

Artículo original

Análisis de genes que participan en la regulación de la longitud telomérica en pacientes con discrasias de células plasmáticas

Analysis of genes that participate in the regulation of telomere length in patients with plasma cell disorders

Andrea Krzywinski¹, Flavia Stella^{2,3}, Sergio Lopresti⁴ e Irma Slavutsky¹

1. Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina. 2. Área de Genética, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Posadas, Buenos Aires, Argentina. 3. Escuela Superior de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Morón, Buenos Aires, Argentina. 4. Servicio de Hematología, Hospital Posadas, Buenos Aires, Argentina.

Manuscrito recibido: 12 de octubre de 2022; aceptado para publicación: 16 de noviembre de 2022

Autor de Contacto: Dra. Irma Slavutsky. Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides. Instituto de Medicina Experimental. CONICET-Academia Nacional de Medicina. Pacheco de Melo 3081, 1425 – Buenos Aires, Argentina.
E-mail: islavutsky@hematologia.anm.edu.ar; islavutsky@hotmail.com

Resumen

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia caracterizada por una infiltración atípica de células plasmáticas en la médula ósea y la secreción de una proteína monoclonal en suero y/u orina. Los telómeros son regiones repetitivas en tándem de ADN no codificante TTAGGG, localizadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos. Se encuentran regulados por proteínas que integran diferentes complejos, que participan en el mantenimiento de su integridad, preservando a la célula de la inestabilidad genómica. Entre ellos encontramos el complejo ribonucleoproteico (RNP), conformado por cuatro proteínas evolutivamente conservadas GAR1, NHP2, NOP10 y DKC1, y las subunidades *TERC* y *TERT* de la telomerasa. Una alteración en los niveles de expresión de estos genes puede resultar en disfunción telomérica y desarrollo de diferentes patologías. Un evento primario importante en la patogénesis del MM lo constituye la inestabilidad genómica, evidenciada por las numerosas alteraciones citogenéticas numéricas y estructurales recurrentes presentes ya desde estadios asintomáticos, y observadas al diagnóstico o adquiridas durante la evolución de la enfermedad, probablemente relacionadas al acortamiento telomérico, asociado a la aparición de cambios secundarios que promueven la carcinogénesis. En este trabajo se analizaron 40 pacientes con desórdenes de células plasmáticas: 32 con MM y 8 con gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS). Se efectuó estudio citogenético y citomolecular de muestras de médula ósea y evaluación de la expresión de los genes del complejo RNP mediante RT-qPCR. En MM, el 26% de los casos mostraron alteraciones citogenéticas, 50% de los cuales presentaron cariotipos complejos. La técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) incrementó al 63% el porcentaje de casos patológicos. El análisis molecular mostró una disminución de los niveles de expresión de los genes *NOP10*, *GAR1* y

NHP2 en MM respecto de MGUS ($p < 0,04$). Se evidenció una fuerte correlación entre los niveles de expresión de los genes *NOP10*, *GAR1* y *NHP2*, y de *TERC* con estos mismos genes ($p < 0,0001$), indicando una estrecha interacción entre los mismos. La correlación con los parámetros clínicos en MM, permitió observar una disminución de los niveles de expresión de *TERC* en pacientes con valores altos de creatinina ($p = 0,025$), así como un aumento de los niveles de *TERT* en pacientes con niveles elevados de $\beta 2$ microglobulina ($p = 0,017$). Los resultados obtenidos constituyen un aporte a la caracterización biológica del MM, contribuyendo a la comprensión de los mecanismos patogénicos involucrados en el desarrollo de la patología.

Palabras clave: mieloma múltiple; telómeros; complejo ribonucleoproteico; telomerasa.

Abstract

Multiple myeloma (MM) is a B-cell neoplasia characterized by the accumulation of malignant plasma cells within the bone marrow and the presence of a monoclonal immunoglobulin in the serum and/or urine. Telomeres are repetitive TTAGGG sequences that cap chromosome ends and prevent them from being recognized as DNA damage. They are regulated by different protein complexes. Among them, the ribonucleoprotein (RNP) complex is composed of four evolutionary conserved proteins, NOP10, NHP2, GAR1 and DKC1. In this study, we have evaluated the expression profile of the RNP complex genes as well as the telomerase subunits TERT and TERC, in patients with MM and MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance). Cytogenetic and FISH (fluorescence in situ hybridization) analysis were performed; RT-qPCR was used to analyze mRNA expression of the RNP complex genes. In MM, 26% of cases showed cytogenetic alterations, 50% of them with complex karyotypes. FISH analysis increased to 63% the percentage of patients with genetic abnormalities. Molecular analysis showed a decrease in the expression levels of NOP10, NHP2 and GAR1 genes in MM with respect to MGUS ($p < 0.04$). A strong correlation among NOP10, NHP2 and GAR1 genes, as well as of TERC with these genes ($p < 0.0001$) was observed. The association with clinical parameters in MM showed a decrease of TERC mRNA expression in patients with high creatinine values ($p = 0.025$) and an increase of TERT level in cases with high $\beta 2$ microglobuline values ($p = 0.017$). Our results contribute to the biologic characterization of MM patients as well as to the understanding of the pathogenic mechanisms involved in the development of this pathology.

Key words: multiple myeloma; telomeres; ribonucleoprotein complex; telomerase.

DOI: <http://doi.org/10.34073/286>

INTRODUCCIÓN

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia a células B maduras caracterizada por una infiltración atípica de células plasmáticas (CP) en la médula ósea (MO) y la secreción de una proteína monoclonal, el componente M, en suero y/u orina (Rajkumar, 2020). Representa aproximadamente el 10% de las neoplasias hematológicas y se encuentra asociado a alta heterogeneidad clínica y complejidad genética. En la mayoría de los casos está precedido por una fase pre-maligna, la gammapatía monoclonal de significado incierto

(MGUS). Diferentes estudios han demostrado el valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas y citomoleculares en esta patología, pudiendo identificarse anomalías primarias específicas, presentes ya en estadios asintomáticos, y alteraciones secundarias asociadas a la progresión tumoral (Rajan & Rajkumar, 2015; Stella et al, 2015).

Los telómeros son estructuras de ADN altamente repetitivo (TTAGGG) asociado a proteínas multiméricas, que se encuentran en ambos extremos de los cromosomas eucarióticos. Cumplen un rol fundamental en la protección del ADN

de la acción de enzimas degradativas y de las fusiones terminales, preservando la estabilidad e integridad cromosómica (Shammas, 2011). A nivel estructural, el ADN telomérico posee 9 a 15 kb de repeticiones TTAGGG doble cadena seguida de una protrusión simple cadena 3' de 50 a 300 kb rica en G (O'Sullivan & Karlseder, 2010). Durante las sucesivas divisiones celulares, los extremos de los telómeros se van acortando debido a la incapacidad de la ADN polimerasa de realizar la síntesis completa del extremo 3' de la hebra discontinua (Bonetti et al, 2014). Dicho acortamiento se encuentra regulado por la enzima telomerasa, una ribonucleoproteína constituida por dos subunidades: catalítica (TERT; *Telomerase Reverse Transcriptase*) y nucleotídica (TERC; *Telomerase RNA Component*) (Chang et al, 2002), con capacidad de añadir repeticiones TTAGGG en los extremos de los telómeros, y por las proteínas de unión al ADN telomérico.

Dichas proteínas de unión al ADN telomérico integran diferentes complejos: protector (*shelterin complex*), no protector (*non-shelterin complex*) y ribonucleoproteico (RNP). El primero contribuye al control del tamaño telomérico regulando el acceso de la telomerasa a los telómeros, permite a las cé-

lulas distinguir el extremo de los telómeros de sitios de ADN dañado, previniendo la activación de la respuesta celular ante roturas de doble cadena (DSB: *Double Strand Break*) (De Lange, 2005; Doksani, 2019). En cuanto al complejo no protector, el mismo se encuentra conformado por proteínas que previenen la degradación telomérica y facilitan la elongación dependiente de telomerasa (Gilson & Géli, 2007). El complejo RNP o complejo telomerasa (Fig. 1), se encuentra compuesto por cuatro proteínas conservadas, DKC1 (*Dyskerin Pseudouridine Synthase 1*), NHP2 (*NHP2 Ribonucleoprotein*), NOP10 (*NOP10 Ribonucleoprotein*) y GAR1 (*GAR1 Ribonucleoprotein*), y un ARN no codificante (Meier, 2006; Lin et al, 2015). Este ARN se caracteriza por presentar en su extremo 3' una región H/ACA por la que tienen afinidad estas proteínas, mientras que en su extremo 5' se encuentra la secuencia que funcionará como templatado para la síntesis telomérica dentro de la subunidad TERT. Todos los ARN H/ACA se asocian con un conjunto frecuente de proteínas. Los H/ACA RNP son esenciales para tres procesos celulares fundamentales: síntesis de proteínas, empalme de ARNm y mantenimiento de la integridad del genoma. Las proteínas DKC1, NHP2 y NOP10 conforman un trímero, interdepen-

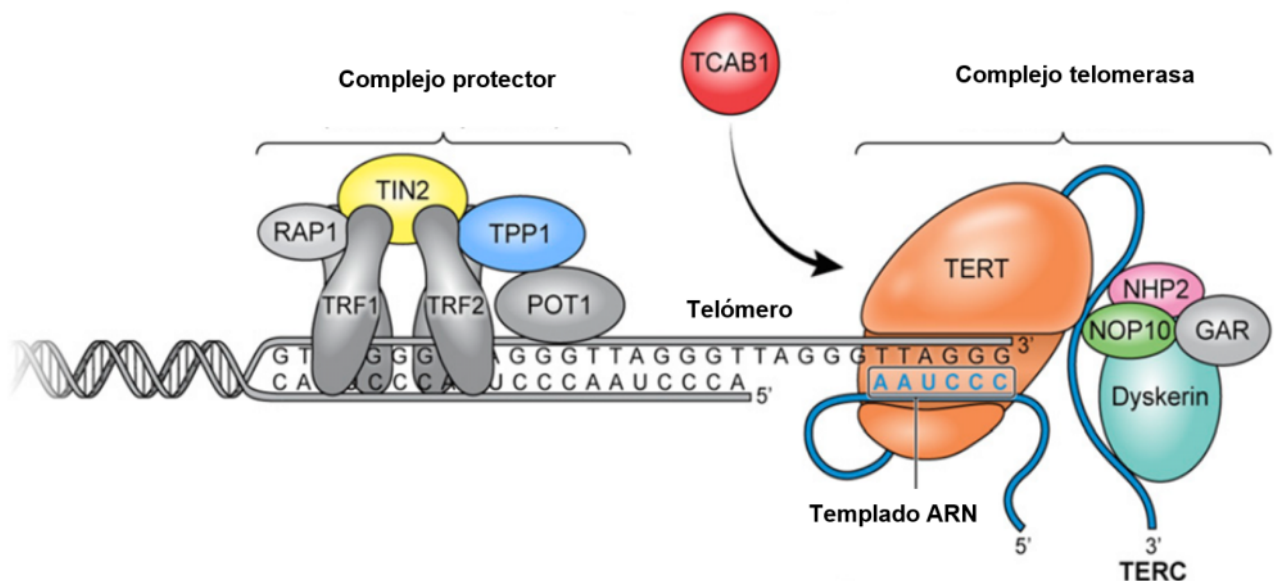


Figura 1. Complejo ribonucleoproteico. El complejo telomerasa se encuentra constituido por 4 proteínas (diskerina, NOP10, NHP2 y GAR1), de un molde de ARN (TERC) y de la subunidad catalítica (TERT) (Modificado de Townsley et al, 2014). TCAB1 (Telomerase Cajal Body Protein 1)

diente entre sí, que se une de forma directa a la región H/ACA contribuyendo al ensamblaje y estabilización del ARN (Grozdanov et al, 2009). GAR1 se une únicamente a DKC1, siendo necesaria para el correcto funcionamiento del complejo RNP H/ACA; su ausencia no afecta la estabilidad y los niveles de TERC (Darzacq et al, 2006; Vulliamy et al, 2008). Una alteración en cualquiera de las proteínas que conforman el trímero reduce la estabilidad de TERC disminuyendo la actividad de la telomerasa, llevando a un acortamiento mayor de los telómeros (Lin et al., 2015). Por su parte, DKC1 actúa en varios procesos celulares, tales como biosíntesis de RNA y proteínas (Filipowicz, 2002), en el mantenimiento telomérico a través del correcto procesamiento de TERC y su estabilización dentro del complejo telomerasa (Chang et al, 2002; Alawi & Lin, 2011), así como en la regulación de la apoptosis (Yoon et al, 2006).

Al presente existe muy poca información respecto de los genes asociados a H/ACA en MM (Díaz De la Guardia et al, 2012; Ronchetti et al, 2012; López-Corral et al, 2012). Nuestro grupo ha efectuado el análisis de genes de los complejos protector y no protector de los telómeros en pacientes con

MM y MGUS (Panero et al, 2010; 2014; 2015), siendo el objetivo del presente trabajo analizar los niveles de expresión de los genes del complejo RNP en desórdenes de células plasmáticas, establecer la interacción entre los mismos y correlacionar los resultados moleculares con las características genéticas y clínicas de los pacientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se evaluaron 40 pacientes: 32 MM y 8 MGUS. En la Tabla 1 se detallan edad, sexo, estadios clínicos, así como características de laboratorio y clínicas de los pacientes estudiados. Las muestras de MO fueron obtenidas por el médico hematólogo previa conformidad y consentimiento informado de los pacientes. Los estudios efectuados en este trabajo fueron evaluados y aprobados por el Comité de Docencia del Instituto de Medicina Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina. y por los Comités de Bioseguridad y Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina. Los estadios clínicos fueron definidos acorde a los criterios establecidos por el ISS (*International Staging System*) (Greipp et al, 2005).

Tabla 1: Características clínicas de los pacientes estudiados.

Características clínicas	MM	MGUS
Nº de casos	32	8
Sexo (F/M)	10/22	6/2
Edad media (años) (rango)	64,29 (26-90)	65,3 (59-83)
Isotipo (%)		
IgG	64,5	71,4
IgA	16,1	-
IgM	3,2	28,6
Otro	16,1	-
Cadena liviana (%)		
Kappa	54,8	50
Lambda	38,7	50
Otro	6,5	

Estadio ISS (%)		
I	34,6	-
II	34,6	-
III	30,8	-
IMO (%)		
<30	42,9	100
30-60	35,7	0
>60	21,4	0
Lesiones óseas (%)	66,7	0
Falla renal (%)	26,9	0
	Media (rango)	Media (rango)
β_2 M (ug/mL)	4,94 (1,7-16,5)	2,27 (1,3-4,5) *
LDH (U/L)	234,5 (84-429)	308 (175-471)
Hemoglobina (g/dL)	10,99 (6,7-16,1)	13 (11,8-13,6) **
Albúmina (g/dL)	3,56 (2,39-4,78)	4,22 (3,69-4,5)
Creatinina (g/dL)	1,56 (0,7-7,26)	0,92 (0,6-1,5)
Calcemia (mg/dL)	9,81 (7,5-14)	9,54 (8,9-10,1)
Paraproteína M (g)	3,11 (0-7,52)	1,14 (0,5-1,9) #

F: Femenino; M: Masculino; ISS: International Staging System; IMO: infiltración de la médula ósea; β_2 M: β_2 microglobulina; LDH: lactato dehidrogenasa. * $p=0,0058$; ** $p=0,0042$; # $p=0,0134$

Estudios citogenéticos

Se efectuó cultivo directo de MO y de 72 hs. sin estimular, en medio RPMI suplementado con 20% de suero fetal bovino y antibióticos. Luego de la incubación se adicionó Colchicina 0,1 mg/ml durante 30-45 minutos (m), se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se agregaron 10 ml de solución hipotónica KCl 0,075 M durante 30 m a 37°C. Se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y se procedió a los lavados con fijador alcohol metílico:ácido acético (3:1). El material fijado se extendió sobre portaobjetos para su posterior análisis. Se empleó la técnica de bandeo G para la identificación cromosómica y se utilizó la nomenclatura establecida en el International System of Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN, 2020). Se analizaron al menos 20 metafases por paciente.

Análisis citomolecular

Se empleó la técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) según los protocolos estipulados por los fabricantes. Se utilizó el siguiente panel de sondas: locus específica OLE 13q14 RB1, OLE 17p13.1 TP53, OBA14q32 IGH, OLE1p32q21 CKS1B/CDKN2C (Live-Lexel, Buenos Aires, Argentina). Se analizaron 200 núcleos interfásicos para cada sonda. Los puntos de corte (media del control normal más 3 desvíos estándar; $X + 3DS$), determinados en base al análisis de 10 controles normales fueron: 3%, 5%, 3% y 2% para deleciones de RB1, TP53, amplificación/delección de la sonda CKS1B/CDKN2C y rearrreglos de IGH, respectivamente.

Estudios moleculares

Extracción de ARN y obtención de los respectivos ADNc. Se

efectuó extracción de ARN total a partir de muestras de MO utilizando el método de trizol-cloroformo, seguido de una precipitación con isopropanol. La concentración, pureza y calidad de las muestras se evaluó utilizando un espectrofotómetro en las regiones de UV de 230, 260 y 280 nm. La síntesis de los ADNc total se efectuó por RT-PCR usando random-primers

PCR en tiempo real (RT-qPCR). Se efectuó el análisis de la expresión de los genes del complejo RNP: *GAR1*, *NHP2*, *NOP10* y *DKC1*, así como de *TERT* y *TERC* mediante PCR en tiempo real, a partir de los ADNc previamente obtenidos. Como gen de referencia se empleó β -actina. En la Tabla 2 se detallan los primers empleados (Bièche et al, 2000; Dos Santos et al, 2017). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, empleando 2 μ l de ADNc de pacientes, 10 μ l de 2X SYBR Selected Master Mix, y 1 μ l de cada primer para cada gen de interés, incluyendo al gen de

referencia, y 6 μ l de agua. Como control negativo se empleó agua libre de nucleasas. Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial a 50°C por 2 m seguido de 95°C durante 2 m, y 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 20 segundos y *annealing* y extensión a 60°C por 1 m, finalizando con una curva de *melting* de 50 a 99°C. Para el gen *TERC* se empleó un *annealing* y extensión a 56°C por 1 m. Los niveles de expresión de los genes fueron analizados con el método de Pfaffl (2001), que permite considerar en el cálculo las eficiencias tanto del gen control como del gen en estudio en forma independiente, siendo de utilidad cuando se trabaja con diferencias significativas en las eficiencias de los primers de los genes en análisis con respecto al gen control. La expresión relativa (R) del gen de interés se calculó basándose en la eficiencia (E), como factor de amplificación, y el CT (*cycle threshold*) de una muestra desconocida respecto al gen de referencia.

Tabla II: Secuencia de primers

Primers		Secuencia	Referencias
β -Actina	PF:	5' - CCAGAGGCGTACAGGGATAG -3'	Dos Santos et al., 2017
	PR:	5' - CCAACCGCGAGAAGATGA -3'	
DKC1	PF:	5' - TGAAGAGAGAGATTGGGGACT -3'	Dos Santos et al., 2017
	PR:	5' - ATGGGAAGAGGGGTTAGAGG -3'	
NHP2	PF:	5' - CTTCTGTCCATCAGTGCCAT -3'	(Dos Santos et al., 2017)
	PR:	5' - AGCATTTACTTTCCCCACCC -3'	
GAR1	PF:	5' - CGGAGGTCGTGGAGGCTTT -3'	Dos Santos et al., 2017
	PR:	5' - CTCGGAAGTGGTTGCTGCTG -3'	
NOP10	PF:	5' - TTCGGACTGTGAGCCCTGATGCCTTT -3'	Dos Santos et al., 2017
	PR:	5' - TCAATCGCCACGAGAGACTGGATGCC -3'	
TERT	PF:	5' - TGACACCTCACCTACCCAC -3'	Bièche et al., 2000
	PR:	5' - CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC -3'	
TERC	PF:	5' - TAACTGAGAAGGGCGTAGGC -3'	Presente trabajo
	PR:	5' - AGAATGAACGGTGAAGGCG -3'	

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa GraphPad Prism 6.01. El estudio comparativo de la distribución de las variables clínicas y los parámetros de laboratorio se efectuó mediante el test de Mann-Whitney, regresión lineal y coeficiente de correlación de Spearman. En todas las evaluaciones se tomó un $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Se efectuó análisis citogenético en 23 pacientes con MM, observándose alteraciones cromosómicas en 6 de ellos (26%) (Tabla 3). El análisis por FISH permitió detectar anomalías en 19/30 (63%) pacientes analizados.

La cuantificación de la expresión génica se llevó a cabo en muestras de MO de 40 pacientes con desórdenes a células plasmáticas: 32 con MM al diagnóstico y 8 con MGUS. En todos ellos se efectuó el análisis de los perfiles de expresión de cuatro genes del complejo RNP: *GAR1*, *NHP2*, *NOP10* y *DKC1*, así como de *TERC* y *TERT*, correspondientes a las subunidades nucleotídica y catalítica de la telomerasa, respectivamente, tomándose como referencia el gen de expresión constitutiva β -Actina. Esta evaluación permitió evidenciar una disminución en los niveles de expresión en MM respecto de MGUS en los genes *NOP10*, *GAR1*, *NHP2* y *TERC*, con diferencias significativas para *NOP10* ($p=0,0107$), *GAR1* ($p=0,0427$) y *NHP2* ($p=0,0388$) (**Fig. 2**). Por su parte,

Tabla III: Características citogenéticas y citomoleculares de los pacientes con MM y alteraciones citogenéticas.

Caso Nº	Edad/Sexo	Cariotipo	FISH (%)			
			IGH	del TP53	del RB1	G-A 1q21/del1p32
17	86/F	46,XX,add(4)(p16)[3]/46,XX[22]	-	6,5	-	-
18	80/F	48,XXX,+i(3)(q10)[16]/46,XX[4]	7,8*	-	4,1	-
19	81/M	45,X,-Y[10]/46,XY[10]	0	5,8	-	-
20	51/M	50,XY,del(1)(p13),+2,add(2)(q37),+3,+6,+7,+mar[cp5]/46,XY[15]	-	8,6	-	G: 6,9- A: 6
21	36/M	25-34, XY,+1,+2,+3,+del(6)(q25),+7,+9,-10,13,+15,+16,+18,+19,+20,+21,+22[cp6]/34-44,Y,-X,del(6)(q25),-7,-8,-17[cp14]/46,XY[8]	-	8,8	-	G: 7- A: 4,2
22	75/M	54,XY,dup(3)(q21q25),+7,del(8)(q11),der(8)t(8;17)(p21;q21),+9,+11,der(11)t(8;11)(q11;p11),der(12)t(12;21)(p11;q11),del(13)(q12q22),+del(14)(q24),der(16)t(16;17)(p13;q21-q25),+18,der(21)t(10;21)(q11;p11)[11] (M-FISH)	2,5	2,7	7,7	G: 2,8- A: 0,8/1,7 (del1p)

Del: delección; *G-A:* ganancia-amplificación; * copia extra del gen IGH.

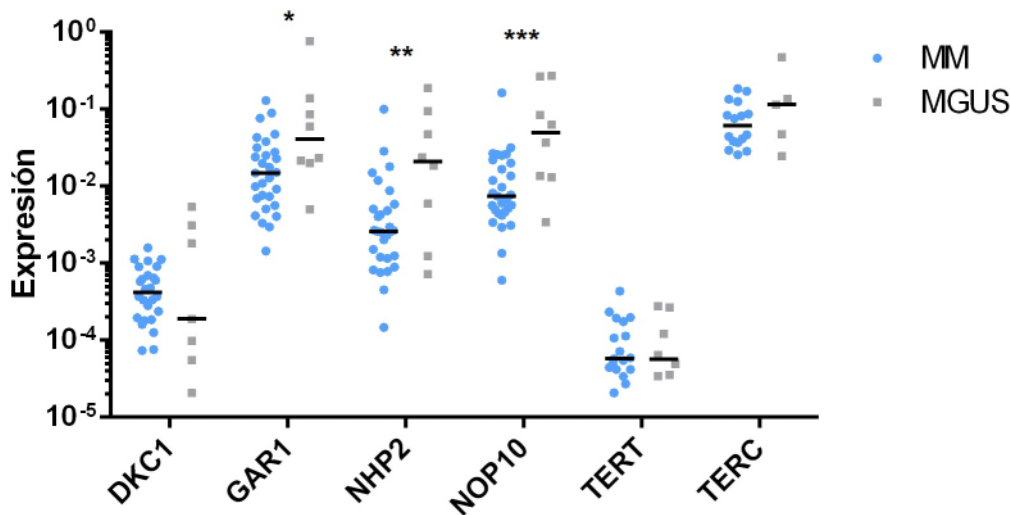


Figura 2. Perfiles de expresión de los genes *DKC1*, *GAR1*, *NHP2*, *NOP10*, *TERT* y *TERC* en pacientes con MM y MGUS. *Diferencias significativas para: * *GAR1* ($p=0,0427$), ** *NHP2* ($p=0,0388$) y *** *NOP10* ($p=0,0107$).

DKC1 mostró un incremento no significativo, y *TERT* presentó similares niveles de expresión en ambas patologías.

El análisis de la expresión de los distintos genes mostró correlación positiva entre los niveles de transcripto de: *GAR1-NHP2* ($r=0,68$), *GAR1-NOP10* ($r=0,68$), y *NOP10-NHP2* ($r=0,84$) ($p<0,0001$) (**Fig. 3**), indicando una estrecha interacción entre los mismos.

Asimismo, se observó una fuerte correlación entre *TERC* y los genes *GAR1* ($r=0,88$), *NHP2* ($r=0,84$) y *NOP10* ($r=0,74$) (**Fig. 4**).

En cuanto a la asociación con las alteraciones citogenéticas, observamos que aquellos pacientes con 2 o más anomalías citogenéticas presentaban una mayor expresión de los genes *GAR1*, *TERT* y *TERC*, aunque sin alcanzar niveles significativos, así como también un incremento no significativo de los genes *TERT* y *TERC* en los pacientes con 2 o más alteraciones por FISH respecto de los casos sin anomalías.

Finalmente efectuamos el análisis de la expresión génica en función de las características clínico-biológicas de los pacientes. Se evaluó la distribución de los niveles de expresión en función del sexo, isotipo, cadena liviana, estadios ISS, infiltración de células plasmáticas en médula ósea (ICPMO), β_2M , LDH, albúmina, creatinina, hemoglobina, calcemia y

lesiones líticas. Si bien no se detectaron diferencias significativas, observamos que todos los genes presentaron menores niveles de expresión en hombres respecto de las mujeres. Con respecto al isotipo los genes *NHP2*, *NOP10* y *TERC* mostraron menor expresión en pacientes con IgA en comparación a aquellos con IgG; en el análisis de cadenas livianas encontramos que todos los genes excepto *DKC1* y *TERT* presentan mayor nivel de expresión en pacientes con cadenas livianas κ . En cuanto a los otros parámetros, se encontró una disminución significativa en el nivel de expresión de *TERC* ($p=0,025$) en los casos con altos valores de creatinina, 60% de los cuales presentaron falla renal (**Fig. 5a**), y un aumento significativo de *TERT* ($p=0,017$) en los casos con niveles elevados de β_2M (**Fig. 5b**).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se efectuó la caracterización citogenética y citomolecular de pacientes con MM y MGUS y se estudiaron los niveles de expresión de diferentes genes involucrados en la regulación telomérica. En nuestra serie detectamos alteraciones citogenéticas en el 26% de los casos, valores compatibles con datos de la literatura que muestran la presencia de cariotipos patológicos en alrededor

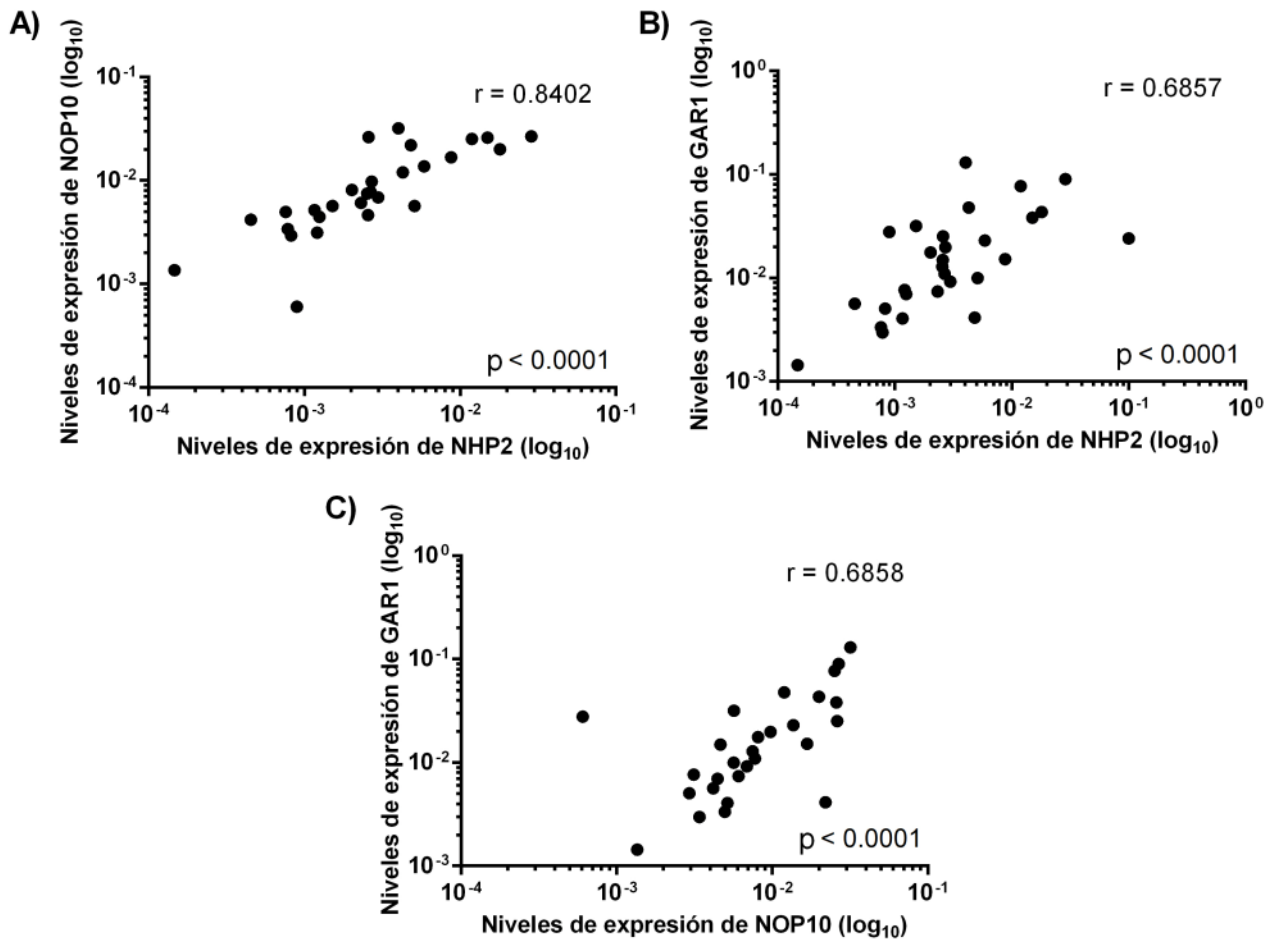


Figura 3. Correlación entre los perfiles de expresión de los genes NHP2, GAR1 y NOP10.

del 30%-40% de los pacientes (Fonseca et al, 2009; Saxe et al, 2019). Asimismo, la conjunción de datos citogenéticos y de FISH mostró un 63% de casos patológicos, valor cercano al 70%-80% descrito en la literatura (Stella et al, 2015; Kumar & Rajkumar, 2018).

A nivel molecular, el análisis de nuestros resultados muestra desregulación global de los genes evaluados, con una disminución estadísticamente significativa en la expresión de *GAR1*, *NHP2* y *NOP10* en MM respecto de MGUS. La literatura presenta escasa información sobre el comportamiento de estos genes en neoplasias hematológicas. Los datos de nuestra serie son concordantes con lo observado por nuestro grupo para *GAR1* y *NOP10* en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) (Dos Santos et al, 2017) pero contrarios

a lo detectado en un estudio de *microarrays* en pacientes españoles con desórdenes de células plasmáticas y líneas celulares de MM, en el que se encontró aumento de expresión de *GAR1*, *NHP2*, *NOP10* y *DKC1* desde MGUS a leucemia de células plasmáticas (Díaz De la Guardia et al, 2012). Simultáneamente, estudios efectuados en neuroblastoma sugieren que en estadios iniciales del tumor la baja expresión de *DKC1*, *NHP2* y *GAR1* podría propender a la aparición de alteraciones genéticas e inestabilidad asociadas a la disfunción telomérica (von Stedingk et al, 2013).

El análisis de los niveles de expresión de estos genes mostró correlación positiva entre *GAR1*, *NHP2* y *NOP10*, y a su vez de TERC con estos mismos genes, indicando una estrecha interacción entre los mismos. Esta correlación entre *GAR1*,

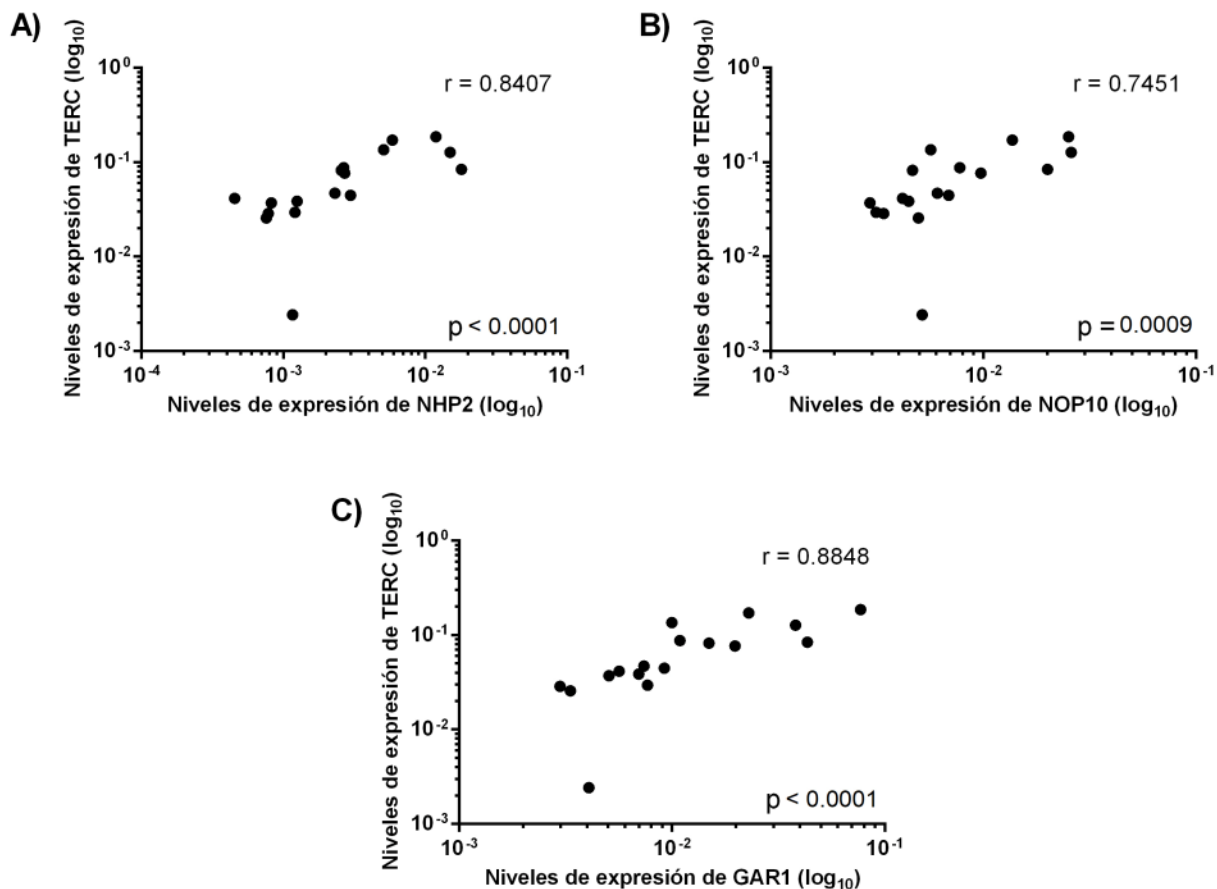


Figura 4. Correlación entre los perfiles de expresión del gen TERC con respecto a GAR1, NHP2 y NOP10.

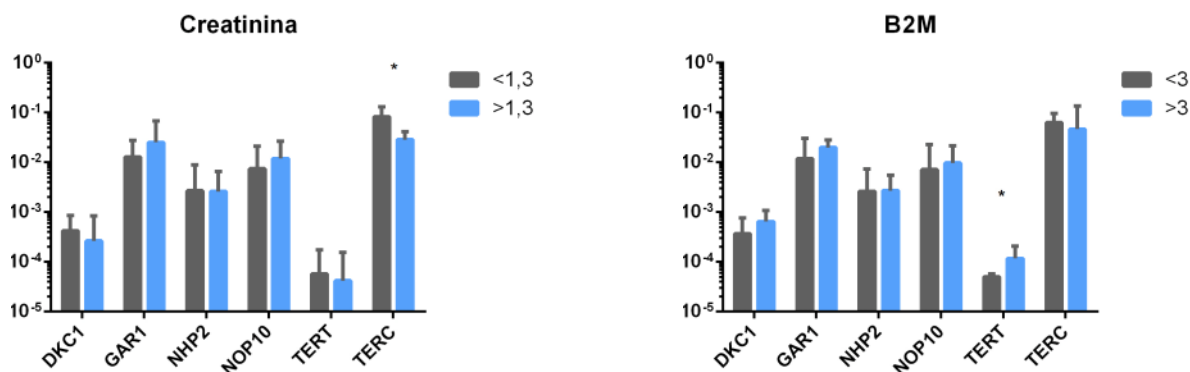


Figura 5. a) Niveles de expresión de TERC en función de creatinina ($p=0,025$). b) Niveles de expresión de TERT en función de $\beta_2 M$ ($p=0,017$).

NHP2 y *NOP10* ha sido también evidenciada en LLC (Dos Santos et al., 2017), sustentando el rol de estas proteínas en el ensamblaje y estabilización de la telomerasa así como en el procesamiento post-transcripcional del RNA ribosómico y del espliceosoma (Lin et al, 2015). Particularmente, *NHP2* es una proteína de unión al ARN, cuya especificidad por el sitio de unión H/ACA snoRNAs proviene de su asociación a disquerina a través de la pequeña proteína *NOP10*, en tanto que disquerina es estabilizada por *GAR1*, una proteína que no interactúa con el ARN. En este contexto, *NHP2*, *NOP10* y *DKC1* forman un *core* que se une directamente al complejo RNP H/ACA, siendo interdependientes para mantener su estabilidad y la unión al RNA (Grozdanov et al, 2009). El silenciamiento de los genes *DKC1*, *NHP2*, *NOP10* y *GAR1* en líneas celulares humanas utilizando ARN de interferencia, mostró una disminución en los niveles de *TERC* asociado al silenciamiento de los tres primeros genes, pero no de *GAR1* (Montanaro et al, 2006; Vulliamy et al, 2008; Walne et al, 2007), indicando que una alteración en los niveles de *DKC1*, *NOP10* y *NHP2* conduce a una desestabilización de *TERC* disminuyendo sus niveles, siendo estas proteínas necesarias para su acumulación. Después de la unión de *GAR1*, el complejo H/ACA maduro se mueve desde el núcleo al nucléolo y los cuerpos de Cajal, lugares en los que cumpliría sus primeras funciones, considerándose que el mismo podría regular numerosos procesos biológicos (Meier, 2006; Jádý et al, 2012). Un estudio en líneas celulares (Lin et al, 2015) encuentra una expresión diferencial en células normales y transformadas, así como en respuesta a distintos agentes genotóxicos y particularmente al daño al ADN, sugiriendo que modificaciones en la expresión de los componentes del complejo RNP podrían ser responsables, al menos en parte, de la supervivencia y la proliferación de las células tumorales, factores de importancia en la progresión tumoral.

En cuanto a *DKC1*, es una proteína que se asocia a familias específicas de H/ACA snoRNAs, algunas de las cuales podrían estar desreguladas en desórdenes hematológicos alterando la hematopoyesis (Bellodi et al, 2013). El análisis de nuestra serie muestra mayores niveles de expresión del gen *DKC1* en MM respecto de MGUS, pero sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas, posiblemente asociado a la dispersión de los datos y el limitado número de casos. No obstante, este incremento resulta concordante con

datos previos de la literatura (Díaz De la Guardia et al, 2012; Panero et al, 2015), habiéndose propuesto que en MM el aumento de expresión de *DKC1* no solo participaría en mantener la actividad de la telomerasa sino que además colaboraría en aumentar los niveles de biosíntesis de proteínas que requieren las CPs malignas, manteniendo los procesos requeridos para el crecimiento de las células neoplásicas (Panero et al, 2015). Por el contrario, en LLC se observó una disminución en la expresión de *DKC1* con respecto al grupo control (Poncet et al, 2008; Dos Santos et al, 2017), considerándose que en esta patología los bajos niveles de *DKC1* conducirían a un desbalance de proteínas ribosomales que podrían influenciar la respuesta de las células leucémicas al microambiente, y tener además un impacto general en la maquinaria traduccional que contribuiría a la oncogénesis al alterar el *splicing* de determinados mRNA o modulando los niveles de ciertos snoRNAs (Angrisani et al, 2014; Sbarrato et al, 2016).

El componente nucleotídico de la telomerasa, *TERC*, se expresa en todas las células con actividad telomerasa positiva, incluyendo células madre y la mayoría de las células neoplásicas (Avilion et al, 1996; Morrison et al, 1996). Asimismo, se encuentra también ampliamente expresado en la mayoría de las células terminalmente diferenciadas que no presentan actividad telomerasa, que no expresan *TERT*, siendo su función en las mismas aún desconocida (Liu et al, 2019). En las células *TERT* positivas los niveles de *TERC* suelen ser mayores a los requeridos para formar unidades *TERT* actividad telomerasa (Xi & Cech, 2014). En el presente trabajo se observó una disminución no significativa de los niveles de *TERC* en MM, concordante con lo detectado en pacientes con LLC (Dos Santos et al, 2017). Simultáneamente, diferentes autores observaron sobreexpresión de *TERC* en cáncer de próstata y de pulmón (Penzo et al, 2015; Baena-Del Valle et al, 2018).

Por su parte, la subunidad proteica de la telomerasa, *TERT*, es la encargada de elongar los telómeros, junto con *TERC*. Se encuentra constitutivamente activada en células germinales hematopoyéticas, células madre y células normales con alta tasa de renovación como ser: células sanguíneas normales, proliferativas basales de la piel, tejido endometrial (durante el ciclo menstrual), células de las crestas intestinales y folículos pilosos (Broccoli et al, 1995; Counter et al,

1995; Härle-Bachor & Boukamp, 1996; Ramirez et al, 1997). Por el contrario, en las células somáticas sus niveles de expresión se encuentran estrictamente regulados siendo mínimos o nulos, resultando esta ausencia de actividad de telomerasa en un acortamiento telomérico que limita la proliferación a un número finito de divisiones (Greenberg, 2005; Cifuentes-Rojas & Shippen, 2012). Por lo tanto, la expresión de *TERT* constituye un factor limitante en la activación del complejo telomerasa (Avilion et al, 1996; Kyo & Inoue, 2002). En el presente trabajo observamos valores similares en los niveles de expresión de ambas patologías. La literatura muestra aumento de *TERT* en MM respecto de MGUS (Xu et al, 2001; Panero et al, 2010), aunque sin diferencias significativas debido a la amplia variabilidad entre pacientes. En LLC se han reportado resultados contradictorios, existen trabajos donde se ha observado un aumento de la expresión de este gen, incluido un estudio previo realizado por nuestro grupo (Bechter 1998; Hoxha et al, 2014; Dos Santos et al, 2017), en tanto que Poncet et al (2008) observaron una disminución de la misma. Algo similar se observó en linfoma de células del manto donde nuestro grupo encontró sobreexpresión (Panero et al, 2016) mientras que otros autores reportaron lo contrario (Klapper et al, 2003).

Completando nuestro estudio, nos interesó ver si existía asociación entre los niveles de expresión de los genes analizados y las alteraciones genéticas, observando mayor expresión en los genes *GAR1*, *TERT* y *TERC* en pacientes con 2 o más alteraciones citogenéticas y un incremento de *TERT* y *TERC* en los casos con alteraciones por FISH. Estos datos son concordantes con lo detectado por nuestro grupo en pacientes con LLC, donde observamos un aumento significativo de expresión de *GAR1*, *NHP2*, *NOP10* y *DKC1* en los casos con dos o más alteraciones (Dos Santos et al, 2017), así como con un estudio en neuroblastoma por microarrays (von Steingck et al, 2013) en el que detectaron sobreexpresión de *DKC1*, *NHP2* y *GAR1* asociado a complejidad genómica.

Por otra parte, evaluamos la asociación entre la expresión génica y los parámetros clínicos, observando una disminución significativa de la expresión de *TERC* en los pacientes con creatinina elevada. Asimismo, detectamos un aumento significativo de *TERT* en los pacientes con β 2M aumentada, confirmando datos previos de nuestro grupo que evidenciaron parámetros clínicos asociados a progresión con mayores

niveles de expresión de *TERT* (Panero et al, 2010). En este aspecto cabe mencionar el efecto inhibitorio sobre la actividad de telomerasa de los inhibidores del proteasoma, fármacos ampliamente usados en el tratamiento del MM. Este efecto se produce tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, permitiendo ubicar a la telomerasa como un blanco general para estos compuestos. Las células mielomatosas muestran diferente sensibilidad a los inhibidores del proteasoma, que podría relacionarse con la resistencia al tratamiento en algunos pacientes, sugiriendo su importancia a nivel clínico (Shalem-Cohavi et al, 2019).

Concluyendo, nuestro estudio muestra disfunción en los niveles de expresión de los genes que codifican para las proteínas del complejo RNP en MM y MGUS, y evalúa por primera vez, a nuestro conocimiento, su comportamiento en relación a alteraciones genéticas y los parámetros clínicos. Los resultados obtenidos constituyen un aporte a la caracterización biológica del MM y sustentan un rol del complejo H/ACA en el mantenimiento de la capacidad proliferativa de las células mielomatosas, contribuyendo a la comprensión de los mecanismos patogénicos involucrados en el desarrollo de la patología, permitiendo sugerir a estos genes como potenciales blancos para futuros tratamientos en estas entidades.

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado con fondos del Subsidio PI3 2018-2020 (código 80020170200010UM), Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Morón, y del CONICET PIP N° 1122015 0100753.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaw F, Lin P. (2011) Dyskerin is required for tumor cell growth through mechanisms that are independent of its role in telomerase and only partially related to its function in precursor rRNA processing. *Mol Carcinog* 50: 334-45.
- Angrisani A, Vicidomini R, Turano M, et al. (2014) Human dyskerin: Beyond telomeres. *Biol Chem* 395: 593-610.
- Avilion AA, Piatyszek MA, Gupta J, et al. (1996) Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res* 56: 645-50.

- Baena-Del Valle JA, Zheng Q, Esopi DM, et al. (2018). MYC drives overexpression of telomerase RNA (hTR/TERC) in prostate cancer. *J Pathol* 244: 11-24.
- Bechter O. (1998) Telomere length and telomerase activity predict survival in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Cancer Res* 58: 4918-22.
- Bellodi C, McMahon M, Contreras A, et al. (2013) H/ACA Small RNA Dysfunctions in Disease Reveal Key Roles for Non-coding RNA Modifications in Hematopoietic Stem Cell Differentiation. *Cell Rep* 3: 1493-1502.
- Bièche I, Noguès C, Paradis V, et al. (2000) Quantitation of hTERT gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res* 6: 452-9.
- Bonetti D, Martina M, Falcettoni M, et al. (2014) Telomere-end processing: Mechanisms and regulation. *Chromosoma* 123: 57-66.
- Broccoli D, Young JW, De Lange T. (1995) Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9082-6.
- Chang JTC, Chen YL, Yang HT, et al. (2002) Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits. *Eur J Biochem* 269: 3442-50.
- Cifuentes-Rojas C, Shippen DE. (2012) Telomerase regulation. *Mutat Res* 730: 20-7.
- Counter CM, Gupta J, Harley CB, et al. (1995) Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85: 2315-20.
- Darzacq X, Kittur N, Roy S, et al. (2006) Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells. *J Cell Biol* 173: 207-18.
- De Lange T. (2005) Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19: 2100-10.
- Díaz De la Guardia R, Catalina P, Panero J, et al. (2012) Expression profile of telomere-associated genes in multiple myeloma. *J Cell Mol Med* 16: 3009-21.
- Doksani Y. (2019) The response to DNA damage at telomeric repeats and its consequences for telomere function. *Genes* 10: 1-17.
- Dos Santos PC, Panero J, Stanganelli C, et al. (2017) Dysregulation of H/ACA ribonucleoprotein components in chronic lymphocytic leukemia. *PLoS ONE* 12: 1-13.
- Filipowicz W. (2002) Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* 14: 319-27.
- Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. (2009) International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 23: 2210-21.
- Gilson E, Géli V. (2007) How telomeres are replicated. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 825-38.
- Greenberg R. (2005) Telomeres, Crisis and Cancer. *Curr Mol Med* 5: 213-8.
- Greipp PR, Miguel JS, Dune BGM, et al. (2005). International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 23: 3412-20.
- Grozdanov PN, Roy S, Kittur N, et al. (2009) SHQ1 is required prior to NAF1 for assembly of H/ACA small nucleolar and telomerase RNPs. *RNA* 15: 1188-97.
- Härle-Bachor C, Boukamp P. (1996) Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6476-81.
- Hoxha M, Fabris S, Agnelli L, et al. (2014) Relevance of telomere/telomerase system impairment in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosome Cancer* 53: 612-21.
- ISCN. McGowan-Jordan J, Hastings RJ, Moore S. (eds). (2020) An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. *Cytogenet Genome Res* 160: 341-503.
- Jády BE, Ketele A, Kiss T. (2012). Human intron-encoded Alu RNAs are processed and packaged into Wdr79-associated nucleoplasmic box H/ACA RNPs. *Genes Dev* 26: 1897-1910.
- Klapper W, Krams M, Qian W, et al. (2003). Telomerase activity in B-cell non-Hodgkin lymphomas is regulated by hTERT transcription and correlated with telomere-binding protein expression but uncoupled from proliferation. *Br J Cancer* 89: 713-9.
- Kumar SK, Rajkumar SV. (2018) The multiple myelomas - Current concepts in cytogenetic classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 15: 409-21.
- Kyo S, Inoue M. (2002) Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: How can we apply them for cancer therapy? *Oncogene* 21: 688-97.
- Lin P, Mobasher ME, Hakakian Y, et al. (2015) Differential requirements for H/ACA ribonucleoprotein components in cell

proliferation and response to DNA damage. *Histochem Cell Biol* 144: 543-58.

- López-Corral L, Mateos MV, Corchete LA, et al. (2012) Genomic analysis of high-risk smoldering multiple myeloma. *Haematologica* 97: 1439-43.
- Liu H, Yang Y, Ge Y, et al. (2019) TERC promotes cellular inflammatory response independent of telomerase. *Nucleic Acids Res* 47: 8084-95.
- Meier U. (2006) How a single protein complex accommodates many different H/ACA RNAs. *Trends Biochem Sci* 31: 311-5.
- Montanaro L, Brigotti M, Clohessy J, et al. (2006). Dyskerin expression influences the level of ribosomal RNA pseudouridylation and telomerase RNA component in human breast cancer. *J Pathol* 210: 10-8.
- Morrison SJ, Prowse KR, Ho P, et al. (1996) Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity* 5: 207-16.
- O'Sullivan RJ, Karlseder J. (2010) Telomeres: Protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 171-81.
- Panero J, Arbelbide J, Fantl DB, et al. (2010) Altered mRNA expression of telomere-associated genes in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Mol Med* 16: 471-8.
- Panero J, Stanganelli C, Arbelbide J, et al. (2014) Expression profile of shelterin components in plasma cell disorders. Clinical significance of POT1 overexpression. *Blood Cells Mol Dis* 52: 134-9.
- Panero J, Stella F, Schutz N, et al. (2015) Differential expression of non-shelterin genes associated with high telomerase levels and telomere shortening in plasma cell disorders. *PLoS ONE* 10: 1-13.
- Panero J, Alves-Paiva RM, Roisman A, et al. (2016). Acquired TERT promoter mutations stimulate TERT transcription in mantle cell lymphoma. *Am J Hematol* 91: 481-5.
- Penzo M, Ludovini V, Treré D, et al. (2015). Dyskerin and TERC expression may condition survival in lung cancer patients. *Oncotarget* 6: 21755-60.
- Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
- Poncet D, Belleville A, De Roodenbeke CTK, et al. (2008) Changes in the expression of telomere maintenance genes

suggest global telomere dysfunction in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111: 2388-91.

- Rajan AM & Rajkumar SV. (2015) Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer J* 5: 1-7.
- Rajkumar SV. (2020) Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 95:548-67.
- Ramirez RD, Wright WE, Shay JW, et al. (1997) Telomerase activity concentrates in the mitotically active segments of human hair follicles. *J Invest Dermatol* 108: 113-7.
- Ronchetti D, Todoerti K, Tuana G, et al. (2012) The expression pattern of small nucleolar and small Cajal body-specific RNAs characterizes distinct molecular subtypes of multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2: e96-8.
- Saxe D, Seo EJ, Bergeron MB, et al. (2019) Recent advances in cytogenetic characterization of multiple myeloma. *Int J Lab Hematol* 41: 5-14.
- Sbarrato T, Horvilleur E, Pojry T, et al. (2016) A ribosome-related signature in peripheral blood CLL B cells is linked to reduced survival following treatment. *Cell Death Dis* 7: e2249.
- Shalem-Cohavi N, Beery E, Nordenberg J, et al. (2019). The effects of proteasome inhibitors on telomerase activity and regulation in multiple myeloma cells. *Int J Mol Sci* 20: 2509.
- Shammas MA. (2011) Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14: 28-34.
- Stella F, Pedrazzini E, Agazzoni M, et al. (2015) Cytogenetic alterations in multiple myeloma: Prognostic significance and the choice of frontline therapy. *Cancer Invest* 33: 496-504.
- Townsley DM, Dumitriu B, Young NS. (2014). Bone marrow failure and the telomeropathies. *Blood* 124: 2775-83.
- von Stedingk K, Koster J, Piqueras M, et al. (2013) snoRNPs regulate telomerase activity in neuroblastoma and are associated with poor prognosis. *Transl Oncol* 6: 447-57
- Vulliamy T, Beswick R, Kirwan M, et al. (2008) Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 8073-8.
- Xi L, Cech TR. (2014) Inventory of telomerase components in human cells reveals multiple subpopulations of hTR and hTERT. *Nucleic Acids Res* 42: 8565-77.

- Xu D, Zheng C, Bergenbrant S, et al. (2001) Telomerase activity in plasma cell dyscrasias. *Br J Cancer* 84: 621-5.
- Yoon A, Peng G, Brandenburg Y, et al. (2006) Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. *Science* 312: 902-6.