

**ESTUDIO PARALELO CON MICROARRAYS
GENÓMICOS Y DE EXPRESIÓN IDENTIFICA
A LOS *R-TRAIL, DR4 Y DR5*, COMO GENES
SUPRESORES CANDIDATOS EN LINFOMA B**

**F. Rubio-Moscardo, D.Blesa, C.Mestre R.Siebert, A.Rosenwald, J.I.
Martinez, I.Benet, J.Climent, M.Marín, M.Esteller, L.M.Staudt,
D.Pinkel, M.J.S.Dyer, J.García-Conde, J.A.Martinez-Climent**

**Servicio de Hematología y Oncología Médica
Hospital Clínico Universitario de Valencia**

GENES SUPRESORES DE TUMORES EN LINFOMAS B

- El mapeo físico de regiones de delección en tumores: identificación de clásicos TSGs con mutaciones bialélicas (*P53, ATM, P16, RB*)
- En algunos locus con pérdida genómica no se han encontrado mutaciones bialélicas.
- El requerimiento de “two-hit” propuesto por Knudson podría no ser siempre necesario para la tumorigenesis.
- Mutaciones en un único alelo de *P27, P53, DMP1, P18* y *BLM* suficientes para promover la formación de tumores en ratones.
- Estos TSGs haploinsuficientes podrían ser frecuentes en tumores.

BÚSQUEDA DE GENES SUPRESORES DE TUMORES EN LINFOMA B

- **Hipótesis:** La comparación entre número de copias del DNA y las alteraciones en la expresión génica podrían localizar potenciales genes supresores de tumores mediante la identificación de transcritos que presenten una expresión reducida a lo largo de deleciones genómicas.

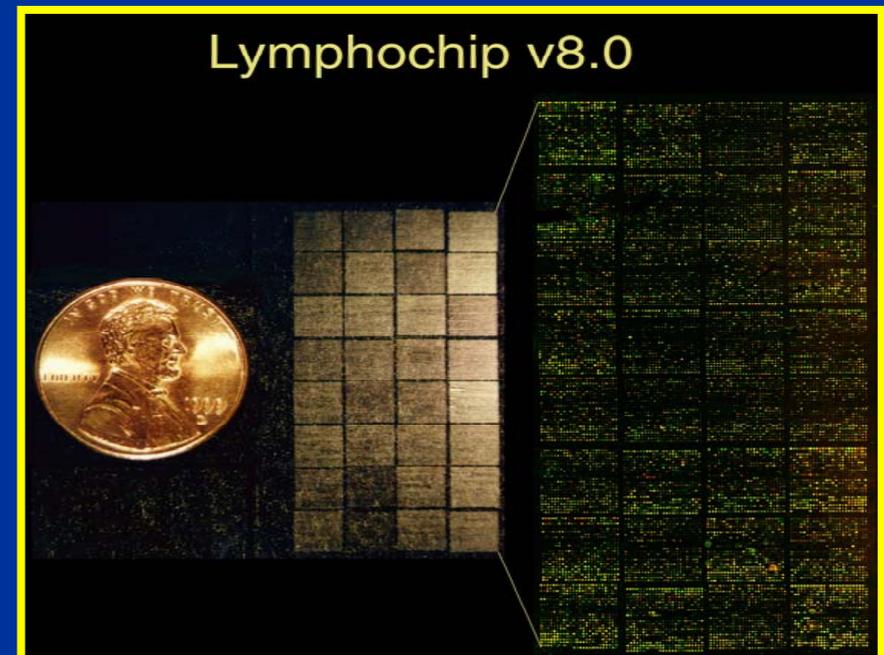
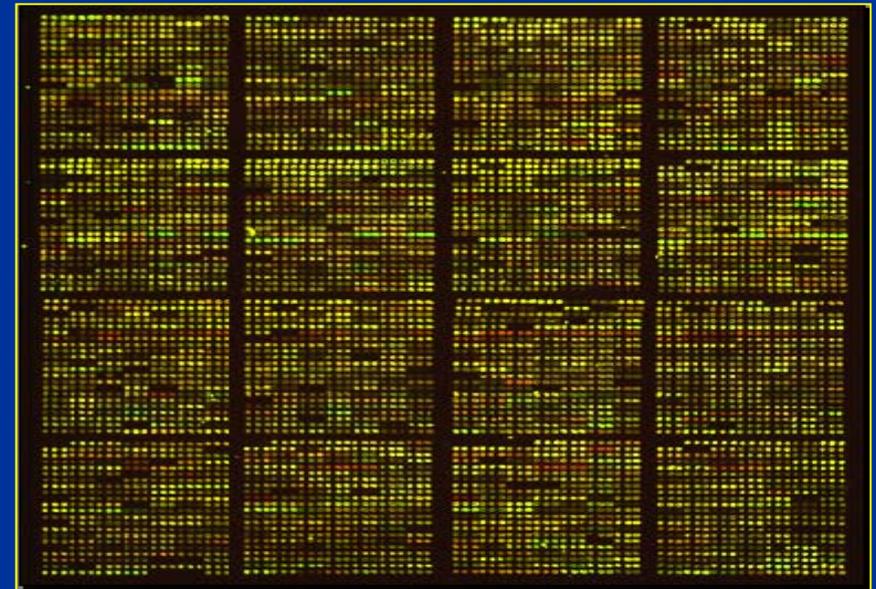
HUMAN ARRAY 1.14 UCSF (Snijders et al; *Nat Genet* 2001)

- 2.400 BAC/PACs
- UCSC (Golden Path)
- Triplicado
- Genoma completo
- Cromosoma 1 al 22
- Resolución 1.4 Mb

36 L.C. LNH-B

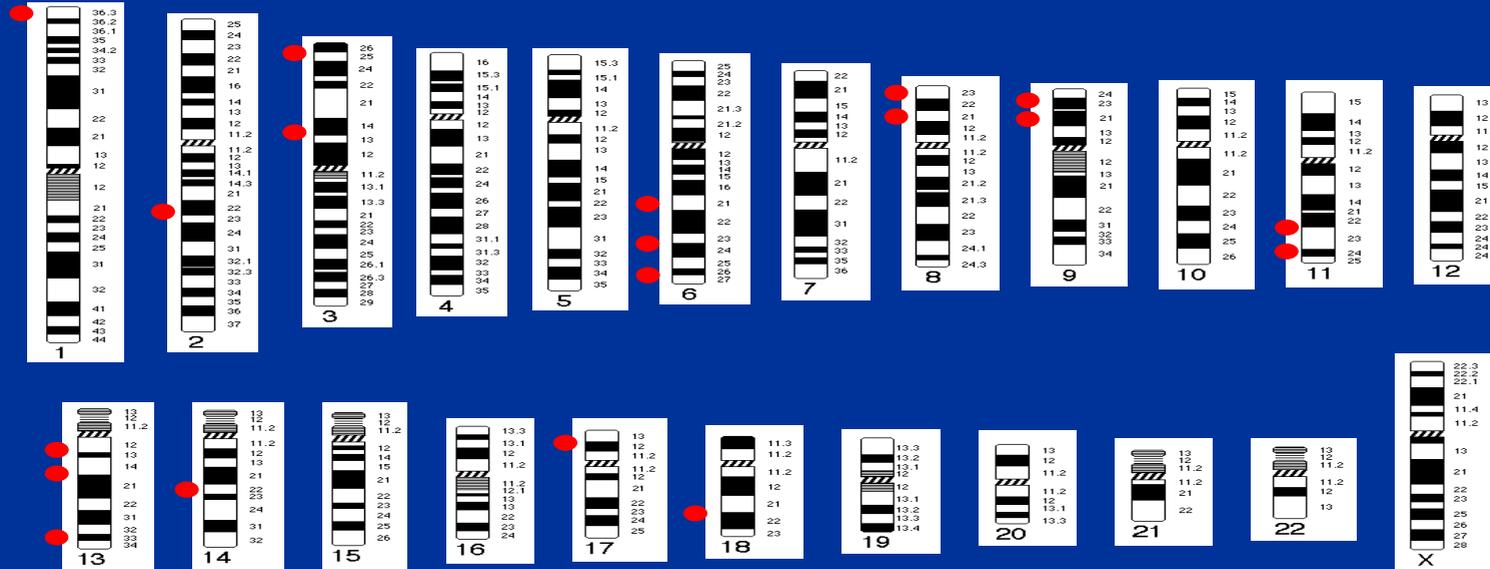
LINFOCHIP DE EXPRESIÓN v8.0 (A.Alizadeh et al. *Nature* 2000)

- Microchip “linfoide” especializado
- ~15.000 cDNAs
- Cuantificación de la expresión de los genes con respecto a un panel de referencia de líneas celulares



RESULTADOS

REGIONES DE DELECCIÓN GENÓMICA



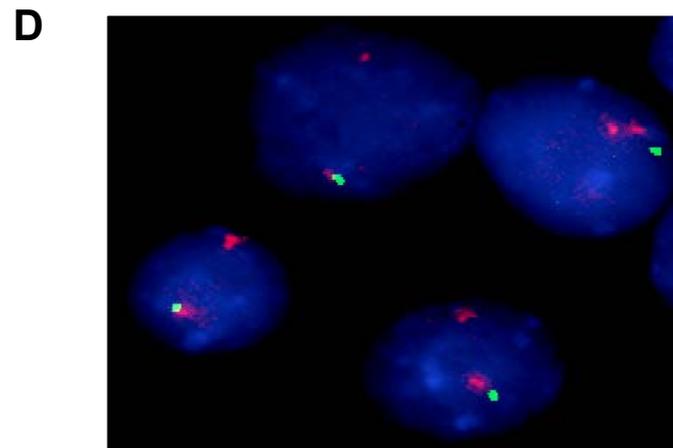
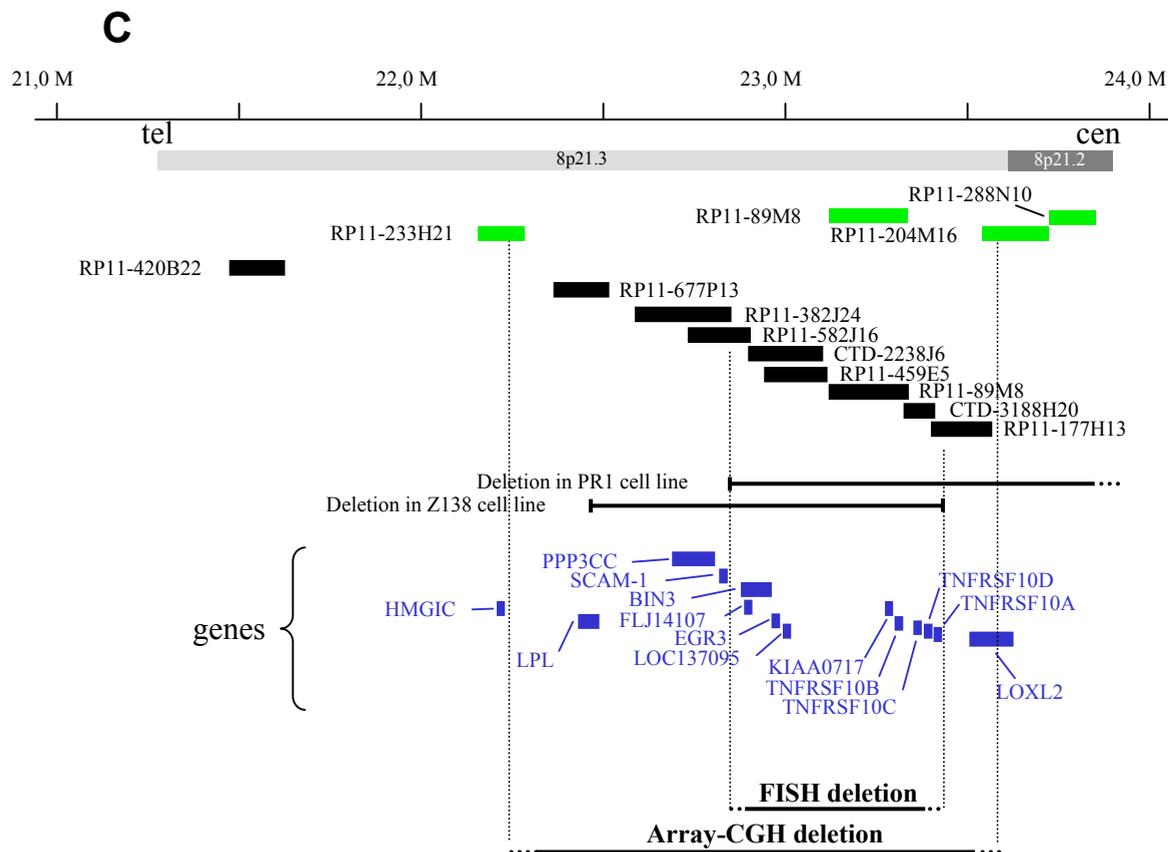
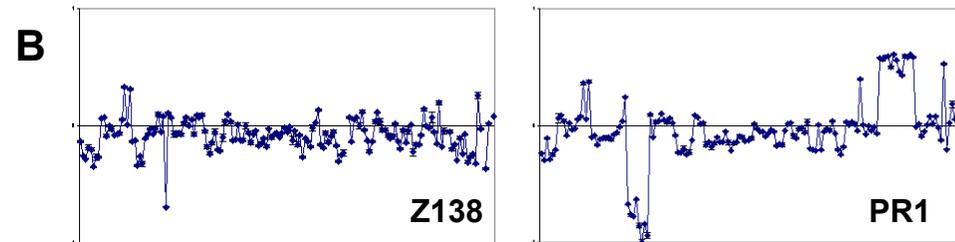
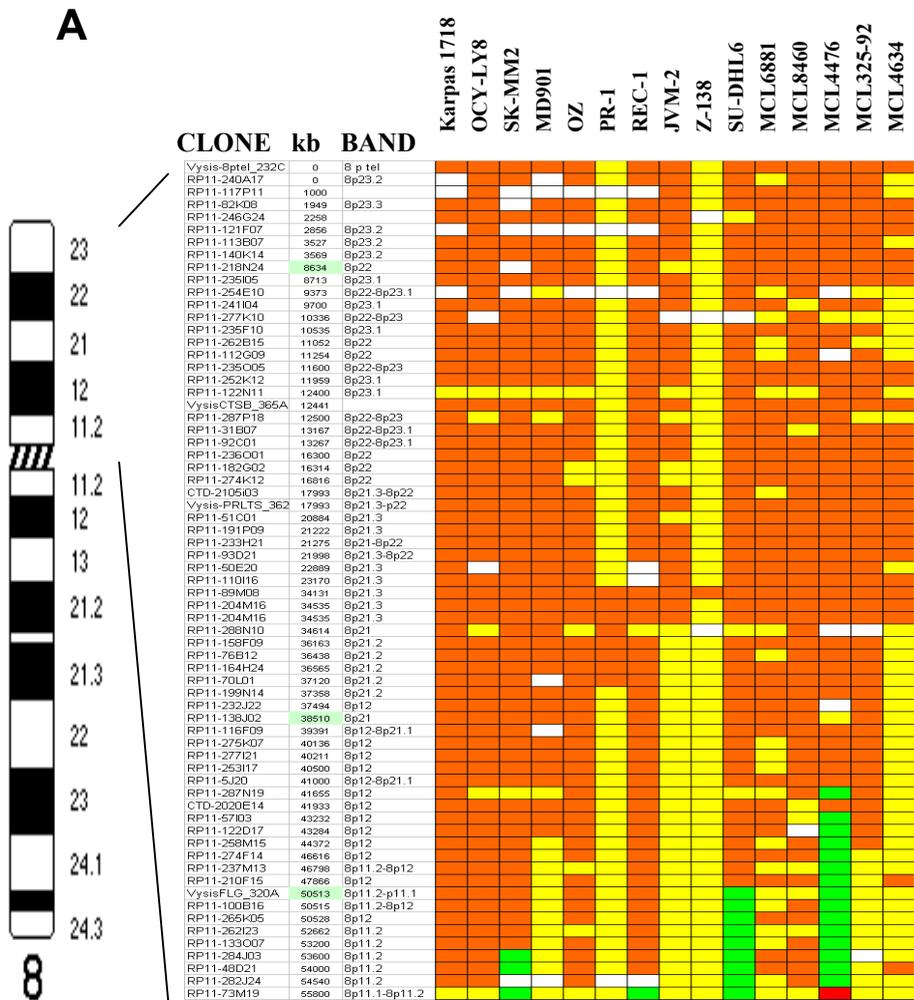
GENES DELECCIONADOS CON REDUCIDA EXPRESIÓN

BANDA	CLONES	GENES
6q23-q24	3 cDNAs	IFNGR1;Hs.92448; CGI-130
8p21-p23	5 cDNAs	DR5;PPP3C; HSPC035 protein, FBXO25
11q24-q25	9 cDNAs	PIG8; FLJ23117 fis; FLI-1; ZNF202; FLJ14494
13q14	7 cDNAs	RFC(38KD); RB; KPNA3; BRCA2
17p13	23 cDNAs	MGC4189; 14-3-3 EPSILON; ARRB2; MEK4; LIS1; RPA1; DPH2L; GPS2;
		SHMT1; C1QBP; Hs.200433; USP3; ARK2; CD103 alpha; PFN1; CENTB1
TOTAL	47 cDNAs	36 genes

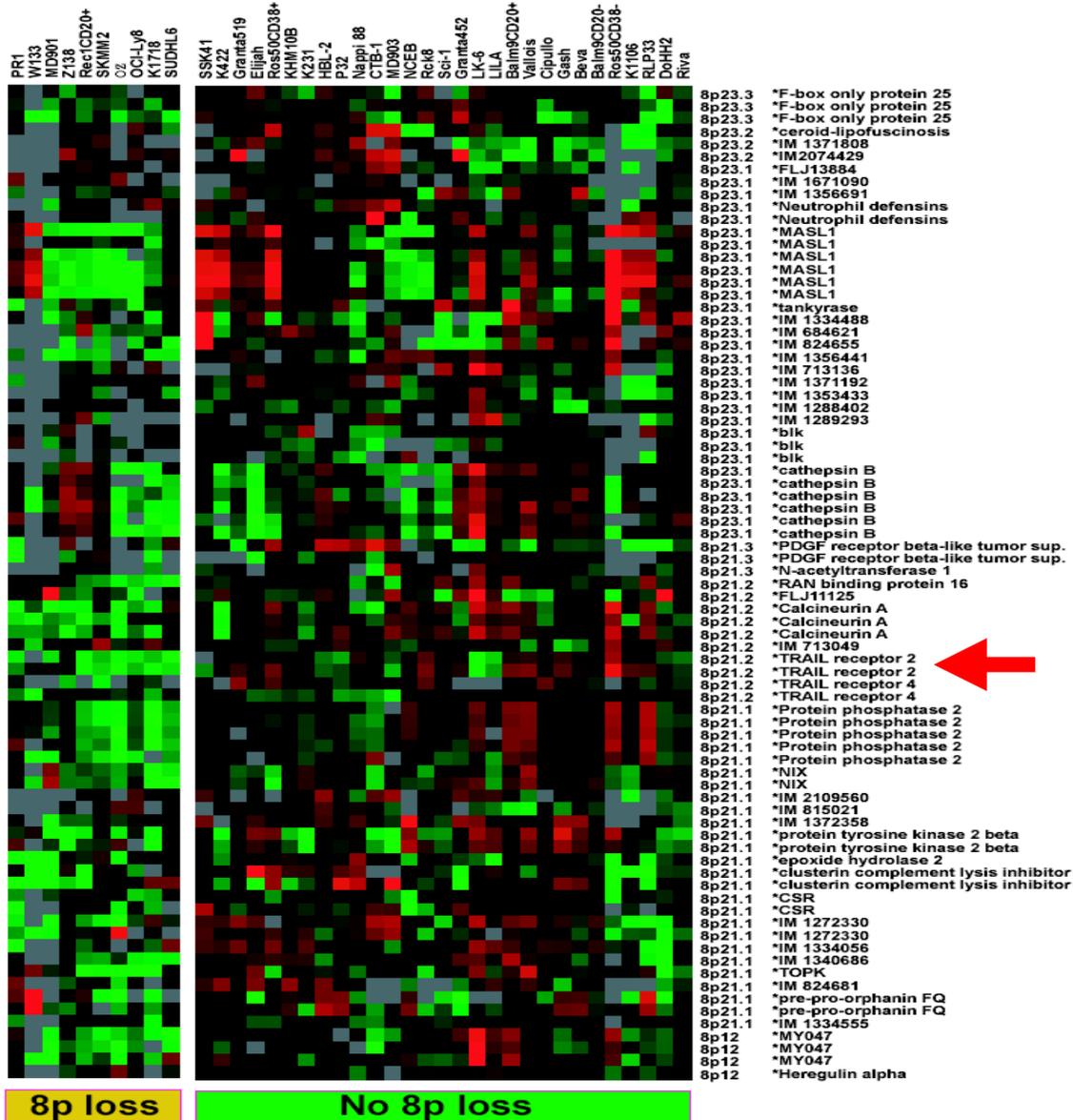


DELIMITACIÓN MOLECULAR DE LA DELECCIÓN DEL CROMOSOMA 8p

- 8p frecuentemente delecionado en tumores sólidos (20-60%) (mama, próstata, pulmón, c-cuello, colorectal).
- La pérdida genómica de 8p está asociada con estadio avanzado del tumor y enfermedad metastática.
- Pérdida genómica de 8p: frecuente en linfoma del manto leucemizado (Martínez-Climent et al; *Blood* 2001)
- En ningún caso se han encontrado alteraciones bialélicas en una proporción significativa de tumores.
- Podrían haber uno o más TSGs haploinsuficientes.



EXPRESIÓN EN TUMORES CON DELECCIÓN 8p21.3



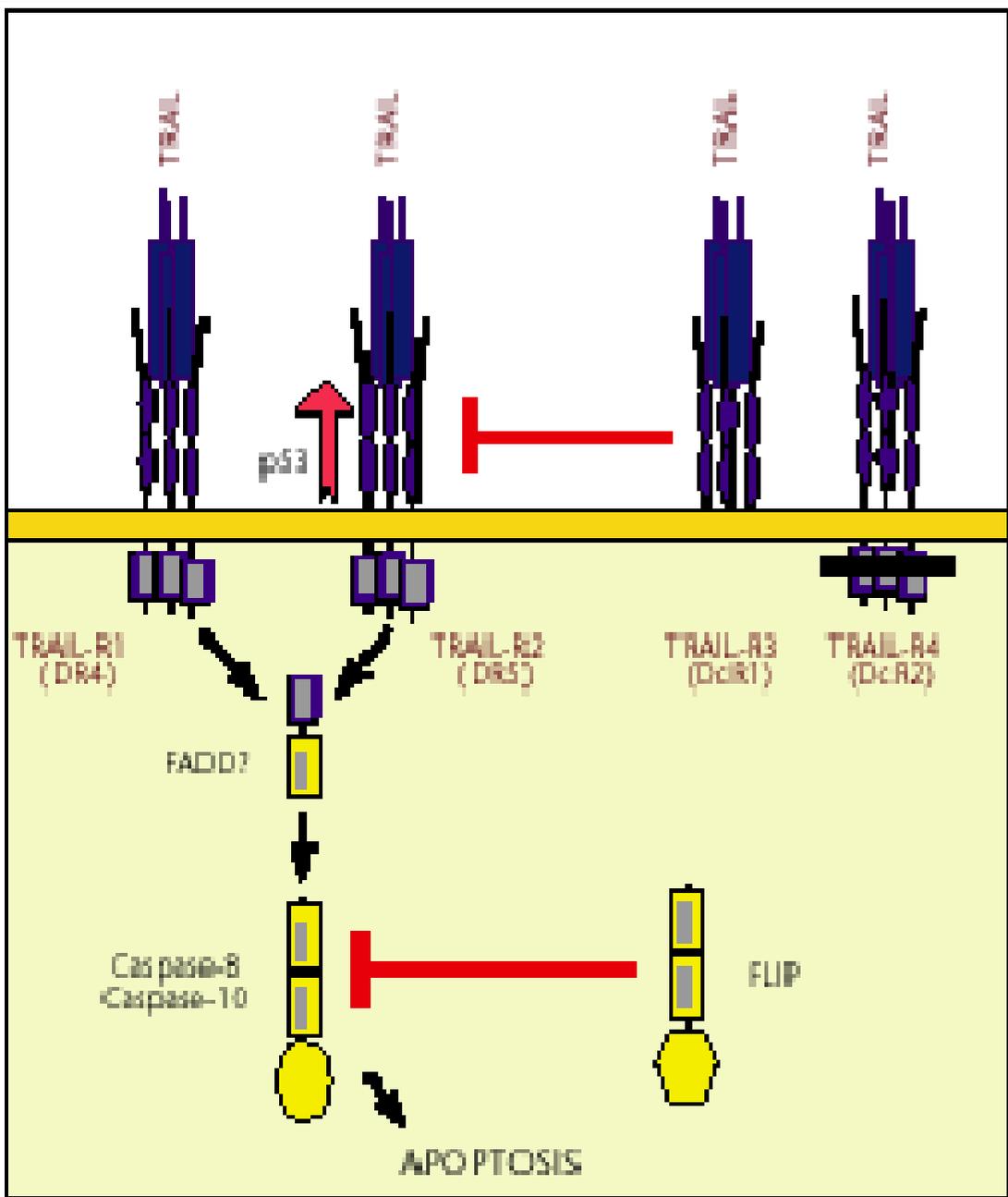
Análisis estadístico: correlación entre delección de 8p y alteración en la expresión

Band	Gene	p value
8p21.3	TRAIL receptor 2=death receptor 5 (D	4,4366E-06
8p21.2	Calcineurin A catalytic subunit	8,4549E-06
8p21.3	TRAIL receptor 2=death receptor 5 (D	0,00031506
8p23.3	F-box only protein 25	0,0004202
8p21.1	Protein phosphatase 2 (formerly 2A)	0,00104584
8p12	HSPC035 protein	0,00178533
8p11	TACC1	0,00283208
8p21.2	Calcineurin A catalytic subunit	0,00329083
8p21.2	MY047=Similar to OB-R	0,00331322
8p23.2	Unknown Clone=1371808	0,00365264
8p21.1	Protein phosphatase 2 (formerly 2A)	0,00385345
8p12	protein phosphatase 2 (formerly 2A)	0,00411624



Estudios con RT-PCR y QRT-PCR confirman los resultados de expresión del linfocip de los receptores-TRAIL, DR4 y DR5 a nivel de mRNA.

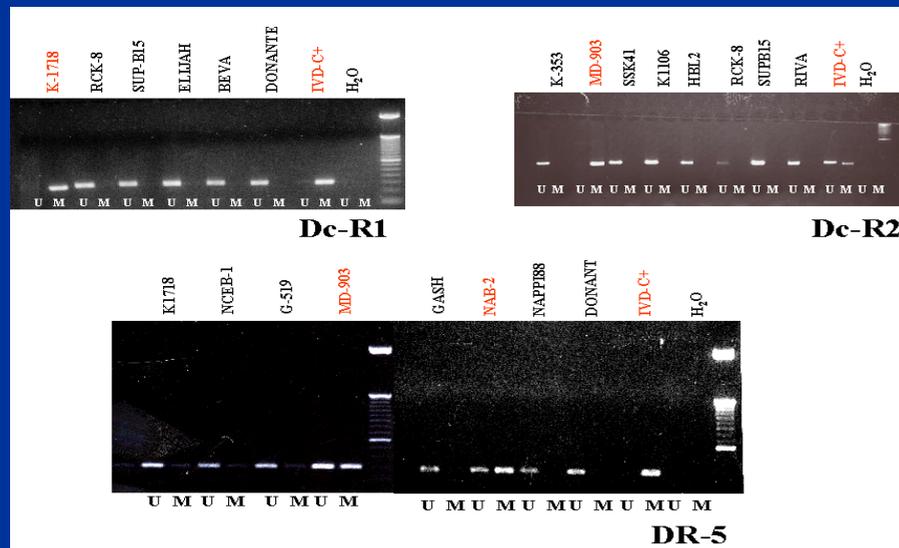
TRAIL RECEPTOR GENES



- Cluster de 4 genes que codifican para “necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) receptors”
- Normalmente, se expresan en todos los tejidos; las células tumorales no expresan apenas los receptores “decoy” y son por lo tanto sensibles al ligando TRAIL
- Ligando TRAIL (Apo-2L) se está usando en ensayos clínicos como agente anti-tumoral

ANÁLISIS GENÓMICO DE LOS GENES QUE CODIFICAN A LOS RECEPTORES -TRAIL

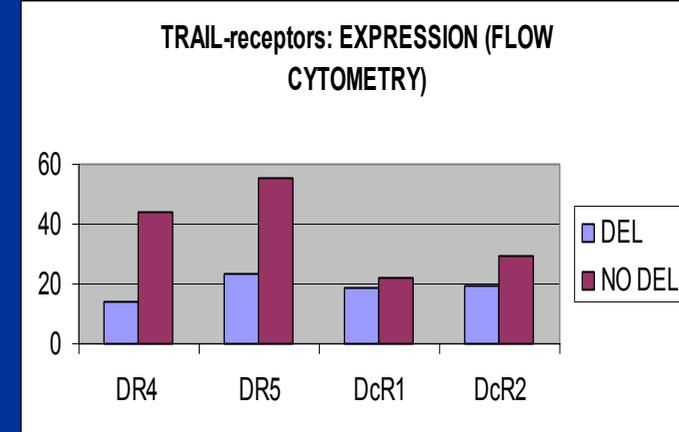
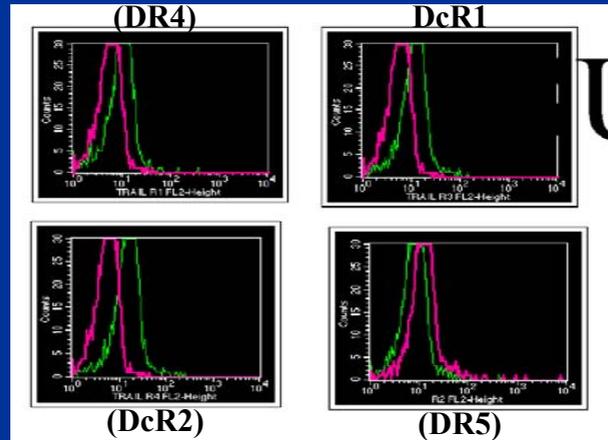
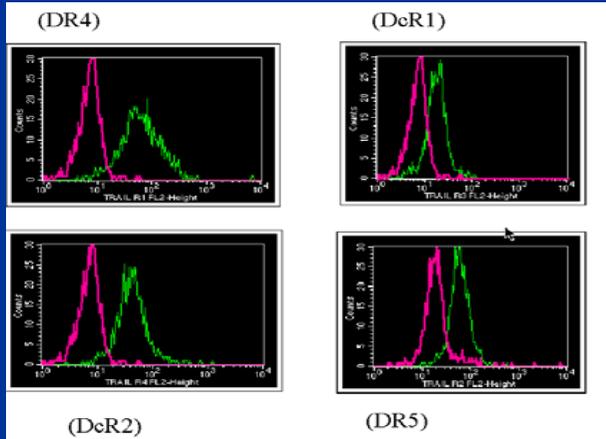
- Screening mutacional de la región codificante de los 4 receptores-TRAIL en 70 tumores y líneas celulares (26 con delección 8p/44 sin delección 8p):
 - No mutaciones.
- Análisis metilación de promotores (MSP):



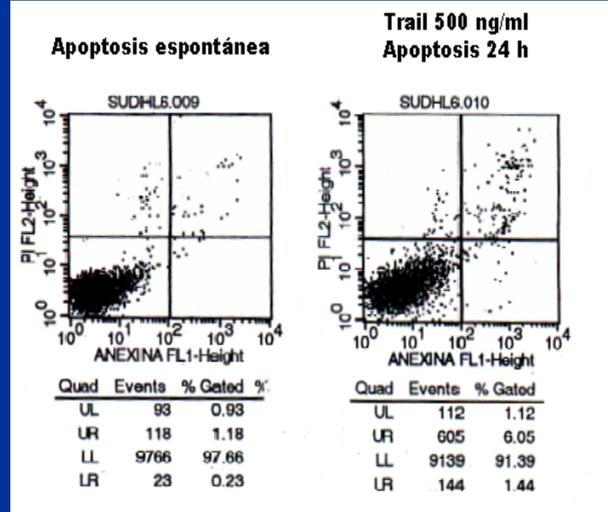
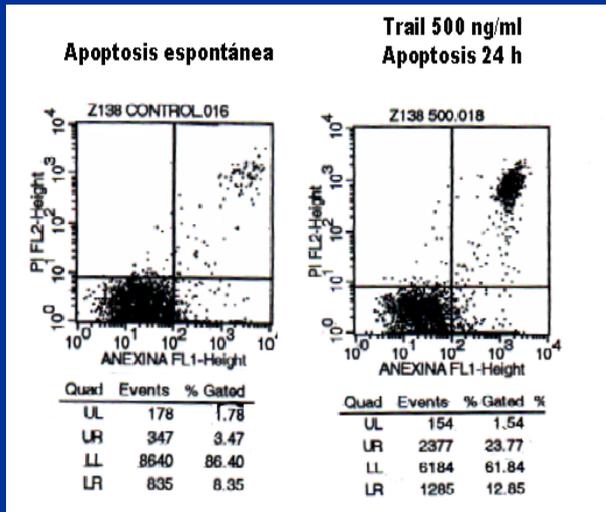
- no hipermetilación de promotores de DR4 y DR5 tumores con delección.
- DcR1 está metilado y silenciado 60% de los linfomas.
- DcR2 raramente se encuentra hipermetilado.

ESTUDIOS FUNCIONALES DE LOS RECEPTORES-TRAIL(I)

ANALISIS DE CITOMETRIA DE FLUJO CONFIRMA LA REDUCCION DE EXPRESION DR4 Y DR5 EN TUMORES CON del 8p21.3



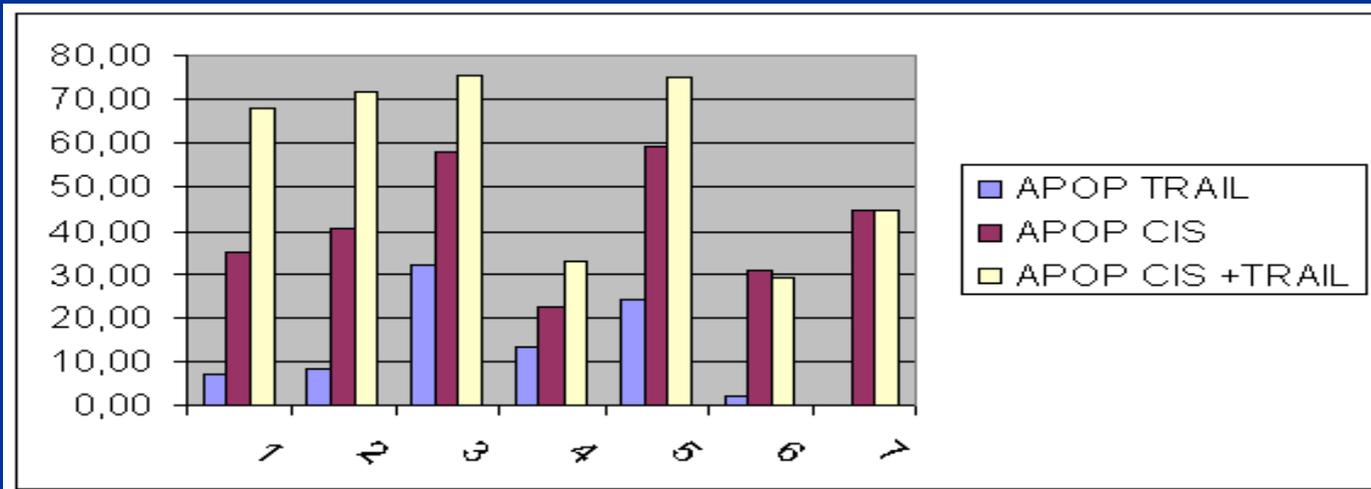
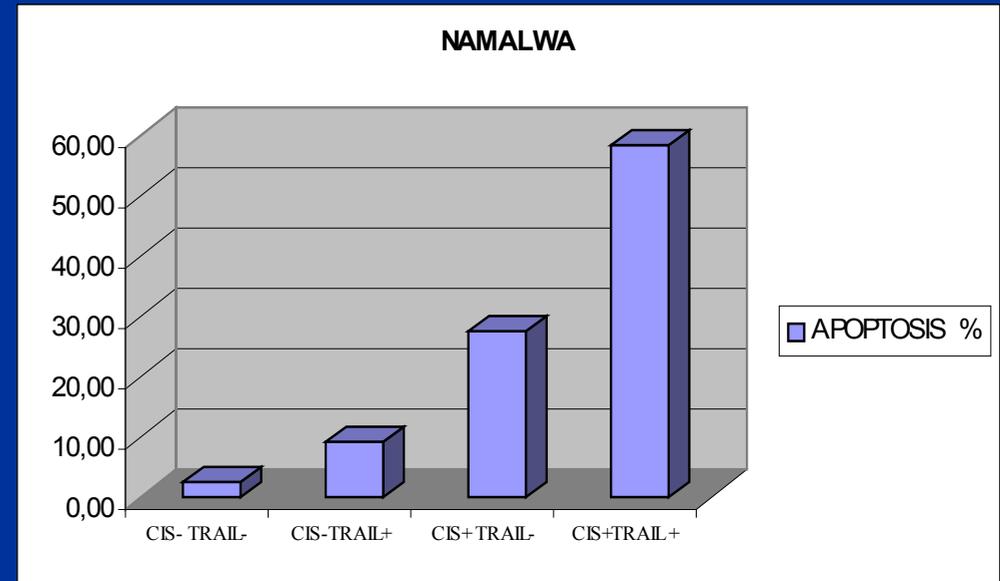
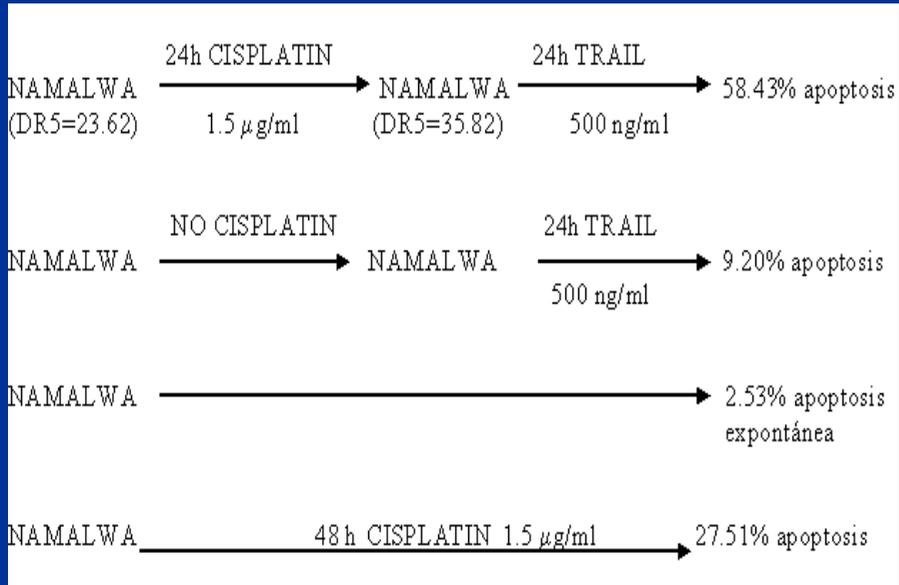
	DR4	DR5	DcR1	DcR2	DR4+DR5
DEL	14,11	23,04	18,76	19,48	31,52
NO DEL	43,73	55,04	22,21	29,43	98,77
	p=0,03	p=0,018	p=NS	p=NS	p<0.01



DR4 Y DR5 presentan una menor expresion proteica en tumores con 8p21.3. DcR1 Y DcR2 no presentan diferencias

CORRELACION ENTRE LA RESISTENCIA A TRAIL Y EXPRESION BAJA DE PROTEINA DR4 Y DR5 EN LA MEMBRANA

ESTUDIOS FUNCIONALES DE LOS RECEPTORES TRAIL(II)



RESTAURACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE DR4 Y DR5 EN LINEAS CELULARES CON DELECCIÓN DE 8p21.3 REVIERTEN LA SENSIBILIDAD A TRAIL

CONCLUSIONES

- El estudio comparativo entre las alteraciones genómicas y la expresión génica nos ha permitido localizar potenciales GST.
- En 8p hemos identificado los genes codificantes de los receptores de TRAIL, DR4 y DR5, como candidatos supresores en linfoma B
- Análisis genéticos y funcionales “in vitro” de los receptores-TRAIL indican que DR4 y DR5 modulan la apoptosis en linfomas B mediante un mecanismo dependiente de la dosis genómica (haploinsuficiencia).
- Para demostrar esta hipótesis definitivamente será necesario generar un modelo “knock-out” deficientes en DR4 y DR5