



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

**POLIMORFISMES GENÈTICS I TRACTAMENT ANTITUMORAL:  
EVOLUCIÓ DELS PACIENTS AMB LEUCÈMIA LIMFOBLÀSTICA  
AGUDA I INDUCCIÓ DE LEUCÈMIES SECUNDÀRIES**

MARIA CABEZAS SOMALO

Memòria presentada per optar al Grau de Doctora en Biodiversitat per la  
Universitat Autònoma de Barcelona

Directors:

Dra. Gemma Armengol i Rosell i Dra. María Rosa Caballín Fernández

Bellaterra, 2017





Universitat Autònoma de Barcelona

**Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia**

Unitat d'Antropologia Biològica

La **Dra. Gemma Armengol i Rosell**, professora titular del Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

I la **Dra. María Rosa Caballín Fernández**, catedràtica del Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEN:

Que **Maria Cabezas Somalo** ha realitzat sota la seva direcció el treball d'investigació que s'exposa en la memòria titulada "Polimorfismes genètics i tractament antitumoral: evolució dels pacients amb leucèmia limfoblàstica aguda i inducció de leucèmies secundàries" per optar al grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball s'ha dut a terme a la Unitat d'Antropologia Biològica del Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia.

I per tal que així consti, firmen el present certificat.

Bellaterra, 16 de juny de 2017.

Dra. Gemma Armengol i Rosell

Dra. María Rosa Caballín Fernández

Maria Cabezas Somalo



Aquesta tesi s'ha realitzat amb el finançament de la Generalitat de Catalunya (suport a grups de recerca 2014 SGR 354). Maria Cabezas Somalo ha gaudit d'una beca predoctoral per a personal investigador novell (FI), concedida per la Generalitat de Catalunya (2013FI\_B1076).

## Agraïments

A les meves directores de tesi, la M<sup>a</sup> Rosa Caballín i la Gemma Armengol.

M<sup>a</sup> Rosa, gracias por tu tiempo y por tu dedicación. Por todo lo que me has enseñado durante estos años y por darme la oportunidad de entrar en el mundo de la investigación. Por tus consejos y ganas de mejorar día a día. Muchas gracias.

Gemma, al punt en que ja he dipositat la tesi crec que mai podré acabar d'agrair-te tot el que has fet per mi, gràcies per la teva confiança, per la teva energia, pel teu optimisme i les teves ganes de treballar. Perquè sempre has trobat un moment per mi, perquè més que una directora has estat una guia, perquè m'has resolt tots els dubtes amb un gran somriure. Pel teu temps, per la teva dedicació i per la teva comprensió, Gràcies.

A tots els metges involucrats en els projectes d'aquesta tesi, sense la seva ajuda els treballs resultants d'aquesta tesi no haurien estat possible. A la Mireia Camòs per ajudar-me i facilitar-me les mostres, per resoldre tots els dubtes amb molta facilitat.

A la Jèssica, perquè aquesta tesis és tant seva com meva. Per ensenyar-me tot el que sé en el laboratori, per la seva paciència en tots els meus dubtes, pels seus consells, pel nostre món macroscòpic, per tots els moments en la sala de cultius, a la sala de microscòpia però sobretot pel seu somriure de bon matí. Per ajudar-me a créixer tant a nivell laboral com personal, vaig entrar a Antropologia com una nena, la teva Maria, i surto amb una gran amistat que espero no perdre mai.

A la Mar, en Pere i la Gemma, per els bons moments viscuts durant aquest anys, dins i fora d'Antropologia, pels vostres consells, per tots els dinars compartits i espero que això no acabi aquí. Aida, Amanda, Cristina Alfonso, Mònica, Nekane, Maria Fontalans, Nika, Marc... i tothom que ha passat per antropologia durant els meus anys de doctorat, gràcies pels consells i els moments viscuts.

Chiquiiii (María Chicano), mi compañera de despacho durante unos cuantos años, gracias por tu saber estar, por escuchar, por tus consejos y sobre todo por tu amistad, espero seguir discutiendo contigo sobre técnicas moleculares muchos años más; Yolanda, gràcies per les hores de microscopi ensenyant-me el que saps i pels

“achuchones” quan teníem un mal dia. A la Tati i a la Blanca, per acompanyar-me durant part de la vida universitària.

To Dr. Townsend and Dr Tew, thank you because I was well received in your lab, you helped me a lot when I arrived to Charleston. Jacqui and Tiffany, I will never forget the moments that we lived in the lab, you accepted me since the first day, I am so grateful to you. Jacqui thank you for your friendship during my stay in Charleston, I am sure that It wouldn't have been the same without you.

Núria, quants moments viscuts i s'acaben, moltes gràcies pels teus consells, per fer-me veure que no tot es tan negre o quan estava equivocada, gràcies per comptar sempre amb mi, et trobaré molt a faltar.

A les meves amigues de Girona, que en els últims moments les he tingut una mica descuidades, Alba, Eva, Sara, Laura i Cristina, gràcies per entendre i mostrar sempre interès sobre el meu doctorat. A la Llúcia, que tot i la distància sempre està allà. A la Mar i en Marco, que sempre han sabut com fer que m'oblidi de tot perduts en mig del Pirineu o deixant tota l'adrenalina escalant muntanyes. Gràcies per la vostra amistat, és única.

A la meva família, al meu pare perquè des de ben petita em va ensenyar a ser forta, perquè sense ell avui no estaria aquí i per trobar la seva mà després de cada caiguda. A la meva germana, la meva meitat, la meva guia. Al Adri, pels Skype a les tantes de la matinada i per tractar-me sempre com a una germana més. Als meus nebots, l'Iker i en Jan, ells han convertit les llàgrimes de tristesa o preocupació, en llàgrimes d'amor, el millor regal que mai he rebut. A la meva mare, no puc evitar donar-te les gràcies per ajudar-me a créixer i veure un sentit diferent a la vida, mai oblidaré els teus valors.

A tu, per aparèixer en un moment molt important, per donar-me ànims quan estava lluny, per ajudar-me a motivar-me en els moments de baixó, per aguantar els meu canvis d'humor quan un experiment no sortia o el full estava blanc durant hores, pels diumenges a la universitat i per estar-hi sempre. Gràcies per valorar-me i ajudar-me a aconseguir els meus somnis. T'estimo.



*Perquè no totes les princeses,  
tenen un preciós cabell, ni un llarg vestit...*



<b>ABREVIATURES.....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 LEUCÈMIA .....</b>	<b>16</b>
1.1.1 Leucèmia limfoblàstica aguda .....	16
1.1.2 Leucèmia mieloide aguda .....	21
1.1.3 Neoplàsies mieloides relacionades amb la teràpia .....	25
1.1.3.1 Agents antitumorals que poden donar lloc a t-NM .....	26
1.1.3.1.1 Agents alquilants .....	26
1.1.3.1.2 Inhibidors de la topoisomerasa II .....	27
1.1.3.2 Mecanismes de desenvolupament de t-NM .....	27
1.1.3.2.1 Generació de DSBs i activació de la resposta al dany de DNA .....	27
1.1.3.2.2 Reparació dels DSBs i desenvolupament de t-NM .....	29
1.1.4 Tractament de les leucèmies agudes .....	32
1.1.5 Metabolisme de fàrmacs quimioteràpics .....	36
1.1.6 Mecanismes de l'apoptosi .....	39
<b>1.2 POLIMORFISMES GENÈTICS RELACIONATS AMB EL TRACTAMENT ANTINEOPLÀSTIC ..</b>	<b>41</b>
1.2.1 Tipus de polimorfismes genètics .....	42
1.2.2 Polimorfismes genètics relacionats amb la resposta al tractament per LLA infantil.....	43
1.2.3 Polimorfismes genètics relacionats amb el desenvolupament de t-NM. ....	45
<b>1.3 OBJECTIUS: .....</b>	<b>49</b>
<b>2. RESULTATS.....</b>	<b>50</b>
<b>2.1 IMPACT OF POLYMORPHISMS IN APOPTOSIS-RELATED GENES ON THE OUTCOME OF CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA .....</b>	<b>51</b>
<b>2.2 RISK OF DEVELOPING THERAPY-RELATED MYELOID NEOPLASM AND POLYMORPHISMS IN MDM2 AND TP53 GENES .....</b>	<b>80</b>
<b>3. DISCUSSIÓ.....</b>	<b>114</b>
<b>3.1 APOPTOSI .....</b>	<b>115</b>
3.1.1 Apoptosi i carcinogènesi .....	115
3.1.1.1 Alteració en l'equilibri entre proteïnes pro-apoptòtiques i anti-apoptòtiques .....	115
3.1.1.1.1 Família de proteïnes BCL-2 .....	115
3.1.1.1.2 P53.....	116
3.1.1.1.3 Proteïnes IAPs.....	118

3.1.1.2	Disminució de l'activitat de les caspases .....	118
3.1.1.3	Alteracions en la senyalització dels receptors de mort cel·lular .....	119
3.1.2	Apoptosi i resposta a la teràpia antitumoral .....	119
<b>3.2</b>	<b>POLIMORFISMES EN GENS RELACIONATS AMB L'APOPTOSI I EVOLUCIÓ DELS</b>	
	<b>PACIENTS AMB LLA PEDIÀTRICA.....</b>	<b>120</b>
3.2.1	CNV del gen <i>GSTM1</i> i apoptosi .....	120
3.2.2	Polimorfisme Arg72Pro en el gen <i>TP53</i> i apoptosi.....	124
<b>3.3</b>	<b>POLIMORFISMES EN GENS DE LA VIA DE P53 I DESENVOLUPAMENT DE T-NM.....</b>	<b>125</b>
3.3.1	SNP309 del gen <i>MDM2</i> i apoptosi .....	125
3.3.2	Polimorfisme Arg72Pro en el gen <i>TP53</i> i reparació del DNA .....	127
<b>3.4</b>	<b>PERSPECTIVES DE FUTUR .....</b>	<b>129</b>
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>131</b>
<b>5.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>134</b>

## ABREVIATURES

53BP1: *Tumor protein p53 binding protein 1*

Arg: *Arginine*

ABC: *ATP-binding cassette*

ARID5B: *AT-rich interactive domain 5B*

ASK1: *Apoptosis signal-regulating kinase 1*

ASXL1: *Additional Sex Combs Like 1*

ATM: *Ataxia telangiectasia mutated*

ATR: *Ataxia telangiectasia *à* rad3 related*

BRCA1: *Breast cancer 1*

CBFB: *Core-Binding Factor Beta Subunit*

CCR5: *Chemokine receptor*

CDKN2A: *cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A*

CDKN2B: *cyclin-dependent kinase Inhibitor 2B*

CEBPA: *CCAAT/Enhancer-Binding Protein Alpha*

CEBPE: *CCAAT/Enhancer Binding Protein Epsilon*

CHK2: *Checkpoint kinase 2*

CLEC12A: *C-type lectin domain family 12 member A*

CNV: *Copy number variants*

COP1: *Coat complex protein 1*

CYP2D6: *Cytochrome P450 family 2 subfamily D member 6*

DDR: *DNA damage response*

DHFR: *Dihydrofolate reductase*

DISC: *death-inducing signalling complex*

DNA-PKcs: *DNA-dependent kinase catalytic subunit*

DNMT3A: *DNA methyltransferase 3 alpha*

DSB: Trencaments de doble cadena

ELN: European LeukemiaNet

ERCC2: *Excision repair cross-complementation group 2*

ETP-LLA: *Early T precursor –LLA*

ETV6: *ETS translocation variant 6*

EZH2: *enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*

FADD: *Fas-associated protein with death domain*

FLT3: *Fms-like tyrosine kinase 3*

GATA3: *GATA Binding Protein 3*

GSH: Glutatió

GST: Glutatió S-transferases

GSTM1: *Glutathione S-transferase mu 1*

GSTT1: *Glutathione S-transferase theta 1*

$\gamma$ -H2AX: Histona H2AX fosforilada en el residu serina 139

HPRT: Hypoxanthine phosphoribosyl transferase

HR: *homologous recombination*

IAPs: Inhibidors de proteïnes apoptòtiques

iASPP : *Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53*

IDAC: *Intermediate-dose cytarabine*

IKZF1: *IKAROS Family Zinc Finger 1*

IL-15: *Interleukin*

JAK: *C-Jun N-terminal kinases-*

KMT2A: *lysine N-methyltransferase 2A*

LLA: Leucèmia limfoblàstica aguda

LMA: Leucèmia mieloide aguda

MDC1: *Mediator of DNA damage checkpoint 1*

MDM2: murine double-minute *clone 2*

MDM4: *Murine double minute 4*

MECOM: *MDS1 and EVI1 complex locus*

MEKK1: *MAPK kinase kinase 1*

MLH1: *MutL homolog 1*

MO: *Medul·la òssia*

MRN: *MRE11-RAD50-NBS1*

MTHFR: *Methylene tetrahydrofolate reductase*

MTX: *Metotrexat*

MYCN: *MYCN proto-oncogèn, bHLH transcription factor*

MYH11: *Myosin Heavy Chain 11*

NF- $\kappa$ B: *Nuclear factor kappa B subunit 1*

NHEJ: *Non-homologous end joining*

NPM1: *Nucleophosmin*

NQO: *Quinone oxoreductase*

OMS: *Organització Mundial de la Salut*

PARP: *Poly(ADP-ribose)polymerase*

PAX5: *Paired Box 5*

PDE4B: *Phosphodiesterase 4B*

PI3K : *Phosphatidylinositol 3-kinase*

PIP4K2A: *Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type-2 alpha*

PML: *Promyelocytic leukemia*

PREP: *Prolyl endopeptidase*

Pro: *Proline*

PYGL: *Glycogen phosphorylase*

RAD21: *Receptor associated protein 21*

RARA: *Retinoic acid receptor alpha*

RFC: *Reduced folate carrier*

ROS: Espècies reactives d'oxigen

RPA: *Human replication protein A*

RUNX1: *Runt Related Transcription Factor 1*

RUNX1T1: *RUNX1 Translocation Partner 1*

SF3B1: *splicing factor 3B subunit 1*

SMD: Síndrome mielodisplàstic

SNC: Sistema nervios central

SNP: *Single nucleotide polymorphysm*

SRSF2: *Serine and arginine rich splicing factor 2*

STAG2: *Stromal Antigen 2*

STAT: *Signal transducer and activator of transcription*

SULT: *Sulfotransferasa*

SULT1A1: *Sulfotransferase family 1A member 1*

TET2: *Tet methylcytosine dioxygenase 2*

TGNs: *Thioguanine nucleotide*

t-LMA: Leucèmia mieloide aguda relacionada amb teràpia

t-NM: Neoplàsies mieloides relacionades amb teràpia

TP53: *tumor protein p53*

TP63: *tumor protein p63*

TPMT: *Thiopurine S-methyltransferase*

TS: *Thymidylate synthase*

U2AF1: *U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1*

UGT: *UDP glucuronil transferasa*

UGT2B17: *UDP glucuronosyltransferase family 2 member B17*

XLF: *XRCC4-like factor*

XRCC4: *X-ray repair cross complementing 4*

ZRSR2: *Zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2*

# 1. INTRODUCCIÓ



## 1.1 LEUCÈMIA

Els símptomes de la leucèmia es coneixen des dels temps d'Hipòcrates, però no va ser fins entre el 1839 i el 1845 que Virchow va reconèixer la leucèmia com un trastorn clínic distintiu. Va anomenar aquesta malaltia leucèmia per l'aparença blanca de la sang en pacients amb febre, debilitat i limfadenopatia (revisat per Turgeon 2012). Actualment, el seu diagnòstic es realitza mitjançant l'anàlisi de sang perifèrica i medul·la òssia (MO).

La leucèmia és una neoplàsia hematològica que es caracteritza per una proliferació anòmala en MO de les cèl·lules precursors de les cèl·lules sanguínies. La leucèmia altera l'hematopoesi, que es defineix com el mecanisme fisiològic responsable de la formació continuada (diferenciació i maduració) de cèl·lules sanguínies a partir d'una cèl·lula mare hematopoètica totipotent. Les leucèmies es poden classificar, depenent de les seves manifestacions clíniques, en agudes o cròniques; agudes, aquelles que evolucionen ràpidament i cròniques, les que es mantenen en creixement lent durant anys. També es poden classificar, segons el seu llinatge, en leucèmies limfoides o mieloides (Figura 1).

A diferència dels tumors sòlids, les leucèmies solen presentar poques alteracions genètiques, i generalment presenten translocacions que impliquen el reordenament d'oncogens.

### 1.1.1 Leucèmia limfoblàstica aguda

La leucèmia limfoblàstica aguda (LLA) és una neoplàsia de cèl·lules progenitores limfoides. És el càncer infantil més comú i representa un terç dels tumors malignes infantils (Pui 2010). La incidència de LLA infantil ha augmentat gradualment des del 1975 (Smith et al. 2014) fins arribar a 41 nous casos per milió d'habitants en menors de 14 anys, i aproximadament 17 casos per milió d'habitants entre 15 i 19 anys (Howlader et al. 2016), amb un pic d'incidència entre 2 i 3 anys (revisat per Howlader et al. 2011). Afortunadament, la taxa de supervivència als 5 anys també ha augmentat, gràcies a la intensificació progressiva de múltiples agents quimioteràpics i a la correcta estratificació dels pacients en grups de risc, fins arribar a un 90% de supervivència en

nens menors de 15 anys i fins al 75% en adolescents de 15 a 19 anys (Howlader et al., 2015). No obstant, el 15-20% dels pacients recauen (Ceppi et al. 2015).

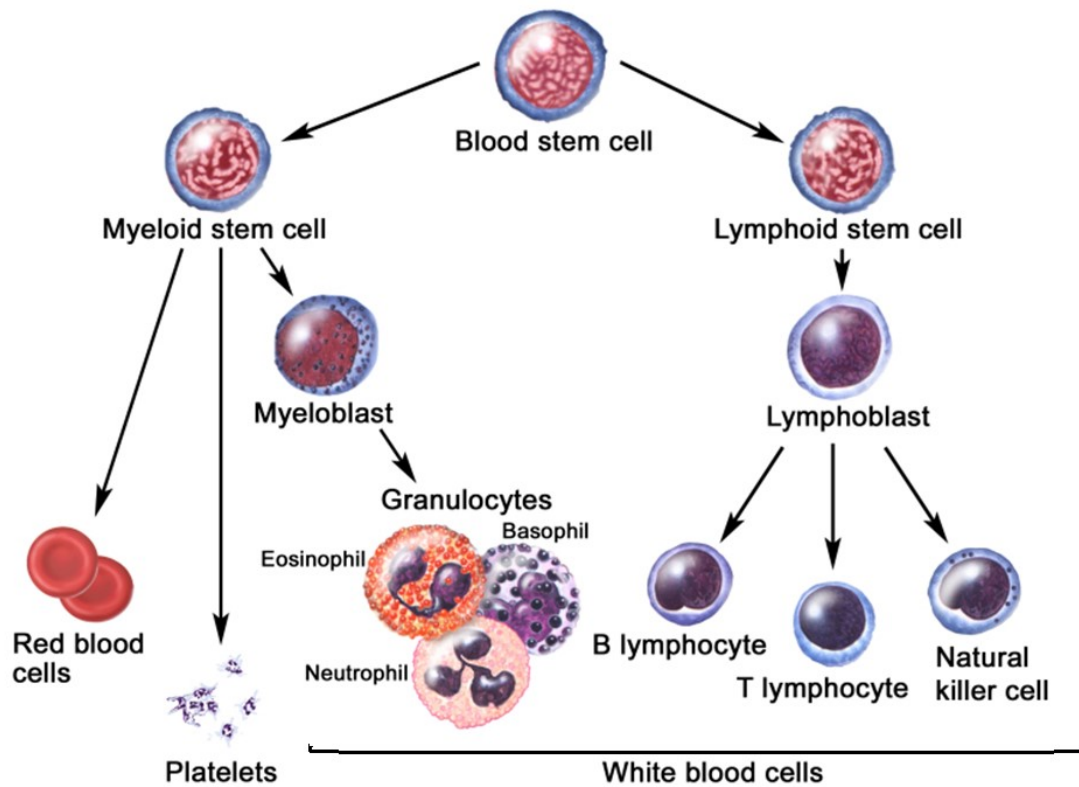


Figura 1. Línies de diferenciació en la hematopoesi. A partir d'una cèl·lula mare pluripotent comú es formen les cèl·lules madures dels diversos llinatges hematopoètics en la MO tant durant el desenvolupament embrionari com al llarg de la vida adulta. Modificada de PubMedHealth (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022038>).

Hi ha factors genètics associats amb un increment del risc a desenvolupar LLA infantil, sent el més destacat la síndrome de Down (Buitenkamp et al. 2014). En estudis d'associació genòmica també s'han identificat variants polimòrfiques en diversos gens (incloent *ARID5B*, *AT-rich interactive domain 5B*, *CEBPE*, *CCAAT/Enhancer Binding Protein Epsilon*, *GATA3*, *GATA Binding Protein 3*, *CDKN2A*, *cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A*, *CDKN2B*, *cyclin-dependent kinase Inhibitor 2B*, *PIP4K2A*, *Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type-2 alpha*, *TP63*, *tumor protein p63* i *IKZF1*, *IKAROS Family Zinc Finger 1*), associats amb un increment del risc de LLA o d'un subtipus específic de LLA infantil (Treviño et al. 2009; Papaemmanuil et al. 2009;

Sherborne et al. 2010; Ellinghaus et al. 2012; Xu et al. 2013; Perez-Andreu et al. 2013). A més, s'ha observat que mutacions germinals poc freqüents en *PAX5* (*Paired Box 5*) i *ETV6* (*ETS translocation variant 6*) estan associades a LLA familiar (Shah et al. 2013; Zhang et al. 2015). Fins ara, s'han trobat pocs factors de risc ambientals associats a LLA infantil; l'exposició a la radiació i a certs agents químics podria estar relacionada amb un increment de la freqüència de LLA infantil, però aquestes associacions explicarien només una petita minoria dels casos (Hunger & Mullighan 2015).

Les cèl·lules leucèmiques dels pacients amb LLA tenen una varietat de mutacions que inclouen aneuploïdia (canvis en el nombre de cromosomes), reordenaments cromosòmics, pèrdues i guanys en el DNA i mutacions puntuals en la seqüència del DNA (Harrison 2009). Moltes d'aquestes mutacions alteren processos cel·lulars claus, incloent la regulació transcripcional del desenvolupament i de la diferenciació del llinatge limfoide; la regulació del cicle cel·lular; la via de p53-RB; les vies de senyalització de receptors de factors de creixement, de RAS, de PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) i de JAK-STAT (c-Jun N-terminal kinases- signal transducer and activator of transcription); el metabolisme de nucleòsids i les marques epigenètiques (Zhang et al. 2011; Ma et al. 2015). De mitjana, els nens amb LLA presenten de 10 a 20 mutacions puntuals no silencioses al moment del diagnòstic, i aproximadament el doble en la recaiguda (Ma et al. 2015).

Per altra banda, les translocacions cromosòmiques i els reordenaments intracromosomals són primerencs i possiblement inicien el procés de la leucemogènesi. Fins i tot es poden detectar en mostres de sang neonatal anys abans de que es produeixin les manifestacions clíniques de la leucèmia (Wiemels et al. 1999). Les translocacions poden activar els oncògens per dos mecanismes: en el primer, l'oncògen es col·loca en regions reguladores de gens transcrits activament causant la desregulació de l'expressió de la proteïna intacta; en el segon, es juxtaposen dos gens, que codifiquen per una proteïna quimèrica que té funcions diferents a les de la proteïna de la qual deriva (revisat per Hunger & Mullighan 2015).

L'organització mundial de la salut (OMS) classifica les LLA integrant aspectes clínics, morfològics, immunofenotípics i genètics i les separa en dos grans grups d'acord amb

el tipus de limfòcit afectat: LLA de cèl·lules B (LLA-B) i LLA de cèl·lules T (LLA-T) (Swerdlow et al. 2008). Dins de les LLA-B hi ha les que tenen alteracions genètiques recurrents i les que no. Recentment, Arber et al. (2016) han introduït dues noves entitats en el subgrup de LLA-B amb alteracions genètiques recurrents: les LLA-B amb amplificació intracromosomal del cromosoma 21 (iAMP21) i les LLA-B amb translocacions involucrades en *tyrosine kinases* o *cytokine receptors* (*BCR-ABL1-like* LLA); i una nova entitat en el subgrup de LLA-T, les ETP (*Early T precursor*) LLA (Taula 1). Les ETP LLA presenten una composició genètica i un immunofenotip únics, amb retenció d'algunes característiques de cèl·lules mieloides i de cèl·lules mare (Arber et al. 2016).

Taula 1. Classificació de la OMS de la leucèmia limfoblàstica aguda (Swerdlow et al. 2008; Arber et al. 2016).

<b>Classificació de l'OMS de les neoplàsies de precursors limfoides</b>
<p>Leucèmia/limfoma limfoblàstica B</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Leucèmia/limfoma limfoblàstica B sense alteracions genètiques recurrents</li> <li>- Leucèmia/limfoma limfoblàstica B amb alteracions genètiques recurrents <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Leucèmia limfoblàstica B amb t(9;22)(q34;q11); <i>BCR-ABL</i></li> <li>▪ Leucèmia limfoblàstica B amb t(v;11q23); reorganització del gen <i>MLL</i></li> <li>▪ Leucèmia limfoblàstica B amb t(12;21)(p13;q22); <i>ETV-RUNX1</i> (<i>TEL-AML1</i>)</li> <li>▪ Leucèmia limfoblàstica B amb hiperdiploïdia</li> <li>▪ Leucèmia limfoblàstica B amb hipodiploïdia</li> <li>▪ Leucèmia limfoblàstica B amb t(5;14)(q31;q32); <i>IL3-IGH</i></li> <li>▪ Leucèmia limfoblàstica B amb t(1;19)(q23;p13.3)</li> <li>▪ Leucèmia limfoblàstica B amb amplificació intracromosomal del cromosoma 21</li> <li>▪ Leucèmia limfoblàstica B amb translocacions involucrades en <i>tyrosine kinases</i> o <i>cytokine receptors</i></li> </ul> </li> </ul>
<p>Leucèmia/limfoma limfoblàstica T</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ETP-LLA</li> </ul>

Els pacients amb LLA infantil es classifiquen en diferent grups pronòstic segons les alteracions citogenètiques i moleculars presents a les cèl·lules tumorals (Taula 2) (Schultz et al. 2007; Pui 2010; Zhou & Yang 2014; Hunger & Mullighan 2015). Les freqüències d'aquestes alteracions en LLA infantil queden reflectides en la Figura 2. Les característiques clíniques i l'immunofenotip també s'utilitzen com a factors pronòstic

en LLA, així com l'edat, ja que els nens que tenen menys d'un any es classifiquen en un subgrup de pacients amb una pitjor resposta al tractament (Taula 3) (revisat per Hunger & Mullighan 2015).

Taula 2. Classificació en grups pronòstic dels pacients amb LLA infantil segons les seves alteracions citogenètiques i moleculars.

	Bon pronòstic	Pronòstic intermedi	Mal pronòstic
<b>LLA de cèl·lules B</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hiperdiploidies (&gt;50cr)</li> <li>- t(12;21)(p13;q21) <i>ETV6/RUNX1</i></li> <li>- t(1;19)(q23;p13) <i>TCF3/PBX1</i></li> <li>- t(8;14)(q24;q32) <i>IGHα/MYC</i></li> <li>- Trisomies 4, 10, 17</li> <li>- Delecions en <i>ERG</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La resta d'alteracions</li> <li>- Cariotip normal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hipodiploidies (&lt;44 cromosomes)</li> <li>- Reorganitzacions de <i>MLL</i></li> <li>- t(9;22)(q34;q11.2) <i>BCR/ABL1</i></li> <li>- <i>iAMP21</i></li> <li>- Reorganitzacions de <i>CRLF2</i></li> <li>- Alteracions de <i>IKZF1</i></li> </ul>
<b>LLA de cèl·lules T</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- t(1;7)(p32;q34) <i>TRB/TAL1</i></li> <li>- t(1;14)(p32;q11) <i>TRA/TAL1</i></li> <li>- t(7;10)(q34;q24) <i>RB/HOX11</i></li> <li>- t(10;14)(q24;q11) <i>HOX11/TRD</i></li> <li>- t(11;19)(q23;p13.3) <i>MLL/ENL</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La resta d'alteracions</li> <li>- Cariotip normal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ETP-LLA</li> <li>- Fusió gènica <i>NUP214-ABL1</i></li> <li>- t(5;14)(q35;q32) <i>TLX3/HOX11L2</i></li> <li>- t(10;11)(p13;q14) <i>CALM/AF10L</i></li> </ul>

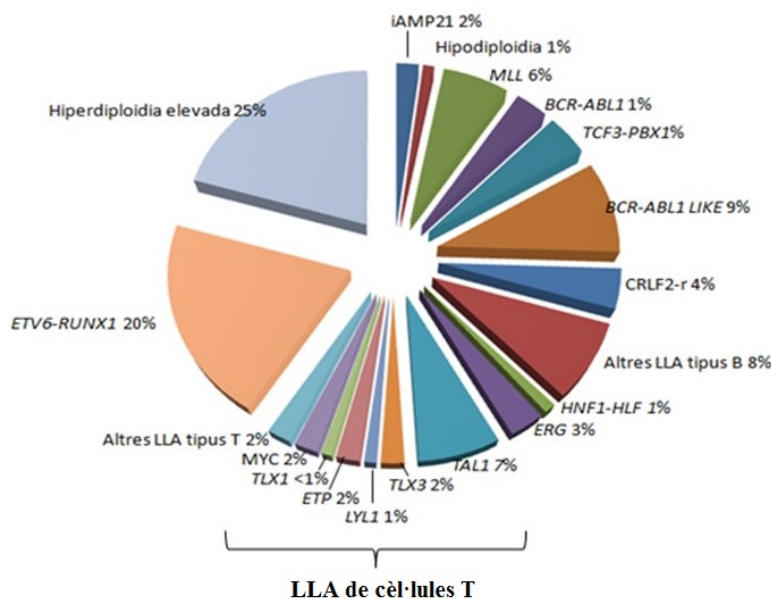


Figura 2. Freqüències dels subtipus d'alteracions genètiques en LLA infantil. Es mostren les freqüències relatives dels subtipus genètics de LLA de cèl·lules T (marcat en el gràfic) i de LLA de cèl·lules B (les altres). No s'inclouen les alteracions genètiques submicroscòpiques. Modificada de Pui et al. (2012).

Taula 3. Factors pronòstic clínic-biològics utilitzats per a la classificació de la LLA. Modificada de Hunger & Mullighan (2015).

	Factor favorable	Factor de mal pronòstic
<b>Edat</b>	De 1 a <10 anys	<1 any o ≥10 anys
<b>Sexe</b>	Femení	Masculí
<b>Raça o grup ètnic</b>	Blancs i asiàtics	Hispànics, americans nadius i negres
<b>Recompte de glòbuls blancs</b>	Inferior a 50.000/mm <sup>3</sup>	Superior a ≥50.000/mm <sup>3</sup>
<b>Immunofenotip</b>	Llinatge tipus B	Llinatge tipus T

### 1.1.2 Leucèmia mieloide aguda

La leucèmia mieloide aguda (LMA) és una neoplàsia hematològica clonal resultant d'alteracions genètiques en cèl·lules mare hematopoètiques de la línia mieloide. Es caracteritza per la penetració de les cèl·lules cancerígenes en la MO, la sang i altres teixits mitjançant la proliferació, la clonació, la diferenciació anòmala i ocasionalment per una diferenciació pobra de les cèl·lules del sistema hematopoètic (revisat per Döhner et al. 2015). El diagnòstic de LMA s'estableix per la presència d'almenys 20% de blasts en la MO o sang perifèrica (revisat per De Kouchkovsky & Abdul-Hay 2016). A Europa, hi ha aproximadament 20.000 nous casos diagnosticats per any (Cassidy & Syed 2016). La LMA predomina en persones grans, amb una edat mitjana al diagnòstic de 66 anys. Tot i que fa 50 anys la LMA era incurable, avui en dia hi ha una taxa de curació del 55% en pacients menors de 20 anys (Rubnitz & Inaba 2012), del 35-40% en pacients menors de 60 anys i del 5-15% en pacients més grans de 60 anys (Döhner et al. 2015). Alguns pacients d'edat avançada no poden rebre quimioteràpia intensiva, i mostren una supervivència mitjana de només 5-10 mesos. Segons l'OMS, hi ha cinc grans categories de LMA: LMA amb alteracions genètiques recurrents, LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia, neoplàsies mieloides relacionades amb la teràpia, neoplàsies mieloides familiars i LMA no especificades en les altres categories (Arber et al. 2016; Döhner et al. 2017). La LMA es pot desenvolupar a partir d'una síndrome mielodisplàstica (SMD) i s'ha observat que un 30% dels pacients amb SMD progressen cap a LMA (revisat per Shukron et al. 2012; da Silva-Coelho et al. 2017). La SMD és un grup heterogeni de neoplàsies hematopoètiques caracteritzades per una diferenciació

anòmala d'una o més línies cel·lulars hematopoètiques, displàsia i citopènia en sang perifèrica (da Silva-Coelho et al. 2017).

La LMA està associada freqüentment amb inestabilitat genètica i es caracteritza per la presència d'alteracions cromosòmiques i moleculars (Seedhouse et al. 2002). A dia d'avui, l'anàlisi citogenètica convencional segueix sent obligatòria en l'avaluació d'una sospita de LMA (Döhner et al. 2017), ja que les alteracions citogenètiques serveixen per diagnosticar la LMA i per definir les categories de l'OMS. En la categoria "LMA amb alteracions genètiques recurrents" s'inclouen vuit translocacions equilibrades i inversions i les seves variants. En la categoria "LMA amb alteracions relacionades amb mielodislàsia" s'inclouen nou reorganitzacions equilibrades i altres de desequilibrades, sempre que el percentatge de blasts sigui  $\geq 20\%$  (Taula 4) (Döhner et al. 2017). També s'han observat altres reordenaments equilibrats poc freqüents (Grimwade et al. 2010; Grimwade et al. 2016). Addicionalment, la hibridació *in situ* amb fluorescència (FISH) s'utilitza per detectar reordenaments gènics com ara *RUNX1-RUNX1T1* (*Runt Related Transcription Factor 1- RUNX1 Translocation Partner 1*), *CBFB-MYH11* (*Core-Binding Factor Beta Subunit- Myosin Heavy Chain 11*), *KMT2A* (*Lysine N-methyltransferase 2A*) i *MECOM* (*MDS1 and EVI1 complex locus*) o pèrdues dels cromosomes 5q, 7q o material del 17p.

Les noves tècniques genòmiques, principalment la seqüenciació de segona generació, han proporcionat una visió sense precedents de l'espectre i la freqüència de les mutacions, els seus diferents patrons de cooperativitat i d'exclusivitat mútua, la seva evolució subclonal durant el transcurs de la malaltia i el mapa epigenètic de la malaltia. Els gens mutats en LMA s'han organitzat en diverses categories funcionals: mutacions en els gens activadors de senyalització (com el *FLT3*, *fms-like tyrosine kinase 3*), mutacions en factors de transcripció mieloide (com el *RUNX1*), mutacions en el gen de la nucleofosmina (*NPM1*), mutacions en gens del complex de *splicing* (com *SRSF2*, *serine and arginine rich splicing factor 2*, *SF3B1*, *splicing factor 3B subunit 1*, *U2AF1*, *U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1*, i *ZRSR2*, *zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2*), mutacions en gens del complex de cohesina (com *STAG2*, *Stromal Antigen 2* i *RAD21*, *RAD21 cohesin complex component*), mutacions en gens involucrats en l'homeòstasi epigenètica de les cèl·lules (com *ASXL1*, *Additional Sex*

*Combs Like 1*, i *EZH2*, *enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*, implicats en la desregulació de les modificacions de la cromatina, així com *DNMT3A*, *DNA methyltransferase 3 alpha* o *TET2* “*tet methylcytosine dioxygenase 2*”, implicats en la metilació del DNA) i finalment mutacions en gens supressors de tumors, com *TP53* (*tumor protein p53*), que poden donar lloc a desregulacions transcripcionals i alteracions de la seva degradació per *MDM2* (*murine double-minute clone 2*) (revisat per Döhner et al. 2015).

Taula 4. Alteracions citogenètiques utilitzades per classificar les LMA en “LMA amb alteracions genètiques recurrents” i “LMA amb alteracions relacionades amb mielodisplàsia” segons l’OMS.

<b>LMA amb alteracions genètiques recurrents</b>				<b>LMA amb alteracions relacionades amb mielodisplàsia</b>
LMA amb t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>				t(11;16)(q23.3;p13.3)
LMA amb inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>				t(3;21)(q26.2;q22.1)
Leucèmia	promielocítica	aguda	amb	t(1;3)(p36.3;q21.2)
t(15;17)(q24.1;q21.1); <i>PML/RARA</i>				
LMA amb t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>				t(2;11)(p21;q23.3)
LMA amb t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>				t(5;12)(q32;p13.2)
LMA amb inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>				t(5;7)(q32;q11.2)
LMA (megacarioblàstica) amb t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>				t(5;17)(q32;p13.2)
Entitat provisional: LMA amb t(9;22)(q34;q11); <i>BCR-ABL1</i>				t(5;10)(q32;q21.2)
				t(3;5)(q25.3;q35.1)

En la Figura 3 es poden observar les freqüències dels subtipus d’alteracions genètiques en LMA en pacients adults.

Els factors pronòstic de LMA poden subdividir-se en els que estan relacionats amb el pacient i els que ho estan amb la malaltia. Els factors relacionats amb el pacient, com l’increment de l’edat, condicions coexistents i malestar general, sovint estan relacionats amb un mal pronòstic degut a una complicació del tractament; mentre que



els factors relacionats amb la malaltia, com per exemple, recompte alt de glòbuls blancs, SMD prèvia, teràpia citotòxica per un altre trastorn o determinades alteracions genètiques en cèl·lules leucèmiques, podrien associar-se amb resistència a la teràpia estàndard actual (revisat per Döhner et al. 2017). Actualment, l'avaluació d'alteracions citogenètiques i moleculars s'utilitza com a marcador pronòstic i predictiu (revisat per Döhner et al. 2015). A part de les alteracions citogenètiques, hi ha tres marcadors moleculars (mutacions en *NPM1* i *CEBPA*, *CCAAT/enhancer-binding protein alpha*, i duplicacions internes en tàndem, ITD, de *FLT3*) que són utilitzats en la pràctica clínica, com queda reflectit a les recomanacions de la European LeukemiaNet (*ELN*) (Taula 5) (revisat per Döhner et al. 2017).

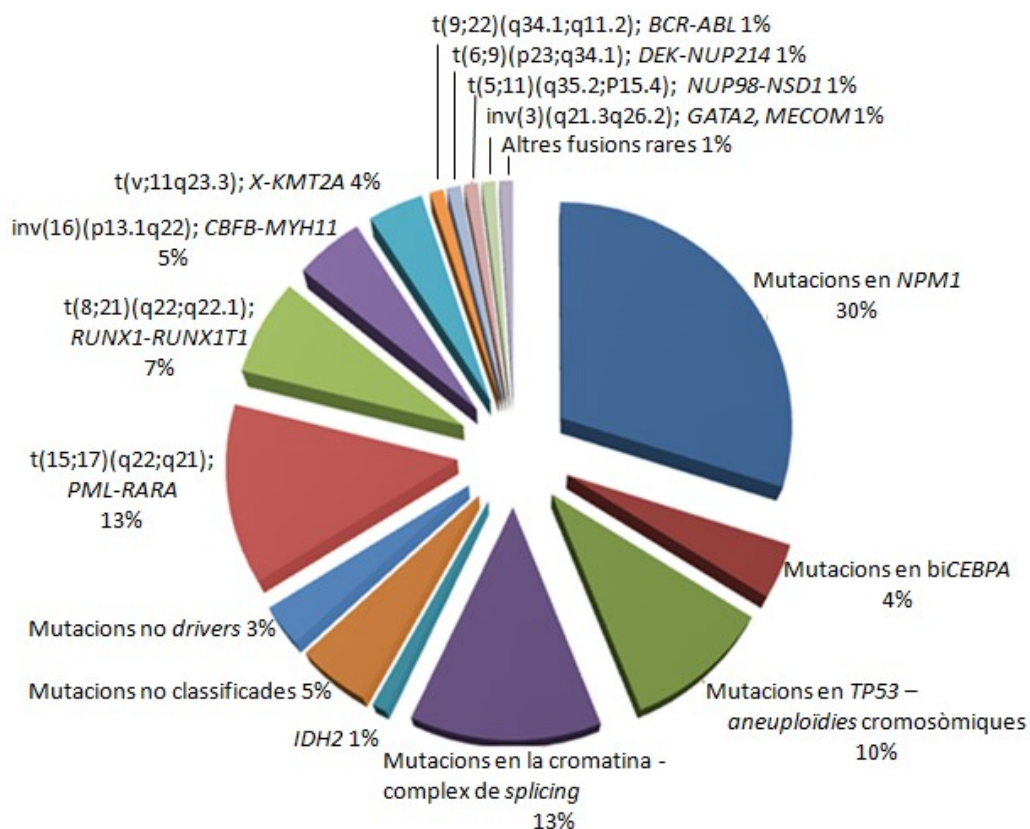


Figura 3. Freqüència dels subtipus d'alteracions genètiques en LMA en pacients adults. Modificada de Döhner et al. (2017).

Taula 5. Estratificació actual dels pacients amb LMA segons les alteracions genètiques d'acord amb les recomanacions de la *ELN*. Modificada de Döhner et al. (2017).

Perfil de risc	Alteracions genètiques
<b>Favorable</b>	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutacions en el gen <i>NPM1</i> sense <i>FLT3-ITD</i> (cariotip normal) Mutacions bial·lèliques de <i>CEBPA</i> (cariotip normal)
<b>Intermedi</b>	Mutacions en els gens <i>NPM1</i> i <i>FLT3-ITD</i> (cariotip normal) Gen <i>NPM1 wild-type</i> sense <i>FLT3-ITD</i> (cariotip normal) t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i> Alteracions citogenètiques no classificades com a risc favorable o desfavorable
<b>Desfavorable</b>	inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2-MECOM(EVI1)</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); reordenament de <i>KMT2A</i> t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> -5 o del(5q); -7; -17/alteracions a 17p cariotip complex* <i>NPM1</i> i <i>FLT3-ITD wild type</i> Mutacions en <i>RUNX1</i> Mutacions en <i>ASXL</i> Mutacions en <i>TP53</i>

\*Cariotip complex es defineix com tres o més alteracions cromosòmiques en absència d'alguna de les següents reorganitzacions: t(8;21), inv(16), o t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) o t(3;3); t(9;22).

### 1.1.3 Neoplàsies mieloides relacionades amb la teràpia

Un subtipus de LMA són les LMA relacionades amb teràpia (t-LMA) que juntament amb les SMD relacionades amb teràpia, es classifiquen en neoplàsies mieloides relacionades amb teràpia (t-NM). Així, les t-MN es defineixen com neoplàsies hematològiques de tipus mioide que ocorren com una complicació tardana després d'utilitzar quimioteràpia i/o radioteràpia per tractar ja sigui tumors sòlids com càncer d'ovari, càncer de mama, càncer testicular o sarcoma, com per tractar altres neoplàsies hematològiques (revisat per Zahid et al. 2016). Les t-NM constitueixen les neoplàsies secundàries al tractament més freqüents; la seva incidència ha augmentat considerablement en els últims anys, degut a que també ha augmentat el nombre de pacients que reben agents citotòxics i la supervivència al càncer a llarg termini (Morton et al. 2013). S'estima que fins a un 20% dels pacients tractats d'un càncer primari

desenvolupen t-MN (Morton et al. 2014) amb períodes de latència entre el diagnòstic de la primera malaltia i l'aparició de la t-MN que van entre varis mesos fins a varis anys (Godley & Larson 2008). Desafortunadament, els pacients amb t-MN mostren freqüentment resistència al tractament convencional i normalment tenen una pitjor resposta en comparació amb les NM *de novo* (Kayser et al. 2011).

### 1.1.3.1 Agents antitumorals que poden donar lloc a t-NM

Els principals agents citotòxics terapèutics que poden provocar t-NM són els agents alquilants i els inhibidors de la topoisomerasa II (Leone et al. 2010). Les t-NM provinents de tractaments amb agents alquilants són les més comunes, amb un 75-90% dels casos i tenen un temps de latència generalment entre 5 i 10 anys; solen venir precedides per SMD i estan associades amb delecions dels cromosomes 5 i/o 7, cariotip complex i mutacions en el gen *TP53* (Shih et al. 2013; Cleven et al. 2015). Les t-NM desenvolupades després del tractament amb radiació ionitzant no tenen un patró únic, però es poden integrar amb les t-NM després d'agents alquilants. Les t-NM provinents de tractaments amb inhibidors de topoisomerasa II són menys comuns i mostren un temps de latència més curt, entre 1 i 5 anys; no acostumen a estar precedides per SMD i es caracteritzen per presentar translocacions equilibrades que impliquen majoritàriament als gens *MLL* (o *KMT2A*) (11q23), o també *RUNX1* (21q22) i *PML/RARA* (*promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor alpha*) t(15;17) (Schoch et al. 2004; Pedersen-Bjergaard et al. 2008; Godley & Larson 2008). Tot i això, actualment el tractament antitumoral es basa en la combinació de diferents teràpies, el que fa que en les t-NM sigui molt difícil distingir aquests dos grups.

#### 1.1.3.1.1 Agents alquilants

Els agents alquilants s'utilitzen àmpliament per tractar varis tipus de càncer i es poden dividir en monofuncionals (com la temozolomida), o bifuncionals (com els alquilsulfonats, p. ex. busulfan). Tant els agents alquilants monofuncionals com els bifuncionals son mutagènics i genotòxics, encara que el tipus de dany i les vies de reparació de les lesions en el DNA són diferents.

Els agents alquilants bifuncionals poden produir monoadductes i diadductes intra o intercadenaes de DNA, generant *crosslinks*. La citotoxicitat d'aquests fàrmacs està

relacionada amb la quantitat de diadductes, ja que aquests poden aturar la replicació del DNA, donant com a resultat trencaments de doble cadena (*double strand breaks*, DSBs). A més, hi ha una correspondència directa entre la ràtio diadducte/monoadducte i la leucemogènesi (revisat per Guillem & Tormo 2008; Casorelli et al. 2012; Zahid et al. 2016).

#### 1.1.3.1.2 Inhibidors de la topoisomerasa II

De forma similar als agents alquilants, els inhibidors de la topoisomerasa II s'utilitzen en el tractament d'una ampla varietat de càncers i inclouen els agents intercalants (p. ex. les antraciclina, com la doxorubicina) i les epipodofilotoxines. Aquest fàrmac estableixen la unió del complex DNA-topoisomerasa de manera transitòria i inhibeixen l'activitat lligasa de la topoisomerasa II, deixant DSBs de forma permanent en el DNA. Per tant, bloquegen eficaçment la replicació del DNA, i també la transcripció. A més a més, s'ha observat tant la presència d'adductes covalents amb el DNA com la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) després del tractament amb antraciclina (revisat per Guillem & Tormo 2008; Nitiss 2009; Casorelli et al. 2012).

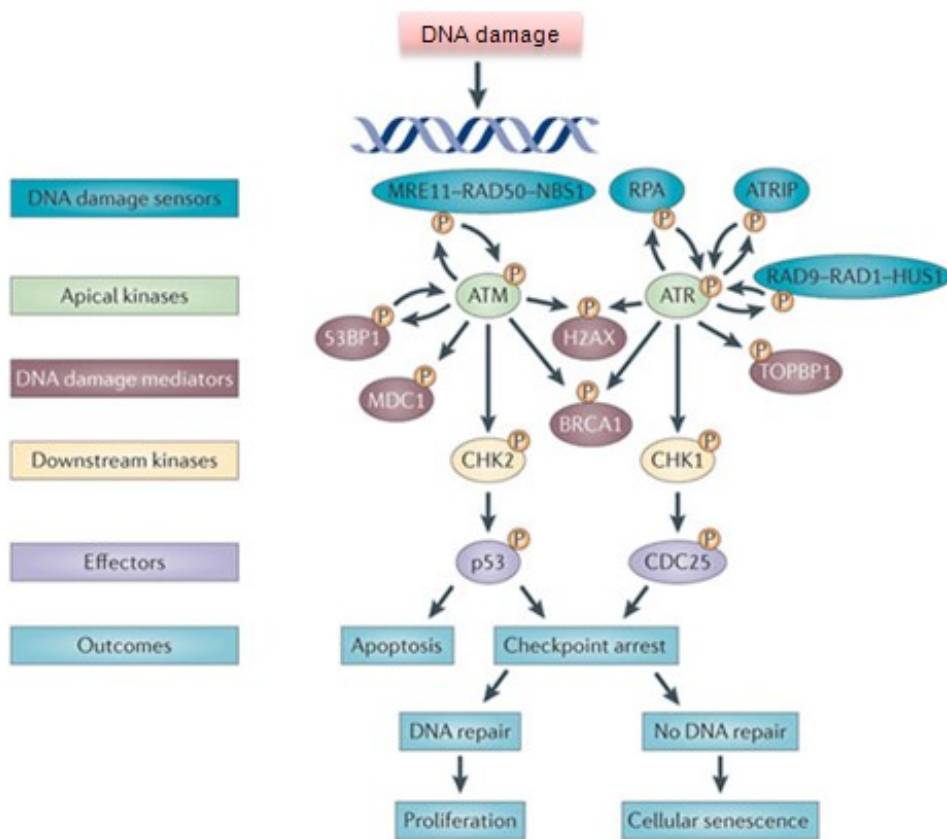
#### 1.1.3.2 Mecanismes de desenvolupament de *t-NM*

Molts dels agents citotòxics utilitzats per tractar el càncer (quimioteràpia i/o radioteràpia) provoquen mutacions en el DNA, de manera que quan la cèl·lula tumoral rep un nivell elevat de dany s'indueix apoptosi. Aquests agents citotòxics, però, afecten també a totes les cèl·lules que s'estan dividint activament en l'organisme, com per exemple, les cèl·lules de la MO on es duu a terme la hematopoesi. De totes les formes del dany al DNA que poden causar aquests fàrmacs, els DSBs són els que tenen l'efecte biològic més important. Aquest fet explicaria el desenvolupament de les leucèmies secundàries al tractament.

##### 1.1.3.2.1 Generació de DSBs i activació de la resposta al dany de DNA

Quan es produeixen DSBs s'activa la resposta al dany de DNA (*DNA damage response*, DDR) (Figura 4). Primerament es recluten proteïnes de la família PARP [*poly(ADP-ribose)polymerase*], que promouen la modificació de la cromatina per reclutar altres factors en el lloc del DSB. A continuació, el complex MRN (MRE11-RAD50-NBS1) s'uneix al lloc del DSB i recluta les cinases ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*), ATR

(*Ataxia telangiectasia* i *rad3 related*) i les DNA-PKcs (*DNA-dependent kinase catalytic subunit*). ATM s'autofosforila i produeix la fosforilació de centenars de proteïnes, entre elles la histona H2AX en el residu 139, generant  $\gamma$ -H2AX (Rogakou et al. 1998). ATR i DNA-PKcs també poden realitzar aquesta fosforilació. La fosforilació d'H2AX facilita la unió de MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint 1*), que promou l'amplificació del senyal amb el reclutament de més MRN i ATM i a la vegada, crea dominis de  $\gamma$ -H2AX que s'estenen centenars de quilobases al llarg de la cromatina en els extrems propers al DSB (Figura 5) (Bonner et al. 2008). L'ensamblatge d'aquestes proteïnes culmina amb el reclutament de les proteïnes 53BP1 (*Tumor protein p53 binding protein 1*) i BRCA1 (*Breast cancer 1*) en el lloc del DSB. L'acumulació o modificació de  $\gamma$ -H2AX i/o altres proteïnes en els extrems del DSB donen lloc a la formació d'uns *foci*, que es consideren marcadors de la presència de DSBs (Ciccio & Elledge 2010; Goodarzi & Jeggo 2012; Sulli et al. 2012; Price & D'Andrea 2013). S'ha observat que el nombre de *foci* de  $\gamma$ -H2AX es correlaciona amb el nombre de DSBs (Rothkamm i Löbrich, 2003). La histona  $\gamma$ -H2AX i altres proteïnes de la DDR poden ser detectades amb tècniques d'immunofluorescència, tant de microscòpia com de citometria de flux. Per a un recompte ràpid i consistent d'aquests *foci*, s'han desenvolupat algorismes computacionals d'anàlisi d'imatges (Cai et al. 2009; Vandersickel et al. 2010; Ivashkevich et al. 2011; Rasche et al. 2016).



Nature Reviews | Cancer

Figura 4. Esquema de la resposta al dany al DNA (DDR). La via de la DDR activa dos complexos proteics de detecció (senyors del dany al DNA) i senyalització (transmissors i mediadors): el complex MRE11–RAD50–NBS1 (MRN) que detecta els trencaments de doble cadena (DSBs); i la proteïna de replicació A i el complex RAD9-RAD1-HUS1 que detecten les regions exposades de DNA de cadena simple. Aquests complexos activaran i reclutaran proteïnes (efectors) que per un costat aturaran la progressió del cicle cel·lular i per l'altre activaran la maquinària de reparació del DNA. Si aquest dany és reparat, la cèl·lula podrà continuar proliferant, però si aquest dany és persistent es pot induir la senescència cel·lular, i si no es pot reparar, es poden iniciar processos de mort cel·lular per apoptosi. Modificada de Sulli et al. (2012).

#### 1.1.3.2.2 Reparació dels DSBs i desenvolupament de t-NM

Quan hi ha danys al DNA hi ha un alentiment i/o aturada del cicle cel·lular, que permet que actuïn els mecanismes de reparació. En els mamífers hi ha dues vies claus en la reparació dels DSBs; la via de reparació per recombinació homòloga (*homologous recombination*, HR) i la via de reparació no homòloga (*non-homologous end joining*, NHEJ) (Figura 6) (Hall & Giaccia 2006; Dueva & Iliakis 2013).

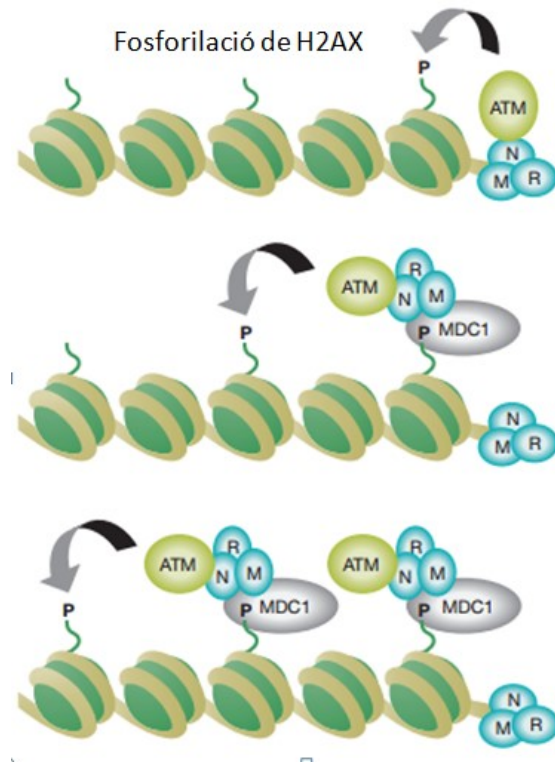


Figura 5. Fosforilació d'H2AX i amplificació del senyal mitjançant la fosforilació de les histones H2AX properes. Modificada de West & Van Attikum (2006).

### Via de reparació HR

La via de reparació HR utilitza la cromàtide intacta com a motlle per a la reparació i per això està restringida a les fases S i G2 del cycle cel·lular (Jasin & Rothstein 2013). La HR actua reconeixent els extrems del DSB, que es tallen amb el complex MRN i altres proteïnes accessòries, les quals tenen activitat 5'-3' exonucleassa i generen extrems 3' de cadena simple, on actuarà ràpidament una proteïna de replicació (RPA, *human replication protein A*) per protegir els segments de cadena simple de la degradació i evitar la formació d'estructures secundàries. Aquesta proteïna de replicació forma un filament de nucleoproteïna i juntament amb altres proteïnes busca una seqüència homòloga i catalitza la invasió de la cromàtide germana, formant un D-loop. A més, es produeix la unió Holliday, que és una estructura en forma de creu entre les dues cadenes a causa de la invasió de la cadena motlle i l'aparellament entre cromàtides. Una vegada format l'heterodúplex comença la síntesi de DNA des de l'extrem 3', i a mida que la síntesi de DNA nou va avançant, les unions Hollidays van lliscant sobre les

cadena en sentit 3'. Finalment es resolten les unions i les seqüències que envoltaven el DNA es restableixen (Figura 6) (Ciccia et al. 2003; Holliday 2007; Rass et al. 2010).

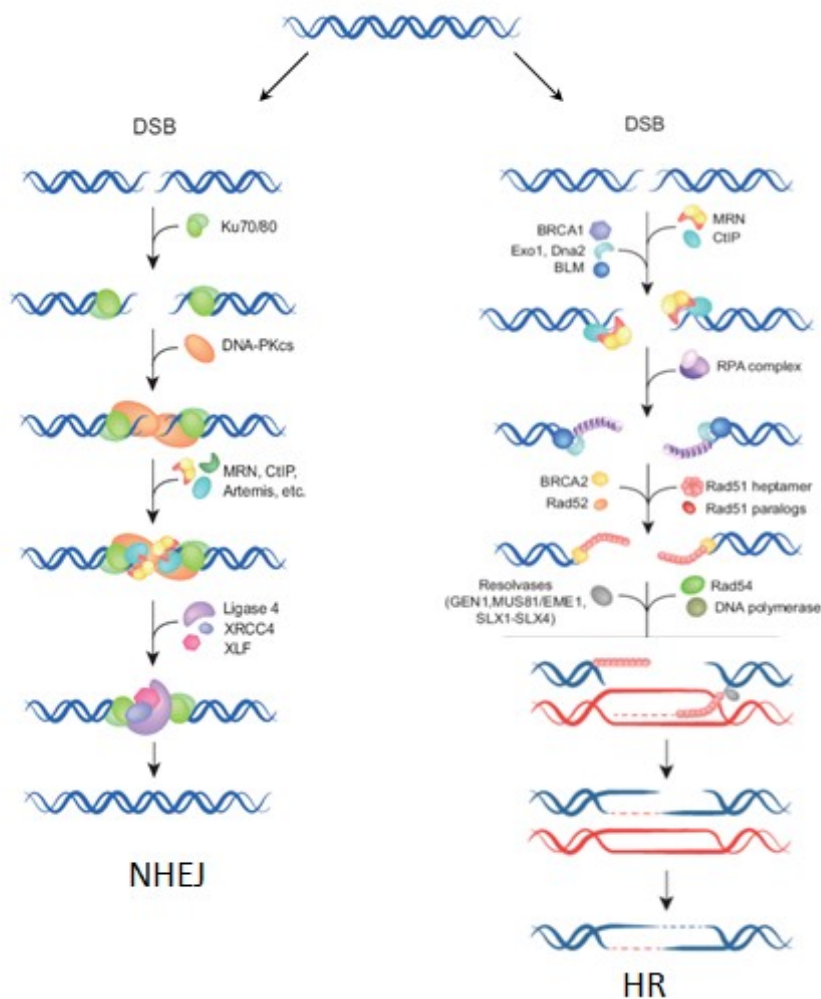


Figura 6. Esquema de les vies de reparació dels DSBs per NHEJ i HR. La NHEJ es basa en el reconeixement i processament dels extrems trencats del DNA per nucleases, seguit d'una síntesi i lligació d'aquests extrems. La HR necessita com a motlle la cromàtide germana per poder dur a terme la reparació, la HR actua reconeixent els extrems del DSB, que es tallen amb el complex MRN i altres proteïnes accessòries, generant extrems 3' de cadena simple que són protegits per diferents proteïnes com les RPA. Aquesta proteïna de replicació forma un filament de nucleoproteïna i juntament amb altres proteïnes busca una seqüència homòloga i catalitza la invasió de la cromàtide germana, formant un D-loop. Permetent així la síntesi del DNA des de l'extrem 3' i la posterior lligació. Modificada de (Dueva & Iliakis 2013).

### Via de reparació NHEJ

La via de reparació NHEJ es considera la via principal de reparació dels DSBs, en la que els extrems trencats es juxtaposen i es tornen a unir lligant el DNA, generalment amb la inserció o pèrdua d'un o més nuclèotids, pel que es poden produir mutacions en la seqüència del DNA original (Peterson & Côté 2004; Shrivastav et al. 2008). La NHEJ



actua 10-30 minuts després de que s'hagi produït el dany i està activa durant tot el cicle cel·lular (Rothkamm et al. 2003; Natarajan & Palitti 2008; Dueva & Iliakis 2013).

La NHEJ es divideix en tres fases. Primerament l'heterodímer ku70/80 detecta el trencament i s'uneix als dos extrems del DSB per reclutar altres proteïnes, com les DNA-PK que, juntament amb ku70/80, mantindran els extrems trencats del DNA propers i formaran un complex. En el segon pas, els extrems no lligables es processaran per convertir-se en extrems 3'-hidroxil i 5'-fosfat amb l'ajuda de múltiples enzims implicats, com algunes nucleases. Finalment, els extrems s'uneixen per la DNA lligasa IV que forma un complex amb les proteïnes XRCC4 (*X-ray repair cross complementing 4*) i XLF (*XRCC4-like factor*) (Figura 6) (Ahnesorg et al. 2006; Vignard et al. 2013; Wang & Lees-Miller 2013).

### **Desenvolupament de t-NM**

Quan els danys en el DNA d'una cèl·lula són abundants, s'incrementa la probabilitat de que alguns no siguin reparats o que siguin reparats erròniament. Les reparacions errònies de les lesions mutagèniques (principalment DSBs) produïdes pels agents alquilants i els inhibidors de la topoisomerasa II poden donar lloc a alteracions cromosòmiques i inestabilitat genòmica, les quals poden induir la transformació leucèmica de les cèl·lules hematopoètiques i en última instància poden donar lloc a t-NM. En el cas contrari, la manca de reparació dels DSBs en el DNA, si el dany en el DNA és irreversible, resulta en una resposta apoptòtica i la mort cel·lular (veure apartat 1.1.6).

### **1.1.4 Tractament de les leucèmies agudes**

Tant la LLA com la LMA, incloent les t-NM, es tracten amb quimioteràpia, que està dividida en tres fases en la LLA infantil (Badell Serra 2014) i en dues fases en la LMA (revisat per Döhner et al. 2017).

**Inducció:** l'objectiu de la quimioteràpia d'inducció és aconseguir la remissió, el que significa que no es trobin cèl·lules leucèmiques en les mostres de MO i que els recomptes sanguinis tornin a ser normals. En el cas de la LLA infantil, més d'un 95% dels nens amb LLA entren en remissió després del tractament d'inducció, el qual dura

un mes. En aquesta fase tots els nens necessiten quimioteràpia intratecal, és a dir, quimioteràpia en el líquid cefalorraquidi, per eliminar aquelles cèl·lules leucèmiques que s'hagin pogut propagar al SNC. En el cas de la LMA, la fase d'inducció té una durada de 10 dies (3 dies amb antraciclina i 7 amb citarabina) i la remissió completa s'assoleix en un 60-80% dels adults joves i en 40-60% dels adults d'edat avançada (Pautas et al., 2010). Els fàrmacs utilitzats en la fase d'inducció queden reflectits en la Taula 6 per LLA i en la Taula 7 per LMA.

**Consolidació** (o intensificació): l'objectiu d'aquesta fase és reduir el nombre de cèl·lules leucèmiques que encara queden en l'organisme. Es combinen diferents agents quimioteràpics (Taula 6 per LLA i Taula 7 per LMA) per ajudar a prevenir que les cèl·lules leucèmiques recurrents desenvolupin resistència. En aquesta fase també s'aplica la teràpia intratecal. En alguns nens amb LLA és possible que s'administri una segona ronda de quimioteràpia intensa amb els mateixos fàrmacs. Els nens amb LLA amb el cromosoma Philadelphia, t(9;22), es poden beneficiar d'una teràpia dirigida contínua com el Imatinib (Gleevec) fins el final del tractament o fins rebre un trasplantament de cèl·lules mare hematopoètiques en els casos que estigui indicat (Badell Serra 2014). En LMA les estratègies post-remissió inclouen quimioteràpia intensiva i teràpia d'altas dosis seguides majoritàriament per un trasplantament de cèl·lules hematopoètiques autòleg o al·logènica (Döhner et al. 2017). La valoració de la malaltia residual per tècniques moleculars o per citometria de flux és crítica en el monitoratge dels pacients en remissió morfològica per saber si cal una teràpia addicional.

**Manteniment:** Si la LLA continua en remissió després de la inducció i la consolidació es pot començar la teràpia de manteniment (Taula 6). Alguns nens amb un risc elevat reben una quimioteràpia de manteniment més intensa i teràpia intratecal. Actualment, la quimioteràpia de manteniment no forma part del tractament de la LMA.

A continuació es descriu el mecanisme d'acció dels fàrmacs utilitzats en LLA infantil o LMA. La prednisona i la dexametasona són glucocorticoides que s'utilitzen per disminuir la inflamació i per induir l'apoptosi; la vincristina i la vindesina són alcaloides que inhibeixen la polimerització de microtúbuls; la daunorubicina i la idarubicina són

antraciclins que, juntament amb l'etopòsid i la mitoxantrona, són inhibidors de la topoisomerasa II; la L-asparaginasa disminueix el creixement de tumors que utilitzen asparagina; la ciclofosfamida i la ifosfamida són agents alquilants; la citarabina és un antagonista de la pirimidina; el metotrexat és un antagonista de l'àcid fòlic; i la 6-mercaptopurina i la 6-tioguanina són antagonistes de les purines. Aquest antagonistes formen part dels fàrmacs antimetabòlits que fan que les cèl·lules perdin la capacitat de dividir-se atacant fases específiques del cicle cel·lular. Finalment la leucovorina és una forma reduïda de l'àcid fòlic que s'utilitza en combinació amb altres fàrmacs quimioteràpics per augmentar l'eficàcia del tractament o com a quimioprotector.

Taula 6. Fàrmacs utilitzats per tractar LLA infantil en les diferents fases de la quimioteràpia depenent del grup de risc. Informació extreta de Badell Serra (2014).

Grup de risc	INDUCCIÓ	CONSOLIDACIÓ	MANTENIMENT
Pronòstic bo o intermedi	Prednisona Vincristina Daunorubicina L-Asparaginasa 6-mercaptopurina Ciclofosfamida Citarabina Dexametasona Doxorubicina 6-tioguanina	Metotrexat 6-mercaptopurina Leucovorin	Metotrexat 6-mercaptopurina L-asparaginasa
Mal pronòstic	Prednisona Vincristina Daunorubicina L-Asparaginasa 6-mercaptopurina Ciclofosfamida Citarabina Dexametasona Doxorubicina 6-tioguanina	Dexametasona Vincristina Metotrexat Ciclofosfamida Citarabina L-asparaginasa Vindesina Ifosfamida Daunorubicina Etopòsid	6-mercaptopurina Metotrexat

L'eficàcia del tractament s'avalua mitjançant la resposta primerenca, la malaltia mínima residual al final de la inducció, la recaiguda i la supervivència. La resposta primerenca es basa en el percentatge de blasts leucèmics en la MO en el dia 14 (<5% correspon a una bona resposta). La malaltia mínima residual es determina en la MO al

final de la fase d'inducció per citometria de flux i és positiva quan es detecten 0.01% o més de cèl·lules leucèmiques. En relació a la supervivència, la supervivència global és el temps des del diagnòstic fins a la mort per qualsevol etiologia o fins l'últim control realitzat. La supervivència lliure d'esdeveniment és el temps des del diagnòstic fins a la presentació d'un esdeveniment, ja sigui la mort per qualsevol etiologia, la recaiguda o la presentació d'una segona neoplàsia, o fins l'últim control realitzat.

Taula 7. Fàrmacs utilitzats per tractar LMA en les diferents fases de la quimioteràpia depenent del grup de risc. Modificada de Döhner et al. (2017).

Grup de risc	INDUCCIÓ	CONSOLIDACIÓ
Pronòstic bo	Antraciclina (daunorubicina i idarubicina) Mitoxantrona Citarabina	IDAC ( <i>intermediate-dose cytarabine</i> )
Pronòstic intermedi		En pacients joves: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Trasplantament al·logènic de cèl·lules hematopoètiques</li> <li>- IDAC</li> <li>- Teràpia d'altres dosis i trasplantament autòleg de cèl·lules hematopoètiques</li> </ul> En pacients grans (més de 60 anys) no s'ha establert un valor de teràpia de consolidació intensiva, es pot considerar un trasplantament de cèl·lules hematopoètiques al·logènica o teràpia en investigació.
Mal pronòstic		En pacients joves, trasplantament al·logènic de cèl·lules hematopoètiques. En pacients grans (més de 60 anys) no s'ha establert un valor de teràpia de consolidació intensiva, es pot considerar un trasplantament de cèl·lules hematopoètiques al·logènica o teràpia en investigació.

En el cas que el pacient amb LLA infantil recaigui es pot tractar amb quimioteràpia de nou. Si la recaiguda és després d'un temps prolongat es podrien utilitzar els mateixos fàrmacs, ja que encara poden ser eficaços. Si el període és curt pot ser que necessiti una quimioteràpia més agressiva i teràpia intratecal. En el cas que recaigui durant els primers 6 mesos a partir de l'inici del tractament o que mostri recurrència després d'una segona ronda de quimioteràpia es pot considerar un trasplantament de cèl·lules mare. Alguns nens mostren recaiguda extramedul·lar, el que significa que les cèl·lules leucèmiques es troben en una part de l'organisme diferent de la MO (líquid cefalorraquidi o testicles). Aquests casos poden rebre quimioteràpia intratecal intensa, radiació al SNC, o radiació a la zona testicular.

Si la LLA recau després d'un trasplantament de cèl·lules mare o no desapareix per complet pot ser molt difícil de tractar. En aquests casos, les noves estratègies d'immunoteràpia poden ser útils. També poden ser utilitzades en aquells casos de LMA que són resistents al tractament convencional. La immunoteràpia és la teràpia que utilitza el propi sistema immune del pacient per lluitar contra el càncer. Hi ha assajos clínics recents que han demostrat que els anticossos monoclonals, alguns dels quals van conjugats a toxines (immunotoxines), poden funcionar en el tractament d'una varietat de càncer (Capitini et al. 2014). Actualment s'estan fent les primeres proves clíniques amb una varietat d'anticossos terapèutics dirigits contra dianes antigèniques de LMA (com CD33, CD123, CLEC12A "*C-type lectin domain family 12 member A*") i de LLA infantil, entre altres (Capitini et al. 2014; Lichtenegger et al. 2015).

### **1.1.5 Metabolisme de fàrmacs quimioteràpics**

La majoria dels fàrmacs que entren en l'organisme, incloent els quimioteràpics, són transformats parcial o totalment en altres substàncies, ja sigui per activar-los o per destoxificar-los. Els enzims encarregats de realitzar aquestes transformacions es troben fonamentalment en el fetge, tot i que també es troben en menor proporció en altres òrgans, com ronyó, pulmó, intestí, glàndules suprarenals i altres teixits, així com en la pròpia llum de l'intestí (mitjançant acció bacteriana) (Del Arco & Flores 2014). Existeix, però, una minoria de fàrmacs que no són transformats i són excretats sense modificar. Els fàrmacs són transformats per sistemes enzimàtics ja existents en l'organisme que també metabolitzen compostos endògens. Les reaccions involucrades en aquest procés de metabolisme són múltiples i diverses i en general tenen lloc en dues fases prèvies a l'excreció (Figura 7). Les reaccions de fase I consisteixen en reaccions d'oxidació i reducció, que alteren grups funcionals o en creen de nous, així com en reaccions d'hidròlisi que trenquen enllaços èsters i amida alliberant també nous grups funcionals. Aquests canvis en general produeixen un augment en la polaritat de la molècula i donen lloc a algun d'aquests resultats: inactivació; conversió d'un producte inactiu en un altre actiu, en aquest cas el producte inactiu s'anomena profàrmac; conversió d'un producte actiu en un altre també actiu en que la seva activitat aprofitable amb fins terapèutics pot ser qualitativament similar o diferent a la del fàrmac original; o conversió d'un producte actiu en un altre actiu, però amb

toxicitat. El fàrmac actiu és el que va a la cèl·lula diana i fa la seva funció tòxica, p.ex. provocant dany al DNA de la cèl·lula. El grup d'enzims més comú i important en la fase I del metabolisme dels fàrmacs és la superfamília d'enzims del citocrom P450 (CYP450). Aquests enzims actuen com a catalitzadors per l'oxidació de molts fàrmacs. Alguns dels enzims més importants d'aquesta família són: *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP3B6*, *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP2E1* i *CYP3A4* (*cytochrome P450 family x subfamily X member x*) (Luch 2010). Les reaccions de fase II són les de conjugació, en les quals el fàrmac o el metabòlit procedents de la fase I s'acoblen a un substrat endogen, augmentant així la mida de la molècula, de manera que quasi sempre s'inactiva el fàrmac i es facilita la seva excreció. En algunes ocasions la conjugació pot activar el fàrmac, p. ex., amb la formació de nucleòsids i nucleòtids. De les reaccions de conjugació, en resulten àcids i bases orgànics forts, productes polars i hidrosolubles, i per tant fàcilment expulsables per l'orina i per la bilis. Aquestes reaccions de conjugació són degudes a enzims denominats transferases. Dins les reaccions de fase II es troba la glucuronidació, l'acetilació, la conjugació amb glutatió, la conjugació amb radicals sulfat, la metilació i la conjugació amb ribòsids i ribòsid-fosfats, entre altres.

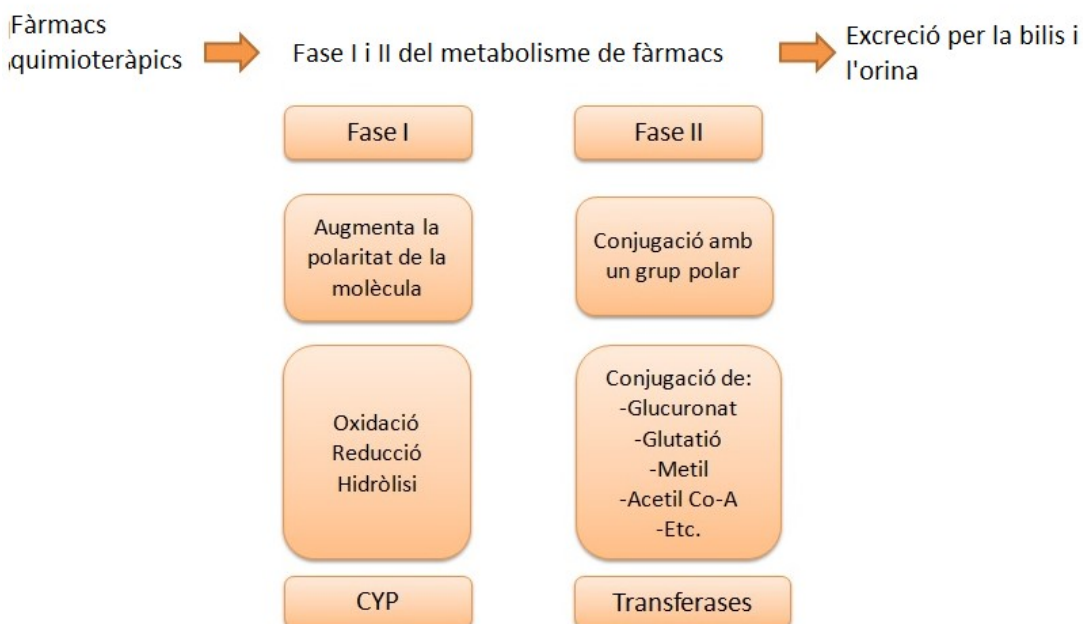


Figura 7. Resum del metabolisme de fàrmacs quimioteràpics.

En el cas de la conjugació amb glutatió, la reacció es du a terme per les glutatió S-transferases (GST). Les GSTs són vitals en la fase II en la via d'enzims de desintoxicació, i proporcionen una protecció contra les toxines catalitzant la conjugació del glutatió o

passivament amb la unió a diverses molècules tòxiques endògenes/exògenes, incloent les toxines ambientals, carcinògens, agents quimioteràpics, o productes de l'estrès oxidatiu. Les GST es divideixen en tres subfamílies diferents: les GST microsomals, les GST mitocondrials i les GST citosòliques, que són altament polimòrfiques (Oakley 2011; Hollman et al. 2016). S'han identificat 8 classes de gens *GST*, incloent *alpha* (*GSTA*), *mu* (*GSTM*), *theta* (*GSTT*), *pi* (*GSTP*), *zeta* (*GSTZ*), *sigma* (*GSTS*), *omega* (*GSTO*) i *kappa* (*GSTK*) (revisat per Hollman et al. 2016).

En el tractament de les leucèmies també s'aplica el metotrexat (MTX) i les tiopurines, que són quimioteràpics que tenen el seu metabolisme específic, que també dóna lloc a productes que provoquen la inhibició de la síntesi de DNA i trencaments de cadena del DNA (Figura 8). El MTX inhibeix el metabolisme del folat mitjançant el seu mecanisme d'acció, que resulta en una reducció de la replicació del DNA (Cunningham & Aplenc 2007). Les tiopurines són pro-fàrmacs que requereixen la conversió intracel·lular a metabòlits actius per executar la seva citotoxicitat (Tidd & Paterson 1974). La tioguanina i la mercaptopurina es poden convertir en anàlegs de nucleòtids TGNs (*thioguanine nucleotide*) mitjançant la HPRT (*hypoxanthine phosphoribosyl transferase*). Aquests nucleòtids s'incorporen al DNA i RNA i condueixen a la mort cel·lular. Les tiopurines es poden convertir a metabòlits inactius mitjançant la TPMT (*thiopurine S-methyltransferase*) (Hosni-Ahmed et al. 2011).

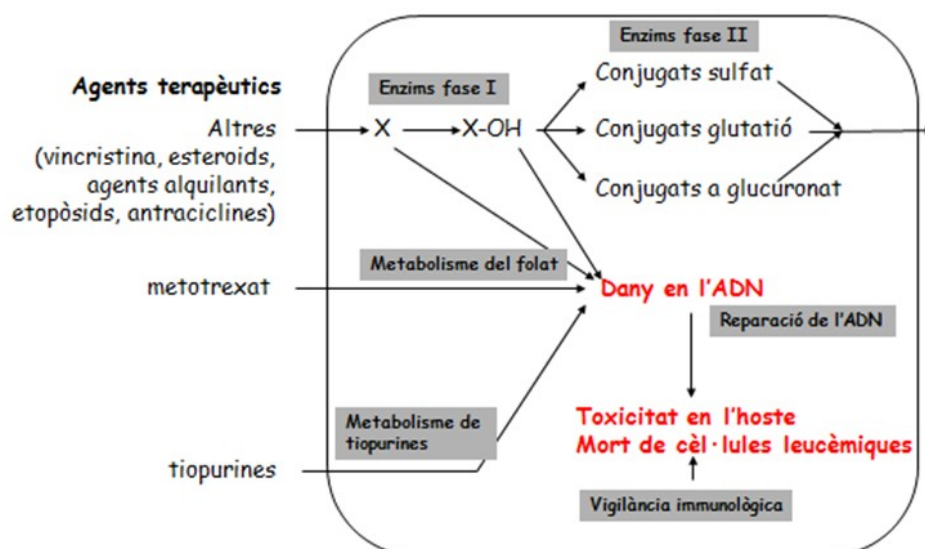


Figura 8: Exemple del metabolisme de fàrmacs i factors que afecten l'eficàcia del tractament en LLA. Modificada de Cunningham & Aplenc (2007).

### 1.1.6 Mecanismes de l'apoptosi

Sigui quin sigui l'agent terapèutic antitumoral utilitzat, l'objectiu és reduir el nombre de cèl·lules tumorals a través d'induir la seva mort majoritàriament per apoptosi. L'apoptosi és un mecanisme de mort cel·lular programada i és essencial per al desenvolupament embrionari i el manteniment de l'homeòstasi en organismes pluricel·lulars. Les vies de senyalització apoptòtiques activen les proteases caspases i causen la disfunció mitocondrial, de manera que les cèl·lules apoptòtiques presenten canvis en les seves característiques morfològiques, incloent l'arrodoniment cel·lular i finalment la fragmentació cel·lular. L'apoptosi s'activa per dues vies de senyalització diferents, tot i que estan interconnectades: la via extrínseca (activada per senyals extracel·lulars, normalment generats per cèl·lules citotòxiques del sistema immune) i la via intrínseca (activada per senyals intracel·lulars, com el dany en el DNA) (Figura 9). La via extrínseca es desencadena majoritàriament per la unió de Fas, un receptor de mort cel·lular situat a la membrana plasmàtica, amb el seu lligand extracel·lular, Fas-L. El complex Fas/Fas-L recluta la FADD (*Fas-associated protein with death domain*) i la pro-caspasa-8, que formaran el complex DISC (*death-inducing signalling complex*). Com a conseqüència, aquest complex activa la pro-caspasa-8 que activa la pro-caspasa-3, que activarà la cascada de caspases efectores de l'apoptosi, acabant amb la fragmentació del DNA i la formació de cossos apoptòtics. Per altra banda, l'estrès cel·lular, com el dany en el DNA causat per les radiacions ionitzants o la quimioteràpia, activa la proteïna p53, que inicia la via intrínseca activant PUMA i NOXA, proteïnes pro-apoptòtiques que activen BAX i BAK mitjançant la inhibició de les proteïnes anti-apoptòtiques BCL-2, BCL-XL i MCL-1. BAX i BAK provoquen la permeabilització de la membrana mitocondrial externa donant lloc a l'alliberació del citocrom-C des de la mitocòndria fins al citoplasma, el qual s'uneix a l'adaptador Apaf-1 i a la pro-caspasa 9 per formar el complex apoptosoma. Aquest complex estimula la caspasa 9, que activarà la caspasa 3, que activarà la cascada de caspases efectores de l'apoptosi, acabant amb la fragmentació del DNA i la formació de cossos apoptòtics. El mitocondri també allibera una proteïna anomenada SMAC/DIABLO en el citosol que promou l'apoptosi indirectament, bloquejant els efectes d'un grup de proteïnes anti-



apoptòtiques anomenades inhibidors de proteïnes apoptòtiques (IAPs) (Ashkenazi 2008; Ouyang et al. 2012).

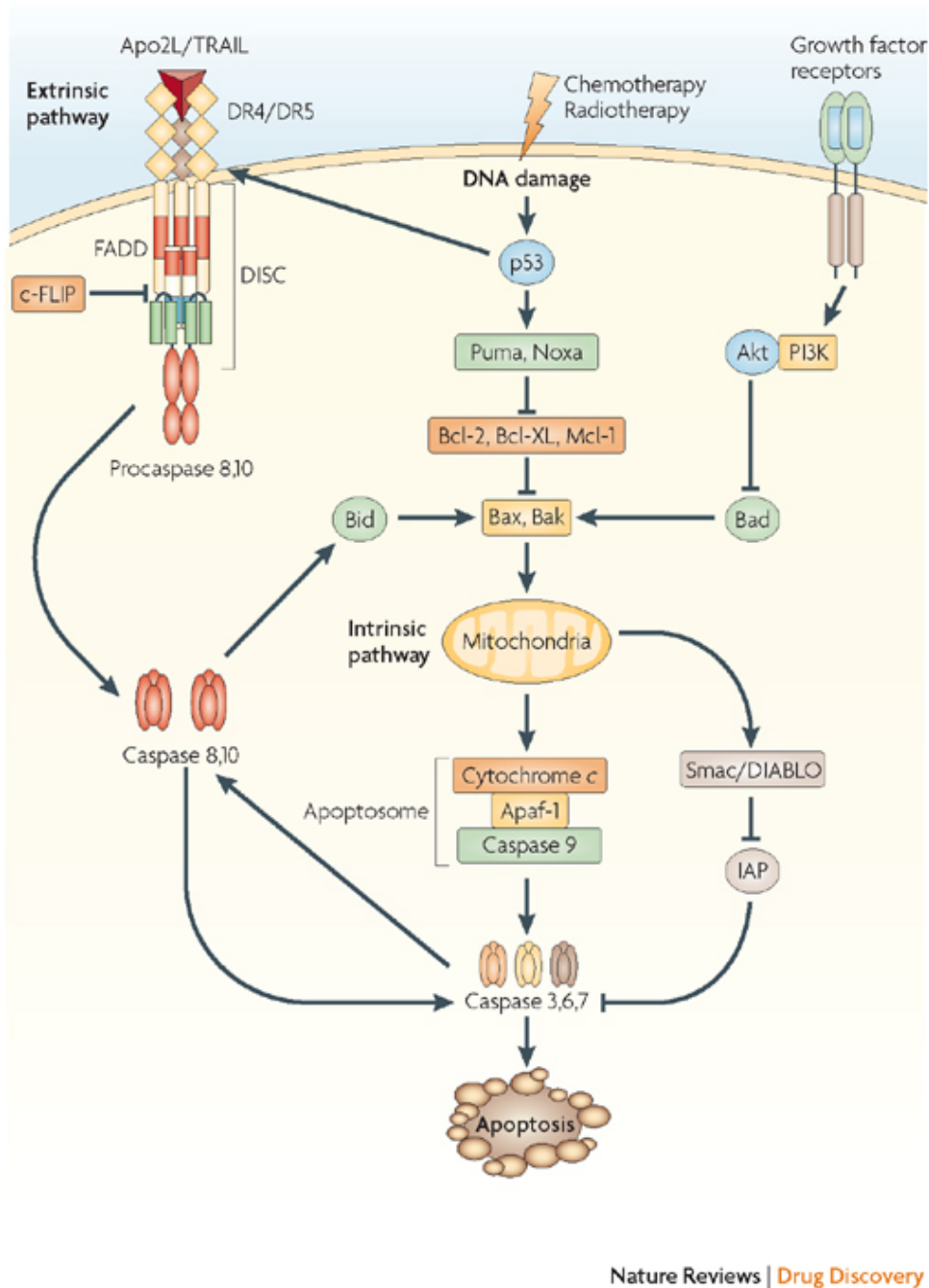


Figura 9. Etapes clau en les vies de senyalització apoptòtiques. Existeixen dues vies de senyalització diferents per desencadenar l'apoptosi, la via extrínseca i la via intrínseca. En la via extrínseca les cèl·lules immunològiques citotòxiques produeixen lligands pro-apoptòtics que s'uneixen als receptors pro-apoptòtics (Fas/Fas-L). Aquests recluten el FADD i les pro-caspases 8 i 10 formant el DISC, que activarà la cascada de les caspases efectores d'apoptosi. A la via intrínseca l'estrès cel·lular activa p53, que acaba activant les proteïnes BAX i BAK, les que permeabilitzen la membrana mitocondrial permetent l'alliberament del citocrom-C al citosol i la formació de l'apoptosoma, el qual activarà la cascada de caspases efectores d'apoptosi. Modificada de Ashkenazi (2008).

## 1.2 POLIMORFISMES GENÈTICS RELACIONATS AMB EL TRACTAMENT ANTINEOPLÀSTIC

La biotransformació dels fàrmacs antineoplàstics està sotmesa a una gran variació interindividual, fet que contribueix a que dosis iguals de fàrmac mostrin diferents nivells plasmàtics en diferents individus. Per exemple, els metabolitzadors ràpids eliminen el fàrmac molt ràpidament, de manera que no s'assoleix la concentració terapèutica del fàrmac en la sang i en els teixits. En altres pacients, el fàrmac és metabolitzat molt lentament i per tant s'acumula en el torrent sanguini. Concentracions elevades de fàrmac en l'organisme creen un major potencial d'efectes adversos.

Hi ha una sèrie de factors que modifiquen el metabolisme dels fàrmacs, com són:

2. Edat o sexe
3. Factors genètics, variants genètiques que modifiquen la quantitat d'enzim
4. Factors fisiològics, com l'embaràs
5. Factors ambientals, en funció de l'exposició a contaminants ambientals
6. Factors dietètics, en funció del tipus de dieta consumida i dels contaminants alimentaris
7. Estats patològics, com la insuficiència hepàtica
8. Interacció amb altres fàrmacs capaços de modificar el metabolisme

En relació als factors genètics, s'ha suggerit que algunes variants genètiques comunes amb baixa penetrància podrien explicar les diferències en com els individus responen als agents quimioteràpics, i com a conseqüència influir en l'evolució de la malaltia (Bolufer et al. 2006; Cunningham & Aplenc 2007; Lopez-Lopez et al. 2014; Moriyama et al. 2015). L'anàlisi d'aquestes variants genètiques o polimorfismes podria ajudar en un futur a optimitzar la teràpia, incrementant-ne la seguretat i l'eficiència. La identificació d'aquests marcadors genètics associats amb el tractament permetria la identificació d'individus amb una susceptibilitat genètica a respondre millor o pitjor a la teràpia, i alhora permetria incrementar els coneixements sobre les vies bioquímiques implicades en la resposta a la teràpia.

### 1.2.1 Tipus de polimorfismes genètics

Un locus polimòrfic és un locus amb dues o més variants (genotips alternatius) de les quals almenys dues tenen una freqüència superior a l'1%. Els polimorfismes es poden localitzar en regions intròniques, regions codificants (exons), regions reguladores i regions intergèniques. Entre els polimorfismes de DNA es troben els polimorfismes de substitució d'una base (*single nucleotide polymorphism*, SNPs), els polimorfismes d'inserció-deleció (simples o multial·lèlics), les variacions en el nombre de còpies (*copy number variants*, CNV) i les inversions. Els SNPs i els CNVs són els polimorfismes més estudiats per associació amb el risc de malaltia o la resposta al tractament.

Els SNPs (Figura 10A) són el tipus de variació genètica interindividual més comú entre les persones. Es troben una vegada cada 300 nucleòtids de mitjana, el que significa que hi ha aproximadament 10 milions de SNPs en el genoma humà. Els SNPs poden actuar com a marcadors biològics, ajudant a localitzar gens que estan associats amb la resposta d'un individu a certs fàrmacs, la susceptibilitat a factors ambientals, com ara toxines, i el risc a desenvolupar alguna malaltia particular (Gupta et al. 2017). Quan els SNPs es troben en els exons o en regions reguladores passen a tenir un paper més directe, afectant la funció del gen.

Les CNVs es defineixen com fragments de DNA d'almenys 1 Kb de grandària, que presenten diferències en el nombre de còpies quan es comparen diversos genomes. Aquestes variants quantitatives poden ser guanys del nombre de còpies (duplicacions) o pèrdues (deleccions) relatius a la seqüència d'un genoma designat com el de referència (Figura 10B). Fins ara s'han descrit algunes associacions entre determinats CNVs i el risc a patir una malaltia (revisat per Henrichsen et al. 2009; Pronold et al. 2012). La majoria d'aquestes associacions s'han trobat mitjançant l'anàlisi de determinats gens o regions candidates. Es creu que la contribució de les CNVs a la susceptibilitat a malalties i a la resposta a la teràpia pot ser més gran de l'esperada, fins i tot en major percentatge que els SNPs, encara que es necessiten més estudis per a conèixer les conseqüències fenotípiques de les mateixes (Komura et al. 2006; Conrad et al. 2010).

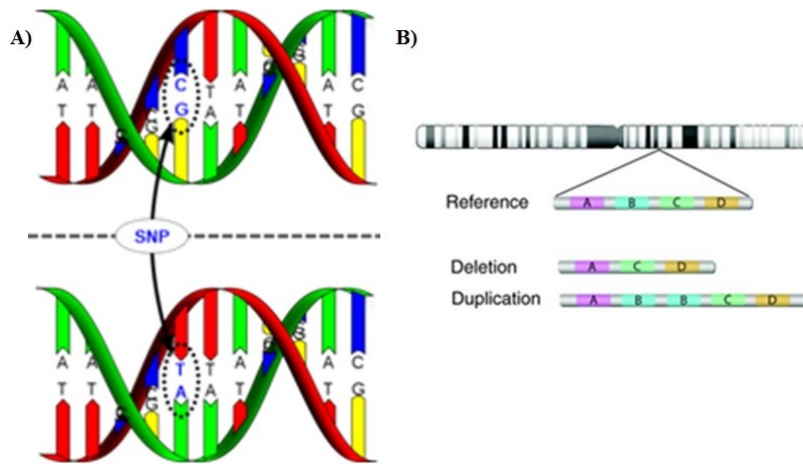


Figura 10. A. Esquema d'un SNP. Modificada de International Society of Genetic Genealogy Wiki ([https://isogg.org/wiki/Single-nucleotide\\_polymorphism](https://isogg.org/wiki/Single-nucleotide_polymorphism)). B. Esquema de CNVs. Modificada de Rahim et al. (2008).

### 1.2.2 Polimorfismes genètics relacionats amb la resposta al tractament per LLA infantil

S'han descrit bastants estudis de correlació entre polimorfismes genètics i l'evolució de pacients amb LLA infantil mitjançant l'aproximació per gens candidats. S'ha observat que l'evolució dels nens amb LLA podria estar associada amb polimorfismes en gens involucrats en: 1) fase I del metabolisme de fàrmacs (oxidació), com *CYP*; 2) fase II d'aquest metabolisme (conjugació/detoxificació), com *GST*, sulfotransferasa (*SULT*) i UDP glucuronil transferasa (*UGT*); 3) fase III del metabolisme, com són els transportadors de la família *ATP-binding cassette (ABC)*; 4) metabolisme de radicals lliures/estrès oxidatiu, com *quinone oxoreductase (NQO)*; 5) metabolisme de l'àcid fòlic, com *reduced folate carrier (RFC)*, *methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR)*, *dihydrofolate reductase (DHFR)*, i *thymidylate synthase (TS)*; 6) metabolisme de tiopurines, com *TPMT*; 7) reparació del DNA, com *MutL homolog 1 (MLH1)*, i *excision repair cross-complementation group 2 (ERCC2)*; 8) processos immunològics, com *chemokine receptor (CCR5)*, *interleukin (IL)-15*, i *GATA3*; i 9) altres proteïnes amb rols crítics en la resposta a agents antileucèmics, com *glycogen phosphorylase (PYGL)* i *phosphodiesterase 4B (PDE4B)* (revisat per Bolufer et al. 2006; Cunningham & Aplenc 2007; Treviño et al. 2009; Lopez-Lopez et al. 2014; Moriyama et al. 2015). No obstant, els resultats no han estat confirmats en altres sèries, excepte per *TPMT*, que es determina rutinàriament en certes institucions abans de l'administració de 6-mercaptapurina (Ansari & Krajcinovic 2007). Tot i les àmplies

anàlisis, encara no s'han trobat les variants al·lèliques responsables de les diferències en l'evolució dels pacients amb LLA.

La majoria dels estudis han analitzat només SNPs (a excepció de *GST* i *UGT*) i alguns dels SNPs estudiats causen un augment o disminució en l'expressió gènica, que podria tenir un efecte similar en la cèl·lula a tenir un augment o disminució en el nombre de còpies del gen (CNVs). De tots els gens amb aquest tipus de SNPs, n'hi ha dos que presenten variacions interindividuals de CNVs d'acord amb la Database of Genomic Variants (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>): *CYP2D6*, que pot presentar fins a 12 còpies (Söderbäck et al. 2005) i *SULT1A1*, fins a 5 còpies (Hebring et al. 2007). Fins ara, no hi ha estudis que hagin avaluat si les CNVs en aquests gens estan associats amb la resposta a LLA. A més a més, la majoria dels estudis han analitzat l'efecte de polimorfismes genètics en *GSTT1*, *GSTM1*, i *UGT2B17* en la resposta a LLA diferenciant entre genotip *null* i *non-null*, però sense considerar el possible efecte en el nombre exacte de còpies, que va de zero a tres còpies en la població Caucàsica (Nørskov et al. 2009; Gaedigk et al. 2012). Cal destacar que s'ha observat una relació entre el nombre de còpies i l'activitat enzimàtica, tant pels gens *CYP2D6* i *SULT1A1* com per *GSTT1*, *GSTM1* i *UGT2B17* (McLellan et al. 1997; Sprenger et al. 2000; Ingelman-Sundberg 2005; Hebring et al. 2007; Wang et al. 2012; Gaedigk et al. 2012), el que suggereix que l'anàlisi del nombre exacte de còpies d'aquests gens podrien ser útils en la predicció de la resposta a la teràpia. Addicionalment, se sap que les proteïnes codificades per aquests gens contribueixen al metabolisme i l'eliminació de molts fàrmacs utilitzats en el tractament de LLA infantil (Pharmacogenomics Knowledge Base, [www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org)).

Encara que *GSTM1* és conegut majoritàriament com un enzim de detoxificació, també ha estat descrit com un desregulador de les vies pro-apoptòtiques. Hosono et al. (2010) van observar que les línies cel·lulars de LLA que expressaven *GSTM1* mostraven una disminució de la sensibilitat cap a alguns fàrmacs quimioteràpics contra la leucèmia, mitjançant la inhibició de l'apoptosi en lloc de mitjançant la transferència de glutatió. *GSTM1* interactua directament amb *ASK (Apoptosis signal-regulating kinase)1* i *MEKK (MAPK kinase kinase)1*, i modula la regulació de les cascades de senyalització pro-apoptòtiques p38 i JNK (Cho et al. 2001; Dorion et al. 2002; Ryoo et al. 2004;

Mcllwain et al. 2006). ASK1/p38 activa p53 mitjançant la fosforilació en la serina 15 i 33 (Hosono et al. 2010; Kim et al. 2011). p53 és un factor de transcripció que modula l'expressió de gens inhibidors del creixement tumoral. Les seves funcions són: regular el cicle cel·lular, contribuir al manteniment de la integritat genètica, inhibir l'angiogènesi i promoure la senescència cel·lular i l'apoptosi, després de dany al DNA o altres fonts d'estrès (Levine 1997; Vogelstein & Kinzler 2004). El gen *TP53* és també polimòrfic. Hi ha un polimorfisme comú a *TP53* en el codó 72 que produeix un canvi d'arginina (Arg) per prolina (Pro) (Arg72Pro); la variant Arg té major potencial apoptòtic, mentre que la variant Pro és un inductor més potent de l'aturada del cicle cel·lular i la reparació del DNA (Figura 11) (Thomas et al. 1999; Pim & Banks 2004; Siddique & Sabapathy 2006). S'ha descrit que aquest polimorfisme està associat amb major risc a neoplàsia hematològica (Ørsted et al. 2007; Do et al. 2009; Tian et al. 2016) i no hematològica (Khan et al. 2015) i amb la resposta a quimioteràpia i amb la supervivència en varis tipus de tumors (Cescon et al. 2009; Toffoli et al. 2009; Liu et al. 2011; Rodrigues et al. 2013). Tot i això, l'impacte d'aquest polimorfisme sembla que depèn del tipus de càncer i del tractament específic.

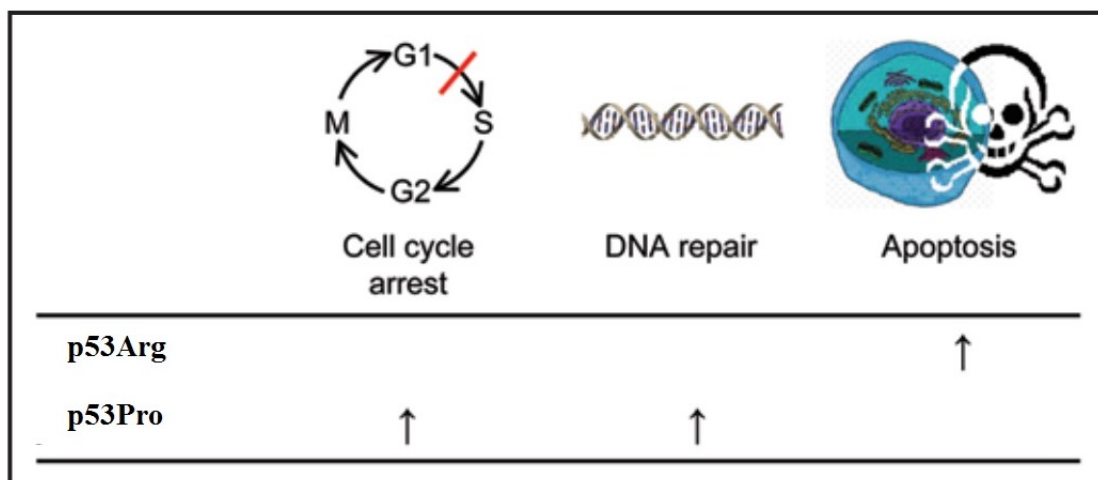


Figura 11. Diferències funcionals entre la variant Pro i la variant Arg de l'SNP Arg72Pro de *TP53*. Modificada de Bojesen & Nordestgaard (2008).

### 1.2.3 Polimorfismes genètics relacionats amb el desenvolupament de t-NM.

S'ha suggerit que els factors genètics poden contribuir al risc de desenvolupar t-NM després d'un tractament antitumoral. Per exemple, només un subgrup de tots els

pacients exposats a teràpia genotòxica desenvolupen t-NM. A més a més, els individus que desenvolupen t-NM tenen un elevat risc de desenvolupar una t-NM addicional (Armstrong et al. 2011). Per altra banda, hi ha evidències de grans variacions interindividuals en la capacitat de reparació del DNA, que poden ser a causa de diferències en la composició genètica (Nagel et al. 2014). És de suposar que una bona capacitat per reparar els DSBs i/o per fer apoptosi podria ser crucial per evitar la transformació maligna de les cèl·lules mare hematopoètiques i la leucemògenesi associada amb la utilització clínica de fàrmacs citotòxics. L'estudi de la predisposició a desenvolupar t-MN és molt important, ja que la identificació dels pacients propensos a desenvolupar-la permetria activar protocols de tractament dissenyats per minimitzar el risc.

La variació en gens involucrats en el metabolisme dels fàrmacs (p.ex. *NQO1*, *GST* i *CYP*), metilació del DNA (p.ex. *MTHFR*), reparació del DNA (p.ex. *MSH2*, *MLH1*, *XRCC* i *RAD51*), i apoptosi (p.ex. *TP53* i *MDM2*) pot ser clau a l'hora de desenvolupar una t-NM (revisat per Bhatia 2015). Concretament, s'ha observat una associació positiva entre el desenvolupament de t-NM i alguns polimorfismes en els gens *NQO1* (Larson et al. 1999; Naoe et al. 2000), *GSTP1* (Allan et al. 2001), *MSH2* (Worrillow et al. 2003), *MLH1* (Worrillow et al. 2008), *XRCC1* (Seedhouse et al. 2002), *CYP3A4* (Felix et al. 1998; Rund et al. 2005) i *RAD51* (Seedhouse et al. 2004). Per altra banda, altres estudis realitzats amb els mateixos gens no mostren associació entre la susceptibilitat a t-NM i polimorfismes en *NQO1*, *GSTP1*, *XRCC1*, *MSH2*, *RAD51*, *MLH1* ni *CYP3A4* (Naoe et al. 2000; Blanco et al. 2002; Seedhouse et al. 2002; Collado et al. 2005; Rund et al. 2005; Bolufer et al. 2007; Ding et al. 2012). Aquests resultats contradictoris podrien indicar que aquests gens no tenen una forta associació amb la t-NM, almenys quan s'estudia un únic gen. Hi ha altres treballs que han estudiat múltiples gens de forma simultània, on s'ha vist que els individus amb més d'una variant de risc tenen més probabilitats de desenvolupar una t-NM. Per exemple, s'ha trobat associació entre t-NM i polimorfismes en les combinacions dels gens *GSTT1* i *GSTM1* (Haase et al. 2002), *RAD51* i *XRCC3* (Seedhouse et al. 2004), *CYP1A1*, *GSTM1* i *NQO1* (Bolufer et al. 2007), *TP53* i *MDM2* (Ellis et al. 2008) i *TP53* i *MTHFR* (Ding et al. 2012). De tots els estudis fets fins ara, els dos únics gens pels quals no hi ha resultats contradictoris són *TP53* i

*MDM2*, el qual pertany a la via de p53 (Ding et al. 2012; Ellis et al. 2008). Un altre factor a tenir en compte és que la majoria d'aquests estudis analitzen una mida de mostra bastant petita, el que els hi confereix un poder estadístic baix. Una problemàtica addicional és que la majoria d'aquests estudis han utilitzat individus sans o mostres de NM *de novo* com a grup de referència, enlloc de pacients que s'hagin sotmès a teràpia per un tumor primari però que no hagin desenvolupat t-NM varis anys més tard. Fins ara, únicament cinc estudis han utilitzat un grup de comparació adequat (Woo et al. 2000; Blanco et al. 2002; Collado et al. 2005; Guillem et al. 2007; Ding et al. 2012) i només dos d'ells han observat una associació positiva amb gens candidats (Guillem et al. 2007; Ding et al. 2012). En aquests dos estudis s'han identificat variants associades amb el risc de t-NM en gens relacionats amb la reparació del DNA i l'apoptosi (*TP53*) i amb la síntesi/reparació del DNA (*MTHFR*); Ding et al. (2012) van observar un efecte sinèrgic dels SNPs de *TP53* i *MTHFR* en el desenvolupament de t-NM després d'un limfoma de Hodgkin, mentre que Guillem et al. (2007) van observar que l'haplotip de risc de *MTHFR* és diferent segons la neoplàsia primària. Per altra banda, Ellis et al. (2008) van observar que els individus portadors de l'al·lel G del SNP309 de *MDM2* i de la variant Pro de *TP53* tenen un risc més elevat de t-LMA. *MDM2* és un oncogen que codifica per una ubiquitina E3 lligasa que regula negativament la proteïna p53 (Vogelstein et al. 2000). S'ha descrit que *MDM2* inhibeix p53 mitjançant la regulació de la seva exportació nuclear, de la seva capacitat com activador transcripcional i de la seva estabilitat (revisat per Vazquez et al. 2008). S'ha observat que un SNP situat al promotor del gen *MDM2* (SNP309, T/G) afecta l'afinitat del factor de transcripció SP1 per aquest promotor. L'al·lel G augmenta l'afinitat de la proteïna SP1 activadora, que resulta en un increment del mRNA de *MDM2*; això causa una atenuació de la resposta de p53 al dany al DNA i com a conseqüència augmenta el risc de tumorigènesi (Figura 12) (Bond et al. 2004).



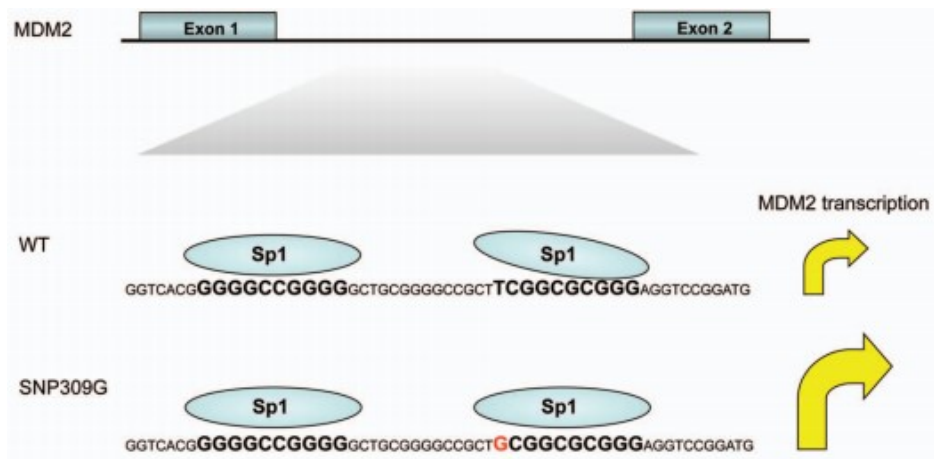


Figura 12. Efecte de l'SNP309 al gen *MDM2* en la transcripció. Modificada de Knappskog & Lønning (2011).

### 1.3 OBJECTIUS:

1. Analitzar si determinats polimorfismes en gens relacionats amb el metabolisme de fàrmacs i l'apoptosi estan implicats en la resposta al tractament per LLA infantil.
  - 1.1. Analitzar l'associació entre els polimorfismes (CNVs i/o SNPs) dels gens *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *UGT2B17*, *SULT1A1* i *TP53* i l'evolució dels pacients amb LLA infantil.
  - 1.2. Avaluar l'efecte *in vitro* de la CNV de *GSTM1* i el polimorfisme Arg72Pro de *TP53* en la resposta a la dexametasona en una línia cel·lular leucèmica.
  
2. Analitzar si determinats polimorfismes en la via de p53 estan implicats en la susceptibilitat a desenvolupar t-NM.
  - 2.1. Avaluar si la variant Pro del polimorfisme Arg72Pro de *TP53* i l'al·lel G de *MDM2* tenen influència en el risc de desenvolupar t-NM, comparant els genotips de pacients amb t-NM i els de pacients tractats per càncer que no han desenvolupat t-NM.
  - 2.2. Avaluar *in vitro* les diferències entre les dues variants del polimorfisme Arg72Pro de *TP53*, en cèl·lules tractades amb un agent alquilant o un inhibidor de la topoisomerasa II, pel que respecta a:
    - a. nombre de DSBs en el DNA, mesurat pel recompte de foci de  $\gamma$ -H2AX.
    - b. nivells de dany en el DNA, mesurat per la freqüència de trencaments cromosòmics i intercanvi de cromàtides germanes
    - c. nombre de cèl·lules apoptòtiques
    - d. presència d'alteracions cromosòmiques típiques de t-NM després d'un cultiu cel·lular de 100 dies.

## **2. RESULTATS**

**2.1 IMPACT OF POLYMORPHISMS IN  
APOPTOSIS-RELATED GENES ON THE  
OUTCOME OF CHILDHOOD ACUTE  
LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA**

# Impact of polymorphisms in apoptosis-related genes on the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia

**SHORT TITLE:** Polymorphisms and outcome of childhood ALL

**Maria Cabezas<sup>1</sup>, Mireia Camós<sup>2,3,4</sup>, Susana Rives<sup>2,4,5</sup>, África García-Orad<sup>6,7</sup>, Josep Lluís Dapena<sup>8</sup>, María Rosa Caballín<sup>1</sup>, Gemma Armengol<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Unit of Biological Anthropology, Department of Animal Biology, Plant Biology and Ecology, Faculty of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Catalonia, Spain

<sup>2</sup> Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Catalonia, Spain.

<sup>3</sup> Hematology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Esplugues de Llobregat, Catalonia, Spain.

<sup>4</sup> National Biomedical Research Institute on Rare Diseases (CIBER ER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

<sup>5</sup> Pediatric Hematology and Oncology Department, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Esplugues de Llobregat, Catalonia, Spain

<sup>6</sup> Department of Genetics, Physic Anthropology and Animal Physiology, University of the Basque Country, UPV/EHU, Leioa, Spain

<sup>7</sup> BioCruces Health Research Institute, Barakaldo, Spain.

<sup>8</sup> Service of Pediatric Hematology and Oncology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain.

**\*Corresponding author:**

Gemma Armengol  
Unit of Biological Anthropology

Department of Animal Biology, Plant Biology and Ecology, Faculty of Biosciences,  
Universitat Autònoma de Barcelona,  
08193-Bellaterra, Catalonia  
Spain

e-mail address: [Gemma.Armengol@uab.cat](mailto:Gemma.Armengol@uab.cat)

Phone: +34 5811503

**WORD COUNTS FOR TEXT: 3929**

**WORD COUNTS FOR ABSTRACT: 250**

#### **KEY POINTS**

- Genetic variants in *GSMT1* and *TP53* genes contribute to differences in response to therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia
- Identification of children with acute lymphoblastic leukemia that have poor response to chemotherapy is important to individualize therapy

## ABSTRACT

Children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) respond differently to chemotherapy, and inherited genetic variants, e.g. single nucleotide polymorphisms (SNPs) and copy number variants (CNVs), may partially explain these differences. We aimed to evaluate the association of CNVs and/or SNPs at genes encoding drug-metabolizing enzymes and apoptotic proteins with early response, minimal residual disease, relapse, and survival in childhood ALL. We genotyped 173 patients for CNVs at *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *UGT2B17*, and *SULT1A1* genes and for SNPs at *CYP2D6*, *SULT1A1*, and *TP53* genes. Results revealed that *GSTM1* non-null genotype was associated with poor outcome (overall survival (OS), 83% vs. 99%,  $p=0.002$ ; event-free survival (EFS), 78% vs. 94%,  $p=0.005$ ). Additionally, there was a trend to reduced survival in patients with Pro variant at the *TP53* Arg72Pro SNP. The combination of *GSTM1* non-null and *TP53* Pro/Pro or Pro/Arg genotype resulted in a highly significant reduction of survival (OS 79% vs. 99%,  $p=0.0005$ ; EFS, 76% vs. 94%,  $p=0.003$ ). To validate these results, an *in vitro* assay was performed with leukemic Jurkat cell line. Jurkat p53Pro *GSTM1* non-null cells exhibited lower sensitivity to the antileukemic drug dexamethasone compared to Jurkat p53Arg *GSTM1* null cells. *GSTM1* and p53 have been associated with apoptosis. It is known that the expression of *GSTM1* inhibits glucocorticoid-induced cell death and that p53Arg variant is a more efficient inducer of apoptosis than p53Pro variant. In conclusion, our results suggest that *GSTM1* non-null genotype and p53Pro variant at codon 72 might be responsible for the poorer outcome in some childhood ALL patients.

## INTRODUCTION

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer in children, representing one third of all childhood malignancies. Progressive intensification of multiple drug chemotherapeutic regimens has improved outcomes for children with ALL; however, up to 20% of patients relapse<sup>1</sup>. It is known that children with ALL respond differently to chemotherapy, and inherited genetic variation could be one of the causes. It has been suggested that common genetic variants with low penetrance may explain these differences, possibly influencing disease outcome. Previous studies have observed that outcome of children with ALL might be associated with polymorphisms in genes involved in drug metabolism [e.g. P450 cytochrome (CYP), glutathione S-methyl transferase (GST), sulfotransferase (SULT), and UDP glucuronyl transferase (UGT)], DNA repair or immune surveillance processes, among others (reviewed in <sup>2-5</sup>). However, these results are still controversial, since they lack confirmation, except for thiopurine S-methyltransferase (TPMT), which is routinely determined in certain institutions before 6-mercaptopurine administration<sup>6</sup>. Yet, despite extensive analysis, the underlying allelic variants responsible for ALL outcome have remained elusive.

Most of the studies performed so far have analyzed only single nucleotide polymorphisms (SNPs) (except for *GST* and *UGT*), because the analysis was more straightforward. However, polymorphic copy number variants (CNVs) are very plausible candidate genetic variants to consider. Among all the polymorphisms that have been reported to be possibly associated with treatment outcome in ALL, some are SNPs causing an increase or decrease in gene expression, which would have the same expected effect in the cell as an increase or decrease in the number of copies of the gene (CNV). Of the genes with such SNPs, there are two that present interindividual CNVs according to the Database of Genomic Variants (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/>): *CYP2D6*, which can present up to 12 copies<sup>7</sup> and *SULT1A1*, up to five copies<sup>8</sup>. To our knowledge, there have been no studies testing whether CNVs in these genes can be associated with ALL patient outcome. It is possible that the simultaneous presence of CNVs in *CYP2D6* or *SULT1A1* with SNPs in these genes having the same theoretical effect (an increase of gene expression) leads to a stronger association with disease outcome. Moreover, most studies investigating the effect of genetic polymorphisms in *GSTT1*, *GSTM1*, and *UGT2B17* on ALL patient outcome distinguished between null and non-null genotypes, but they did not consider the possible effect of the exact gene copy number, which ranges from zero to three copies in the Caucasian population<sup>9,10</sup>. Interestingly, a gene dosage effect



between copy number and enzyme activity has been reported for the genes *CYP2D6* and *SULT1A1* as well as for *GSTT1*, *GSTM1* and *UGT2B17*<sup>8,11-14</sup>, suggesting that the analysis of the exact copy number of these genes might be useful in predicting therapy response. What is more, it is known that the proteins coded by these genes contribute to the metabolism and disposition of many drugs used to treat childhood ALL (Pharmacogenomics Knowledge Base, [www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org)).

Although *GSTM1* is mainly known as a detoxification enzyme, it has also been described as a downregulator of pro-apoptotic pathways. Hosono et al<sup>15</sup> reported that *GSTM1*-expressing ALL cell lines exhibited decreased sensitivity to some antileukemic drugs, through inhibition of apoptosis instead of through glutathione transfer. The key mediator of apoptosis is p53, which modulates DNA repair and apoptosis upon DNA damage. Interestingly, *TP53* gene is also polymorphic. It is well known that a common polymorphism of *TP53* in codon 72 produces an arginine to proline change that diminishes p53 apoptotic activity<sup>16,17</sup>. This polymorphism has been reported to be associated with hematological<sup>18-20</sup> and non-hematological cancer risk<sup>21</sup> and with response to chemotherapy and survival in several types of tumors<sup>22-25</sup>, even though the impact of this polymorphism seems to depend on the type of cancer and on the particular treatment. To our knowledge, the association of the Arg72Pro polymorphism with ALL patient outcome has not been tested yet.

In the current study, we investigated the association between *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *UGT2B17*, *SULT1A1* and *TP53* polymorphisms (CNVs and/or SNPs) and early-treatment response, end-of-induction minimal residual disease (MRD), relapse, and survival in a series of 173 Caucasian children with ALL. In addition, we evaluated *in vitro* the effect of the *GSTM1* CNV and the *TP53* Arg72Pro SNP on the response to an anticancer agent, such as dexamethasone, in a leukemic cell line.

## **PATIENTS AND METHODS**

### **Patients**

One hundred and seventy-three patients diagnosed with ALL and younger than 18 years were recruited from two tertiary university institutions in Spain: Sant Joan de Déu Hospital, Barcelona, and from Cruces Hospital, Barakaldo, between 1996 and 2012. Patients were all of Caucasian descent. All their parents were informed about the study and they provided their

consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The research was approved by the ethics committees of both hospitals. Samples were extracted when patients were at complete remission or without cytogenetic aberrations affecting chromosomes where the polymorphisms are located. Clinical data were collected at diagnosis, including sex, age, leukemia lineage (T-cell or B-cell), white blood cell (WBC) count, cytogenetic risk group and treatment protocol (Table 1). The different cytogenetic risk groups were classified according to the criteria of the Spanish Society of Pediatric Hematology and Oncology, SEHOP (see Supplementary Material). Patients were risk assigned and treated according to the following protocols: SHOP-1994, SHOP-1999 or SHOP-2005. Treatment efficacy was assessed by means of early response, MRD, relapse and survival. Early response was based on the percentage of leukemic blasts in bone marrow on day 14 of induction treatment (less than 5% corresponds to a good response). In protocol SHOP-2005, MRD was determined in bone marrow at the end of remission induction by flow cytometry and positivity was defined as the presence of 0.01% or more ALL cells.

#### **DNA isolation**

DNA was extracted either from bone marrow cell nuclei in fixative (acetic acid-methanol, 1:3) or from peripheral blood cells at remission using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and following manufacturer's instructions.

#### **CNV genotyping by Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)**

Relative quantification of *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *UGT2B17*, and *SULT1A1* gene copy number was performed by qPCR. DNA concentrations were normalized referring to the constant copy number reference *LINE1*<sup>26</sup>. Moreover, the relative gene of interest (GOI) copy number level was also normalized to a human genomic DNA sample from a healthy donor as calibrator.

We used specific primers targeting unique sequences of 110-201 bp within the GOI and the reference sequence as given in Table 2. PCR primers were designed with Primer Premier Biosoft Software ([www.premierbiosoft.com](http://www.premierbiosoft.com)), except for *LINE1*, according to stringent parameters<sup>27</sup>. Specificity of each primer pair was verified using the Basic Local Alignment Search Tool ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

qPCR reactions were conducted using the SYBR Green I PCR KIT (Qiagen) on a Rotor Gene Q (Qiagen). Each reaction was run in duplicate and contained 3 µL of DNA template (60 ng) along with 200 nM (*LINE1* and *GSTT1*) or 400 nM (*CYP2D6*, *GSTM1*, *UGT2B17* and *SULT1A1*) of primers and 1x Power SYBR® Green PCR Master Mix in a final reaction volume of 15 µL. Cycling parameters were: 95°C for 5 min to activate DNA polymerase, then 40 cycles of 95°C for 5 s and 60°C for 10 s, with a final recording step of 75°C for 10 s. Melting curves were performed after each run to ensure that only a single product was amplified. Data were analyzed using Rotor Gene Q Series Software (Qiagen) (see Supplementary Material).

### **SNP genotyping by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)**

The samples were genotyped for the most common SNPs in *CYP2D6* (c.1846G>A, causing a splicing defect in protein), *SULT1A1* (c.638G>A, p.Arg213His) and *TP53* (c.215G>C, p.Arg72Pro) by PCR-RFLP method according to the procedures previously proposed<sup>28–30</sup>. PCR was performed in a 20-µL reaction volume containing 20 ng of genomic DNA (*CYP2D6* and *SULT1A1*) or 100 ng (*TP53*), 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, 0.2 µM of each primer (Table 2), and 0.5 U Taq polymerase (Promega Corporation). Cycling conditions were: denaturation at 94°C for 5 min followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, 58°C (*TP53*) or 69°C (*CYP2D6* and *SULT1A1*) for 20 s, and 72°C for 20 s, and a final extension step at 72°C for 2 min. The PCR product (10 µL) was digested with BstNI (*CYP2D6*), HaeII (*SULT1A1*) or BstUI (*TP53*) digestion enzymes (10 U/µL; Thermo Scientific) according to manufacturer's specifications and digestion products were subjected to electrophoresis on a 3% agarose gel (see Supplementary Material).

### **Statistical analysis**

First, potential prognostic variables, such as clinical parameters, were correlated with treatment efficacy variables (early response, MRD, and relapse). Chi-square and Fisher exact tests were used for sex, leukemia type, cytogenetic risk group and treatment protocol, whereas a Mann-Whitney test was used for age and WBC count.

Second, association analysis between polymorphism genotypes and treatment efficacy variables was performed using R 3.3.1 package (<http://www.r-project.org/>). In particular, SNPassoc library<sup>31</sup> was used to test SNP genotypes and CNVassoc library<sup>32</sup> for CNV genotypes (see Supplementary Material). All possible combination of CNVs (e.g. null genotype in both

*GSTT1* and *GSTM1* vs. other genotypes) and different combinations of SNP and CNV genotypes (Table 3) were also tested for associations with the three therapeutic outcome variables by chi-square test or Fisher exact test.

Finally, Kaplan-Meier curves were generated for graphical representation of overall survival (OS) and event-free survival (EFS) for all clinico-biological parameters and for all polymorphism genotypes. OS is defined as the time from diagnosis to death from any cause or last follow-up. EFS is the time to relapse, second malignancy, death from any cause or last follow-up. Median follow-up was 73 months (range 6-204 months). Survival curves were compared with the log-rank test. Gene copy number of *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *UGT2B17*, and *SULT1A1* was categorized according to the cutoff points from the CNVassoc analysis. Every genotype was analyzed separately and, in addition, in the case of CNVs, null genotypes were tested vs. non-null genotypes, and in the case of SNPs, heterozygotes were grouped together with either homozygote genotype. Additionally, the same above-mentioned combinations of SNP and CNV genotypes were also tested in survival analysis. Moreover, the Cox proportional hazards regression model was used to adjust the effect of genotype status by potential prognostic features, such as clinico-biological parameters (sex, age, leukemia type, WBC count, cytogenetic risk group and treatment protocol).

All statistical analyses were performed using SPSS v22.0 software unless otherwise indicated.

### ***In vitro* analysis of cell viability**

After observing that *GSTM1* CNV and *TP53* Arg72Pro SNP had an effect on OS and EFS of patients with ALL, we performed an *in vitro* analysis to measure the effect of these polymorphisms on the response to a chemotherapy agent. Jurkat cell line, which is derived from a human lymphoblastic T-cell leukemia, was used (American Type Culture Collection, ATCC). We had previously created Jurkat p53Pro and p53Arg cells by transfecting vectors with the two *TP53* variants at codon 72, either Pro or Arg, into Jurkat cells, which are *TP53* null (M.C., M.R.C., and G.A., manuscript in preparation). Vectors were kindly donated by Dr. Lawrence Banks (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Trieste, Italy). Jurkat p53Pro and Jurkat p53Arg cells were electroporated with *GSTM1* siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) and then cultured for 72 h with various concentrations of dexamethasone; cell viability was measured using the MTT assay (see Supplementary

Material). Differences in percentage of viable cells at each concentration point were evaluated by a Mann-Whitney test with SPSS v22.0 software.

## RESULTS

A total of 173 Caucasian children with ALL were enrolled in this study, with a median age of 5 (range 0 to 17.4 years). Samples were genotyped for polymorphisms on gene copy number and/or SNPs in six genes encoding several xenobiotic metabolizing enzymes and an apoptotic protein: *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *UGT2B17*, *SULT1A1*, and *TP53*. Unfortunately, not all samples were available for all genotyping procedures. Genotype distributions of copy numbers for each gene are shown in Table 4. Samples were also genotyped for the most common SNP in *CYP2D6*, *SULT1A1*, and *TP53* and the genotype distribution is listed in Table 5. None of the SNP genotypes showed significant deviations from HWE, except *CYP2D6* ( $p=0.03$ ).

Statistical analysis revealed no significant association between the patients' clinical parameters at diagnosis (sex, age, leukemia lineage, WBC count, cytogenetic risk group and treatment protocol) and early response, MRD, or relapse ( $p>0.05$  in all cases). Kaplan-Meier estimates showed significant differences in OS by age (94% vs 79%,  $p=0.002$ ; Figure S1A), cytogenetic risk group (100% vs 82% vs 100% for good, intermediate and adverse risk groups, respectively,  $p=0.004$ ; Figure S2A) and MRD (90% vs 71%,  $p=0.024$ ; Figure S3A). A trend to worse OS was observed in patients with T-ALL (85% vs. 91%,  $p=0.168$ ; Figure S4) and in those patients with slow early response (85% vs. 92%,  $p=0.085$ ; Figure S5A). The only significant variable for EFS was the presence of MRD (86% vs. 61%,  $p=0.028$ ; Figure S3B), whereas age, cytogenetic risk group and early response only showed a trend to different EFS (Figures S1B, S2B and S5B).

To determine whether the CNV and SNP genotypes were associated with the treatment efficacy variables, CNVassoc and SNPassoc libraries were applied, respectively. No associations were found with any of the genetic models tested in any of the genes. Then, the impact of the CNVs and/or SNPs on patient survival was assessed by estimating OS and EFS probabilities for patients with or without the variant genotypes. The only significant predictor of survival was the *GSTM1* CNV genotype. Kaplan–Meier survival analysis revealed worse survival in patients with 1, 2 or  $\geq 3$  copies of *GSTM1* both when genotypes were analyzed separately (OS  $p=0.013$ ; EFS  $p=0.047$ , Figures 1A & 1B) and when all non-null genotypes were grouped together (OS  $p=0.002$ ; EFS  $p=0.005$ ) (Figures 1C & 1D). These differences were also observed when the effect was adjusted by clinico-biological factors in the Cox model for OS (hazard ratio

[HR]=16.51; 95% confidence interval [CI], 2.13-128.18; p=0.007) and EFS (HR=3.80; 95% CI, 1.40-10.30; p=0.009). Additionally, survival curves for patients grouped according to *TP53* gene polymorphism at codon 72 clearly separated individuals with the Arg/Arg genotype from those carrying at least one Pro variant, the latter having worse survival (Figure 2). However, differences were not significant (OS p=0.208; EFS p=0.110), probably due to the small sample size. We further investigated interactions among SNPs and among CNVs. Epistasis analysis (gene-gene interaction) performed with SNPassoc library did not show any significant association. Moreover, all possible combinations of CNV genotypes were analyzed but they were not statistically significantly associated with early response, MRD, relapse or survival. Specifically, double null *GSTM1* and *GSTT1* genotype was not a significant risk factor for any of the treatment outcome variables.

Then, we wanted to test whether the combination of a CNV genotype in one gene with a SNP genotype in the same gene having the same theoretical effect (an increase of gene expression) was associated with treatment outcome. This analysis was performed for *CYP2D6* and *SULT1A1*, two genes in which this simultaneous effect could happen (see Introduction section). We did not observe any significant differences when testing patients having both >2 copies of the gene and the allele of the SNP conferring high gene expression (homozygous or homozygous + heterozygous) versus the rest of the patients. Neither did we observe differences when we analyzed patients having either >2 copies of the gene or the allele of the SNP conferring high gene expression, compared with the rest of patients.

We next analyzed the importance of combining *GSTM1* CNV genotype and the *TP53* Arg72Pro SNP genotype, both genes being implicated in apoptosis processes. Patients having both non-null genotype of *GSTM1* and *TP53* Pro/Pro or Pro/Arg genotype had a higher risk of relapse than other patients (p=0.043), but no association was found with early response or MRD. In relation to survival, again patients having  $\geq 1$  copies of *GSTM1* and *TP53* Pro/Pro or Pro/Arg (n=62/149 patients with both genes successfully genotyped) had significantly poorer survival (OS p= 0.0005; EFS p=0.003; Figure 3). These differences remained highly significant after applying multivariate Cox regression, either in OS (HR=19.10; 95% CI, 2.44-149.21; p=0.005) or EFS (HR=4.13; 95% CI, 1.49-11.49; p=0.006).

Finally, we investigated *in vitro* the effect on survival of leukemic Jurkat cells carrying different combinations of *GSTM1* CNV and *TP53* Arg72Pro SNP after being treated with dexamethasone. Jurkat p53Pro and Jurkat p53Arg cells were electroporated with a siRNA of *GSTM1* and the

effect of *GSTM1* expression and *TP53* variant on cellular dexamethasone sensitivity was assayed (Figure 4). Jurkat p53Arg *GSTM1* null cells exhibited the highest sensitivity to dexamethasone and Jurkat p53Pro *GSTM1* non-null the lowest. Differences between these two cell lines were statistically significant at all concentrations tested ( $p=0.006$  for 1 and 10  $\mu\text{M}$ , and  $p=0.004$  for 100, 200 and 400  $\mu\text{M}$ ). The other cell lines presented an intermediate sensitivity. Similar results were obtained in another independent experiment.

## DISCUSSION

One of the major causes of disease-related deaths in children with ALL is treatment failure due to drug resistance and/or relapse, which occurs in about 20% of patients in most industrialized countries. Inherited genetic polymorphisms are probably behind variability in response to chemotherapy in childhood ALL. Despite many pharmacogenetic studies carried out in recent years, clinically useful genetic predictors of ALL treatment response are yet to be identified. These markers would help to optimize cancer chemotherapeutic regimens.

In this study, we sought to determine if CNVs/SNPs in genes coding for proteins involved in drug metabolism or apoptosis have an impact on the therapeutic outcome of childhood ALL patients. The CNVs investigated were in *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *UGT2B17*, and *SULT1A1* genes, whereas SNPs were in *CYP2D6*, *SULT1A1*, and *TP53* genes. To the best of our knowledge, this is the first report searching for an association between CNVs (assessing the exact number of copies, i.e. 0, 1, 2,  $\geq 3$ ) in selected gene candidates and prognosis of this disease. Moreover, it is the first study combining SNPs and CNVs in the same genes causing the same theoretical effect, and the first study analyzing *TP53* polymorphism as a possible predictor of treatment outcome in childhood ALL.

The frequency of *GSTM1* null genotype in children with ALL was approximately 50%, whereas most patients had one copy of *CYP2D6*, *GSTT1*, and *UGT2B17* and two copies of *SULT1A1*. These results are similar to what has been reported in the literature for the Caucasian population<sup>8-10,14</sup>. No gene dose effect or SNP effect on early-treatment response, end-of-induction MRD or relapse was demonstrated with either polymorphism tested. Moreover, our hypothesis that CNVs and SNPs at the same gene could increase the association with disease outcome was not proved. However, interestingly, *GSTM1* emerged as a genetic marker for childhood ALL survival, since non-null genotype of *GSTM1* was associated with poor prognosis, even after multivariate analysis. It made no difference whether one, two, or even more than

two copies were present, as can be observed in survival curves (Figure 1). Therefore, it seems that non-null genotype is the determinant factor to shift the balance from good to poor prognosis, regardless of the number of copies. It is known that the GST family of enzymes catalyzes the inactivation of several antileukemic agents through conjugation with glutathione<sup>33</sup>. It is likely that *GSTM1* non-null genotype would lead to increased inactivation of these drugs, compared to null genotype. This means lower drug exposure and subsequent poorer treatment efficacy and poorer survival. So far, *GSTM1* null genotype has been associated with improved childhood ALL outcome in some studies<sup>34–36</sup> but not in others<sup>37–40</sup>. One explanation for these discrepancies is that association might be dependent on the multidrug therapeutic strategy used, as childhood ALL treatment protocols can include up to 13 different chemotherapeutic agents.

The GST enzymes, especially *GSTM1* and *GSTT1*, have different, but sometimes overlapping, substrate affinity. Several studies have searched for the association of *GSTT1* null or *GST* double-null with the risk of leukemia relapse or survival, but findings are contradictory. The null genotype of *GSTT1* confers a reduction in risk of relapse according to some authors<sup>34,39</sup>, but not according to others<sup>35,37,40</sup>. Moreover, Davies et al<sup>38</sup> found no effect on relapse or survival for *GSTT1* or the double-null genotype *GSTT1/GSTM1*, whereas Borst et al<sup>41</sup> results suggested that the combined gene dose of *GSTM1* and *GSTT1* may influence the outcome in childhood ALL. In the present study, we failed to find significant association of these genotypes with treatment outcome. These results prompted us to think that allelic variants of the *GSTM1* gene may influence therapy outcome by additional mechanisms, different from drug metabolism, possibly involving apoptotic processes. Moreover, as *GSTM1* null genotype is present in half the Caucasian population, it is likely that other gene/s is/are modulating its impact as a predictor of childhood ALL outcome. Interestingly, we found that carriers of at least one Pro variant of *TP53* Arg72Pro polymorphism had a trend to worse disease prognosis according to Kaplan-Meier analysis (i.e. dominant effect of Pro variant).

When combining *GSTM1* and *TP53* genotypes, our data indicated that they can predict survival with higher significance than *GSTM1* alone (OS,  $p=0.0005$  vs.  $p=0.002$ ; EFS,  $p=0.003$  vs.  $p=0.005$ ). Children with *GSTM1* non-null genotype and *TP53* Pro/Pro or Pro/Arg genotype were more likely to have shorter survival than children with other genotypes. Both *GSTM1* and *TP53* have been previously associated with apoptosis and thus it is plausible that they might play a role in response to chemotherapy. It has been reported that *GSTM1* binds and inhibits the activity of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) and mitogen-activated protein kinase



kinase kinase 1 (MEKK1), two kinases that activate the JNK and p38 pro-apoptotic pathways under cellular stress<sup>42-44</sup>. Therefore, GSTM1 is able to suppress ASK1- and MEKK1- mediated cell death. As for TP53, several studies have demonstrated that the Arg variant is stronger and faster in inducing apoptosis than the Pro variant. On the other hand, the Pro variant has been found to be a more efficient activator of cell cycle arrest and DNA damage repair and thus may protect tumor cells against apoptosis induced by chemotherapy agents<sup>16,17,45</sup>. Therefore, both having some production of GSTM1 protein (at least one copy of *GSTM1* gene) and having the *TP53* Pro variant (enough in heterozygosis) would lead to less efficient apoptosis of ALL lymphoblasts after antileukemic treatment and therefore, could be related to shorter survival. Interestingly, Wang et al<sup>46</sup> reported that GSTP1 and GSTM1 expression predominated in lymphoid cell lines over other hematopoietic cell lines.

Synthetic glucocorticoids, such as dexamethasone and prednisone, are the keystone in the treatment of ALL in children due to their ability to directly induce extensive apoptosis in ALL cells, through activation of p38-MAPK and Bim<sup>47</sup>. Response to these agents is probably the most important prognostic factor for outcome in this disease<sup>48</sup>. Moreover, it is known that the *in vitro* response of leukemic cells to glucocorticoids is highly predictive of ALL outcome<sup>49</sup>. Notably, Hosono et al<sup>15</sup> demonstrated that GSTM1 inhibits dexamethasone-induced apoptosis in a lymphoblastic leukemia cell line by suppression of Bim through downregulation of p38-MAPK and upregulation of NF-KB p50. In the present study, an *in vitro* cell survival analysis showed that leukemic Jurkat p53Arg *GSTM1* null cells displayed the highest sensitivity to dexamethasone whereas Jurkat p53Pro *GSTM1* non-null displayed the lowest, confirming the results observed in patients. Overall, these data suggest that *GSTM1* and *TP53* polymorphisms contribute to differences in cellular response to glucocorticoids in childhood ALL.

Pharmacogenetic studies, such as the one presented here, may provide tools to improve individualization of drug therapy to treat childhood ALL in the near future. If our results are confirmed in larger series, use of apoptotic-based chemotherapy agents in patients with *GSTM1* non-null genotype and the *TP53* Pro/Pro or Pro/Arg genotype at codon 72 should be revisited.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank all participating patients, families and clinicians who contributed their time and efforts. We thank Jéssica Martínez for her help with the experiments. M.C.,

M.R.C., and G.A. belong to a consolidated research group of the *Generalitat de Catalunya* (2014SGR354). This research was supported by a Ph.D. grant from the *Generalitat de Catalunya* allotted to M.C. (2013FI\_B1076).

#### **AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS**

G.A. and M.R.C. conceived and designed the experiments, M.C. conducted all the experiments. All authors analyzed the results and wrote and reviewed the manuscript.

#### **DISCLOSURE OF CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no competing financial interests. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## REFERENCES

1. Ceppi F, Cazzaniga G, Colombini A, Biondi A, Conter V. Risk factors for relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: prediction and prevention. *Expert Rev. Hematol.* 2015;8(1):57–70.
2. Bolufer P, Barragan E, Collado M, et al. Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression. *Leuk. Res.* 2006;30(12):1471–1491.
3. Cunningham L, Aplenc R. Pharmacogenetics of acute lymphoblastic leukemia treatment response. *Expert Opin. Pharmacother.* 2007;8(15):2519–2531.
4. Lopez-Lopez E, Gutierrez-Camino A, Bilbao-Aldaiturriaga N, et al. Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics.* 2014;15(10):1383–1398.
5. Moriyama T, Relling M V, Yang JJ. Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2015;125(26):3988–3996.
6. Ansari M, Krajcinovic M. Pharmacogenomics of acute leukemia. *Pharmacogenomics.* 2007;8(7):817–834.
7. Söderbäck E, Zackrisson AL, Lindblom B, Alderborn A. Determination of CYP2D6 gene copy number by pyrosequencing. *Clin. Chem.* 2005;51(3):522–531.
8. Hebbring SJ, Adjei AA, Baer JL, et al. Human SULT1A1 gene: Copy number differences and functional implications. *Hum. Mol. Genet.* 2007;16(5):463–470.
9. Nørskov MS, Frikke-Schmidt R, Loft S, Tybjærg-Hansen A. High-throughput genotyping of copy number variation in Glutathione S-Transferases M1 and T1 using real-time PCR in 20,687 individuals. *Clin. Biochem.* 2009;42(3):201–209.
10. Gaedigk A, Twist GP, Leeder JS. CYP2D6, SULT1A1 and UGT2B17 copy number variation: quantitative detection by multiplex PCR. *Pharmacogenomics.* 2012;13(1):91–111.
11. Sprenger R, Schlagenhauer R, Kerb R, et al. Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacogenetics.* 2000;10(6):557–565.
12. McLellan RA, Oscarson M, Alexandrie AK, et al. Characterization of a human glutathione S-transferase mu cluster containing a duplicated GSTM1 gene that causes ultrarapid enzyme activity. *Mol. Pharmacol.* 1997;52(6):958–965.
13. Wang Y-H, Trucksis M, McElwee JJ, et al. UGT2B17 genetic polymorphisms dramatically affect the pharmacokinetics of MK-7246 in healthy subjects in a first-in-human study. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2012;92(1):96–102.
14. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.* 2005;5(1):6–13.
15. Hosono N, Kishi S, Iho S, et al. Glutathione S-transferase M1 inhibits dexamethasone-induced apoptosis in association with the suppression of Bim through dual mechanisms in a lymphoblastic leukemia cell line. *Cancer Sci.* 2010;101(3):767–773.
16. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, et al. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol. Cell. Biol.* 1999;19(2):1092–1100.
17. Pim D, Banks L. P53 Polymorphic Variants At Codon 72 Exert Different Effects on

- Cell Cycle Progression. *Int. J. Cancer*. 2004;108(2):196–199.
18. Ørsted DD, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Tumor suppressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population. *J. Exp. Med.* 2007;204(6):1295–1301.
  19. Do TN, Ucisik-Akkaya E, Davis CF, Morrison BA, Dorak MT. TP53 R72P and MDM2 SNP309 polymorphisms in modification of childhood acute lymphoblastic leukemia susceptibility. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2009;195(1):31–36.
  20. Tian X, Dai S, Sun J, Jiang S, Jiang Y. Association between TP53 Arg72Pro polymorphism and leukemia risk : a meta-analysis of 14 case-control studies. *Sci. Rep.* 2016;6(24097):1–6.
  21. Khan MH, Khalil A, Rashid H. Evaluation of the p53 Arg72Pro polymorphism and its association with cancer risk: a HuGE review and meta-analysis. *Genet. Res. (Camb)*. 2015;97:.
  22. Rodrigues P, Furriol J, Tormo E, et al. Epistatic interaction of Arg72Pro TP53 and -710 C/T VEGFR1 polymorphisms in breast cancer: Predisposition and survival. *Mol. Cell. Biochem.* 2013;379(1–2):181–190.
  23. Liu L, Wu C, Wang Y, et al. Combined effect of genetic polymorphisms in P53, P73, and MDM2 on non-small cell lung cancer survival. *J. Thorac. Oncol.* 2011;6(11):1793–800.
  24. Toffoli G, Biondo P, Russo A, et al. Effect of TP53 Arg72Pro and MDM2 SNP309 polymorphisms on the risk of high-grade osteosarcoma development and survival. *Clin. Cancer Res.* 2009;15(10):3550–3556.
  25. Cescon DW, Bradbury PA, Asomaning K, et al. p53 Arg72Pro and MDM2 T309G polymorphisms, histology, and esophageal cancer prognosis. *Clin. Cancer Res.* 2009;15(9):3103–3109.
  26. Wang T, Maierhofer C, Speicher MR, et al. Digital karyotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002;99(25):19156–19161.
  27. D’haene B, Vandesompele J, Hellemans J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods.* 2010;50(4):262–270.
  28. Krajcinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnott D. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood.* 1999;93(5):1496–1501.
  29. Wang Y, Spitz MR, Tsou AMH, et al. Sulfotransferase (SULT) 1A1 polymorphism as a predisposition factor for lung cancer: A case-control analysis. *Lung Cancer.* 2002;35(2):137–142.
  30. Li F, Sturgis EM, Chen X, et al. Association of p53 codon 72 polymorphism with risk of second primary malignancy in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 2010;116(10):2350–2359.
  31. González JR, Armengol L, Solé X, et al. SNPAssoc: An R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics.* 2007;23(5):644–645.
  32. Subirana I, Diaz-Uriarte R, Lucas G, Gonzalez JR. CNVassoc: Association analysis of CNV data using R. *BMC Med. Genomics.* 2011;4(1):47.
  33. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene.* 2003;22(47):7369–7375.
  34. Stanulla M, Schrappe M, Brechlin a M, Zimmermann M, Welte K. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a

- case-control study. *Blood*. 2000;95(4):1222–1228.
35. Rocha JCC, Cheng C, Liu W, et al. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenetics*. 2005;105(12):4752–4758.
  36. Franca R, Rebora P, Basso G, et al. Glutathione S-transferase homozygous deletions and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: a novel study design in a large Italian AIEOP cohort. *Pharmacogenomics*. 2012;13(16):1905–16.
  37. Leonardi D, Abbate M, Riccheri M, et al. Improving risk stratification of patients with childhood acute lymphoblastic leukemia: Glutathione-S-Transferases polymorphisms are associated with increased risk of relapse. *Oncotarget*. 2016;5:1–8.
  38. Davies SM, Bhatia S, Ross JA, et al. Glutathione S-transferase genotypes, genetic susceptibility, and outcome of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;100(1):67–71.
  39. Anderer G, Schrappe M, Brechlin a M, et al. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes and initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics*. 2000;10(8):715–726.
  40. Krajcinovic M, Labuda D, Mathonnet G, et al. Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Cancer Res*. 2002;8(3):802–810.
  41. Borst L, Buchard A, Rosthoj S, et al. Gene dose effects of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms on outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2012;34(1):38–42.
  42. Dorion S, Lambert H, Landry J. Activation of the p38 signaling pathway by heat shock involves the dissociation of glutathione S-transferase Mu from Ask1. *J. Biol. Chem*. 2002;277(34):30792–30797.
  43. Ryoo K, Huh SH, Yong HL, et al. Negative regulation of MEKK1-induced signaling by glutathione S-transferase Mu. *J. Biol. Chem*. 2004;279(42):43589–43594.
  44. Luo W, Kinsey M, Schiffman JD, Lessnick SL. Glutathione S-Transferases in Pediatric Cancer. *Front. Oncol*. 2011;1:1–11.
  45. Siddique M, Sabapathy K. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. *Oncogene*. 2006;25(25):3489–3500.
  46. Wang L, Groves MJ, Hepburn MD, Bowen DT. Glutathione S-transferase enzyme expression in hematopoietic cell lines implies a differential protective role for T1 and A1 isoenzymes in erythroid and for M1 in lymphoid lineages. *Haematologica*. 2000;85(6):573–579.
  47. Lu J, Quearry B, Harada H. p38-MAP kinase activation followed by BIM induction is essential for glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia cells. *FEBS Lett*. 2006;580(14):3539–3544.
  48. Kfir-Erenfeld S, Sionov RV, Spokoini R, Cohen O, Yefenof E. Protein kinase networks regulating glucocorticoid-induced apoptosis of hematopoietic cancer cells: fundamental aspects and practical considerations. *Leuk. {&} lymphoma*. 2010;51(11):1968–2005.
  49. Distelhorst CW. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. 2002;9:6–19.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### PATIENTS AND METHODS

#### Patients

The classification of patients according to cytogenetic risk groups (adverse, intermediate, and favorable) was as follows. Patients with t(9;22)(q34;q11), t(4;11)(q21;q23) or *MLL* rearrangements at 11q23, or hipodiploidy (<44 chromosomes) were allocated to the high-risk or adverse cytogenetic risk group. Patients with t(12;21)(p13;q22) or hiperdiploidy (>50 chromosomes) were stratified in the favorable risk group and all other cases were considered to belong to the intermediate cytogenetic risk group.

#### CNV genotyping by Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

This method is based on the correlation between the number of cycles at a threshold level of fluorescence (Cq) and the amount of template present at the beginning of the reaction. In order to assess DNA copy number accurately by qPCR, an optimal assay is essential. It should show a good linear standard curve running serial dilutions of a template ( $R^2 > 0.98$ ), high amplification efficiencies (90-105%) and consistency across replicate reactions. In our case, standard curves were generated for each gene (including the reference sequence) with five ten-fold dilutions of a control DNA, and values were within the optimal range. Amplification efficiencies were calculated from the slope of each standard curve and they were all close to 100%. Moreover, only those reactions with SD from the Cq replicates  $\leq 0.5$  were accepted. Finally, reproducibility (interassay variance) was assessed by computing the coefficient of variation (CV) among values in eight independent assays for each gene and it ranged from 13% to 19%, depending on the gene. These values are comparable to others reported in the literature<sup>1,2</sup>.

Copy number calculations were performed using the  $\Delta\Delta Cq$  method, which assumes that both target and reference sequences are amplified with efficiencies near 100% and comparable to each other. As mentioned above, all genes presented amplification efficiencies near 100% and the difference in Cq values between each GOI and the reference sequence plotted against log template amount gave a function with a slope  $< 0.1$  in all cases. Therefore, the relative quantification of gene copy number in samples versus control DNA could be expressed as  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , where  $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{sample}) - \Delta Cq(\text{control})$ , and  $\Delta Cq(\text{sample}) = Cq(\text{GOI, sample}) -$

$Cq(\text{reference sequence, sample})$ , and  $\Delta Cq(\text{control}) = Cq(\text{GOI, control}) - Cq(\text{reference sequence, control})$ .

### Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

In order to transform the relative values obtained after qPCR into absolute values, the number of copies of each gene was measured by FISH in the control DNA used as calibrator. First, long PCR was performed for each gene to generate FISH probes. Primers were designed with the Primer Premier Biosoft software (Table 2) and DNA from a healthy individual was used as a template. The PCR was performed in a total volume of 20  $\mu\text{L}$  comprising 100 ng of DNA, 1x PCR buffer, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM dNTPs, 0.2  $\mu\text{M}$  of each primer, and 0.5 U Taq polymerase (Promega Corporation, Madison, WI). The PCR conditions were: initial denaturation at 94°C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturation for 15 s at 94°C, annealing for 40 s at 57°C (*UGT2B17*), 59°C (*SULT1A1*), 64°C (*CYP2D6*) or 65°C (*GSTT1* and *GSTM1*) and extension for 2 min 20 s at 68°C, with a final extension step at 68°C for 5 min.

The amplified fragments were labeled by standard nick translation procedures using the Nick translation kit (Roche, Basel, Switzerland). Briefly, a 50- $\mu\text{L}$  solution containing 1  $\mu\text{g}$  of long PCR product, 1x Nick Translation Buffer, 0.02 mM dNTP mix (without dTTP), 0.01 mM of dTTP, 0.01 mM Spectrum Orange-dUTP, and 10  $\mu\text{L}$  of Nick Translation Enzyme was run in a thermal cycler at 15°C for 16 h and at 70°C for 10 min. Finally, these probes were hybridized to nuclei spreads from the qPCR control individual, as follows. DNA was ethanol precipitated along with 12.5 ng of salmon sperm DNA and redissolved in 50  $\mu\text{L}$  of TE. Then, 20  $\mu\text{L}$  of labeled DNA probe and 10 ng of Cot1 competitor DNA (Thermo Scientific, Rockford, IL) were mixed and dried at 60°C, and resuspended in 5  $\mu\text{L}$  of 1x hybridization buffer (50% formamide, 2 X SSC (Saline Sodium Citrate) and 10% dextran sulfate). Labeled probes were denatured at 73°C for 8 min, added to the denatured spreads (2 min at 73°C in 70% formamide) and then allowed to hybridize overnight at 37°C. The slides were washed in a series of buffers: 0.7 X SSC/ 0.3% NP-40 at 73°C for 1 min, and 2 X SSC / 0.1% NP-40 at room temperature for 1 min. Interphase nuclei were analyzed in a Zeiss Axio Imager.Z2 microscope (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany) coupled to a Metafer® Slide Scanning System v3.10.2 (MetaSystems, Altlusheim, Germany).

FISH experiments showed that control DNA had one copy of *GSTT1*, *GSTM1*, and *UGT2B17* and two copies of *CYP2D6* and *SULT1A1* (data not shown). After CNV genotyping of *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *UGT2B17* and *SULT1A1*, the relative qPCR values obtained (sample vs. control DNA)

were transformed into absolute gene copy numbers by dividing them by the number of copies of each gene in the control DNA (obtained by FISH).

### **SNP genotyping by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)**

For *CYP2D6* digestion, the wild-type homozygous genotype (G/G) yielded two bands (230 and 104 bp), the heterozygous genotype (G/A) yielded three bands (334, 230, and 104 bp) and the mutant genotype (A/A) yielded one band (334 bp). As for *SULT1A1* digestion, the wild-type homozygous genotype (G/G) yielded two bands (168 and 165 bp), the heterozygous genotype (G/A) yielded three bands (333, 168 and 165 bp), and the mutant genotype (A/A) yielded one band (333 bp). Regarding *TP53* digestion, the Arg homozygous genotype (G/G) was cleaved by BstUI and yielded two small fragments (160 and 119 bp), the Pro homozygous genotype (C/C) was not cleaved and yielded a single 279 bp band, and the heterozygote showed three bands (279, 160, and 119 bp).

### **Statistical analysis**

SNPassoc implements logistic regression methods under five different genetic models (codominant, dominant, recessive, overdominant and log-additive). In addition, SNPassoc explores Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in each SNP using a chi-square test and it can perform an epistasis analysis (SNP-SNP interaction) between all pairs of SNPs. CNVassoc is a latent class model that incorporates uncertainty when copy number status is inferred. For example, copy number status can be assigned by defining a set of cutoff points in the signal distribution. It also includes functions for analyzing association under various inheritance models (additive, multiplicative, dominant or recessive). Both packages allow to adjust for covariates.

### ***In vitro* analysis of cell viability**

Jurkat p53Pro and Jurkat p53Arg cells were grown in RPMI-1640 medium containing L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 15% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin. Cells in logarithmic growth were washed in PBS, resuspended in serum-free RPMI supplemented with 25 mM Hepes at a concentration of  $4 \times 10^6$  cells/mL, and transferred to a 0.4 cm-gap gene pulser cuvette (0.25 mL/cuvette) (Biorad, Hercules, CA). *GSTM1* siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas,

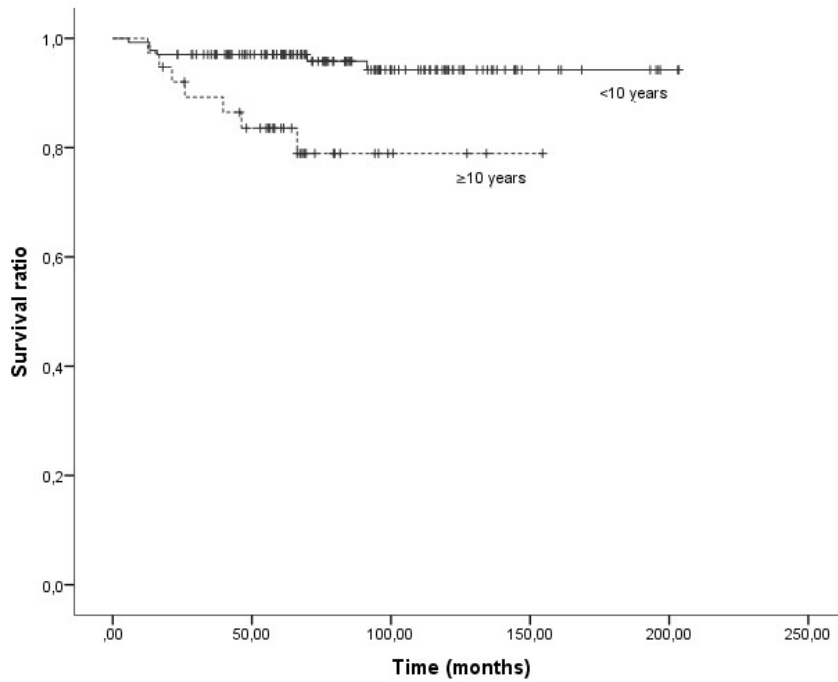


TX) was added to the cells at a final concentration of 600 nM. The cells were electroporated once at 280 V and 500  $\mu$ F using a Gene Pulser (Biorad), left at room temperature for 10 min, and cultured in prewarmed RPMI supplemented with 15% FCS and 25 mM Hepes in a 6-well tissue culture plate. Forty-eight h after transfection, cells were transferred to a 96-well plate, with  $5 \times 10^4$  cells/well (we previously confirmed that *GSTM1* was knocked down at 48 h after transfection by western blot (data not shown)). At this point, we had four cell lines: Jurkat p53Pro *GSTM1* non-null, Jurkat p53Pro *GSTM1* null, Jurkat p53Arg *GSTM1* non-null, and Jurkat p53Arg *GSTM1* null. Then, dexamethasone was added at varying concentrations with a final volume of 100  $\mu$ L (1, 10, 100, 200 and 400  $\mu$ M). Seventy-two hours later, 10  $\mu$ L of MTT (5.5 mg/mL) was added to each well. After 2 h of incubation, 100  $\mu$ L of solubilization solution was added to dissolve the crystals. The plate was allowed to stand 1 h incubation and the absorbance at 550 nm was recorded. Negative control was set as 100% of cell survival. Six replicates of each drug concentration were tested and the experiments were repeated once.

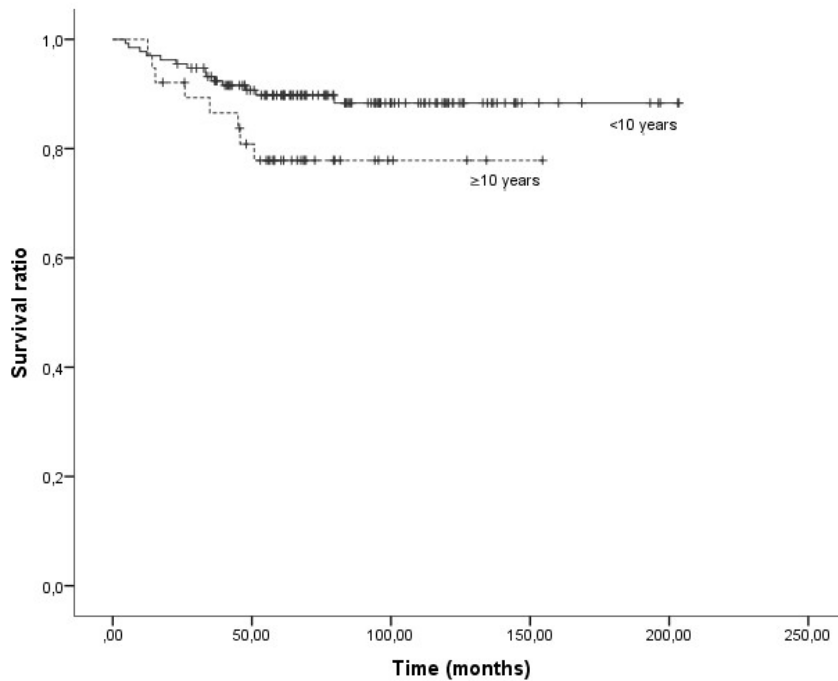
1. Katsoulidou A, Manesis E, Rokka C, et al. Development and assessment of a novel real-time PCR assay for quantitation of hepatitis D virus RNA to study viral kinetics in chronic hepatitis D. *J. Viral Hepat.* 2013;20(4):256–262.
2. Fernandes-Monteiro AG, Trindade GF, Yamamura AMY, et al. New approaches for the standardization and validation of a real-time qPCR assay using TaqMan probes for quantification of yellow fever virus on clinical samples with high quality parameters. *Hum. Vaccines Immunother.* 2015;11(7):1865–1871.

## SUPPLEMENTARY FIGURES

A

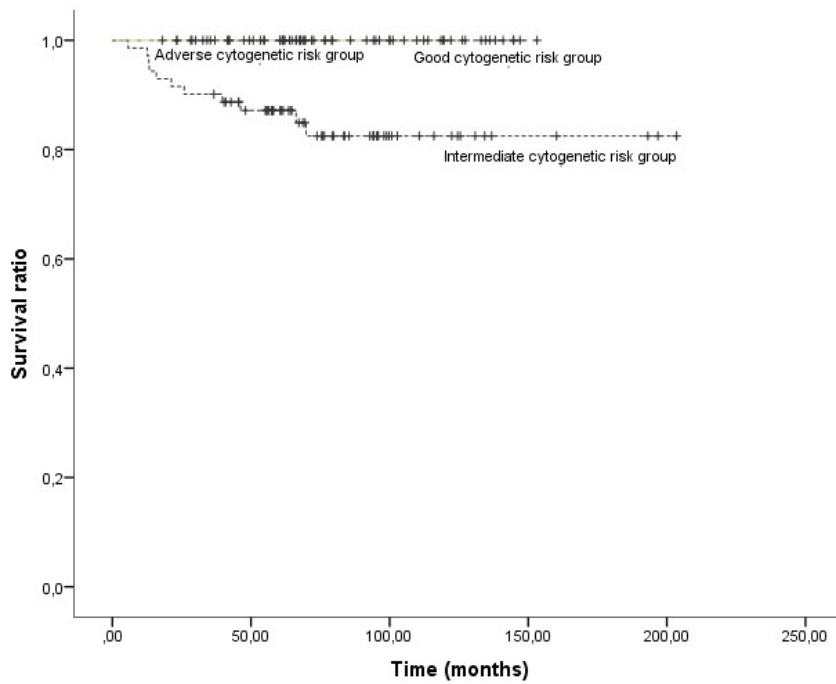


B

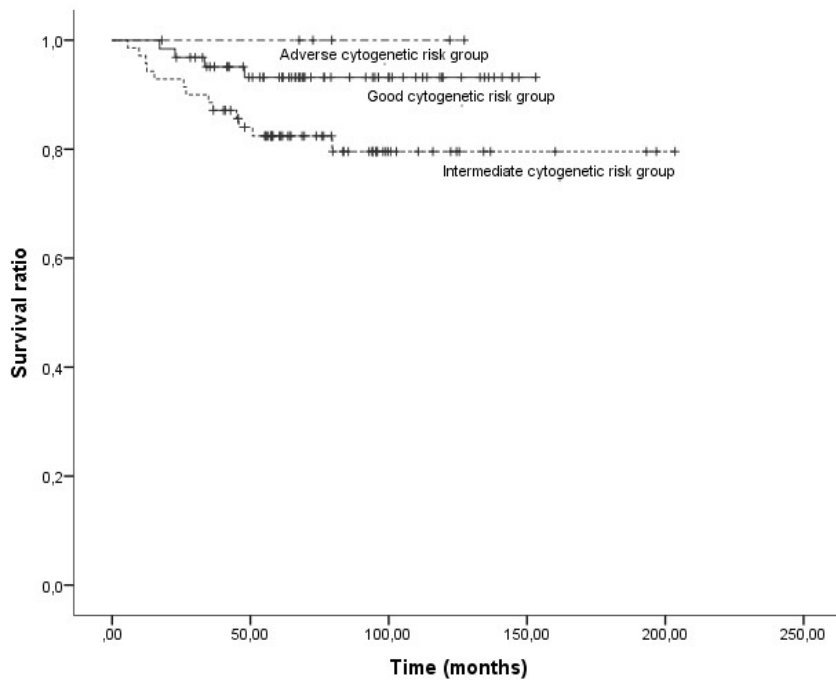


**Figure S1. Kaplan–Meier survival curves of childhood ALL patients according to age. Patients with less than 10 years had better survival (A, OS 94% vs. 79%,  $p=0.002$ ; B, EFS 88% vs. 78%,  $p=0.080$ ).**

A



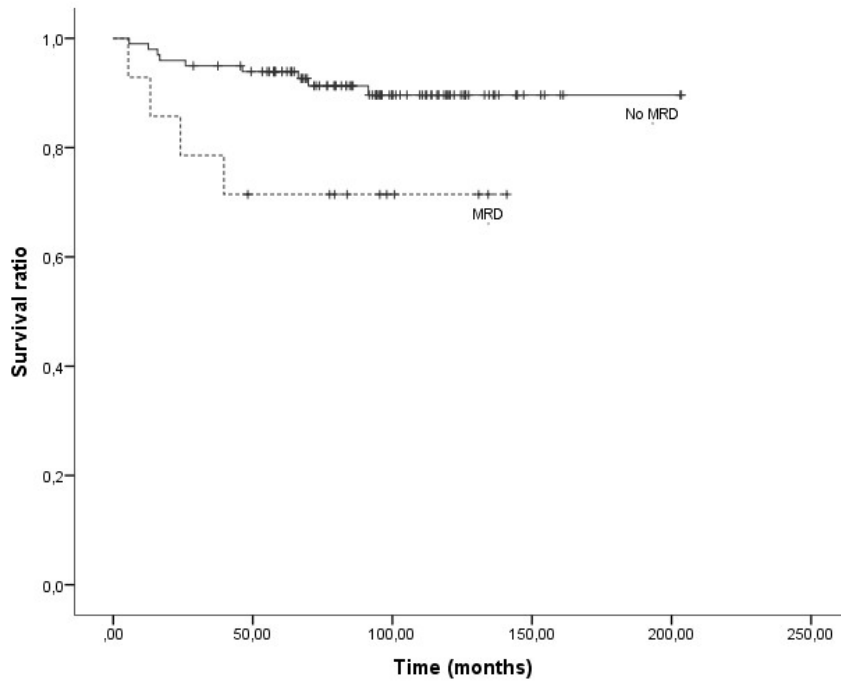
B



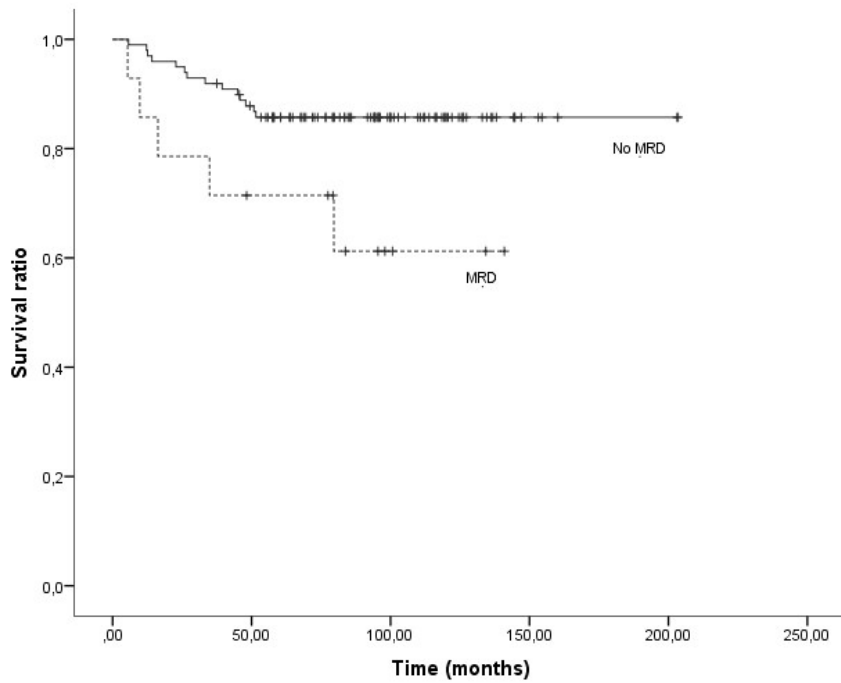
**Figure S2. Kaplan–Meier survival curves of childhood ALL patients according to cytogenetic risk group.** Patients of the good cytogenetic risk group had better survival than patients of the intermediate risk group. Surprisingly, patients of the adverse cytogenetic risk group had also very good survival. This could be partially explained because five of the six cases with adverse cytogenetics harbored the t(9;22) and they received *imatinib* treatment, followed in some cases by an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in first complete remission,

with no subsequent events (A, OS 100% for adverse and good, 82% for intermediate,  $p=0.004$ ;  
B, EFS 100% for adverse, 93% for good, 80% for intermediate,  $p=0.085$ ).

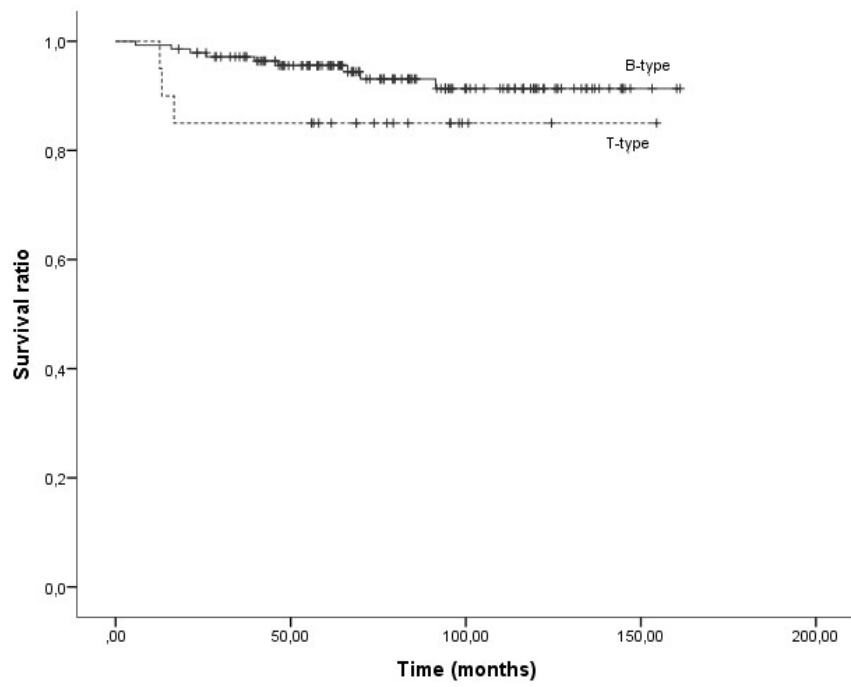
A



B

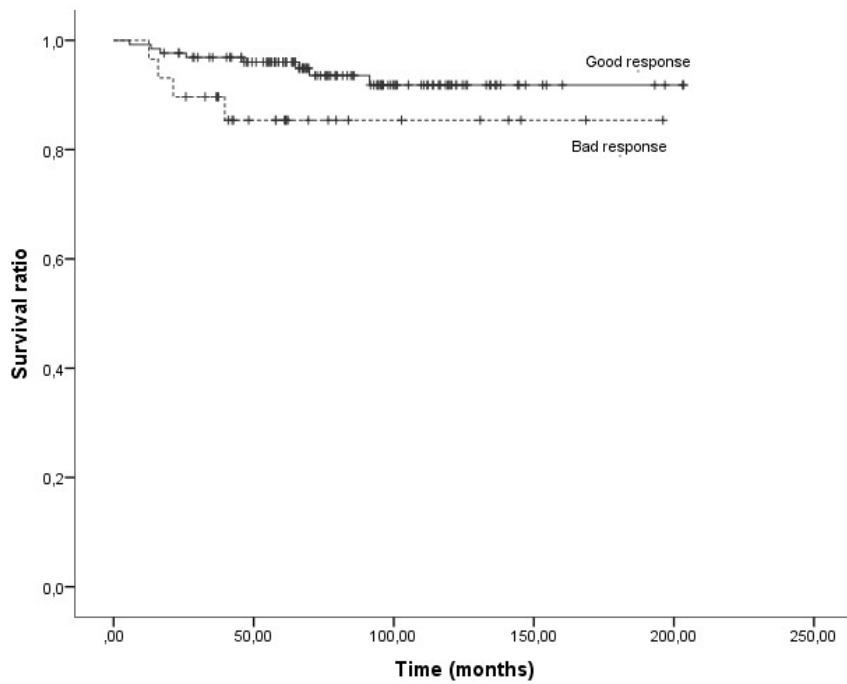


**Figure S3. Kaplan–Meier survival curves of childhood ALL patients according to MRD.** Patients with no detectable MRD had better survival than the others (A, OS 90% vs. 71%,  $p=0.024$ ; B, EFS 86% vs. 61%,  $p=0.028$ ).

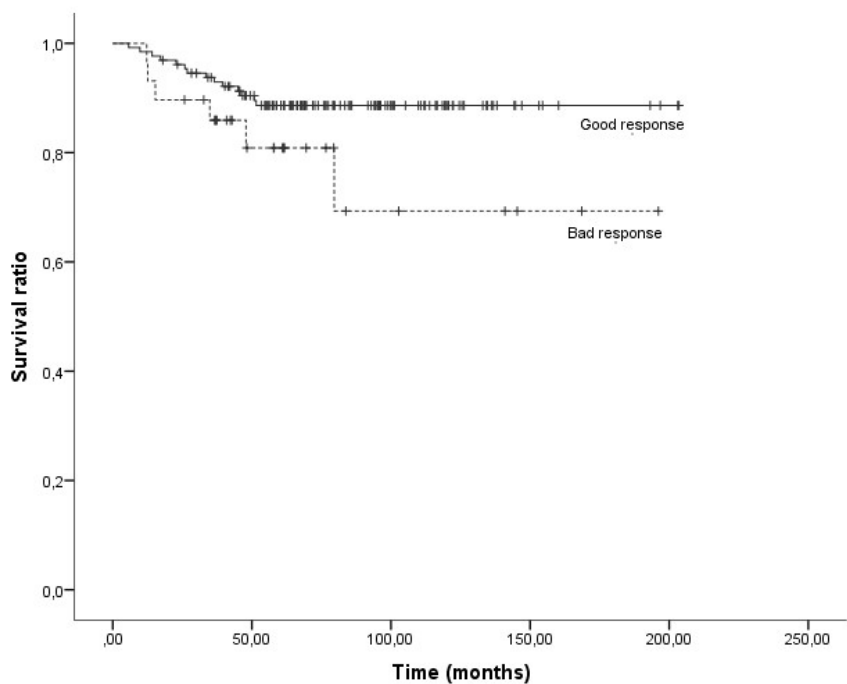


**Figure S4. Kaplan–Meier survival curves of childhood ALL patients according to leukemia type.** Patients with T-cell ALL showed a statistical trend to a worse survival than patients with B-cell precursor ALL (A, OS 91% vs. 85%,  $p=0.168$ ).

A



B



**Figure S5. Kaplan–Meier survival curves of childhood ALL patients according to early response.** Patients with good early response showed better survival than the others, even though differences were not statistically significant (A, OS 92% vs. 85%,  $p=0.085$ ; B, EFS 89% vs. 69%,  $p=0.088$ ).



## **2.2 RISK OF DEVELOPING THERAPY-RELATED MYELOID NEOPLASM AND POLYMORPHISMS IN *MDM2* AND *TP53* GENES**

**RISK OF DEVELOPING THERAPY-RELATED MYELOID NEOPLASM AND  
POLYMORPHISMS IN *MDM2* AND *TP53* GENES**

**Maria Cabezas<sup>1</sup>, Lydia García-Quevedo<sup>1</sup>, Cintia Alonso<sup>1</sup>, Marta Manubens<sup>1</sup>, Yolanda Álvarez<sup>1</sup>, Joan Francesc Barquinero<sup>1</sup>, Santiago Ramón y Cajal<sup>2</sup>, María Rosa Caballín<sup>1</sup>, Gemma Armengol<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Unit of Biological Anthropology, Department of Animal Biology, Plant Biology and Ecology, Faculty of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Catalonia, Spain

<sup>2</sup> Department of Pathology, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Catalonia, Spain

**\*Corresponding author:**

Gemma Armengol  
Unit of Biological Anthropology  
Department of Animal Biology, Plant Biology and Ecology, Faculty of Biosciences,  
Universitat Autònoma de Barcelona,  
08193-Bellaterra, Catalonia  
Spain

## ABSTRACT

One of the most severe complications after successful cancer therapy is the development of a secondary cancer, mostly an acute leukemia of myeloid lineage (t-MN). Constitutional genetic variation is likely to impact on an individual's risk of developing t-MN. We aimed to evaluate if polymorphisms in the p53 pathway can be useful for predicting t-MN susceptibility. First, 45 patients and 66 controls were genotyped for the *TP53* Arg72Pro polymorphism and *MDM2* SNP309. Results revealed that the Pro variant of *TP53* and the G allele of *MDM2* were associated with a high risk of t-MN. Other authors have reported that the Arg variant is more efficient at inducing apoptosis whereas the Pro variant is a more potent inductor of cell cycle arrest and DNA repair. As regards to *MDM2* SNP309, the G allele has been shown to be associated with higher levels of MDM2 expression, and subsequent attenuation of the p53 apoptotic response after exposure to chemotherapy agents. Second, to evaluate the biological effect of the *TP53* polymorphism, we established Jurkat isogenic cell lines expressing p53Arg or p53Pro and assessed the number of  $\gamma$ -H2AX foci, chromosome alterations, sister chromatid exchanges, and apoptotic cells, as well as development of chromosomal alterations typical of t-MN, after treatment with busulfan, an alkylating agent, or doxorubicin, a topoisomerase II poison. Jurkat p53Arg cells presented more  $\gamma$ -H2AX foci per cell, higher level of DNA damage (more chromosome aberrations and more sister chromatid exchanges) and higher apoptotic potential than p53Pro cells. Only Jurkat p53Pro cells presented the t(15;17) *PML/RARA* translocation and del(5q). We suggest that failure to repair DNA lesions in Jurkat p53Arg cells would lead them to apoptosis, whereas some Jurkat p53Pro cells, prone to cell cycle arrest and DNA repair, could undergo misrepair, generating chromosomal translocations or deletions typical of t-MN.

## INTRODUCTION

Therapy-related myeloid neoplasms (t-MN) include therapy-related acute myeloid leukemia (t-AML) and therapy-related myelodysplastic syndrome (t-MDS), which in most cases will progress to overt AML. They are neoplastic hematopoietic disorders occurring as a late complication after chemotherapy and/or radiation therapy used to treat other malignancies. T-MN constitute the most frequent secondary neoplasias, and their incidence has risen dramatically over the last years, as both the number of patients receiving cytotoxic agents and the population of long-term cancer survivors have increased (Morton et al. 2013). Collected data suggest that up to 20% of patients treated for a primary cancer develop t-MN (Morton et al. 2014) with latency periods between diagnosis of the primary disease and occurrence of t-MN ranging between several months to several years (Godley & Larson 2008). Patients with t-MN are typically resistant to conventional treatment and are considered to have an inferior outcome compared with de novo MN (Kayser et al. 2011).

Cytotoxic agents like alkylating agents and topoisomerase II poisons in addition to radiotherapy are associated with t-MN. Depending on the therapeutic agent used to treat the primary cancer, two types of t-AML can be distinguished. The most common, comprising 75-90% of cases, occurs 5 to 10 years after exposure to alkylating agents or radiation, and is frequently accompanied by clonal unbalanced cytogenetic abnormalities, such as the loss of part or all of chromosomes 5 or 7 or both (Smith et al. 2003; Godley & Larson 2008). It is preceded frequently by MDS and mutations of the *TP53* tumor suppressor gene are also common (Leonard et al. 2002). The less common subtype arises after treatment with drugs targeting topoisomerase II. It is characterized by a typical latency of only 1 to 5 years, previous MDS is rare, and it harbors balanced rearrangements involving *MLL* at 11q23 or less often *RUNX1* at 21q22 or t(15;17) *PML/RARA* (Schoch et al. 2004; Pedersen-Bjergaard et al. 2008; Godley & Larson 2008).

Alkylating agents are widely used chemotherapeutic drugs and play an important role in the treatment of several types of cancers. These drugs can be divided into monofunctional or bifunctional alkylating agents. Among the latter are chloroethyl

nitrosoureas, alkylsulfonates (such as busulfan) and nitrogen mustards. Bifunctional alkylators can produce monoadducts and intra- or interstrands diadducts in DNA, generating subsequent crosslinks. The cytotoxicity of these drugs appears to be related to the amount of diadducts, because they can stall DNA replication and finally lead to the formation of double strand breaks (DSBs). Moreover, there is a direct correspondence between the diadduct/monoadduct ratio and leukemogenicity (reviewed in Guillem & Tormo 2008; Casorelli et al. 2012).

Topoisomerase II poisons are also used for the treatment of a wide variety of cancers and include both intercalating agents (e.g. anthracyclines, such as doxorubicin) and non-intercalating epipodophyllotoxins. These drugs stabilize the otherwise transient DNA-topoisomerase complex and inhibit the ligase activity of topoisomerase II, leaving the DNA with permanent DSBs. They effectively block DNA replication, as well as transcription. Moreover, covalent DNA adducts and production of reactive oxygen species have also been documented after treatment with anthracyclines (reviewed in Guillem & Tormo 2008; Casorelli et al. 2012).

Apart from killing tumoral cells, alkylating agents and topoisomerase II poisons can also induce high levels of DNA damage (mainly DSBs) in rapidly dividing non-tumoral cells, such as hematopoietic progenitor cells. These DSBs can be repaired by homologous recombination repair (HRR) or non-homologous end joining (NHEJ). However, misrepair of these highly mutagenic lesions can lead to chromosomal aberrations and genomic instability that can induce leukemic transformation of cells and can ultimately give rise to t-MN, if accompanied by inappropriate avoidance of cell death. Otherwise, failure to repair DNA DSB, if DNA damage is irreversible, results in an apoptotic response and cell death (reviewed in Guillem & Tormo 2008). Interestingly, there is evidence of large inter-individual variations in DNA repair capacity, which may be due to differences in genetic makeup (Nagel et al. 2014). In this regard, a good constitutive capacity for DSB repair and/or apoptosis could be crucial for avoiding malignant stem cell transformation and leukemogenesis associated with the clinical use of some cytotoxic drugs. Noteworthy, only a subset of all patients exposed to genotoxic therapy develop t-MN. Moreover, individuals who develop a t-MN are at particular high risk of developing multiple subsequent cancers (Armstrong et al. 2011).

Overall, these data suggest that genetic factors may contribute to t-MN risk. Studying the heritable predisposition to t-MN is of paramount importance, since the identification of patients prone to develop it, would enable planning treatment protocols designed to minimize risk. Not surprisingly, several studies have identified polymorphisms associated with increased t-MN susceptibility in a number of genes involved in drug metabolism or DNA repair (reviewed by Bhatia 2015). However, most of these studies have produced inconclusive results. This might be due in part because many of these works used healthy individuals or *de novo* MN samples as a reference group, instead of patients who had undergone therapy for a primary tumor but have not developed t-MN some years later. So far, five studies have used an appropriate comparison group (Woo et al. 2000; Blanco et al. 2002; Collado et al. 2005; Guillem et al. 2007; Ding et al. 2012) and only two of them observed positive association with candidate genes, particularly with genes involved in DNA repair and apoptosis (*TP53*) and in DNA synthesis/repair (*MTHFR*) (Guillem et al. 2007; Ding et al. 2012). Ding et al. (2012) observed synergistic impact of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *TP53* and *MTHFR* on t-MN after Hodgkin lymphoma; however, Guillem et al. (2007) reported that *MTHFR* risk haplotype is different according to the primary neoplasia. Therefore, it seems that *TP53* polymorphic variants might be related to a higher risk of t-MN. These studies need further replication and extension with functional approaches (Bhatia 2015).

The p53 protein, when upregulated after genotoxic stress caused by anticancer therapy, for example, induces pathways that ultimately lead to either cell cycle arrest and DNA damage repair or apoptosis. Interestingly, the *TP53* gene harbors a common SNP that results in expression of either arginine (Arg) or proline (Pro) at codon 72, the Arg72Pro polymorphism. There is experimental evidence that the Arg variant is significantly more efficient at inducing apoptosis, whereas the Pro variant is a more potent inductor of cell cycle arrest and DNA repair (Thomas et al. 1999; Pim & Banks 2004; Siddique & Sabapathy 2006). Ding et al. (2012) observed a higher risk for t-MN after lymphoma among Pro carriers of the Arg72Pro polymorphism.

Notably, Ellis et al. (2008) observed that individuals carrying both the *TP53* Pro allele and the *MDM2* G allele are at increased risk of t-AML, although neither polymorphism

alone was associated with t-AML. The MDM2 protein is an important negative regulator of p53. MDM2 has been shown to inhibit p53 by regulating its nuclear export, its capacity as a transcriptional activator and its stability (reviewed in Vazquez et al. 2008). It has been observed that a SNP located in the core promoter of *MDM2* (SNP309, T/G) affects binding of the transcription factor SP1. Particularly, the G-allele is bound more efficiently by SP1 than the T-allele, resulting in high levels of MDM2 mRNA and protein, and subsequent attenuation of the p53 response (Bond et al. 2004).

In the present study, we wanted to investigate whether polymorphisms in the p53 pathway can be useful for predicting t-MN susceptibility. First, we aimed at confirming that the Pro variant of Arg72Pro polymorphism at *TP53* and the G allele at *MDM2* SNP309 has an influence on the t-MN risk comparing the genotypes of a series of patients with this disease versus an appropriate control group. Moreover, we wanted to compare in a cell-based model (after treatment with an alkylating agent or a topoisomerase II poison) the differences between the two *TP53* polymorphic variants concerning i) number of DNA DSBs, measured by counting phosphorylated H2AX ( $\gamma$ H2AX) foci (Rogakou et al. 1999), ii) levels of DNA damage, measured as chromosome breaks or sister chromatid exchanges (SCEs), iii) number of apoptotic cells, and finally iv) development of chromosomal aberrations typical of t-MN after a long term culture.

## **PATIENTS & METHODS**

### *Patients*

The study comprised 45 patients with t-AML or t-MDS, whose samples were obtained from the Laboratory of Clinical Analysis, Balagué Center, Barcelona, which received samples from all over Spain. Clinico-biological characteristics of t-MN patients are shown in Table 1. The study also included a control group of 66 patients (37 males and 29 females) that had been diagnosed with acute leukemia at Vall d'Hebron Hospital, Barcelona, and at Morales Meseguer Hospital, Murcia, Spain, treated with chemotherapy (and in some cases with concomitant radiotherapy) and who 5 years or

more after treatment did not develop a t-NM (mean=103 months, SD=33 months, range=60-199 months). These patients had received various chemotherapy agents, including both alkylating agents and topoisomerase II poisons. All participants in the study were from Caucasian descent. They were informed about the study and provided their consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The research was approved by the ethics committees of the participant hospitals. Any of the patients had undergone bone marrow transplant.

#### *DNA isolation and genotyping*

DNA was extracted from bone marrow cell nuclei in fixative (acetic acid-methanol, 1:3) using the standard phenol-chloroform method or the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following manufacturer's instructions. The first steps were dilution of cell pellet to an OD600 of approx. 1.0 in fixative and removal of the fixative with two PBS washes.

The samples were genotyped for the *TP53* Arg72Pro SNP and the *MDM2* SNP309 by Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method, following the procedure proposed by (Li et al. 2010; Walsh et al. 2007) respectively with the following modifications. PCR was performed in a 20- $\mu$ L (*TP53*) or 25- $\mu$ L (*MDM2*) reaction volume containing 100 ng of genomic DNA, 1x PCR-buffer, 0.2  $\mu$ M of each primer, 200  $\mu$ M dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.5 U Taq polymerase (Promega Corporation, Madison, WI). Cycling conditions were: initial denaturation at 94°C for 5 (*TP53*) or 1 min (*MDM2*) followed by 35 (*TP53*) or 30 (*MDM2*) cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 58°C for 20 s (*TP53*) or 30 s (*MDM2*), and extension at 72°C for 20 s (*TP53*) or 30 s (*MDM2*), and a final extension step at 72°C for 2 min (*TP53*) or 10 min (*MDM2*). The PCR product (10  $\mu$ L) was digested with BstUI (*TP53*) or MspA1 I (*MDM2*) restriction enzymes (10 U/ $\mu$ L; Thermofisher Scientific, Rockford, IL) according to manufacturer's specifications; digestion products were subjected to electrophoresis on a 3% agarose gel. In case of *TP53*, the Arg homozygous genotype (G/G) was cleaved by BstUI and yielded two small fragments (160 and 119 bp), whereas the Pro homozygous genotype (C/C) was not cleaved and yielded a single 279 bp band. The heterozygote showed three bands (279, 160, and 119 bp). Regarding



*MDM2* digestion, the wild-type homozygous genotype (T/T) yielded one band (233 bp), the heterozygous genotype (G/T) yielded three bands (233, 187, and 46 bp) and the other genotype (G/G) yielded two bands (187 and 46 bp).

#### *Cell culture and plasmids*

To directly assess the biological effect of the *TP53* polymorphism on cells treated with chemotherapy agents, we established isogenic cell lines expressing p53Arg or p53Pro. Jurkat cells, which are *TP53* null, and which are derived from a human lymphoblastic T-cell leukemia, were used (American Type Culture Collection, ATCC). Unfortunately, *MDM2* null cells are not viable and such a model could not be constructed for the *MDM2* gene. Jurkat cells were grown in RPMI-1640 medium containing 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 15% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin.

Plasmids expressing either p53Arg (pcDNA3.1-p53Arg) or p53Pro (pcDNA3.1-p53Pro) were kindly donated by Dr. Lawrence Banks and Dr. Miranda Thomas from the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Trieste, Italy (Thomas et al. 1999). Inserts from these plasmids were subcloned into the pLNCX2 retroviral vector to construct pLNCX2-p53Arg and pLNCX2-p53Pro (HindIII and NotI sites) following standard methods.

#### *Cell transfection and retroviral transduction*

To generate cell lines that stably express p53Arg or p53Pro, retroviral production and infection was carried out. First, pLNCX2-p53Arg and pLNCX2-p53Pro constructs were transiently transfected into the Phoenix packaging cell line with jetPEI<sup>®</sup> (Polyplus, Illkirch, France) according to the manufacturer's protocol. For retroviral infection, Jurkat cells were incubated in the presence of the retrovirus-containing supernatant and 4 µg/mL polybrene (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) for 24 h. Infection was repeated the next day. Twenty-four hours after the second infection, medium supplemented with G418 (1 mg/mL, Sigma-Aldrich) was added, and cells underwent selection for 3 days to eliminate uninfected cells. Standard Western blot analysis was carried out to confirm p53 expression.

### *Immunofluorescence staining and analysis of $\gamma$ -H2AX foci*

To assess the kinetics of  $\gamma$ -H2AX foci induction and disappearance following drug treatment, immunostaining of foci and microscopic analysis was performed. Early log phase Jurkat p53Pro and Jurkat p53Arg cells were treated for 2 h with doxorubicin (500 nM) or busulfan (500  $\mu$ M). After treatment, cell cultures were maintained at 37°C for 2.5, 5, 12, 24 and 48 h. Then, cells (30.000 cells/mL) were cytopspun onto glass slides (Menzel-Glaser, Badalona, Spain) at 500 g for 5 min and immunofluorescence staining was performed as previously described (Borràs et al. 2015). Automated slide scanning was done with a Zeiss Axio Imager.Z2 epifluorescence microscope (Metasystems, Altlußheim, Germany) and the MetaCyte software module of the Metafer4 Slide Scanning System v3.10.2 (Metasystems). The images were captured using a 63x PlanApo objective and an SpOr filter. All signals were acquired as a z-stack with 10 focal planes and a z-step size of 0.35  $\mu$ m between planes. A unique classifier was used to count a minimum of 200 cells for each particular experimental condition (a previous experiment with this classifier showed that the number of foci scored in 100 cells is enough to obtain a satisfactory result; Borràs et al. 2015). These experiments were performed two independent times.

### *Chromosome breakage assay*

After treatment with doxorubicin (500 nM) or busulfan (500  $\mu$ M) for 2 h, cells were incubated for 24 h in the presence of colcemid (0.15  $\mu$ g/mL, Gibco Thermofisher Scientific, Barcelona, Spain). Then, cells were collected by centrifugation and hypotonic shock was induced by 0.075 M potassium chloride solution. Cell suspension was fixed in a mixture of methanol and glacial acetic acid (v/v 3:1) and cells were dropped onto slides and air-dried before staining with Leishman stain (Leishman eosin methylene blue solution modified, Merck, Madrid, Spain). One hundred metaphases with 46 chromosomes were analysed for each cell line and for each treatment in a Zeiss Axio Imager Z2 microscope coupled to a Metafer® Slide Scanning System v3.10.2. Chromosome gaps (chrg) and breaks (chrb), as well as chromatid gaps (chtg) and breaks (chtb) were classified according to the International System for Human

Cytogenetic Nomenclature (Shaffer et al. 2013). The experiment was performed two independent times.

#### *SCE assay*

Cells were treated with doxorubicin (500 nM) or busulfan (500  $\mu$ M) for 2 h and then incubated at 37°C for 48 h under the presence of the thymine analogue 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 12  $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich). Colcemid was added at a final concentration of 0.15  $\mu$ g/mL 24 h before harvest. Harvesting, staining and microscope observation was performed as previously mentioned. Before Leishman staining, slides were treated with 0.15 mg/mL Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) for 15 min and then exposed to 254-nm Ultraviolet Crosslinker (UVP, Upland, CA) for an additional 60 min. Then, SCEs were scored in 100 MII cells (in second cell cycle) for each cell line and drug treatment. A SCE was counted each time that two adjacent segments of one of the chromatids in a chromosome were stained differently. These experiments were performed two independent times.

#### *Cell proliferation*

Cell proliferation was measured by the mitotic and proliferation indexes. Mitotic index was calculated as the ratio of the number of mitotic cells in 1000 stimulated nuclei, using the cultures from the chromosome breakage assay and the SCE assay. Proliferation index was determined as  $(MI+2MII+3MIII)/100$  cells, using the cultures from the SCE assay. MI, MII, and MIII are the number of metaphase cells from the first, second and third cell cycle, respectively, according to the pattern of chromatid staining.

#### *Apoptosis assay*

To measure apoptosis after drug treatment, the Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche, Basilea, Switzerland) was used following manufacturer's instructions. Cells were treated with 500 nM of doxorubicin or 500  $\mu$ M of busulfan during 16 h and 24 h in a cellular incubator at 37°C. After labeling with Annexin-V-FLUOS, we determined the proportion of apoptotic cells using an Olympus BX-60 epifluorescence microscope (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan) equipped with FITC, Cy3 and DAPI filters, and a 50x

Plan objective. Three independent experiments were performed analysing 1000 cells for each particular experimental condition.

#### *Fluorescence in situ hybridization (FISH)*

Cell cultures treated with doxorubicin (500 nM) or busulfan (500  $\mu$ M) for 2 h were grown for 100 days. Then, colcemid (0.15  $\mu$ g/mL) was added 2 h before harvesting as previously mentioned. FISH assay was performed with the following probes for chromosomal alterations typical of t-MN: *MLL* dual color break apart rearrangement probe, t(15;17) *PML/RARA* dual color translocation probe, XL 5q31/5q33/5p15 locus-specific probe and a probe centromere-specific for chromosome 7 (CEP7). All the probes used were from Vysis, Downers Grove, IL, except chromosome 5 probe, which is from MetaSystems Probes, Heidelberg, Germany. Experiments were conducted as previously described (Armengol et al. 2010). The cut-off points for positive values were established as the mean of false positives in 1000 nuclei from bone marrow of five controls with no hematological malignancies plus three standard deviations. These cut-off values were 1.5 % for *MLL* rearrangements, 3.2% for t(15;17) *PML/RARA*, 1.1% for del5q31, 1.2% for del5q33, 1.5% for del5q31-q33, and 9.8% for monosomy of chromosome 7.

#### *Statistical analysis*

Hardy-Weinberg equilibrium was explored for the two SNPs using a chi-square test. Test of association between *TP53* or *MDM2* polymorphisms and risk of developing t-MN was performed using the R 3.3.1 package (<http://www.r-project.org/>). Specifically, SNPassoc library (González et al. 2007), which implements logistic regression methods under five different genetic models (codominant, dominant, recessive, overdominant and log-additive), was used. Chi-square or Fisher exact test was used to assess association combining *TP53* and *MDM2* polymorphisms.

To compare number of  $\gamma$ H2AX foci, chromosome/chromatid breaks, SCE or number of apoptotic cells between Jurkat p53Pro and Jurkat p53Arg cells after drug treatment, first, normality of distribution of these parameters was tested with Kolmogorov-Smirnov test (with Lilliefors correction) or Shapiro-Wilk test. In case of compliance with

normal distribution, a parametric test (t-student) was used. Otherwise, the nonparametric Mann–Whitney test was applied. All these statistical analyses were carried out using SPSS v22.0 software. To compare the mitotic index between Jurkat p53Pro and Jurkat p53Arg cells after drug treatment, a z-test was applied with a z-score calculator for two population proportions (<http://www.socscistatistics.com/tests/ztest>).

## RESULTS

### *SNP genotyping of TP53 and MDM2*

Forty and 39 t-MN samples were successfully genotyped for the *TP53* Arg72Pro polymorphism and the *MDM2* SNP309, respectively. Regarding controls, 54 samples were successfully genotyped for the *TP53* Arg72Pro polymorphism and 47 for the *MDM2* SNP309. There were 34 t-MN samples and 35 controls with genotype information for both *TP53* and *MDM2* genes. Unfortunately, not all samples could be genotyped for both genes due to lack of good-quality DNA. Table 2 shows the genotype distribution of both SNPs. *TP53* followed Hardy-Weinberg equilibrium, but not *MDM2* ( $p=0.04$ ). Statistical analysis showed that the Pro variant of the *TP53* Arg72Pro polymorphism was more frequent in the patients with secondary leukemia; however, the association was not statistically significant, probably due to the small population size (log-additive model: OR=1.69, 95% confidence interval [CI]=0.90-3.17,  $p=0.096$ ; recessive model, Pro/Pro vs. Arg/Arg + Pro/Arg: OR=3, 95% CI=0.70-12.82,  $p=0.125$ ). On the other hand, *MDM2* SNP309 was highly significantly associated with t-MN risk in log-additive model (OR=2.49, 95% CI=1.34-4.61,  $p=0.002$ ), in dominant model (T/G + G/G vs. T/T: OR=3.75, 95% CI=1.51-9.31,  $p=0.003$ ) and in codominant model (T/G vs. T/T: OR=3.09, 95% CI=1.14-8.35; G/G vs. T/T: OR=5.60, 95% CI=1.58-19.87;  $p=0.009$ ). These associations were maintained after adjustment by sex. Synergistic effect of both genes was tested and significant association was found between *TP53* and *MDM2* genotypes and risk of t-MN. The *TP53* Arg/Arg and *MDM2* T/T genotype was underrepresented in t-MN patients compared to non-t-MN individuals (6% vs. 29%,  $p=0.013$ , chi-square test). Moreover, the only case with the

*TP53* Pro/Pro and *MDM2* G/G genotype had a t-MDS. The *TP53* Arg/Arg or Pro/Arg and *MDM2* T/T genotype was less frequent in t-MN patients compared to non-t-MN individuals (18% vs. 40%,  $p=0.041$ , chi-square test), whereas the *TP53* Pro/Pro and *MDM2* G/G or T/G genotype was more frequent in t-MN patients, even though differences were not statistically significant (9% vs. 0%,  $p=0.114$ , Fisher exact test).

#### *Analysis of $\gamma$ -H2AX foci*

We next addressed *in vitro* whether the two polymorphic variants of *TP53* result in distinct cellular responses to anticancer drugs in isogenic Jurkat cell lines expressing p53Arg and p53Pro. First,  $\gamma$ -H2AX foci kinetics was assessed after drug treatment (Figure 1, Table 3). We observed foci ( $>1$  foci/cell) after 2.5 h in cells treated with busulfan and after 5 h in cells treated with doxorubicin. After foci were detectable, Jurkat p53Arg cells presented significantly higher number of foci per cell than Jurkat p53Pro cells at all times tested and for both treatments, except at 48 h in doxorubicin- and busulfan-treated cells ( $p$  values are shown in Table 3). Maximum values of  $\gamma$ -H2AX foci were detected at 15-20 h post-treatment for Jurkat p53Arg, and at 5-15 h for Jurkat p53Pro.

#### *Chromosome breakage assay and SCE assay*

We evaluated the effect of the *TP53* polymorphism on the number of breaks on chromosomes or chromatids in the p53Pro- and p53Arg-expressing isogenic cell lines 24 h after drug treatment. Jurkat p53Arg cells had statistically significantly higher number of chtb ( $p=0.016$ ) and total chromosome aberrations ( $p=0.018$ ) than Jurkat p53Pro cells after treatment with busulfan (Figure 2A). On the other hand, Jurkat p53Arg cells treated with doxorubicin had more chtb than Jurkat p53Pro cells but differences were not statistically significant ( $p=0.184$ ); moreover, they had statistically significantly higher number of chrb ( $p=0.012$ ) and total chromosome aberrations ( $p=0.021$ ) than Jurkat p53Pro cells (Figure 2B).

To further investigate the difference in DNA damage induction, we also analyzed the levels of SCE 48 h after drug treatment using the same cells. Consistent with the data from chromosome breakage assay at 24 h, SCE assay demonstrated that Jurkat p53Arg

cells had more SCE per cell than Jurkat p53Pro cells 48 h after treatment with busulfan ( $p=0.02$ ) or doxorubicin ( $p=5 \times 10^{-6}$ ) (Figure 3).

#### *Cell proliferation*

We next evaluated whether mitotic and proliferation indexes would also be affected by p53Arg or p53Pro expression. Untreated Jurkat p53Arg cells and Jurkat p53Pro cells had a mitotic index of 28.8% and 27%, respectively, at 24 h, and 38.1% and 39.6%, respectively, at 48 h. These differences were not statistically significant. However, the cells presented differences in their mitotic index after treatment with drugs (Figure 4). Jurkat p53Arg treated with either busulfan or doxorubicin divided more actively than Jurkat p53Pro both at the 24-h and 48-h cultures ( $p<0.001$  in all cases).

Proliferation index for doxorubicin-treated cells was  $1.32 \pm 0.12$  in Jurkat p53Arg cells and  $1.18 \pm 0.23$  in Jurkat p53Pro cells, whereas for busulfan-treated cells, it was  $1.49 \pm 0.15$  in Jurkat p53Arg cells and  $1.30 \pm 0.09$  in Jurkat p53Pro cells. As it can be observed in Figure 5, Jurkat p53Pro cells presented more cells in MI and less cells in MII than p53Arg cells after chemical treatment, suggesting that more cells were arrested at MI.

#### *Apoptosis assay*

We next determined whether there were any differences in the apoptosis-induction potential between the isogenic cells expressing p53Arg or p53Pro. The results revealed that Jurkat p53Arg cells had a consistently higher level of apoptosis than Jurkat p53Pro cells after treatment with either busulfan or doxorubicin and at all points analyzed, and even with no drug treatment, what corresponds to spontaneous cell death (Figure 6).

#### *FISH analysis*

Then, FISH analysis was carried out to evaluate if Jurkat p53Pro cells presented some of the chromosomal alterations typical of t-AML after a long-term culture of 100 days. The analysis showed that either Jurkat p53Arg or Jurkat p53Pro cells did not present the *MLL* rearrangement after treatment with doxorubicin. Interestingly, Jurkat p53Pro cells had 6.3% and 15.5% of nuclei with the t(15;17) *PML/RARA* translocation in the two experiments performed (Figure 7), whereas Jurkat p53Arg cells did not present the

rearrangement, after treatment with doxorubicin. Many hiperdiploid cells were observed at the doxorubicin-treated cultures: 52% of metaphases in Jurkat p53Pro cells and 51% in Jurkat p53Arg cells, as expected given the implication of topoisomerase II enzyme in sister chromatid separation (reviewed in Pommier et al. 2016). On the other hand, either Jurkat p53Arg or Jurkat p53Pro cells did not present deletion of chromosome 7 after treatment with busulfan, but Jurkat p53Pro cells had deletion at chromosome 5. Two percent of cells and 26.9% of cells presented deletion of 5q33 in the two experiments performed (Figure 8), whereas Jurkat p53Arg cells did not present the rearrangement, after treatment with busulfan.

## DISCUSSION

One of the most severe complications after successful cancer therapy is the development of a secondary cancer, mostly an acute leukemia of myeloid lineage (t-MN). Unfortunately, the number of these therapy-related cancers has constantly increased in the last decades, because cancer patients are now surviving longer. Constitutional genetic variation is likely to impact on an individual's risk of developing such a secondary cancer. Therefore, the analysis of genetic polymorphisms may help to identify patients at high risk of developing t-MN, which might benefit from surveillance and/or from personalized treatment.

In the present study, we investigated the impact of polymorphisms in the p53 pathway on the development of t-MN in a series of 40 t-MN patients and their appropriate controls. We observed that the *TP53* Arg72Pro polymorphism and the *MDM2* SNP309 were associated with t-MN risk, especially when analyzing the synergistic effect of both genes. The Pro variant of *TP53* and the G allele of *MDM2* were overrepresented in t-MN patients as compared to non-t-MN individuals. This confirms previous results by Ellis et al. (2008) for *TP53* and *MDM2* and by Ding et al. (2012) for *TP53*. It is well known that the two forms of p53 at codon 72 have differences in their abilities to induce apoptosis and suppress transformed cell growth (Thomas et al. 1999). As regards to *MDM2* SNP309, the homozygous G/G or heterozygous T/G genotypes have been shown to be associated with significantly higher levels of MDM2 expression in



normal and tumoral cells, accompanied by suppression of p53 and attenuation of the p53 apoptotic response after exposure to chemotherapy agents (reviewed in Vazquez et al. 2008). Moreover, the G allele has been linked to increased cancer risk for many human tumors and in mouse models; however, some other reports have failed to obtain the same results (reviewed in Knappskog & Lønning 2011).

Overall, the above-mentioned reports and the association study presented here suggest p53 pathway as a likely t-MN risk factor. To analyze this further, we developed a cellular model with isogenic Jurkat cell lines expressing the Arg and the Pro variant of the *TP53* Arg72Pro polymorphism, in order to see whether the altered biochemical and/or biological function of p53 due to polymorphisms can have an effect on cells after treatment with chemotherapy agents.

A summary of the results obtained in the cell-based model is shown in Table 4. Regarding  $\gamma$ -H2AX foci, Jurkat p53Arg cells presented more foci per cell than Jurkat p53Pro cells after treatment with busulfan or doxorubicin. Previous studies have reported that  $\gamma$ -H2AX foci analysis can reflect DSB repair capacity: repair-deficient mouse strains and radiosensitive cells/mice present increased foci levels compared to repair-proficient mouse strains and radioresistant cells/mice, respectively (Bouquet et al. 2006; Rube et al. 2008; Borràs-Fresneda et al. 2016). This means that if Jurkat p53Pro cells had fewer DSBs, it is probably due to the fact that expression of the Pro variant results in a significantly higher DNA-repair capacity than the Arg variant, as others have observed (Siddique & Sabapathy 2006). The Pro variant activates transcription of several p53-dependent target genes involved in DNA repair (i.e. GADD45, p48, and p53R2) more efficiently than the Arg form (Siddique & Sabapathy 2006). Moreover, Siddique & Sabapathy (2006) evaluated the correct NHEJ activity, which rejoins broken DNA ends, and observed that the Pro form is more potent than the Arg form in the repair of exogenously damaged plasmids.

Unlike ionizing radiation, most DNA damaging drugs, such as alkylating agents and topoisomerase II poisons, do not induce DSBs directly (see Introduction). This explains why maximum values of  $\gamma$ -H2AX foci were observed several hours after treatment, as other authors have described (Staszewski et al. 2008). Very late counts of as many as

20  $\gamma$ -H2AX foci can correspond to cells with unrepaired DSBs or to cells that are likely to die (Banáth et al. 2010).

Regarding chromosome and chromatid breaks and SCE per cell, again Jurkat p53Arg cells presented higher level of DNA damage than Jurkat p53Pro cells after drug treatment. Siddique & Sabapathy (2006) reported that Pro-expressing cells exhibit reduced micronuclei formation compared to Arg-expressing cells. Later, Litviakov et al. (2010) showed that cancer patients with Pro/Pro genotype have fewer chromatid breaks in comparison to Arg/Pro and Arg/Arg carriers. Moreover, chromosomal radiosensitivity, as measured by the G2-chromosome break assay, has been reported to be associated with polymorphisms in *TP53* codon 72 (Schwartz et al. 2011). In that study, reduced frequencies of radiation-induced chromatid aberrations were observed in cell lines with the Pro/Pro genotype compared to other genotypes.

We observed that chtb was the predominant type of chromosome aberration, as would be expected for the mechanism of action of the two drugs used. Busulfan generates adducts, which cause replication stall during cell division, generating DSBs in the replication fork. If not properly repaired, these DSBs result in chtb in mitosis. On the other hand, doxorubicin inhibits the ligase activity of topoisomerase II, generating DSBs mostly behind the replication fork and near the transcription bubble (Pommier et al. 2016). When DSBs are generated behind the replication fork or during transcription in G2, and if they are not repaired, they result in chtb in mitosis. When generated during transcription in G1, and if breaks in both strands remain unrepaired through S phase, the result will be visible in both chromatids as a chrb in next mitosis (Cortés-Ledesma & Aguilera 2006).

In relation to cell proliferation, we observed that Jurkat p53Arg cells treated with drugs for 2 h and cultured for 24 h and 48 h divided more actively (higher mitotic and proliferation indexes and more MII cells) than Jurkat p53Pro cells, even though mitotic index was low (maximum values were 55% of the untreated cells index). On the other hand, more Jurkat p53Pro cells were arrested at MI. It is known that expression of the Pro variant in cell lines results in a predominant cell cycle arrest in G1 (Sullivan et al. 2004), most likely to allow cells to carry out DNA repair processes.

As for apoptosis, Jurkat p53Arg cells presented higher apoptotic potential than p53Pro cells after treatment with busulfan or doxorubicin for 16 h or 24 h. Back in 1999, Thomas et al. reported that the two forms of p53 had differences in their transcriptional activities and in their abilities to induce apoptosis and suppress transformed growth. Several reports published later confirmed that the Arg variant induces apoptosis more efficiently than does the Pro variant, probably due to its enhanced localization to the mitochondria (Dumont et al. 2003), to its more efficient induction of specific apoptosis-associated genes, eg. NOXA, PUMA, PIGPC1 and AIP1 (Jeong et al. 2010; Sullivan et al. 2004) or even to its ability to escape from negative regulation by iASPP (Bergamaschi et al. 2006).

Finally, we were able to detect the t(15;17) translocation and del5q33 in Jurkat p53Pro cells, but not in Jurkat p53Arg cells, after treatment with busulfan or doxorubicin, respectively, after a long-term culture. This chromosomal abnormalities are likely to be related to DNA breaks that have been repaired aberrantly (Iarovaia et al. 2014). Other authors have reported the t(15;17) translocation in 22% patients with t-AML, especially arising after treatment with anthracyclines (doxorubicin, epirubicin, or daunorubicin) and/or mitoxantrone (Beaumont et al. 2003; Mistry et al. 2005). Moreover, haploinsufficiency of the RPS14 gene on 5q33 has been implicated in the pathogenesis of MN, even though mutations in other genes are needed for the pathogenesis and progression of t-MN.

Figure 8 shows a model of possible mechanisms underlying differences in t-MN risk in patients treated with the same doses of chemotherapy and/or radiation according to the ability of individuals to undergo apoptosis or to repair DNA lesions more or less efficiently related to the *TP53* polymorphism. Taken together, the results from the present study showed that the p53Arg-expressing cells presented an increased rate of DNA damage compared to p53Pro-expressing cells after treatment with the same dose of busulfan or doxorubicin. These lesions were probably incompletely or inefficiently repaired and the apoptotic program was triggered. As most cells with high levels of DNA damage died, no chromosomal abnormalities were observed in Jurkat p53Arg cells. On the other hand, p53Pro-expressing cells had fewer DNA breaks, probably due to cell cycle arrest and DNA damage repair. Therefore, these cells were less prone to

perform apoptosis. In some of these Jurkat p53Pro cells, DNA repair was erroneous, generating chromosomal alterations typical of t-MN observed after a long-term culture.

In conclusion, the association study presented here showed that the Pro variant of Arg72Pro polymorphism at *TP53* and the G allele at *MDM2* SNP309 had an influence on the t-MN risk. Moreover, we observed in isogenic cell lines that the two *TP53* polymorphic variants at codon 72 are functionally distinct; they had different effects on DNA damage levels and on generation of chromosomal aberrations after treatment with an alkylating agent or a topoisomerase II poison. We suggest that these differences may influence t-MN risk. Previous studies have also reported that p53Arg is more efficient in suppressing malignant transformation than p53Pro (Thomas et al. 1999; Jeong et al. 2010). However, the association analysis indicated that there must be other genes, probably from the p53 pathway, that can be modulating the t-MN risk, e.g. *MDM2* SNP309. What is more, other p53 pathway proteins that interact with or are under control of p53 have been found to contain polymorphisms of potential clinical interest, such as ATM and p21, among others (reviewed in Whibley et al. 2009). It will be very important to confirm the effect of p53-pathway polymorphisms on t-MN risk in larger series of t-MN patients and their appropriate controls in a near future.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank all participating patients, families and clinicians who contributed their time and efforts. We thank Jéssica Martínez for her help with the experiments. M.C., Y.A., J.F.B., M.R.C., and G.A. belong to a consolidated research group of the *Generalitat de Catalunya* (2014SGR354). This research was supported by a Ph.D. grant from the *Generalitat de Catalunya* allotted to M.C. (2013FI\_B1076).

## REFERENCES

- Armengol, G. et al., 2010. Genetic changes including gene copy number alterations and their relation to prognosis in childhood acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 51(1), 114–124.
- Armstrong, G.T. et al., 2011. Occurrence of multiple subsequent neoplasms in long-term survivors of childhood cancer: A report from the childhood cancer survivor study. *Journal of Clinical Oncology*, 29(22), 3056–3064.
- Banáth, J.P. et al., 2010. Residual  $\gamma$ H2AX foci as an indication of lethal DNA lesions. *BMC Cancer*, 10(1), 4.
- Beaumont, M. et al., 2003. Therapy-related acute promyelocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 21(11), 2123–2137.
- Bergamaschi, D. et al., 2006. iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. *Nature genetics*, 38(10), 1133–1141.
- Bhatia, S., 2015. Genetic variation as a modifier of association between therapeutic exposure and subsequent malignant neoplasms in cancer survivors. *Cancer*, 121(5), 648–663.
- Blanco, J.G. et al., 2002. Genetic polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4 and NQO1 in children who developed therapy-related myeloid malignancies. *Pharmacogenetics*, 12(8), 605–11.
- Bond, G.L. et al., 2004. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*, 119(5), 591–602.
- Borràs-Fresneda, M. et al., 2016. Differences in DNA Repair Capacity, Cell Death and Transcriptional Response after Irradiation between a Radiosensitive and a Radioresistant Cell Line. *Scientific reports*, 6, 27043.
- Borràs, M. et al., 2015. Comparison of methods to quantify histone H2AX

- phosphorylation and its usefulness for prediction of radiosensitivity. *International Journal of Radiation Biology*, 3002(October), 1–10.
- Bouquet, F., Muller, C. & Salles, B., 2006. The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage. *Cell cycle*, 5(10), 1116–22.
- Casorelli, I., Bossa, C. & Bignami, M., 2012. DNA damage and repair in human cancer: Molecular mechanisms and contribution to therapy-related leukemias. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(8), 2636–2657.
- Collado, M. et al., 2005. Lack of association of CYP3A4-V polymorphism with the risk of treatment-related leukemia. *Leukemia Research*, 29(5), 595–597.
- Cortés-Ledesma, F. & Aguilera, A., 2006. Double-strand breaks arising by replication through a nick are repaired by cohesin-dependent sister-chromatid exchange. *EMBO reports*, 7(9), 919–926.
- Ding, Y. et al., 2012. Genetic susceptibility to therapy-related leukemia after Hodgkin lymphoma or non-Hodgkin lymphoma: role of drug metabolism, apoptosis and DNA repair. *Blood Cancer Journal*, 2(3), e58.
- Dumont, P. et al., 2003. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature genetics*, 33(3), 357–365.
- Ellis, N.A. et al., 2008. MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro interact to alter therapy-related acute myeloid leukemia susceptibility. *Blood*, 112(3), 741–749.
- Godley, L.A. & Larson, R.A., 2008. Therapy-Related Myeloid Leukemia. *Seminars in Oncology*, 35(4), 418–429.
- González, J.R. et al., 2007. SNPassoc: An R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics*, 23(5), 644–645.
- Guillem, V. & Tormo, M., 2008. Influence of DNA damage and repair upon the risk of treatment related leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 49(2), 204–17.

- Guillem, V.M. et al., 2007. Role of MTHFR (677, 1298) haplotype in the risk of developing secondary leukemia after treatment of breast cancer and hematological malignancies. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 21(7), 1413–1422.
- Iarovaia, O. V et al., 2014. Dynamics of double strand breaks and chromosomal translocations. *Molecular cancer*, 13, 249.
- Jeong, B.-S. et al., 2010. Differential levels of transcription of p53-regulated genes by the arginine/proline polymorphism: p53 with arginine at codon 72 favors apoptosis. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(5), 1347–1353.
- Kayser, S. et al., 2011. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood*, 117(7), 2137–2145.
- Knappskog, S. & Lønning, P.E., 2011. Effects of the MDM2 promoter SNP285 and SNP309 on Sp1 transcription factor binding and cancer risk. *Transcription*, 2(5), 207–210.
- Leonard, D.G. et al., 2002. p53 mutations in leukemia and myelodysplastic syndrome after ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 8(5), 973–985.
- Li, F. et al., 2010. Association of p53 codon 72 polymorphism with risk of second primary malignancy in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, 116(10), 2350–2359.
- Litviakov, N. V. et al., 2010. Association between TP53 gene ARG72PRO polymorphism and chromosome aberrations in human cancers. *Molecular Carcinogenesis*, 49(6), 521–524.
- Mistry, A.R. et al., 2005. DNA topoisomerase II in therapy-related acute promyelocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, 352(15), 1529–1538.
- Morton, L.M. et al., 2013. Evolving risk of therapy-related acute myeloid leukemia following cancer chemotherapy among adults in the United States, 1975-2008.

*Blood*, 121(15), 2996–3004.

Morton, L.M. et al., 2014. The rising incidence of second cancers: patterns of occurrence and identification of risk factors for children and adults. *American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO. American Society of Clinical Oncology. Meeting*, e57-67.

Nagel, Z.D., Chaim, I.A. & Samson, L.D., 2014. Inter-individual variation in DNA repair capacity: A need for multi-pathway functional assays to promote translational DNA repair research. *DNA Repair*, 19, 199–213.

Pedersen-Bjergaard, J., Andersen, M.K., Andersen, M.T. & Christiansen, D.H., 2008. Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 22(2), 240–248.

Pim, D. & Banks, L., 2004. P53 Polymorphic Variants At Codon 72 Exert Different Effects on Cell Cycle Progression. *International Journal of Cancer*, 108(2), 196–199.

Pommier, Y., Sun, Y., Huang, S.-Y.N. & Nitiss, J.L., 2016. *Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability.*,

Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. & Bonner, W.M., 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *Journal of Cell Biology*, 146(5), 905–915.

Rübe, C.E. et al., 2008. DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: Implications for radiosensitivity testing. *Clinical Cancer Research*, 14(20), 6546–6555.

Schoch, C. et al., 2004. Karyotype is an independent prognostic parameter in therapy-related acute myeloid leukemia (t-AML): an analysis of 93 patients with t-AML in comparison to 1091 patients with de novo AML. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 18, 120–125.

Schwartz, J.L. et al., 2011. Tp53 codon-72 polymorphisms identify different radiation sensitivities to g2-chromosome breakage in human lymphoblast cells.



*Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52(1), 77–80.

Shaffer, L.G., McGowan-Jordan, J. & Schmid, M. eds., 2013. *ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.*, Basel: S. Karger.

Siddique, M. & Sabapathy, K., 2006. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. *Oncogene*, 25(25), 3489–500.

Smith, S.M. et al., 2003. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: The University of Chicago series. *Blood*, 102(1), 43–52.

Staszewski, O., Nikolova, T. & Kaina, B., 2008. Kinetics of  $\gamma$ -H2AX focus formation upon treatment of cells with UV light and alkylating agents. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49(9), 734–740.

Sullivan, A. et al., 2004. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene*, 23(19), 3328–3337.

Thomas, M. et al., 1999. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Molecular and cellular biology*, 19(2), 1092–1100.

Vazquez, A., Bond, E.E., Levine, A.J. & Bond, G.L., 2008. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(12), 979–987.

Walsh, C.S., Miller, C.W., Karlan, B.Y. & Koeffler, H.P., 2007. Association between a functional single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene and sporadic endometrial cancer risk. *Gynecologic Oncology*, 104(3), 660–664.

Whibley, C., Pharoah, P.D.P. & Hollstein, M., 2009. P53 Polymorphisms: Cancer Implications. *Nat Rev Cancer*, 9(2), 95–107.

Woo, M.H. et al., 2000. Glutathione S-transferase genotypes in children who develop treatment-related acute myeloid malignancies. *Leukemia*, 14(2), 232–7.

Table 1. Clinical characteristics of the t-MN cases (n=45)

<b>Characteristic</b>	<b>n (%)</b>
<b>Sex</b>	
Female	22 (49%)
Male	23 (51%)
<b>Primary diagnosis</b>	
Hematologic malignancies	25 (55%)
Solid tumors	12 (27%)
Unknown	8 (18%)
<b>t-MN</b>	
t-AML	28 (62%)
t-MDS	17 (38%)
<b>Cytogenetic features</b>	
Loss of chromosome 5, 7, or both	16 (35%)
t(11q23), t(21q22), t(15;17) or inv(16)	8 (18%)
Normal karyotype	7 (16%)
Other karyotypes	12 (27%)
Unknown	2 (4%)
<b>Age at t-MN diagnosis*</b> , years	54.47 (14-78) n=19
<b>Latency*</b> , months	47.25 (11-180) n=16

\*Values are median; minimum to maximum in parentheses

Table 2. Genotype distribution for SNPs at *TP53* and *MDM2* in the patients used in this study

SNP and genotype	No. t-MN patients (%)	No. controls (%)
<i>TP53</i> c.215G>C (Arg72Pro)		
Arg/Arg	19 (47.5)	33 (61.1)
Arg/Pro	15 (37.5)	18 (33.3)
Pro/Pro	6 (15)	3 (5.6)
<i>MDM2</i> c.309T>G		
T/T	11 (28.2)	28 (59.6)
T/G	17 (43.6)	14 (29.8)
G/G	11 (28.2)	5 (10.6)

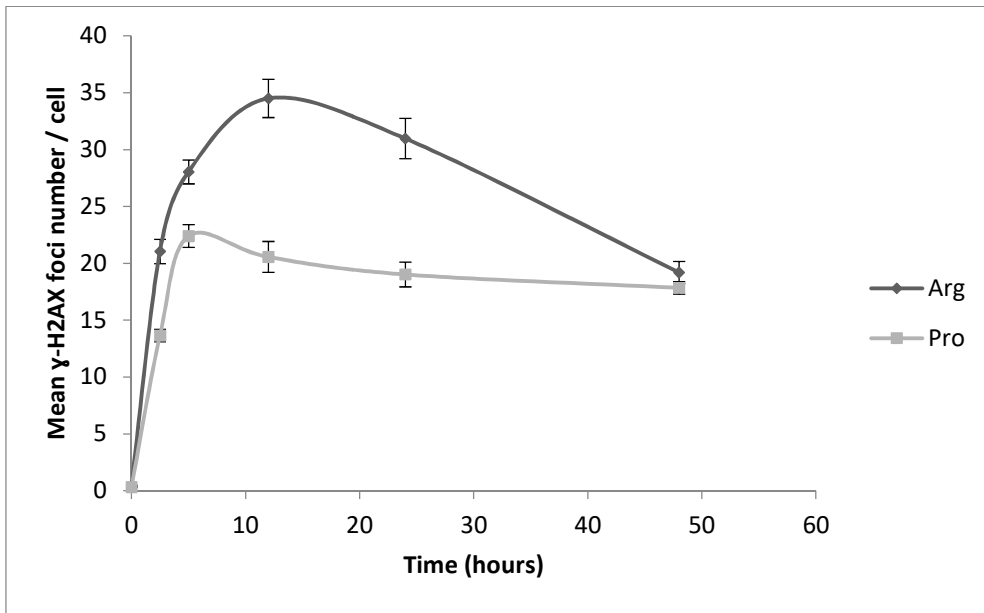
Table 3. Mean  $\gamma$ -H2AX foci number per cell  $\pm$  SEM in Jurkat p53Pro and p53Arg cell lines after treatment with busulfan and doxorubicin

Time	Busulfan			Doxorubicin		
	Jurkat p53Pro	Jurkat p53Arg	P value	Jurkat p53Pro	Jurkat p53Arg	P value
0 h	0.32 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.05	0.073	0.04 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.02	0.079
2.5 h	13.65 $\pm$ 0.54	21.05 $\pm$ 1.07	0.000	0.45 $\pm$ 0.07	0.20 $\pm$ 0.05	0.121
5 h	22.40 $\pm$ 1.00	28.05 $\pm$ 1.05	0.001	6.01 $\pm$ 0.34	8.18 $\pm$ 0.46	0.002
12 h	20.57 $\pm$ 1.36	34.51 $\pm$ 1.68	0.000	39.08 $\pm$ 1.34	43.80 $\pm$ 1.40	0.026
24 h	19.03 $\pm$ 1.10	30.98 $\pm$ 1.77	0.001	30.41 $\pm$ 1.43	49.86 $\pm$ 1.62	0.000
48 h	17.85 $\pm$ 0.56	19.20 $\pm$ 0.96	0.909	24.44 $\pm$ 0.90	23.28 $\pm$ 1.35	0.532

Table 4. Summary of results obtained in Jurkat p53Arg and p53Pro after drug treatment.

Parameter measured	Jurkat p53Arg	Jurkat p53Pro
Number of foci up to 24 h	↑	↓
Number of foci at 48 h	=	=
Number of chromosome alterations at 24 h	↑	↓
Number of SCE at 48 h	↑	↓
Mitotic index at 24 h and 48 h	↑	↓
Proliferation index at 48 h	↑	↓
Cell cycle arrest	↓	↑
Number of apoptotic cells at 16 h and 24 h	↑	↓
Chromosomal translocations at 100-day culture	Absent	Present

A



B

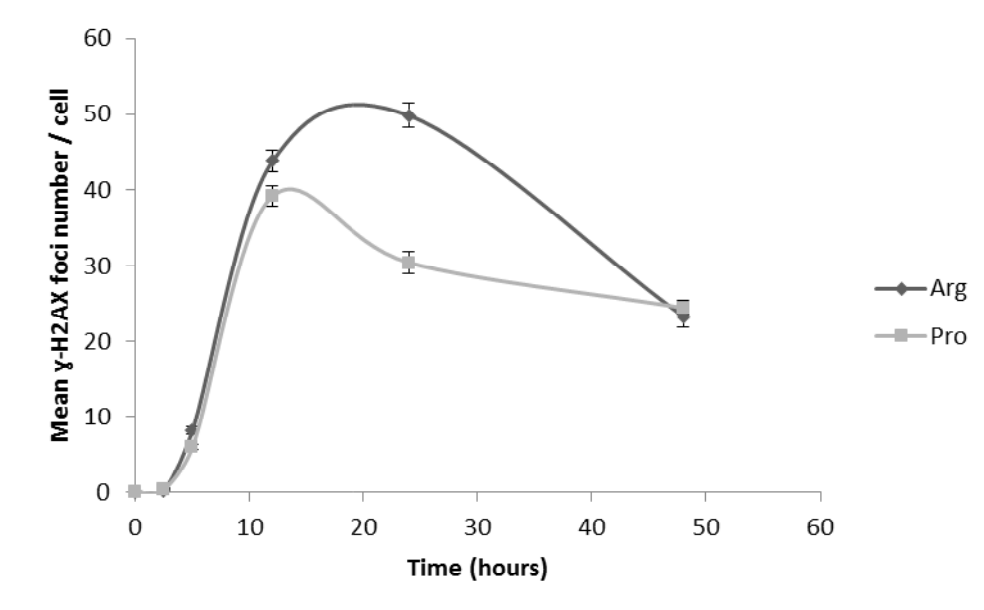
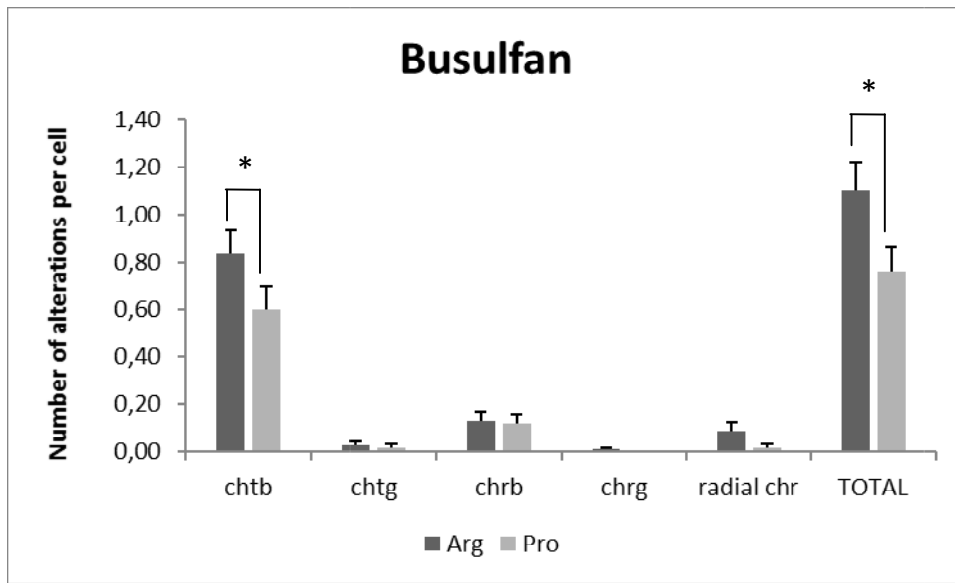


Figure 1. Kinetics of  $\gamma$ -H2AX foci formation and disappearance after treatment with (A) busulfan or (B) doxorubicin for 2 h. Values correspond to means  $\pm$  SEM and results are representative of two independent experiments.

A



B

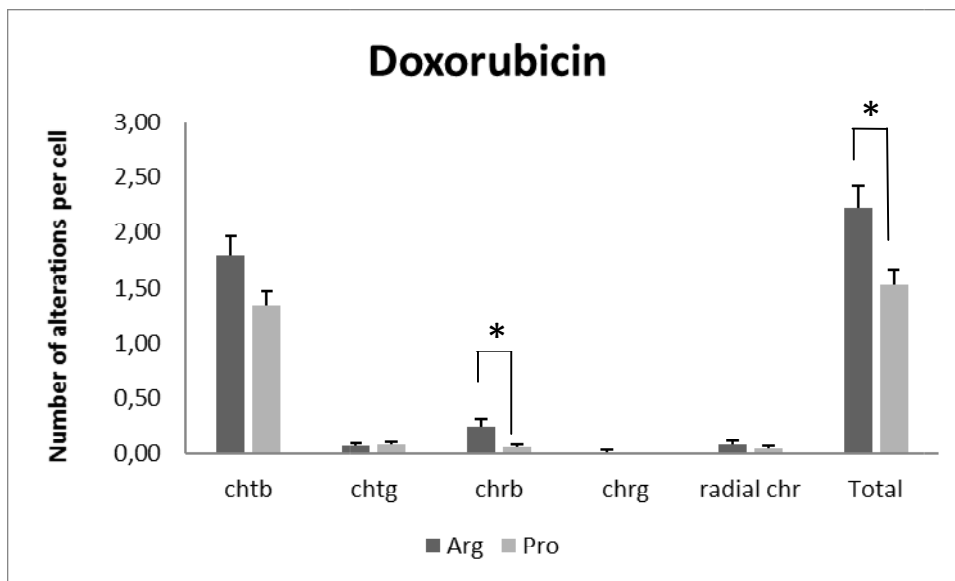


Figure 2. Chromosome alterations per cell (chtb, chtg, chrb, chrg, radial chromosomes) in Jurkat p53Arg and p53Pro treated with (A) busulfan or (B) doxorubicin for 2 h and cultured for 24 h. Data are plotted as means  $\pm$  SEM and results are representative of two independent experiments. Asterisks denote significant differences ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney test).

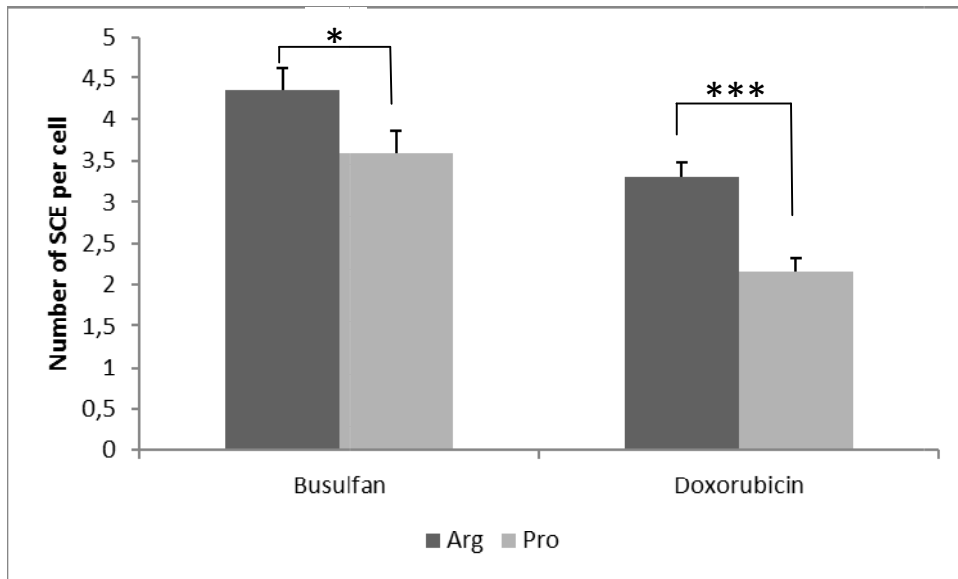


Figure 3. Number of SCE per cell after treatment with busulfan or doxorubicin for 2 h and culture of 48 h. Data are plotted as mean  $\pm$  SEM and results are representative of two independent experiments. Asterisks denote significant differences (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , Mann-Whitney test).

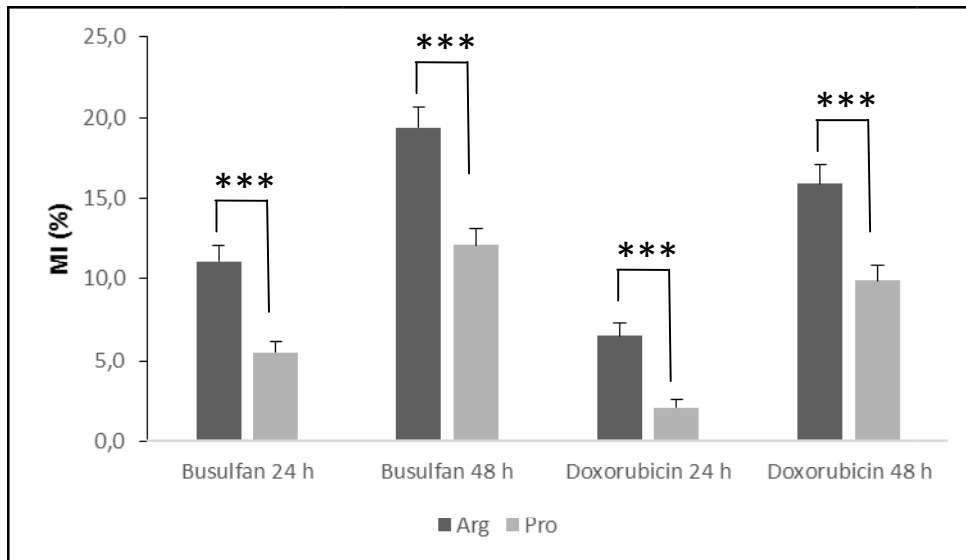


Figure 4. Mitotic index in Jurkat p53Arg and Jurkat p53Pro cells treated with busulfan or doxorubicin for 2 h and cultured for 24 h or 48 h. Results are representative of two independent experiments. Asterisks denote significant differences (\*\*\*,  $p < 0.001$ , z-test).

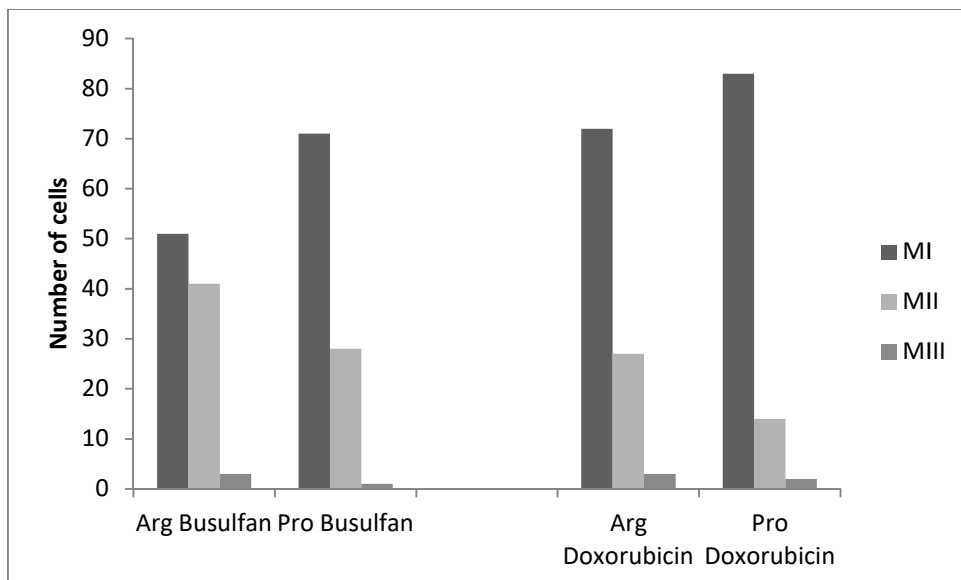
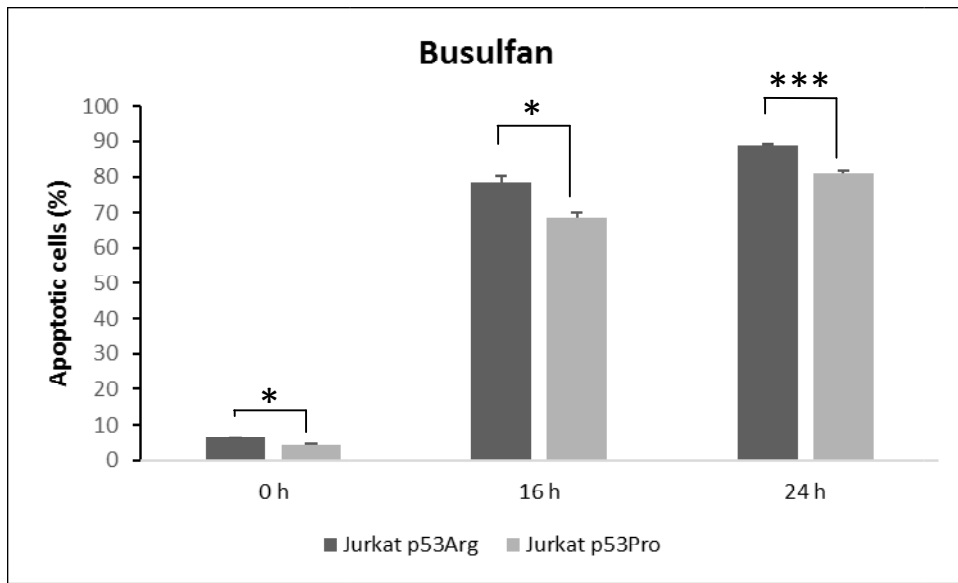


Figure 5. Number of cells at MI, MII, or MIII in Jurkat p53Arg and Jurkat p53Pro cells treated with busulfan or doxorubicin for 2 h and cultured for 48 h. Results are representative of two independent experiments.



A



B

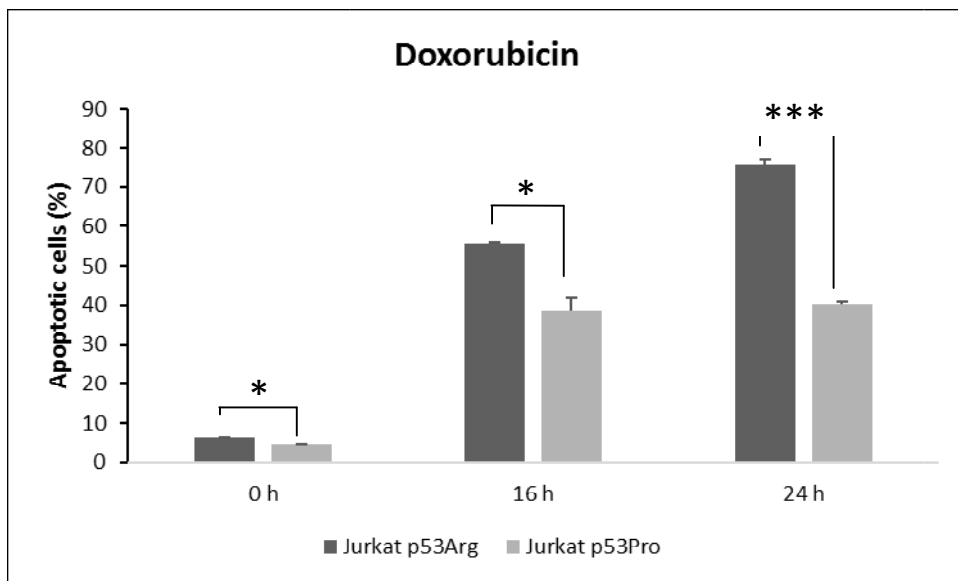


Figure 6. Comparison of apoptosis potential of Jurkat p53Arg and Jurkat p53Pro cells after treatment with busulfan (A) or doxorubicin (B) for 2 h. Data are plotted as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Asterisks denote significant differences (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , t-test).

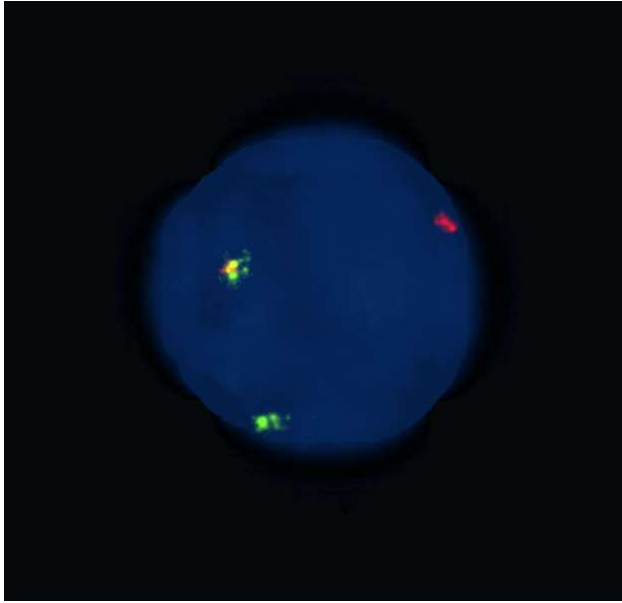


Figure 7. FISH image of a nucleus from the Jurkat p53Pro cell line after a 100-day culture using the translocation PML-RARA specific probe.

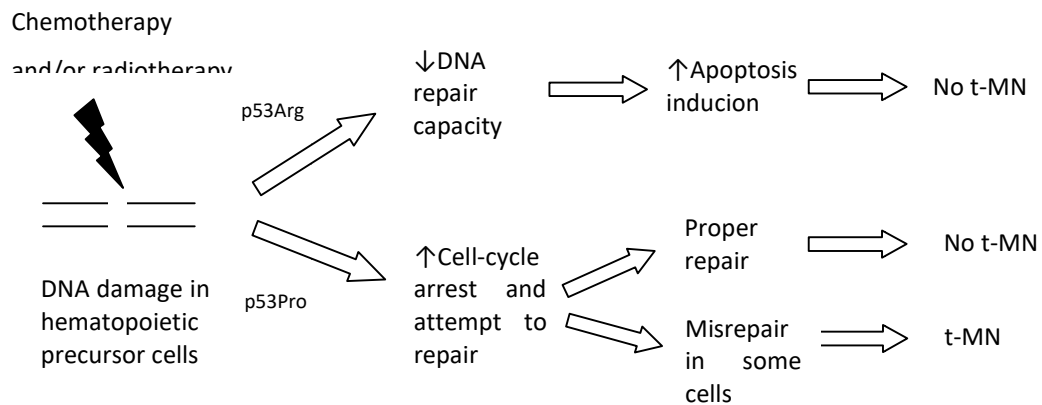


Figure 8. Hypothetical model of t-MN development after treatment with chemotherapy and/or radiotherapy. The capacity of cells to undergo apoptosis or to arrest cell cycle and repair DNA damage more or less efficiently can be influenced by genetic polymorphisms in the p53 pathway, for example, the *TP53* Arg72Pro polymorphism.

## **3. DISCUSSIÓ**

## 3.1 APOPTOSI

Els resultats dels treballs 1 i 2 suggereixen que determinats polimorfismes genètics relacionats amb l'apoptosi podrien estar associats amb els efectes del tractament antitumoral, tant pel que fa a la supervivència dels casos amb LLA infantil, com pel que respecta al desenvolupament de càncer secundari.

### 3.1.1 Apoptosi i carcinogènesi

En les cèl·lules canceroses hi ha un desequilibri entre la taxa de divisió i la de mort cel·lular, i freqüentment les cèl·lules que haurien de morir no reben els senyals necessaris per fer-ho. Kerr et al. (1972) van ser els primers en observar una relació entre l'apoptosi i l'eliminació de cèl·lules potencialment malignes, la hiperplàsia i la progressió del tumor. Per tant, les deficiències en l'apoptosi tenen un paper crucial en la carcinogènesi (revisat per Wong 2011). Hi ha diferents mecanismes mitjançant els quals les cèl·lules neoplàsiques poden presentar una apoptosi deficient, com una alteració en l'equilibri entre les proteïnes pro-apoptòtiques i anti-apoptòtiques, majoritàriament de la via intrínseca, una disminució en l'activitat de les caspases o bé alteracions en la senyalització dels receptors de mort cel·lular (Figura 13) (Wong 2011).

#### 3.1.1.1 Alteració en l'equilibri entre proteïnes pro-apoptòtiques i anti-apoptòtiques

S'han descrit moltes proteïnes que presenten activitat pro- o anti-apoptòtica. Però no és la quantitat absoluta de la proteïna, sinó més aviat la ràtio entre aquestes proteïnes, la que juga un paper important en la regulació de la mort cel·lular. A més, s'ha observat que una expressió elevada o reduïda de determinats gens causa deficiències en l'apoptosi en les cèl·lules cancerígenes. Entre les proteïnes pro- i anti-apoptòtiques hi ha la família de proteïnes BCL-2, la proteïna p53 i els IAPs.

##### 3.1.1.1.1 Família de proteïnes BCL-2

La família de proteïnes BCL-2 regulen la permeabilització de la membrana externa de la mitocòndria; dins d'aquesta família es troben proteïnes pro-apoptòtiques, com PUMA, NOXA, BAX i BAK, i proteïnes anti-apoptòtiques, com BCL-2, BCL-XL i MCL-1. La desregulació de l'apoptosi pel desequilibri en les proteïnes de la família Bcl2 es duu a terme mitjançant la sobreexpressió d'una o més proteïnes anti-apoptòtiques o una

subexpressió d'una o més proteïnes pro-apoptòtiques o la combinació de les dues coses. Per exemple, en el cas de la leucèmia limfocítica crònica, les cèl·lules presenten un fenotip anti-apoptòtic a causa de presentar nivells més elevats de la proteïna anti-apoptòtica BCL-2 i nivells disminuïts de proteïnes pro-apoptòtiques com BAX (Goolsby et al. 2005).

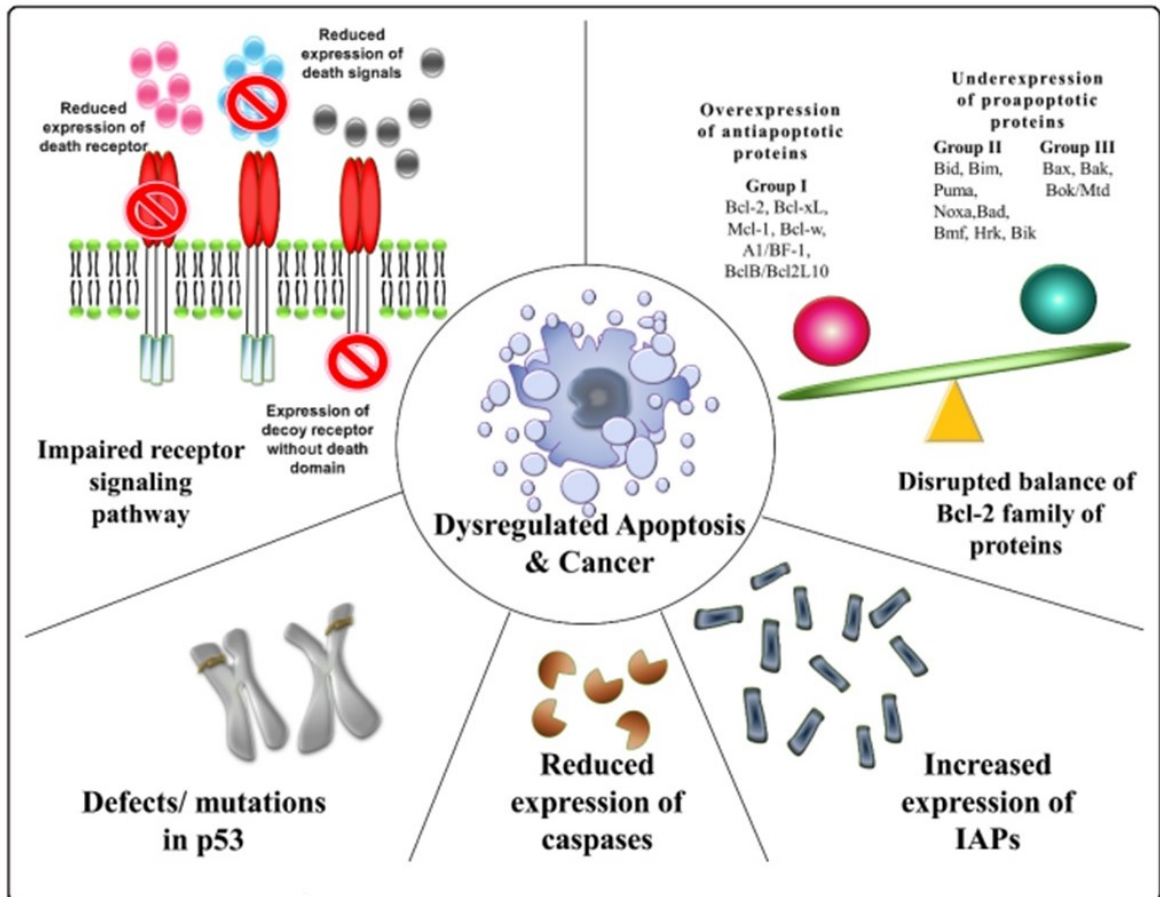


Figura 13. Mecanismes implicats en inhibir l'apoptosi i promoure la carcinogènesi. Modificada de Wong (2011).

### 3.1.1.1.2 P53

p53 està involucrada en una gran varietat de processos cel·lulars importants; una de les funcions més importants és induir l'apoptosi. La interrupció d'aquest procés pot promoure la progressió tumoral i la resistència a quimioteràpia (Fridman & Lowe 2003). Per altra banda, p53 també assegura la fidelitat de la replicació i l'estabilitat genòmica, necessàries per evitar la iniciació i la progressió tumoral.

p53 es pot activar per una àmplia varietat de senyals d'estrès extracel·lulars i intracel·lulars, incloent el dany en el DNA, l'activació d'oncogens, hipòxia, ROS, etc. Aquests senyals d'estrès activen la proteïna p53 a través de modificacions post-traduccionals, com la fosforilació, l'acetilació, la metilació, etc., per estabilitzar-la i augmentar els nivells de proteïna p53 en les cèl·lules (Yue et al. 2017).

Un exemple de dany en el DNA que podria activar p53, serien els DSBs induïts, entre d'altres, pels agents alquilants i els inhibidors de la topoisomerasa II. Si p53 està absent o alterada, degut a alguna mutació, o si funciona menys eficientment, p.ex. degut a la variant Pro al codó 72, les cèl·lules danyades sobreviuen i l'acumulació de lesions oncogèniques pot induir el procés carcinogènic. Per tant, l'apoptosi mediada per p53 proporciona un mecanisme supressor tumoral crucial per eliminar les cèl·lules que sucumbeixen a la inestabilitat genòmica (Figura 14) (Attardi 2005).

La pèrdua de la funció de p53 és sovint un requisit previ de la tumorigènesi, el que ha estat clarament mostrat pel major risc de càncer que presenten els pacients amb la síndrome de Li-Fraumeni, els quals tenen el gen *TP53* mutat i presenten una probabilitat del 50% de desenvolupar càncer abans dels 30 anys; la gran majoria acabaran patint càncer en edats més avançades (Bougeard et al. 2008).

Per altra banda, les mutacions somàtiques en *TP53* que resulten en absència o disfunció de p53 són un dels mecanismes més comuns pels quals la via de p53 és alterada durant la tumorigènesi (Whibley et al. 2009). S'han descrit alteracions en el gen *TP53* en més del 50% de càncers humans (Bai & Zhu 2006). S'han trobat evidències que la majoria d'alteracions en p53 ocorren en estadis tardans de la tumorigènesi en diferents tipus de càncers (Rivlin et al. 2011). A més de les mutacions en *TP53*, s'ha observat que la funció de p53 es troba freqüentment reduïda i la seva senyalització no és funcional a causa de múltiples mecanismes, incloent la sobreexpressió i/o ampliació gènica de diferents reguladors negatius de p53, com ara MDM2, MDM4 (*murine doble minute 4*), COP1 (*coat complex protein 1*), etc. (revisat per Yue et al. 2017).

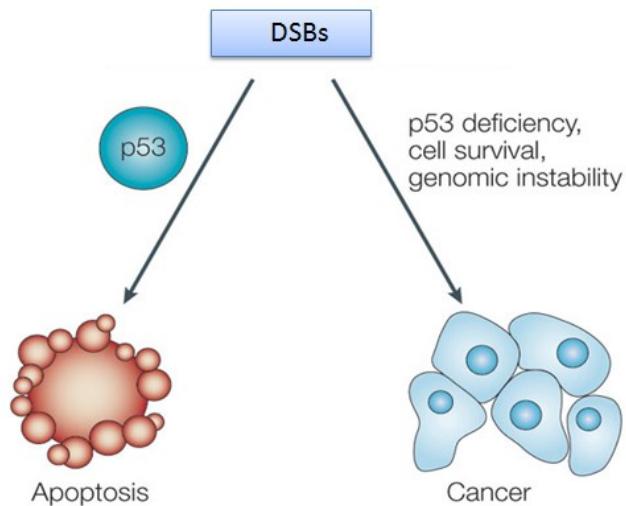


Figura 14. Esquema de com una cèl·lula respon al dany en el DNA (per exemple DSBs) i es dirigeix cap a l'apoptosi o cap a processos carcinogènics segons la funcionalitat de p53. En presència de p53, les cèl·lules amb DSBs solen dur a terme l'apoptosi, el que disminueix la tumorogènesi. Si p53 està absent o deficient, les cèl·lules amb DSBs poden sobreviure, creant un entorn que permet la generació d'inestabilitat genòmica en les cèl·lules i pot conduir a la carcinogènesi. Modificada de Brown & Attardi (2005).

Mentre que el paper clau de la proteïna p53 *wild-type* en la supressió de tumors està ben establert, hi ha evidències recents que han mostrat que en alguns tumors les proteïnes mutades de p53 no només perden la funció com a supressors de tumors, sinó que en alguns casos també poden promoure la tumorogènesi amb guany de funció de p53 (Oren & Rotter 2010; Yue et al. 2017).

### 3.1.1.1.3 Proteïnes IAPs

Els IAPs són un grup de proteïnes que s'assemblen entre elles estructural i funcionalment i que regulen l'apoptosi, la citocinesi i la transducció de senyals. Poden promoure la degradació de les caspases o separar les caspases lluny del seu substrat (Wei et al. 2008). S'ha descrit la desregulació de l'expressió dels IAPs en moltes neoplàsies; per exemple, es va mostrar que Livin, un IAP, està sobreexpressat en melanoma i limfoma (revisat per Wong 2011).

### 3.1.1.2 Disminució de l'activitat de les caspases

Les caspases es poden classificar en dos grups: les relacionades amb la caspasa 1 i les que tenen un paper clau en la iniciació i l'execució de l'apoptosi (Fink & Cookson

2005). S'ha observat que nivells baixos o deficiències en la funció de les caspases poden conduir a baixos nivells de l'apoptosi i promoure la carcinogènesi (Wong 2011). Per exemple, s'ha observat que el gen de la caspasa 8 es troba freqüentment inactivat en neuroblastoma (Teitz et al. 2000).

### ***3.1.1.3 Alteracions en la senyalització dels receptors de mort cel·lular***

Els receptors de mort cel·lular i els seus lligands juguen un paper clau en la via extrínseca de l'apoptosi. S'han identificat diverses anomalies en aquesta via que poden donar lloc a la inhibició d'aquesta via. Per exemple, s'han observat mutacions en el gen *CD95* en malalties autoimmunes, limfomes i LLA-T infantil (revisat per Dechant et al. 2004).

## **3.1.2 Apoptosi i resposta a la teràpia antitumoral**

La teràpia antitumoral pot induir diferents tipus de mort cel·lular, essent la via que implica l'apoptosi la més utilitzada (Russo et al. 2006). Per això, una apoptosi deficient, a més de promoure la iniciació i la capacitat de progressió del tumor, també pot donar lloc a resistència al tractament (Lowe & Lin 2000). S'ha descrit que les mateixes alteracions genètiques que inhibeixen l'apoptosi durant la carcinogènesi també poden modular la sensibilitat al tractament. Per tant, l'èxit de cada estratègia terapèutica depèn principalment de la capacitat de la teràpia per induir l'apoptosi, ja sigui inhibint les proteïnes anti-apoptòtiques sobreexpressades o mitjançant l'estimulació de l'expressió de molècules pro-apoptòtiques (Hassan et al. 2014). Degut a això en alguns casos s'utilitza l'apoptosi com un marcador pronòstic de la resposta al tractament (Russo et al. 2006; Wong 2011).

Cal destacar que algunes de les noves teràpies antitumorals actuen com agents inductors de l'apoptosi, amb grans esperances pels tumors resistents a les teràpies convencionals. Aquests fàrmacs es poden usar sols o en combinació amb la teràpia convencional. Diversos estudis suggereixen que les teràpies dirigides a l'apoptosi tenen un gran potencial; algunes d'aquestes teràpies es centren en actuar sobre les proteïnes de la família BCL-2 o sobre els IAPs, utilitzant estratègies per modificar la seva activitat i reactivar l'apoptosi i, així, eliminar les cèl·lules canceroses (Hassan et al. 2014).



Degut a la proporció significativa de càncers amb alteracions en el gen *TP53*, utilitzar fàrmacs dirigits contra aquest gen és especialment atractiu en el desenvolupament de les noves teràpies antitumorals (Yue et al. 2017). És d'esperar que una millor comprensió dels mecanismes implicats en l'acumulació de mutacions en la proteïna p53 acceleraran el desenvolupament de teràpies antitumorals dirigides (Amaral et al. 2010; Yue et al. 2017).

## 3.2 POLIMORFISMES EN GENS RELACIONATS AMB L'APOPTOSI I EVOLUCIÓ DELS PACIENTS AMB LLA PEDIÀTRICA

Fins on sabem, el treball 1 és el primer que analitza l'associació entre variants en el nombre exacte de còpies en uns gens candidats i el pronòstic de la LLA infantil, i també el primer estudi que analitza un polimorfisme de *TP53* com un possible indicador de l'evolució del tractament en LLA.

### 3.2.1 CNV del gen *GSTM1* i apoptosi

Com ja s'ha esmentat en el treball 1, els nostres resultats suggereixen que *GSTM1* podria esdevenir un marcador genètic de la supervivència en la LLA infantil, ja que els pacients amb el genotip *non-null* de *GSTM1* mostraven una supervivència inferior a la dels nens amb els altres genotips. A més, en l'estudi in vitro les cèl·lules Jurkat *GSTM1 non-null* tenien una menor sensibilitat a un glucocorticoide, com la dexametasona.

Els glucocorticoides juguen un paper crucial en el tractament de la LLA infantil, i la resposta dels pacients a aquests agents quimioteràpics és un factor important per l'evolució clínica dels pacients. Tot i que el mecanisme de com els glucocorticoides indueixen l'apoptosi encara no està del tot clar, s'han pogut identificar algunes vies involucrades, com la via de p38 i la via de NF-Kb (*nuclear factor kappa B subunit 1*). Ambdues són vies de senyalització importants per la regulació de l'apoptosi (Wang et al. 1996; Miller et al. 2005). Per una banda, els glucocorticoides activen p38, que indueix la transcripció de mRNA i la síntesi de BIM. BIM activa BAX directament i la inducció de BAX es correlaciona amb l'inici de l'apoptosi induïda per glucocorticoides (Wang et al. 2003; Willis & Adams 2005; Lu et al. 2006). Per altra banda, s'ha observat que el complex format per la unió entre el glucocorticoide i el seu receptor

interacciona amb NF- $\kappa$ B i inhibeix la seva activitat transcripcional, impedit la seva unió al DNA (Smoak & Cidlowski 2004; Schoneveld et al. 2004). Generalment NF- $\kappa$ B activa l'expressió de gens anti-apoptòtics i inhibeix l'expressió de gens pro-apoptòtics (p.ex. BIM) (Salvesen & Duckett 2002), de manera que quan la seva funció està inhibida degut a la presència de glucocorticoides, s'indueix l'apoptosi.

Hosono et al. (2010) van observar en un model cel·lular que GSTM1 inhibeix l'apoptosi induïda per dexametasona, regulant les vies p38 i NF- $\kappa$ B. En aquest estudi els autors van proposar que GSTM1 causa resistència a la dexametasona mitjançant la supressió de BIM, ja sigui per la inhibició de la via pro-apoptòtica p38 o per l'activació de la via anti-apoptòtica NF- $\kappa$ B (Figura 15). Com a conseqüència, les cèl·lules que expressen GSTM1 no duen a terme l'apoptosi després del tractament amb dexametasona.

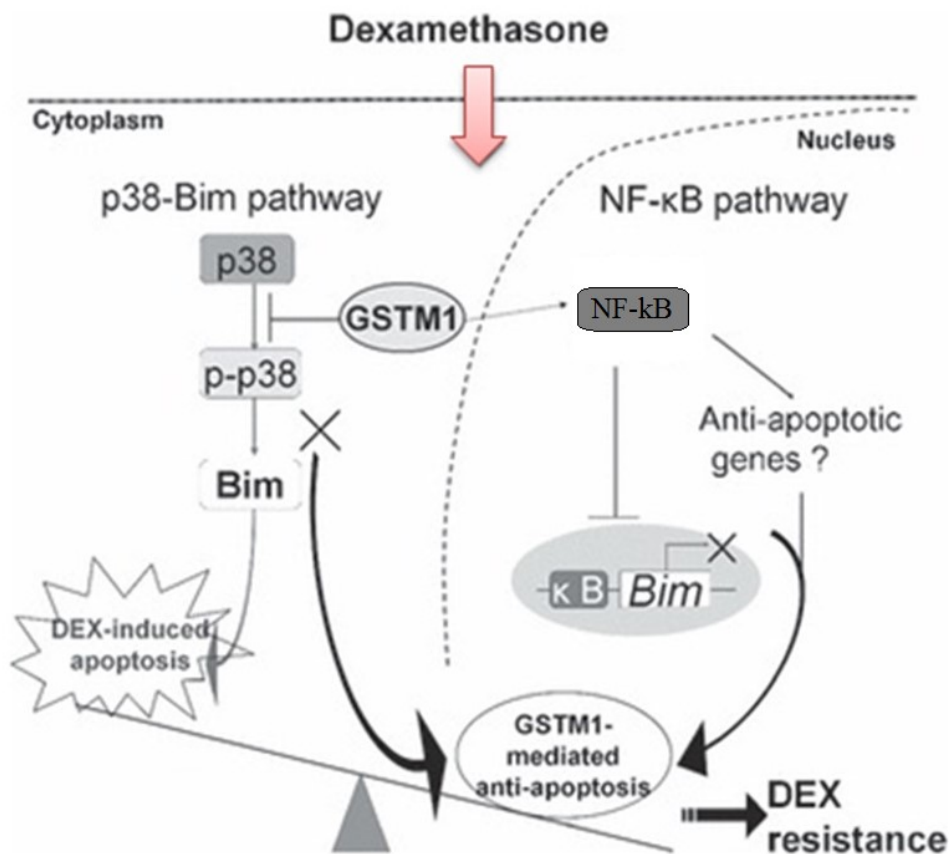


Figura 15. Model hipotètic de com l'expressió de GSTM1 pot induir resistència a la dexametasona. En aquest model, GSTM1 inhibeix BIM, ja sigui per la inhibició de la via pro-apoptòtica p38 o per l'activació de la via anti-apoptòtica NF- $\kappa$ B. La possibilitat de que altres gens contribueixin a inhibir la apoptosi (com els gens anti-apoptòtics *BCL-2*, *BCL-XL*, *MCL1* i *CYCLIND1*) no pot ser descartada. Modificada de Hosono et al. (2010).

Els mecanismes pels quals GSTM1 inhibeix les vies pro-apoptòtiques com la via p38 i NF-kB, o també la via JNK, encara no es coneixen amb detall, però hi ha alguns estudis que han aportat informació sobre el tema. S'ha descrit que GSTM1 interacciona directament amb ASK1 modulant les cascades de senyalització pro-apoptòtica p38 i JNK (Cho et al. 2001; Dorion et al. 2002; McIlwain et al. 2006). La teràpia antitumoral dona lloc a estrès oxidatiu, que provoca l'oligomerització de GSTM1 i la dissociació del complex GSTM1:ASK1, permetent al seu torn l'oligomerització d'ASK1 i la seva autofosforilació. ASK1 fosforilada activa les vies apoptòtiques JNK i p38, que finalment desencadenen l'apoptosi (Saitoh et al. 1998; Cho et al. 2001; Dorion et al. 2002; Ryoo et al. 2004; McIlwain et al. 2006; Sui et al. 2014). En condicions normals, ASK1 mostra poca activitat perquè està segrestat per GSTM1, el qual inhibeix la seva oligomerització (Figura 16) (Saitoh et al. 1998; Cho et al. 2001; Dorion et al. 2002; Ryoo et al. 2004; McIlwain et al. 2006).

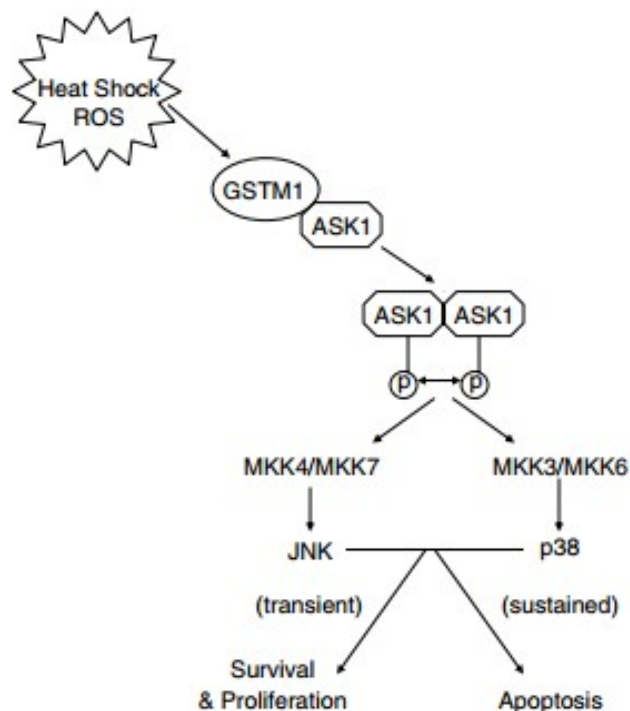


Figura 16. Esquema de com GSTM1 pot actuar com a inhibidor de la funció d'ASK1. L'estrès, com el provocat per les espècies reactives d'oxigen, resulta en la separació d'ASK1 del complex GSTM1:ASK1. ASK1 oligomeritza i s'activa mitjançant l'autofosforilació, el que activa una cascada de cinases fins activar les vies apoptòtiques de JNK i p38. El destí de la cèl·lula cap a apoptosi o proliferació depèn del temps i la quantitat d'exposició a l'estrès. Modificada de (McIlwain et al. 2006).

Per altra banda, també s'ha descrit que GSTM1 interacciona amb MEKK1, de manera que pot regular la via apoptòtica JNK/SAPKs. L'estrès cel·lular, com el causat per la teràpia antitumoral, activa MEKK1 que interacciona amb SEK1 (una MKK4) inactiva i forma el complex MEKK1:MKK4. MEKK1 fosforila i activa MKK4 i com a resultat es dissocia el complex. MKK4 activada i lliure interacciona amb JNK i l'activa per fosforilació. Quan JNK s'activa, el complex MKK4:JNK es dissocia i la JNK fosforila els seus substrats, activant així la via apoptòtica JNKs/SAPKs (Chang & Karin 2001; Ryoo et al. 2004). GSTM1 inhibeix l'activació de MEKK1 induïda per estrès cel·lular, de manera independent a la seva activitat catalítica de la conjugació del glutatí. Estudis *in vitro* han mostrat que GSTM1 s'uneix directament a MEKK1 i inhibeix la seva activitat cinasa, interferint en la formació del complex MEKK1:MKK4; per tant GSTM1 inhibeix l'apoptosi mediada per MEKK1 i funciona com un regulador negatiu de MEKK1 (Figura 17) (Ryoo et al. 2004).

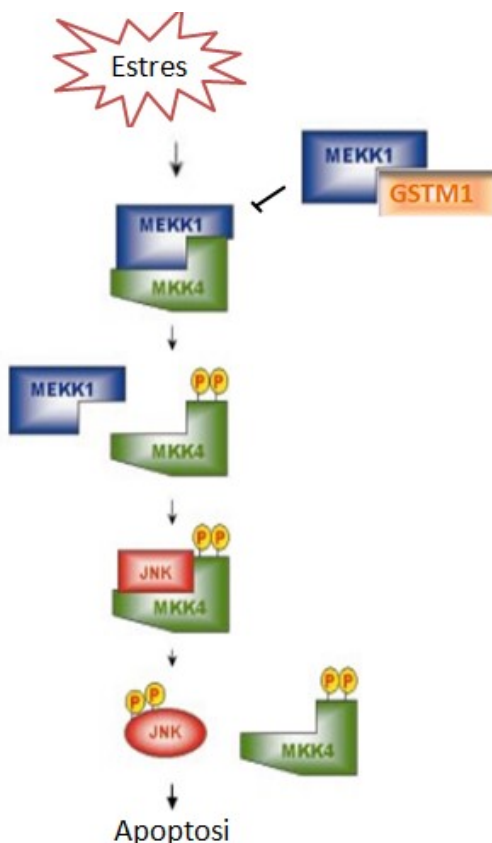


Figura 17. Esquema de com GSTM1 pot actuar com a inhibidor de la funció de MEKK1. L'estrès cel·lular activa a MEKK1 que interacciona amb MKK4 inactiva, formant un complex. MEKK1 fosforila i activa MKK4 i, com a resultat, es dissocia el complex. MKK4 activada interacciona amb JNK. JNK un cop activada s'allibera del complex per fosforilar els seus substrats. GSTM1 inhibeix l'activació de MEKK1 i per tant l'apoptosi mediada per MEKK1 (Chang & Karin 2001).

Tenint en compte els nostres resultats i els observats en la literatura podríem concloure que l'expressió de GSTM1 podria conduir a una apoptosi menys eficient després del tractament antitumoral i per tant, relacionar-se amb una menor supervivència dels pacients amb LLA infantil.

### **3.2.2 Polimorfisme Arg72Pro en el gen *TP53* i apoptosi**

En el treball 1 es va observar que els nens amb LLA i el genotip Arg/Arg al codó 72 de *TP53* tenien una tendència a una major supervivència (Figura 2, treball 1), mentre que els que tenien almenys un al·lel Pro tenien una tendència a pitjor supervivència, de manera que la variant Pro presentava un efecte dominant. A més, en l'estudi in vitro les cèl·lules Jurkat p53Pro tenien una menor sensibilitat a un glucocorticoide, com la dexametasona.

Thomas et al. (1999) van ser els primers en observar que la variant Arg de l'SNP Arg72Pro de *TP53* és més eficient en la supressió de la transformació maligna pels oncogens E7 i EJ-ras i en la iniciació de l'apoptosi. Estudis posteriors han confirmat que la variant p53Arg indueix apoptosi de manera més eficient que la variant Pro (Dumont et al. 2003; Sullivan et al. 2004; Xu et al. 2005). Les hipòtesis per explicar perquè la variant p53Arg té una capacitat més alta d'inducció de l'apoptosi mediada per p53 es poden dividir en quatre. En primer lloc, la variant p53Arg tindria una major capacitat per localitzar-se en la mitocòndria permetent l'alliberament del citocrom c al citosol (Dumont et al. 2003; Lin et al. 2008); en segon lloc, seria més eficient en la inducció de la transcripció de gens específics associats a apoptosi, com per exemple *NOXA*, *NOVA*, *PUMA*, *PIG3C*, *PERP* i *AIP1* (Sullivan et al. 2004; Jeong et al. 2010); en tercer lloc, podria ser més eficient per escapar de la regulació negativa de l'*inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53* (IASPP) (Bergamaschi et al. 2006); i en quart lloc, podria interactuar amb el producte d'un gen pro-apoptòtic (PREP, *prolyl endopeptidase*) més activament, en comparació amb la variant Pro; la interacció amb la proteïna PREP podria resultar en una activitat apoptòtica 10 vegades major (revisat per Lin et al. 2008). Estudis addicionals, utilitzant línies cel·lulars isogèniques, han mostrat que la variant Arg de l'SNP Arg72Pro de *TP53* té un potencial apoptòtic més elevat tant en

presència com en absència de agents quimioteràpics (Sullivan et al. 2004; Pim & Banks 2004; Bergamaschi et al. 2006).

A més en el treball 1 també vam observar que la combinació dels genotips de CNV de *GSTM1* i de l'SNP Arg72Pro de *TP53* podia predir la supervivència amb una significació més elevada que la del gen *GSTM1* per si sol. Per avaluar la base biològica d'aquests resultats, es va realitzar una anàlisi *in vitro* amb cèl·lules leucèmiques Jurkat transfectades amb l'al·lel Arg o Pro de l'SNP Arg72Pro de *TP53* i amb un siRNA de *GSTM1* per generar el genotip *null*. Els resultats van mostrar que les cèl·lules Jurkat p53Arg *GSTM1 null* tenien una sensibilitat més gran a un agent quimioteràpic, la dexametasona, en comparació amb les cèl·lules Jurkat p53Pro *GSTM1 non-null*, confirmant els resultats observats en els pacients. Per tant, amb els resultats obtinguts en aquesta tesi i els observats en la literatura es pot concloure que tenir almenys una còpia del gen *GSTM1* i la variant Pro de *TP53*, suficient en heterozigosi, podria conduir a una apoptosi menys eficient en les cèl·lules leucèmiques després del tractament antitumoral i per tant, podria relacionar-se amb una menor supervivència.

### **3.3 POLIMORFISMES EN GENS DE LA VIA DE P53 I DESENVOLUPAMENT DE T-NM**

#### **3.3.1 SNP309 del gen *MDM2* i apoptosi**

En el treball 2 de la present tesi es va observar que l'al·lel G del SNP309 de *MDM2* estava sobrerrepresentat en pacients amb t-NM en comparació als pacients que no havien desenvolupat t-NM.

*MDM2* és un oncogen que codifica per una ubiquitina E3 lligasa, que regula negativament la proteïna p53 (Vogelstein et al. 2000). La interacció p53-MDM2 és una de les regulacions de p53 més ben estudiades, malgrat que l'activitat de p53 pot estar regulada estretament per altres interaccions proteïna-proteïna en la cèl·lula (revisat per Grochola et al. 2010). S'ha observat que en condicions normals MDM2 s'uneix directament a p53 i inhibeix la seva capacitat per activar la transcripció, a més regula la seva localització cel·lular, i provoca la degradació de p53 en el proteasoma (revisat per Grochola et al. 2010). En canvi, quan hi ha estrès cel·lular i concretament dany en el

DNA, com el que genera la quimioteràpia, les cinases ATM i CHK2 (*Checkpoint kinase 2*) catalitzen la fosforilació de p53 i MDM2, el que condueix a la dissociació del complex p53-MDM2. La presència de p53 lliure permetrà induir l'apoptosi, o alternativament l'aturada del cicle cel·lular per intentar reparar el dany en el DNA (Figura 18). És interessant destacar que la inactivació en la línia germinal de les cinases ATM i CHK2 s'ha associat amb la predisposició al càncer (Soussi & Bérout 2001; Cheng & Chen 2010). A més a més, s'ha observat que alguns polimorfismes localitzats en les regions reguladores de *MDM2* poden alterar la seva activitat, i per tant afectar la via de p53 i induir neoplàsia. L'SNP més freqüent a *MDM2* és l'SNP309 (T/G); s'ha descrit que l'al·lel G augmenta l'afinitat del factor de transcripció Sp1 (Bond et al. 2004). Això dona lloc a un augment de la transcripció de *MDM2*, que a la vegada resulta en l'atenuació de la resposta de p53 al dany al DNA i en un augment del risc de tumorigènesi (Bond et al. 2004; Ellis et al. 2008).

Tenint en compte els nostres resultats i els resultats de la literatura podríem concloure que l'al·lel G de l'SNP309 de *MDM2* confereix un risc superior al de l'al·lel T a desenvolupar una t-NM.

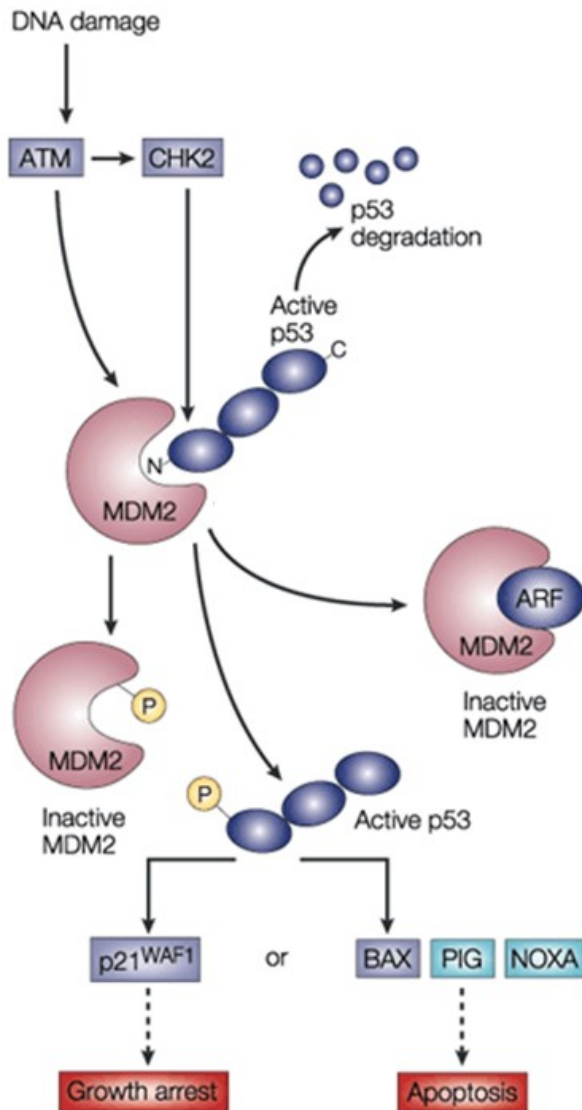


Figura 18. Esquema de la regulació de p53 per MDM2. En condicions normals el factor de transcripció p53 és inactivat per MDM2. Variis tipus d'estrès poden activar p53. Per exemple el dany en el DNA inactiva MDM2 mitjançant la fosforilació de p53 i MDM2, conduint a la dissociació del complex p53:MDM2. Aquesta fosforilació és catalitzada per varies cinases, incloent ATM i CHK2; la inactivació a la línia germinal d'aquestes dues cinases s'ha associat amb la predisposició a càncer. Modificada de (Soussi & Bérout 2001).

### 3.3.2 Polimorfisme Arg72Pro en el gen *TP53* i reparació del DNA

En el treball 2 de la present tesi es va observar que la variant Pro del polimorfisme Arg72Pro de *TP53* es trobava més freqüentment en pacients amb leucèmia secundària al tractament. L'anàlisi *in vitro* en un model cel·lular va mostrar que les cèl·lules Jurkat p53Arg, després de ser tractades amb un agent alquilant o un inhibidor de la topoisomerasa II, presentaven més *foci* de  $\gamma$ -H2AX per cèl·lula, més dany en el DNA i



un potencial apoptòtic més elevat, respecte a les cèl·lules Jurkat p53Pro. A més, es va detectar la translocació t(15;17) i la deleció en el cromosoma 5q, alteracions típiques de t-NM, en les cèl·lules Jurkat p53Pro però no en les Jurkat p53Arg després de 100 dies en cultiu.

Hi ha estudis que han mostrat que la variant Pro de *TP53* és un activador més eficient de l'aturada del cicle cel·lular i de la reparació del DNA (Thomas et al. 1999; Pim & Banks 2004; Siddique & Sabapathy 2006). Aquesta variant activa la transcripció més eficientment de varis gens diana dependents de p53 involucrats en la reparació del DNA, com *GADD45*, *p48* i *p53R2* (Siddique & Sabapathy 2006). Siddique & Sabapathy (2006) també van avaluar l'activitat de la reparació per NHEJ i van observar que la variant Pro de *TP53* és més eficaç en la reparació dels plàsmids als que se'ls hi ha produït un trencament. A més, les cèl·lules que expressen la variant Pro de *TP53* mostren una disminució en la formació del micronuclis en comparació amb les cèl·lules que expressen Arg, el que suggereix que la inestabilitat genòmica és menor en aquestes cèl·lules (Siddique & Sabapathy 2006). S'ha observat que abans del tractament, els pacients amb càncer amb el genotip Pro/Pro tenen menys trencaments de cromàtides en comparació als portadors d'almenys un al·lel Arg (Litviakov et al. 2010). Addicionalment, Cattelani et al. (2012) han observat que els pacients amb el genotip Pro/Pro poden respondre menys eficientment a tractaments que indueixen dany en el DNA. Els autors d'aquest estudi suggereixen que a aquests pacients se'ls hi hauria de administrar protocols terapèutics que incloguin fàrmacs citotòxics amb mecanismes d'acció independents de p53.

Els resultats del present estudi i el que s'ha descrit a la literatura suggereixen que les cèl·lules que presenten p53Arg presenten un increment de la taxa de dany en el DNA en comparació amb les cèl·lules p53Pro després de ser tractades amb la mateixa dosi de busulfan o de doxorubicina. Probablement, aquestes llesions tenen una reparació ineficient o incompleta, el que desencadenarà l'apoptosi. La majoria de cèl·lules amb dany en el DNA moren, ja que no es van observar alteracions cromosòmiques en les cèl·lules Jurkat p53Arg. Per altra banda, les cèl·lules amb la variant p53Pro en almenys un al·lel, tindrien un menor nombre de trencaments en el DNA, probablement a causa d'una major eficiència en l'aturada del cicle cel·lular i en la reparació del dany al DNA.

En algunes cèl·lules aquesta reparació podria ser errònia, donant lloc a translocacions característiques de t-NM observades després d'un cultiu de 100 dies. A la Figura 19 es mostra el possible mecanisme que explicaria les diferències en el risc de desenvolupar t-NM en pacients tractats amb les mateixes dosis de quimioteràpia i/o radioteràpia, que podrien ser degudes a la capacitat de cada individu de dur a terme més o menys eficientment l'apoptosi o la reparació de les lesions al DNA, segons el polimorfisme que tingui a *TP53* o a altres gens de la via de p53.

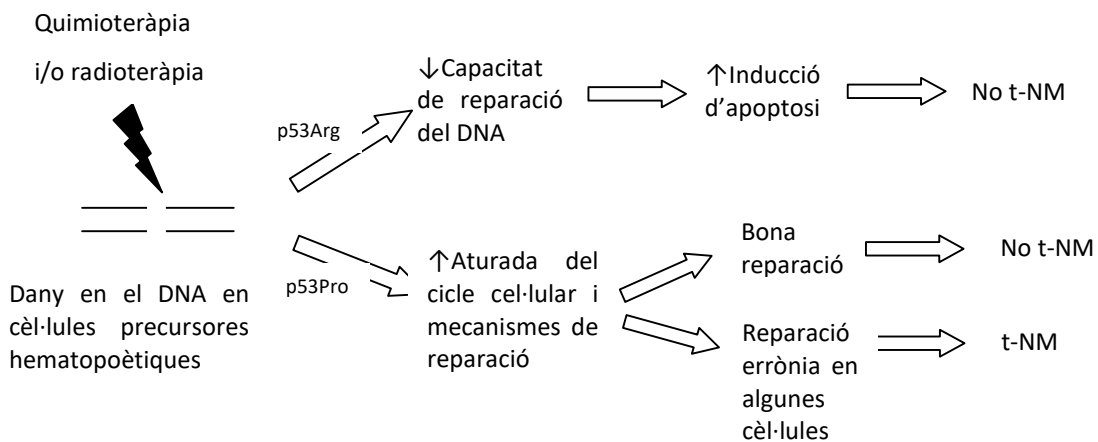


Figura 19. Model hipotètic del desenvolupament de t-NM després del tractament amb quimioteràpia i/o radioteràpia. La capacitat de les cèl·lules de dur a terme més o menys eficientment l'apoptosi o la reparació de les lesions al DNA podria estar influenciada per polimorfismes de la via de p53, com per exemple el polimorfisme Arg72Pro del gen *TP53*.

### 3.4 PERSPECTIVES DE FUTUR

Els estudis farmacogenètics, com el presentat en la present tesi, podrien ajudar a desenvolupar teràpies individualitzades pel tractament de LLA infantil en un futur pròxim. Si els nostres resultats es confirmen en una sèrie més ampla de pacients, s'hauria de revisar l'ús d'agents quimioteràpics basats en la inducció d'apoptosi en aquells pacients amb el genotip *GSTM1 non-null* i el genotip Pro/Pro o Pro/Arg en el codó 72 de *TP53*.

Per altra banda, en relació a les leucèmies secundàries també seria convenient fer estudis amb una mostra més gran de pacients amb t-NM per corroborar els nostres

resultats. La t-NM és poc freqüent i la mortalitat de la t-NM és molt elevada; per això, la majoria d'estudis presenten sèries petites de pacients. També seria interessant poder estudiar les t-NM en funció del tipus de teràpia que el pacient hagi rebut pel tumor primari. Això, però, és molt difícil ja que la majoria de tractaments són combinacions de fàrmacs i radioteràpia i per tant, és molt difícil esbrinar com afecta cada teràpia individualment. Ara per ara, els resultats obtinguts en la present tesi en relació al risc de desenvolupar t-NM no permeten predir encara si una persona patirà t-NM després d'un determinat tractament de quimioteràpia o radioteràpia, però en un futur potser es puguin utilitzar per optimitzar el tractament o conèixer si un pacient té un risc major de desenvolupar t-NM.

Els estudis d'associació en malalties complexes, tal i com és el càncer, tenen una altra limitació; hi ha molts factors que contribueixen a la seva aparició i la seva evolució. És per això que caldria afegir als estudis d'associació altres variables, com per exemple l'edat i el sexe en LLA, o possibles agents carcinògens relacionats amb t-MN, per tal de conèixer com afecta cadascuna d'elles en l'evolució dels nens amb LLA o en l'aparició de t-NM.

## **4. CONCLUSIONS**

1. Els pacients amb leucèmia limfoblàstica aguda (LLA) infantil portadors d'almenys un còpia del gen *GSTM1* van mostrar una supervivència significativament menor respecte als pacients amb el genotip *GSTM1 null* (0 còpies). Els pacients amb LLA amb el genotip Pro/Arg o Pro/Pro del polimorfisme Arg72Pro del gen *TP53* van mostrar una tendència a una menor supervivència respecte als pacients amb el genotip Arg/Arg. La combinació dels genotips *GSTM1 non-null* i *TP53 Pro/Arg* o *Pro/Pro* va resultar en una reducció molt significativa de la supervivència, comparat amb el *GSTM1* per si sol.
2. En un model *in vitro* amb cèl·lules leucèmiques Jurkat, les cèl·lules Jurkat p53Pro *GSTM1 non-null* tenien una menor sensibilitat a un fàrmac antitumoral, la dexametasona, respecte a les cèl·lules Jurkat p53Arg *GSTM1 null*; aquestes diferències eren estadísticament significatives.
3. Donat que l'expressió de *GSTM1* i p53Pro estan relacionats amb una menor eficiència apoptòtica, els resultats obtinguts suggerien que en els pacients amb LLA pediàtrica amb almenys una còpia del gen *GSTM1* i la variant Pro de *TP53*, almenys en heterozigosi, hi hauria una apoptosi menys eficient en les cèl·lules leucèmiques després del tractament antitumoral. Per tant, aquests genotips podrien ser els responsables de la menor supervivència que mostren alguns pacients amb LLA pediàtrica.
4. Els estudis farmacogenètics com el presentat en la present tesi, podrien ajudar a desenvolupar teràpies individualitzades pel tractament de LLA infantil en un futur pròxim. Si els nostres resultats es confirmen en una sèrie més ampla de pacients, s'hauria de revisar l'ús d'agents quimioteràpics basats en la inducció d'apoptosi en aquells pacients amb el genotip *GSTM1 non-null* i el genotip Pro/Pro o Pro/Arg en el codó 72 de *TP53*.
5. La variant Pro de l'SNP Arg72Pro de *TP53* i l'al·lel G de l'SNP309 de *MDM2* estaven associats amb un major risc de desenvolupar neoplàsies mieloides relacionades amb el tractament (t-NM), especialment quan es presentaven aquests polimorfismes en ambdós gens.
6. En un model *in vitro* amb la línia cel·lular Jurkat tractada amb agents antitumorals, les cèl·lules Jurkat p53Arg presentaven un nombre més elevat de *foci* de  $\gamma$ -H2AX per cèl·lula, un nivell més elevat de dany en el DNA (més trencaments de

cromosoma i cromàtida i més intercanvis de cromàtides germanes) i un potencial apoptòtic més elevat, respecte a les cèl·lules Jurkat p53Pro. A més, en les cèl·lules Jurkat p53Pro es van detectar després de 100 dies de cultiu alteracions cromosòmiques característiques de t-NM, com la translocació t(15;17) i la deleció en el cromosoma 5q, però no en les cèl·lules Jurkat p53Arg.

7. S'ha descrit en la literatura que els individus amb l'al·lel G de l'SNP309 de *MDM2* presenten més expressió de la proteïna MDM2 que condueix a una major degradació de la proteïna apoptòtica p53. A més la variant Pro de *TP53* és menys efectiva en l'apoptosi, però més efectiva en aturar el cicle cel·lular i reparar el DNA, tot i que aquesta reparació pot ser errònia en alguns casos. Per tant, aquesta alteració de l'apoptosi i de la reparació del DNA podria ser la responsable d'un major risc de desenvolupar t-NM.
8. S'ha proposat un possible mecanisme que explicaria les diferències en el risc de desenvolupar t-NM en pacients tractats amb les mateixes dosis de quimioteràpia i/o radioteràpia, que podrien ser degudes a la capacitat de cada individu de dur a terme més o menys eficientment l'apoptosi o la reparació de les lesions al DNA, segons el polimorfisme que tingui a *TP53* o a altres gens de la via de p53. La manca de reparació de les lesions al DNA en les cèl·lules hematopoètiques que expressen p53Arg provocaria apoptosi, mentre que les cèl·lules que expressen p53Pro, propenses a aturar el cicle i reparar el DNA, podrien fer una mala reparació, generant les translocacions cromosòmiques.

## **5. BIBLIOGRAFIA**

- Ahnesorg, P., Smith, P. & Jackson, S.P., 2006. XLF interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 124(2), 301–313.
- Allan, J.M. et al., 2001. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11592–11597.
- Amaral, J.D., Xavier, J.M., Steer, C.J. & Rodrigues, C.M., 2010. The role of p53 in apoptosis. *Discovery medicine*, 9(45), 145–152.
- Ansari, M. & Krajinovic, M., 2007. Pharmacogenomics of acute leukemia. *Pharmacogenomics*, 8(7), 817–834.
- Arber, D.A. et al., 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391–2405.
- Del Arco, C. & Flores, J., 2014. *Farmacología Humana*.
- Armstrong, G.T. et al., 2011. Occurrence of multiple subsequent neoplasms in long-term survivors of childhood cancer: A report from the childhood cancer survivor study. *Journal of Clinical Oncology*, 29(22), 3056–3064.
- Ashkenazi, A., 2008. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(12), 1001–1012.
- Attardi, L.D., 2005. The role of p53-mediated apoptosis as a crucial anti-tumor response to genomic instability: Lessons from mouse models. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569(1–2), 145–157.
- Badell Serra, I., 2014. Tratamiento de la Leucemia Aguda Linfoblástica de Nuevo Diagnóstico. , 1–261.
- Bai, L. & Zhu, W., 2006. p53: Structure , Function and Therapeutic Applications. *Online*, 2, 141–153.
- Bergamaschi, D. et al., 2006. iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. *Nature genetics*, 38(10), 1133–1141.
- Bhatia, S., 2015. Genetic variation as a modifier of association between therapeutic exposure and subsequent malignant neoplasms in cancer survivors. *Cancer*, 121(5), 648–663.
- Blanco, J.G. et al., 2002. Genetic polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4 and NQO1 in children who developed therapy-related myeloid malignancies. *Pharmacogenetics*, 12(8), 605–611.
- Bojesen, S.E. & Nordestgaard, B.G., 2008. The common germline Arg72Pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans. *Cell Cycle*, 7(2), 158–163.
- Bolufer, P. et al., 2006. Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression. *Leukemia Research*, 30(12), 1471–1491.
- Bolufer, P. et al., 2007. Profile of polymorphisms of drug-metabolising enzymes and the risk of therapy-related leukaemia. *British Journal of Haematology*, 136(4), 590–596.



- Bond, G.L. et al., 2004. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*, 119(5), 591–602.
- Bonner, W.M. et al., 2008.  $\gamma$ H2AX and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(12), 957–967.
- Bougeard, G. et al., 2008. Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. *Journal of Medical Genetics*, 45(8), 535–538.
- Brown, J.M. & Attardi, L.D., 2005. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature Reviews. Cancer*, 5(3), 231–237.
- Buitenkamp, T.D. et al., 2014. Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. *Blood*, 123(1), 70–77.
- Cai, Z., Vallis, K.A. & Reilly, R.M., 2009. Computational analysis of the number, area and density of  $\gamma$ -H2AX foci in breast cancer cells exposed to  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF or  $\gamma$ -rays using Image-J software. *International Journal of Radiation Biology*, 85(3), 262–271.
- Capitini, C.M., Otto, M., Desantes, K.B. & Sondel, P.M., 2014. Immunotherapy in pediatric malignancies: current status and future perspectives. *Future Oncology*, 10(9), 1659–1678.
- Casorelli, I., Bossa, C. & Bignami, M., 2012. DNA damage and repair in human cancer: Molecular mechanisms and contribution to therapy-related leukemias. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(8), 2636–2657.
- Cassidy, S. & Syed, B.A., 2016. Acute myeloid leukaemia drugs market. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(8), 527–528.
- Cattelani, S. et al., 2012. The p53 Codon 72 Pro / Pro Genotype Identifies Poor-Prognosis Neuroblastoma Patients: Correlation with Reduced Apoptosis and Enhanced Senescence. *Neoplasia*, 14(7), 634–643.
- Cepi, F. et al., 2015. Risk factors for relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: prediction and prevention. *Expert Review of Hematology*, 8(1), 57–70.
- Cescon, D.W. et al., 2009. p53 Arg72Pro and MDM2 T309G polymorphisms, histology, and esophageal cancer prognosis. *Clinical Cancer Research*, 15(9), 3103–3109.
- Chang, L. & Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), 37–40.
- Cheng, Q. & Chen, J., 2010. Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage. *Cell Cycle*, 9(3), 472–478.
- Cho, S.G. et al., 2001. Glutathione S-Transferase Mu Modulates the Stress-activated Signals by Suppressing Apoptosis Signal-regulating Kinase 1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12749–12755.
- Ciccia, A., Constantinou, A. & West, S.C., 2003. Identification and characterization of the human mus81-eme1 endonuclease. *The Journal of biological chemistry*, 278(27), 25172–25178.
- Ciccia, A. & Elledge, S.J., 2010. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play

- with Knives. *Molecular Cell*, 40(2), 179–204.
- Cleven, A.H. et al., 2015. High p53 protein expression in therapy-related myeloid neoplasms is associated with adverse karyotype and poor outcome. *Mod Pathol*, 28(4), 552–563.
- Collado, M. et al., 2005. Lack of association of CYP3A4-V polymorphism with the risk of treatment-related leukemia. *Leukemia Research*, 29(5), 595–597.
- Conrad, D.F. et al., 2010. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*, 464(7289), 704–712.
- Cunningham, L. & Aplenc, R., 2007. Pharmacogenetics of acute lymphoblastic leukemia treatment response. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 8(15), 2519–2531.
- Dechant, M.J. et al., 2004. Mutation analysis of the apoptotic “death-receptors” and the adaptors TRADD and FADD/MORT-1 in osteosarcoma tumor samples and osteosarcoma cell lines. *International Journal of Cancer*, 109(5), 661–667.
- Ding, Y. et al., 2012. Genetic susceptibility to therapy-related leukemia after Hodgkin lymphoma or non-Hodgkin lymphoma: role of drug metabolism, apoptosis and DNA repair. *Blood Cancer Journal*, 2(3), e58.
- Do, T.N. et al., 2009. TP53 R72P and MDM2 SNP309 polymorphisms in modification of childhood acute lymphoblastic leukemia susceptibility. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 195(1), 31–36.
- Döhner, H. et al., 2010. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 115(3), 453–474.
- Döhner, H. et al., 2017. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129(4), 424–448.
- Döhner, H., Weisdorf, D.J. & Bloomfield, C.D., 2015. Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine*, 373(12), 1136–1152.
- Dorion, S., Lambert, H. & Landry, J., 2002. Activation of the p38 signaling pathway by heat shock involves the dissociation of glutathione S-transferase Mu from Ask1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30792–30797.
- Dueva, R. & Iliakis, G., 2013. Alternative pathways of non-homologous end joining ( NHEJ ) in genomic instability and cancer. *Translational Cancer Research*, 2(3), 163–177.
- Dumont, P. et al., 2003. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature genetics*, 33(3), 357–365.
- Ellinghaus, E. et al., 2012. Identification of germline susceptibility loci in ETV6-RUNX1-rearranged childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 26(5), 902–909.
- Ellis, N.A. et al., 2008. MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro interact to alter therapy-related acute myeloid leukemia susceptibility. *Blood*, 112(3), 741–749.
- Felix, C.A. et al., 1998. Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(22), 13176–81.

- Fink, S.L. & Cookson, B.T., 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 73(4), 1907–1916.
- Fridman, J.S. & Lowe, S.W., 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22(56), 9030–9040.
- Gaedigk, A., Twist, G.P. & Leeder, J.S., 2012. CYP2D6, SULT1A1 and UGT2B17 copy number variation: quantitative detection by multiplex PCR. *Pharmacogenomics*, 13(1), 91–111.
- Godley, L.A. & Larson, R.A., 2008. Therapy-Related Myeloid Leukemia. *Seminars in Oncology*, 35(4), 418–429.
- Goodarzi, A.A. & Jeggo, P.A., 2012. Irradiation induced foci (IRIF) as a biomarker for radiosensitivity. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 736(1–2), 39–47.
- Goolsby, C., Paniagua, M., Tallman, M. & Gartenhaus, R.B., 2005. Bcl-2 regulatory pathway is functional in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 63(1), 36–46.
- Grimwade, D., Ivey, A. & Huntly, B.J.P., 2016. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*, 127(1), 29–41.
- Grimwade, D., Vyas, P. & Freeman, S., 2010. Assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Current opinion in oncology*, 22(6), 656–663.
- Grochola, L.F., Zeron-Medina, J., Mériaux, S. & Bond, G.L., 2010. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 signaling pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5).
- Guillem, V. & Tormo, M., 2008. Influence of DNA damage and repair upon the risk of treatment related leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 49(2), 204–217.
- Guillem, V.M. et al., 2007. Role of MTHFR (677, 1298) haplotype in the risk of developing secondary leukemia after treatment of breast cancer and hematological malignancies. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 21(7), 1413–1422.
- Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J. & Tripathy, B.C., 2017. *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*,
- Haase, D. et al., 2002. Increased risk for therapy-associated hematologic malignancies in patients with carcinoma of the breast and combined homozygous gene deletions of glutathione transferases M1 and T1. *Leukemia Research*, 26(3), 249–254.
- Hall, E.J. & Giaccia, A.J., 2006. Radiobiology for the radiologist. In L. W. & Wilkins, ed. *Radiobiology for the radiologist*. Philadelphia.
- Harrison, C.J., 2009. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 144(2), 147–156.
- Hassan, M. et al., 2014. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Research International*, 2014.
- Hebbring, S.J. et al., 2007. Human SULT1A1 gene: Copy number differences and functional implications. *Human Molecular Genetics*, 16(5), 463–470.
- Henrichsen, C.N., Chaignat, E. & Reymond, A., 2009. Copy number variants, diseases and gene expression. *Human Molecular Genetics*, 18(R1).

- Holliday, R., 2007. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetical research*, 89, 285–307.
- Hollman, A.L., Tchounwou, P.B. & Huang, H.C., 2016. The association between gene-environment interactions and diseases involving the human GST superfamily with SNP variants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(4).
- Hosni-Ahmed, A., Barnes, J.D., Wan, J. & Jones, T.S., 2011. Thiopurine methyltransferase predicts the extent of cytotoxicity and DNA damage in astroglial cells after thioguanine exposure. *PLoS ONE*, 6(12).
- Hosono, N. et al., 2010. Glutathione S-transferase M1 inhibits dexamethasone-induced apoptosis in association with the suppression of Bim through dual mechanisms in a lymphoblastic leukemia cell line. *Cancer Science*, 101(3), 767–773.
- Howlander, N. et al., 2016. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013. *National Cancer Institute*, april.
- Howlander, N. et al., 2011. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD, based on November 2012 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2013. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2010](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010) (Accessed on June 08, 2013).
- Hunger, S.P. & Mullighan, C.G., 2015. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *The New England journal of medicine*, 373(16), 1541–52.
- Ingelman-Sundberg, M., 2005. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *The pharmacogenomics journal*, 5(1), 6–13.
- Ivashkevich, A.N. et al., 2011. Gamma-H2AX foci as a measure of DNA damage: A computational approach to automatic analysis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1–2), 49–60.
- Jasin, M. & Rothstein, R., 2013. Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(11).
- Jeong, B.-S. et al., 2010. Differential levels of transcription of p53-regulated genes by the arginine/proline polymorphism: p53 with arginine at codon 72 favors apoptosis. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(5), 1347–1353.
- Kayser, S. et al., 2011. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood*, 117(7), 2137–2145.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. & Curriet, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Journal of Internal Medicine*, 258(6), 479–517.
- Khan, M.H., Khalil, A. & Rashid, H., 2015. Evaluation of the p53 Arg72Pro polymorphism and its association with cancer risk: a HuGE review and meta-analysis. *Genetics Research*, 97.
- Kim, H.D., Kim, T.-S. & Kim, J., 2011. Aberrant ribosome biogenesis activates c-Myc and ASK1 pathways resulting in p53-dependent G1 arrest. *Oncogene*, 30(30), 3317–3327.
- Knappskog, S. & Lønning, P.E., 2011. Effects of the MDM2 promoter SNP285 and

- SNP309 on Sp1 transcription factor binding and cancer risk. *Transcription*, 2(5), 207–210.
- Komura, D. et al., 2006. Genome-wide detection of human copy number variations using high-density DNA oligonucleotide arrays. *Genome Research*, 16(12), 1575–1584.
- De Kouchkovsky, I. & Abdul-Hay, M., 2016. “Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update.” *Blood Cancer Journal*, 6(7), e441.
- Larson, J., Lynch, G., Games, D. & Seubert, P., 1999. Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain Research*, 840, 23–35.
- Leone, G., Fianchi, L., Pagano, L. & Voso, M.T., 2010. Incidence and susceptibility to therapy-related myeloid neoplasms. *Chemico-Biological Interactions*, 184(1–2), 39–45.
- Levine, A.J., 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88(3), 323–31.
- Lichtenegger, F.S., Krupka, C., Köhnke, T. & Subklewe, M., 2015. Immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Seminars in Hematology*, 52(3), 207–214.
- Lin, H.Y. et al., 2008. TP53 codon 72 gene polymorphism paradox in associated with various carcinoma incidences, invasiveness and chemotherapy responses. *International Journal of Biomedical Science*, 4(4), 248–254.
- Litviakov, N. V. et al., 2010. Association between TP53 gene Arg72Pro polymorphism and chromosome aberrations in human cancers. *Molecular Carcinogenesis*, 49(6), 521–524.
- Liu, L. et al., 2011. Combined effect of genetic polymorphisms in P53, P73, and MDM2 on non-small cell lung cancer survival. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 6(11), 1793–800.
- Lopez-Lopez, E. et al., 2014. Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics*, 15(10), 1383–1398.
- Lowe, S.W. & Lin, a W., 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), 485–495.
- Lu, J., Quearry, B. & Harada, H., 2006. p38-MAP kinase activation followed by BIM induction is essential for glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia cells. *FEBS Letters*, 580(14), 3539–3544.
- Luch, A., 2010. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*,
- Ma, X. et al., 2015. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nature communications*, 6, 6604.
- McIlwain, C.C., Townsend, D.M. & Tew, K.D., 2006. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene*, 25(11), 1639–1648.
- McLellan, R.A. et al., 1997. Characterization of a human glutathione S-transferase mu cluster containing a duplicated GSTM1 gene that causes ultrarapid enzyme activity. *Molecular pharmacology*, 52(6), 958–965.
- Miller, A., Webb, M. & Copik, A., 2005. p38 Mitogen-activated protein kinase(MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human

- glucocorticoid receptor at serine 211. *Molecular Endocrinology*, 19, 1569–1583.
- Moriyama, T., Relling, M. V & Yang, J.J., 2015. Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 125(26), 3988–3996.
- Morton, L.M. et al., 2013. Evolving risk of therapy-related acute myeloid leukemia following cancer chemotherapy among adults in the United States, 1975-2008. *Blood*, 121(15), 2996–3004.
- Morton, L.M. et al., 2014. The rising incidence of second cancers: patterns of occurrence and identification of risk factors for children and adults. *American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO. American Society of Clinical Oncology. Meeting*, e57-67.
- Nagel, Z.D., Chaim, I.A. & Samson, L.D., 2014. Inter-individual variation in DNA repair capacity: A need for multi-pathway functional assays to promote translational DNA repair research. *DNA Repair*, 19, 199–213.
- Naoe, T. et al., 2000. Analysis of Genetic Polymorphism in NQO1 , GST-M1 , GST-T1 , and CYP3A4 in 469 Japanese Patients with Therapy-related Leukemia / Myelodysplastic Syndrome and de novo Acute Myeloid Leukemia 1. , 6(October), 4091–4095.
- Natarajan, A.T. & Palitti, F., 2008. DNA repair and chromosomal alterations. *Mutation Research*, 657(1), 3–7.
- Nitiss, J.L., 2009. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 9(5), 338–350.
- Nørskov, M.S., Frikke-Schmidt, R., Loft, S. & Tybjærg-Hansen, A., 2009. High-throughput genotyping of copy number variation in Glutathione S-Transferases M1 and T1 using real-time PCR in 20,687 individuals. *Clinical Biochemistry*, 42(3), 201–209.
- Oakley, A., 2011. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metabolism Reviews*, 43(2), 138–151.
- Oren, M. & Rotter, V., 2010. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(2).
- Ørsted, D.D., Bojesen, S.E., Tybjaerg-Hansen, A. & Nordestgaard, B.G., 2007. Tumor suppressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population. *The Journal of experimental medicine*, 204(6), 1295–1301.
- Ouyang, L. et al., 2012. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6), 487–498.
- Papaemmanuil, E. et al., 2009. Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*, 41(9), 1006–1010.
- Pedersen-Bjergaard, J., Andersen, M.K., Andersen, M.T. & Christiansen, D.H., 2008. Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 22(2), 240–248.
- Perez-Andreu, V. et al., 2013. Inherited GATA3 variants are associated with Ph-like childhood acute lymphoblastic leukemia and risk of relapse. *Nature genetics*,

- 45(12), 1494–1498.
- Peterson, C.L. & Côté, J., 2004. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes and Development*, 18(6), 602–616.
- Pim, D. & Banks, L., 2004. P53 Polymorphic Variants At Codon 72 Exert Different Effects on Cell Cycle Progression. *International Journal of Cancer*, 108(2), 196–199.
- Price, B.D. & D’Andrea, A.D., 2013. Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell*, 152(6), 1344–1354.
- Pronold, M., Vali, M., Pique-Regi, R. & Asgharzadeh, S., 2012. Copy number variation signature to predict human ancestry. *BMC bioinformatics*, 13, 336.
- Pui, C., Mullighan, C.G., Evans, W.E. & Relling, M. V, 2012. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood*, 120(6), 1165–1174.
- Pui, C.H., 2010. *Childhood leukemias. Third Edition.*
- Rahim, N.G., Harismendy, O., Topol, E.J. & Frazer, K.A., 2008. Genetic determinants of phenotypic diversity in humans. *Genome Biology*, 9(4), 215.
- Rasche, L. et al., 2016. Analysis of lymphocytic DNA damage in early multiple sclerosis by automated gamma-H2AX and 53BP1 foci detection: A case control study. *PLoS ONE*, 11(1).
- Rass, U. et al., 2010. Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein. *Genes and Development*, 24(14), 1559–1569.
- Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M. & Rotter, V., 2011. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene. *Blood*, 2(4), 466–474.
- Rodrigues, P. et al., 2013. Epistatic interaction of Arg72Pro TP53 and -710 C/T VEGFR1 polymorphisms in breast cancer: Predisposition and survival. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 379(1–2), 181–190.
- Rogakou, E.P. et al., 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5858–5868.
- Rothkamm, K. et al., 2003. Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle. *Molecular and cellular biology*, 23(16), 5706–5715.
- Rubnitz, J.E. & Inaba, H., 2012. Childhood acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 159(3), 259–276.
- Rund, D. et al., 2005. Therapy-related leukemia: clinical characteristics and analysis of new molecular risk factors in 96 adult patients. *Leukemia*, 19, 1919–1928.
- Russo, A. et al., 2006. Apoptosis: A relevant tool for anticancer therapy. *Annals of Oncology*, 17(SUPPL. 7), 115–123.
- Ryoo, K. et al., 2004. Negative regulation of MEKK1-induced signaling by glutathione S-transferase Mu. *Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 43589–43594.
- Saitoh, M. et al., 1998. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO Journal*, 17(9), 2596–2606.
- Salvesen, G.S. & Duckett, C.S., 2002. Apoptosis: IAP proteins: blocking the road to death’s door. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(6), 401–410.

- Schoch, C. et al., 2004. Karyotype is an independent prognostic parameter in therapy-related acute myeloid leukemia (t-AML): an analysis of 93 patients with t-AML in comparison to 1091 patients with de novo AML. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 18, 120–125.
- Schoneveld, O.J.L.M., Gaemers, I.C. & Lamers, W.H., 2004. Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1680(2), 114–128.
- Schultz, K.R. et al., 2007. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: A combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children’s Cancer Group (CCG). *Blood*, 109(3), 926–935.
- Seedhouse, C. et al., 2002. The genotype distribution of the XRCC1 gene indicates a role for base excision repair in the development of therapy-related acute myeloblastic leukemia. *Blood*, 100(10), 3761–3766.
- Seedhouse, C., Faulkner, R., Ashraf, N. & Das-gupta, E., 2004. Polymorphisms in Genes Involved in Homologous Recombination Repair Interact to Increase the Risk of Developing Acute Myeloid Leukemia. , 10(0), 2675–2680.
- Shah, S. et al., 2013. A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 45(10), 1226–1231.
- Sherborne, A.L. et al., 2010. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nat Genet*, 42(6), 492–494.
- Shih, A.H. et al., 2013. Mutational analysis of therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myelogenous leukemia. *Haematologica*, 98(6), 908–912.
- Shrivastav, M., De Haro, L.P. & Nickoloff, J.A., 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell research*, 18(1), 134–147.
- Shukron, O. et al., 2012. Analyzing transformation of myelodysplastic syndrome to secondary acute myeloid leukemia using a large patient database. *Am J Hematol*, 87(9), 853–860.
- Siddique, M. & Sabapathy, K., 2006. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. *Oncogene*, 25(25), 3489–3500.
- da Silva-Coelho, P. et al., 2017. Clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nature Communications*, 8, 15099.
- Smith, M.A. et al., 2014. Declining childhood and adolescent cancer mortality. *Cancer*, 120(16), 2497–2506.
- Smoak, K.A. & Cidlowski, J.A., 2004. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(10–11), 697–706.
- Söderbäck, E., Zackrisson, A.L., Lindblom, B. & Alderborn, A., 2005. Determination of CYP2D6 gene copy number by pyrosequencing. *Clinical Chemistry*, 51(3), 522–531.
- Soussi, T. & Bérout, C., 2001. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nature Reviews Cancer*, 1(3), 233–239.
- Sprengr, R. et al., 2000. Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a



- trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacogenetics*, 10(6), 557–65.
- Sui, X. et al., 2014. P38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Letters*, 344(2), 174–179.
- Sulli, G., Di Micco, R. & di Fagagna, F. d'Adda, 2012. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(10), 709–720.
- Sullivan, A. et al., 2004. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene*, 23(19), 3328–3337.
- Swerdlow, S.H. et al., 2008. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*,
- Teitz, T. et al., 2000. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nature medicine*, 6(5), 529–535.
- Thomas, M. et al., 1999. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Molecular and cellular biology*, 19(2), 1092–1100.
- Tian, X. et al., 2016. Association between TP53 Arg72Pro polymorphism and leukemia risk : a meta-analysis of 14 case-control studies. *Scientific reports*, 6(24097), 1–6.
- Tidd, D.M. & Paterson, A.R.P., 1974. A Biochemical Mechanism for the Delayed Cytotoxic Reaction of 6-Mercaptopurine. *Cancer Research*, 34(4), 738–746.
- Toffoli, G. et al., 2009. Effect of TP53 Arg72Pro and MDM2 SNP309 polymorphisms on the risk of high-grade osteosarcoma development and survival. *Clinical Cancer Research*, 15(10), 3550–3556.
- Treviño, L.R. et al., 2009. Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*, 41(9), 1001–1005.
- Turgeon, M.L., 2012. *Clinical Hematology Theory & Procedures*,
- Vandersickel, V. et al., 2010. Early increase of radiation-induced  $\gamma$ H2AX foci in a human Ku70/80 knockdown cell line characterized by an enhanced radiosensitivity. *Journal of radiation research*, 51(6), 633–641.
- Vazquez, A., Bond, E.E., Levine, A.J. & Bond, G.L., 2008. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(12), 979–987.
- Vignard, J., Mirey, G. & Salles, B., 2013. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A direct and indirect lighting up. *Radiotherapy and Oncology*, 108(3), 362–369.
- Vogelstein, B. & Kinzler, K.W., 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*, 10(8), 789–799.
- Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A.J., 2000. Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810), 307–310.
- Wang, C.-Y., Mayo, M.W. & Baldwin, A.S., 1996. TNF- and Cancer Therapy-Induced Apoptosis: Potentiation by Inhibition of NF-kappa B. *Science*, 274(5288), 784–787.
- Wang, C. & Lees-Miller, S.P., 2013. Detection and repair of ionizing radiation-induced dna double strand breaks: New developments in nonhomologous end joining. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 86(3), 440–449.

- Wang, Y.-H. et al., 2012. UGT2B17 genetic polymorphisms dramatically affect the pharmacokinetics of MK-7246 in healthy subjects in a first-in-human study. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 92(1), 96–102.
- Wang, Z. et al., 2003. Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 23861–23867.
- Wei, Y., Fan, T. & Yu, M., 2008. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40(4), 278–288.
- West, A.G. & Van Attikum, H., 2006. Chromatin at the crossroads. Meeting on signalling to chromatin epigenetics. *EMBO reports*, 7(12), 1206–1210.
- Whibley, C., Pharoah, P.D.P. & Hollstein, M., 2009. P53 Polymorphisms: Cancer Implications. *Nat Rev Cancer*, 9(2), 95–107.
- Wiemels, J.L. et al., 1999. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet*, 354(9189), 1499–1503.
- Willis, S.N. & Adams, J.M., 2005. Life in the balance: How BH3-only proteins induce apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(6), 617–625.
- Wong, R.S.Y., 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 30(1), 87.
- Woo, M.H. et al., 2000. Glutathione S-transferase genotypes in children who develop treatment-related acute myeloid malignancies. *Leukemia*, 14(2), 232–237.
- Worrillow, L.J. et al., 2003. An Intron Splice Acceptor Polymorphism in hMSH2 and Risk of Leukemia after Treatment with Chemotherapeutic Alkylating Agents 1. , 9, 3012–3020.
- Worrillow, L.J. et al., 2008. Polymorphic MLH1 and risk of cancer after methylating chemotherapy for Hodgkin lymphoma. *Journal of medical genetics*, 45(3), 142–146.
- Xu, H. et al., 2013. Novel susceptibility variants at 10p12.31-12.2 for childhood acute lymphoblastic leukemia in ethnically diverse populations. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(10), 733–742.
- Xu, Y. et al., 2005. p53 codon 72 polymorphism predicts the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(20), 7328–7333.
- Yue, X. et al., 2017. Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy. *Journal of Molecular Biology*, 1595–1606.
- Zahid, M.F. et al., 2016. Therapy-related myeloid neoplasms - what have we learned so far? *World journal of stem cells*, 8(8), 231–242.
- Zhang, J. et al., 2011. Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the Children's Oncology Group. *Blood*, 118(11), 3080–3087.
- Zhang, M.Y. et al., 2015. Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. *Nature genetics*, 47(2), 180–185.
- Zhou, M.H. & Yang, Q.M., 2014. NUP214 fusion genes in acute leukemia (Review). *Oncology Letters*, 8(3), 959–962.