abl protein-tyrosine kinase selects the Crk adapter as a substrate using SH3-binding sites. *Genes Dev* 1994 Apr 1;8(7):783-795.
- Renne C, Willenbrock K, Martin-Subero JI, Hinsch N, Doring C, Tiacci E, et al. High expression of several tyrosine kinases and activation of the PI3K/AKT pathway in mediastinal large B cell lymphoma reveals further similarities to Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 2007 Apr;21(4):780-787.
- Renshaw MW, Capozza MA, Wang JY. Differential expression of type-specific c-abl mRNAs in mouse tissues and cell lines. *Mol Cell Biol* 1988 Oct;8(10):4547-4551.
- Riccaboni M, Bianchi I, Petrillo P. Spleen tyrosine kinases: biology, therapeutic targets and drugs. *Drug Discov Today* 2010 Jul;15(13-14):517-530.
- Roberts PS, Jozwiak S, Kwiatkowski DJ, Dabora SL. Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) is a highly sensitive, semi-automated method for identifying mutations in the TSC1 gene. *J Biochem Biophys Methods* 2001 Jan 30;47(1-2):33-37.
- Robertson SC, Tynan J, Donoghue DJ. RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad. *Trends Genet* 2000 Aug;16(8):368.
- Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000 Nov 20;19(49):5548-5557.
- Robyn J, Metcalfe DD. Systemic mastocytosis. *Adv Immunol* 2006;89:169-243.
- Rocquain J, Carbuccioni N, Trouplin V, Raynaud S, Murati A, Nezri M, et al. Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *BMC Cancer* 2010 Aug 2;10:401.
- Rosati R, La Starza R, Luciano L, Gorello P, Matteucci C, Pierini V, et al. TPM3/PDGFRB fusion transcript and its reciprocal in chronic eosinophilic leukemia. *Leukemia* 2006 Sep;20(9):1623-1624.
- Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009 Sep 3;361(10):958-967.
- Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001 Dec 3;194(11):1639-1647.

- Ross TS, Bernard OA, Berger R, Gilliland DG. Fusion of Huntingtin interacting protein 1 to platelet-derived growth factor beta receptor (PDGFBetaR) in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;7)(q33;q11.2). *Blood* 1998 Jun 15;91(12):4419-4426.
- Roufosse FE, Goldman M, Cogan E. Hypereosinophilic syndromes. *Orphanet J Rare Dis* 2007 Sep 11;2:37.
- Roumiantsev S, Krause DS, Neumann CA, Dimitri CA, Asiedu F, Cross NC, et al. Distinct stem cell myeloproliferative/T lymphoma syndromes induced by ZNF198-FGFR1 and BCR-FGFR1 fusion genes from 8p11 translocations. *Cancer Cell* 2004 Mar;5(3):287-298.
- Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Pelet A, Rozet JM, Maroteaux P, et al. Mutations of the fibroblast growth factor receptor-3 gene in achondroplasia. *Horm Res* 1996;45(1-2):108-110.
- Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973 Jun 1;243(5405):290-293.
- Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000;132:365-386.
- Ruhe JE, Streit S, Hart S, Wong CH, Specht K, Knyazev P, et al. Genetic alterations in the tyrosine kinase transcriptome of human cancer cell lines. *Cancer Res* 2007 Dec 1;67(23):11368-11376.
- Rumi E. Familial chronic myeloproliferative disorders: the state of the art. *Hematol Oncol* 2008 Sep;26(3):131-138.
- Ryan PE, Davies GC, Nau MM, Lipkowitz S. Regulating the regulator: negative regulation of Cbl ubiquitin ligases. *Trends Biochem Sci* 2006 Feb;31(2):79-88.
- Sada K, Takano T, Yanagi S, Yamamura H. Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J Biochem* 2001 Aug;130(2):177-186.
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995 Jul;19(3):183-232.
- Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, et al. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature* 2009 Aug 13;460(7257):904-908.
- Sanna S, Pitzalis M, Zoledziewska M, Zara I, Sidore C, Murru R, et al. Variants within the immunoregulatory CBLB gene are associated with multiple sclerosis. *Nat Genet* 2010 Jun;42(6):495-497.
- Sargin B, Choudhary C, Crosetto N, Schmidt MH, Grundler R, Rensinghoff M, et al. Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML. *Blood* 2007 Aug 1;110(3):1004-1012.
- Sato M, Ohtsuka M, Ohmi Y. Repeated GenomiPhi, phi29 DNA polymerase-based rolling circle amplification, is useful for generation of large amounts of plasmid DNA. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 2004;(48)(48):147-148.
- Savage DG, Antman KH. Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy. *N Engl J Med* 2002 Feb 28;346(9):683-693.
- Savage KJ, Monti S, Kutok JL, Cattoretti G, Neuberg D, De Leval L, et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-

- cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003 Dec 1;102(12):3871-3879.
- Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999 Apr 29;340(17):1330-1340.
- Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 1994 Apr 8;77(1):121-131.
- Scaife RM, Job D, Langdon WY. Rapid microtubule-dependent induction of neurite-like extensions in NIH 3T3 fibroblasts by inhibition of ROCK and Cbl. *Mol Biol Cell* 2003 Nov;14(11):4605-4617.
- Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2006 Sep 15;12(18):5268-5272.
- Schaub FX, Jager R, Looser R, Hao-Shen H, Hermouet S, Girodon F, et al. Clonal analysis of deletions on chromosome 20q and JAK2-V617F in MPD suggests that del20q acts independently and is not one of the predisposing mutations for JAK2-V617F. *Blood* 2009 Feb 26;113(9):2022-2027.
- Schaub FX, Looser R, Li S, Hao-Shen H, Lehmann T, Tichelli A, et al. Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2010 Mar 11;115(10):2003-2007.
- Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 2000 Sep 15;289(5486):1938-1942.
- Schittenhelm MM, Shiraga S, Schroeder A, Corbin AS, Griffith D, Lee FY, et al. Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies. *Cancer Res* 2006 Jan 1;66(1):473-481.
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000 Oct 13;103(2):211-225.
- Schmidt MH, Dikic I. The Cbl interactome and its functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005 Dec;6(12):907-918.
- Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Geer T, Muller P, Mittermuller J, et al. Detection of JAK2 exon 12 mutations in 15 patients with JAK2V617F negative polycythemia vera. *Haematologica* 2009 Mar;94(3):414-418.
- Schnittger S, Bacher U, Kern W, Schroder M, Haferlach T, Schoch C. Report on two novel nucleotide exchanges in the JAK2 pseudokinase domain: D620E and E627E. *Leukemia* 2006 Dec;20(12):2195-2197.
- Schnittger S, Kohl TM, Leopold N, Schoch C, Wichmann HE, Kern W, et al. D324N single-nucleotide polymorphism in the FLT3 gene is associated with higher risk of myeloid leukemias. *Genes Chromosomes Cancer* 2006 Apr;45(4):332-337.
- Schwaller J, Anastasiadou E, Cain D, Kutok J, Wojiski S, Williams IR, et al. H4(D10S170), a gene frequently rearranged in papillary thyroid carcinoma, is fused to the platelet-derived growth factor receptor beta gene in atypical chronic myeloid leukemia with t(5;10)(q33;q22). *Blood* 2001 Jun 15;97(12):3910-3918.
- Score J, Curtis C, Waghorn K, Stalder M, Jotterand M, Grand FH, et al. Identification of a novel imatinib responsive KIF5B-PDGFR A fusion gene following screening for PDGFR A overexpression in patients with hypereosinophilia. *Leukemia* 2006 May;20(5):827-832.

- Scott LM, Beer PA, Bench AJ, Erber WN, Green AR. Prevalance of JAK2 V617F and exon 12 mutations in polycythaemia vera. *Br J Haematol* 2007 Nov;139(3):511-512.
- Shah BH, Olivares-Reyes JA, Catt KJ. The protein kinase C inhibitor Go6976 [12-(2-cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo(2,3-a)pyrrolo(3,4-c)-carbazole] potentiates agonist-induced mitogen-activated protein kinase activation through tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Mol Pharmacol* 2005 Jan;67(1):184-194.
- Shah NP, Lee FY, Luo R, Jiang Y, Donker M, Akin C. Dasatinib (BMS-354825) inhibits KITD816V, an imatinib-resistant activating mutation that triggers neoplastic growth in most patients with systemic mastocytosis. *Blood* 2006 Jul 1;108(1):286-291.
- Shannon K, Loh M. Cancer: More than kin and less than kind. *Nature* 2009 Aug 13;460(7257):804-807.
- Shen M, Yen A. c-Cbl interacts with CD38 and promotes retinoic acid-induced differentiation and G0 arrest of human myeloblastic leukemia cells. *Cancer Res* 2008 Nov 1;68(21):8761-8769.
- Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Church DM, Fielder TJ, Bocian M, et al. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 1994 Jul 29;78(2):335-342.
- Shide K, et al. Pathogenetic role of JAK2 gene mutation in chronic myeloproliferative disorders]. *Rinsho Ketsueki* 2008 Jul;49(7):429-436.
- Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 1985 Jun 13-19;315(6020):550-554.
- Skoda R. The genetic basis of myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007;2007:1-10.
- Skorski T. Oncogenic tyrosine kinases and the DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* 2002 May;2(5):351-360.
- Slape C, Liu LY, Beachy S, Aplan PD. Leukemic transformation in mice expressing a NUP98-HOXD13 transgene is accompanied by spontaneous mutations in Nras, Kras, and Cbl. *Blood* 2008 Sep 1;112(5):2017-2019.
- Smedley D, Demiroglu A, Abdul-Rauf M, Heath C, Cooper C, Shipley J, et al. ZNF198-FGFR1 transforms Ba/F3 cells to growth factor independence and results in high level tyrosine phosphorylation of STATS 1 and 5. *Neoplasia* 1999 Oct;1(4):349-355.
- Sohal J, Chase A, Mould S, Corcoran M, Oscier D, Iqbal S, et al. Identification of four new translocations involving FGFR1 in myeloid disorders. *Genes Chromosomes Cancer* 2001 Oct;32(2):155-163.
- Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006 Aug 1;22(15):1928-1929.
- Soler G, Nusbaum S, Varet B, Macintyre EA, Vekemans M, Romana SP, et al. LRRFIP1, a new FGFR1 partner gene associated with 8p11 myeloproliferative syndrome. *Leukemia* 2009 Jul;23(7):1359-1361.
- Soman G, Yang X, Jiang H, Giardina S, Vyas V, Mitra G, et al. MTS dye based colorimetric CTLL-2 cell proliferation assay for product release and stability monitoring of

- interleukin-15: assay qualification, standardization and statistical analysis. *J Immunol Methods* 2009 Aug 31;348(1-2):83-94.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Sep 11;98(19):10869-10874.
- Spinola M, Leoni V, Pignatiello C, Conti B, Ravagnani F, Pastorino U, et al. Functional FGFR4 Gly388Arg polymorphism predicts prognosis in lung adenocarcinoma patients. *J Clin Oncol* 2005 Oct 10;23(29):7307-7311.
- Spivak JL, Silver RT. The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis and primary myelofibrosis: an alternative proposal. *Blood* 2008 Apr 9.
- Spolverini A, Jones AV, Hochhaus A, Pieri L, Cross NC, Vannucchi AM. The myeloproliferative neoplasm-associated JAK2 46/1 haplotype is not overrepresented in chronic myelogenous leukemia. *Ann Hematol* 2011 Mar;90(3):365-366.
- Staerk J, Kallin A, Royer Y, Diaconu CC, Dusa A, Demoulin JB, et al. JAK2, the JAK2 V617F mutant and cytokine receptors. *Pathol Biol (Paris)* 2007 Mar;55(2):88-91.
- Stam K, Heisterkamp N, Grosveld G, de Klein A, Verma RS, Coleman M, et al. Evidence of a new chimeric bcr/c-abl mRNA in patients with chronic myelocytic leukemia and the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 1985 Dec 5;313(23):1429-1433.
- Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2004 Feb;18(2):189-218.
- Stover EH, Chen J, Folens C, Lee BH, Mentens N, Marynen P, et al. Activation of FIP1L1-PDGFRalpha requires disruption of the juxtamembrane domain of PDGFRalpha and is FIP1L1-independent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 May 23;103(21):8078-8083.
- Streit S, Bange J, Fichtner A, Ihrler S, Issing W, Ullrich A. Involvement of the FGFR4 Arg388 allele in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004 Aug 20;111(2):213-217.
- Streubel B, Vinatzer U, Willheim M, Raderer M, Chott A. Novel t(5;9)(q33;q22) fuses ITK to SYK in unspecified peripheral T-cell lymphoma. *Leukemia* 2006 Feb;20(2):313-318.
- Stromnes IM, Blattman JN, Tan X, Jeevanjee S, Gu H, Greenberg PD. Abrogating Cbl-b in effector CD8(+) T cells improves the efficacy of adoptive therapy of leukemia in mice. *J Clin Invest* 2010 Oct 1;120(10):3722-3734.
- Sugimoto Y, Muramatsu H, Makishima H, Prince C, Jankowska AM, Yoshida N, et al. Spectrum of molecular defects in juvenile myelomonocytic leukaemia includes ASXL1 mutations. *Br J Haematol* 2010 Jul;150(1):83-87.
- Sun H, Tonks NK. The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* 1994 Nov;19(11):480-485.
- Swaminathan G, Tsygankov AY. The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling. *J Cell Physiol* 2006 Oct;209(1):21-43.
- Swolin B, Rodger S, Roupe G. Cytogenetic studies in patients with mastocytosis. *Cancer Genet Cytogenet* 2000 Jul 15;120(2):131-135.

- Szpurka H, Jankowska AM, Makishima H, Bodo J, Bejanyan N, Hsi ED, et al. Spectrum of mutations in RARS-T patients includes TET2 and ASXL1 mutations. *Leuk Res* 2010 Aug;34(8):969-973.
- Taagepera S, McDonald D, Loeb JE, Whitaker LL, McElroy AK, Wang JY, et al. Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Jun 23;95(13):7457-7462.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009 May 15;324(5929):930-935.
- Tan YH, Krishnaswamy S, Nandi S, Kanteti R, Vora S, Onel K, et al. CBL is frequently altered in lung cancers: its relationship to mutations in MET and EGFR tyrosine kinases. *PLoS One* 2010 Jan 29;5(1):e8972.
- Tartaglia M, Di Rocco C, Lajeunie E, Valeri S, Velardi F, Battaglia PA. Jackson-Weiss syndrome: identification of two novel FGFR2 missense mutations shared with Crouzon and Pfeiffer craniosynostotic disorders. *Hum Genet* 1997 Nov;101(1):47-50.
- Tavormina PL, Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Wilkin DJ, Lachman RS, et al. Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 1995 Mar;9(3):321-328.
- Taylor JG 6, Cheuk AT, Tsang PS, Chung JY, Song YK, Desai K, et al. Identification of FGFR4-activating mutations in human rhabdomyosarcomas that promote metastasis in xenotransplanted models. *J Clin Invest* 2009 Nov;119(11):3395-3407.
- Teckchandani AM, Panetti TS, Tsygankov AY. c-Cbl regulates migration of v-Abl-transformed NIH 3T3 fibroblasts via Rac1. *Exp Cell Res* 2005 Jul 1;307(1):247-258.
- Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 2010 Jun;24(6):1128-1138.
- Tefferi A. Molecular drug targets in myeloproliferative neoplasms: mutant ABL1, JAK2, MPL, KIT, PDGFRA, PDGFRB and FGFR1. *J Cell Mol Med* 2009 Feb;13(2):215-237.
- Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia* 2008 Jan;22(1):3-13.
- Tefferi A. A contemporary approach to the diagnosis and management of polycythemia vera. *Curr Hematol Rep* 2003 May;2(3):237-241.
- Tefferi A, Gilliland DG. Oncogenes in myeloproliferative disorders. *Cell Cycle* 2007 Mar 1;6(5):550-566.
- Tefferi A, Gilliland G. Classification of chronic myeloid disorders: from Dameshek towards a semi-molecular system. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006;19(3):365-385.
- Tefferi A, Lasho TL, Brockman SR, Elliott MA, Dispenzieri A, Pardanani A. FIP1L1-PDGFRB and c-kit D816V mutation-based clonality studies in systemic mast cell disease associated with eosinophilia. *Haematologica* 2004 Jul;89(7):871-873.
- Tefferi A, Levine RL, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, et al. Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFRB correlates. *Leukemia* 2009 May;23(5):900-904.

- Tefferi A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Patnaik MM, et al. Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia* 2009 Jul;23(7):1343-1345.
- Tefferi A, Lim KH, Levine R. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009 Sep 10;361(11):1117; author reply 1117-8.
- Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* 2009 May;23(5):905-911.
- Tefferi A, Spivak JL. Polycythemia vera: scientific advances and current practice. *Semin Hematol* 2005 Oct;42(4):206-220.
- Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007 Aug 15;110(4):1092-1097.
- Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008 Jan;22(1):14-22.
- Teofili L, Giona F, Martini M, Cenci T, Guidi F, Torti L, et al. Markers of myeloproliferative diseases in childhood polycythemia vera and essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 2007 Mar 20;25(9):1048-1053.
- Thien CB, Langdon WY. c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: substrate diversity and the negative regulation of signalling responses. *Biochem J* 2005 Oct 15;391(Pt 2):153-166.
- Thien CB, Langdon WY. Negative regulation of PTK signalling by Cbl proteins. *Growth Factors* 2005 Jun;23(2):161-167.
- Thien CB, Langdon WY. Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Apr;2(4):294-307.
- Thien CB, Langdon WY. c-Cbl: a regulator of T cell receptor-mediated signalling. *Immunol Cell Biol* 1998 Oct;76(5):473-482.
- Thien CB, Langdon WY. Tyrosine kinase activity of the EGF receptor is enhanced by the expression of oncogenic 70Z-Cbl. *Oncogene* 1997 Dec 11;15(24):2909-2919.
- Thien CB, Scaife RM, Papadimitriou JM, Murphy MA, Bowtell DD, Langdon WY. A mouse with a loss-of-function mutation in the c-Cbl TKB domain shows perturbed thymocyte signaling without enhancing the activity of the ZAP-70 tyrosine kinase. *J Exp Med* 2003 Feb 17;197(4):503-513.
- Thussbas C, Nahrig J, Streit S, Bange J, Kriner M, Kates R, et al. FGFR4 Arg388 allele is associated with resistance to adjuvant therapy in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2006 Aug 10;24(23):3747-3755.
- Tomasson MH, Xiang Z, Walgren R, Zhao Y, Kasai Y, Miner T, et al. Somatic mutations and germline sequence variants in the expressed tyrosine kinase genes of patients with de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 2008 May 1;111(9):4797-4808.
- Tomlinson DC, Hurst CD, Knowles MA. Knockdown by shRNA identifies S249C mutant FGFR3 as a potential therapeutic target in bladder cancer. *Oncogene* 2007 Aug 30;26(40):5889-5899.

- Tono C, Xu G, Toki T, Takahashi Y, Sasaki S, Terui K, et al. JAK2 Val617Phe activating tyrosine kinase mutation in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2005 Oct;19(10):1843-1844.
- Toyama T, Iwase H, Yamashita H, Hara Y, Omoto Y, Sugiura H, et al. Reduced expression of the Syk gene is correlated with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Lett* 2003 Jan 10;189(1):97-102.
- Trempat P, Villalva C, Laurent G, Armstrong F, Delsol G, Dastugue N, et al. Chronic myeloproliferative disorders with rearrangement of the platelet-derived growth factor alpha receptor: a new clinical target for STI571/Glivec. *Oncogene* 2003 Aug 28;22(36):5702-5706.
- Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010 Feb;10(2):116-129.
- Tyner JW, Loriaux MM, Erickson H, Eide CA, Deininger J, Macpartlin M, et al. High-throughput mutational screen of the tyrosine kinome in chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2008 Jul 10.
- Uddin S, Gardziola C, Dangat A, Yi T, Plataniias LC. Interaction of the c-cbl proto-oncogene product with the Tyk-2 protein tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 Aug 23;225(3):833-838.
- Underhill PA, Jin L, Lin AA, Mehdi SQ, Jenkins T, Vollrath D, et al. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res* 1997 Oct;7(10):996-1005.
- Valtieri M, Santoli D, Caracciolo D, Kreider BL, Altmann SW, Tweardy DJ, et al. Establishment and characterization of an undifferentiated human T leukemia cell line which requires granulocyte-macrophage colony stimulatory factor for growth. *J Immunol* 1987 Jun 1;138(11):4042-4050.
- van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:251-337.
- Van Etten RA, Jackson P, Baltimore D. The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell* 1989 Aug 25;58(4):669-678.
- Van Etten RA, Jackson PK, Baltimore D, Sanders MC, Matsudaira PT, Janney PA. The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity. *J Cell Biol* 1994 Feb;124(3):325-340.
- Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact* 2010 Mar 19;184(1-2):16-20.
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002 Oct 1;100(7):2292-2302.
- Vatsveen TK, Brenne AT, Dai HY, Waage A, Sundan A, Borset M. FGFR3 is expressed and is important for survival in INA-6, a human myeloma cell line without a t(4;14). *Eur J Haematol* 2009 Nov;83(5):471-476.
- Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn* 2006 May;8(2):141-151.

- Verstovsek S. JAK2 inhibitors and myeloproliferative neoplasms. *Clin Adv Hematol Oncol* 2008 Dec;6(12):878-80, 896.
- Verstovsek S, Manshouri T, Quintas-Cardama A, Harris D, Cortes J, Giles FJ, et al. WP1066, a novel JAK2 inhibitor, suppresses proliferation and induces apoptosis in erythroid human cells carrying the JAK2 V617F mutation. *Clin Cancer Res* 2008 Feb 1;14(3):788-796.
- Vizmanos JL, Hernandez R, Vidal MJ, Larrayoz MJ, Otero MD, Marin J, et al. Clinical variability of patients with the t(6;8)(q27;p12) and FGFR1OP-FGFR1 fusion: two further cases. *Hematol J* 2004;5(6):534-537.
- Vizmanos JL, Novo FJ, Roman JP, Baxter EJ, Lahortiga I, Larrayoz MJ, et al. NIN, a gene encoding a CEP110-like centrosomal protein, is fused to PDGFRB in a patient with a t(5;14)(q33;q24) and an imatinib-responsive myeloproliferative disorder. *Cancer Res* 2004 Apr 15;64(8):2673-2676.
- Vlahovic G, Crawford J. Activation of tyrosine kinases in cancer. *Oncologist* 2003;8(6):531-538.
- Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004 Aug;10(8):789-799.
- Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997 Dec;8(12):1197-1206.
- Wacker MJ, Godard MP. Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III. *J Biomol Tech* 2005 Sep;16(3):266-271.
- Walz C, Chase A, Schoch C, Weisser A, Schlegel F, Hochhaus A, et al. The t(8;17)(p11;q23) in the 8p11 myeloproliferative syndrome fuses MYO18A to FGFR1. *Leukemia* 2005 Jun;19(6):1005-1009.
- Walz C, Curtis C, Schnittger S, Schultheis B, Metzgeroth G, Schoch C, et al. Transient response to imatinib in a chronic eosinophilic leukemia associated with ins(9;4)(q33;q12q25) and a CDK5RAP2-PDGFR1 fusion gene. *Genes Chromosomes Cancer* 2006 Oct;45(10):950-956.
- Walz C, Metzgeroth G, Haferlach C, Schmitt-Graeff A, Fabarius A, Hagen V, et al. Characterization of three new imatinib-responsive fusion genes in chronic myeloproliferative disorders generated by disruption of the platelet-derived growth factor receptor beta gene. *Haematologica* 2007 Feb;92(2):163-169.
- Wang J, Stockton DW, Ittmann M. The fibroblast growth factor receptor-4 Arg388 allele is associated with prostate cancer initiation and progression. *Clin Cancer Res* 2004 Sep 15;10(18 Pt 1):6169-6178.
- Wang JY. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene* 2000 Nov 20;19(49):5643-5650.
- Wang S, Ding YB, Chen GY, Xia JG, Wu ZY. Hypermethylation of Syk gene in promoter region associated with oncogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004 Jun 15;10(12):1815-1818.
- Wang SC, Hung MC. Nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor family membrane tyrosine kinase receptors. *Clin Cancer Res* 2009 Nov 1;15(21):6484-6489.
- Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 2000 Jan 1;95(1):19-29.

- Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Yarden Y. The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1999 Aug 6;274(32):22151-22154.
- Watzinger F, Lion T. Multiplex PCR for quality control of template RNA/cDNA in RT-PCR assays. *Leukemia* 1998 Dec;12(12):1984-6; discussion 1987-93.
- Weir JP, Meltzer MS. Transfection of human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA into primary human monocytes. *Cell Immunol* 1993 Apr 15;148(1):157-165.
- Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, Bruggen J, Cowan-Jacob SW, Ray A, et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* 2005 Feb;7(2):129-141.
- Wen ST, Jackson PK, Van Etten RA. The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products. *EMBO J* 1996 Apr 1;15(7):1583-1595.
- Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2006 Jun 1;107(11):4274-4281.
- Westwood NB, Gruszka-Westwood AM, Atkinson S, Pearson TC. Polycythemia vera: analysis of DNA from blood granulocytes using comparative genomic hybridization. *Haematologica* 2001 May;86(5):464-469.
- Westwood NB, Pearson TC. Diagnostic applications of haemopoietic progenitor culture techniques in polycythaemias and thrombocythaemias. *Leuk Lymphoma* 1996 Sep;22 Suppl 1:95-103.
- Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003 Jun 15;101(12):4944-4951.
- Wilkinson K, Velloso ER, Lopes LF, Lee C, Aster JC, Shipp MA, et al. Cloning of the t(1;5)(q23;q33) in a myeloproliferative disorder associated with eosinophilia: involvement of PDGFRB and response to imatinib. *Blood* 2003 Dec 1;102(12):4187-4190.
- Wilkinson K, Velloso ER, Lopes LF, Lee C, Aster JC, Shipp MA, et al. Cloning of the t(1;5)(q23;q33) in a myeloproliferative disorder associated with eosinophilia: involvement of PDGFRB and response to imatinib. *Blood* 2003 Dec 1;102(12):4187-4190.
- Wong CL, Ma ES, Wang CL, Lam HY, Ma SY. JAK2 V617F due to a novel TG --> CT mutation at nucleotides 1848-1849: diagnostic implication. *Leukemia* 2007 Jun;21(6):1344-1346.
- Wong TK, Neumann E. Electric field mediated gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 1982 Jul 30;107(2):584-587.
- Xiang Z, Zhao Y, Mitaksov V, Fremont DH, Kasai Y, Molitoris A, et al. Identification of somatic JAK1 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008 May 1;111(9):4809-4812.
- Xiao S, Nalabolu SR, Aster JC, Ma J, Abruzzo L, Jaffe ES, et al. FGFR1 is fused with a novel zinc-finger gene, ZNF198, in the t(8;13) leukaemia/lymphoma syndrome. *Nat Genet* 1998 Jan;18(1):84-87.

- Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* 2001 Jun;17(6):439-474.
- Yagasaki F, Wakao D, Yokoyama Y, Uchida Y, Murohashi I, Kayano H, et al. Fusion of ETV6 to fibroblast growth factor receptor 3 in peripheral T-cell lymphoma with a t(4;12)(p16;p13) chromosomal translocation. *Cancer Res* 2001 Dec 1;61(23):8371-8374.
- Yokoi N, Fujiwara Y, Wang HY, Kitao M, Hayashi C, Someya T, et al. Identification and functional analysis of CBLB mutations in type 1 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Mar 28;368(1):37-42.
- Zhang SJ, Li JY, Li WD, Song JH, Xu W, Qiu HX. The investigation of JAK2 mutation in Chinese myeloproliferative diseases-identification of a novel C616Y point mutation in a PV patient. *Int J Lab Hematol* 2007 Feb;29(1):71-72.
- Zhao Q, Weiss A. Enhancement of lymphocyte responsiveness by a gain-of-function mutation of ZAP-70. *Mol Cell Biol* 1996 Dec;16(12):6765-6774.
- Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 2005 Jun 17;280(24):22788-22792.
- Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol Med* 2002 Jan;8(1):17-23.
- Zyss D, Montcourrier P, Vidal B, Anguille C, Merezegue F, Sahuquet A, et al. The Syk tyrosine kinase localizes to the centrosomes and negatively affects mitotic progression. *Cancer Res* 2005 Dec 1;65(23):10872-10880.

A new potential oncogenic mutation in the FERM domain of *JAK2* in *BCR/ABL1*-negative and V617F-negative chronic myeloproliferative neoplasms revealed by a comprehensive screening of 17 tyrosine kinase coding genes

Paula Aranaz¹, Cristina Ormazábal¹, Cristina Hurtado, Ignacio Erquiaga, Maria J. Calasanz, Marina García-Delgado, Francisco J. Novo, José L. Vizmanos*

Department of Genetics, School of Sciences, Research Building, University of Navarra, C/ Iruñlarrea 1, E-31008 Pamplona, Spain

Received 15 October 2009; received in revised form 14 December 2009; accepted 3 January 2010

Abstract

BCR/ABL1-negative chronic myeloproliferative neoplasms (CMPNs) are a heterogeneous group of clonal hematological malignancies. Over recent years, some genetic events in tyrosine kinase (TK) genes have been described as causal events of these diseases. To identify new genetic aberrations underlying these diseases, we used denaturing high performance liquid chromatography and fluorescence in situ hybridization (FISH) to analyze 17 genes from two receptor-TK families (III and IV) and from three cytoplasmic-TK families (Syk, Abl, and Jak) on samples from 44 *BCR/ABL1*-negative and *JAK2*(V617F)-negative CMPN patients with different clinical phenotypes. Although screening by FISH did not reveal novel chromosomal aberrations, several sequence changes were detected. None of them were frequent events, but we identified a new potential activating mutation in the FERM domain of *JAK2*(R340Q). None of the germline *JAK2*(V617F) single-nucleotide polymorphisms detected differed in distribution between patients and control subjects. In summary, data presented here show that these genes are not frequently mutated or rearranged in CMPNs, suggesting that molecular events causing these disorders must be located in other genes. © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

BCR/ABL1-negative chronic myeloproliferative neoplasms (CMPNs) are a heterogeneous group of clonal hematological malignancies characterized by abnormal proliferation and survival of one or more myeloid lineage cells. In some cases, CMPNs can evolve to acute myeloid leukemia. These diseases include both classic CMPNs (i.e., essential thrombocythemia, polycythemia vera, and idiopathic myelofibrosis) and atypical or nonclassic CMPNs (e.g., chronic eosinophilic leukemia, chronic neutrophilic leukemia, hypereosinophilic syndrome, mast cell disease, and myeloid neoplasms with eosinophilia) [1]. Unlike chronic myeloid leukemia, in which *BCR/ABL1* fusion seems to be the primary cause of the disease, the pathogenesis of these

CMPNs has remained elusive until recently. Over recent years, some genetic alterations (such as mutations in *JAK2*) have been described, most of them activating tyrosine kinase (TK) genes that play a role similar to that of *ABL1* in chronic myeloid leukemia.

Tyrosine kinases have an important role in cell growth and oncogenesis regulating multiple cellular processes. Gain-of-function abnormalities of TK genes can result in constitutive activation of the signaling pathways in which they are involved, contributing to tumor development and progression, and causing the abnormal proliferation and survival that characterize these diseases [2].

The RTK (receptor tyrosine kinase) class III genes include *PDGFRA* (4q12), *PDGFRB* (5q33), *CSF1R* (5q33), *KIT* (4q12), and *FLT3* (13q12). The RTK class IV or FGFR-family genes include *FGFR1* (8p11), *FGFR2* (10q26), *FGFR3* (4p16), and *FGFR4* (5q35). All of them code for receptors characterized by several immunoglobulin-like domains in the extracellular ligand-binding region, a transmembrane domain, a juxtamembrane

* Corresponding author. Tel.: +34-948425600.

E-mail address: jlvizmanos@unav.es (J.L. Vizmanos).

¹ Both authors contributed equally to this work and each is considered first author.

domain, and a split cytoplasmic TK domain. Ligand binding to RTKs promotes receptor dimerization and subsequent activation of downstream signaling pathways.

Whereas RTKs are able to initiate signal transduction pathways, cytoplasmic tyrosine kinases (CTKs) are mediators in the same or in other pathways triggered by receptors with and without TK activity. Two genes from the Syk family, *SYK* (9p22) and *ZAP70* (2q12), are both expressed in different cells from hematological tissue (mainly B and T cells). Both share the same structure, with two N-terminal SH2 protein-binding domains and a C-terminal TK domain. Genes from the Abl family (*ABL1* located on 9q34 and *ABL2* on 1q25) share an N-terminal SH3 domain, followed by a protein-binding SH2 domain, a central TK domain, and a C-terminal DNA-binding domain. The Jak family comprises four genes (*JAK1* in 1p31, *JAK2* in 9p24, *JAK3* in 19p13, and *TYK2* in 19p13). All of them are important players in the JAK–STAT signaling pathway, triggered by several different cytokines, which has been found aberrantly activated in CMPNs [3] mostly in consequence of *JAK2* mutations. Four JAKs share structural properties, with an N-terminal receptor-binding FERM domain, followed by an internal protein-binding SH2 domain, a unique autoinhibitory pseudokinase domain, and a C-terminal TK domain.

To date, some fusions other than the *BCR/ABL1* but involving also *ABL1* (*ETV6/ABL1*) and other TK genes (*SYK*, *JAK2*, *FGFR1*, *PDGFRA*, *PDGFRB*, and *FLT3*) have been described in isolated CMPN cases. Some of these genes are rearranged with multiple partners (for a review see reference [4]); others, such as *KIT* and *FLT3*, have been found also mutated in several neoplasms. To date, however, only the *JAK2*(V617F) point mutation has been found recurrently in classic CMPNs and in a small number of nonclassic CMPNs [5], so there remains a significant proportion of patients in whom the disease-causing molecular event remains to be discovered. In addition, recent reports have addressed the role of germline variation in MPN pathogenesis, defining putative disease susceptibility loci [6–9] that would explain, at least in part, the familial clustering observed in these diseases [10,11].

The activating abnormalities described in neoplasms and the effect of the targeted therapy have pointed to TK coding genes as obvious candidates for systematic screenings in cancer. In fact, this is the focus of a comprehensive study worldwide using different approaches on different tumors [12–17].

The objective of the present study was to screen and analyze all genes from RTK families III and IV and from CTK families Syk, Abl, and Jak in a candidate-gene approach, using fluorescence in situ hybridization (FISH) to detect putative cryptic rearrangements and denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC), a sensitive, high-throughput and low-cost screening method, to detect sequence variants. The hypothesis was that one or more of these genes might be altered in *BCR/ABL1*-negative and

JAK2(V617F)-negative CMPNs. All of these genes have a functional role in hematopoietic cells, and at least one gene of each family has been found fused or mutated in a hematological neoplasm.

2. Materials and methods

Material from 44 different European-origin CMPN patients (28 males and 16 females) with normal karyotype from several hospitals from the north of Spain was obtained with informed consent from individual patients, and the study was approved by the institutional ethics committee. The diagnoses were polycythemia vera ($n = 4$), essential thrombocythemia ($n = 15$), four idiopathic myelofibrosis ($n = 4$), and atypical CMPN ($n = 21$). All cases included in the series were negative for the *BCR/ABL1* fusion, ruled out by means of reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR) and FISH, and for the *JAK2*(V617F) mutation, determined by amplification refractory mutation system PCR [18].

Cell suspensions in sufficient quantity and quality for FISH analysis were available for only 27 of the 44 patients. In addition, the analysis by dHPLC included 20 normal samples (i.e., no disease) used as the control group, to check the frequency of sequence changes observed (putative polymorphisms) in our population.

2.1. FISH

FISH analysis was performed with commercial probes for *PDGFRB* and *CSF1R* (*PDGFRB* 5q33 break-apart probe; Kreatech Biotechnology, Amsterdam, The Netherlands), *ABL1* (Vysis LSI BCR/ABL ES dual-color translocation probe; Abbott Molecular, Des Plaines, IL), and *ABL2* (Vysis LSI 1p36/LSI 1q25 and LSI 19q13/19p13 dual-color probe; Abbott Molecular). For the other genes, we designed two-color FISH analyses with flanking probes (assay A) and one-color analyses with a gene-spanning probe (assay B) using bacterial artificial chromosome (BAC) clones according to the position showed by University of California, Santa Cruz, Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>). These clones were obtained from the BACPAC Resources Center, Children's Hospital Oakland Research Institute (Oakland, CA; <http://bacpac.chori.org>) and from clone resources at The Wellcome Trust Sanger Institute (Hinxton, UK; <http://www.sanger.ac.uk>) (supplemental Table S1). Assay B was performed only in cases in which assay A showed an ambiguous pattern.

Some of the TK genes selected for the analyses have been found fused with *ETV6* (12p13), so we also analyzed this gene, using a Vysis LSI ETV6 dual-color break-apart probe (Abbott Molecular), to check if abnormalities in *ETV6* could reveal new TK fusions.

The BACs were extracted from liquid lysogeny broth cultures with a PhasePrep bacterial artificial chromosome DNA kit (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) and labeled by nick translation using a CGH nick translation kit (Abbott Molecular). Coprecipitation, hybridization, and washing were performed using standard methods. Results were analyzed with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i; Nikon Instruments, Tokyo, Japan) and the Isis FISH imaging system (MetaSystems, Altlußheim, Germany) software. Every probe was previously tested on normal metaphases and nuclei to establish a cutoff normal value for each assay. For each assay and patient, 200 interphase nuclei, and also metaphases when available, were analyzed.

2.2. dHPLC analysis

Genomic DNA was obtained from all the samples and whole-genome amplification (WGA) was performed (using illustra GenomiPhi V2; GE Healthcare, Piscataway, NJ) to obtain enough material for the mutational analyses. Several tests using DNA from original and WGA samples were performed to check whether both results matched, and no discrepancies were observed.

For every gene screened, we selected exons coding the main functional protein domains, such as the transmembrane (regulator) domain and the intracellular kinase domain. Given its importance, the 25 coding exons of *JAK2* were analyzed in 23 fragments. Primers located in flanking introns were designed using Primer3 [19]. (For a list for primers, size of fragments, and dHPLC conditions, see supplemental Table S2.) For each fragment, a mutant control fragment was obtained from normal DNA, changing a nucleotide in the forward or reverse primer depending on the melting profile; this fragment allowed us to validate the dHPLC assay. Melting profiles of PCR fragments were calculated in each case by Navigator software v1.6.2 (Transgenomic, Omaha, NE), helping to establish theoretical solvent gradient and temperature or temperatures of the analysis. Some fragments, because of their melting profiles, required more than one condition (temperature) to improve mutation detection. Conditions were then validated experimentally with appropriate controls. All the analyses were performed on a Transgenomic WAVE 4500HT detection system with a DNASep HT cartridge.

All the PCR reactions were performed with AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) under standard conditions. After PCR cycling, samples were subjected to several cycles of heating and cooling to create heteroduplex molecules, which improve mutation detection by dHPLC. For each fragment, we sequenced two samples of each different elution profile and results were analyzed with Mutation Surveyor software v3.10 (SoftGenetics, State College, PA). The genomic reference sequences were obtained from the Ensembl database (<http://www.ensembl.org>).

2.3. Association analysis

Although genotyping single-nucleotide polymorphisms (SNPs) was not our main goal, our mutational analysis did reveal some germline SNPs in exons and flanking intronic regions. Because the genetic background has been proposed as an important predisposing factor for the development of these diseases [11], we performed statistical analyses to determine putative associations between allele and genotype frequencies of the SNPs detected and the development of the disease. Although our patient and control series were small and a preliminary association must be verified in larger series, an unequal distribution of alleles or genotypes (or both) could unravel a putative linkage disequilibrium with real predisposing variants.

For each sequence variant detected, we compared allele frequencies between patient and control groups using a two-tailed Fisher's exact test. For the control group we used data obtained from 20 individuals without disease. In addition, when available, we also used genotype data from European-origin individuals deposited in the National Center for Biotechnology Information SNP database, dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). In addition, we compared genotype frequencies using a chi-square 2×3 contingency test with two degrees of freedom with two rows, one for patients and one for control subjects, and three columns, for the three different genotypes. As before, we compared patients versus our control group and patients versus the control group plus European data from dbSNP when available. Hardy–Weinberg equilibrium testing to ensure a correct genotyping was performed using SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snstats>) [20].

2.4. mRNA splicing prediction analysis

To check for any influence of intronic changes (both SNPs and mutations) on mRNA splicing, we used an mRNA splicing prediction web tool, Human Splicing Finder v 2.4 (<http://www.umd.be/SSF/>). This tool predicts the influence of nucleotide changes on mRNA splicing due to the effect on potential splice sites, splicing silencers and enhancers, and branch points.

3. Results

3.1. FISH analysis

For *PDGFRA*, we observed an abnormal FISH result only with assay A (gene-flanking two-color labeled probes) in a single atypical CMPN patient. This patient lost one red signal in 170 of 200 nuclei (85%) and in 8 of 10 metaphases analyzed (80%), suggesting a deletion of the upstream 5' part of *PDGFRA*. Subsequent analysis with a commercial FISH probe (Poseidon repeat free *FIP1L1/CHIC/ PDGFRA* 4q12 deletion/break dual-color; Kreatech Biotechnology)

showed a pattern compatible with a *FIP1L1/PDGFR*A rearrangement, not detected previously by conventional RT-PCR.

All other samples showed normal hybridization patterns for all the TK genes included in the analyses. In addition, no abnormal pattern with commercial assay for *ETV6* was found in any of the samples.

3.2. Mutation and association analyses

For each fragment, two samples from each different dHPLC elution profile were sequenced. We could detect 93 changes (see supplemental Table S3) already described as polymorphisms in dbSNP. The most polymorphic gene was *SYK*, with 11 SNPs detected; the least polymorphic was *ABL1*, with only one SNP detected. Only seven of the 93 changes detected were nonsynonymous: rs3822214 in *KIT* (M541L); rs17881656 in *FGFR3*(F384L); rs351855 in *FGFR4*(G388R); rs2230723 in *JAK2*(L393V); rs3213409 in *JAK3*(V722I); and rs12720356(I684S) and rs55882956(R703W), both in *TYK2*. None of them showed different distribution either in patients versus the control group or in patients versus the control group plus dbSNP data ($P > 0.01$). For rs55882956 in *TYK2*, no frequency data were available in dbSNP.

Of the 93 SNPs, 35 were detected in exons but without effect on translation. Again, none of these showed different distribution either in patients versus the control group or in patients versus the control group plus dbSNP data ($P > 0.01$). Remarkably, two of the SNPs (rs246395 in *PDGFRB* and rs3733542 in *KIT*) showed differences ($P = 0.025$ and $P = 0.005$) in the allelic frequencies when dbSNP data were considered, but no differences were observed considering only our control data, so perhaps there are some differences between European-origin populations for these SNPs.

The remaining 51 SNPs were detected in flanking intronic regions. Some of them could have a potential effect on splicing according to Human Splicing Finder prediction (supplemental Table S3), but again none of them showed a different distribution in patients versus the control group or in patients versus the control group plus dbSNP data ($P > 0.01$).

Finally, we also found sequence changes not described in dbSNP (Table 1), each in only a few individuals. Some of the sequence changes were found in both patients and control subjects or only in control samples without effects on translation, except for 16283C>A (R925S), which was detected in *JAK3* in 1 of 43 patients (2%) and in 1 of 20 control subjects (5%). Only 57982G>A in *CSF1R* and 72438A>G in *FLT3* were detected in a significant proportion of patients and control subjects: 2 of 44 (4%) and 3 of 44 (7%), respectively, in patients and 2 of 20 (10%) and 3 of 20 (15%), respectively, in the control group. Interestingly, we found a nonsynonymous sequence change in exon 8 of *JAK2* (70507 G>A, R340Q) in a patient with

atypical CMPN (Fig. 1A). The sequence pattern was compatible with a somatic event, but we could not analyze another tissue sample from this patient to test this possibility. This change affects the FERM domain (Prosite no. PS50057 [<http://expasy.org/prosite/>]; InterPro no. IPR000299 [<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>]). FERM domains are involved in protein–protein interactions, mainly in the localization of proteins to the plasma membrane; they are found in cytoskeletal-associated proteins.

4. Discussion

Over recent years, knowledge about the pathogenesis of the *BCR/ABL1*-negative CMPNs has grown significantly, mainly based on the description of the *JAK2*(V617F) mutation in a considerable proportion of classic CMPNs, but also thanks to the characterization of multiple gene fusions involving several TK genes in a smaller number of CMPN patients. Taken together, all of these genetic lesions lead to TK activation, resulting in aberrant signaling. Nevertheless, there remains a considerable proportion of CMPN patients in whom the molecular aberration driving the disease is still unclear. In addition, during recent some studies have shown association of different polymorphisms with the development of the neoplastic process, some of them in myeloproliferative neoplasms [6,14,21–24].

We considered the hypothesis that some TK genes (from RTK families III and IV and from CTK families Syk, Jak, and Abl) could be altered by cryptic genomic aberrations or point mutations in a proportion of CMPN patients, which would explain, at least in part, the development of these diseases. Some genes from these families have already been found mutated or rearranged in these and other tumors.

The FISH analyses did not reveal any new cryptic chromosomal rearrangement in the cases analyzed. This suggests that gene fusions of these TK genes remain highly infrequent events in these disorders. A *FIP1L1/PDGFR*A fusion that had been missed by conventional RT-PCR was detected by FISH in one patient. Our results confirm that, as previously reported by other groups, FISH analysis is a good technique for detecting the *FIP1L1/PDGFR*A gene fusion when, because of the variability of the breakpoints in *FIP1L1*, conventional RT-PCR fails. Also, a multiplex PCR from genomic material has been recently reported to improve the detection of this rearrangement [25].

We chose denaturing-HPLC as a powerful method for somatic mutation discovery in neoplastic diseases. With serial dilutions of mutant controls, we have been able to detect a mutation present in 3–5% molecules of the sample (data not shown), whereas the sensitivity of direct sequencing is in the range of 10–20%.

Applying a dHPLC comprehensive screening approach on candidate genes, we have detected, as expected, many sequence variants previously described as SNPs in dbSNP. Of the 93 variants detected, only 7 were nonsynonymous;

Table 1

Changes not previously described as single-nucleotide polymorphisms observed in chronic myeloproliferative neoplasm patients and control subjects

Location	Base ^a	AA change	Splicing effect ^b	Frequency, n/N (%)		Patients ID	Diagnosis
				Patients	Controls		
<i>PDGFRA</i> (ENSG00000134853)							
Intron 20	59678 G>A	n/a	None	2/44 (4.5)	0/20 (0)	14752, 18148	aCMPN
<i>CSF1R</i> (ENSG00000182578)							
Intron 19	57982 G>A	n/a	none	2/44 (4.5)	2/20 (10)	16737, 18708	ET
<i>KIT</i> (ENSG00000157404)							
Intron 17	78549 T>C	n/a	none	0/44 (0)	1/20 (5)		
<i>FLT3</i> (ENSG00000122025)							
Intron 16	72438 A>G	n/a	none	3/44 (6.8)	3/20 (15)	15703, 15081, 11615	ET (1); aCMPN (2)
Intron 16	72454delTG	n/a	break ^c	2/44 (4.5)	0/20 (0)	9606	IMF
Intron 20	84872 C>A	n/a	break ^c	1/44 (2.3)	0/20 (0)	16659	ET
<i>FGFR3</i> (ENSG00000068078)							
Intron 12	11635insGCC	n/a	none	1/44 (2.3)	0/20 (0)	16547	ET
<i>FGFR4</i> (ENSG00000160867)							
Exon 10	6546 C>T	none (G435G)	n/a	1/44 (2.3)	0/20 (0)	18708	ET
Exon 11	6846 C>T	none (A501A)	n/a	1/44 (2.3)	0/20 (0)	14886	ET
<i>ABL1</i> (ENSG00000097007)							
Intron 4	149290 C>T		none	1/41 (2.5)	0/20 (0)	17826	ET
Intron 9	166395 C>T		none	0/44 (0)	1/20 (5)		
<i>ZAP70</i> (ENSG00000115085)							
Intron 2	10431delC		none	1/44 (2.3)	0/20 (0)	16659	ET
<i>JAK1</i> (ENSG00000162434)							
Intron 13	118975 C>T		none	1/43 (2.3)	0/20 (0)	15703	ET
Exon 20	126901 C>T	none (D947D)	n/a	1/43 (2.3)	0/20 (0)	16547	ET
<i>JAK2</i> (ENSG00000096968)							
Exon 8	70507G>A	R340Q	n/a	1/44 (2.3)	0/20 (0)	16572	aCMPN
Exon 19	96506 C>T	none (D820D)	n/a	1/44 (2.3)	0/20 (0)	18148	aCMPN
Exon 25	141607 C>T	noncoding region	n/a	1/44 (2.3)	0/20 (0)	18630	PV
<i>JAK3</i> (ENSG00000105639)							
Exon 15	12791G>A	none (L643L)	n/a	1/43 (2.3)	0/20 (0)	14837	ET
Intron 19	15525 T>C		break ^c	0/43 (0)	1/20 (5)		
Exon 20	16286 C>A	R925S	n/a	1/43 (2.3)	1/20 (5)	14837	ET
Intron 20	16389 C>T		none	0/43 (0)	2/20 (10)		
<i>TYK2</i> (ENSG00000105397)							
Intron 12	16955 C>T		none	2/43 (4.7)	0/20 (0)	19537, 16547	PV (1); ET (1)
Exon 18	24345 C>T	none (R952R)	n/a	0/43 (0)	1/20 (5)		
Exon 23	27725 C>T	noncoding region	n/a	1/43 (2.3)	0/20 (0)	21762	PV

Abbreviations: aCMPN, atypical chronic myeloproliferative neoplasm; ET, essential thrombocythemia; IMF, idiopathic myelofibrosis; n/a, not applicable; PV, polycythemia vera.

^a Base position numbering according Ensembl data (<http://www.ensembl.org>). For each gene, the Ensembl identifier is given parenthetically in the subheading.

^b Data from Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/SSF/>).

^c Breaks potential splicing site.

samples. Most of these sequence variants showed dHPLC and sequencing patterns compatible with changes present in the germ line, suggesting that they could be bona fide rare SNPs not yet described; however, no sample from another tissue was available to confirm this. Only 72454delTG and 84872C>A in *FLT3* and 15525 T>C in *JAK3* could have a putative effect on splicing according to in silico analyses performed with Human Splicing Finder.

Finally, only two nonsynonymous changes were observed, R340Q (70507 G>A) in *JAK2* exon 8 and R925S (16286 C>A) in *JAK3* exon 20. The latter was found in 1 of 43 patients (a patient with essential thrombocythemia), but also in an individual from the control group; this finding points to a rare SNP. However, this change affects the kinase domain, and recently a nonsynonymous SNP (rs3213409) in exon 15 (pseudokinase domain) of *JAK3*(V722I) has been demonstrated as an activating point mutation in a patient with acute megakaryoblastic leukemia [27], although other genetic or environmental factors could promote the oncogenic effect of this variant.

The R340Q sequence variant could be a driver mutation. Sequence chromatography revealed a pattern compatible with a somatic mutation (the wild-type allele in a very low proportion and the mutant allele in a proportion >50%) (Fig. 1A), and this change affects a *JAK2* interspecies-conserved amino acid present also in *JAK3* (Fig. 1B). Definite demonstration of its oncogenic potential made with functional analyses is needed. This change affects the FERM domain, which is involved in *JAK2*-receptor binding with a putative role in the regulation of the catalytic activity of the kinase [28]. Several different activating mutations apart from V617F have been described in the SH2 domain, the pseudokinase and the kinase coding regions of *JAK2* (Fig. 1A), but, to our knowledge, mutations in the FERM domain of *JAK2* have not been described to date.

Recently, it has been reported that the function of V617F is dependent on the *JAK2* FERM domain. This domain seems to be inhibitory in wild-type *JAK2*, keeping *JAK2* in an inactive basal state [29]. In addition, some mutations with transforming activity have been described in the FERM domain in *JAK1* and *JAK3*. For instance, *JAK3*(P132T) was described in an acute megakaryoblastic leukemia patient [27] and I87T was found in a patient with Down syndrome and acute megakaryoblastic leukemia with a previous history of transient myeloproliferative disorder [30]. The *JAK1*(K204M) mutation has been recently described in an adult with a B-cell acute lymphoblastic leukemia [28], also with transforming activity. Although *JAK2*(R340Q) could be a very rare mutation, it could be rewarding to explore its recurrence. Unfortunately most studies on *JAK2* are focused only in pseudokinase and kinase coding regions, so other changes such as this one could be missed.

In summary, both FISH and dHPLC mutation screening have shown that genes coding for RTK families III and IV

and CTK families Abl, Syk, and Jak are not frequently mutated in *BCR/ABL1*-negative and *JAK2*(V617F)-negative CMPN patients. Moreover there are some cases of polycythemia vera in which the molecular event is not known. Our results also show that dHPLC is a reliable and efficient method for mutation detection, although most of the changes detected are SNPs or passenger variants that do not contribute to the neoplastic process [31]. Only the nonsynonymous mutation 70507 G>A (R340G) found in *JAK2* exon 8, coding for FERM domain, could be a novel oncogenic driver change, although this requires confirmation by functional analyses.

5. Conclusion

In conclusion, molecular events or cryptic rearrangements involved in causing *BCR/ABL1*-negative and *JAK2*(V617F)-negative CMPNs, if they exist, must be located in other TK coding genes or in genes coding for other molecules participating in the same signal transduction pathways. Despite the number of genes screened, only a single putative driver mutation, R340Q in *JAK2*, has been identified in a patient with atypical CMPN. Our results are in accord with other TK screening analyses performed mainly by resequencing in several cancers [12–17], in which the frequency of mutations in TK genes was found to be lower than initially expected.

Acknowledgments

This work was funded with the help of the Institute of Health Carlos III (FIS PI040037), Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF 2007-62473), the PIUNA Program of the University of Navarra, and the Caja Navarra Foundation through the Program “You choose, you decide” (Project 10.830). F.J.N. is a recipient of a “Jerónimo de Ayanz” award from the Government of Navarra.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [10.1016/j.cancergencyto.2010.01.002](http://dx.doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2010.01.002).

References

- [1] Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008;22:14–22.
- [2] De Keersmaecker K, Cools J. Chronic myeloproliferative disorders: a tyrosine kinase tale. *Leukemia* 2006;20:200–5.
- [3] Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;112:2190–8.
- [4] Macdonald D, Cross NC. Chronic myeloproliferative disorders: the role of tyrosine kinases in pathogenesis, diagnosis and therapy. *Pathobiology* 2007;74:81–8.

- [5] Tefferi A. Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the *JAK2*V617F era. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006;240–5.
- [6] Pardanani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;111:2785–9.
- [7] Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL, Cario H, Pahl HL, Collins A, Reiter A, Grand F, Cross NC. *JAK2* haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009;41:446–9.
- [8] Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM, Wadleigh M, Mullally A, Ebert BL, Bass A, Marubayashi S, Heguy A, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Offit K, Stone RM, Gilliland DG, Klein RJ, Levine RL. A germline *JAK2* SNP is associated with predisposition to the development of *JAK2*(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009;41:455–9.
- [9] Olcaydu D, Harutyunyan A, Jäger R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, Gisslinger H, Kralovics R. A common *JAK2* haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009;41:450–4.
- [10] Bellanné-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, Bellanger F, Barbu V, De Toma C, Delhommeau F, Casadevall N, Vainchenker W, Thomas G, Najman A. Genetic and clinical implications of the Val617Phe *JAK2* mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;108:346–52.
- [11] Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY, Helgadottir EA, Samuelsson J, Björkholm M. Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24,577 first-degree relatives of 11,039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood* 2008;112:2199–204.
- [12] Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan MH, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal PA, Stratton MR. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 2007;446:153–8.
- [13] Ruhe JE, Streit S, Hart S, Wong CH, Specht K, Knyazev P, Knyazeva T, Tay LS, Loo HL, Foo P, Wong W, Pok S, Lim SJ, Ong H, Luo M, Ho HK, Peng K, Lee TC, Bezler M, Mann C, Gaertner S, Hoefler H, Iacobelli S, Peter S, Tay A, Brenner S, Venkatesh B, Ullrich A. Genetic alterations in the tyrosine kinase transcriptome of human cancer cell lines. *Cancer Res* 2007;67:11368–76.
- [14] Tomasson MH, Xiang Z, Walgren R, Zhao Y, Kasai Y, Miner T, Ries RE, Lubman O, Fremont DH, McLellan MD, Payton JE, Westervelt P, Dipersio JF, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, Watson M, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Bloomfield CD, Mardis ER, Wilson RK, Ley TJ. Somatic mutations and germline sequence variants in the expressed tyrosine kinase genes of patients with de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111:4797–808.
- [15] Loriaux MM, Levine RL, Tyner JW, Frohling S, Scholl C, Stoffregen EP, Wernig G, Erickson H, Eide CA, Berger R, Bernard OA, Griffin JD, Stone RM, Lee B, Meyerson M, Heinrich MC, Deininger MW, Gilliland DG, Druker BJ. High-throughput sequence analysis of the tyrosine kinome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111:4788–96.
- [16] Brown JR, Levine RL, Thompson C, Basile G, Gilliland DG, Freedman AS. Systematic genomic screen for tyrosine kinase mutations in CLL. *Leukemia* 2008;22:1966–9.
- [17] Tyner JW, Loriaux MM, Erickson H, Eide CA, Deininger J, Macpartlin M, Willis SG, Lange T, Druker BJ, Kovacsovics T, Maziarz R, Gattermann N, Deininger MW. High-throughput mutational screen of the tyrosine kinome in chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2008;23:406–9.
- [18] Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC. Widespread occurrence of the *JAK2* V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005;106:2162–8.
- [19] Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000;132:365–86.
- [20] Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a Web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006;22:1928–9.
- [21] Schnittger S, Kohl TM, Leopold N, Schoch C, Wichmann HE, Kern W, Lohse P, Hiddemann W, Haferlach T, Spiekermann K. D324N single-nucleotide polymorphism in the *FLT3* gene is associated with higher risk of myeloid leukemias. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45:332–7.
- [22] Pastinen T, Ge B, Hudson TJ. Influence of human genome polymorphism on gene expression. *Hum Mol Genet* 2006;15(Spec No 1):R9–R16.
- [23] Gondek LP, Dunbar AJ, Szpurka H, McDevitt MA, Maciejewski JP. SNP array karyotyping allows for the detection of uniparental disomy and cryptic chromosomal abnormalities in MDS/MPD-U and MPD. *PLoS ONE* 2007;2:e1225.
- [24] El-Omar EM, Ng MT, Hold GL. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene* 2008;27:244–52.
- [25] Score J, Walz C, Jovanovic JV, Jones AV, Waghorn K, Hidalgo-Curtis C, Lin F, Grimwade D, Grand F, Reiter A, Cross NC. Detection and molecular monitoring of *FIP1L1-PDGFR*A-positive disease by analysis of patient-specific genomic DNA fusion junctions. *Leukemia* 2009;23:332–9.
- [26] Campbell PJ. Somatic and germline genetics at the *JAK2* locus. *Nat Genet* 2009;41:385–6.
- [27] Walters DK, Mercher T, Gu TL, O'Hare T, Tyner JW, Loriaux M, Goss VL, Lee KA, Eide CA, Wong MJ, Stoffregen EP, McGreevey L, Nardone J, Moore SA, Crispino J, Boggon TJ, Heinrich MC, Deininger MW, Polakiewicz RD, Gilliland DG, Druker BJ. Activating alleles of *JAK3* in acute megakaryoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2006;10:65–75.
- [28] Flex E, Petrangeli V, Stella L, Chiaretti S, Hornakova T, Knoops L, Ariola C, Fodale V, Clappier E, Paoloni F, Martinelli S, Fragale A, Sanchez M, Tavolaro S, Messina M, Cazzaniga G, Camera A, Pizzolo G, Tornesello A, Vignetti M, Battistini A, Cavé H, Gelb BD, Renaud JC, Biondi A, Constantinescu SN, Foa R, Tartaglia M. Somatic acquired *JAK1* mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* 2008;205:751–8.
- [29] Zhao L, Ma Y, Seemann J, Huang LJ. A regulating role of *JAK2* FERM domain in hyperactivation of *JAK2*(V617F). *Biochem J* 2009 Nov 24 [Epub ahead of print].
- [30] Kiyoi H, Yamaji S, Kojima S, Naoe T. *JAK3* mutations occur in acute megakaryoblastic leukemia both in Down syndrome children and non-Down syndrome adults. *Leukemia* 2007;21:574–6.
- [31] Fröhling S, Scholl C, Levine RL, Loriaux M, Boggon TJ, Bernard OA, Berger R, Döhner H, Döhner K, Ebert BL, Teckie S, Golub TR, Jiang J, Schittenhelm MM, Lee BH, Griffin JD, Stone RM, Heinrich MC, Deininger MW, Druker BJ, Gilliland DG. Identification of driver and passenger mutations of *FLT3* by high-throughput DNA sequence analysis and functional assessment of candidate alleles. *Cancer Cell* 2007;12:501–13.

E-mail address: mvoulgar@med.uoa.gr (M. Voulgarelis)

12 December 2007

Available online 19 February 2008

doi: 10.1016/j.leukres.2007.12.007

Low frequency of *JAK2* exon 12 mutations in classic and atypical CMPDs

The *BCR-ABL* negative chronic myeloproliferative disorders (CMPDs) are a group of stem cell clonal haematological malignancies characterised by abnormal proliferation and survival of one or more myeloid lineage cells. It has been proposed that they are caused by abnormalities in some signal transduction pathways mainly due to acquired somatic mutations, some of them in tyrosine kinase genes. One of the most prevalent mutations is V617F in the pseudokinase domain (JH2) coded by *JAK2* exon 14. This mutation, reported in 2005, has been associated with nearly 95% of patients diagnosed of polycythaemia vera (PV) and near a half of the patients with essential thrombocythaemia (ET) and primary myelofibrosis (MF). However, the frequency of this mutation is below 20% for the remaining chronic myeloproliferative disorders and is absent in lymphoid neoplasms. *JAK2*V617F has been an important milestone in the knowledge of the molecular mechanisms leading to classic myeloproliferative disorders. However, there are still some patients with PV, ET and MF lacking V617F whose molecular defect is unknown. The disease in these cases could be due to other abnormalities in *JAK2* or other related genes. In fact, in a few cases new point mutations have been reported, affecting also the JH2 domain, and one mutation affecting the JH1 domain [1] and reviewed in [2], some of them in other haematological malignancies. In addition, 10% of patients diagnosed of MF and some with ET show somatic activating mutations in the thrombopoietin receptor gene (*MPL*) inducing constitutive cytokine-independent activation of the JAK-STAT pathway.

Recently, different groups have described novel mutations in *JAK2* exon 12 in V617F-negative CMPD patients [2–6]. The mutations reported affect aminoacid residues between F537-E544 and lie in a highly conserved region proximal to the JH2 domain of this gene. These findings support the idea that *JAK2* is one of the main candidates to study the pathogenesis of these disorders. In addition, the patients with *JAK2* exon 12 mutations seem to show distinctive clinical features different from V617F-positive patients such erythrocytosis, and also a distinctive bone marrow morphology [5,7]. These findings could define a new myeloproliferative variant associated with erythrocytosis but this is still unclear [4].

We have studied the coding region of *JAK2* (25 coding exons) in 39 patients diagnosed of classic (PV $n=19$, TE $n=7$, MF $n=2$) and atypical CMPD ($n=11$) by denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC) with the WAVE® 4500 System (Transgenomic Ltd., Omaha, NE) and

direct sequencing of the abnormal elution profiles. Sequencing results were analyzed with Mutation Surveyor v2.51 Software (SoftGenetics, LLC, State College, PA), and abnormal profiles were checked manually. All the patients were negative for *JAK2*V617F analyzed by amplification refractory mutation system PCR (ARMS-PCR) and confirmed by dHPLC. Twenty-one normal samples were also included as control group in order to detect potential differences in the frequencies of the polymorphisms observed in the analyses.

Two of the 19 PV patients carried silent variants in exons 19 and 25, 96506C>T (D820D) and 141607C>T (exonic non-coding region), respectively, not previously described as polymorphisms in the NCBI SNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Both of these mutations were in heterozygous state and were not detected in the control group. If either both changes are rare polymorphisms or silent mutations affecting *jak2* function (by means, for example, of increased mRNA stability) remains to be elucidated.

Another 2 of the 19 PV patients harbored *JAK2* exon 12 heterozygous mutations (Fig. 1). One male patient had a 6 bp in-frame deletion, between positions 1627 and 1632 of the cDNA sequence (Fig. 1A and B). This mutation results in the loss of two aminoacids (E543-D544del) and it has been described previously in six PV patients (five female and one male) [5] and one female patient with idiopathic erythrocytosis (IE) [6]. The other patient, also male, had another 6 bp in-frame deletion, located between positions 1624 and 1629 (Fig. 1A and C) resulting also in the loss of two aminoacids (N542-E543del). This mutation has been described in eleven PV patients (five female and six male) [3,5,7,8] and five IE patients (three female and two male) [6]. Both of them are the most frequent recurrent non-V617F mutation in *JAK2* and lie in the same “hot” region where other indel mutations have been described. No other mutation was identified in the 25 *JAK2* coding exons in the remaining 35 V617F-negative CMPDs patients, despite the fact that dHPLC is a very sensitive method.

In our series, 20 CMPDs samples other than PV or IE have been included. No *JAK2* mutations were found in these samples, confirming that *JAK2* exon 12 mutations are specific for PV and IE phenotype as reported by other groups [5,7].

The data presented here support the idea that other somatic aberrations remain to be identified, and also that some PV patients have mutations other than V617F in *JAK2* or in other genes. In addition, the frequency of *JAK2* exon 12 mutations in PV V617F-negative patients (2/19 or 10.5%) was significantly lower in our series than the frequency observed by other groups (30–100%) [3,4,5,7], maybe due to the small size of our series. In addition, both mutations in exon 12 were found in male patients in contrast with the slightly female predominance described by other groups [3,6]. However, despite the discrepancy in the frequencies observed, the mutations reported here reside in the same *JAK2* mutational “hot spot region”. This region must play an important role in *JAK2* activity that needs to be investigated in further analyses.

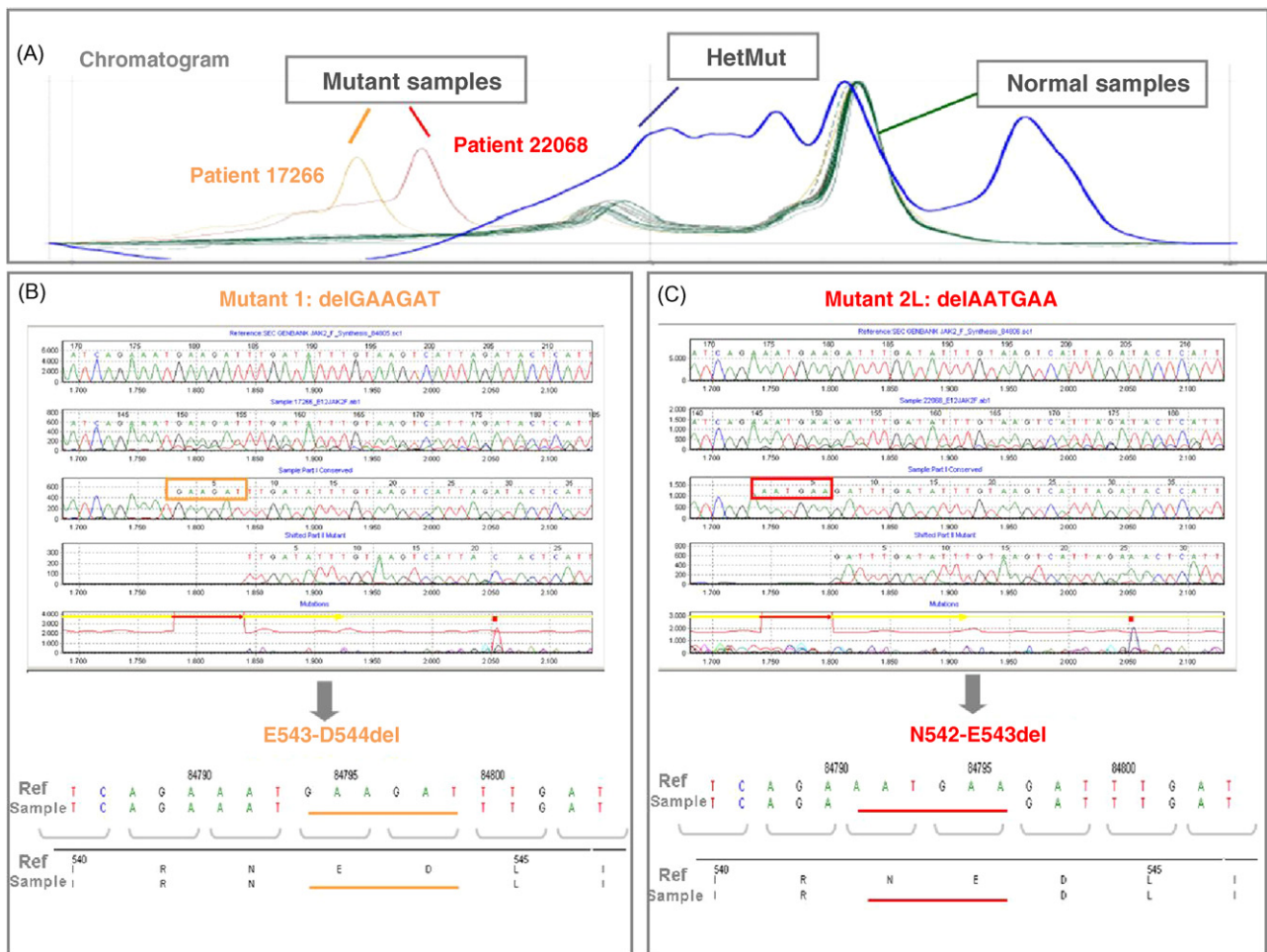


Fig. 1. (Panel A) Mutational analysis by denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC) of *JAK2* exon 12 in 39 samples from CMPDs patients. There are different elution profiles: green profile from patients lacking mutations, blue profile from heteroduplex mutant-normal (mutant created by mutagenesis and used as reference for the analyses), orange and red profiles from patient samples with mutations in *JAK2* exon 12. (Panel B) *JAK2* exon 12 sequencing results from the 17,266 patient sample with orange profile. The sample sequence has been compared with the genomic reference sequence obtained from Ensembl (<http://www.ensembl.org>) showing a 6-bp in-frame deletion (GAAGAT). This mutation results in the loss of two aminoacids (E543-D544del). (Panel C) *JAK2* exon 12 sequencing results from the 22,068 patient sample with red profile. Comparing this sequence with the genomic reference sequence, a 6-bp deletion (AATGAA) can be observed, resulting in the loss of two aminoacids (N542-E543del). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

The data presented here reinforce the importance of searching mutations by screening methods in *JAK2* exon 12, at least for some CMPDs, in addition to the highly prevalent V617F. This will lead to a better diagnosis of some patients, who might also become potential candidates for future anti-*jak2* therapies.

Acknowledgements

This work has been funded with the help of the Institute of Health Carlos III (FIS PI040037), the PIUNA Program of the University of Navarra and the CajaNavarra Foundation through the Program “You choose, you decide” (Project 10.830)

References

- [1] Wong CL, Ma ES, Wang CL, Lam HY, Ma SY. JAK2 V617F due to a novel TG → CT mutation at nucleotides 1848–1849: diagnostic implication. *Leukemia* 2007;21(6):1344–6.
- [2] Karow A, Waller C, Reimann C, Niemeyer CM, Kratz CP. JAK2 mutations other than V617F: a novel mutation and mini review. *Leuk Res* 2007 [Epub ahead of print].
- [3] Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007;356(5):459–68.
- [4] Butcher CM, Hahn U, To LB, Geetz J, Wilkins EJ, Scott HS, et al. Two novel JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera patients. *Leukemia* 2007 [Epub ahead of print].
- [5] Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theodorides A, Ferrarini M, et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2007 [Epub ahead of print].

- [6] Percy MJ, Scott LM, Erber WN, Harrison CN, Reilly JT, Jones FG, et al. The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. *Haematologica* 2007;92(12):1607–14.
- [7] Williams DM, Kim AH, Rogers O, Spivak JL, Moliterno AR. Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis. *Exp Hematol* 2007;35(11):1641–6.
- [8] Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Hanson CA, Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia* 2007;21(9):1960–3.

C. Ormazábal
C. Hurtado
P. Aranaz
I. Erquiaga
M. García-Delgado
M.J. Calasanz
F.J. Novo
J.L. Vizmanos*

*Department of Genetics, School of Sciences,
University of Navarra, C/ Irunlarrea 1,
E-31008 Pamplona, Navarra, Spain*

* Corresponding author. Tel.: +34 948425600;
fax: +34 948425649.

E-mail address: jlvizmanos@unav.es (J.L. Vizmanos)

3 January 2008

Available online 4 March 2008

doi: 10.1016/j.leukres.2008.01.002

Refractory Waldenström's macroglobulinaemia responsive to 2-chlorodeoxyadenosine and mycophenolate mofetil

1. Introduction

Waldenström's macroglobulinaemia is a chronic lymphoproliferative disorder characterized by monoclonal IgM protein production [1,2]. Treatments include alkylating agents, purine analogues and monoclonal antibodies such as rituximab [3].

2. Index case

In 1999, a 53-year-old female presented with hyperviscosity symptoms and a serum IgM spike >16,000 mg/dL (normal range: 45–281 mg/dL). Bone marrow biopsy revealed Waldenström's macroglobulinaemia. After plasmapheresis and a single cycle of vincristine, adriamycin, and dexamethasone, four cycles of fludarabine (25 mg/(m² month)) and rituximab were initiated. Her serum IgM remained at 8000 mg/dL. Next, 10 cycles of cyclophosphamide, vin-

cristine, and prednisone were employed; no major IgM decrement occurred.

Chlorambucil (2 mg daily) with rituximab (375 mg/m² every 3 weeks) followed. After the 10th cycle, given a sustained IgM level of >2000 mg/dL, the chlorambucil dose was increased by 33%. After 12 months of chlorambucil/rituximab therapy, her serum IgM measured 1640 mg/dL. Therefore, single agent hydroxyurea (500 mg daily) ensued. Twelve months into hydroxyurea therapy, her serum IgM remained elevated at 1100 mg/dL. After 21 months, the hydroxyurea was increased (1500 mg divided over 48 h).

Upon medical transfer, given the extensive use of alkylating therapy, peripheral blood fluorescence in situ hybridization (FISH) studies were preformed and revealed deletion of 5q31 (EGR1) in 11/200 cells (5.5%). She refused matched unrelated allogeneic stem-cell transplantation.

Therefore, after 6.5 years of therapy, at 59 years of age, with a serum IgM of 610 mg/dL, hydroxyurea was stopped and cladribine (2-CdA: 0.09 mg/(kg day)) for 5 days and continuous mycophenolate mofetil (1 g twice daily) were prescribed. Trimethoprim/sulfamethoxazole provided primary *Pneumocystis jiroveci* prophylaxis. 16 months later, after achieving a sustained steady state IgM response of 418 mg/dL, in order to evaluate the need for continued therapy, the mycophenolate mofetil was stopped. During the next 2 months, her serum IgM level rose steadily and dramatically to 493 (a level not observed since day 100 of therapy initiation). Mycophenolate mofetil was re-introduced. Now 1.5 years since initial therapy, currently measuring 316 mg/dL, the patient's serum IgM continues to steadily decline (Fig. 1). Moreover, FISH studies no longer identify an abnormal 5q-clone.

3. Discussion

Waldenström's macroglobulinaemia is a relatively rare chronic myeloproliferative illness. Recent NCCN guidelines, V.I.2007, provide stem-cell transplantation as the best alternative therapy for those with progressive disease. Unfortunately, curative allogeneic bone marrow transplantation, in the age group most often afflicted with Waldenström's, is often prohibitive secondary to toxicity and the lack of appropriate donor stem-cell availability. This case illustrates such an individual.

After years of continuous alkylating agents, purine analogs, and monoclonal therapy, this patient with Waldenström's macroglobulinaemia achieved only a partial response and likely suffered a treatment-induced second malignant clone. As she refused stem-cell transplantation, a single cycle of 2-CdA with continuous mycophenolate mofetil was started. Leukopenia was mild (NCI grade II). Sixty-four weeks after continuous mycophenolate mofetil, given the sustained reduction in serum IgM levels and loss of the malignant clone, therapy was stopped. Shortly, thereafter, her serum IgM level rose. While peripheral blood FISH studies did not

ORIGINAL ARTICLE: RESEARCH

Quantification of *PDGFRA* alternative transcripts improves the screening for *X-PDGFRA* fusions by reverse transcriptase-polymerase chain reaction

IGNACIO ERQUIAGA*, CRISTINA ORMAZÁBAL*, CRISTINA HURTADO, PAULA ARANAZ, MARÍA J. CALASANZ, MARINA GARCÍA-DELGADO, FRANCISCO J. NOVO, & JOSÉ L. VIZMANOS

Department of Genetics, School of Sciences, University of Navarra, Pamplona, Spain

(Received 14 April 2010; revised 3 May 2010; accepted 25 May 2010)

Abstract

Hematological malignancies with eosinophilia are often associated with fusions in *PDGFRA*, *PDGFRB*, or *FGFR1* genes. RT-PCR has proved to be useful for finding new *PDGFRA* gene fusions, but some studies have shown overexpression of the TK domain which cannot be explained by the existence of such aberrations. This fact could be related to the expression of alternative *PDGFRA* transcripts. We show that quantification of the expression of three different *PDGFRA* fragments discriminates between *PDGFRA* alternative transcripts and fusion genes, and we have tested this novel methodological approach in a group of eosinophilia cases. Our data show that alternative *PDGFRA* transcripts should be taken into account when screening for *PDGFRA* aberrations, such as gene fusions, by RT-PCR. Expression from an internal *PDGFRA* promoter seems to be a frequent event, in both normal and leukemic samples, and is probably related to physiological conditions, but it could have a role in other tumors. Even so, we show that our RQ-PCR methodology can discriminate expression of alternative transcripts from the presence of *X-PDGFRA* fusion genes.

Keywords: Fusion genes, *PDGFRA*, alternative transcripts, RQ-PCR

Introduction

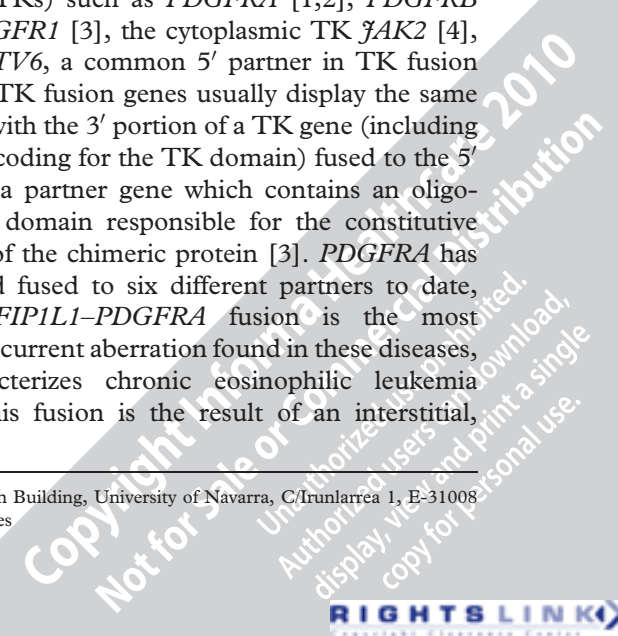
Hypereosinophilic syndromes (HESs) are a heterogeneous group of hematological malignancies with eosinophilia as the main feature. The lack of genetic markers makes it difficult to distinguish these primary or clonal diseases from reactive or secondary eosinophilias. Therefore, the description of genetic aberrations causing clonal eosinophilia improves the diagnosis and classification of these diseases, and allows the development of rational and targeted treatments.

In recent years, several genetic abnormalities have been found to be associated with the development of eosinophilia in myeloproliferative neoplasms

(MPNs), involving genes coding for receptor tyrosine kinases (RTKs) such as *PDGFRA* [1,2], *PDGFRB* [2], and *FGFR1* [3], the cytoplasmic TK *JAK2* [4], but also *ETV6*, a common 5' partner in TK fusion genes [5]. TK fusion genes usually display the same structure, with the 3' portion of a TK gene (including the region coding for the TK domain) fused to the 5' portion of a partner gene which contains an oligomerization domain responsible for the constitutive activation of the chimeric protein [3]. *PDGFRA* has been found fused to six different partners to date, although *FIP1L1-PDGFRA* fusion is the most common recurrent aberration found in these diseases, and characterizes chronic eosinophilic leukemia (CEL). This fusion is the result of an interstitial,

Correspondence: José Luis Vizmanos, PhD, Department of Genetics, School of Sciences, Research Building, University of Navarra, C/Irunlarrea 1, E-31008 Pamplona, Spain. Tel: +0034-948-425-600. Fax: +0034-948-425-649. E-mail: jlvizmanos@unav.es

*Both authors have contributed equally to this work.



and cytogenetically invisible, 800 kb deletion [6]. In this case FIP1L1 does not contribute an oligomerization domain, and the chimeric protein seems to be activated by disruption of the PDGFRA (platelet-derived growth factor α) juxtamembrane domain [7]. Patients with *PDGFRA* fusions respond well to anti-TK therapy such as imatinib [8]. Point mutations could also activate PDGFRA in HES patients [9].

Abnormalities of *PDGFRA* have also been described in gastrointestinal tumors (GIST), glioma/glioblastoma, prostate cancer metastasis, testicular germ cell tumors, hepatocellular carcinoma, and systemic mastocytosis [10–14].

Despite progress made in recent years, a large number of HES cases still have an unknown molecular origin and are classified as ‘idiopathic HES’ or ‘CEL not otherwise specified’ [15]. Therefore it seems evident that further research about the molecular causes of eosinophilia is needed in order to improve diagnosis, classification, and treatment of these diseases.

In order to characterize new putative *PDGFRA* fusions we have analyzed *PDGFRA* expression in a group of patients with hematological malignancies and eosinophilia as a common feature. Approaches using multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) [16] and real-time quantitative PCR (RQ-PCR) [17] have been successfully applied for describing new *PDGFR* fusions, although in some cases they detected *PDGFRA* TK coding region overexpression not explained by such fusions. We have also detected a high proportion of patients in whom *PDGFRA* seemed to be abnormally expressed lacking either mutations or fusions that could explain this fact. Quantification of different *PDGFRA* transcripts allows proper identification of gene fusions and discrimination of these fusions from alternative transcript expression.

Materials and methods

Patients

Sixty-seven cases with different hematological malignancies and persistent unexplained eosinophilia (43 males and 24 females) were selected. Among them, 25 were diagnosed with chronic myeloproliferative neoplasms (MPNs), five with myelodysplastic syndrome (MDS), seven with MDS/MPN, four with acute myeloid leukemia (AML), one with lymphoma, three with lymphoproliferative neoplasms (LPNs), and 22 did not have a definite diagnosis (Supplementary Table I). Informed consent was obtained from individual patients and the study was approved by the internal Ethics Committee.

Samples from 20 healthy volunteers were used as non-disease controls. The EoL-1 cell line was used as *FIP1L1-PDGFR*A positive control [18], and the MG-63 cell line was used as a *PDGFRA* overexpression control [19].

Methods

Total DNA and RNA were isolated from peripheral blood and/or bone marrow leukocytes using DNAzol Reagent and TRIzol Reagent (Invitrogen-Life Technologies Ltd, Paisley, UK) respectively. cDNA was synthesized from total RNA with random hexamers using the SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen-Life Technologies Ltd). cDNA quality was tested using the Watzinger and Lion method [20].

PDGFRA TK domain overexpression was evaluated as described previously using the same conditions [16].

PDGFRA alternative transcripts were amplified by RT-PCR using PDA11F and PDATCCEAS primers for the 3.0 kb transcript, PDAi12S and PDAe19AS for the 1.8 kb transcript, and PDAi12S and PDATCCEAS for the 1.0 kb transcript (Table I and Figure 1).

5'-RACE (rapid amplification of 5' complementary DNA ends) was performed on commercial normal bone-marrow RNA pooled from six male/female Caucasians (ages 38–59, sudden death, Ref. 636548; Clontech-Takara Bio USA, Madison, WI) using the GeneRacerTM kit (Invitrogen-Life Technologies Ltd, Paisley, UK). *PDGFRA*-GR5Rev and GeneRacerTM 5' primers were used for the first reaction, and *PDGFRA*-GR5NesR and GeneRacerTM 5' nested primers were used for nested-PCR. 5'-RACE products were cloned using the TOPO[®] TA cloning kit for sequencing (Invitrogen-Life Technologies Ltd).

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analyses were carried out with commercial probes for *PDGFRB* and *ETV6* (*PDGFRB* 5q33 Break Probe from Kreatech Biotechnology and LSI *ETV6* Dual Color Breakapart Probe from Vysis Abbott Molecular, respectively). Two-color FISH assays with flanking probes for *PDGFRA* and *FGFR1* rearrangements were designed using BAC (bacterial artificial chromosome) clones according to the position shown by the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) (RP11-601I15, RP11-571I18 BACs, RP11-80L11 and RP11-178P22 for *PDGFRA* analyses, and BACs RP11-118H9, RP11-675F6, RP11-265K5, and RP11-90P5 for *FGFR1* analyses). All these BACs had been previously tested on normal metaphases. Two hundred interphase nuclei, and metaphases when available, were analyzed for each assay and patient.

Table I. Primers used for transcript-specific RT-PCR, 5'-RACE, and RQ-PCR.

Primer	Sequence	Location
PDA11F	GTGCTGTTGGTGATTGTGATCATCT	Exon 11
PDAi12S	AGCTGAGGAGCGTCTGGAGTTT	Intron 12
PDATCCEAS	CAGATAGTCACGGAAGGCCAGAAA	TCCE (intron 16)
PDAe19AS	CCCAGAGCAGAATGCCATAAGACC	Exon 19
PDGFRA-GR5Rev	CTTGGTGCAGGCTCCCAGCAAGTTT	Exon 14
PDGFRA-GR5NesR	CAAAATGTGGCCCCAGGTGAGTCATTA	Exon 14
PDA_ex4fw	CCGTCAAAGGAAAGAAGTTCCA	Exon 4
PDA_ex5rv	TTTTAAGAGCTTCCATTTCTAGATCCA	Exon 5
PDA_i12fw	TCTGGAGTTTTTGGGTGTTAATGA	Intron 12
PDA_ex13rv	CAACCACCTTCCCAAATGCT	Exon 13
PDA_ex13fw	TGGTTGAAGGAACAGCCTATGG	Exon 13
PDA_ex1314rv	GATCTGGCCGTGGGTTTTAG	Exon 13-14

RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; 5'-RACE, rapid amplification of 5' complementary DNA ends; RQ-PCR, real-time quantitative PCR.

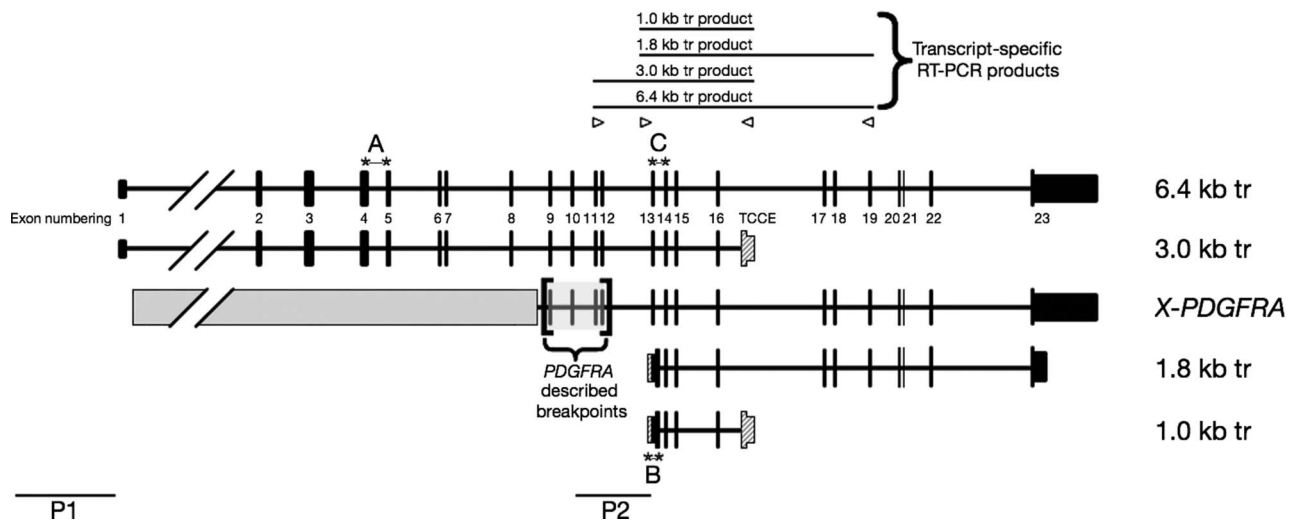


Figure 1. Structure of *PDGFRA* transcripts of 6.4, 3.0, 1.8, 1.0 kb and *X-PDGFRA* fusion transcripts showing position of the primers for RQ-PCR assays A, B, and C (labeled with *). Primers used for transcript-specific PCRs are labeled with triangles (Δ). Regions of the putative promoters P1 and P2 that were analyzed by dHPLC are also indicated.

One microgram of DNase-treated RNA samples from 20 patients, seven healthy individuals, and EoL-1 and MG-63 cell lines were reverse-transcribed into cDNA as previously described. RQ-PCRs were performed in an ABI 7500 System (Applied Biosystems, Foster City, CA) using SYBR Green I as the detection dye. Target cDNA was quantified using the relative quantification method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) using 7500 Sequence Detection Software Version 1.3.1.21 (Applied Biosystems). Fifteen nanograms of cDNA were assayed for each sample in triplicate using FastStart SYBR Green Master (Rox) (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) in 20 μ L total volume. *TBP* was used as the endogenous reference gene. Three different assays were performed for *PDGFRA*. Assay A had primers located in exons 4 and 5 (PDA_ex4fw and PDA_ex5rv), assay B had

primers designed in intron 12 and exon 13 (PDA_i12fw and PDA_ex13rv), and assay C had primers located in exons 13 and 14 (PDA_ex13fw and PDA_ex1314rv) (Table I and Figure 1).

Mutation scanning of *PDGFRA* was done by denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC) on a WAVE 4500HT System (Transgenomic Ltd, Omaha, NE) with a DNASepHT cartridge. Prior to analysis, whole genome amplification was performed with GenomiPhi v2.0 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Putative promoters were delimited according to the position of CpG islands: P1 from position -3000 to +730 and P2 from position +44170 (start of intron 10) to +48213 (end of exon 13) (Figure 1). Positions refer to the ENSG00000134853 transcription start site (TSS) from Ensembl v53. Promoters were divided into

overlapping fragments shorter than 400 bp, so 14 fragments for P1 and 12 fragments for P2 were scanned. In addition, we also performed analyses of exons 13, 14, and 16 [9] (Supplementary Table II). All of them were amplified using AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) under standard conditions. After PCR cycling, samples were subjected to several cycles of heating and cooling in order to create heteroduplex molecules, which improve mutation detection by dHPLC. Melting profiles of PCR fragments were calculated in each case by Navigator Software v1.6.2 (Transgenomic Ltd, Omaha, NE). Conditions were validated experimentally with mutant controls obtained from normal DNA by changing a nucleotide in the forward or reverse primer depending on the melting profile. Two samples were sequenced for each elution profile, and results were analyzed with Mutation Surveyor v3.10 (SoftGenetics LLC, State College, PA) and compared to reference sequences obtained from the Ensembl v53 database.

Results and discussion

PDGFRA TK domain overexpression assay and search for putative fusions

Analysis of overexpression of the region of *PDGFRA* coding for the TK domain by multiplex RT-PCR [16] has been shown to be a useful method to help identify new *X-PDGFRA* fusions. Our results showed amplification of a 290 bp fragment (exons 13 to 15) in 46.3% (31/67) of the patients, whereas fragments of 290 bp and 650 bp (exons 10 to 15) were simultaneously amplified in 16.4% (11/67) of the patients. Expression of *PDGFRA* was very low or undetectable in normal samples. These results suggested that up to 31 samples could have *X-PDGFRA* fusion genes. However, molecular analyses using bubble-PCR and inverse-PCR were not able to identify any fusion.

FISH

In cases with available material and *PDGFRA* expression (15/42), *PDGFRA* was analyzed by FISH. Results obtained only showed an abnormal pattern in case 20383, which harbored a *FIP1L1-PDGFRA* fusion not amplified by conventional RT-PCR [21]. As reported by other groups, due to the variability of breakpoints in *FIP1L1*, FISH could detect cases with *FIP1L1-PDGFRA* fusions missed by conventional RT-PCR.

In cases with available material and no *PDGFRA* expression (20/25), we hypothesized that eosinophilia could be related to *X-PDGFRA*, *X-FGFR1*, or

ETV6-X fusions, as these fusions have been associated with eosinophilia. We studied these cases by FISH, but we could not find any abnormal hybridization pattern in any of these genes.

These results agree with previous reports [3] showing that TK fusions are infrequent events, excepting *BCR-ABL1* in chronic myeloid leukemia (CML), *NUP214-ABL1* in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), or *FIP1L1-PDGFRA* in CEL/HES.

PDGFRA 5'-ends identification by RACE

Multiplex RT-PCR *PDGFRA* assay showed an unexplained *PDGFRA* expression pattern in some samples. Several years ago a subset of *PDGFRA* alternative transcripts, probably involving a new TSS, were described in a teratocarcinoma cell line by Mosselman *et al.* [13,22], and they are also predicted by bioinformatics (Alternative Splicing Prediction Database; <http://t.caspar.it/ASPicDB>). The expression of alternative transcripts could explain our results and those found by others [16,17]. 5'-RACE assays showed two different *PDGFRA* 5'-ends. One of them corresponded to the 5'-end of RefSeq transcript NM_006206, but the other was located in intron 12 [22]. This 5'-end confirmed the presence of a second TSS in *PDGFRA* intron 12, suggesting the existence of a promoter (termed P2) near this intron, 44 kb away from the canonical (P1) promoter (Figure 1). The P2 promoter would be located downstream to the breakpoints described in *X-PDGFRA* fusions (all of them between intron 9 and exon 12) [23]. This fact led us to hypothesize that the abnormal amplification of the 290 bp fragment could be due to *PDGFRA* expression from P2 rather than the presence of *X-PDGFRA* fusions. We queried whether *PDGFRA* expression from P2 might be related to eosinophilia in some cases, so we designed specific RT-PCR assays to distinguish the different transcripts.

Transcript-specific RT-PCR

ASPicDB and previous reports describe two different transcripts expressed from P2 (Figure 1). One of them is 1.0 kb long, although it was initially described as 1.5 kb long [22], and spans from intron 12 to a new exon previously termed TCCE (teratocarcinoma cryptic exon) [22]. The other one is 1.8 kb long, previously described as 5.0 kb long [22], and spans from intron 12 to exon 23. In order to test whether RT-PCR amplification of the 290 bp fragment was attributable to expression from P2, we performed two PCRs which discriminated both 1.0 kb and 1.8 kb transcripts. The 1.0 kb transcript

was detected in 64.3% (27/42) of eosinophilia cases with *PDGFRA* expression (290 bp or 650 bp fragments) but also in 37.5% (3/8) of non-disease samples tested. The 1.8 kb transcript was expressed in 66.7% (28/42) of eosinophilia cases with *PDGFRA* expression (290 bp or 650 bp fragments), but again also in 50% (4/8) of non-disease samples. Both transcripts were detected in 54.8% (23/42) of eosinophilia cases with *PDGFRA* expression and in 37.5% (3/8) of non-disease samples. Finally, 23.8% (10/42) of eosinophilia cases with *PDGFRA* expression and 50.0% (4/8) of non-disease samples did not show expression of either 1.0 or 1.8 kb transcript.

These results confirmed that expression of the region of *PDGFRA* coding for the TK domain (290 bp fragment) that we had observed could be explained by transcription from the P2 promoter. Three samples (3/42, 7.1%) with amplification of the 290 bp fragment did not show expression from P2. However, we have not been able to associate expression from P2 with the development of eosinophilia. Expression from this TSS appears to be normal in some non-disease individuals, and it could be related to physiological conditions. However, we noted that eosinophilia samples might show an abnormal P1/P2 expression ratio, and we designed semi-quantitative RT-PCR assays to address this point.

RQ-PCR

We designed three RQ-PCR assays (Figure 1) to analyze the amount of the different *PDGFRA* fragments being expressed relative to the normal bone marrow ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ method). Assay A was designed to evaluate the expression of a fragment between exons 4 and 5. This fragment is only present in transcripts expressed from P1, and it showed very little or no expression in eosinophilia samples, and no expression at all in healthy samples and the EoL-1 cell line. The MG-63 cell line had, as expected, marked expression of this fragment. Expression of the fragment spanning from intron 12 to exon 13 (transcripts from P2), analyzed with assay B, was found to be heterogeneous in both eosinophilia and healthy samples. Assay C was designed to amplify a region between exons 13 and 14, present in all *PDGFRA* transcripts and fusions. Sample 20383 (*FIP1L1-PDGFRA* positive) and EoL-1 and MG-63 cell lines showed marked expression of this fragment.

To compare P2 versus P1 relative expression for each sample we calculated the B/A expression ratio. Expression was calculated as $2^{-\Delta C_t}$ to avoid inter-individual differences in expression of the endogenous control gene. In the absence of fusions, assay C

expression should be equal to the sum of expressions from assays A and B in each sample. Cases with expression from assay C larger than A + B would be the result of *PDGFRA* overexpression, which could be due to the presence of a fusion. The C - (A + B) expression difference is shown in Figure 2.

Our results did not show any difference in total or relative expression from P1 and P2 between eosinophilia patients and healthy individuals. However, our RQ-PCR design proved adequate for discriminating a *PDGFRA* fusion gene in patient 20383 and EoL-1 (Figure 2). False positives for TK overexpression were reduced by taking into account expression from P2 in assay B. This RQ-PCR design can also detect differences in relative expression from P1 and P2, so is suitable for detecting abnormal promoter activation. This assay takes account of alternative transcripts, minimizing expression differences when two regions of a gene are compared [16]. In addition, the usage of $2^{-\Delta C_t}$ for intra-patient analysis eliminates the variability derived from the difference of expression of the endogenous control gene between individuals [17].

Nevertheless, the presence and relative expression of transcripts starting in P2 might be important in other pathologies, such as GIST, glioma/glioblastoma, prostate cancer metastasis, testicular germ cell tumors, or hepatocellular carcinoma [10–14], where *PDGFRA* has been shown to play a role. The product of the 1.8 kb transcript contains a full TK domain but lacks the extracellular, trans-, and juxtamembrane domains, the latter having TK autoinhibitory activity [7]. This turns this transcript into a good candidate to be involved in dysregulated pathways leading to disease development or progression, as it would code a cytoplasmic protein with TK activity. Given that this isoform is presumably sensitive to

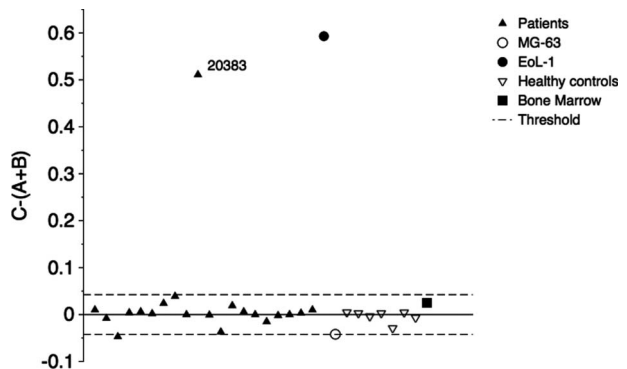


Figure 2. Difference of expression (calculated by $2^{-\Delta C_t}$ method) between assay C and the sum of assays A and B. Cases with a *FIP1L1-PDGFRA* fusion (patient 20383 and EoL-1 cell line) show a difference over 0.5 not explained by P1 or P2 expression. Threshold is $\pm 3SD$ of healthy controls plus commercial bone-marrow average expression.

imatinib, these analyses could be useful in treatment as well.

Mutational status study by dHPLC

Simultaneously with RQ-PCR assays, dHPLC was carried out on samples with *PDGFRA* expression and available material (30/42) to study the mutational status of the canonical *PDGFRA* promoter P1, and of the potential internal promoter P2. Mutations in both regions could explain possible abnormal expression of *PDGFRA* due to changes in transcription factor binding sites. However, mutation analyses showed no differences between eosinophilia samples and healthy individuals, with the exception of a C > T change in P1 (position -1629) which appeared in 13.3% (4/30) of eosinophilia cases but neither in healthy individuals nor in dbSNP (database of single nucleotide polymorphisms). This change did not alter a CpG dinucleotide and did not appear to affect any transcription factor binding site according to TFSearch (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

It has been reported recently that overexpression of the 3'-end of *PDGFRA* in eosinophilia cases could be associated with activating mutations of *PDGFRA* in exons 10, 13, 14, and 16 [9]. Our dHPLC analysis of these exons did not reveal any mutation, suggesting that point mutations in *PDGFRA* are not a common feature of hematological malignancies with eosinophilia.

Conclusion

We have observed overexpression of the region of *PDGFRA* coding for the TK domain in cases with hematological neoplasms with eosinophilia. Although this could be due to the presence of *X-PDGFRA* fusions, none have been found. However, this differential expression pattern could be related to the presence of an internal promoter around intron 12 (P2) that could lead to misinterpretation of data. In fact, expression from P2, but not from P1, was also detected in some normal healthy samples, and it might be related to physiological conditions. Functional activity of both P1 and P2 must be considered in *PDGFRA* expression analyses, and assays for each different transcript are required in order to further delineate their specific roles in pathologies in which *PDGFRA* has been involved. Although we have not found any new fusion, our three-assay RQ-PCR design should be useful for discriminating fusions such as *FIP1L1-PDGFRA* from P1 and P2 expression.

Declaration of interest: This work has been funded with the help of the Institute of Health Carlos III

(FIS PI040037), Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF 2007-62473), the PIUNA Program of the University of Navarra, and the Caja Navarra Foundation through the Program 'You choose, you decide' (Project 10.830). F.J.N is the recipient of a 'Jerónimo de Ayanz' award from the Government of Navarra.

References

1. Gotlib J, Cools J. Five years since the discovery of FIP1L1-PDGFRA: what we have learned about the fusion and other molecularly defined eosinophilias. *Leukemia* 2008;22:1999–2010.
2. Jones AV, Cross NC. Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2912–2923.
3. Macdonald D, Cross NC. Chronic myeloproliferative disorders: the role of tyrosine kinases in pathogenesis, diagnosis and therapy. *Pathobiology* 2007;74:81–88.
4. Reiter A, Walz C, Watmore A, et al. The t(8;9)(p22;p24) is a recurrent abnormality in chronic and acute leukemia that fuses PCM1 to JAK2. *Cancer Res* 2005;65:2662–2667.
5. Gotlib J, Cross NC, Gilliland DG. Eosinophilic disorders: molecular pathogenesis, new classification, and modern therapy. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006;19:535–569.
6. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, et al. A tyrosine kinase created by fusion of the *PDGFRA* and *FIP1L1* genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1201–1214.
7. Stover EH, Chen J, Folens C, et al. Activation of FIP1L1-PDGFRalpha requires disruption of the juxtamembrane domain of PDGFRalpha and is FIP1L1-independent. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:8078–8083.
8. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 1996;56:100–104.
9. Elling C, Erben P, Walz C, et al. Novel *PDGFRA* point mutations in hypereosinophilic syndrome induce growth factor independence and leukemia in vitro and in vivo. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2009;114(Suppl. 1): (Abstract 767).
10. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al. *PDGFRA* activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003;299:708–710.
11. Martinho O, Longatto-Filho A, Lambros MB, et al. Expression, mutation and copy number analysis of platelet-derived growth factor receptor A (*PDGFRA*) and its ligand *PDGFA* in gliomas. *Br J Cancer* 2009;101:973–982.
12. Russell MR, Jamieson WL, Dolloff NG, Fatatis A. The alpha-receptor for platelet-derived growth factor as a target for antibody-mediated inhibition of skeletal metastases from prostate cancer cells. *Oncogene* 2009;28:412–421.
13. Mosselman S, Looijenga LH, Gillis AJ, et al. Aberrant platelet-derived growth factor alpha-receptor transcript as a diagnostic marker for early human germ cell tumors of the adult testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2884–2888.
14. Oseini AM, Roberts LR. *PDGFRalpha*: a new therapeutic target in the treatment of hepatocellular carcinoma? *Expert Opin Ther Targets* 2009;13:443–454.
15. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114:937–951.

16. Score J, Curtis C, Waghorn K, et al. Identification of a novel imatinib responsive KIF5B-PDGFRA fusion gene following screening for PDGFRA overexpression in patients with hypereosinophilia. *Leukemia* 2006;20:827–832.
17. Erben P, Gosenca D, Muller MC, et al. Screening for diverse PDGFRA or PDGFRB by fusion genes is facilitated by generic quantitative RT-PCR. *Haematologica* 2010;95:738–744.
18. Griffin JH, Leung J, Bruner RJ, Caligiuri MA, Briesewitz R. Discovery of a fusion kinase in EOL-1 cells and idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7830–7835.
19. Minato Y, Tashiro E, Kanai M, Nihei Y, Kodama Y, Imoto M. Transcriptional regulation of a new variant of human platelet-derived growth factor receptor alpha transcript by E2F-1. *Gene* 2007;403:89–97.
20. Watzinger F, Lion T. Multiplex PCR for quality control of template RNA/cDNA in RT-PCR assays. *Leukemia* 1998;12:1984–1986.
21. Aranaz P, Ormazábal C, Hurtado C, et al. A new potential oncogenic mutation in the FERM domain of JAK2 in BCR-ABL1-negative and V617F-negative chronic myeloproliferative neoplasms revealed by a comprehensive screening of 17 tyrosine kinase coding genes. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;199:1–8.
22. Mosselman S, Claesson-Welsh L, Kamphuis JS, van Zoelen EJ. Developmentally regulated expression of two novel platelet-derived growth factor alpha-receptor transcripts in human teratocarcinoma cells. *Cancer Res* 1994;54:220–225.
23. Novo FJ, de Mendibil IO, Vizmanos JL. TICdb: a collection of gene-mapped translocation breakpoints in cancer. *BMC Genomics* 2007;8:33.