

CO-073 LAS VARIANTES GERMINALES RS6336/RS6339 DE NTRK1 PREDISPONEN A NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS.

Cuenca-Zamora EJ1, Ruiz-Pividal JF1, Zamora-Plana L2, Bellosino B3, De la Morena-Barrio ME1, Bohdan N1, Marín-Quilez A4, Cifuentes R5, Martínez-Montesinos L1, Aroca C1, Vicente V5, Corral J5, Arranz L6, Teruel-Montoya R5, Ferrer-Marín F7

1Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Universitario Morales Meseguer, Centro Regional de Hemodonación, Universidad de Murcia, IMIBArrixaca; 2ICO-Badalon. Institut d'Investigació contra la Leucèmia Josep Carreras (Badalona); 3Hospital del Mar. IMIM (Barcelona); 4Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Universitario Morales Meseguer, Centro Regional de Hemodonación, Universidad de Murcia, IMIB-Arrixaca / IBSAL, IBMCC, CIC, Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca, Spain; 5Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Universitario Morales Meseguer, Centro Regional de Hemodonación, Universidad de Murcia, IMIBArrixaca / CIBER Enfermedades raras CIBER-ER; 6UiT Norges arktiske universitet (Tromsø, Norway); 7Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Universitario Morales Meseguer, Centro Regional de Hemodonación, Universidad de Murcia, IMIB-Arrixaca / CIBER Enfermedades raras CIBERER / UCAM

Introducción: La predisposición familiar a adquirir Neoplasias Mieloproliferativas Ph negativas (NMP) se observa en el 5-8% de los casos aparentemente esporádicos. Recientemente se han identificado variantes germinales que predisponen a la adquisición de mutaciones somáticas en pacientes con NMP familiar. Nuestro grupo caracterizó 5 familias con NMP (G. Soler, 2015). En una de ellas, los dos familiares afectados (padre e hija) presentaban mutaciones mutuamente excluyentes (JAK2/CALR). Con estos antecedentes, postulamos la hipótesis de que existen mutaciones germinales que predisponen o tienen un efecto sinérgico con las mutaciones iniciadoras.

Métodos y Resultados: A partir de una muestra de mucosa bucal de uno de estos casos familiares (Figura 1A, P1) realizamos un estudio de secuenciación del exoma completo (WES) sin identificar ninguna de las variantes germinales predisponentes de NMP familiares descritas hasta la fecha. Tras aplicar una serie de filtros sobre el estudio WES (Fig 1B), seleccionamos 9 variantes en 5 genes: NTRK1, PDE4DIP, KIF17, SCRIB y RECQL4. Para su validación, secuenciamos por Sanger dichas variantes en los casos afectados y no afectados de las 5 familias. La única variante encontrada en miembros afectados de más de una familia fue la variante rs6339 en NTRK1, que está en desequilibrio de ligamiento con rs6336 ($D'=0,97$), teniendo ambas variantes una frecuencia del alelo menor baja ($MAF=0,019$). Los estudios in silico de patogenicidad mostraron que las variantes que presentaban un mayor efecto deletéreo fueron rs6336 y rs6339 de NTRK1. A continuación, realizamos un estudio de asociación genotipando rs6339 en una cohorte de 521 casos esporádicos de NMP y 821 controles sanos (apareados en edad y sexo). El estudio mostró un enriquecimiento de dicha variante entre los casos de NMP esporádicos ($OR=1,67$; $p < 0,01$) y familiares ($OR=4,38$; $p < 0,0001$) (Tabla 1). NTRK1 codifica para TrkA, receptor de una neurotrofina, NGF, expresada en progenitores

hematopoyéticos y células estromales. Para validar el efecto funcional de dichas variantes sobre la expresión y fosforilación de TrkA, empleamos un modelo recombinante en células HEK293T carentes de TrkA. Sobre un vector comercial de TrkA (TrkA_NM_001012331), generamos las variantes rs6336 y/o rs6339, mediante mutagénesis dirigida. Previo a la transfección, la cantidad de vector fue cuantificada por PCR digital (dPCR). Además, se cotransfectó un vector control (GFP). Evaluamos la expresión del gen NTRK1 por qRT-PCR (Hs01021011_m1); la proteína TrkA (fosforilada y total) por “western blot”; y la eficiencia de la transfección cuantificando por microscopía el porcentaje de células fluorescentes. Observamos diferencias en la expresión de mRNA de NTRK1 según la variante transfectada ($p < 0,0001$). Excepto para rs6339, observamos una menor expresión de mRNA NTRK1, siendo la mayor disminución en presencia de la doble variante, rs6336/6339 (Figura 2A). Resultados que correlacionan con los niveles proteicos de TrkA total y fosforilado (pTrkA/TrkA) ($p < 0,01$) (Fig 2B). Los resultados de dPCR y microscopía demostraron que nuestros hallazgos no se debían a diferencias en la cantidad de vector transfectado (Fig 2C) o a discrepancias en la eficiencia de la transfección entre las distintas variantes (Figura 2D). El reciente descubrimiento de que la inhibición de la señalización de TrkA en células DAMI (línea celular megacariocítica) mediante CRISPR-Cas9 induce trombopoyesis (Kizilyer, Sci Reports 2019) avala nuestros resultados. Conclusiones: Nuestros estudios de asociación sugieren que las variante germinales rs6339/rs6336 del gen NTRK1 son un factor predisponente para la adquisición de NMP. Los estudios funcionales in vitro parecen corroborar su patogenicidad. Financiación: PI18/00316; 20644/JLI/18.

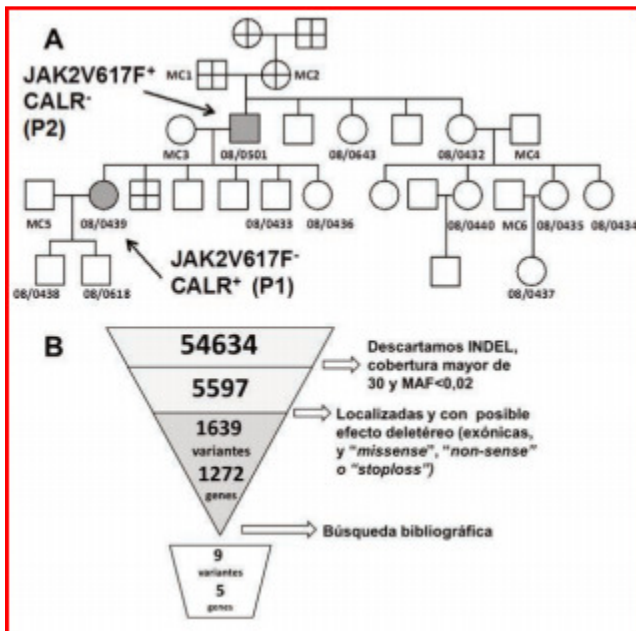


Figura 1. (A) Árbol genealógico familiar. Familia índice. Esta familia cuenta con un caso (P2) JAK2+; CALR- y otro (P1) JAK2-; CALR+. En ambos casos familiares se confirmó la presencia de la variante rs6339 en NTRK1. (B) Filtros utilizados en la selección de las variantes genéticas a validar desde el estudio WES: 1) que no fueran una variación tipo INDEL; que presentaran una

frecuencia del alelo menor (MAF) $\leq 0,02$ y con una cobertura de secuenciación mayor de 30; 2) que se localizaran en regiones exónicas y presentaran un potencial efecto deletéreo; y 3) que fueran variantes de genes donde previamente se han encontrado mutaciones somáticas recurrentes en casos esporádicos de NMP.

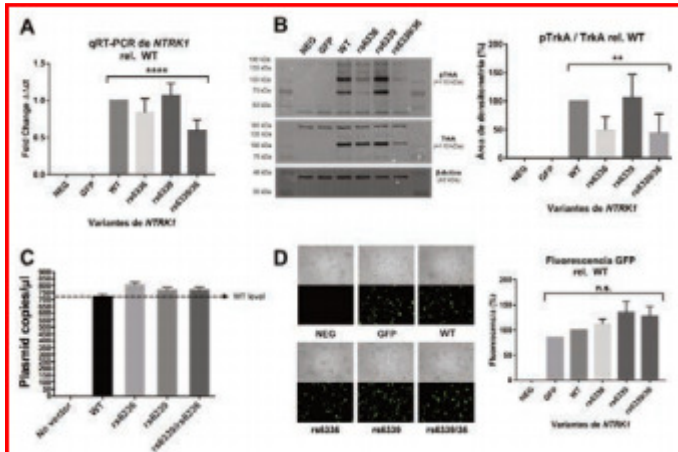


Figura 2. Análisis de las variantes rs6336 y rs6339 del gen NTRK1 en la línea celular HEK293T. (A) Expresión de NTRK1 medida por qRT-PCR sin transfectar, (NEG, n = 8); transfectadas con GFP (n = 5), o con las distintas variantes de dicho gen (n \geq 8), relativizado a WT. (B) Izquierda: Imagen representativa de los Western blot de pTrkA, TrkA total y β -Actina, de 5 experimentos independientes; Derecha: Análisis densitométrico (n = 5) de la relación pTrkA / TrkA, y relativizada a WT; (C) Cuantificación de los vectores utilizados en las distintas condiciones de transfección mediante PCR digital. (D) Imágenes de microscopía de fluorescencia, donde se observa la fluorescencia de la proteína GFP en las distintas condiciones de la transfección. Imagen representativa de 3 experimentos independientes; (**, p < 0,01; ****, p < 0,0001; n.s., no significativo, mediante test de Kruskal-Wallis).

Tabla 1. Genotipado de rs6339 en una cohorte de 5 familias con NMP y 521 casos esporádicos.

	Genotipo	Casos	MAF rs6339 (T) Casos	Controles	MAF rs6339 (T) Controles	Odds ratio (95% IC)	p-value
TE	G/G	238	0,054	766	0,033	Ref.	0,0283
	G/T	29		55			
PV	G/G	227	0,053	766	0,033	Ref.	0,0409
	G/T	27		55			
TE+PV	G/G	465	0,054	766	0,033	Ref.	0,0093
	G/T	56		55			
Familiares	G/G	35	0,120	766	0,033	Ref.	0,0001
	G/T	11		55			