

## IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA

A.E. Rodríguez<sup>1</sup>, R. Benito<sup>1</sup>, M. Hernández<sup>1</sup>, S. González<sup>1</sup>, C. Zato<sup>2</sup>, J.Á. Hernández<sup>3</sup>, N. de las Heras<sup>4</sup>, J.F. de Paz<sup>2</sup>, J.M<sup>5</sup>. Hernández-Rivas<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>IBMCC. Centro de Investigación del Cáncer. Universidad de Salamanca-CSIC. <sup>2</sup>Departamento de Informática y Automática. Universidad de Salamanca. <sup>3</sup>Hospital Infantil Leonor. Madrid. <sup>4</sup>Hospital Virgen Blanca. León. <sup>5</sup>Hospital Clínico Universitario de Salamanca

La leucemia linfática crónica (LLC) es una hemopatía maligna con una heterogeneidad clínica manifiesta, que puede estar en relación con las alteraciones genéticas de sus células. La combinación de la captura de determinadas regiones y su posterior secuenciación es una estrategia que permite realizar un análisis de las variaciones en los genes seleccionados, por lo que puede ser de utilidad en el estudio de la LLC.

**Objetivo:** Analizar la presencia de nuevas variaciones genéticas en LLC mediante el uso combinado del enriquecimiento de secuencias y la secuenciación masiva.

**Pacientes y métodos:** Se analizaron 4 enfermos con LLC al diagnóstico y 4 controles de hemopatías malignas no LLC. Se extrajo el ADN de las células CD19+, purificadas mediante bolas magnéticas. Se secuenciaron un total de 845 kb, correspondientes a 1266 regiones, que incluían 1564 exones correspondientes a 93 genes y a dos regiones cromosómicas completas: 13q14.3 y 17p13.1. A partir de 5 ug de DNA total se preparó una librería de fragmentos de DNA de cadena sencilla (300-500pb) con adaptadores. Las secuencias de interés fueron capturadas mediante un *array* de diseño personalizado ("NimbleGen Sequence Capture *array*") y posteriormente amplificadas por PCR. El producto final se secuenció mediante el sistema 454-FLX de Roche. La localización de las alteraciones se realizó con el programa GS Reference Mapper (454 Roche). Los resultados se confirmaron mediante secuenciación Sanger.

**Resultados:** Se identificaron 299 variaciones genéticas. De ellas 226 eran SNPs que estaban presentes en todas las muestras, por lo que fueron descartados. Del total de las variantes detectadas en cada muestra, el 10% correspondía a mutaciones nuevas no descritas. Se observaron 73 mutaciones que provocaban cambio de aminoácido en 38 genes. La mayoría de los genes presentaban solo una (60.5%) o dos (26.3%) mutaciones. En ATM y GCAT se identificaron 3 mutaciones por gen. Las variaciones identificadas incluían mutaciones no solamente en dianas conocidas en LLC como ATM, TP53 y CDK6 sino también en genes hasta ahora no relacionados con LLC, como SYNE1 y TET2 (polimorfismos asociados a SMDs y una mutación no descrita previamente). Se identificaron además mutaciones fuera de regiones exónicas, de gran interés biológico, como las localizadas en secuencias promotoras (FCRL1 y PI3K) o las variaciones que afectan a microRNAs (DICER, miR223).

**Conclusión:** La combinación del enriquecimiento mediante captura de secuencias seguido de la tecnología de secuenciación masiva permite el hallazgo de nuevas variaciones genéticas en LLC, que pueden abrir nuevas vías de investigación en su fisiopatología y tratamiento.

*Subvención del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS06/00126, FIS09/0).*