



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**TESIS DOCTORAL**

**Papel de las Proteína Tirosina Fosfatasas  
y  $\beta$ -Catenina en la Hematopoyesis.**

**GUILLERMO LÓPEZ RUANO**

Salamanca, 2015













**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**TESIS DOCTORAL**

**Papel de las Proteína Tirosina Fosfatasas  
y  $\beta$ -Catenina en la Hematopoyesis.**

**GUILLERMO LÓPEZ RUANO**

**Salamanca, 2015**







**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**  
*Campus Miguel de Unamuno - Edificio Departamental*  
*Pza. Doctores de la Reina s/n 37007 Salamanca. Spain.*  
Tel.+34-923 294 465 Fax:+34-923 294 579



D. ÁNGEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada “***Papel de las Proteína Tirosina Fosfatasas y  $\beta$ -Catenina en la Hematopoyesis.***”, que para optar al Grado de Doctor en Biología presenta D. Guillermo López Ruano, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Considerando que la Tesis Doctoral se halla concluida, autorizo su presentación para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo el presente documento en Salamanca a veintisiete de febrero de dos mil quince.





**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**  
Campus Miguel de Unamuno - Edificio Departamental  
Pza. Doctores de la Reina s/n 37007 Salamanca. Spain.  
Tel.+34-923 294 465 Fax:+34-923 294 579



GUILLERMO LÓPEZ RUANO, Licenciado en Biología y Bioquímica por la Universidad de Salamanca,

DECLARO:

Que soy el Autor de esta Tesis Doctoral titulada “***Papel de las Proteína Tirosina Fosfatasas y  $\beta$ -Catenina en la Hematopoyesis.***”, realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca bajo la dirección del Profesor Dr. Ángel Hernández Hernández

Y para que así conste, firmo el presente documento en Salamanca a veintisiete de febrero de dos mil quince.



## **NOTA PRELIMINAR**

Este trabajo de investigación ha sido financiado con cargo a los proyectos subvencionados por el **Ministerio de Ciencia y Tecnología** (Plan I+D+i),( "*Papel de las especies reactivas del oxígeno en la megacariopoyesis y eritropoyesis: origen y mecanismo de acción*" Ref. BFU 2009-10568), el **Ministerio de Economía y competitividad**, ("*Papel de las especies reactivas del oxígeno en hematopoyesis. Uso de NADPH oxidasas como dianas terapéuticas en cáncer*" REF. BFU2011-28467), la **Junta de Castilla y León** ("*Función de PTP-Bas durante la megacariopoyesis. Regulación de su expresión génica*" SA126A071 y "*Papel de las especies reactivas del oxígeno en la megacariopoyesis*" SA010A10-2). Y la **Fundación Samuel Solórzano Barruso** ("*Papel de las especies reactivas del oxígeno en hematopoyesis. Uso de NADPH oxidasas como dianas terapéuticas en cáncer*")

El autor de la Memoria ha disfrutado de un contrato de Formación de Personal Investigador de reciente titulación universitaria de la Junta de Castilla y León cofinanciado con el Fondo Social Europeo FEDER (agosto 2009-agosto 2013).

Los resultados recogidos en esta Memoria han sido en parte publicados en un artículo y presentados en los siguientes Congresos:

### **Artículo:**

Sardina JL, **López-Ruano G**, Prieto-Bermejo R, Sánchez-Sánchez B, Pérez-Fernández A, Sánchez-Abarca LI, Pérez-Simón JA, Quintales L, Sánchez-Yagüe J, Llanillo M, Antequera F, Hernández-Hernández A. *PTPN13 regulates cellular signalling and  $\beta$ -catenin function during megakaryocytic differentiation.*

Biochim Biophys Acta. 2014 Dec; . doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.08.014.

### **Congresos:**

AUTORES/AS: **Guillermo López Ruano**; José Luis Sardina Ortega; Beatriz Sanchez Sanchez; Rodrigo Prieto Bermejo; Marcial Llanillo Ortega; Angel Hernández-Hernández.  
TÍTULO: Regulation of HEL cells megakaryocytic differentiation by SHP1 and SHP2.  
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster  
CONGRESO: Europhosphatase 2013: Protein Phosphatases in Health and Disease  
PUBLICACIÓN: Libro de resúmenes  
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Rehovot, Israel      AÑO: 2013

AUTORES/AS: **Guillermo López Ruano**; Beatriz Sánchez Sánchez; Rodrigo Prieto Bermejo; Jesús Sánchez Yagüe; Llanillo, M.; Hernández-Hernández, A.

TÍTULO: Regulation of SHP1 oxidation regulates megakaryocytic differentiation in HEL cells

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress

PUBLICACIÓN: Libro de resúmenes

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Sevilla (España)      AÑO: 2012

AUTORES/AS: **Guillermo López Ruano**; José L Sardina; Beatriz Sánchez Sánchez; Sánchez-Yagüe, J.; Llanillo, M.; Hernández-Hernández, A.

TÍTULO: Regulación de la diferenciación megacariocítica por SHP1 y SHP2

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

PUBLICACIÓN: Libro de resúmenes

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Barcelona (España)      AÑO: 2011

AUTORES/AS: **Guillermo López Ruano**; José Luis Sardina Ortega; Beatriz Sanchez Sanchez; Serena Giancane; Jesús Sánchez Yagüe; Marcial Llanillo; Angel Hernández-Hernández.

TÍTULO: Regulacion de la diferenciación megacariocítica por especies reactivas del oxígeno y proteína Tirosina fosfatasas

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

PUBLICACIÓN: Libro de resúmenes

LUGAR DE CELEBRACIÓN: CORDOBA, España      AÑO: 2010







Mucho antes de ni siquiera imaginar que acabaría realizando la presente tesis doctoral, cuando una tesis caía en mis manos, y le echaba un ojo, siempre acababa en la parte de los agradecimientos. A partir de la segunda tesis que ojeé, supe que el formato que estos debían tener era claro. El primer agradecimiento debía ser para el director. Por ello, yo quiero ser original, y en primer lugar quiero dar las gracias a mi director de tesis. Sé que es repetitivo con respecto a otras tesis, pero el empeño y dedicación del Dr. Angel Hernández es lo que le ha aportado a esta tesis la calidad que pueda tener. Yo lo único que he hecho es trabajar y aprender. En señal de agradecimiento solo puedo decir que espero haber aprendido de su forma de pensar. A él, quiero agradecerle también, que me haya enseñado que la inspiración hay que buscarla trabajando. Por último, gracias a él, la elaboración de esta tesis en su laboratorio ha sido una gran etapa profesional.

Sin embargo, mentiría si no dijera que últimamente siento que aunque mi nombre es el que figura en la tesis, lo único que hice fue aprovecharme del conocimiento de otras personas, las cuales han contribuido, y mucho, a la realización de esta tesis.

En primer lugar mis compañeros de laboratorio, laboratorio que he visto crecer a lo largo de estos últimos años. Por empezar temporalmente, gracias a José Luis Sardina que me ayudó mucho al inicio de mi etapa en el laboratorio. A Beatriz Sánchez-Sánchez, con la que he compartido muchas jornadas de laboratorio, que ha aguantado gran parte de mis quejas y que me ayudó siempre que se lo pedí y muchas más veces que ni siquiera lo hice. Gracias a Rodrigo Prieto Bermejo, porque algunos de los experimentos no hubieran sido posibles sin su ayuda. Gracias también a los otros miembros del grupo con los que he compartido menos tiempo y por orden cronológico han sido Serena, Alex, Mónica, Marta, Tamara, David y las últimas incorporaciones Carla y Alberto. Gracias, porque aunque no lo parezca, con ruido y gente alrededor se trabaja mejor.

Quiero dar las gracias también a los profesores del departamento de Bioquímica y Biología molecular. Especialmente a Marcial Llanillo a quien a partir de ahora tomaré como ejemplo de dedicación y trabajo diario. A Jesús Sánchez Yagüe porque fue importante al inicio de mi tesis y tesina y siempre tiene un punto de vista externo. Y gracias a Pablo Hueso, porque me ha enseñado muchas cosas, y las menos importantes son las que me enseñó cuando fui su alumno. Por último, gracias a los otros profesores del departamento y con especial cariño gracias a Isabel, Carmen, Enrique, Nieves y Valery.

Gracias a los que en algún momento fueron becarios del departamento de Bioquímica y Biología molecular. Nada de su trabajo está reflejado en esta tesis, pero de muchos aprendí y sigo aprendiendo muchas cosas y con otros fue un placer trabajar. Gracias por tanto a

Fernando, Nacho, Javi, Juan, Sara, Nancy, Lorena, Juanjo, Nazaret, Violeta, Mar, Irene y Laura.

Gracias al personal no docente del departamento Tomy, Victoria y Javier, siempre he sentido de ellos una especial deferencia hacia mi y siempre han sido solícitos cuando les pedí ayuda.

Fuera del departamento, también, ha habido personas que han sido absolutamente indispensables para que esta tesis esté terminada. Gracias a Nacho Sánchez-Abarca por su diligencia, amabilidad, cariño y eficacia. A Carmén Guerrero y a su grupo de investigación por su generosidad y rapidez en ofrecerme su ayuda siempre que lo he necesitado. A Paco Antequera por su deferencia con el laboratorio y conmigo. A las técnicas del servicio de citometría de flujo de la Universidad de Salamanca, Paloma y M<sup>a</sup> Luz, sin su ayuda los experimentos de citometría en ratones no los hubiéramos podido realizar. A Noemí Puig por su ayuda con el Infinicyt. A María Sacristán e Irene García-Higuera por su ayuda con el ciclo celular. A Ramón Martí Seves y Javier Torres Torronteras por su inestimable ayuda para conseguir la transducción de las células Lin-. Y gracias a Teresa Ramos a la que últimamente debería haber enseñado a hacer Western blot y de la que, lo único que hice, fue aprender.

Especial mención quiero hacer a Rafi López que fue mi profesora durante el instituto y su profesionalidad me inculcó el amor por la biología. Es la responsable última de que esta tesis se haya realizado y desde luego lo menos importante a sido su ayuda en la elaboración de esta memoria.

Gracias a mis amigos, especialmente a los “avutardos”, a los que no veo lo que desearía, con los que en su momento compartí muchas noches de locura y con los que últimamente comparto planes, esperanzas y frustraciones.

Gracias a Lucí, que decir aquí que no suene a tópico, gracias porque me complementas, porque complementas mi cocina, porque espero que nunca me duela verte removiendo las cenizas que el placer tras de sí dejó. Gracias por cada minuto de cada día. Gracias también a la familia política en la que poco a poco me he ido introduciendo. Especialmente a la más cercana, por aguantarme, que no siempre es fácil.

Por último, y volviendo al principio, gracias a los miembros de mi familia. Porque deberían estar en el primer párrafo y siempre están en el último. Porque solo recibo cosas buenas de ellos. Gracias a mi padre, con el que algunas veces choco porque siempre ve las cosas de la misma forma que yo y eso no siempre me gusta. Gracias a mi madre, ejemplo de generosidad absoluta. También debo darles las gracias a mis padres por tener una familia amplia. Ellos me han proporcionado a mis tres hermanos y la posibilidad de tener una relación

absolutamente distinta con cada uno de ellos. Sin embargo, de los tres lo único que hago es recibir y casi nunca dar. Gracias a Bari, Ferna y Ángel M<sup>a</sup> que aburrida y triste hubiera sido la vida sin vosotros.

Gracias al resto de personas que también han contribuido a la realización de esta tesis doctoral y de las que seguramente me acordare cuando ya este impresa y no pueda reflejarlo.

Por último, quiero agradecer a la empresa que se encarga del servicio de vigilancia de la Universidad de Salamanca el recordame en un par de ocasiones que, a pesar de que sean las 12 de la noche y solo sea para 5 minutos, no se puede aparcar a la puerta del edificio departamental de la facultad de Biología. Siempre es un placer cuando después de una larga jornada de laboratorio alguien te ofrece su ayuda desinteresada.



## **Abreviaturas**

---



**7-AAD:** 7-Aminoactinomicina D

**Ac:** Anticuerpo.

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico copia.

**Akt = PKB** (Protein Kinase B): Proteína quinasa B.

**APC:** Alofocianina.

**ARE** (antioxidant-responsive element): Elemento de respuesta a antioxidantes.

**BFU-E** (Burst forming unit erythroid): Unidades explosivas formadoras de eritrocitos.

**BFU-MK** (Burst forming unit megakaryocyte): Unidades explosivas formadoras de megacariocitos.

**BSA:** Seroalbúmina Bovina.

**Células HEK293** (human embryonic kidney 293 cells): Línea celular obtenida a partir de células tumorales de riñón embrionario humano.

**CFU-MK** (Colony-Forming Unit Megakaryocytes): Unidades formadoras de megacariocitos.

**CMEP:** Progenitor eritro-mieloide común.

**CML:** Leucemia mielogénica crónica.

**CMLP:** Progenitor linfo-mieloide común.

**CMP** (Common Myeloid Progenitor): Progenitor mieloide común.

**CLP** (Common Lymphoid progenitor): Progenitor linfoide común.

**CSF-1** (Colony Stimulating Factor): Factor estimulador de colonias.

**DMEM** (Dubelcco's Modified Eagle's Medium): Medio de Eagle modificado por Dulbeco.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**dH<sub>2</sub>O:** Agua ultrapura.

**dNTPs** (deoxyribonucleoside triphosphate): desoxirribonucleósidos trifosfato.

**DAG:** Diacilglicerol

**Dominio FERM** (Four point one/Ezrin/Radixin/Moesin): Dominio homólogo a las proteínas Ezrina, Radixina y Moesina.

**Dominio KIND** (Kinase non catalytic C-lobe domain): Dominio no catalítico homólogo a los dominios kinasa.

**Dominio PEST:** Secuencia rica en aminoácidos prolina, glutamato, serina y treonina.

**Dominio PDZ** (PSD-95/*Drosophila* disc large/Zonula occludens): Dominio homólogo a los de la proteína PSD-95 de *Drosophila*, originalmente identificado como regiones repetitivas de homología entre el producto del supresor génico tumoral *dgl* *Drosophila* y la proteína sináptica PSD-95.

**Dominio SH2** (Src homology 2 domain): Dominios homólogos al dominio 2 de la proteína Src.

**DPI:** difenil iodonium.

**DTT:** Ditionitrosito.

**EDTA** (Ethylenediaminetetraacetic acid): Ácido etilendiaminotetraacético.

**EPO:** Eritropoyetina.

**ERK** (Extracellular-signal-regulated kinase): Quinasa reguladas por señales extracelulares.

**FBS:** Suero Fetal Bovino.

**FLT3** (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand): Ligando de la Tirosina quinasa 3 de hígado fetal.

**FOG-1** (Friend of GATA-1): Proteína que actúa como un cofactor de GATA-1.

**FOXOs** (Forkhead O Transcription Factors): Factores de transcripción de la familia "Forkhead O".

**G-CSF** (Granulocyte Colony Stimulating Factor): Factor estimulador de colonias de granulocitos.

**GFP** (Green Fluorescence Protein): Proteína verde fluorescente.

**GM-CSF** (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor): Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.

**GMLP:** Progenitor granulo-monocítico-linfoide.

**GMP** (Granulocyte/Monocytic Progenitor): Progenitor granulo-monocítico.

**GP** (glycoprotein): Glicoproteína.

**GpA:** Glicoforina A.

**GRX:** Glutarredoxina

**HSCs** (Haematopoietic Stem Cells): Células madre hematopoyéticas.

**LT-HSCs** (Long Term HSCs): HSCs de largo plazo.

**ST-HSCs** (Short Term HSCs): HSCs de corto plazo.

**LMPPs** (Lymphoid-Primed Multipotent Progenitor) Progenitor primario multipotente.

**HRP** (Horseradish peroxidase): Peroxidasa de rábano.

**ILs:** Interleuquinas

**IP:** Ioduro de propidio.

**IRS1** (Insulin receptor substrate 1): Receptor de insulina de sustratos tipo 1.

**JAKs** (Janus Kinases): Quinasas de la familia "Janus".

**JNKs:** Quinasas c-Jun N-terminal.

**kDa:** KiloDaltons.



**LSCs** (Leukaemic Stem Cells): Células madre leucémicas.

**MAPK** (Mitogen Activated Protein Kinases): Proteínas quinasas activadas por mitógenos.

**MBP**: Progenitor mielo-linfoide B.

**M-CSF** (Mastocyte Colony Stimulating Factor): Factor estimulante de colonias de mastocitos.

**MEP= MkEP** (Megakaryocyte/Erythroid Progenitor): Progenitor eritro-megacariocítico.

**MEK=MKK** (Mitogen-activated protein kinase kinase): Proteína quinasa quinasa activada por mitógeno.

**MOI**: Multiplicidad media de infección.

**MTT**: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

**NF-κB** (nuclear factor-kappa B): Factor nuclear kappa B.

**NMDA**: N-metil-D-aspartato.

**NOXs**: NADPH oxidasas

**NRPTs**: Proteína tirosina fosfatasa de tipo no receptor o intracelulares.

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>**: Anión superóxido.

**OH<sup>-</sup>**: Radical hidroxilo.

**pb**: Pares de bases.

**PBS** (Phosphate Buffer Saline): Tampón fosfato salino o solución amortiguadora de fosfatos.

**PKC**: Proteína quinasa C.

**PMA** (Phorbol 12-myristate 13-acetate): Forbol 12-Miristato 13-Acetato.

**Proteína(s) STAT(s)** (Signal Transducers and Activators of Transcription): Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción.

**PTKs**: Proteína tirosina quinasa(s).

**PTPs**: Proteína tirosina fosfatasa(s).

**PTP-BL=mPTPN13** (PTP-Bas Like): PTP homóloga de PTPN13 en ratones.

**p/v**: peso/volumen.

**PVDF**: Difluoruro de polivinilideno.

**shRNA** (short hairpin RNA): ARNs pequeños con forma de horquilla.

**siRNA**: ARNs pequeños de interferencia.

**RNAasa A**: Ribonucleasa A.

**ROS** (Reactive Oxygen Species): Especies reactivas del oxígeno.

**RT-qPCR** (Real time PCR) PCR a tiempo real o PCR cuantitativa.

**RTKs**: Receptores tirosina quinasa.

**SCF** (Stem Cell Factor): Factor de células madre.

**SDF-1** (Stromal cell-Derived Factor-1): Factor celular derivado del estroma 1.

**SDS**: Dodecil sulfato sódico.

**SOD**: Superóxido dismutasa.

**TBS** (Tris Buffer Saline): Tampón Tris Salino.

**TCA**: Ácido tricloroacético.

**TPO**: Tombropoyetina.

**Tris**: Tris(hidroximetil)aminometano.

**Tween 20**: Polioxietileno 20 sorbitan monolaurato.





## Índice

---



<b>1.</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>39</b>
1.1	La hematopoyesis: Una diferenciación que cambia de entorno durante el desarrollo embrionario	39
1.2	La jerarquía hematopoyética.	40
1.3	El nicho hematopoyético: el lugar donde viven las HSCs	41
1.4	La hematopoyesis se divide en el linaje linfoide y el linaje mieloide	43
1.5	La hematopoyesis está regulada por numerosas citoquinas.	44
1.5.1	La trombopoyetina	45
1.5.2	CXCL12	46
1.5.3	SCF	47
1.5.4	Factores de la familia Wnt.	48
1.5.4.1	$\beta$ -Catenina	49
1.6	La megacariopoyesis	52
1.7	Las PTPs, más que unos simples inhibidores de las rutas de señalización.	55
1.7.1	SHP1 y SHP2, dos PTPs estructuralmente muy similares	56
1.7.2	PTPN13.	59
1.7.3	Las ROS regulan a las PTPS	61
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>69</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>75</b>
3.1	Aparatos	75
3.2	Reactivos	76
3.3	Materiales.	78
3.3.1	Material biológico.	78
3.3.1.1	Líneas celulares	78
3.3.1.2	Animales de experimentación	78
3.3.1.3	Cepas bacterianas	78

3.3.2	Material informático	798
3.4	Medios de cultivos.	79
3.4.1	Medios de cultivos celulares.	79
3.4.2	Medios de cultivos bacterianos.	80
3.5	Soluciones y tampones.	80
3.6	Métodos	81
3.6.1	Cultivos celulares	81
3.6.2	Extracción de las células de los diferentes compartimentos de ratones C57BL/6	82
3.6.2.1	Células de la médula ósea.	82
3.6.2.2	Células del bazo	83
3.6.2.3	Células del timo	83
3.6.2.4	Células de sangre periférica	83
3.6.2.5	Obtención de las células linaje negativas.	83
3.6.3	Citometría de flujo	83
3.6.3.1	Análisis de marcadores	83
3.6.3.1.1	Medida de los diferentes linajes sanguíneos en ratones	84
3.6.3.2	Análisis de ciclo celular	86
3.6.3.2.1	Análisis de la ploidía.	86
3.6.3.2.2	Tinción con 7AAD/Pironina Y	86
3.6.3.2.3	Tinción con Ki67	86
3.6.4	Ensayos de formación de colonias formadoras de megacariocitos.	87
3.6.5	Extractos celulares	87
3.6.6	Valoración de proteínas	87
3.6.7	Inmunoprecipitación	87
3.6.8	Medida de la actividad PTPásica	88
3.6.9	Medida de la oxidación de PTP.	88
3.6.10	Western blot	89



3.6.10.1	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.	89
3.6.10.2	Transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF.	89
3.6.10.3	Incubación de la membrana con los anticuerpos.	89
3.6.10.4	Detección.	90
3.6.10.5	Cuantificación.	90
3.6.11	Clonajes	90
3.6.11.1	Diseño de oligos	90
3.6.11.2	Preparación de los oligonucleótidos.	92
3.6.11.3	Preparación del plásmido.	92
3.6.11.3.1	Digestión del plásmido	93
3.6.11.3.2	Desfosforilación del plásmido.	94
3.6.11.3.3	Purificación del plásmido	94
3.6.11.4	Inserción del oligo en el plásmido	94
3.6.11.5	Transformación del plásmido en bacteria por choque térmico	94
3.6.11.6	Comprobación de las colonias que contenían el plásmido.	95
3.6.12	Producción vírica	96
3.6.12.1	Transfección en células HEK 293t.	96
3.6.12.2	Aumento de la concentración de partículas víricas por ultracentrifugación.	97
3.6.12.3	Titulación vírica.	97
3.6.13	Transducción de partículas víricas en los diferentes linajes de células estudiados.	98
3.6.14	Trasplante de células de la médula ósea en ratones.	98
3.6.15	Experimentos de adhesión en células HEL.	98
3.6.15.1	Ensayo del MTT.	98
3.6.16	PCR a tiempo real.	99
3.6.16.1	Extracción de ARN.	99
3.6.16.2	Síntesis de ADN copia (ADNc) ó retrotranscripción	100
3.6.16.3	PCR cuantitativa ó a tiempo real (RT-PCR))	100

3.6.16.3.1	Diseño de los oligos	101
3.6.16.3.2	Oligos real time	101
3.6.16.3.3	Validación de los oligos	102
3.6.17	Análisis estadístico.	103
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>107</b>
4.1	Estudio de SHP1 y SHP2 en la diferenciación megacariocítica	107
4.1.1	Niveles de fosforilación de SHP1 y SHP2 en la diferenciación megacariocítica.	107
4.1.2	Reducción de los niveles de SHP1 en células HEL y K562	109
4.1.2.1	Fenotipado de células HEL y K562 donde se ha reducido la expresión de SHP1	110
4.1.3	Reducción de los niveles de SHP2 en células HEL y K562	112
4.1.3.1	Fenotipado de células HEL y K562 donde se ha reducido la expresión de SHP2	113
4.1.4	La fosforilación de SHP2 se ve incrementada por la interferencia de SHP1	117
4.1.5	Medida de la actividad de SHP1 y SHP2	118
4.1.6	Medida del estado de oxidación de PTPs en la diferenciación megacariocítica.	121
4.2	PTPN13 y $\beta$ -Catenina en la megacariopoyesis	126
4.2.1	PTPN13 en la megacariopoyesis	126
4.2.2	Interacción de PTPN13 Y $\beta$ -Catenina	128
4.2.3	$\beta$ -Catenina en la megacariopoyesis	129
4.2.4	$\beta$ -Catenina y PTPN13 en la diferenciación megacariocítica ex vivo.	133
4.3	PTPN13 y $\beta$ -Catenina en la hematopoyesis in vivo	137
4.3.1	Estudio de PTPN13 y $\beta$ -Catenina en la megacariopoyesis in vivo.	139
4.3.2	Análisis de la reducción de los niveles de expresión de $\beta$ -CATENINA y PTPN13 <i>in vivo</i> en los diferentes linajes celulares sanguíneos.	143
4.3.3	Estudio del papel de PTPN13 y $\beta$ -Catenina en los progenitores hematopoyéticos inmaduros de la médula ósea.	145
4.3.3.1	Modulación del ciclo celular por parte de mPTPN13 y m $\beta$ -Catenina	150
4.3.4	Estudio de PTPN13 Y $\beta$ -Catenina en la adhesión celular	153
4.3.5	Modulación de los niveles de PTPN13 Y $\beta$ -Catenina por la TPO y Wnt3a.	155

4.3.5.1	TPO y Wnt3a modulan genes de de adhesión celular	157
4.3.6	Otras citoquinas del nicho hematopoyético también modulan los niveles de PTPN13 y $\beta$ -Catenina.	157
5.	<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>165</b>
6.	<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>169</b>



## Introducción

---



# 1. INTRODUCCIÓN

## **1.1 HEMATOPOYESIS: Una diferenciación que cambia de entorno durante el desarrollo embrionario**

La hematopoyesis es el proceso de formación de los componentes formes de la sangre: eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Este fenómeno constituye uno de los paradigmas de la biología porque a partir de un único tipo de células se originan hasta nueve linajes diferentes.

En el desarrollo embrionario las células sanguíneas proceden de un progenitor común, del que también se desarrollan las células endoteliales, llamado hemangioblasto (Tavian et al., 2010). Aparecen muy pronto en el desarrollo embrionario, sin embargo, la médula ósea y los órganos hematopoyéticos secundarios, bazo y timo, donde maduran linfocitos B y T respectivamente, se forman muy tarde al final de la embriogénesis (Fontaine-Perus et al., 1981). Por ello, a lo largo de este desarrollo los órganos donde se produce la hematopoyesis cambian. En las primeras etapas la diferenciación hematopoyética se produce en el saco vitelino y la región aorta-gonadal-mesonefro (AGM). Le siguen, en etapas embrionarias, la placenta, el hígado fetal, el bazo y la médula ósea. En el desarrollo posnatal el principal órgano hematopoyético humano es la médula ósea (Mikkola y Orkin, 2006).

Anterior a esta hematopoyesis que podríamos llamar definitiva, existe en las etapas iniciales del desarrollo embrionario una diferenciación hematopoyética primitiva, transitoria, que conduce a la formación del linaje eritroide. Se produce en unos islotes externos al saco vitelino embrionario y sus progenitores no tienen capacidad de repoblación. Parece que fundamentalmente se producen eritrocitos porque la función conocida de esta hematopoyesis es aportar oxigenación a los tejidos embrionarios que, en estas etapas, tienen una rápida expansión. (Orkin y Zon, 2008).

Las células sanguíneas maduras suelen tener una vida media bastante reducida, por lo que las encargadas de mantener la hematopoyesis son un grupo pequeño de células germinales (Orkin y Zon, 2008), las HSCs (de sus siglas en inglés, Hematopoeitic Stem Cells). Todos los tipos de células madre adultas deben de ser capaces de reaccionar rápida y ordenadamente a los cambios que se producen en el entorno. Pero al contrario que otros tipos de diferenciación celular de organismos pluricelulares, que están ligados al desarrollo o a procesos de regeneración, la hematopoyesis se produce durante toda la vida del individuo. Se calcula que las HSCs en el ratón representan aproximadamente el 0,01% del total de células de la médula ósea, y algunos autores proponen que estas células solo se dividen 5 veces durante la vida del ratón, aunque son las encargadas finales de producir los millones de células que cada día se renuevan en todos los linajes del sistema hematopoyético (Wilson et al., 2008) .

## **1.2 La jerarquía hematopoyética**

Si algo define a la hematopoyesis es lo jerarquizada que se encuentra, las células pasan por una serie de etapas y se van diferenciando por el camino. Dos metodologías han permitido los mayores avances en el estudio de la hematopoyesis. Por un lado, el trasplante de médula en ratones irradiados letalmente y sus variaciones y, por otro, la citometría de flujo. En el ratón, y también en humanos, la citometría de flujo y el uso de anticuerpos unidos a fluorocromos han posibilitado la descripción de diferentes subpoblaciones dentro de lo que hemos llamado HSCs. De hecho, la expresión de unos marcadores y no otros es lo que ha posibilitado el conocerlas y caracterizarlas. Se han descrito unos intermediarios de la diferenciación hematopoyética fundamentales para entender la hematopoyesis y sus alteraciones. Sin embargo, se ha comprobado que la expresión de marcadores en el ratón no se corresponde exactamente con los marcadores que expresan las células hematopoyéticas en humanos (Iwasaki y Akashi, 2007). Por ello, cuando hablemos de marcadores celulares en la diferenciación hematopoyética durante la presente memoria hablaremos siempre, salvo que se indique lo contrario, de marcadores de ratón, ya que ha sido el material biológico usado para estudiar esta diferenciación *in vivo*.

Las principales células que son capaces de repoblar la médula ósea a largo plazo son las conocidas como células LSK (Lin- Sca-1+ c-Kit+). Estas células no expresan ninguno de los marcadores que definen a los linajes maduros (Lin-) pero sí que expresan Sca-1 y c-Kit, además de Ly-6A/E (Ikuta y Weissman, 1992). Las células LSK expresan también otro tipo de marcadores, en concreto CD34 y Flt3. Los diferentes grupos que se pueden establecer por la presencia o ausencia de unos y otros marcadores reflejan la biología de estas células.

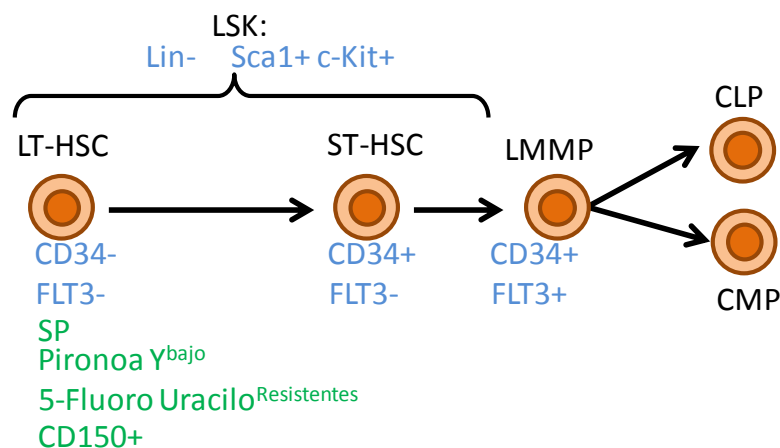
Las células que pueden llevar a cabo la repoblación a largo plazo y en varios receptores sucesivos, es decir, haciendo trasplantes sucesivos, donde el primer receptor se convierte en donante del segundo receptor, son las células LSK CD34- FLT3-. Estas células son conocidas como LT-HSC (de sus siglas en inglés, Long-Term HSC). Poseen, además, otras características importantes que han sido establecidas en diferentes estudios. bajos niveles de ARN, por lo que al teñirlas con pironina Y, un colorante que tiñe ARN, presentan bajos niveles del mismo. También se encuentran dentro de la población SP (del inglés, "side population") cuando las teñimos con Hoechst, este colorante de ADN es específicamente expulsado por células madre gracias a un sistema transportador activo dependiente de ATP. Por ello estas células se presentan con bajos niveles de Hoechst. Por último, presentan resistencia al tratamiento con 5-Fluoro uracilo, ya que, al ser tan baja la tasa de división de estas células no incorporan esta droga al ADN.

Un segundo grupo, que no es capaz de repoblar la médula a tan largo plazo, son las llamadas ST-HSC (reconstitución transitoria, de sus siglas en inglés, Short Term HSC). La



única diferencia con las LT-HSC, en cuanto a expresión de los marcadores utilizados en este trabajo para diferenciarlas, es que expresan CD34 (LSK CD34+ FLT3-), aunque la expresión de otros marcadores puede variar ligeramente también.

Por último, dentro de las células LSK, están las células que también expresan FLT3 conocidas como LMPP (LSK CD34+ FLT3+) (de sus siglas en inglés Lymphoid-Primed Multipotent Progenitor). Estas células son el paso previo a tomar un camino hacia el linaje linfóide o el mielóide. Son, por lo tanto totipotentes, en cuanto a la formación de células sanguíneas, pero no pueden repoblar la médula y mantener la hematopoyesis durante el resto del tiempo de vida del individuo (Thoren et al., 2008) (Figura I.1).



**Figura I.1: Esquema donde se muestran los marcadores que definen las HSC en ratón.** Se muestran los utilizados en este trabajo (en azul) y otros utilizados frecuentemente para las LT-HSC (verde).

En cualquier caso, no hay un consenso absoluto en lo referente a los marcadores a utilizar para definir las subpoblaciones de las HSCs, y otros autores utilizan marcadores diferentes a los aquí mencionados, por ejemplo sustituir FLT3 por CD150. En ese caso las LT-HSC se definirían como LSK CD34<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup> (Ikuta y Weissman, 1992)

### **1.3 El nicho hematopoyético: el lugar donde viven las HSCs**

Como los otros tipos de células madre adultas, las HSCs deben ser capaces de reaccionar rápida y ordenadamente a los cambios que se producen en su entorno. Este entorno es el nicho hematopoyético. Dependiendo de las señales que reciban del nicho, estas células pueden tomar tres caminos diferentes: se mantienen quiescentes, proliferan manteniéndose indiferenciadas o toman el camino de la diferenciación que, después de varias etapas, conduce a la formación de los diferentes linajes celulares maduros. Como el entorno es el que condiciona a la HSC, este entorno tiene que estar exquisitamente regulado para proporcionar las señales adecuadas.

En los últimos años se han aportado datos de cómo el entorno regula a las HSCs. En el nicho hematopoyético se han descrito diferentes tipos celulares y estructuras que, directa o indirectamente, controlan el destino de las HSCs. De hecho, alteraciones de este nicho

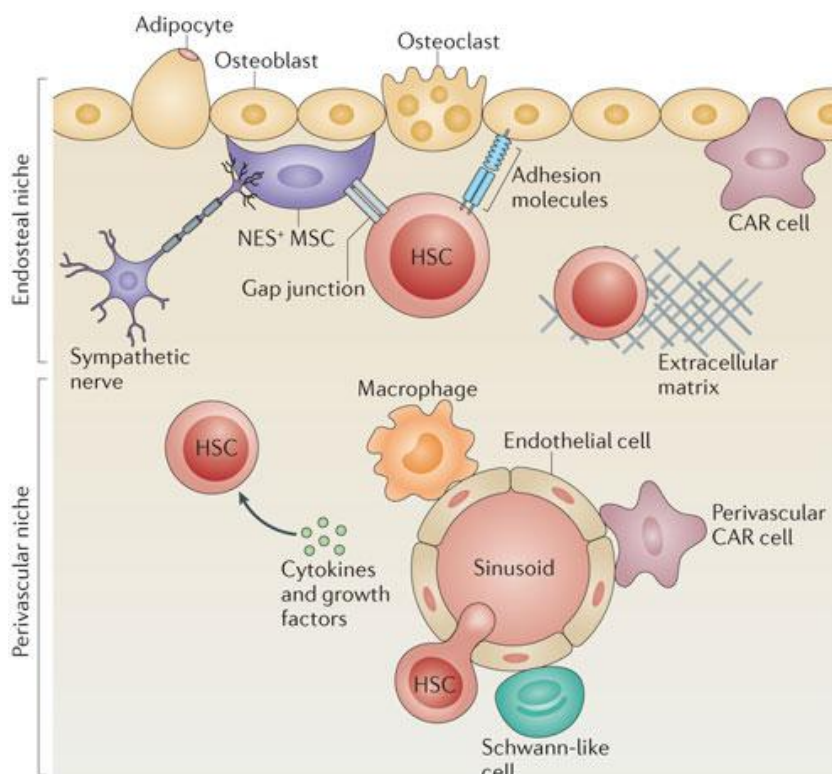
pueden llevar a una activación permanente de las HSCs que, en un primer momento, provoca una acumulación de mutaciones en las HSCs y que, posteriormente, originan el desarrollo de distintos tipos de leucemias. Estas alteraciones pueden ser cambios en el tipo celular o en las estructuras, o cambios en las señales que el nicho produce (Schreck et al., 2014).

Aunque se encuentra en permanente estudio y discusión, actualmente se diferencian dos espacios dentro del nicho que las HSC ocupan dentro de la médula ósea: el nicho osteoblástico y el nicho perivascular.

El primero se sitúa físicamente más próximo a los osteoblastos de las trabéculas del hueso. En este nicho se encontrarían fundamentalmente osteoblastos y también células CAR (células reticulares que expresan altas cantidades de CXCL12). Aquí las HSCs reciben estímulos por los que se autorrenuevan o permanecen quiescentes.

El segundo, el nicho vascular, se encuentra en los sinusoides del endotelio cercanos a los vasos sanguíneos (Arai et al., 2009). Las HSCs que están en él se encuentran adyacentes a los vasos sanguíneos y son las que habitualmente entran y salen de la circulación (Wright et al., 2001). Dentro del nicho perivascular se han descrito células CAR, células endoteliales, nervios del sistema simpático y macrófagos.

Aunque en general hay evidencias de que existen dos nichos, las diferencias fisiológicas de ello no son tan claras, ya que, células del nicho aisladas de ambos compartimentos son capaces de mantener la actividad de las LT-HSC. Por lo tanto, un estudio se requiere más profundo para aclarar las diferentes partes y funciones del nicho. Figura I.2.

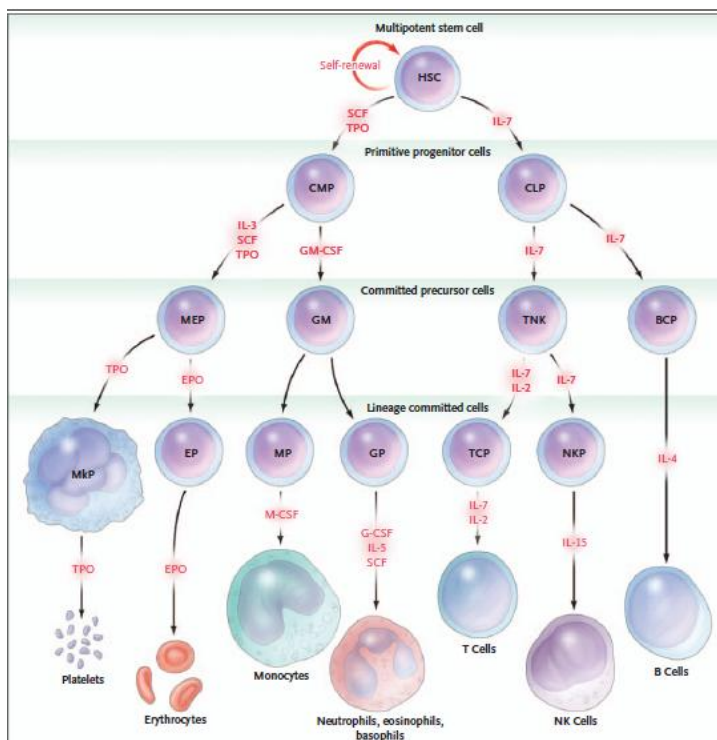


**Figura I.2:El nicho hematopoyético.** Esquema que muestra los dos nichos hematopoyéticos. Tomada de (Geiger et al., 2013)

## 1.4 La hematopoyesis se divide en el linaje linfoide y el linaje mieloide

Tradicionalmente se han diferenciado dos linajes diferentes en el proceso de hematopoyesis a partir de las HSCs. Estas son el tronco común del linaje linfoide, representado por el progenitor linfoide común (CLP, de sus siglas en inglés, common lymphoid progenitor) y del linaje mieloide representado por el progenitor mieloide común (CMP, de sus siglas en inglés, common myeloid progenitor). El CMP formará a su vez el progenitor eritro-megacariocito (MEP, de sus siglas en inglés, Megakaryocyte-erythroid Progenitor) y el progenitor granulo-monocítico (GMP, de sus siglas en inglés, Granulocyte-macrophage Progenitor).

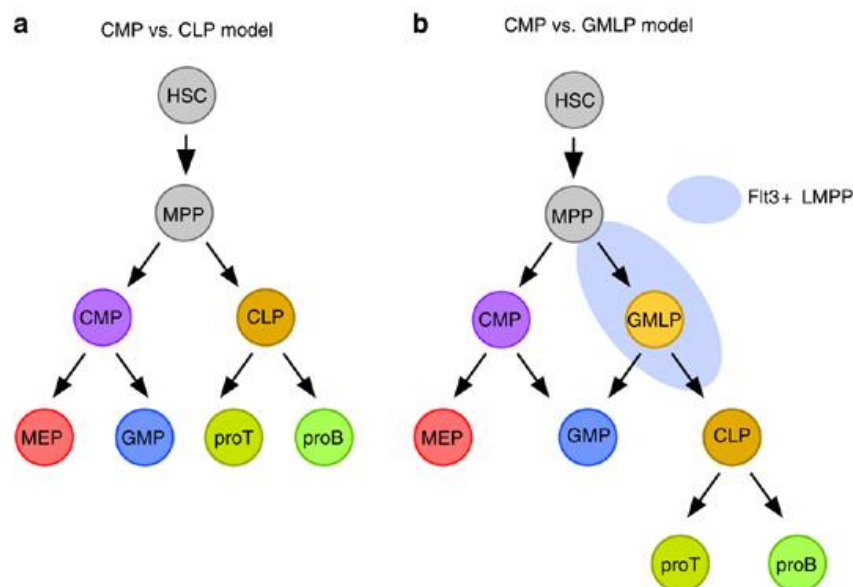
Así, cuando se aisló el CLP, éste fue capaz de generar todos los tipos celulares del linaje linfoide, pero ninguno de los mieloides. Lo mismo ocurrió en experimentos en los que aislaron el CMP donde solo se producían los componentes del linaje mieloide (Kondo et al., 1997; Akashi et al., 2000). El linaje linfoide da lugar a los linfocitos T y B y a las células NK (del inglés "Natural Killer"), mientras que el mieloide originará, al final del proceso de maduración, los diferentes granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), los macrófagos, los mastocitos, los eritrocitos y los megacariocitos. Posteriormente, éstos últimos originarán las plaquetas circulantes (Figura I.3)



**Figura I.3: Modelo general del proceso de hematopoyesis y las principales citoquinas que estimulan la formación de los diferentes linajes.** Tomado de Kaushansky, 2006.

Sin embargo, datos conocidos desde hace ya algunos años indican que la ruta que siguen las HSCs no está tan definida, ya que se han descrito nuevas vías intermedias que enlazan los linajes tradicionales (Iwasaki y Akashi, 2007) (figura I.4). Así, el CLP quedaría

relegado a un nivel inferior, y una nueva especie, el progenitor granulocítico-monocítico-linfoide (GMLP, de sus siglas en inglés, granulocyte–monocyte–lymphoid progenitor), se situaría a nivel del CMP. Además, el GMP, que tradicionalmente se colocaba en el linaje mieloide diferenciado a partir del CMP, podría originarse también a partir del GMLP. Estas discrepancias podrían venir relacionadas por el uso de marcadores de diferenciación en el establecimiento de estos linajes, ya que la expresión de unos, y no de otros, se produce después de que la célula ya “haya tomado” la decisión de diferenciarse hacia uno u otro linaje. Sería dentro de las células LMPPs donde se presentan las células que expresan marcadores de un linaje cuando contienen en su interior factores de transcripción del contrario. Por ello algunos autores proponen el uso de factores de transcripción para diferenciar las poblaciones de la diferenciación hematopoyética como una herramienta que define mejor la biología de estas células.



**Figura I.4: Comparación del “modelo tradicional” de hematopoyesis con uno alternativo.** Obsérvese la aparición del GMLP y el desplazamiento del CMP a un lugar inferior dentro del esquema (Modificado de Iwasaki y Akashi, 2007).

A partir de este punto, la diferenciación hematopoyética continúa para formar los diferentes elementos de la sangre. Cada linaje celular maduro ejerce diferentes funciones: los eritrocitos se encargan del transporte de oxígeno; las plaquetas de la formación de trombos en procesos hemorrágicos; los mastocitos, neutrófilos y basófilos intervienen en procesos inflamatorios; los eosinófilos reconocen el complejo antígeno-anticuerpo y lo fagocitan; los monocitos (que se diferencian a macrófagos en los tejidos periféricos) fagocitan patógenos; y los linfocitos T y B y las células NK se relacionan con la inmunidad específica.

### **1.5 La hematopoyesis está regulada por numerosas citoquinas.**

El proceso de diferenciación hematopoyético está controlado por numerosas **citoquinas** que afectan a la multipotencialidad de las HSCs y al camino que éstas deben tomar. Estos factores son secretados por el nicho y regulan tanto la biología de las HSCs como la

maduración de los diferentes linajes hematopoyéticos. El factor de células madre SCF (del inglés “stem cell factor”), FLT3 (del inglés “FMS-like tyrosine kinase 3”), GM-CSF (del inglés “granulocyte colony-stimulating factor”), la interleuquina-2, la interleuquina-3 y la interleuquina-7 y algunos más dirigen la diferenciación hacia los diferentes tipos de células maduras. La eliminación de uno de ellos, a excepción de la interleuquina 7 (IL7), solo provoca pequeñas alteraciones en la hematopoyesis, ya que, sus funciones son redundantes (Kaushansky, 2006). Por ejemplo, la IL7 es el principal factor que controla los progenitores linfoides, está presente desde la diferenciación del progenitor linfóide común y después es necesaria, junto con la interleuquina-2, para la formación de los linfocitos T maduros. Aunque se han comprobado diferencias en la implicación de la IL7 en ratones y humanos, la delección del gen de la IL7 o de su receptor provoca que el ratón presente un número extremadamente bajo de linfocitos T y B (Peschon et al., 1994; Freedman-Jeffrey et al., 1995). La interleuquina 4 está implicada en la maduración de los linfocitos B, y la interleuquina 15 en la de las células NK. Algo similar a lo que ocurre con la interleuquina-7 en la línea linfóide sucede en la mieloide con la trombopoyetina (TPO), que es necesaria, junto con el SCF, para la formación del progenitor mieloide común, y posteriormente es necesaria para la maduración de los megacariocitos. La eritropoyetina (EPO) es necesaria para la formación de los eritrocitos. M-CSF (de sus siglas en inglés “Macrophage colony-stimulating factor”) es necesario para la diferenciación de los mastocitos. Los eosinófilos requieren la interleuquina-5, los basófilos SCF, y los granulocitos GM-CSF (Figura 1.3). Veamos algunas de ellas con un más de amplitud.

### **1.5.1 La trombopoyetina**

En 1960 se purificó por primera vez la trombopoyetina de animales con trombocitopenias, y en los años 80 del pasado siglo se pusieron a punto los ensayos de diferenciación megacariocítica *in vitro*. Ya en 1990 se clonó el gen responsable de la TPO y su receptor (c-MPL) (Hitchcock y Kaushansky, 2014).

La TPO es la citoquina fundamental que regula la megacariopoyesis y la trombopoyesis (Kaushansky, 1995). La interrupción del gen de la TPO o de su receptor provoca dificultad para producir la megacariopoyesis, pero estos ratones también presentan reducción de HSC en su médula ósea (Carver-Moore et al., 1996; Kimura et al., 1998). Estudios *in vitro*, demostraron que la combinación de la TPO con interleuquina 3 (IL3) y SCF incrementa la viabilidad de células CD34+ de ratón (Ku et al., 1996). Cabe destacar que el receptor de la TPO no se expresa en las mismas cantidades durante las diferentes etapas de maduración de células hematopoyéticas. Así, se expresa en cantidades mayores en células LT-HSC que en otras HSC menos inmaduras, como son las ST-HSC o LMMP (Buza-Vidas et al., 2006). Añadido a esto, este receptor presenta una preferencia por células LT-HSC que se

encuentran en estado de quiescencia frente a las que se encuentran en ciclo para mantener una población constante de LT-HSC (Yoshihara et al., 2007) (Figura 1.5).

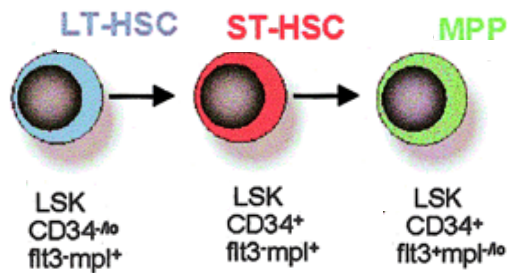


Figura 1.5: Esquema del la desaparición del receptor de TPO (mpl) durante las diferentes etapas de HSC en ratón. Modificado de (Yang et al., 2005)

Después del nacimiento, los principales órganos de producción de TPO son el hígado y los riñones. No obstante, parece difícil que esta TPO llegue a la médula ósea donde se encuentran las HSCs, entre otras cosas, por el elevado número de plaquetas circulantes que poseen el receptor de la TPO. Como este receptor no produce ninguna respuesta cuando la TPO se une a él, las plaquetas actúan como atrapadores de TPO, modulando los niveles de TPO circulantes en el organismo. Por ello, se ha propuesto que es la TPO secretada por los osteoblastos, a los que las HSCs están unidas íntimamente en el nicho osteoblástico, la responsable de los efectos que la TPO tiene sobre las HSCs. Otro dato que apunta a la importancia de la TPO en la supervivencia de las HSC es que los ratones xenotrasplantados con células CD34+ humanas sobreviven durante más tiempo cuando se sustituye el gen de la TPO de ratón por el gen humano (Rongvaux et al., 2011). Sin embargo, no existen muchas evidencias de cuál es el mecanismo específico por el que la TPO ejerce los efectos mencionados en las HSCs.

Parece que la TPO juega este papel en la regulación de las HSCs solo en individuos adultos. Durante las etapas prenatales, cuando la médula ósea no es el principal órgano hematopoyético, la TPO no parece influir en las HSC (Qian et al., 2007). Así, la expansión de HSCs que se produce en el hígado fetal (Pawliuk et al., 1996) es independiente de la TPO, ya que ratones sin el gen la TPO ( $Tpo^{-/-}$ ) o su receptor ( $c-Mpl^{-/-}$ ) presentan un mayor número de células progenitoras que el fenotipo silvestre. Además, los distintos estadios de maduración de las HSC no se encuentran alterados o, si lo hacen, presentan una mayor proporción de HSC que en el fenotipo silvestre (Qian et al., 2007). Este resultado contrasta con el menor número de HSCs encontrado en estos mismos ratones adultos en la médula ósea (Carver-Moore et al., 1996; Kimura et al., 1998).

### 1.5.2 CXCL12

Mediante análisis de la médula ósea de ratón por medio de microscopía tridimensional de alta resolución se han detectado microdominios de la médula ósea donde la citoquina CXCL12 (ligando de la citoquina CXC), también conocida como SDF-1 (de sus siglas en

inglés, Stromal Cell-Derived factor 1)) y la selectina E están presentes en cantidades muy abundantes (Sipkins et al., 2005). Estos dominios corresponden a las células CAR. CXCL12 se encuentra también expresado en médula ósea de individuos adultos humanos en las células endoteliales (Peled et al., 2000).

La importancia de CXCL12 en la biología de las HSCs fue descrita por el grupo de Nawasawa en 2006 (Sugiyama et al., 2006). En este trabajo los autores describen que el knock out condicional del receptor de CXCL12, CXCL4R, tiene un número significativamente menor de células HSC. Además, estos ratones presentan un menor porcentaje de células en quiescencia comparados con el fenotipo silvestre. Estos datos, junto a otros posteriores presentan a CXCL12 como una molécula central en el mecanismo de atracción de las HSCs a su nicho. Por ejemplo, CXCL12, y no otras citoquinas con motivos CXC, es capaz por sí sola de producir migración de progenitores hematopoyéticos tanto en ratones como en humanos (Wright et al., 2002).

También hay numerosos estudios de las células mesenquimales como moduladoras del nicho perivascular entre otras cosas, porque son capaces de secretar SCF (de sus siglas en inglés, Stem cell factor) y CXCL12 (Sacchetti et al., 2007). Además, se ha sugerido que la movilización provocada por el factor de crecimiento G-CSF, es debida, al menos en parte, a que exoproteasas como las catepsina K y la X degradan a CXCL12 (Staudt et al., 2010; Kollet et al., 2006; Morrison y Scadden, 2014).

### **1.5.3 SCF**

El SCF fue uno de los primeros factores descubiertos que influyen sobre la función de las HSC, también conocido como SF (del inglés, steel factor). Es un factor de crecimiento que se une y activa al receptor transmembrana tirosina quinasa tipo III, llamado KIT (comúnmente conocido como CD117 o c-Kit). Al contrario de lo que sucede con otros receptores, todos los tipos de HSC de ratón, LT-HSC y ST-HSC, expresan las mismas cantidades de c-Kit independientemente, además, de la etapa del ciclo celular en el que se encuentren (Ashman, 1999). SCF puede ser secretado al medio o mantenerse unido a la membrana de la célula productora. Ratones que solo expresan la forma soluble de SCF muestran un deficiente mantenimiento de las HSC por parte del nicho (Barker, 1997). Por otra parte, diferentes concentraciones de SCF son capaces de regular la autorrenovación de las HSC *in vitro*, mejorando esto el trasplante de estas células en los receptores (Uchida et al., 2003). También se han descrito implicaciones de SCF en relación con los reguladores del ciclo celular tanto de algunas ciclinas como de ciclinas dependientes de quinasas (Kent et al., 2008).

La unión de SCF a su receptor provoca la activación por homodimerización del mismo, lo que conlleva una autofosforilación cruzada de estos homodímeros. Posteriormente activa a otras quinasas adyacentes como JAK2, después a los factores STAT (1, 3 y 5) y a otras

tirosina fosfatasas como SHP1 y SHP2 (Linnekin, 1999; Weiler et al., 1996; Kozlowski et al., 1998). En el proceso también participa la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K), que finalmente activa a PKB (AKT) (Engstrom et al., 2003).

Los factores STAT, en especial el 3 y el 5a, están muy relacionados con la expansión de las HSC *in vivo*. Los niveles de estos factores están muy finamente regulados, y una desregulación provoca síndromes mieloproliferativos, un ejemplo muy conocido es el caso de STAT5. Variaciones de los niveles de los mismos se producen durante los estadios de maduración de las HSC. También cambian los niveles de ARN mensajero de estas proteínas entre las HSC fetales y adultas (Kato et al., 2005; Chung et al., 2006).

#### **1.5.4 Factores de la familia Wnt.**

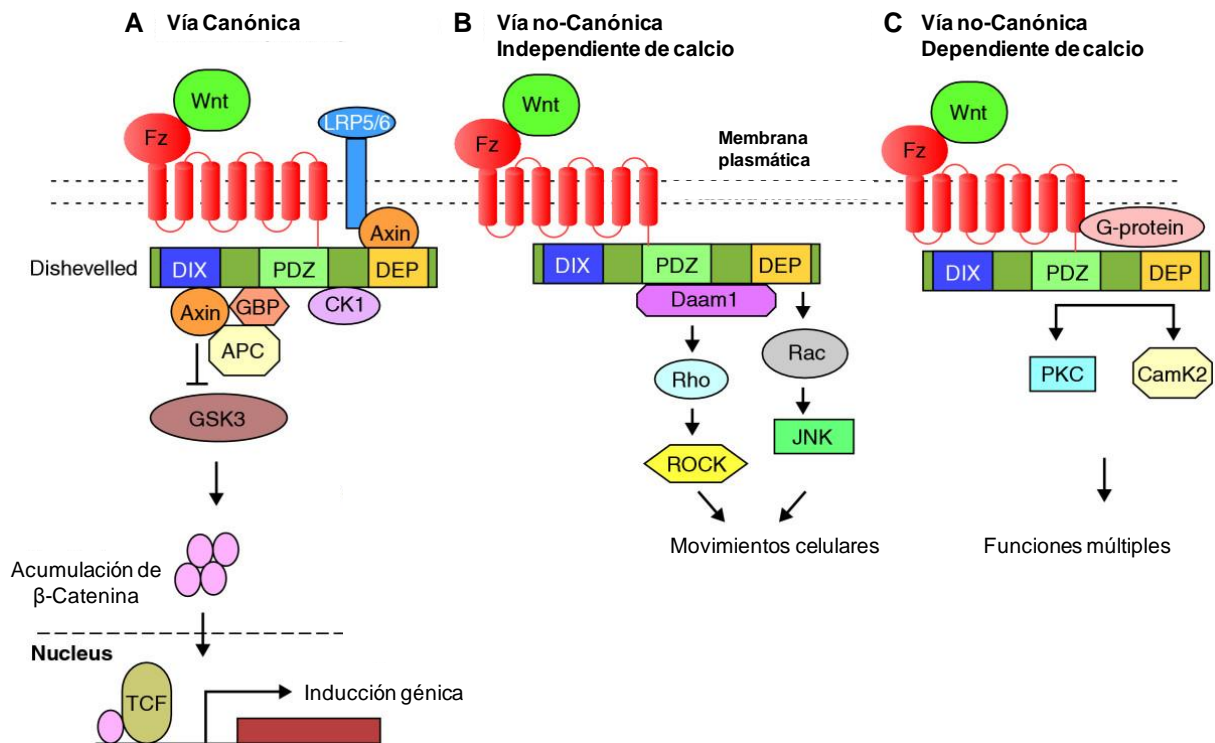
La familia de factores Wnt son una amplia serie de proteínas secretadas. Se conocen al menos 19 proteínas Wnt, 10 receptores y dos co-receptores, además de 10 moléculas de señalización intracelular. Se descubrieron relacionados con el desarrollo embrionario pero también tienen importancia en la hematopoyesis. Lo conservados que se encuentran algunos genes que codifican proteínas de estas rutas, y la complejidad de los factores Wnt y sus ligandos, sugiere que esta ruta apareció muy pronto en la evolución de los metazoos. (Seke Etet et al., 2013; Wodarz y Nusse, 1998; Valenta et al., 2012).

En el contexto de la hematopoyesis, está descrito que los osteoblastos de la médula ósea son los encargados de liberar los ligandos de Wnt. Estos se unirían a sus receptores en la membrana de las HSCs, los receptores fundamentales de estas células son Fzd4 y Fzd6. Por ejemplo, Wnt5a, que es secretado por células estromáticas del nicho hematopoyético, ha sido descrito como un regulador negativo de la proliferación de linfocitos B (Liang et al., 2003). Algunos factores Wnt son capaces de desencadenar la activación del factor activador de las células T (NFAT) y, con ello, modulan la diferenciación de osteoblastos, linfocitos B y la formación del hueso. (Sesler y Zayzafoon, 2013; Seke Etet et al., 2013).

Tradicionalmente, la señalización por Wnt se ha dividido en dos rutas dependiendo de si se estabiliza o no la proteína  $\beta$ -Catenina (Figura 1.6). La ruta no canónica no conlleva la estabilización de  $\beta$ -Catenina, y sus ligandos más conocidos son Wnt5a, Wnt5b, Wnt11 y Wnt16. Esta ruta es más compleja en cuanto a mecanismos de activación intermedia y se subdivide en dos en función si la activación es dependiente de calcio o no. Entre los mediadores de la activación de la ruta no canónica se encuentran las GTPasas tipo Rho o las MAP quininas. La ruta no canónica está relacionada con diferentes procesos como embriogénesis, movimiento celular o división celular asimétrica; de hecho se ha implicado en las divisiones asimétricas que se dan en las células hematopoyéticas (Veeman et al., 2003).



Esta ruta no canónica también ha sido relacionada con la diferenciación mesenquimal (Baksh y Tuan, 2007).



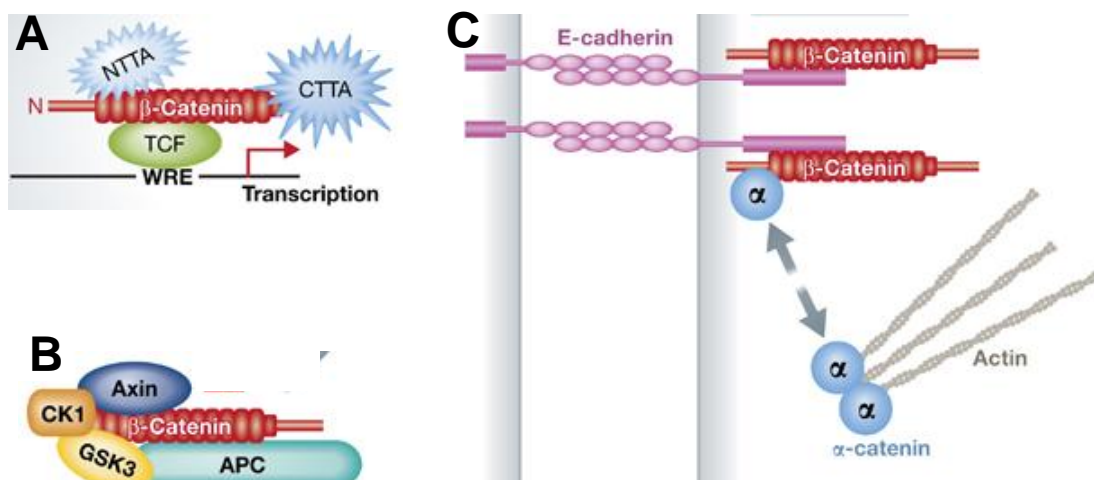
**Figura I.6: Esquema de la ruta de Wnt.** Se puede observar la separación entre ruta canónica (A) y ruta no canónica (B y C). A su vez esta ruta no canónica puede ser independiente de calcio (B) o dependiente de calcio (C). Modificado de (Habas y Dawid, 2005)

La ruta canónica conlleva la estabilización de β-Catenina y los ligandos que la activan son Wnt1, Wnt3a, Wnt8a, Wnt8b y Wnt10b (Seke Etet et al., 2013). A finales de los años 80 del siglo pasado fue descrita por primera vez la β-Catenina. De manera independiente y coetánea en el tiempo, diversos grupos encontraron el papel dual que la β-Catenina juega en la célula. En primer lugar, junto a α-Catenina y γ-Catenina, β-Catenina tiene un papel estructural donde media la adhesión celular asociada a las E-cadherinas, que a su vez están reguladas por  $Ca^{2+}$  (Ozawa et al., 1989). Por otro lado, tiene un papel fundamental como efector de la ruta de señalización de Wnt. Gracias a trabajos en *Drosophila* con Wingless/Armadillo, que son los ortólogos de Wnt/β-Catenina respectivamente, se describió a esta ruta de señalización como crucial en el desarrollo embrionario (Wieschaus y Riggelman, 1987). Más recientemente, a mediados de los 90, se encontró que en el núcleo la acción de la β-Catenina está mediada a través del factor de células T (TCF, de sus siglas en inglés, T Cell Factor) unido al factor de transcripción Lef (Behrens et al., 1996; van de et al., 1997).

#### 1.5.4.1 β-Catenina

En humanos β-Catenina tiene 781 residuos donde se pueden diferenciar tres partes. Un dominio N terminal, una región central que consta de 12 repeticiones armadillo (ARM, de las

que toma el nombre la proteína en *Drosophila*) y una región C terminal. La región central forma un armazón rígido, todas las repeticiones forman en su conjunto una superhélice cargada eléctricamente, que es la encargada de la unión a los diferentes “socios” de  $\beta$ -Catenina tanto en la membrana como en el citosol o en el núcleo. Los extremos C y N terminal son bastante flexibles (Huber et al., 1997). La parte central es por la cual  $\beta$ -Catenina establece la mayoría de las interacciones, por lo tanto, la unión con unas moléculas impide la unión de otras por impedimentos estéricos y estas uniones condicionan la función de  $\beta$ -Catenina. Un buen ejemplo de moléculas que interaccionan en el mismo lugar son la interacción con E-cadherina, importante en las uniones entre células, APC (de sus siglas en inglés, Axin and Adenoma Polyposis Coli), que regula la destrucción de  $\beta$ -Catenina, y TCF/LEF, que regula la activación canónica de Wnt. Como se puede intuir, las acciones que provocan estas tres uniones son completamente diferentes para la célula. (Huber y Weis, 2001; Graham et al., 2002; Eklof et al., 2001; Poy et al., 2001). La regulación de estas interacciones se produce porque los ligandos se encuentran en lugares diferentes, y por cambios conformacionales de los extremos N-terminal, y en especial, el C-terminal de  $\beta$ -Catenina (Castano et al., 2002; Solanas et al., 2004) (Figura I.7).



**Figura I.7: Esquema de algunas las diferentes interacciones que se producen entre  $\beta$ -Catenina y otras moléculas.**  $\beta$ -Catenina esta representada como un núcleo central que corresponde a las 12 repeticiones ARM y los extremos N y C terminal. A la región central se unen los factores de transcripción TCF (A), APC (B) y la E-Cadherina (C) entre otros. Modificada de Valenta et al., 2012.

$\beta$ -Catenina se encuentra en numerosos emplazamientos en la célula, sin embargo, en ausencia del estímulo por parte de Wnt, los niveles citoplasmáticos de  $\beta$ -Catenina deben mantenerse bajos. En esta situación la mayoría de las moléculas de  $\beta$ -Catenina se encuentra cerca de membrana disponible para la unión con las cadherinas; la más estudiada es la unión a la E-Cadherina. La  $\beta$ -Catenina que no se encuentra unida a la E-cadherina es fosforilada por el complejo de destrucción de  $\beta$ -Catenina que es agrupado por APC. Esta fosforilación la marca para su degradación en el proteosoma. Este complejo está, además, compuesto por

GSK3 $\beta$  (glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$ ), que es la encargada de fosforilar a  $\beta$ -Catenina, la CK1 (caseína quinasa 1), y la PP2A, (proteína fosfatasa 2A)(Kimelman y Xu, 2006). Sin embargo, también se ha descrito que la estabilidad de  $\beta$ -Catenina puede regularse de forma independiente a la señal de Wnt y de la fosforilación de GSK3- $\beta$ , pero para ello también es necesaria la intervención de APC (Dimitrova et al., 2010).

GSK3 $\beta$  regula la estabilidad de  $\beta$ -Catenina porque la fosforila en numerosos residuos de serina. Estas fosforilaciones tienen diferentes funciones como son inducir la degradación (Ser 33) o entorpecer la unión de APC (Ser 246), por poner dos ejemplos. También puede ser fosforilada en diferentes tirosinas, la función de las mismas es más controvertida y debe ser investigada en más profundidad, pero parecen regular la unión de la  $\beta$ -Catenina y las Cadherinas o la actividad transcripcional (Piedra et al., 2001; Valenta et al., 2012). En este sentido, nuestro grupo de investigación ha descrito recientemente, en el contexto de la megacariopoyesis, que la proteína tirosina fosfatasa PTPN13, de la que hablaremos más adelante, regula indirectamente la fosforilación de  $\beta$ -Catenina en la Ser 33 y, directa o indirectamente, las fosforilaciones en las tirosinas 86 y 654 (Sardina et al., 2014).

En relación con su unión a E-Cadherina, la  $\beta$ -Catenina regula la actividad de la  $\alpha$ -Catenina. Cuando la  $\beta$ -Catenina, unida a la E-cadherina, se une a la  $\alpha$ -Catenina, ésta última no puede unirse entre sí, lo que impide que regule la formación de los filamentos de actina.  $\alpha$ -Catenina necesita estar en forma de homodímero para poder llevar a cabo la regulación de la polimerización de los filamentos de actina (Yamada et al., 2005). La liberación de la  $\beta$ -Catenina de su unión con las cadherinas puede activar a dos importantes reguladores del ciclo celular C-myc y la Ciclina D1 dianas descritas también de la ruta Wnt. (Maretzky et al., 2005; Reiss et al., 2005). Esta faceta es la que contribuye al efecto de polarización de los epitelios en metazoos (Meng y Takeichi, 2009). Recíprocamente, la unión de  $\beta$ -Catenina con las cadherinas protege a estas últimas de la degradación, ya que, cuando esta unión no existe las cadherinas exhiben un dominio PEST que es reconocido por las ubiquitina ligasas y que las marca para degradación vía proteosoma (Hinck et al., 1994).

Uno de los principales ligandos que activa la ruta canónica es Wnt3a (Malhotra y Kincade, 2009). Los embriones de ratones deficientes en Wnt3a mueren en la etapa E12.5. Además, las HSC de estos embriones trasplantadas en un ratón silvestre no consiguen repoblar la hematopoyesis, lo que sugiere que el control de este ligando que debería ser extrínseco, también condiciona a la célula intrínsecamente (Luis et al., 2009). Este es uno de los datos que sugiere que la función de  $\beta$ -Catenina debe ser importante en la hematopoyesis, ya que Wnt3a estabiliza los niveles de  $\beta$ -Catenina. Sin embargo, los efectos de la alteración de los niveles de esta proteína tienen consecuencias controvertidas para la hematopoyesis en

general y para las células madre hematopoyéticas en particular. Hay trabajos que afirman que la estabilización por sobreexpresión de una forma estable de  $\beta$ -Catenina provoca una alteración del sistema hematopoyético. Esto provoca que las HSCs pierdan su capacidad de quiescencia y de repoblar la médula ósea. Además, se producen bloqueos dentro de la formación de eritrocitos y una alteración del desarrollo de los linfocitos (Kirstetter et al., 2006). Esta evidencia se puede argumentar también en el hecho de que defectos de GSK3 causan similares efectos a los provocados por la sobreexpresión de una forma no degradable de  $\beta$ -Catenina (Huang et al., 2009). Apoyándose en estos datos, algunos autores sugieren que para que la biología (quiescencia y autorrenovación) de las HSC sea la correcta, los niveles de  $\beta$ -Catenina deben ser bajos (Lento et al., 2013). Sin embargo, otros autores afirman que la supresión de  $\gamma$ - y  $\beta$ -Catenina no muestra ninguna alteración en el comportamiento de las HSC (Jeannet et al., 2008). Por lo tanto, un estudio más profundo debe producirse para dar explicación a las controversias aquí expuestas.

Además, la alteración de  $\beta$ -Catenina en el nicho también condiciona la hematopoyesis. Así, la expresión de una forma aberrante de  $\beta$ -Catenina en las células del nicho hematopoyético, provoca que el nicho no sea capaz de mantener a las HSC más primitivas. Esto puede deberse a una reducción del número de osteoblastos y de los factores de crecimiento. Por otro lado la sobreexpresión de  $\beta$ -Catenina en células estromáticas otorga a éstas una mayor habilidad para mantener las HSC en cultivo (Nemeth et al., 2009; Kim et al., 2009).

## **1.6 La megacariopoyesis**

Una de las diferenciaciones que más interés ha suscitado dentro de mi grupo de investigación en los últimos años ha sido la diferenciación megacariocítica (Sardina et al., 2010; Sardina et al., 2014). La formación de megacariocitos tiene lugar en la médula ósea en individuos adultos, donde los megacariocitos son una de las poblaciones celulares más escasas (Kaushansky, 2008). El proceso se desencadena a partir de las HSCs que, según los esquemas tradicionales de linajes hematopoyéticos, originan el progenitor mieloide común (CMP), el cual se diferencia posteriormente para originar los precursores progenitor granulomonocítico (GMP) y eritro-megacariocítico (MEP). Sea cual sea la ruta hasta el MEP éste se diferencia para dar lugar a dos linajes diferentes: las colonias formadoras de eritrocitos (BFU-E) y las colonias formadoras de megacariocitos (**HPP-CFU-MK**). Estas últimas, después de pasar por una serie de estadios intermedios, formarán los **megacariocitos maduros** que liberarán, posteriormente, las **plaquetas** circulantes.

Algunas de las características principales del megacariocito son su gran diámetro celular (50-100  $\mu\text{m}$ ) y la posesión de un único núcleo poliploide y multilobulado (Kanz et al.,

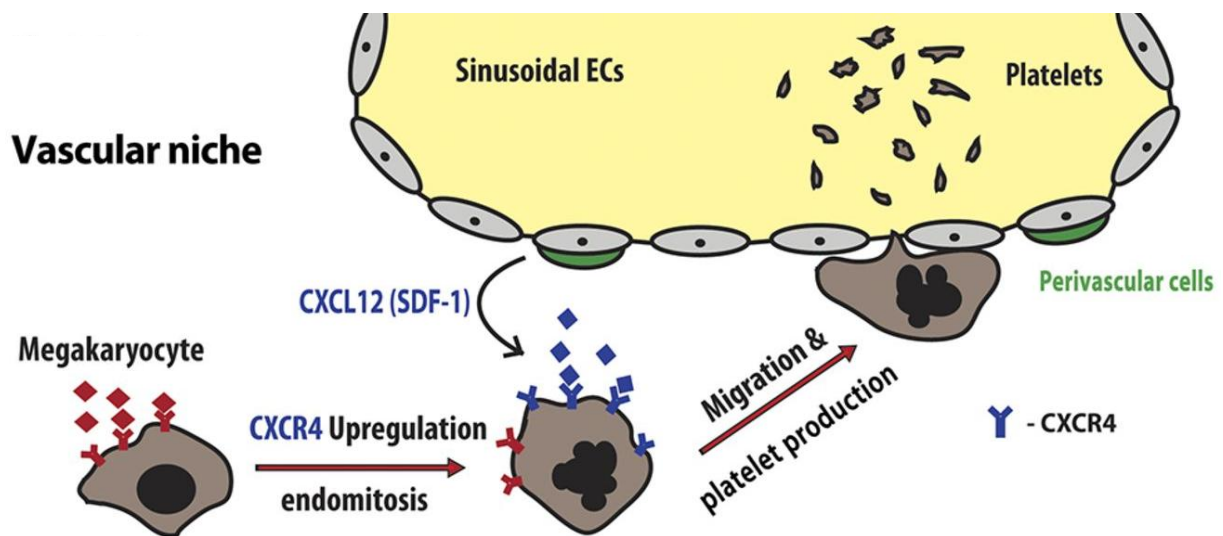
1982). Por lo tanto, a nivel citológico, la diferenciación megacariopoyética afecta a dos compartimentos celulares: el **núcleo**, en el que se produce la endorreproducción del ADN para formarse finalmente una célula poliploide de hasta 128 N (Tomer et al., 1989), y el **citoplasma**, que madura formando un gran número de invaginaciones en el sistema de membranas y se expande. Estos procesos son necesarios para que, posteriormente, desde el citoplasma del megacariocito maduro puedan liberarse las plaquetas circulantes (Deutsch y Tomer, 2006). Lo ocurrido con el citoplasma tiene una explicación evidente. Debe expandirse para formar las proplaquetas y posteriormente la plaquetas. Sin embargo, la función de la endorreproducción del núcleo es menos evidente. En este sentido, se ha sugerido que este proceso es necesario para producir las grandes cantidades de ARN mensajero que se deben empaquetar en las plaquetas para que luego estas lleven a cabo sus funciones, ya que son elementos sin núcleo (Zimmet y Ravid, 2000). A pesar de ello, la relación entre estos dos procesos de la maduración del megacariocito continúa aún desconocida.

Numerosos factores de crecimiento hematopoyético regulan diferentes aspectos de la maduración de los megacariocitos. Algunas citoquinas, entre las que se incluyen GM-CSF, las interleuquinas 3, 6, 11 y 12 y la EPO, estimulan la proliferación de los progenitores megacariocíticos. Otras citoquinas, como la interleuquina 1 $\alpha$  y el factor inhibidor de la leucemia, modulan la maduración del megacariocito y la liberación de las plaquetas (Gordon y Hoffman, 1992; Vainchenker et al., 1995).

Sin embargo, como ya hemos dicho, la principal citoquina implicada en la megacariopoyesis es la trombopoyetina. La TPO es necesaria desde las primeras etapas de la hematopoyesis hasta la maduración del megacariocito y posterior liberación de las plaquetas. Se necesitan, por lo tanto, unos niveles constitutivos de TPO circulante, los cuales son secretados, en adultos, principalmente por el hígado (Jelkmann, 2001), aunque los osteoblastos también pueden secretarla (Guerriero et al., 1997) y parecen los encargados de regular el proceso en la médula. La TPO aumenta la poliploidía del precursor megacariocítico que afecta a la maduración de las plaquetas al reducir el nivel del ADP, del colágeno o de la trombina necesarios para inducir la agregación, y que aumenta la adhesión plaquetaria (Kaushansky et al., 1995; Chen et al., 1995; Oda et al., 1996; Van Os et al., 2003).

Los megacariocitos en cultivo *in vitro* pueden formar proplaquetas en suspensión, por lo tanto, el ambiente que proporciona la médula ósea no parece necesario para la formación de plaquetas. Sin embargo, la eficiencia de esta producción es menor a la observada *in vivo*. Es decir, el entorno sí estimularía y mantendría activa la formación de proplaquetas y la liberación de las plaquetas maduras. Al parecer existe una interacción dinámica entre el megacariocito y las proteínas extracelulares de la médula ósea, jugando estas un papel en la

compartimentación del proceso de maduración del megacariocito dentro de la médula ósea. Este proceso se produciría en el nicho osteoblástico y migraría al vascular para iniciar el proceso de formación de plaquetas. (Arai y Suda, 2007; Pallotta et al., 2009). Para poder liberar las plaquetas el megacariocito debe migrar del nicho osteoblástico al nicho vascular de la médula y, según algunos estudios recientes, para ello sería necesaria la interacción de CXCL12 y su receptor CXCL4 (Pitchford et al., 2012) (Figura I.8). También se ha sugerido que CXCL12 podría estimular la formación de megacariocitos por una vía independiente de TPO (Avecilla et al., 2004)



**Figura I.8:** Esquema representativo de la migración del megacariocito durante su maduración para formar plaquetas. modificado de (Gars y Rafii, 2012).

El cambio de nicho fisiológico dentro de la médula ósea no es algo exclusivo de la diferenciación megacariocítica, en el caso de la diferenciación de linfocitos B también parece producirse. Así, los diferentes estadios de diferenciación: células proB, células preB y células B inmaduras se mueven durante este proceso dentro de la médula ósea. Y esto está regulado por el gradiente de citoquinas que se expresan en los diferentes nichos, principalmente IL-7 y también CXCL12. (Peschon et al., 1994).

GATA-1 también destaca como principal factor en la regulación de la megacariopoyesis. Así, GATA-1 fue el primer factor de transcripción que se descubrió de la familia GATA (Zon et al., 1993; Lemarchandel et al., 1993) y juega un papel fundamental en el proceso de desarrollo. Por ejemplo, los embriones “knock-out” para el gen de GATA-1 generan anemias letales (Pevny et al., 1991) y, además, tienen afectada la expresión de diversas glicoproteínas y del receptor de TPO (c-Mpl). Otros factores de transcripción implicados en megacariopoyesis son Fli-1 y TEL, NF-E2, SCL y RUNX1. Todos estos factores de transcripción trabajan en conjunto con los factores de crecimiento ya descritos para regular la

organización de la cromatina del megacariocito y la liberación de las plaquetas (Pang et al., 2005).

Tomando como ejemplo la megacariopoyesis, el desarrollo de las células hematopoyéticas se produce en un ambiente fuertemente influenciado por factores de crecimiento y contactos celulares. En este contexto, las células hematopoyéticas tienen que integrar estas complejas señales y responder de manera adecuada. Para ello dentro de la célula se ha desarrollado un complejo sistema de señalización intracelular.

### **1.7 Las PTPs, más que unos simples inhibidores de las rutas de señalización.**

La fosforilación de proteínas es uno de los mecanismos más ampliamente extendidos en la regulación del desarrollo y respuesta celular. Este fenómeno enfrenta a dos tipos de familias ampliamente extendidas: las proteína quinasas, encargadas de añadir grupos fosfato, y las proteína fosfatasas, que se encargan de eliminarlos.

Las proteína fosfatasas están separadas en dos familias diferentes por su estructura y mecanismo de actuación distinto. Por un lado, las proteína serina/treonina fosfatasas y por otro las proteína tirosina fosfatasas (PTPs).

Centrándonos en la regulación por fosforilación en tirosina, los niveles de fosfotirosina estarían regulados por las proteína tirosina quinasas (del inglés, PTK) y por las PTPs. Las PTPs están a su vez divididas en dos grupos, las tirosinas específicas clásicas, PTPs, y las fosfatasa duales (DSPs), proteínas estas últimas que tienen la capacidad para desfosforilar los tres tipos de residuos fosforilados que presentan las proteínas, serina, treonina y tirosina, pero también los que presentan algunos lípidos y ARN mensajeros. Por último, dependiendo de si presentan o no algún dominio transmembrana, las PTPs clásicas están divididas a su vez en dos grupos, las PTPs de membrana o de tipo receptor (RPTPs), codificadas por 21 genes en humanos y que presentan dos dominios catalíticos, y las PTPs no transmembrana, codificadas por 16 genes en humanos y que solo presentan un dominio catalítico. El dominio catalítico característico de las PTPs clásicas, que está presente en todas ellas, está formado por unos 280 aminoácidos que presentan motivo conservado formado por 7 aminoácidos R-HC-(X<sub>5</sub>)-R esencial para la catálisis. Las PTPs no transmembrana, también llamadas citosólicas, presentan un único dominio catalítico flanqueado por otros motivos y dominios que regulan su actividad y su compartimentación dentro de la célula.

La nomenclatura de las fosfatasas en general, y las PTPs en particular, es bastante compleja, lo cual no ha facilitado la comunicación entre grupos y, por lo tanto, su estudio. Esta nomenclatura se puede observar en la tabla I.1 para las PTPs citosólicas.

nombre del gen	diferentes nombres de la proteína
Ptpn1	PTPN1, PTP-1B
Ptpn2	PTPN2, TC-PTP, MPTP, PTP-S
Ptpn3	PTPN3, PTPH1
Ptpn4	PTPN4, PTP-MEG1, TEP
Ptpn5	PTPN5, STEP
<b>Ptpn6</b>	<b>PTPN6, Shp1, PTP1C, SH-PTP1, HCP</b>
Ptpn7	PTPN7, HePTP, LCPTP
Ptpn9	PTPN9, PTP-MEG2
<b>Ptpn11</b>	<b>PTPN11, Shp2, SH-PTP2, Syp, PTP1D, PTP2C, SH-PTP3</b>
Ptpn12	PTPN12, PTP-PEST, PTP-P19, PTPG1
<b>Ptpn13</b>	<b>PTPN13, PTP-BAS, FAP-1, PTP1E, RIP, PTPL1, PTP-BL</b>
Ptpn14	PTPN14, PTP36, PEZ, PTPD2
Ptpn18	PTPN18, PTP-HSCF, PTP20, BDP
Ptpn20	PTPN20, TypPTP
Ptpn21	PTPN21, PTPD1, PTP2E, PTP-RL10
Ptpn22	PTPN22, LYP, PEP
Ptpn23	PTPN23, HD-PTP, PTP-TD14

**Tabla I.1: En la tabla se muestran las PTPs no transmembrana y su nomenclatura.**

La fosforilación en tirosina se produce en receptores, adaptadores y proteínas estructurales que, entre otras funciones, regulan el desarrollo. De hecho, hace tiempo que se abandonó la corriente de pensamiento que aseguraba que las PTPs, y las fosfatasa en general, eran simples inhibidores de la respuesta celular y carecían de sustratos específicos. De hecho, las PTPs se han revelado como unos importantes actores en funciones celulares que incluyen la adhesión, proliferación o procesos de migración y secreción. Se conocen ya bastantes ejemplos donde la actividad de las PTPs está muy regulada, porque desregulaciones de la misma acarrear alteraciones importantes dentro de las células. Todo lo anterior está revisado en profundidad en (Alonso et al., 2004; Tonks, 2006; Tonks, 2013)

### **1.7.1 SHP1 y SHP2, dos PTPs estructuralmente muy similares**

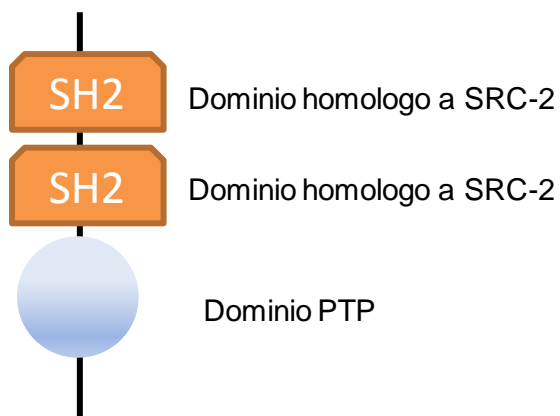
Diferentes PTPs se han encontrado relacionadas con la hematopoyesis, la megacariopoyesis y las plaquetas. SHP1 y SHP2 son dos fosfatasa implicadas en la regulación de las señales de receptores típicos de plaquetas, pero también se han descrito a PTP1B y PTPMEG2 (Senis, 2013).

SHP1 y SHP2 son dos proteína tirosina fosfatasa de tipo no receptor (PTPs) que contienen dos dominios SH2 (del inglés, src homology 2).

SHP1 (también conocida como PTPN6, SHP1, PTP1C, SH-PTP1 y HCP (tabla I.1)) está codificada por el gen *PTPN6* y su distribución se encuentra restringida a células epiteliales y hematopoyéticas. SHP2 (también conocida como PTPN11, SH-PTP2, Syp, PTP1D, PTP2C y SH-PTP3) está codificada por el gen *PTPN11* y se encuentra ampliamente distribuida.



Estructuralmente ambas proteínas tienen en la zona N-terminal un tándem con dos dominios SH2 (Figura I.9). Estos dominios les permiten interactuar con otras moléculas y también son dominios que influyen en la autorregulación de su actividad porque pueden bloquear su centro catalítico. La actividad de SHP1 en la célula está regulada de diferentes formas: la fosforilación en residuos de tirosina parece que aumenta su actividad de dos a cuatro veces; la traslocación a diferentes localizaciones puede alterar su capacidad para desfosforilar sustratos. Además, es autoinhibida por su propio dominio SH2, y la unión de este dominio a la proteína sustrato que va a ser desfosforilada la libera de esta inhibición. Su expresión génica también se encuentra regulada (Martin et al., 1999). Estos fenómenos de regulación se pueden extender a SHP2 (Vogel et al., 1993; Mitra et al., 2008).



**Figura I.9: Representación esquemática de la estructura de SHP1 y SHP2.** Inspirada en Tonks, 2006.

A pesar de que ambas PTPs tienen una estructura muy similar, sus funciones no son redundantes en la señalización celular. Esto es debido a la diferente capacidad que los dominios SH2 de cada una de ellas tienen de interactuar con otras proteínas y de diferencias en su dominio catalítico. Así, estudios con proteínas quiméricas indican que los dominios SH2 de estas proteínas interactúan con moléculas específicas, por lo que estos dominios SH2 no son intercambiables, y los dominios catalíticos de estas proteínas tampoco lo son (Neel et al., 2003; Tenev et al., 1997).

La deficiencia de SHP1 es letal, estos ratones mueren 2 o 3 semanas después de nacer con problemas inflamatorios relacionados con inmunodeficiencia y autoinmunidad (Shultz et al., 1993). Mutaciones espontáneas que provocan una expresión de SHP1 con menor capacidad catalítica, permiten a los ratones sobrevivir hasta las 9-12 semanas (Kozlowski et al., 1993). Además, los granulocitos y macrófagos de estos ratones presentan una respuesta aumentada a algunos factores de crecimiento (Jiao et al., 1997), así como una menor actividad de las plaquetas con respecto al agonista de la glicoproteína 6 (GPVI) (Pasquet et al., 2000). Por último, también poseen un desarrollo y maduración anormales de linfocitos, tanto B como T, lo que hace que presenten una gran cantidad de anticuerpos autorreactivos en diferentes tejidos como piel, riñón o pulmón (Kozlowski et al., 1993).

La deficiencia de SHP2 es letal durante el desarrollo embrionario, concretamente entre las etapas E8.1-E10.5. Ratones con mutaciones espontáneas que provocan una reducción de los niveles de SHP2 también mueren en fase embrionaria, pero en etapas posteriores debido, probablemente, a una compartimentación y actividad defectuosas de SHP2 (Yang et al., 2006). Por otra parte, la expresión de mutantes de SHP2 con una ganancia de función conduce a desarrollos embrionarios viables que presentan alteraciones como el síndrome de Noonan y en algunas ocasiones leucemia (Araki et al., 2004; Keilhack et al., 2005).

Se conoce desde hace tiempo que tanto SHP1 como SHP2 regulan la señalización de una gran variedad de receptores ligados a tirosina quinasas, donde se incluyen los receptores de citoquinas y de factores de crecimiento o las integrinas entre otros (Pao et al., 2007). Tradicionalmente se sitúa a SHP1 como un regulador negativo en la señalización intracelular, mientras que a SHP2 se le considera un regulador positivo, sin embargo existen procesos en los que esto no ocurre.

Un ejemplo bien caracterizado de la función de SHP1 es la inhibición de la señalización del receptor ITAM. Estos receptores se denominan así porque los que poseen motivos ITAM (de sus siglas en inglés Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), cuando el receptor que posee estos dominios se activa, estos dominios se fosforilan en tirosina y desencadenan la activación de rutas de señalización intracelular. Sin embargo, los receptores con motivos ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inactivation Motif) se inhiben cuando estos motivos se fosforilan en tirosina y se encargarían de la inhibición de las rutas de señalización. La interacción de SHP1 con un receptor con motivos ITIM provoca que SHP1 desfosforile a receptores con motivos ITAM, estas desfosforilaciones inhiben la ruta. (Daeron et al., 2008).

En cuanto al papel como activador de SHP2, y aunque no se conoce con exactitud el mecanismo concreto, SHP2 actúa como activador de Ras. Que como ya hemos dicho, es una de las proteínas que actúa como activador de las MAPK que desencadenan la activación de ERK en la señalización de receptores de citoquinas y factores de crecimiento (Kontaridis et al., 2004). Sin embargo, SHP2 también ha sido propuesto como un regulador negativo de la señalización de receptores ITAM vía su posible asociación con receptores ITIM, al igual que lo descrito en el párrafo anterior para SHP1 (Yusa y Campbell, 2003).

Por tanto, los papeles de inhibidor y activador de estas proteínas no están tan definidos. Por ejemplo, tanto SHP1 como SHP2 son reguladores negativos de la señalización por citoquinas a través de desfosforilaciones en JAK y STAT. Así, SHP1 es capaz de desfosforilar a JAK1, JAK2, JAK3 y STAT5. Y SHP2 desfosforila a JAK2, STAT1 y STAT2. De hecho, por ejemplo, un complejo formado por STAT5B y SHP1 se ha encontrado en el núcleo de células de cultivo hepáticas en respuesta a hormona del crecimiento. SHP1 actuaría, de esta forma,

en la actividad de las citoquinas CSF-1, EPO e IL3. Mientras SHP2 influiría en la señalización de SCF, GM-CSF, IL3 y EPO. Revisado todo ello en (Tsui et al., 2006).

En cuanto al papel de SHP1 y SHP2 en la hematopoyesis, SHP1 actúa como regulador negativo en diversas patologías hematopoyéticas. Su metilación ocurre en el 52% de los casos de leucemia mieloide aguda y el 79% de los de leucemia linfocítica aguda. Esta metilación conduce a una inactivación de SHP1, lo que activa la vía Jak/STAT. En contraste con estos tumores hematopoyéticos, en otros tipos de tumores epiteliales (próstata, ovario o mama), donde SHP1 también se expresa, esta se encuentra sobreexpresada (revisado en (Tsui et al., 2006)).

SHP2 está involucrada en el mantenimiento de las HSCs, ya que, HSCs extraídas de ratones que solo tienen una copia funcional de SHP2 no son capaces de llevar la repoblación de la médula ósea a largo plazo (Chan et al., 2006). SHP2 disminuye la activación de Ras/ERK en la ruta de las MAPK disparadas por GM-CSF (Chan et al., 2006), pero es requerida para la activación de las MAPK cuando esta señal es activada por el receptor c-Kit en mastocitos (Yu et al., 2006). SHP2 tiene que inactivarse durante la activación del receptor de linfocitos T. Así, para que tenga lugar la señalización producida por este receptor SHP2, debe inhibirse por oxidación, proceso que no se ha detectado para SHP1 (Kwon et al., 2005).

### **1.7.2 PTPN13.**

PTPN13 es la proteína tirosina fosfatasa codificada por el gen *PTPN13*, que también es conocida con el nombre de PTP-Bas, PTPL1, PTP1E y hPTP1e, FAP-1. En ratón es conocida como RIP o PTP-BL. En la presente memoria, y para facilitar la lectura, nos referiremos a ella como PTPN13 o mPTPN13 en ratón (del inglés mouse) Ampliamente revisado en (Erdmann, 2003).

PTPN13 es una PTP que se encuadra dentro de las PTP del tipo no receptor, ya que, al igual que SHP1 y SHP2, carece de dominios transmembrana (Andersen et al., 2001), tiene un peso molecular muy alto, alrededor de 270 kDa y una estructura modular donde se pueden observar hasta 8 dominios diferentes. Estos dominios le dan a PTPN13 la posibilidad de interactuar con numerosas moléculas y tener muy diferentes roles dentro de la célula. Desde el extremo N-terminal al C-terminal nos encontramos con un dominio KIND, un dominio FERM, 5 dominios PDZ y el dominio con actividad fosfatasa (Cicarelli et al., 2003; Chishti et al., 1998; Kennedy, 1995). Además, se conocen varias isoformas de PTPN13, y más aún de mPTPN13, algunas de ellas con la región C-terminal donde se encuentra el dominio fosfatasa truncada, lo que, unido a la gran cantidad de moléculas que pueden interactuar con ella, sugiere un papel importante como proteína de andamiaje (Banville et al., 1994). (Figura I.10)

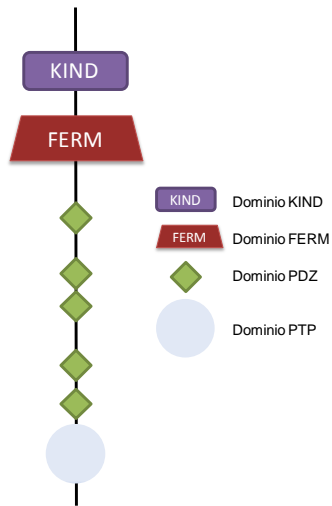


Figura I.10: Representación esquemática de la estructura de PTPN13. Inspirado en Tonks, 2006.

Los diferentes dominios PDZ permiten a PTPN13 interactuar con numerosas moléculas. Así, está descrito que la región PDZ1 interactúa con el factor de transcripción IκBα. (Maekawa et al., 1999). PDZ2 es capaz de interactuar la proteína de superficie FAS (Sato et al., 1995) y también con otras proteínas como el receptor de neurotrofinas p75<sup>NTR</sup> o proteínas RIL (Irie et al., 1999; Cuppen et al., 1998). PDZ3 interactúa con el citoesqueleto. PDZ4 se ha relacionado con proteínas RIL y con receptores de efrinas. El dominio PDZ5 no tiene interacciones con proteínas conocidas, aunque, al igual que PDZ2 y PDZ3, puede interactuar con difosfatidil inositol bisfosfato (Zimmermann et al., 2002). El dominio inicial KIND es un dominio homólogo al módulo C de las quinasa y parece que no tiene actividad catalítica. Por último, con los dominios FERM, PTPN13 es capaz de interactuar con el citoesqueleto de actina (Ciccarelli et al., 2003). Figura I.11.

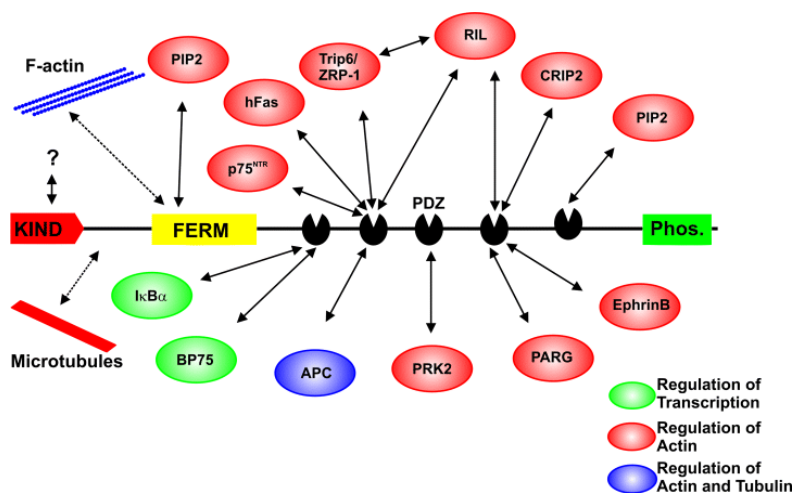


Figura I.11: Representación esquemática de las interacciones de PTPN13. Tomado de Erdmann, 2003.

En cuanto a la actividad PTPásica, se han descrito algunos sustratos de PTPN13 que son capaces de interactuar con dominios PDZ *in vivo*. En diferentes líneas celulares se ha

descrito desfosforilación RIL, I $\kappa$ B $\alpha$ , EphrinB. En cuanto a experimentos *in vitro*, PTPN13 es capaz de desfosforilar a c-src y a  $\beta$ -Catenina (Palmer et al., 2002; Cuppen et al., 1998; Maekawa et al., 1999; Erdmann et al., 2000), actividad de la que nuestro grupo de investigación también ha aportado evidencias *in vivo* (Sardina et al., 2014).

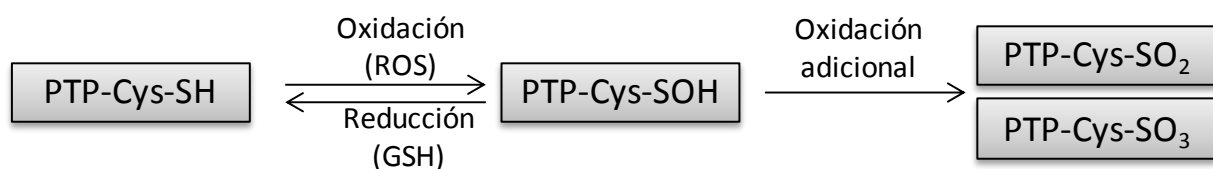
La eliminación del dominio catalítico de mPTPN13 no provoca un fenotipo muy acusado en estos ratones. De hecho, los ratones siguen siendo viables y fértiles. Sin embargo, se encontró que estos ratones presentaban defectos a la hora de reparar lesiones producidas en los nervios motores (WANSINK; 2004). La supresión completa del gen de mPTPN13 provoca una alteración de la diferenciación de linfocitos T, debido probablemente a alteraciones en la fosforilación de los STATS, probablemente STAT4 y STAT6 (Nakahira et al., 2007).

Se ha sugerido un papel de PTPN13 también en la regulación de la citocinesis. Este proceso es la última etapa de la mitosis y es el encargado de dividir la célula en dos después de la segregación de los cromosomas. En células de mamíferos, al final de la anafase se debe constituir un anillo de actina y miosina bajo la membrana plasmática que ayuda a la división del citoplasma por la contracción del mismo. La localización durante este proceso de PTPN13 está muy regulada y en la anafase se sitúa en cinturón medio y en el cuerpo medio al final de la citocinesis. Esta regulación sería debida a la interacción entre el dominio FERM de PTPN13 y los filamentos de actina. Además, la sobreexpresión de mPTPN13 en células HeLa disminuye el número de células polinucleadas (Herrmann et al., 2003). Con el dominio PDZ2 de PTPN13 es capaz de interactuar la proteína de superficie FAS aunque no lo hace mPTPN13. Por ello, PTPN13 podría estar relacionado con fenómenos de apoptosis regulando negativamente la señalización de Fas; lo que se ha observado en diferentes líneas celulares tumorales (Sato et al., 1995).

### **1.7.3 Las ROS regulan a las PTPs.**

La actividad de las PTPs puede regularse a través de los niveles de expresión, por promotores alternativos o de la maduración del ARNm (“splicing” alternativo). También se regulan a nivel postraducional con diferentes localizaciones celulares, unión específica de ligandos y modificaciones covalentes como son las fosforilaciones, proteólisis y las oxidaciones (Tonks, 2013). De hecho, la oxidación de PTPs es uno de los principales modos de regulación de las PTPs, que son muy sensibles a la oxidación, algo descrito en nuestro grupo de investigación hace ya algunos años (Hernandez-Hernandez et al., 1999). Esta oxidación provoca una inactivación en las PTPs (Meng et al., 2002), pero también inhibe serina-treonina fosfatasas o a quinasas como MEKK1, AKT, PKA o PKC (Sardina et al., 2012). Sin embargo, la oxidación también produce una activación de las quinasas de la familia Src (Giannoni et al., 2010) o de la actividad de la GTPasa (Adachi et al., 2004).

En el caso concreto de las PTPs, esta sensibilidad a la oxidación es debida a la oxidación de residuos de cisteína, un aminoácido que se encuentra en la estructura y en el centro activo de las PTPs. La cisteína del centro activo está conservada porque es imprescindible para la catálisis que lleva a cabo la fosfatasa. La cadena lateral de la cisteína está formada por un grupo SH y, para que esta sea funcional, el azufre se debe encontrar en forma de tiol (S<sup>-</sup>) o de sulfidilo (SH). Sin embargo, cuando algunos oxidantes, por ejemplo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reaccionan con ella, la molécula de azufre se oxida a ácido sulfénico (SOH), estado en el cual la cisteína no puede llevar a cabo la acción catalítica. Si las concentraciones de oxidante son altas, el estado del grupo sulfato de la cisteína puede llegar a ácido sulfínico (SO<sub>2</sub>H) o ácido sulfónico (SO<sub>3</sub>H). En estos estados de oxidación de la cisteína las PTPs tampoco pueden llevar a cabo la catálisis. La oxidación a ácido sulfénico es reversible en contextos fisiológicos (Ostman et al., 2006) (Figura I.12).



**Figura I.12: Representación esquemática de los estados de oxidación de las cisteínas de las PTPs.** Tomado de Ostman et al., 2006.

Por ello, las PTPs son un firme candidato a intervenir en la regulación de la señalización mediada por las especies reactivas del oxígeno (ROS) (de sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species). Las ROS tradicionalmente se han relacionado con efectos perniciosos para la célula. Ya a mediados del siglo pasado se relacionó al oxígeno y al peróxido de hidrógeno con daños en el metabolismo del cerebro (Mann y Quastel, 1946). Sin embargo, desde hace algún tiempo se han descrito a las ROS como moduladores fisiológicos de muchos procesos bioquímicos de la célula. A principios de este siglo ya se recogen revisiones en las que se habla de la implicación en la señalización celular de las ROS (Thannickal y Fanburg, 2000) , implicándose a las ROS en la expresión génica (Goldstone et al., 1996) o en la regulación de señalización (Tatla et al., 1999). En este sentido, nuestro grupo de investigación demostró recientemente, por primera vez, cómo la producción de ROS es imprescindible para el desencadenamiento de la diferenciación megacariocítica (Sardina et al., 2010). Estos y otros indicios han llevado a la comunidad científica a acuñar el término anglosajón de “Redox Signaling” que quiere englobar a estos efectos regulatorios de las ROS en la célula.

Aun así, estamos lejos de conocer cómo es exactamente el mecanismo de acción por el cual las ROS son capaces de actuar en la señalización celular. Dentro de lo que hemos denominado ROS existe una gran cantidad de especies distintas donde las más comunes de

estas formas parcialmente reducidas del oxígeno son el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) (Turrens, 2003). Además, las fuentes de producción de las ROS en la célula son diversas, las principales son: los complejos enzimáticos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, el complejo enzimático de la xantina oxidoreductasa y el complejo enzimático de la familia de las NADPH oxidasas (abreviado como Nox). Cuantitativamente, el principal productor de ROS es la mitocondria. Sin embargo, las Nox tienen una cualidad que no presenta el resto de sistemas productores de ROS, y es que a este sistema no se le conoce ninguna otra función aparte de producir ROS (Paravicini y Touyz, 2008). Además, presentan una biología muy interesante, ya que se conocen hasta 7 isoformas de esta familia. Su patrón de expresión depende del tipo celular y siempre están asociadas para su actuación a la membrana, ya sea a la membrana externa o a membranas internas. Debido a estas premisas, un concepto que aún debe ser discernido en cuanto a la biología de las Nox es si existe redundancia o especificidad en las funciones de las diferentes Nox.









## **Objetivos**

---



## 2. OBJETIVOS

La diferenciación hematopoyética está controlada por numerosas **citoquinas** que afectan a la multipotencialidad de las HSCs y al camino que éstas deben tomar. En muchas ocasiones la señalización intracelular estimulada por estas citoquinas va a depender de los niveles de fosforilación de diferentes proteínas señalizadoras. En concreto, los niveles de fosforilación en tirosina están regulados por el equilibrio entre la PTKs y PTPs. Aunque existen evidencias de que las PTPs intervienen en la señalización que conduce a la megacariopoyesis y a la hematopoyesis (Pao et al., 2007), el mecanismo por el que las PTPs regulan estos procesos no está aún dilucidado. Uno de los mecanismos conocidos de regulación de la actividad de las PTPs es la oxidación de su centro activo por las ROS (Meng et al., 2002). Nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que una producción transitoria de ROS es necesaria para la diferenciación megacariocítica (Sardina et al., 2010). Debido a la sensibilidad de las PTPs a los procesos de oxidación, pensamos que el inicio de este proceso de diferenciación pueda verse acompañado de la inactivación de algunas PTPs. Es interesante señalar que se ha implicado a SHP1 y SHP2 en la diferenciación megacariocítica (Mazharian et al., 2013), y que estas PTPs pueden ser reguladas por ROS (Meng et al., 2002).

Además, nuestros resultados sugieren la implicación de PTPN13, una fosfatasa de alto peso molecular en la diferenciación megacariocítica. Recientemente se ha demostrado una posible relación funcional entre PTPN13 y  $\beta$ -Catenina (Huang et al., 2013). El papel de  $\beta$ -Catenina en la hematopoyesis de mamíferos es controvertido (Luis et al., 2012).

Por tanto, el **OBJETIVO GENERAL** que nos propusimos en esta Tesis Doctoral era estudiar el papel y la regulación de las PTPs y  $\beta$ -Catenina en la diferenciación hematopoyética. Dicho objetivo general se concretó en los siguientes objetivos concretos

1. Estudiar la implicación de las proteína tirosina fosfatasas SHP1 y SHP2 y su regulación por oxidación durante la diferenciación megacariocítica.
  - 1.1 Averiguar si SHP1 y SHP2 son importantes para la diferenciación megacariocítica.
  - 1.2 Analizar las principales rutas de señalización implicadas en la diferenciación megacariocítica y su posible relación con SHP1 y SHP2.
  - 1.3 Estudiar la actividad de SHP1 y SHP2 durante la diferenciación megacariocítica.
  - 1.4 Analizar si fenómenos que alteran la actividad de SHP1 y SHP2, fosforilación u oxidación, están implicados en la regulación de estas proteínas en la diferenciación megacariocítica.

- 2 Estudiar el papel de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina durante la hematopoyesis.
  - 2.1 Comprobar si PTPN13 y  $\beta$ -Catenina trabajan juntas durante la diferenciación megacariocítica.
  - 2.2 Estudiar si PTPN13 y  $\beta$ -Catenina actúan en la diferenciación de otros linajes de la hematopoyesis.
  - 2.3 Analizar si PTPN13 y  $\beta$ -Catenina están implicadas en la regulación de las células madre hematopoyéticas.
  - 2.4 Estudiar si algunas citoquinas del nicho hematopoyético pueden modular a PTPN13 y/o  $\beta$ -Catenina.







## **Objetivos**

---



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Aparatos

- Agitador balancín BFR 25 de “Grant Boekel”.
- Agitador magnético Minimix de “OVAN”.
- Aparatos de electroforesis horizontal: GNA 100 de “Pharmacia Biotech” y “BioRad DNA Sub Cell™”.
- Autoclaves: Steam Sterilizer de “Raypa” y Autester-G de “Selecta”.
- Balanza analítica 40SM-200A de “Precisa” y granataria Electronic Scale de “Want”.
- Baño termoregulables: SBS TFB serie B, Memmert y Retostat.
- Cámara Gel Logic 100 Imaging System de “Kodak”
- Campanas de flujo laminar ESCO class II BSC , de “Labcultures” y Telstar Bio IIA, class II cabinet, de “Fisher”.
- Centrífugas: Allegra™ 21R Centrifuge y Avanti™ J-25 Centrifuge de “Beckman”, Optima™ XL-100K Ultracentrifuge de “Beckman coulter” , Sorvall Legend Micro 21R Centrifuge de “Thermo Scientific”, IEC MicroCL 17 Centrifuge de “Thermi Electron Corporation” y 5810R Centrifuge de “Eppendorf”, Cytospin2 de “Shandon”.
- Citómetros FACSaria, FACSariaIII y FACSCalibur de “Becton Dickinson Biociences”.
- Congeladores: de -20° C “IGNIS” y de -80° C Forma -86C ULT Freezer de “Thermo Electron Corporation”.
- Contenedor de nitrógeno líquido “Thermo Forma”.
- Densitómetro CS-9000 de “Shimadzu”
- Escáner Hewlett-Packard, modelo Scanjet 3C.
- Incubador modelo 311 de “Thermo scientific”, y Orbital Shaker de “Thermo Forma”.
- Lectores de ELISA: Multiskan FC de “Thermo Scientific” y Varioskan Flash “Thermo Electron Corporation”.
- Máquina de revelado para Western “Medical X-ray Processor” de “Kodak”.
- Microscopios de luz invertida: Olympus 1X51 y Nikon TMS.
- Nanodrop 1000 Spectrophotomer “Thermo scientific”
- pH-metro Crison microPH 2001.
- Roller mix (agitador) de “Ovan”
- Secuenciador capilar automático 3100 Genetic Analyzer de “Applied Biosystems Hitachi”.
- Sistema de electroforesis vertical, sistema para el montaje de los cristales y polimerización de los geles de poliacrilamida de “BioRad”.

- Sistema de purificación de agua ultrapura Milli Q (Millipore).
- Termocicladores: Mastercycler epgradient de “Eppendorf” y Step One Real Time PCR System de “Applied Biosystems”.
- Transiluminador TFX 35M de “Vilber Lourmat”.
- Unidades de corriente: Electroforesis Power Suply EPS 200 de “Pharmacia Biotech”, GPSU-200/100 de “BioRad DNA Sub Cell™” y “Power Pac HC y Power Pac Basic de “BioRad”
- Otros aparatos de uso frecuente en el laboratorio.

### **3.2 Reactivos.**

Todos los productos empleados en este trabajo fueron de calidad analítica.

- De **Fermentas** (Domaine de Saint Paul, Francia), fueron adquiridos los desoxirribonucleótidos trifostato (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), el “DNA extranction kit” y el marcador de tamaño de DNA “Gene Ruler™ DNA Ladder Mix” .
- De **Miltenyi Biotec** (Madrid, España) se obtuvieron los medios de cultivo semisólido en metilcelulosa “HSC-CFU básico”. Además de los anticuerpos de citometria: FcR Bloking, CD127, CD16/32, CD3e, CD11b, CD19, CD117, CD4, CD8a, CD44, CD25, B220, anti-Gr1, anti-Sca-1, anti-Ter-119, anti-Igm, anti-Ki67, CD45, la mezcla para detección de células linaje positivas y el fluoróforo unido a estreptavidina todos ellos reconocen proteínas de ratón. También fueron adquiridas a este distribuidor las citoquinas recombinantes de ratón: interleuquina (IL-3), factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), el ligando de FLT3 y la interleuquina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ).
- El anticuerpo  $\alpha$ -IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), el sistema de revelado de los Westerns (“ECL plus Western Blotting Detection System”), las películas hyperfilm-ECL, las membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) y el kit de extracción ARNspin fueron suministrados por **GE Healthcare Limited** (Buckinghamshire, Reino Unido).
- El anticuerpo anti ox-PTP, y las citoquinas humanas CXCL12 y SCF fueron adquiridas a **RD system** (Madrid, España).
- El anticuerpo anti phospho-STAT5 (Y694) procede de **Cell Signalling Technology** (Danvers MA, USA).
- El extracto de levaduras, el agar bacteriológico, la agarosa, la agarosa de bajo punto de fusión y la bactotriptona fueron proporcionados por **Laboratorios Conda** (Torrejón de Ardoz, Madrid, España).

- El marcador de peso molecular para SDS-PAGE “BenchMark™ Prestained Protein Ladder”, el inhibidor de RNAsa (RNAsa Out®), la Transcriptasa reversa (SuperScript® II Reverse Transcriptase), el dithiothreitol (DTT) y el anticuerpo  $\alpha$ -rabbit IgG-HRP (Zymed) fueron suministrados por **Invitrogen** (Carlsbad, CA, USA)”.
- El Power SYBR® Green (PCR Master MIX) fue proporcionado por **Applied Biosystems** (Warrington, UK).
- La acrilamida, bisacrilamida, dodecil sulfato sódico (SDS), persulfato amónico, *N,N,N',N'*-tetrametil-etilendiamida (TEMED) fueron adquiridos en **Bio-Rad Laboratories** (Barcelona, España).
- La ligasa “T4 DNA Ligase”, la T4 polinucleótido Kinasa y las endonucleasas de restricción procedían de **Takara** (Saint-Germain-en-Laye, Francia).
- La Polietilanimina lieal (MW 25000) (PEI) fue proporcionada por **Polysciences, Inc** (Eppelheim, Alemania).
- Los anticuerpos de ratón CD41, CD42d, CD61, Cd135, CD34, CD127 se adquirieron a **eBioscience**. (Barcelona, España).
- Los anticuerpos secundarios anti-cadenana ligera de conejo y ratón unidos a peroxidasa de rábano fueron adquiridos a **Jackson ImmunoResearch Inc.** (Baltimore Pike).
- Los anticuerpos, phospho-ERK (E-4) , ERK 1 (K-23) y STAT5 (H-134),  $\beta$ -Catenina, PTPN13, fosfo-SHP1, fosfo-SHP2, SHP1, SHP2, PTP1B fueron adquiridos de **Santa Cruz Biotechnology** (Santa Cruz, CA, USA).
- Los Kits de extracción de DNA plasmídico “HiPure Plasmid Midiprep” , “HiPure Plasmid filter Maxiprep” y “PureLink® Quick Plasmid Miniprep” fueron proporcionados por **Invitrogen** (Carlsbad, CA, USA)”.
- Los Kits de extracción de DNA plasmídico “Qiagen® Plasmid Plus Midi Kit” y “Endofree® Plasmid Maxi Kit” fueron obtenidos de **Qiagen** (Hilden, Alemania).
- Los oligonucleótidos para RT-qPCR y para la interferencia del ARN mensajero de las proteínas, la pironina y, la saponina y el anticuerpo anti GAPDH fueron suministrados por **Thermo Fisher Scientific In.** (Rockford, USA).

- El anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina , bromuro de etidio, mezcla de inhibidores de proteasas, el difenileneiodonium (DPI) , dimetilsulfóxido (DMSO) , 4'-Hydroxy-3-methoxyacetophenon (Apocinina), ioduro de propidio (IP), ribonucleasa A, seroalbúmina bovina (BSA), TRI-reagent, tris(hidroximetil)aminometano (TRIZOL), Triton X-100 y Tween 20 (polioxietileno 20 sorbitan monolaurato), Ácido Iodoacético (IAA) fueron suministrados por **Sigma Chemical Co** (Madrid, España).
- Por **LONZA** (Barcelona, España) y Biowest (Madrid, España) fueron suministrados la estreptomina, medios de cultivo RPMI 1640 y DMEM, L-glutamina, penicilina, y tripsina-EDTA.
- Los restantes productos empleados en este trabajo fueron proporcionados por **Probus** (Badalona, España) o **Panreac** (Castellar del Vallès, España) o **Thermo Fisher Scientific In.** (Rockford, USA).

### **3.3 Materiales.**

#### **3.3.1 Material biológico.**

##### 3.3.1.1 Líneas celulares.

Para el presente estudio se utilizarán: células HEL y K562 que son dos líneas celulares eritroleucémicas, células HEK 293T que son una línea celular tumoral de riñón embrionario humano y células hMSC-TERT que son una línea celular procedente de células mesenquimales humanas immortalizadas.

##### 3.3.1.2 Animales de experimentación.

También se utilizaron ratones C57BL/6 fueron proporcionados por Charles River Laboratory y por el animalario OMG del servicio de experimentación animal de la Universidad de Salamanca (SEA). Los ratones de entre 8 y 12 semanas de edad fueron mantenidos y estabulados en el SEA en jaulas de hasta 6 individuos a temperatura de 20-22 °C, con periodos de luz-oscuridad de 12 h, con libre acceso a comida y agua. Fueron manipulados de acuerdo a las directivas europeas y con la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca. De estos ratones se utilizaron células de 4 órganos: bazo, timo, sangre periférica (SP) y medula ósea (MO).

##### 3.3.1.3 Cepas bacterianas

Como cepa bacteriana se utilizó *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , una cepa bacteriana con elevada competencia utilizada para transformar por choque térmico.

### **3.3.2 Material informático.**

- **Adobe Photoshop:** Procesamiento de las imágenes.
- **Cell Quest Pro “BD Biociencias”, Flowing software 2, Infinicyt:** Se emplearon estos programas para la adquisición y análisis de las muestras de citometría de flujo.
- **DP Controller “Olimpus”:** Realización de fotografías al microscopio de luz invertida Olympus 1X51.
- **IBM SPSS Statistics 21:** Análisis estadístico.
- **Paquete DNA STAR, Primer 3:** Se emplearon este software programas de este para el análisis de secuencias de ADN y el diseño de oligonucleótidos.
- **Paquete Microsoft Office:** Realización de la redacción del trabajo, construcción de figuras y análisis de resultados.
- **Quantity One:** programa utilizado junto al transiluminador para visualizar y analizar la electroforesis en geles de agarosa.
- **StepOne Software v.2.1:** para el diseño y análisis de las reacciones de PCR cuantitativa o Tiempo Real.

## **3.4 Medios de cultivos.**

### **3.4.1 Medios de cultivos celulares.**

- **RPMI 1640-10% FBS/PS/Gln:** RPMI 1640 suplementado con FBS 10% (inactivado por calentamiento a 55°C durante 1h), 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml estreptomicina, y L-glutamina 2 mM.
- **DMEM-10%FBS/PS/Gln:** DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) 10% (inactivado por calentamiento a 55°C durante 1h), 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml estreptomicina, y L-glutamina 2 mM.
- **IDMD-20%FBS/PS/Gln:** suplementado con suero fetal bovino (FBS) 20% (inactivado por calentamiento a 55°C durante 1h), 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml estreptomicina, y L-glutamina 2 mM.
- **MEDIO DE CULTIVO SEMISÓLIDO EN METILCELULOSA “HSC-CFU basic”:** Contiene: IMDM, L-Glutamina, metilcelulosa, suero fetal bovino, albúmina de suero bovino y 2-Mercaptoetanol. Permite la adición de factores de crecimiento o citoquinas a elección. Se suplemento con TPO 100 ng/ml y IL1 $\beta$  10 ng/ml ambas de ratón (mTPO, mL1 $\beta$ ).

### 3.4.2 Medios de cultivos bacterianos.

- **LB (Luria-Bertoni):** Extracto de levadura 0,5%; bacto triptona 1%; NaCl 1%; NaOH 1mM.
- **LB-Agar:** Extracto de levadura 0,5%; bacto triptona 1%; NaCl 1%; NaOH 1mM; agar bacteriológico 1,5%.

### 3.5 Soluciones y tampones.

Todas las soluciones empleadas se prepararon con H<sub>2</sub>O ultrapura excepto cuando se muestra algo diferente.

- **PBA:** EDTA 5 mM, BSA 0.5% en PBS
- **PBS (Solución amortiguadora de fosfatos):** NaCl 137mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM; pH 7,0.
- **Pervanadato:** Vanadato 200 µM con de peróxido de hidrógeno 200 µM.
- **Poliacrilamida al 40%:** acrilamida al 38.96% y bis-acrilamida al 1.04%.
- **Solución de arrastre de los anticuerpos unidos a una membrana de transferencia de Western (Solución de arrastre):** Tris 62,5 mM pH 6,8; SDS 2% p/v; β-mercaptoetanol 100 mM.
- **Solución de bloqueo:** leche desnatada al 5% ó BSA al 2% en tampón de lavado (TBS-tween).
- **Solución de lisis de las células de la serie roja (SLSR):** NH<sub>4</sub>CL 0,155 M , KHCO<sub>3</sub> 10 mM , EDTA 10 mM a pH 7,4.
- **Solución de precipitación/purificación de ADN (Fenol/cloroformo/isoamílico):** Fenol/cloroformo 1:1. El cloroformo se estabiliza con alcohol isoamílico 4%. La mezcla se cubre con Tris-HCl 10 mM pH 8.
- **Solución de trabajo de yoduro de propidio:** IP 50 µg/mL; Ribonucleasa A 0,1 mg/ml; en PBS 1.
- **Solucion Hepes:** Hepes 200mM pH 7.4.
- **Solución NASS:** Solución de marcaje de ácidos nucleídos. pH 4.8: NaCl 0,15 M en tampón fosfato citrato 0.1 M, EDTA 5 mM, BSA 0.5% (Seroalbúmina bovina)
- **Tampón concentrante:** Tris 0,5 M, pH 6,8 ajustado con HCl.
- **Tampón de anillamiento:** Acetato sódico 100 mM; Acetato de magnesio 2 mM; HEPES 30 mM. Se ajustó a pH 7,4 con KOH.
- **Tampón de carga o de muestra para proteínas:** Tris 125 mM; SDS 2%; glicerol 5% v/v; azul de bromofenol 0,003%; β-mercaptoetanol 1%. Se ajustó a pH 6,8 con HCl.



- **Tampón de electroforesis de agarosa (TAE) (Tris-Acético-EDTA):** Tris 40 mM; Ácido acético glacial 20 mM; EDTA 2 mM.
- **Tampón de electroforesis para Western:** Tris 25 mM; Glicina 200 mM y SDS al 0,1%, se ajustó a pH 8,3 con HCl. Diluido 5 veces para su uso.
- **Tampón de lavado (TBS-tween):** Tris 10 mM, NaCl 100 mM y Tween 20 0,05%, se ajustó a pH 7,5 con HCl.
- **Tampón de lisis MLB:** HEPES 25 mM pH 7,5; NaCl 150 mM, Igepal 1%, glicerol 10%, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 1mM, NaF 25 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM e inhibidores de proteasas.
- **Tampón de actividad PTPs:** Hepes 50 mM pH 7,2, NaCl 60 mM, KCl 50 mM y EDTA 5 mM.
- **Tampón de lisis oxidación de PTPs:** Triton X-100 0,5%, ácido desoxicolato 0,5%, NaCl 150 mM, Tris 20 mM pH 7,5, EDTA 10 mM y pirofosfato sódico 30 mM.
- **Tampón de transferencia:** Tris 25 mM; glicina 190 mM; metanol 20% v/v.
- **Tampón separador:** Tris 1,5 M, pH 8,8 ajustado con HCl.
- **Tampón STET:** Sacarosa 15%; Tris-HCl 50 mM pH 8; EDTA 50 mM pH 8; Triton X-100 1%.
- **TE (Tris-EDTA):** Tris 10 mM; EDTA 1 mM.
- **Vanadato:** Solución de trabajo preparada con vanadato sódico 200 mM. Para prepararla se añadieron unos µl de HCl hasta que la solución se volvió amarilla. Posteriormente se hirvieron durante 3 minutos. Desapareciendo el color amarillo. Se enfrió en hielo y se repitieron estos pasos hasta que el color amarillo era estable después de haber hervido durante 5 minutos. Aproximadamente 3 ó 4 repeticiones fueron necesarias.

### **3.6 Métodos**

#### **3.6.1 Cultivos celulares**

Las células **HEL** y **K562** Se crecieron a una densidad de entre  $2 \times 10^5$  células/ml y  $5 \times 10^5$  células/ml en RPMI 1640-10%FBS/PS/Gln. Para cambiar el medio se centrifugaron a  $300 \times g$  durante 5 minutos a 4°C. Se lavaron con tampónPBS. Se crecieron a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub>. Se pueden diferenciar tanto a megacariocitos como a eritrocitos. La diferenciación a megacariocitos se llevó a cabo tratando las células con Forbol 12-Miristato 13 Acetato (PMA) 20 nM en células a una concentración de  $3 \times 10^5$ , recogándose muestras a distintos tiempos. Para inhibir la actividad NADPH oxidasa se utilizó Difenil iodonium (DPI). Para estimularlas con citoquinas: se preincubaron antes de añadir la citoquina durante 16 horas en RPMI 1640 sin suplementar con FBS y posteriormente se les añadió TPO 100 ng/ml, Wnt3a 100 ng/ml, CXCL12 100 ng/ml o SCF 100 ng/ml en el medio sin suero. Para tratarlas con el medio proveniente de hMSC-TERT se preincubaron durante 16 horas con DMEN sin FBS.

Posteriormente se recogieron por centrifugación en las condiciones arriba indicadas y se sembraron en medio donde la línea celular hMSC-TERT había crecido durante 72 horas.

Las células **HEK 293t** y **hMSC-TERT**: Se crecieron adheridas a superficie en DMEM-10%FBS/PS/Gln, cambiándolas a una superficie 3 o 4 veces mayor. Para ello, cuando se encontraban confluentes, se incubaron con tripsina para desprenderlas del sustrato, previo lavado con PBS. Se crecieron a 37 °C en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

Las células **Lin-** se cultivaron durante los tiempos que se indican en cada sección en IDMD- 20% FBS /PS/Gln suplementadas con TPO 100 ng/ml y IL1β 10 ng/ml para llevar a cabo la diferenciación megacariocítica o IL-3 10 ng/ml, SCF 10 ng/ml, TPO 10 ng/ml y el ligando de FLT3 10 ng/ml para mantenerlas indiferenciadas o transducirlas con los virus correspondientes.

Cuando se infectaron con virus, se mantuvieron con ellos durante 24 horas a 37 °C en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% y a continuación se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en:

- PBS para trasplantarlas al ratón
- IDMD- 20% FBS/PS/Gln con TPO 100 ng/ml y IL1β 10 ng/ml para que desarrollaran la diferenciación megacariocítica.
- HSC-CFU básico con TPO 100 ng/ml y IL1β 10 ng/ml para formar colonias formadoras de megacariocitos.
- IDMD-20%FBS/PS/Gln con IL-3, SCF, TPO y el ligando de FLT3 10 ng/ml para mantenerlas indiferenciadas.

### **3.6.2 Extracción de las células de los diferentes compartimentos de ratones C57BL/6**

#### 3.6.2.1 Células de la médula ósea.

Para su obtención se extrajeron las tibias y los fémures se cortaron estos huesos a la altura aproximada de las metafisis con un bisturí. Las epífisis se desecharon y se utilizaron para extraer las células las diáfisis. Se introdujo una aguja de 25G en el corte que se había realizado en el hueso y se inyectó PBS a través de la médula de la diáfisis, recogiendo el PBS con las células que salen por la parte distal en una placa de cultivo. Se puede observar que se ha realizado con éxito la operación porque la médula interior del hueso pierde el color rojo característico de contener eritrocitos.

Para extraer las células más firmemente unidas a la matriz del hueso se trocearon los huesos después de someterlos al proceso anterior y se trataron durante 2h en agitación fuerte y 37 °C con colagenasa y dispasa 2 mg/ml.

#### 3.6.2.2 Células del bazo.

Se extrajo el bazo del ratón, se troceó sobre un portaobjetos y se homogeneizó con la ayuda de otro portaobjetos.

#### 3.6.2.3 Células del timo.

Después de extraer el timo se utilizó la misma técnica que con las células del bazo.

#### 3.6.2.4 Células de sangre periférica.

Se hicieron extracciones de sangre desde la vena submandibular y directamente desde el ventrículo izquierdo en tubos EDTA K3.

Todas estas células excepto las de la sangre periférica, se pasaron por un tamiz de 70  $\mu\text{m}$  de poro. Posteriormente las células se centrifugaron a 4 °C durante 10 minutos y 300 x g. Se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se incubó durante 20 minutos en hielo en la solución de lisis de la serie roja (SLSR), 155 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM de  $\text{KHCO}_3$  y 10 mM de EDTA pH 7,4, las células de la sangre periférica se resuspendieron directamente en esta solución de lisis de la serie roja. Con esto se lisaron las células no nucleadas, es decir los eritrocitos maduros. A continuación se lavaron con PBS, centrifugándose en las condiciones anteriores estando así preparadas para su procesamiento posterior.

#### 3.6.2.5 Obtención de las células linaje negativas (Lin-).

A partir de las células de la MO y después de lisar la serie roja se separaron las células linaje negativas siguiendo las instrucciones del Miltenyi Biotec. A grandes rasgos el proceso consiste en marcar las células de la médula ósea con una mezcla de anticuerpos (CD5, CD45R (B220), CD11b, Gr-1 (Ly-6G/C), 7-4, y Ter-119), que están unidos a biotina y posteriormente se añade estreptavidina unida a pequeñas esferas de hierro que es atraído por magnetismo. Esta mezcla se pasa por una columna magnética, por lo que las únicas células que salen de dicha columna son las que no están unidas a ningún anticuerpo (Lin-).

### **3.6.3 Citometría de flujo**

#### 3.6.3.1 Análisis de marcadores

Para medir los niveles de los diferentes marcadores megacariocíticos (CD61a y CD41) las células HEL y K562 se recogieron trascurridas 48 horas de estimulación con PMA. Transcurrido el tiempo de diferenciación, las células fueron procesadas para su análisis por citometría de flujo de la siguiente forma.  $10^5$  células se resuspendieron en 50  $\mu\text{l}$  de PBS en un tubo de citometría. Se añadieron la cantidad de los distintos anticuerpos (CD41, CD61a)

unidos a fluorocromos siguiendo las instrucciones del fabricantes durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se lavaron con 3 mililitros de PBS y se centrifugaron en las condiciones que se indicaron anteriormente. Se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 200 µl para su adquisición en el citómetro de flujo.

Para experimentos *in vitro* de diferenciación megacariocítica, las células Lin- cultivadas en IMDM- 20% FBS/PS/Gln suplementadas con TPO 100 ng/ml y IL1β 10 ng/ml durante 5 o 12 días. Posteriormente se recogieron y resuspendieron en 50 µl de PBA. Se añadieron la cantidad recomendada de los distintos anticuerpos unidos a fluorocromos (CD41, CD61a y CD42d) durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se lavaron con 3 mililitros de PBS y se centrifugaron en las condiciones que se indicaron anteriormente. Se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 200 µl para su adquisición en el citómetro de flujo FASCalibur.

Para los experimentos *in vitro* de células Lin- y LSK, las células después de las 24 horas de presencia de los virus, se lavaron dos veces con PBS y se cultivaron durante 5 o 12 días en medio IMDM suplementado al 20% con FBS, 100 unidades por mililitro de penicilina y de estreptomicina y 2 mM de L-glutamina e IL-3, SCF, TPO y FLT3 10 ng/ml durante 5 días. Posteriormente se recogieron y resuspendieron en 50 µl de PBA. Se añadieron la cantidad recomendada de los distintos anticuerpos unidos a fluorocromos (c-Kit, Sca-1) y el cóctel Lin+ unido a biotina durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se lavaron con 3 mililitros de PBS y resuspendieron en 50 µl de PBA. A continuación se añadió un anticuerpo unido anti biotina unido a fluorocromo durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se lavaron con 3 mililitros de PBS y se centrifugaron en las condiciones que se indicaron anteriormente. Se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 200 µl para su adquisición en el citómetro de flujo FASCalibur.

#### 3.6.3.1.1 *Medida de los diferentes linajes sanguíneos en ratones*

Después de ocho semanas desde el trasplante, los ratones se sacrificaron para llevar a cabo el análisis de los diferentes órganos como se indica en el 3.6.2 marcándose posteriormente las células del siguiente modo:

En primer lugar se sometieron a un bloqueo con FcR bloking (Miltenyi Biotech) que en realidad es el anticuerpo CD16/32 sin ningún fluorocromo durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Este paso es recomendando por la mayoría de las casas comerciales y evita la aparición de uniones inespecíficas de los anticuerpos que se van a utilizar después. Siempre que fue posible se marcaron un millón de células utilizando la

cantidad de anticuerpo que indicaba la casa comercial pertinente. Los anticuerpos que se utilizaron fueron los siguientes.

**Megacariocitos:** CD41+, CD61+ y CD4d+ en médula ósea.

**Línea eritroide:** Anti-Ter119+ en médula ósea, sangre periférica y bazo.

**Granulocitos:** CD11+, Anti-GR1+ en médula ósea, sangre periférica y bazo.

**Macrófagos:** CD11+, Anti-GR1- en médula ósea, sangre periférica y bazo.

**Células T:** CD3+ en timo y sangre periférica; **Linfocitos T dobles negativos (DN):** CD3+, CD4- y CD8- en timo; **Linfocitos T dobles positivos (DP):** CD3+, CD4+ y CD8+ en timo; **Linfocitos T CD4:** CD3+, CD4+ y CD8- en timo, **Linfocitos T CD8:** CD3+, CD4- y CD8+ en timo. Maduración de linfocitos T: **DN1** CD3+, CD4-, CD8- CD25- y CD44+ en timo; **DN2** CD3+, CD4-, CD8- CD25+ y CD44+ en timo; **DN3** CD3+, CD4-, CD8- CD25+ y CD44- en timo y **DN4** CD3+, CD4-, CD8- CD25- y CD44- en timo.

**Células B:** CD19+ y/o anti-B220+ en bazo, sangre periférica y médula ósea. Maduración de los linfocitos B: **Células ProB:** anti-B220+, CD43+, anti-IgM- en médula ósea, **células Pre-B:** anti-B220+, CD43-, anti-IgM- en médula Osea; **Células B inmaduras** anti-B220+, CD43- anti-IgM+ en médula ósea.

Progenitores de ratón todos en médula ósea: **LSK:** Lin-, Sca-1+, c-kit+; **LT-HSC:** LSK, CD34-, Flt3-; **ST-HSC:** LSK, CD34+, Flt3-; **LMPPs:** LSK, CD34+, Flt3+; **MEP:** Lin-, Sca1-, cKit+, IL-7R $\alpha$ -, CD34-, CD16/32-; **GMP:** Lin-, Sca1-, cKit+, IL-7R $\alpha$ -, CD34+, CD16/32+; **CMP:** Lin-, Sca1-, cKit+, CD34+, CD16/32-; **CLP:** Lin-, Sca1<sup>bajo</sup>, cKit<sup>bajo</sup>, IL-7R $\alpha$  +.

Celulas **Lin-** y **LSK** después del tratamiento con **colagenáasa/dispása:** se utilizó el mismo marcaje que para los experimentos *in vitro* de células Lin- y LSK. Además como control de células hematopoyéticas se introdujo el marcador CD45.

Todos los anticuerpos se marcaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con las células resuspendidas en 50  $\mu$ l PBA. Posteriormente se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en un volumen aproximado de 200  $\mu$ l para su adquisición en el citómetro.

Cuando los fluorocromos fueron hasta 4, 3 de anticuerpos y además la GFP las células se adquirieron en el FASCalibur, un citómetro que permite analizar cuatro fluorocromos diferentes. Cuando fueron más de cuatro, hasta 8 en algunas poblaciones se utilizó el FASCaria que permite determinar hasta 12 fluorocromos.

### 3.6.3.2 Análisis de ciclo celular.

#### 3.6.3.2.1 *Análisis de la ploidía.*

Se utilizaron células HEL o células Lin-. Las primeras fueron tratadas durante 7 días con PMA 20 nm, cada dos días el medio fue remplazado por medio fresco. Las células Lin- fueron cultivadas durante 12 días en IDMD-20%FBS/PS/Gln suplementadas con TPO 100  $\mu$ M y IL1 $\beta$  10  $\mu$ M. El día 12 las células fueron recogidas se fijaron con una solución de paraformaldeído en PBS al 2,5 % durante 30 minutos en hielo. Esto hace que las células conserven la emisión de GFP. Después de los cuales las células fueron lavadas con PBS 1X, centrifugadas a 1000 xg durante 5 minutos y resuspendidas en 100  $\mu$ L de etanol al 70%, en el que se fijaron durante 1 hora a 4°C. Posteriormente las células se volvieron a lavar con PBS 1X , se centrifugaron a 1000 xg durante 5 minutos y se añadió a cada muestra 500  $\mu$ L de la solución de Ioduro de propidio (IP) ( 25  $\mu$ L de IP 1 mg/mL , 2,5  $\mu$ L de Ribonucleasa A 0,1mg/mL y 472,5  $\mu$ L de PBS), con la que se incubaron las células 45 minutos a 37 °C en oscuridad (Es necesario añadir a la solución de IP ribonucleasa A ya que el IP se une por igual al ADN y al ARN). Se lavaron las células una vez más y se resuspendieron en 350  $\mu$ L de PBS 1X para ser adquiridas en el citómetro FACSCalibur.

#### 3.6.3.2.2 *Tinción con 7AAD/Pironina Y*

Las células se marcaron con los anticuerpos correspondientes y posteriormente se fijaron con paraformaldeído 2,5 %. Después de lavarlas con PBS se incubaron en una solución NASS que contenía saponina al 0,02% que permeabilizaron las células y 7AAD 10  $\mu$ g/ml durante 20 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad. A continuación se lavaron con PBS y se resuspendieron en 500  $\mu$ l de solución NASS con 10  $\mu$ g/ml de actinomicina D durante 5 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Después se introdujeron 5  $\mu$ l de Pironina Y a una concentración de 0,1 mg/ml. Se mantuvieron en hielo al menos 10 minutos protegidos de la luz y se lavaron resuspendiéndolos en PBS justo antes de introducirlos en el citómetro (FASaria). Modificado de (Schmid et al., 2000)

#### 3.6.3.2.3 *Tinción con Ki67*

Este anticuerpo reconoce una proteína intracelular que sólo se expresa cuando la célula se encuentra en ciclo celular. Después de marcar las células con los anticuerpos de superficie se fijaron con una solución de paraformaldeído al 2,5% en PBS en las mismas condiciones ya descritas. Después, se lavaron las células y se permeabilizaron con una solución de PBS con saponina al 0,02% durante 10 minutos en hielo. A continuación se lavaron las células y se marcaron con el anticuerpo Ki67 durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

Después de lavarlas una vez más con PBS se resuspendieron en unos 200  $\mu$ l para su adquisición en el citómetro de flujo (FASCaria).

#### **3.6.4 Ensayos de formación de colonias formadoras de megacariocitos.**

30000 células Lin- después de ser extraídas como se indica en el apartado 3.6.2 se infectaron con los virus correspondientes como se indica en el apartado 3.6.13 se sembraron en medio 1 ml de medio de metilcelulosa (HSC-CFU) suplementado con TPO 100 ng/ml y IL1 $\beta$  10 ng/ml. Se incubaron las placas durante 14 días a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. A día 14, se contaron el número de colonias (CFUs) mediante la observación a microscopía óptica de fluorescencia con el filtro que permiten observar la fluorescencia verde con el objetivo 4X.

#### **3.6.5 Extractos celulares**

Los extractos celulares se obtuvieron resuspendiendo las células en tampón lisis MLB con inhibidores de proteasas comerciales (Sigma-Aldrich) en hielo durante 15 minutos, lo que permite la rotura y solubilización de las membranas celulares. Estos extractos se centrifugaron durante 15 minutos a 17.000 x g, separándose el sobrenadante para su uso posterior.

#### **3.6.6 Valoración de proteínas**

Las proteínas totales se valoraron según el método de Bradford (1976). El patrón utilizado fue seroalbúmina bovina (BSA) a distintas concentraciones. Para realizar las mediciones de la absorbancia de las muestras se empleó un lector de placas de ELISA Multiskan FC de "Thermo Scientific".

#### **3.6.7 Inmunoprecipitación**

La inmunoprecipitación se llevó a cabo con la misma cantidad de proteínas totales en cada muestra. Cuando fue posible se inmunoprecipitó una cantidad de proteína total de 1 mg. Se realizó un prelavado de la muestra con 5  $\mu$ l de proteína G agarosa, con lo que se consigue que lo que se une inespecíficamente a la muestra se retire de la muestra. A continuación el sobrenadante se incubó con 4  $\mu$ l del anticuerpo de interés durante 3 horas a 4 °C y en agitación suave. A continuación se añadieron 20  $\mu$ l de proteína g agarosa resuspendida en tampón de lisis durante 1 hora en las mismas condiciones que la incubación con el anticuerpo. Posteriormente se lavaron las muestras tres veces para proceder a resuspenderlas en el tampón adecuado para cargarlas en un gel de acrilamida, medir la actividad PTPásica o medir la oxidación de proteínas.

#### **3.6.8 Medida de la actividad PTPásica**

Tanto para la medida de la actividad PTPásica como para la medida de la oxidación de las PTPs se degasificaron los tampones que se utilizaron para eliminar la mayor cantidad de aire (oxígeno) en el proceso, que pudiera entorpecer las medidas. Después de lisar las

células con un tampón de lisis MLB e inmunoprecipitar la proteína de interés en el mismo tampón con 4 µl de anticuerpo, las proteínas se lavaron 2 veces con el tampón de lisis MLB sin glicerol y una vez más con el tampón de Actividad PTP. Posteriormente se resuspendieron en 200 µl de tampón de Actividad PTP con pNPP 50mM (bis-para-Nitrofenilfosfato). Se incubaron a 37 °C con agitación hasta observar la aparición de color amarillo, unas dos horas aproximadamente. A continuación, se centrifugaron las muestras a 1000 x g durante 5 minutos para sedimentar la proteína G. Se tomó la mediada de la absorbancia del sobrenadante que se midió a 495 nm.

### 3.6.9 Medida de la oxidación de PTP.

El método usado está modificado de (Ostman et al., 2011). Después de lisar las células con el tampón de lisis de oxidación e inmunoprecipitar la proteína de interés en el mismo tampón con 4 µl de anticuerpo, las proteínas se incuban con Ácido Iodoacético 50 mM (Figura M.4A), esto protege a los grupos SH reducidos de las cisteínas de la oxidación ambiental. A continuación se lavaron 3 veces con Hepes 20 mM y se incubó con **threo-1,4-Dimercapto-2,3-butanediol** (DTT) 100mM para reducir las cisteínas oxidadas (Figura M.4B). Se vuelven a lavar y se tratan con pervanadato 100µM lo que hace que las cisteínas que se habían reducido en el paso anterior se oxiden hasta una forma que reconoce el anticuerpo (Figura M.4C). Posteriormente se realiza un Western blot utilizando el citado anticuerpo (Figura M.4D).

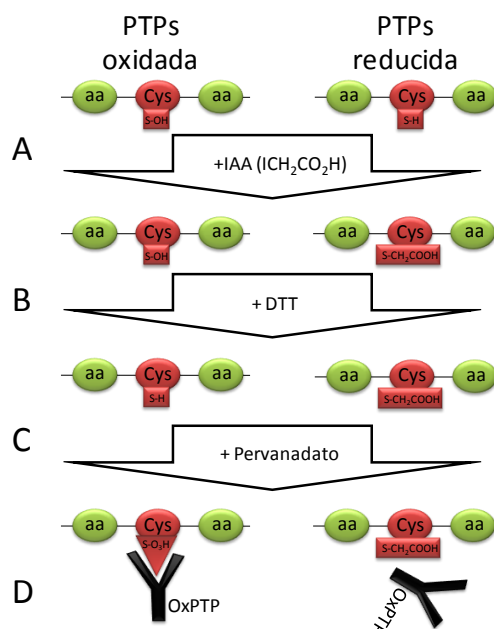


Figura M.4. Esquema representativo de los pasos necesarios para detectar la oxidación de las PTPs.



### **3.6.10 Western blot**

#### 3.6.10.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

Los extractos protéicos o las inmunoprecipitaciones, procedentes de la línea celular, se sometieron a electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) en condiciones reductoras siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras se incubaron a 100° C durante 5 minutos en tampón de carga [Tris-ClH 125 mM, que contenía SDS al 2% (p/v), glicerol al 5% (v/v), azul de bromofenol 0,003% (p/v) y  $\beta$ -mercaptoetanol al 1% (v/v) pH 6,8]. En cada carril del gel se depositó la misma en cantidad de proteínas. Las electroforesis se efectuaron en una disolución amortiguadora (tampón de electroforesis) de Tris-ClH 25 mM, con SDS al 0,4% (p/v), pH 6,8, aplicándose un voltaje constante de 125 V a temperatura ambiente.

#### 3.6.10.2 Transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF.

Tras la electroforesis se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF. Para ello se empleó un sistema de transferencia húmeda utilizando una disolución amortiguadora (tampón de transferencia). La transferencia se efectuó aplicando un amperaje constante de 400 mA, durante 4 horas a 4° C.

#### 3.6.10.3 Incubación de la membrana con los anticuerpos.

Una vez realizada la transferencia, se bloqueó la membrana mediante inmersión de ésta en una solución de bloqueo que contenía leche desnatada al 5% (p/v) o Seroalbumina bovina (BSA) al 2%, (no debe utilizarse leche cuando se emplean anticuerpos frente a formas fosforiladas ya que la leche contiene numerosas proteínas fosforiladas que causan reacción cruzada) en TBS (Tris-ClH 10 mM, ClNa 100 mM y Tween 20 al 0,05% (v/v), pH 7,5), durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario convenientemente diluido durante toda la noche a 4°C y con agitación constante. Los anticuerpos fueron diluidos en la disolución de bloqueo en las proporciones (v/v) que se indican en la tabla M.1. Después de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó con TBS (tres veces, durante 10 minutos cada vez) y se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario, que está conjugado a la peroxidasa de rábano, diluido en la disolución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante, según la concentración que aparece en la tabla M.1.

Proteína	Anticuerpo 1º	Anticuerpo 2º	Sol. Bloqueo
<b>β-Tubulina</b>	1:2000	Anti- mouse 1:10.000	Leche 5%
<b>GAPDH</b>	1:2000	Anti- mouse 1:10.000	Leche 5%
<b>β-Catenina</b>	1:1000	Anti- rabbit 1:25.000	Leche 5%
<b>PTPN13</b>	(N13) 1:1000	Anti- rabbit 1:25.000	Leche 5%
<b>pSHP1</b>	1:1000	Anti- mouse 1:10.000	BSA 2%
<b>SHP1</b>	(C-19) 1:1000	Anti- rabbit 1:20.000	Leche 5%
<b>pSHP2</b>	1:1000	Anti- rabbit 1:20.000	BSA 2%
<b>SHP2</b>	1:1000	Anti- rabbit 1:20.000	Leche 5%
<b>pErk 1/2</b>	(E-4) 1:3000	Anti- mouse 1:10.000	BSA 2%
<b>ERK 1/2</b>	(K-23) 1:5000	Anti- rabbit 1:20.000	Leche 5%
<b>pSTAT5</b>	(Y694) 1:2000	Anti- rabbit 1:20.000	BSA 2%
<b>STAT5</b>	(H-134) 1:2000	Anti- rabbit 1:20.000	Leche 5%
<b>OX-PTP</b>	1:500	Anti- mouse 1:10.000	Leche 5%

Tabla M.1. Nombre, dilucion y especie de los anticuerpos utilizados en la presente tesis doctoral.

#### 3.6.10.4 Detección.

Una vez incubada la membrana con los anticuerpos, se lavó de nuevo con TBS (tres veces, durante 10 minutos cada vez) y se sometió al revelado por el sistema de sustrato luminiscente para la peroxidasa de rábano mediante el kit comercial “ECL plus Western Blotting Detection System”, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El tiempo de exposición varió en función de la muestra y del anticuerpo primario utilizado. Tras la exposición la película se reveló en una máquina de revelado Medical X-ray Processor.

#### 3.6.10.5 Cuantificación.

Los resultados de las películas obtenidas por Western Blot fueron cuantificados mediante densitometría, haciendo pasar un haz de luz de longitud de onda de 580 nm sobre las bandas presentes, de manera que se registró la intensidad de señal de cada banda.

### **3.6.11 Clonajes**

#### 3.6.11.1 Diseño de oligos

Para reducir los niveles de las diferentes proteínas estudiadas en el presente trabajo se optó por la estrategia de introducir una secuencia de ARN de interferencia (shRNA; small hairpin RNA) en las células con la ayuda de un lentivirus modificados. Para diseñar los oligos

se siguió las instrucciones por la web Dharmacon RNA technologies y los criterios de diseño racional de ARN de interferencia descritos en (Reynolds et al., 2004).

Se diseñaron dos secuencias de shARN dirigidas contra el ARNm mensajeros (ARNm) escogiéndose para los ARNm humanos las siguientes, se muestran las secuencias sentido:

ARNi SHP1 1: 5' **GCAGGAGGTGAAGAACTTG** 3'

ARNi SHP1 2: 5' **GGAACAAATGCGTCCCATA** 3'

ARNi SHP2 1: 5' **GCTCATGACTATACGCTAA** 3'

ARNi SHP2 2: 5' **TTTTCTTGGAACACCATCC** 3'

ARNi  $\beta$ -Catenina 1: 5' **CCATGGAACCAGACAGAAA** 3'

ARNi  $\beta$ -Catenina 2: 5' **CCACTAATGTCCAGCGTTT** 3'

ARNi PTPN13 1: 5' **CCATGAAGATTCTGATAAA** 3'

ARNi PTPN13 2: 5' **TGGACGAGTTCTAGAATTA** 3'

Para los ARNm de ratón:

ARNi m $\beta$ -Catenina 1: 5' **GCACCATGCAGAATACAAA** 3'

ARNi m $\beta$ -Catenina 2: 5' **AGGACAAGCCACAGGATTA** 3'

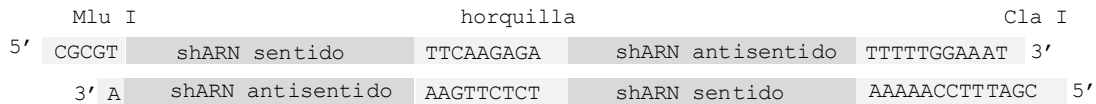
ARNi mPTPN13 1: 5' **CCATGAAGATTCTGATAAA** 3'

ARNi mPTPN13 2: 5' **CAAAGACGATTCCACTTAC** 3'

Como control se utilizó en todos los casos una secuencia dirigida al mensajero de la luciferasa de luciérnaga descrita en (Diaz-Hernandez et al., 2005).

ARNi Luc: 5' **CTGACGCGGAATACTTCGA** 3'

La secuencia elegida se integró en una secuencia de nucleótidos más grande en dos lugares, se integraron la tanto la secuencia elegida como su complementaria. Secuencia sentido y secuencia antisentido. Como resultado tendremos dos oligos que son complementarios entre sí de 63 y 61 nucleótidos respectivamente. Estos oligos se pidieron a una casa comercial (Figura M.1).



**Figura M.1. Esquema de la caja utilizada para clonar el shARN en el plasmido pLVTHM**

Como vemos en la figura M.1, el diseño hace que se formen al hibridar los oligos dos sitios de corte para las enzimas de restricción. Mlu I y Cla I. Estos sitios fueron aprovechados para introducir esta secuencia en el vector pLVTHM.

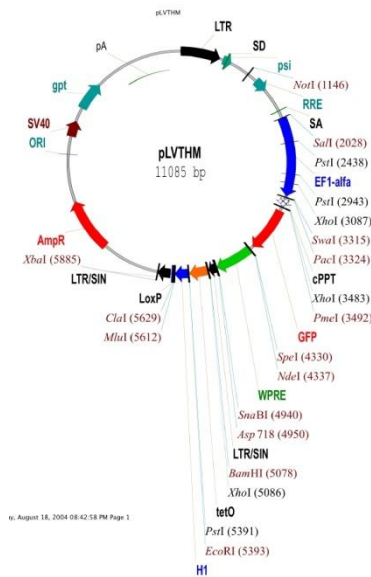
### 3.6.11.2 Preparación de los oligonucleótidos.

Los oligos se resuspendieron un volumen de agua apropiado para conseguir una concentración de 3 µg/µl y se procedió a su anillamiento. Para lo cual 1 µl de cada uno de los oligos, secuencia sentido y secuencia antisentido, se pusieron en 48 µl de tampón de anillamiento. Los tubos con la mezcla se introdujeron en un frasco de cristal cerrado y se incubó 5 minutos a 100 °C. Posteriormente se dejó enfriar hasta temperatura ambiente lentamente. Por último se realizó una incubación de 5 minutos en hielo. Con esto se consigue en un primer momento que las posibles estructuras secundarias que los oligos tuvieran se desnaturalicen. Y al enfriarse lentamente los oligos hibridaran entre sí por las partes complementarias.

Posteriormente, los oligos se fosforilaron para proporcionar el fosfato necesario en posición 5'. Así, la ligasa puede unir los dos extremos. Para ello, 2 µl de los oligos anillados del paso anterior se incubaron 30 minutos a 37 °C junto con 1 µl del tampón específico de esta enzima, 1 µl de T4 fosfonucleotido quinasa (10 unidades), 1 µl de ATP a una concentración de 10mM y 5 µl de agua. Posteriormente para inactivar la enzima se incubó la mezcla 10 minutos a 70 °C. Así quedó preparado el inserto para introducirlo en el vector.

### 3.6.11.3 Preparación del plásmido.

Además del inserto fue necesario preparar el vector en este caso el pLVTHM. Muy brevemente, el diseño del pLVTHM (diseñado y cedido amablemente por el Dr. Trono) hace que tenga un sitio de corte único para las enzimas Mlu I y Cla I bajo el control del promotor H1. (Figura M.2)



**Figura M.2. Mapa del plásmido pLVTHM.**

El promotor H1 es un promotor reconocido por la ARN polimerasa III de eucariotas. Esto permite que se forme la doble cadena de shRNA en la célula infectada. Además contiene el factor de elongación 1 $\alpha$  que dirige la expresión proteínica GFP con la que podemos distinguir y separar las células que son infectadas porque emiten fluorescencia verde. Por último, también lleva un gen de resistencia a ampicilina para poder seleccionar las colonias de bacteria transformadas con dicho plásmido.

### 3.6.11.3.1 Digestión del plásmido

Para preparar el plásmido en primer lugar se digirió este con Mlu I. Para ello 2  $\mu$ l de pLVTHM a una concentración de 1  $\mu$ g/  $\mu$ l se incubaron una hora a 37 °C junto con 23  $\mu$ l de agua, 3  $\mu$ l de tampón específico para la enzima utilizada proporcionado comercialmente y un 1  $\mu$ l de Mlu I (10 unidades). Después de esto se fenolizó la muestra para eliminar del plásmido digerido con Mlu I los restos de enzima y el tampón. Así se llevó a 100  $\mu$ l el volumen de reacción con agua, y se añadió un volumen de fenol/cloroformo y se agitó vigorosamente al vortex. Posteriormente se centrifugó durante 2 minutos a 17000 x g. La fracción acuosa se pasó a un tubo limpio y se repitió el proceso de nuevo. La nueva fracción acuosa se pasó a un tubo limpio y se incubó 30 minutos a -20 °C con 2,5 volúmenes de etanol y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5,2. A continuación se centrifugó 15 minutos a 4 °C y 17000 x g. Se retiró el sobrenadante y el sedimento se lavó con 500  $\mu$ l de etanol al 70%. Centrifugando 5 minutos en las condiciones anteriores. Se retiró el sobrenadante y el sedimento de DNA se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua. Posteriormente se cortó el vector con Cla I en las mismas condiciones descritas para Mlu I. Al finalizar este proceso se inactivó la enzima por calor durante 20 minutos a 70 °C.

#### 3.6.11.3.2 *Desfosforilación del plásmido.*

Si alguna de las moléculas del plásmido solo fue cortada por una enzima es fácil que esta re-circularice, por lo que para evitar esto se desfosforilaron los grupos fosfato presentes en 5' de los extremos del plásmido que habíamos digerido previamente. Para ello 30 µl del plásmido procedente de la segunda digestión se incubaron con 4 µl de tampón proporcionado por la casa comercial y 1 µl de fosfatasa alcalina T4 (1 unidad).

#### 3.6.11.3.3 *Purificación del plásmido*

Después de cortar y desfosforilar el vector se cargó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en tampón TAE (40 mM de Tris pH 8,5; EDTA 2 mM, ácido acético 20 mM). Después de resolver el gel durante una hora aproximadamente se cortó la banda correspondiente al tamaño del plasmido y se purificó siguiendo en protocolo proporcionado por el DNA EXTRACTION KIT de Fermentas.

#### 3.6.11.4 Inserción del olígo en el plásmido

Con estos procesos descritos en los apartados anteriores, conseguimos tener preparados el vector y el inserto correspondiente. Además con este diseño conseguimos que el vector tuviera extremos cohesivos complementarios con el inserto. De esta forma si alguna de las moléculas de vector aceptaba un inserto este solo se podía introducir en la dirección adecuada puesto que los extremos del vector no eran complementarios entre sí. Por lo tanto se procedió a la ligación. 2 µl de los oligos anillados y fosforilados, 1 µl del vector digerido con Mlu I y Cla I y desfosforilado, 1 µl de ligasa y 1 µl del tampón específico de la enzima se incubaron junto con 5 µl de agua a 16 °C 16 horas.

#### 3.6.11.5 Transformación del plásmido en bacteria por choque térmico

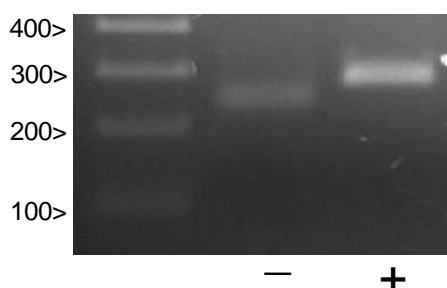
La mezcla de ligación se incubó durante 20 minutos en hielo junto con bacterias competentes, y posteriormente se dió un choque térmico para facilitar la entrada de las moléculas de DNA. A continuación se recuperaron las bacterias 2 minutos en hielo para bajar rápidamente la temperatura y 1 hora en medio LB sin antibióticos en agitación fuerte para conseguir una buena aireación a 37 °C. Después de este tiempo se sembraron estas bacterias en placas de LB-agar más ampicilina 0,1µg/µl se incubaron hasta el día siguiente a 37°C. Con esto se consiguió que solo crecieran las bacterias que contenían el gen de resistencia a ampicilina y por lo tanto las que habían integrado el pLVTHM.

### 3.6.11.6 Comprobación de las colonias que contenían el plásmido.

Para poder extraer el plásmido en cantidades suficientes como para poder manipularlo se sembraron algunas de las colonias obtenidas en la placa de LB-agar en 3 ml de medio LB con ampicilina 0,1 µg/µl a 37 °C hasta el día siguiente en agitación. Una forma rápida y sencilla de extraer el plásmido de la bacteria y comprobar que efectivamente contiene el inserto de interés es extraerlo mediante un tampón ayudado por un aumento de la temperatura a 100 °C.

Así 1 ml de medio con bacteria se centrifugo a 17000 x g durante 1 min. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200 µl de tampón STET y 50 de lisozima 5mg/ml durante dos minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se introdujeron en un baño a 100 °C durante 1 minuto y se pasaron a hielo durante otros 2 minutos. A continuación se centrifugaron durante 5 minutos a 17000 x g. Se formó un sedimento de aspecto mucilaginoso que se desechó con la ayuda de un palillo estéril. El sobrenadante acuoso se incubó con isopropanol durante 5 minutos en hielo. Se centrifugó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se retiró todo el sobrenadante dejando secar de isopropanol del sedimento. Una vez seco se resuspendió en 49 µl de tampón TE y 1 µl RNAsa 20 mg/ml y se incubó durante 30 minutos a 37 °C.

El plásmido así obtenido se digirió con enzimas de restricción para comprobar si contenía el inserto. Así 5 µl de plásmido se incubaron durante 2 horas a 37 °C junto con 0,5 µl de EcoRI y 0,5 µl de Cla I además de 2 µl de tampón Tango 10X (Fermentas) en el que son capaces de cortar las dos enzimas y 13 µl de agua. Como se puede ver en la figura M.2, Eco RI tiene un único sitio de corte en posición 5393 y Cla I también tiene un único sitio de corte en posición 5629. Por lo tanto este corte debe liberar una banda de 236 pb. Si hemos conseguido clonar el inserto ha esta banda hay que sumarle 64 pares de bases que componían nuestro inserto sumando un total de 300 pares de bases. Se cargaron 10 µl de digestión en un gel de agarosa y se dejó discurrir durante 1 hora y se seleccionaron las bacterias que liberaban una única banda de 300 pares de bases (Figura M.3).



**Figura M.3.** Ejemplo de plásmido que no han integrado el inserto correspondiente al ARN de interferencia (-), y plasmidos que si lo han hecho (+). Los números corresponden al tamaño del marcador de ADN.

Se eligió una de las colonias positiva y se creció durante 8 horas en 15 ml de LB con ampicilina 0,1 µg/µl a 37 °C y en agitación. Transcurrido dicho tiempo este cultivo se inoculó

en 500 ml de LB más ampicilina 0,1 µg/µl durante toda la noche en las mismas condiciones que el preinóculo.

Al día siguiente se procedió a extraer el DNA plasmídico del cultivo. Esto se realizó siguiendo las instrucciones de un kit de Maxipreparaciones. Posteriormente se digirió parte de este plásmido en las mismas condiciones explicadas en el punto anterior para comprobar que el plásmido seguía conteniendo el inserto. Por último, para asegurarnos completamente de que el plásmido contenía el inserto deseado en cada caso, se secuenciaron en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca.

### **3.6.12 Producción vírica**

#### **3.6.12.1 Transfección en células HEK 293t.**

Con el plásmido obtenido en la maxipreparación se transfectaron células HEK 293t para producir los lentivirus con los que infectar las células en estudio. Nuestro sistema de lentivirus utiliza tres vectores diferentes. Por un lado, utiliza el vector pLVTHM que ya hemos descrito. Además, necesita de otros dos plásmidos que codifican las proteínas necesarias para la cápside vírica. En concreto, el sistema de segunda generación utilizado en este trabajo utiliza psPAX2 que contiene la información necesaria para la formación estructura vírica y pMD2.G que se encarga de dirigir el correcto empaquetamiento del virus. Metodológicamente es necesario introducir los tres plásmidos en la célula. Para ello utilizamos la polietilenimina lineal (PEI, Mw 25.000 Da). Este compuesto condensa las moléculas de DNA en un entorno catiónico que se une al entrono aniónico de la membrana celular. Este complejo es internado en la célula vía endocitosis. Posteriormente este endosoma se degrada y el DNA viaja al núcleo donde dirigirá la producción del virus.

Para llevar a cabo la transfección se sembraron, 6 horas antes de la misma, unos 6 millones de células HEK 293t en placas de 60 cm<sup>2</sup>. Estas placas habían sido previamente recubiertas con colágeno 100 mg/ml para facilitar la adhesión de las células a la superficie de la placa, además el colágeno hace que las células se unan más fuertemente, con lo que se facilita el manejo posterior. Se incubaron a 37 °C y al 5% de CO<sub>2</sub>. Sembrando este número de células se consiguió que las placas en el momento de la transfección estuvieran entre el 85-95%, con este porcentaje de confluencia se consiguen los mejores rendimientos de producción vírica. Se preparó una mezcla de transfección que está formada por 1200 µl de NaCl 150 mM, 6 µg del plásmido pLVTHM, 5 µg del psPAX2 y 4,5 µg del pMD2.G junto con 60 µl de PEI, esta mezcla se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Durante estos 20 minutos el medio de las placas con las células HEK 293T se cambió por 9,6 ml de medio DMEN fresco. Transcurrida la incubación se añadió la mezcla de transfección por toda la superficie de la placa. Esta mezcla se dejó durante 16 horas retirándose entonces el



medio de la placa y añadiendo nuevamente 9 ml de medio fresco. 24 horas después se recogió este medio que ya contenía partículas víricas y se añadieron otros 9 ml de medio que se recogieron otras 24 horas después. En estos 18 ml se encontraban los lentivirus producidos en el proceso.

#### 3.6.12.2 Aumento de la concentración de partículas víricas por ultracentrifugación.

Para concentrar los virus se centrifugaron a 56000 x g durante dos horas y a 16 °C. El sobrenadante se desechó y se añadieron 200 µl de medio. El medio en el que se resuspendieron los virus fue el mismo en el que se transducirían posteriormente las células. Véase apartado de cultivos celulares 3.6.1. Estos 200 µl se dejaron en el tubo de centrifugación 4 horas a 4°C para facilitar la resuspensión de todos los virus que formaron el sedimento en el fondo del tubo y que se encontraban fuertemente fijados al fondo por la alta velocidad de centrifugación. A las cuatro horas se resuspendieron con la ayuda de una pipeta y se guardaron a -80 °C para su posterior uso. Una pequeña alícuota de estos virus fue utilizada para conocer la cantidad de virus producida.

#### 3.6.12.3 Titulación vírica.

Para conocer la cantidad de virus por mililitro, título vírico, 80000 células HEK 293t por pocillo fueron sembradas en una placa de 24 pocillos (aproximadamente 1,9 cm<sup>2</sup> de superficie) 24 horas antes. La placa se recubrió con colágeno en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Para cada muestra se sembraron 4 pocillos, donde se pusieron 0,025; 0,05; 0,1 y 0,5 µl de concentrado vírico. Además se contaron las células de un pocillo para saber cuántas células había en el momento de la infección. Este número de células fue el que se utilizó para realizar los cálculos. También se añadió polibreno a una concentración final de 8 µg/ml. La placa se envolvió en film transparente y se centrifugó durante 90 minutos a 1800 x g a 32°C para facilitar la infección. Posteriormente se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 16 horas. Transcurrido este tiempo se retiró el medio de cultivo y se añadió medio fresco. Después de 48 horas de incubación en las mismas condiciones se midió el porcentaje de células GFP positivas mediante análisis en citómetro de flujo.

Todo este proceso de transfección puede ser seguido gracias a la expresión de la GFP mediante microscopía de fluorescencia. La GFP también se expresa en las células que son infectadas por estos virus.

El cálculo del número de virus, título vírico, es un cálculo teórico que se realiza con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{unidades transformantes}}{\text{ml}} = \frac{\text{número de células contadas} * \text{porcentaje de células GFP} + 1000}{\frac{100}{\text{µl de sobrenadante vírico añadido}}}$$

De los cuatro números obtenidos, uno por cada cantidad de virus añadido, se asumió como resultado de la titulación el más alto, ya que teóricamente, es en el cual una célula es infectada por una única partícula vírica.

### **3.6.13 Transducción de partículas víricas en los diferentes linajes de células estudiados.**

La MOI (multiplicidad de infección, ratio entre las partículas víricas y el número de células que infectan) fue el siguiente:

En células HEL se usó una MOI de 50 consiguiendo infecciones del 95%. Las células se sembraron 16 horas antes de inocular los virus en medio GSM con 100 unidades por mililitro de penicilina y de estreptomicina libre se suero fetal bobino.

En células K562 se usó una MOI de 25, que fue suficiente para conseguir infecciones de más del 97%. Las células se sembraron 16 horas antes de inocular los virus en medio RPMI 1640 suplementado con 100 unidades por mililitro de penicilina y de estreptomicina y 1% de FBS.

60000 células HEL o K562 se pusieron en un pocillo de una placa de 96 pocillos con la cantidad correspondiente de virus en un volumen final de 200 µl de medio y se centrifugaron durante 90 minutos a 32 °C a 1000 x g. Posteriormente se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> después se lavaron dos veces con PBS y se siguieron cultivando en las mismas condiciones explicadas en el apartado de cultivos celulares.

En células Lin- se uso una MOI de 150 consiguiéndose un porcentaje de células infectadas de entre el 20 y 30 %. 100000 células Lin- se sembraron en un pocillo de una placa de 96 pocillos en IMDM suplementado al 20% con FBS, 100 unidades por mililitro de penicilina y de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina y IL-3, SCF, TPO y FLT3 10 ng/ml. Se añadieron los virus y se centrifugaron en las mismas condiciones que las líneas celulares. Se incubaron 24 horas 37 °C y con atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo se procedió a utilizarse experimentalmente.

### **3.6.14 Trasplante de células de la médula ósea en ratones.**

Las células Lin- procesadas como se explica en el epígrafe anterior se trasplantaron inyectándolas a través de una aguja de 27G en la vena de la cola de ratones C57BL/6. Estos ratones fueron irradiados letalmente, gracias a la plataforma Nucleus, 6 y 4 horas antes del pinchazo con una dosis de 5 Gy emitidos por una fuente de Cesio en un irradiador Gammacell 1000 Ellite.

Se introdujeron 300000 células por ratón. Los ratones se estabularon en condiciones estándar ya descritas anteriormente y se controlaron el peso y el aspecto físico cada 2 días hasta el momento de sacrificarlos. Durante las primeras dos semanas después de la irradiación se trataron con Enrofloxacino en agua de bebida a una concentración final de 100 µg/ml. En el trasplante secundario se introdujeron 3000000 de células de médula ósea, donde se habían lisado los eritrocitos, por raton. Estas células procedían de un ratón donante que había sido trasplantado 8 semanas antes.

### **3.6.15 Experimentos de adhesión en células HEL.**

Los pocillos de una placa de 96 pocillos se recubrieron de fibronectina 20 µg/ml o con colágeno 100 µg/ml durante 16 horas a 4°C. Posteriormente se aspiraron y se lavaron los pocillos con PBS. Se sembraron 200 µl de células HEL a una concentración de  $7 \times 10^5$  células/ml. Se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 horas y a continuación se retiró el medio y se lavaron 3 veces con PBS para arrastrar todas las células que no estuvieran adheridas. La proporción de células adheridas se analizó mediante el ensayo del MTT. Para ello se realizó un MTT en estos pocillos y en otros que no se habían recubierto con fibronectina ni colágeno, ni se habían aspirado, para tomar estos pocillos como número inicial de células sembradas en cada pocillo.

#### 3.6.15.1 Ensayo del MTT

El MTT es una sal de tetrazolio de color amarillo, que es convertida por las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas en cristales de formazán de color azul oscuro-violeta. Después de la solubilización de los cristales de MTT en DMSO, se obtiene un medio de color violeta, cuya mayor o menor absorbancia a 570 nm se relaciona directamente con el número de células vivas presentes en el cultivo.

Las células se lavaron con PBS previa centrifugación para sedimentarlas y se resuspendieron en 100 µL de la solución de MTT, en la cual se incubaron durante 75 minutos a 37 °C. Posteriormente las células se lavaron de nuevo con PBS y se resuspendieron en 200 µL de DMSO para solubilizar el MTT y poder medir la absorbancia de las muestras a 570 nm.

### **3.6.16 Expresión génica por PCR a tiempo real (RT-qPCR).**

#### 3.6.16.1 Extracción de ARN

El ARN total de las células se obtuvo a partir de muestras celulares. Se empleó el reactivo “TRI reagent” de SIGMA, siguiendo las instrucciones de la casa comercial para la extracción, a grandes rasgos:  $7 \times 10^6$  células se resuspendieron en 1 ml de TRI reagent, par lisarlas. Se añadieron 0,2 ml de cloroformo. Posteriormente, se centrifugó a  $12.000 \times g$  durante 15 minutos a 4°C. Tras la centrifugación la fase acuosa superior se transfirió a un tubo limpio y se

añadieron 0,5 ml de isopropanol. Se volvieron a centrifugar a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C para precipitar el ARN. Y este ARN se lavo con etanol al 75%. Para la extracción del ARN de las células provenientes de la separación de células GFP+ del bazo de ratones C56BL/6 se utilizó el Kit ARN spin (GE Healthcare Limited) siguiendo sus instrucciones paso a paso. La concentración de ARN se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro GeneQuant pro RNA/DNA Calculator. La integridad del ARN se comprobó corriendo 1 µg de ARN en geles de agarosa.

#### 3.6.16.2 Síntesis de ADN copia (ADNc) ó retrotranscripción

Se llevó a cabo a partir del ARN total obtenido tal y como se describe anteriormente. Siguiendo las instrucciones de la casa comercial, 5 µg de ARN se incubaron con 2 µl de oligos 0,25 mM a 65 °C durante 10 minutos. A continuación se añadió 4 µl del tampón de reacción comercial de la retrotranscriptasa, 2 µl de dNTPs 10 mM, 20U inhibidor de ribonucleasa y 2 µl de DTT a la concentración proporcionada por él fabricante. Se pre-incubó la mezcla a 42°C durante 5 minutos, y finalmente se añadieron 200U de la retrotranscriptasa (SuperScript® II Reverse Transcriptase). Se dejó transcurrir la reacción durante 50 minutos a 42°C.

#### 3.6.16.3 PCR cuantitativa ó a tiempo real (RT-qPCR)

El parámetro que caracteriza las reacciones de RT-qPCR es el denominado Ciclo Umbral o Ct (del inglés “cycle threshold”), que se define como el punto en el tiempo (el ciclo de PCR) donde se detecta por primera vez la amplificación de una diana específica de ADN.

La mezcla de reacción se realizó para un volumen final de 10 µL, y contenía: 0,1 µL de cada oligonucleótido (sentido y antisentido) diseñado frente a cada diana a 10 mM; 5 µL de PCR Master MIX (“Power SYBR® Green”, que contiene ampliTaq Gold DNA polimerasa LD, dNTPs, y SYBR® Green I dye); 2 µL de la dilución de ADNc muestra (varía dependiendo del gen de interés y fue necesario optimizarla) y 2,8 µL de agua ultrapura estéril. Todas las reacciones se hicieron por duplicado o triplicado y con un control negativo de la muestra. Para poder relativizar entre las distintas muestras se llevo un control endógeno que en nuestro caso fue la actina humana o de ratón.

El programa de amplificación fue el siguiente: Fase de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos. Los ciclos de amplificación fueron 40 en la que la temperatura de anillamiento fue de 60 °C 30 segundos y la de desnaturalización de 95 °C durante 15 segundos. A continuación se introdujo en una última etapa una curva de Melt. En la que la temperatura aumenta de los 60 a los 95 °C de forma progresiva y suave.

### 3.6.16.3.1 *Diseño de los oligos*

El diseño de los oligos se realizó de forma cuidadosa para evitar que se produjeran amplificaciones inespecíficas y que estos fueran lo más eficientes posibles. Se tomaron las siguientes precauciones.

1 El amplicon fue siempre menor de 200 pares de bases para mejorar la eficiencia de la reacción.

2 El punto de hibridación se escogió de tal forma que el oligo sentido o antisentido estuviera posicionado en dos exones distintos del ARNm sin procesar. O que entre las posiciones entre las que hibridan hubiese un intrón mayor a una kilobase. De esta forma evitamos las amplificaciones por contaminación por ADN genómico ya que; o uno de los oligos solo hibrida con la secuencia del mensajero, o existe en el caso de que hibridara con el genómico una secuencia interna tal que la polimerasa no puede replicarla por falta de tiempo. Recordemos que la polimerasa debe efectuar su trabajo en el tiempo que la temperatura va desde los 60 °C donde los oligos hibridan a los 95 °C donde se produce la desnaturalización de la doble hélice que se acaba de formar porque no hemos introducido fase de polimerización a 72 °C, por ello el tiempo de polimerización solo dura unos segundos.

### 3.6.16.3.2 *Oligos real time*

Las secuencias de los oligos y los tamaños de producto teórico resultante fueron los siguientes. La m delante del gen significa que la secuencia es válida para ratón (del inglés, mouse)

**mPTPN13 186 pb**

Sentido 5' CACATCAGGAACAGCAACTG 3' Antisentido 5' TGAAGTGGAGCTTCTTCCTG-3';

**mβ-CATENINA 197 pb**

Sentido 5' AGAGTGCTGAAGGTGCTGTC 3' Antisentido 5' TGCACTAGAGTCCCAAGGAG-3'.

**mACTINA 100 pb**

Sentido 5' CAGCCTTCCTTCTTGGGTAT 3' Antisentido 5' TGGCATAGAGGTCTTTACGG-3';

**PTPN13 186 pb**

Sentido 5' AGTAAGCCTAGCTGATCCTG 3' Antisentido 5' TGGATCTTTTCAACATCTGA-3';

**β-CATENINA 179 pb**

Sentido 5' TTGGTTCACCAGTGGATTCT 3' Antisentido 5' AATTTGAAGGCAGTCTGTGCG-3'.

**ITGA4 118 pb**

Sentido 5' GCATACAGGTGTCCAGCAGA 3' Antisentido 5' TGAGGACCAAGGTGGTAAGC 3'

**ITGA5 108 pb**

Sentido 5' AGTTGCATTTCCGAGTCTGG 3' Antisentido 5' GATTCGGTAGGGCATCTTCA 3'

**ITGA11 111 pb**

Sentido 5' GTTCTTCGGCTACGCAGTTC 3' Antisentido 5' TAAACACAGCCCCAGGAGAC 3'

**ITGAL** 116 pb

Sentido 5' AATGACCTTGCAACAGACC 3' Antisentido 5' TCTGGCGGAAGAGGTAACAC 3'

**CDH1** 118 pb

Sentido 5' GAACGCATTGCCACATACAC 3' Antisentido 5' ATTCGGGCTTGTGTCATTC 3'

**CDH5** 152 pb

Sentido 5' GCCAGGTATGAGATCGTGGT 3' Antisentido 5' GTGTCTTCAGGCACGACAAA 3'

**CDH12** 139 pb

Sentido 5' GGAGATGGGGGAAATTTGTT 3' Antisentido 5' GGTC AAGGTGAAGGTTGGAA 3'

**CDH18** 147 pb

Antisentido 5' AGTTGGAGGGCTTTCAGGAT 3' Antisentido 5' TTTGCCTTGATTTTCCCAAC 3'

**NCAM2** 136 pb

Sentido 5' TGGACCATGGGGTATGAAGT 3' Antisentido 5' CTCCAAGCCCAAGACCATTA 3'

**RELINA** 145 pb

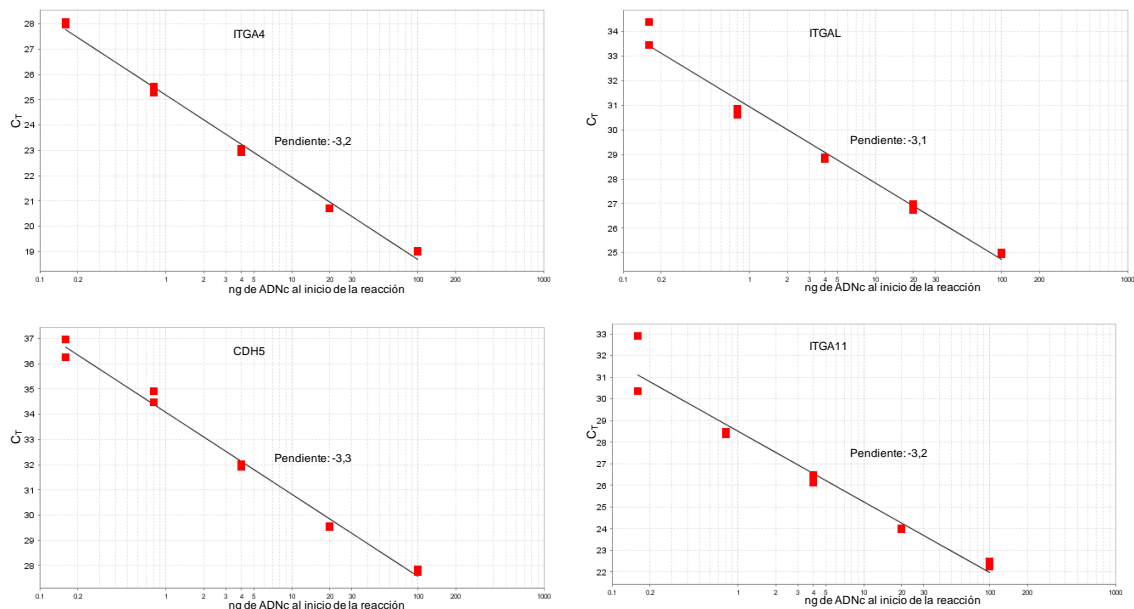
Sentido 5' CCACAACCAACCTCAGTTTC -3'; Antisentido 5' TCTGTTGGAGCTCCTTGTTTC -3'.

**ACTINA** 110 pb

Sentido 5' CACCACACCTTCTACAATGA3' Antisentido 5' ACATGATCTGGGTCATCTTC-3'

3.6.16.3.3 Validación de los oligos

Se realizaron rectas patrón para comprobar la eficiencia de los oligos y que los de el gen problema y los de la actina (control interno) coincidieran en la medida de lo posible. Figura R.5.

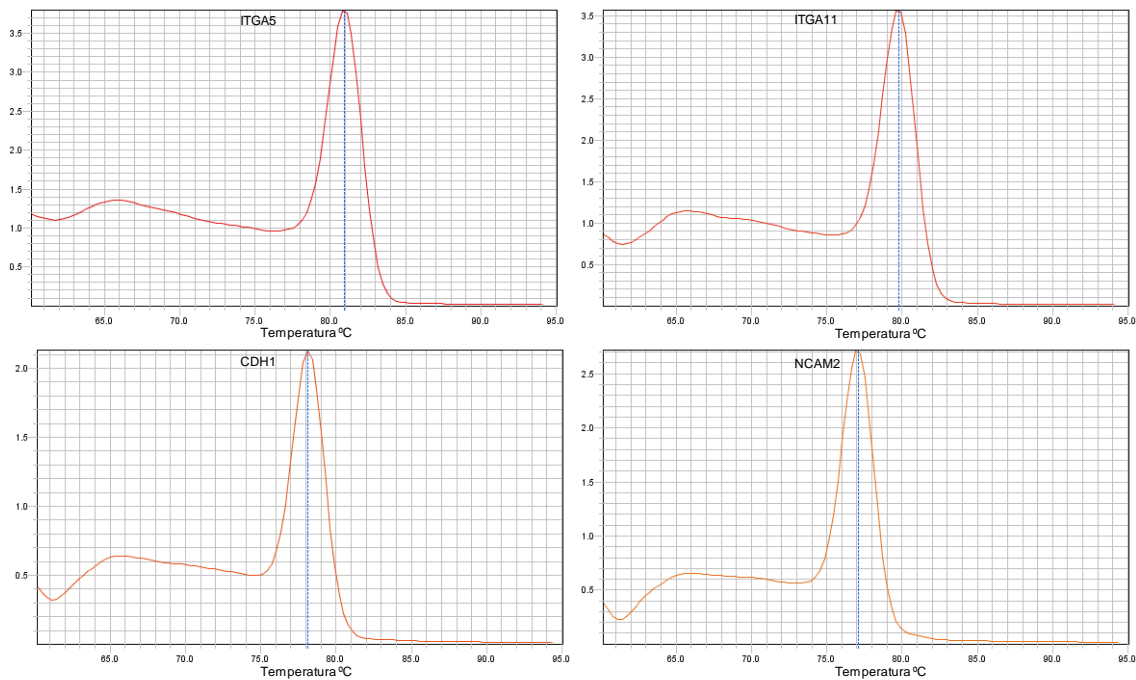


Figura

M.5. Ejemplos de la pendiente obtenida en la preparación de algunas de las RT-qPCR. Como se puede ver la pendiente obtenida se aproxima a la teorica de -3,2.

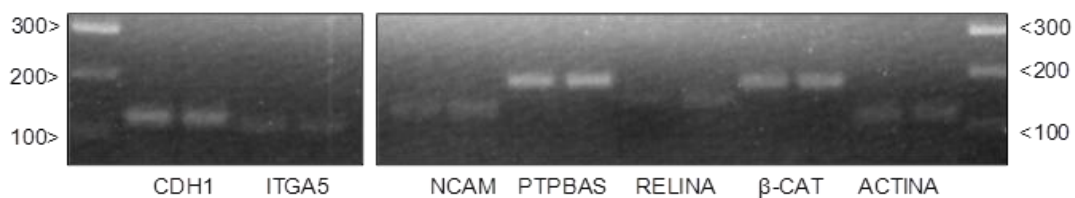
Cuando la pendiente de esta recta en la que se representa el ADNc de partida y el ciclo umbral ( $C_T$ ) es de -3,2 significa que en cada ciclo de PCR se duplica el ADN ya que pasan 3,2 ciclos hasta que obtenemos 10 veces más de ADN como teóricamente debe de ser, como se puede ver en estos ejemplos, la pendiente siempre estuvo muy próxima a ese valor teórico de -3,2.

Además se comprobó que las curvas de Melt formaran en la derivada un solo pico, como deben de formar cuando el producto amplificado es uno solamente. Figura M.6.



**Figura M.6. Ejemplos de la derivada de la curva de Melt obtenida en algunas de las RT-qPCR.** Como se puede ver los amplicones solo presentaban un pico.

Para terminar de comprobar que el tamaño amplificado era el correcto se corrieron en un gel de agarosa los productos de la PCR y comprobar así que el tamaño teórico se correspondía con la realidad. Figura M.7.



**Figura M.7. Ejemplos de los amplicones obtenidos en algunas de las RT-qPCR.** Los números corresponden al tamaño del marcador de ADN. Se cargaron dos carriles con la mismo producto de PCR.

### 3.6.17 Análisis estadístico.

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando la t de Student.





## **Resultados y discusión**

---



## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

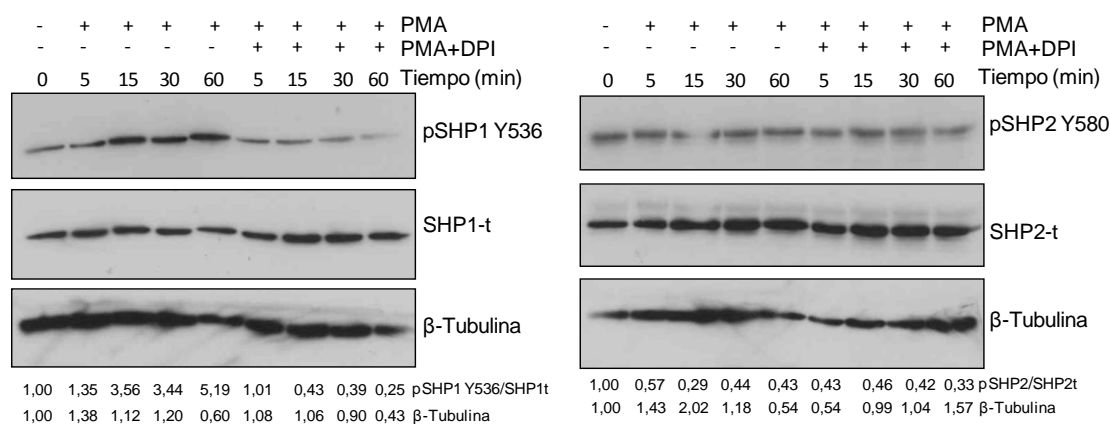
Como hemos comentado durante la introducción, los niveles de fosfotirosina en la célula cambian durante la señalización que desencadena la unión de numerosas citoquinas a sus receptores. Las proteína tirosina fosfatasas se encargan de retirar los grupos fosfato de las proteínas fosforiladas en tirosina. Dos de estas proteínas, estudiadas recientemente en plaquetas y megacariocitos, son SHP1 y SHP2 (Mazharian et al., 2013; Huang et al., 2012). Además, en nuestro laboratorio, también poseíamos algunos datos con respecto a la posible actividad de diferentes fosfatasas en la diferenciación megacariocítica en líneas celulares eritroleucémicas. Por ejemplo, conocíamos que al inicio de la diferenciación megacariocítica se produce una bajada de la actividad PTPásica total. Además, el pervanadato, un inhibidor de PTPs, produce un fenotipo muy similar al que produce el PMA, el agente que normalmente usamos para inducir la diferenciación megacariocítica en las células de cultivo. Estos datos sugieren que para que se produzca la diferenciación megacariocítica es necesaria una inhibición de la actividad PTPásica a tiempos cortos. En este sentido, las ROS producidas por NADPH oxidasas son indispensables en la diferenciación megacariocítica (Sardina et al., 2010), y una de las dianas mejor conocidas de la señalización por ROS son las PTPs. Curiosamente, el incremento de las ROS que se produce durante la diferenciación megacariocítica (Sardina et al., 2010) coincide con la bajada de actividad PTPásica que nosotros detectamos (Sardina, 2010). Por eso nuestra hipótesis de partida es que al igual que el pervanadato inhibe las PTPs, y esto provoca un fenotipo megacariocítico, los ROS que se producen al inicio de la megacariopoyesis inhibirían a las PTPs y esto es lo que permitiría que se disparara la diferenciación megacariocítica.

### **4.1 Estudio de SHP1 y SHP2 en la diferenciación megacariocítica**

#### **4.1.1 Niveles de fosforilación de SHP1 y SHP2 en la diferenciación megacariocítica.**

Curiosamente, SHP1 y SHP2, dos fosfatasas cuya misión es desfosforilar residuos de tirosina, se activan cuando se fosforilan precisamente en residuos de tirosina (Martin et al., 1999; Vogel et al., 1993). Sin embargo, cuáles son las tirosinas concretas en las que se produce esta fosforilación no está totalmente dilucidado. Por ello, nos pareció interesante comprobar, si el proceso de diferenciación megacariocítica conlleva asociados cambios en los niveles de fosforilación de las PTPs SHP1 y SHP2. Las células HEL y K562, inician la diferenciación megacariocítica cuando se tratan con concentraciones nanomolares de ésteres de forbol. Nosotros elegimos una concentración de 20 nM de PMA, utilizada desde hace tiempo en nuestro laboratorio para este fin. Para comprobar si los niveles de fosforilación de SHP1 y SHP2 estaban alterados, detectamos los niveles de fosforilación con anticuerpos que

reconocen específicamente estas proteínas cuando se encuentran fosforiladas. Concretamente, detectamos los niveles de fosforilación de la tirosina 536 de SHP1 y de la 580 de SHP2 (Figura R.1).



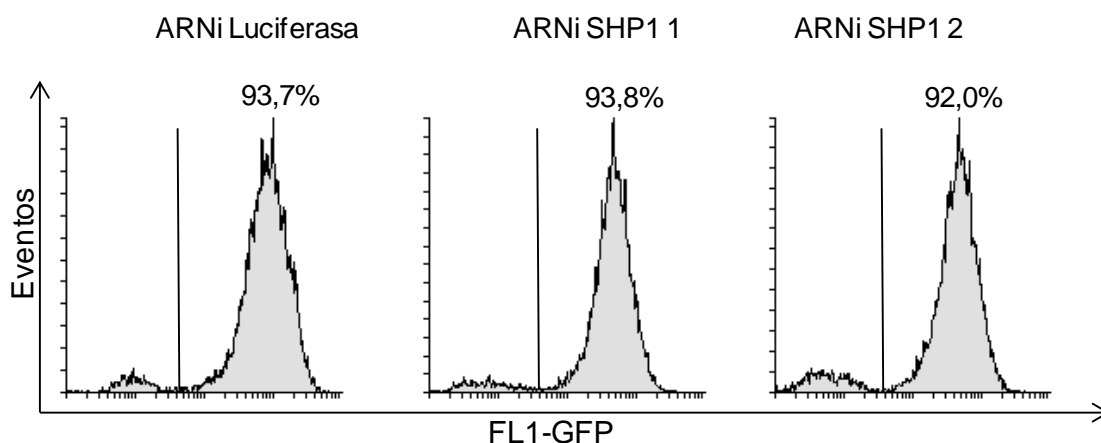
**Figura R.1: Durante la diferenciación megacariocítica los niveles de fosforilación de SHP1 aumentan y los niveles de fosforilación de SHP2 disminuyen.** Células HEL fueron tratadas con PMA 20 nM o PMA 20 nM y DPI 5μM durante los tiempos que se indican en la figura. Se resolvieron los extractos celulares en un Western blot y se detectaron con anticuerpos frente a la forma fosforilada de la tirosina 536 de SHP1 y de la tirosina 580 de SHP2. La proteína total de SHP1 y SHP2, además de la β-Tubulina, se utilizaron como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

Hemos comprobado que, en células HEL tratadas con PMA, se produce un incremento en la fosforilación de la tirosina 536 de SHP1. Este incremento se aprecia ya a los 15 minutos de incubación, siendo sostenido durante al menos una hora. Sin embargo, encontramos una disminución de la fosforilación de la tirosina 580 de SHP2 a esos mismos tiempos. Estos datos sugieren que SHP1 y SHP2 podrían ser reguladas por fosforilación en los instantes iniciales de la diferenciación megacariocítica. Se ha descrito que la fosforilación en tirosina de SHP1 estimula la actividad de esta fosfatasa. Se conocen al menos tres residuos de tirosina que se fosforilan en SHP1: Y536, Y543 y Y566. Además, existe fosforilación en serina (Poole y Jones, 2005). Al igual que ocurre con el PMA, el tratamiento con VEGF (de sus siglas en inglés, vascular endothelial growth factor) aumenta la fosforilación de SHP1 en la tirosina 536. Estos autores demuestran que a la vez que se produce este incremento de la fosforilación de SHP1 aumenta su actividad (Martin et al., 1999). Teniendo en cuenta que la fosforilación de SHP1 es un proceso rápido y coincide con el descenso de actividad PTPásica global, podemos sugerir que tal incremento en la fosforilación se debe a la inhibición del enzima o enzimas que se encarguen de su desfosforilación. En relación a SHP2, en otros estudios, la sobreexpresión del receptor con actividad quinasa β-PDGF hace aumentar los niveles de SHP2 fosforilada en las tirosinas y, a su vez, la actividad catalítica de SHP2 también es mayor (Vogel et al., 1993). SHP2 se fosforila en tirosina al menos en los residuos Y63, Y279, Y542 y Y580 (Mitra et al., 2008). Por lo tanto, atendiendo a los datos bibliográficos esperaríamos un incremento de la actividad de SHP1 y un descenso de la actividad de SHP2 debido a estas fosforilaciones.

Como las NADPH oxidasas tienen un papel clave en la diferenciación megacariocítica (Sardina et al., 2010), decidimos comprobar si un inhibidor de NADPH oxidasas, el DPI, tenía algún efecto sobre esta fosforilación. Como se puede ver en la figura R.1, la fosforilación de SHP1, que se produce al inicio de la diferenciación megacariocítica, es bloqueada en presencia del inhibidor de NADPH oxidasas. Las ROS producidas en las etapas iniciales de la diferenciación megacariocítica por las NADPH oxidasas son necesarias para que se consiga la completa activación (fosforilación) de proteínas clave en las rutas de señalización que regulan la megacariopoyesis (Sardina et al., 2010). Estos datos muestran que ocurre lo mismo para la fosforilación de SHP1 y, sin embargo, los niveles de fosforilación de SHP2 no se ven alterados por la presencia del inhibidor de NADPH oxidasas.

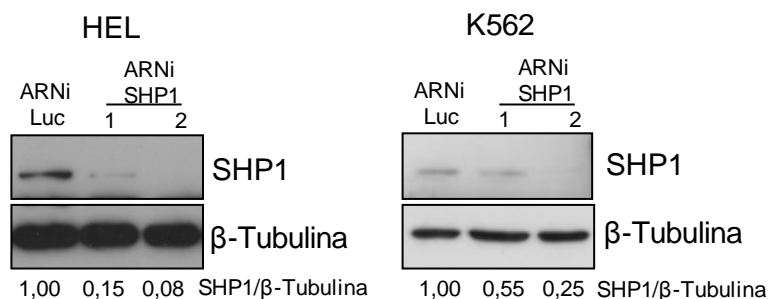
#### 4.1.2 Reducción de los niveles de SHP1 en células HEL y K562

Teniendo en cuenta que la fosforilación de SHP1 variaba durante la diferenciación megacariocítica, SHP1 parecía un buen candidato para regular, al menos en parte, la diferenciación megacariocítica. Para indagar en ello, utilizamos la estrategia de reducir los niveles de esta proteína mediante ARN de interferencia (ARNi). Diseñamos dos secuencias de ARNi contra la secuencia del mensajero de SHP1 (véase sección de métodos). En primer lugar, comprobamos si las células habían incorporado el plásmido en el que se clonaron las secuencias de interferencia. Para ello, en estas células se midió, mediante citometría de flujo, la expresión de GFP (de sus siglas en inglés, Green Fluorescent Protein) que se utilizó como reportero porque se expresa en las células en que se ha internalizado la secuencia. Como se puede ver en la figura R.2 los porcentajes alcanzados superaron el 90% de células que expresaban GFP.



**Figura R.2: Porcentaje de infección:** Las células HEL utilizadas en el estudio se infectaron con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, y dos secuencias de silenciamiento de SHP1. El número indica el porcentaje de células en el pico. Se muestra un experimento representativo.

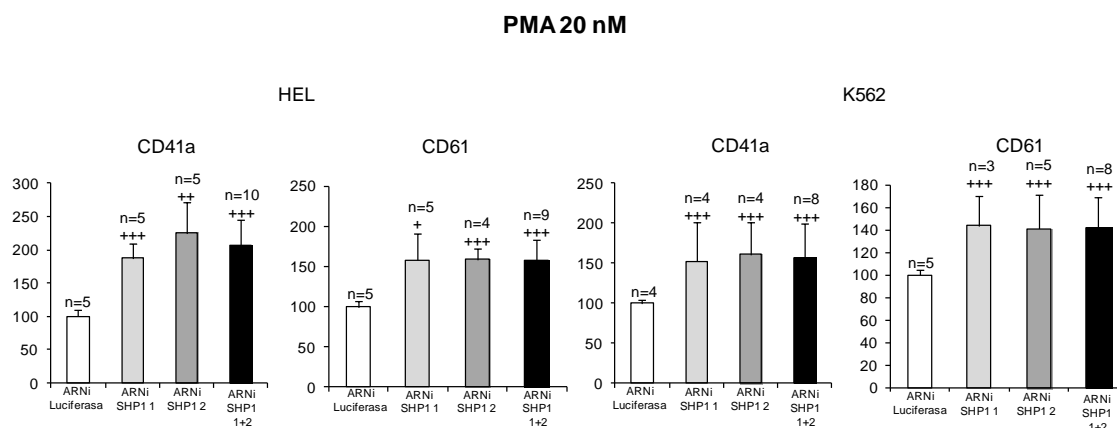
A continuación, medimos los niveles de proteína de SHP1 mediante transferencia de western con un anticuerpo que la reconoce específicamente. Comprobamos que, efectivamente, los niveles de proteína de SHP1 se habían reducido en células HEL y K562 con las dos secuencias empleadas para su silenciamiento (Figura R.3).



**Figura R.3: Silenciamiento de SHP1:** Extractos celulares de las células HEL y K562 infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, y dos secuencias de silenciamiento de SHP1 se resolvieron en un Western blot y se detectaron con anticuerpos frente a SHP1. La  $\beta$ -Tubulina se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

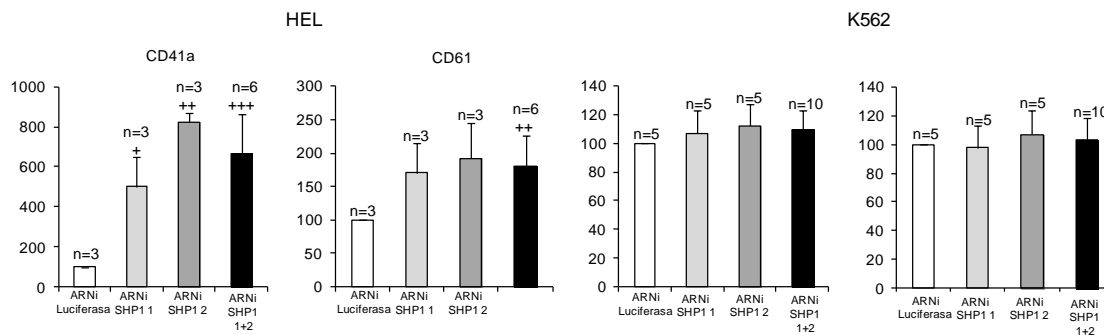
#### 4.1.2.1 Fenotipado de células HEL y K562 donde se ha reducido la expresión de SHP1

Como otras células sanguíneas, los megacariocitos expresan una serie de marcadores a lo largo de su diferenciación. Dos de estos marcadores son CD41a y CD61. Por ello, una manera efectiva de seguir el desarrollo de la diferenciación megacariocítica es medir los niveles de estos marcadores mediante citometría de flujo. Se analizaron los niveles de estos marcadores y se comprobó que la reducción de los niveles de SHP1, en células HEL y K562, aumentaba los niveles de marcadores megacariocíticos en células estimuladas durante 48h con PMA 20 nM, con respecto a células control. (Figura R.4).



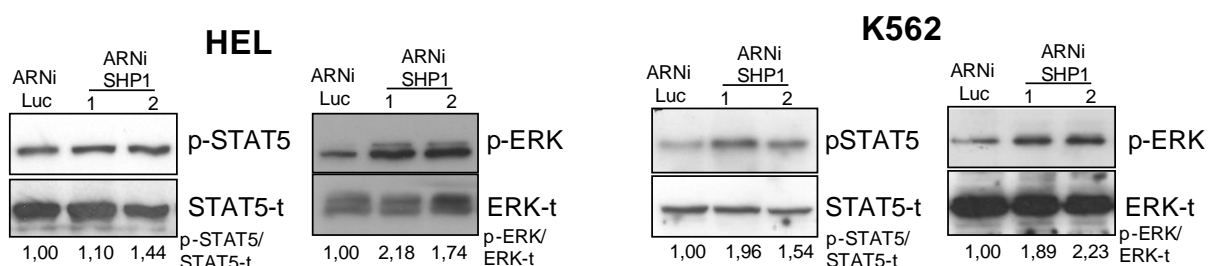
**Figura R.4: El silenciamiento de SHP1 aumenta los niveles de marcadores megacariocíticos de células HEL y K562 estimuladas con PMA 20 nM:** Células HEL y K562 infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, y dos secuencias de silenciamiento de SHP1 se trataron con PMA 20 nM durante 48 h. Los marcadores de superficie CD41a y CD61 se midieron con anticuerpos fluorescentes específicos mediante citometría de flujo. Las barras muestran la media  $\pm$  la desviación estándar.  $+p < 0,05$ ,  $++p < 0,01$ ,  $+++p < 0,001$  representan la significación frente al control (ARNi de Luciferasa).

Además, para nuestra sorpresa, las células HEL, que no se habían estimulado con PMA para iniciar la diferenciación megacariocítica, también presentaban unos niveles de marcadores más altos que las células control. Es decir, la simple interferencia de SHP1 hace que las células HEL aumenten los marcadores megacariocíticos; esto no lo hemos observado en células K562. (Figura R.5).



**Figura R.5: El silenciamiento de SHP1 aumenta los niveles basales de marcadores megacariocíticos de células HEL:** Utilizando células HEL y K562 infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, y dos secuencias de silenciamiento de SHP1, se midieron los marcadores de superficie CD41a y CD61 con anticuerpos fluorescentes específicos mediante citometría de flujo. Las barras muestran la media  $\pm$  la desviación estándar. += $p$ <0,05, ++= $p$ <0,01, +++= $p$ <0,001 representan la significación frente al control (ARNi de Luciferasa).

Para intentar ahondar en el mecanismo por el cual se produce este aumento de los niveles de marcadores megacariocíticos, analizamos dos de las rutas de señalización que se activan durante el proceso de megacariopoyesis. Estas son la ruta de las MAPK quinasas y la ruta de los factores de transcripción STATs. Los factores STATs son fosforilados por la proteína JAK2 asociada al receptor de TPO (Kaushansky, 2005). Para ello seguimos la fosforilación (activación) de ERK y de STAT5, que son dos proteínas claves en estas rutas, con anticuerpos específicos (Figura R.6).



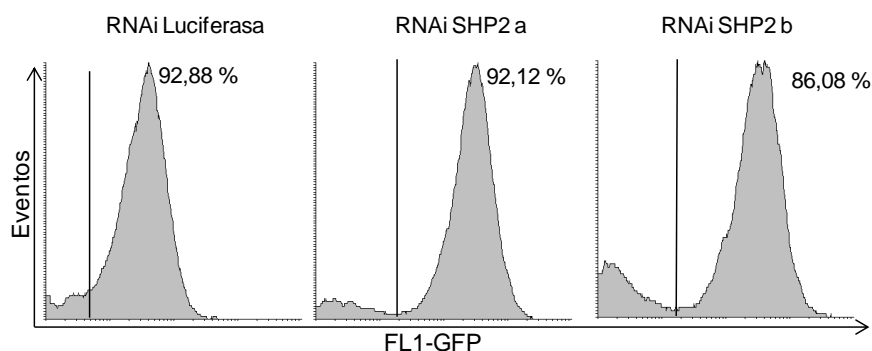
**Figura R.6: La interferencia de SHP1 altera la activación de algunas rutas que desencadenan la diferenciación megacariocítica:** Extractos celulares de las células HEL y K562 infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, y dos secuencias de silenciamiento de SHP1 se resolvieron en un Western blot y se detectaron con anticuerpos específicos frente a las formas activas/fosforiladas de ERK y STAT5. La proteína total de ERK y STAT5 se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

Se puede observar que las células, que tienen interferida la expresión de SHP1, presentan unos mayores niveles de fosforilación de STAT5 y ERK. Como se puede ver, el aumento en los niveles de diferenciación megacariocítica, producido por la reducción de los

niveles de SHP1, se relaciona con un aumento de la activación de estas rutas de señalización. Hemos observamos que esta activación es muy sutil en la ruta de los STATs de células HEL. Esto podría indicar que, en este caso, la mayor activación de ERK, efector final de la ruta de las MAPKs quinasas, es suficiente para producir el fenotipo observado en las figuras anteriores (R.4 y R.5). Existe controversia en cuanto al efecto que la reducción de los niveles de SHP1 provoca en la activación de la ruta de las MAPKK. Por ejemplo, la interferencia y sobreexpresión de esta fosfatasa en células mononucleadas de médula ratón no altera los niveles de pERK cuando son estimuladas con M-CSF para inducir la diferenciación a monocitos/macrófagos (Choi et al., 2011). Sin embargo, en coincidencia con nuestros datos, las células mononucleadas de los ratones mutantes que presentan bajos niveles de SHP1 presentan unos niveles superiores de pERK que los ratones silvestres. La diferencia podría deberse a la manera de reducir los niveles de SHP1. Estas células, de estos mismos ratones, presentan incrementados los niveles de STAT5 activado (pSTAT5), pero solo cuando son tratadas con interleuquina 3 que activa en estas células la diferenciación a mastocitos (Nakata et al., 2011). De hecho, se conoce desde hace tiempo que SHP1 interacciona con JAK2, proteína que posteriormente fosforila a los STATs, y con STAT5 (Klingmuller et al., 1995; Xiao et al., 2009). Nuestros datos sugieren que SHP1 actúa como regulador negativo de la activación de estas rutas de señalización.

#### 4.1.3 Reducción de los niveles de SHP2 en células HEL y K562

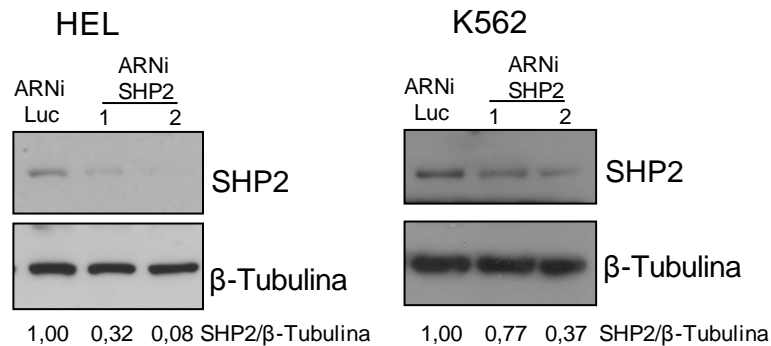
A continuación tratamos de caracterizar el fenotipo producido por la interferencia de SHP2 en la megacariopoyesis de células HEL y K562. Siguiendo el proceso descrito para SHP1, en primer lugar comprobamos que la mayoría de las células habían incorporado la secuencia de ARNi deseado. Para ello medimos la fluorescencia verde emitida por la GFP (Figura R.7). En este caso obtuvimos porcentajes superiores al 85%.



**Figura R.7: Porcentaje de infección:** Las células HEL utilizadas en el estudio se infectaron con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, y dos secuencias de silenciamiento de SHP2. El número indica el porcentaje de células en el pico. Se muestra un experimento representativo.



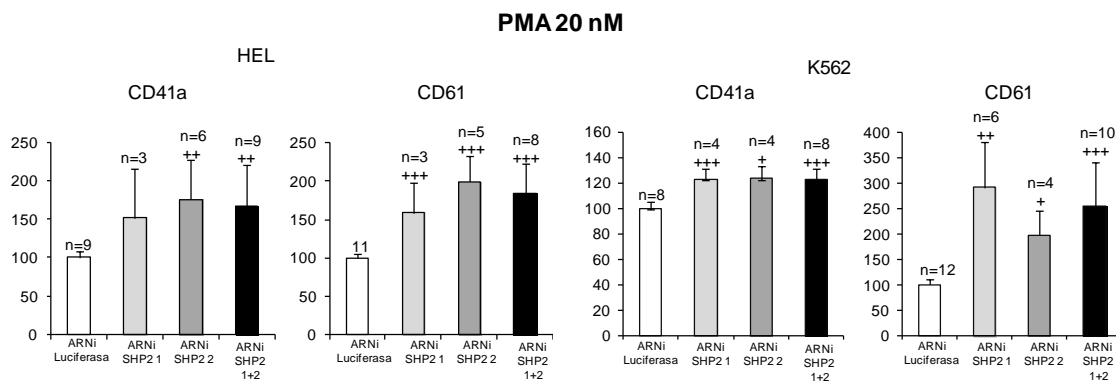
Posteriormente medimos los niveles de proteína de SHP2 mediante transferencia de western con un anticuerpo que reconoce específicamente SHP2. Los niveles se habían reducido claramente también en ambas líneas celulares (Figura R.8).



**Figura R.8: Silenciamiento de SHP2:** Extractos celulares de las células HEL y K562 infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, y dos secuencias de silenciamiento de SHP2 se resolvieron en un Western blot y se detectaron con anticuerpos específicos frente a SHP2. La  $\beta$ -Tubulina se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

#### 4.1.2.1 Fenotipado de células HEL y K562 donde se ha reducido la expresión de SHP1

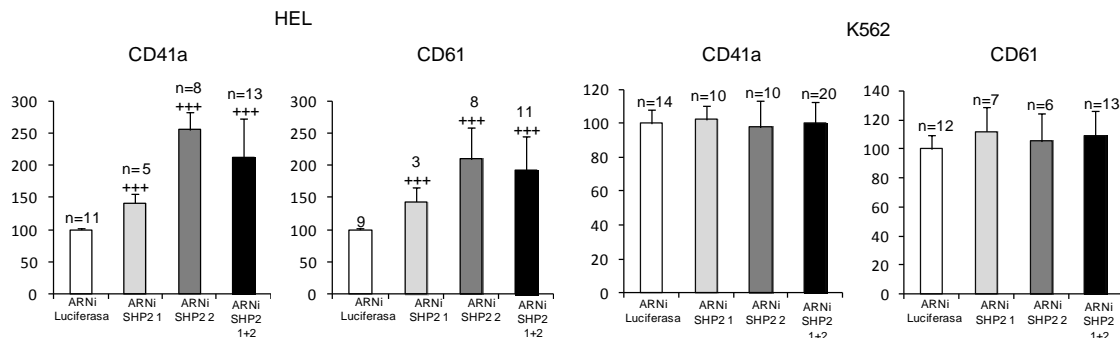
Igual que en el caso de SHP1, analizamos los niveles de marcadores megacariocíticos mediante citometría de flujo. Así se comprobó que la reducción de los niveles de SHP2 en células HEL y K562 también aumentaba los niveles de marcadores megacariocíticos en células estimuladas durante 48h con PMA 20 nM, con respecto a células control, de forma muy similar a lo encontrado para SHP1 (Figura R.9.).



**Figura R.9: El silenciamiento de SHP2 aumenta los niveles de marcadores megacariocíticos de células HEL y K562 estimuladas con PMA 20 nM:** Células HEL y K562 infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, y dos secuencias de silenciamiento de SHP2 se trataron con PMA 20 nM durante 48 h. Los marcadores de superficie CD41a y CD61 se midieron con anticuerpos fluorescentes específicos mediante citometría de flujo. Las barras muestran la media  $\pm$  la desviación estándar. += $p < 0,05$ , ++= $p < 0,01$ , +++= $p < 0,001$  representan la significación frente al control (ARNi de Luciferasa).

En vista de que los resultados eran similares a los encontrados para SHP1, medimos los diferentes marcadores en células sin estimular con PMA, comprobando que la

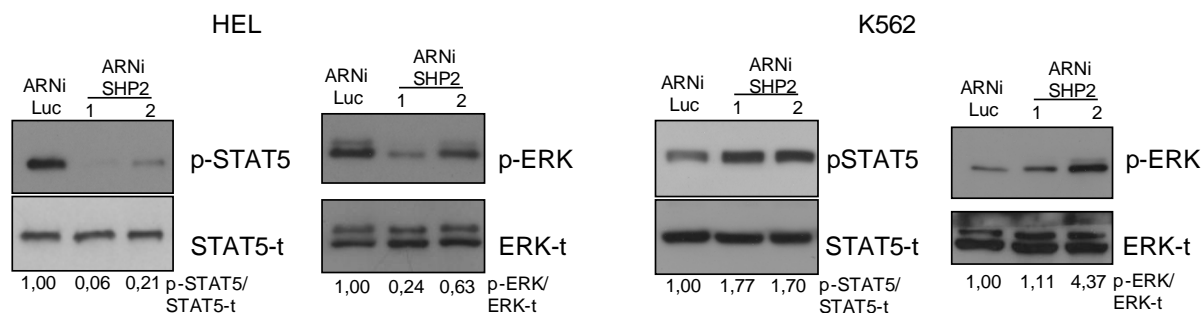
interferencia de SHP2 aumenta los niveles de CD41a y CD61 en células HEL (Figura R.10) pero no en K562. Sorprendentemente, estos resultados coinciden con los obtenidos cuando reducimos los niveles de SHP1.



**Figura R.10: El silenciamiento de SHP2 aumenta los niveles basales de marcadores megacariocíticos de células HEL:** Utilizando células HEL y K562 infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, y dos secuencias de silenciamiento de SHP2 se midieron los marcadores de superficie CD41a y CD61 con anticuerpos fluorescentes específicos mediante citometría de flujo. Las barras muestran la media  $\pm$  la desviación estándar.  $+ = p < 0,05$ ,  $++ = p < 0,01$ ,  $+++ = p < 0,001$  representan la significación frente al control (ARNi de Luciferasa).

Analizando en conjunto los datos de SHP1 y SHP2 presentados hasta aquí, otros autores proponen que delección condicional en ratones de SHP1 no produce cambios en el recuento de plaquetas y tan solo un pequeño aumento de volumen de las mismas, mientras que la delección condicional de SHP2 provoca una disminución del número de plaquetas del 30%, sin embargo, el volumen de estas plaquetas es un 16% superior a las plaquetas del ratón silvestre (Mazhairan et al., 2013). Además, estos autores no encuentran cambios en la expresión de la integrinas CD61 de ninguno de estos ratones y, en general, los cambios en la expresión de otras integrinas son sutiles. Por último, análisis *ex vivo* de los megacariocitos de estos ratones tratados con TPO muestran un bloqueo de las células con contenido 2N y 4N, lo que indicaría que la deficiencia de SHP1 y SHP2 estaría bloqueando la diferenciación. Sin embargo, nuestros datos sugieren un papel como reguladores negativos de ambas PTPs en la diferenciación megacariocítica. Esta aparente contradicción podría ser debida a que en el estudio de Mazhairan et al, analizan la diferenciación terminal de megacariocitos, y la liberación de plaquetas, mientras que nosotros analizamos la diferenciación en líneas celulares que pueden diferenciarse a eritrocitos o megacariocitos; es decir, estaríamos analizando las etapas iniciales del proceso. Bajo nuestro punto de vista, cabe la posibilidad de que estos enzimas puedan jugar papeles distintos en las diferentes etapas del proceso. Este hecho explicaría por ejemplo, que estos mismos ratones presenten un claro bloqueo de los megacariocitos en fase 2N/4N y, sin embargo, presenten un recuento de plaquetas normal.

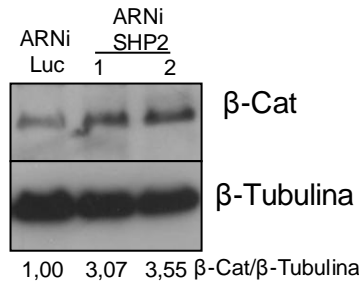
Continuando con el mismo proceso ya descrito para SHP1, nos centramos en conocer si SHP2 regula la diferenciación megacariocítica a través de alguna vía de señalización (Figura R.11).



**Figura R.11: La interferencia de SHP2 altera la activación de algunas rutas que desencadenan la diferenciación megacariocítica:** Extractos celulares de las células HEL y K562 infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, y dos secuencias de silenciamiento de SHP2 se resolvieron en un Western blot y se detectaron con anticuerpos específicos frente a las formas activas/fosforiladas de ERK y STAT5. La proteína total de ERK y STAT5 se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

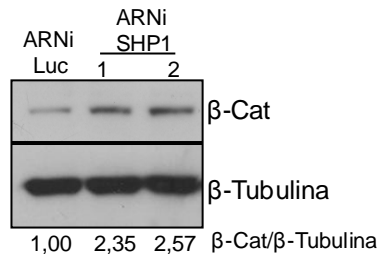
En células K562, al igual que para SHP1, vemos cómo las rutas que cursan con la fosforilación de ERK y STAT5 están claramente más activadas en las células con niveles reducidos de SHP2. Aunque los niveles fosfotirosina están muy condicionados en estas células por la presencia de la quinasa permanentemente activa BCR-ABL, las células K562 con expresión reducida de SHP2 que presentan una mayor expresión de marcadores megacariocíticos, presentan una mayor activación de las rutas de señalización. Por el contrario, y para nuestra sorpresa, en células HEL, con niveles reducidos de SHP2, los niveles de fosforilación de ERK y STAT5 son mucho menores. Sin embargo, está ampliamente descrito que la bajada de niveles de SHP2 provoca una reducción de los niveles de activación de las MAPKK, bajada de los niveles de pERK. Así está descrito, por ejemplo, en la diferenciación de células epiteliales de intestino, que la reducción condicional en estas células de SHP2 provoca una disminución de los niveles de pERK (Heuberger et al., 2014). Además, la reducción mediante ARNi de SHP2 en la línea celular A549 provoca también una reducción de los niveles de fosforilación de ERK (Tien y Chang, 2014). Más contradictorio es el resultado de pSTAT5. pSTAT5 ha sido identificado como una diana de SHP2 *in vivo* (Chen et al., 2003). Por ello, una reducción de los niveles de SHP2 debería aumentar los niveles de pSTAT5. En cualquier caso, hay que recordar que las células con las que se analizaron estas rutas de señalización no habían sido estimuladas con PMA, por lo que, aunque presentan más marcadores megacariocíticos de superficie (figura R.9), puede ser que aún no hubieran iniciado la diferenciación como tal, por ejemplo a nivel de factores de transcripción. Una explicación complementaria sería que, en estas células, la influencia de SHP2 se desarrolla por otras vías de señalización.

A lo largo de este trabajo ya hemos hablado, y hablaremos, de la importancia de la  $\beta$ -Catenina en la hematopoyesis. Para intentar comprobar si la  $\beta$ -Catenina estaba implicada en la alteración producida por el silenciamiento de SHP2, medimos los niveles de  $\beta$ -Catenina en estas células. (Figura R.12).



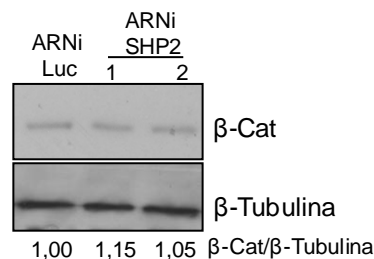
**Figura R.12: La interferencia de SHP2 altera los niveles de β-Catenina en células HEL:** Extractos celulares de las células HEL infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, y dos secuencias de silenciamiento de SHP2 se resolvieron en un Western blot y se detectaron con anticuerpos frente a β-Catenina. La β-Tubulina se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

Comprobamos que la reducción de SHP2 aumenta los niveles de β-Catenina. Además, como se observa en figura R.13, la β-Catenina también se estabiliza cuando reducimos los niveles de SHP1 en células HEL.



**Figura R.13: La interferencia de SHP1 altera los niveles de β-Catenina en células HEL:** Extractos celulares de las células HEL infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, y dos secuencias de silenciamiento de SHP1 en un Western blot y se detectaron con anticuerpos frente a β-Catenina. La β-Tubulina se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

Este fenómeno no lo hemos observado en la línea celular K562, como se ve en figura R.14. Parece, por lo tanto, que la activación de la megacariopoyesis podría no desencadenarse exactamente por idénticas rutas de señalización en ambas líneas celulares.



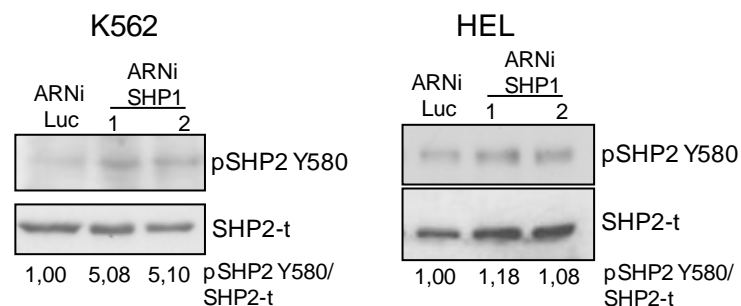
**Figura R.14: La interferencia de SHP2 no altera los niveles de β-Catenina en células K562:** Extractos celulares de las células K562 infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, y dos secuencias de silenciamiento de SHP2 se resolvieron en un Western blot y se detectaron con anticuerpos β-Catenina. La β-Tubulina se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

Según Gu y colaboradores, una bajada en los niveles de β-Catenina producida por la sobreexpresión de un inhibidor de la ruta Wnt/β-Catenina (Dickkopf 3), en líneas tumorales de páncreas, provoca una disminución de los niveles de pERK (Gu et al., 2011). Estos datos

estarían en correlación con los datos obtenidos en nuestro laboratorio, donde la diferenciación megacariocítica estimulada con PMA produce un aumento de las rutas de señalización de JAK y MAPKK y, también, una estabilización de los niveles de  $\beta$ -Catenina (Sardina et al., 2010; Sardina et al., 2014). Sin embargo, la interconexión de estas tres rutas en este sistema debe ser estudiada en más profundidad, además de los efectos concretos que pueda tener en los niveles de fosfotirosina el hecho de que las células K562 sobreexpresen la tirosina quinasa BCR-ABL.

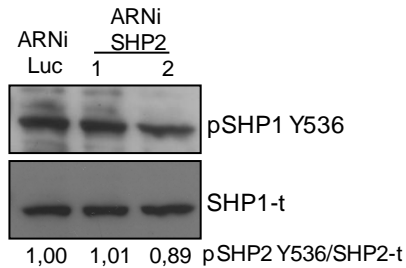
#### 4.1.4 La fosforilación de SHP2 se ve incrementada por la interferencia de SHP1

En conjunto, los datos hasta aquí descritos hacen pensar que SHP1 y SHP2 están regulando la diferenciación megacariocítica en líneas celulares. Quisimos comprobar si la alteración de los niveles de una de las proteínas afectaba a los niveles fosforilación de la otra proteína, dado que ambas funcionan como reguladores negativos de la diferenciación megacariocítica. Comprobamos que la interferencia de SHP1 hace aumentar los niveles de fosforilación de SPH2 en la tirosina 580, sugiriendo que SHP1 podría ser uno de los encargados de desfosforilar a SHP2 *in vivo* (Figura R.15). Está descrito que SHP1 y SHP2 interaccionan *in vivo*, al menos en la señalización producida por interleuquina 3. En este caso ambas fosfatasas tienen a Gab1 como sustrato (Wheadon et al., 2002), lo que les permitiría ser el sustrato una de la otra como sugieren nuestros resultados.



**Figura R.15: La interferencia de SHP1 incrementa los niveles de fosforilación de SHP2:** Extractos celulares de las células HEL y K562 infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, y dos secuencias de silenciamiento de SHP1 se resolvieron en un Western blot y se detectaron con anticuerpos frente a la forma fosforilada en la tirosina 580 de SHP2. La proteína total de SHP2 se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

Sin embargo, la reducción de SHP2 no incrementa los niveles de fosforilación de SHP1. (Figura R.16).



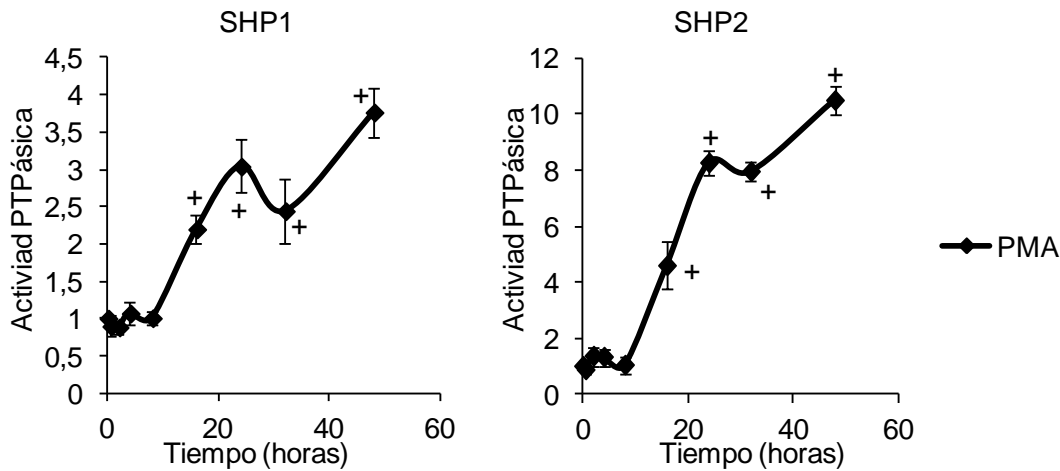
**Figura R.16: La interferencia de SHP2 no incrementa los niveles de fosforilación de SHP1:** Extractos celulares de las células HEL infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, y dos secuencias de silenciamiento de SHP2 se resolvieron en un Western blot y se detectaron con anticuerpos frente a la forma fosforilada en la tirosina 536 de SHP1. La proteína total de SHP1 se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

Como hemos dicho, en general, la fosforilación de SHP1 y SHP2 activa a estas proteínas (Martin et al., 1999; Vogel et al., 1993). Por ello, nos parece interesante que observemos una disminución de la fosforilación de SHP2 durante la diferenciación megacariocítica y, sin embargo, estos niveles aumenten cuando reducimos los niveles de SHP1, de la que ya hemos descrito que se fosforila durante este proceso (Figura R1). Por lo tanto, podría tratarse de un efecto de compensación, y al reducirse los niveles de SHP1, SHP2 se fosforilaría, activándose.

#### 4.1.5 Medida de la actividad de SHP1 y SHP2

A continuación, procedimos a medir la actividad de estas dos enzimas durante la diferenciación megacariocítica para comprobar si realmente su actividad cambiaba durante la megacariopoyesis, como parecían indicar los datos hasta ahora mostrados. Datos de nuestro grupo muestran una importante bajada de la actividad PTPásica total al inicio de la diferenciación megacariocítica de células HEL estimuladas con PMA (Sardina, 2010). Esta bajada se conoce en otros procesos desencadenados por PMA (Kiyomoto et al., 1994), y podría ser necesaria para que se produzcan las fosforilaciones que desencadenan dicha diferenciación (Avraham y Price, 1999). Esta bajada continúa con un aumento de la actividad a tiempos más largos.

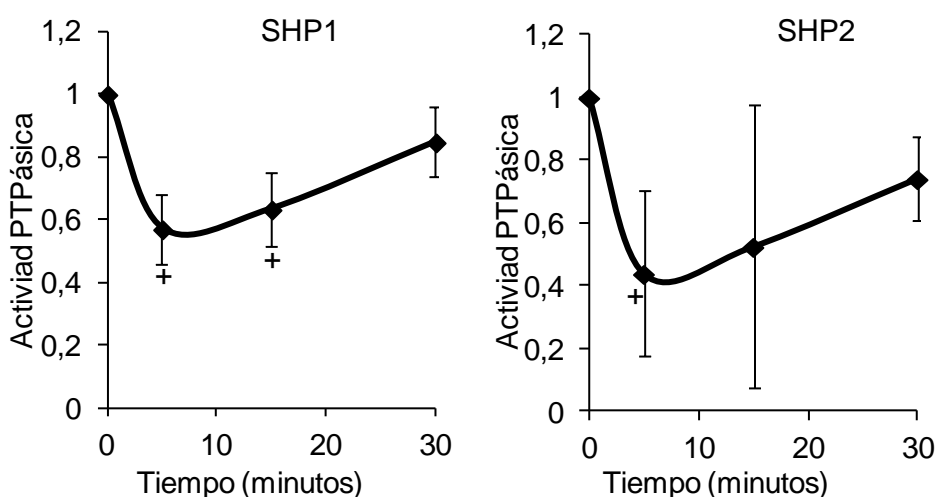
Como se describe en el apartado de métodos, para medir la actividad de SHP1 y SHP2 inmunoprecipitamos, con anticuerpos específicos, cada una de las PTPs en extractos celulares. Estos extractos provenían de células sometidas a tratamiento con PMA para desencadenar la megacariopoyesis durante diferentes tiempos. Así comprobamos que la actividad, tanto de SHP1 como de SHP2, aumenta considerablemente a partir de 16 horas de estimulación con PMA (Figura R.17).



**Figura R.17: La actividad de SHP1 y SHP2 aumenta a tiempos largos en la diferenciación megacariocítica:** Células HEL fueron tratadas con PMA 20 nM durante los tiempos que se indican en la figura. De los extractos celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpos frente a SHP1 o SHP2 la misma cantidad de proteína. La actividad se siguió por espectrofotometría a una longitud de 495 nm después de dos horas de reacción con las muestras en presencia de *pnpp*. Cada punto representa la media  $\pm$  la desviación estándar de 4 experimentos.  $+p < 0,05$  representa la significación frente al control (0 horas).

Este patrón se corresponde con el observado en la actividad PTPásica total (Sardina, 2010). Con esta subida se produciría el apagado de las rutas de señalización que cursan con activación por fosforilación. Por ello, SHP1 y SHP2 podrían estar mediando en el proceso. Esto es así porque, una vez que se ha producido el desencadenamiento de la diferenciación, es necesario que estas rutas vuelvan a los niveles de fosforilación iniciales.

Intentamos resolver, con mayor detalle, la actividad de SHP1 y SHP2 en los momentos iniciales de la diferenciación. Para ello medimos la actividad PTPásica de SHP1 y SHP2 a tiempos cortos de diferenciación, hasta 30 minutos de estimulación con PMA (Figura R.18).



**Figura R.18: La actividad de SHP1 y SHP2 disminuye a tiempos cortos en la diferenciación megacariocítica:** Células HEL fueron tratadas con PMA 20 nM durante los tiempos que se indican en la figura. De los extractos celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpos frente a SHP1 o SHP2 la misma cantidad de proteína. La actividad se siguió por espectrofotometría a una longitud de 495 nm después de dos horas de reacción con las muestras en presencia de *pnpp*. Cada

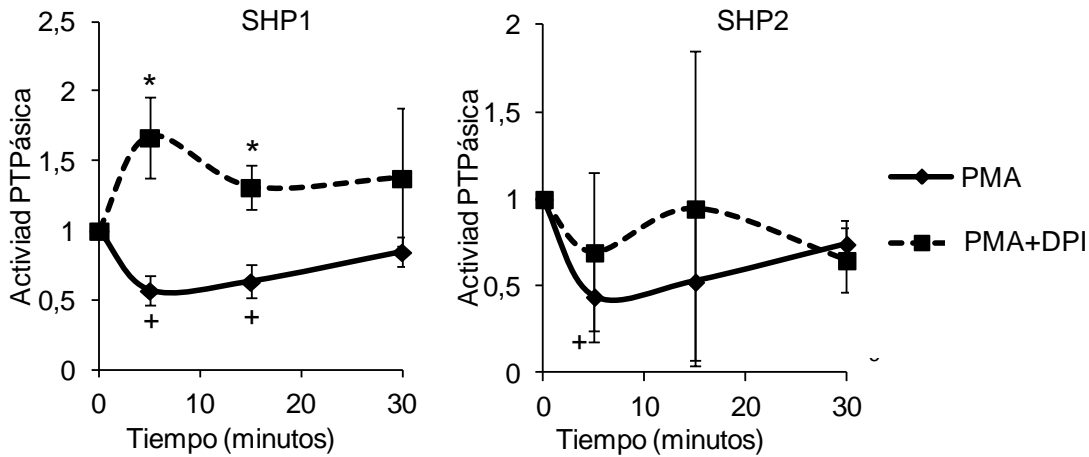
punto representa la media  $\pm$  la desviación estándar de 4 experimentos.  $+p < 0,05$  representa la significación frente al control (0 minutos).

Como se puede ver, durante los minutos iniciales de la diferenciación megacariocítica en células HEL estimuladas con PMA, se produce una bajada de la capacidad de SHP1 y SHP2 para desfosforilar sustratos. Esta bajada ya es significativa con respecto a células en estado basal, no estimuladas con PMA, a los 5 minutos de tratamiento con PMA. De hecho, a los 15 minutos de estimulación con PMA, solo observamos bajadas significativas para SHP1. A la media hora las dos PTPs estudiadas recuperan una actividad similar al control. Esta bajada de actividad es coincidente en el tiempo con el cambio en la fosforilación de estas dos proteínas mostrado en la figura R.1. Al igual que lo descrito en la bibliografía (Vogel et al., 1993), la bajada de fosforilación de SHP2 estaría relacionada con la bajada de actividad. Sin embargo, parece que la fosforilación de SHP1 producida por la estimulación con PMA que se produce al inicio de la diferenciación megacariocítica estaría inhibiendo SHP1, lo que contrasta con datos mostrados en otros trabajos, donde se asocia la fosforilación de SHP1 producida por VEGF con un aumento de la actividad (Bhattacharya et al., 2008).

Independientemente de la fosforilación, si, como según nuestros datos indican, se produce una bajada de actividad de SHP1 y SHP2 al inicio de la diferenciación megacariocítica, esto podría permitir que se activen las rutas de señalización. Por ejemplo, SHP2 es capaz de desfosforilar a STAT5 in vivo, por lo que, si se inhibe la actividad de SHP2, los niveles de fosforilación de STAT5 deberían ser más altos (Chen et al., 2003). Estos resultados sugieren que una bajada puntual de la actividad, de al menos SHP1 y SHP2, permite que se active la señalización de la diferenciación megacariocítica. Esta bajada, de la actividad de estas PTPs, permitiría la fosforilación de ciertas proteínas de las vías de señalización intracelulares.

Como ya hemos comentado ampliamente, se sabe que la actividad de las PTPs puede estar regulada por oxidación de su centro catalítico (Meng et al., 2002). Además, conocíamos que se produce una subida de ROS, producidas por NADPH oxidasas, en el contexto de la diferenciación megacariocítica (Sardina et al., 2010). Por ello quisimos comprobar si la inhibición de la actividad de SHP1 y SHP2 se podía revertir inhibiendo las NADPH oxidasas que se activan durante la diferenciación (Figura R.19).





**Figura R.19: El DPI aumenta la actividad de SHP1 y SHP2:** Células HEL fueron tratadas con PMA 20 nM o PMA20 nM y DPI 5  $\mu$ M durante los tiempos que se indican en la figura. De los extractos celulares se inmunoprecipito con anticuerpos específicos SHP1 o SHP2. La actividad se siguió por espectrofotometría a una longitud de 495 nm después de dos horas de reacción con las muestras en presencia de *pnp*. Cada punto representa la media  $\pm$  la desviación estándar de 4 experimentos.  $+p < 0,05$  representa la significación frente al control (0 minutos).  $*=p < 0,05$  representa la significación frente al mismo tiempo de tratamiento con PMA.

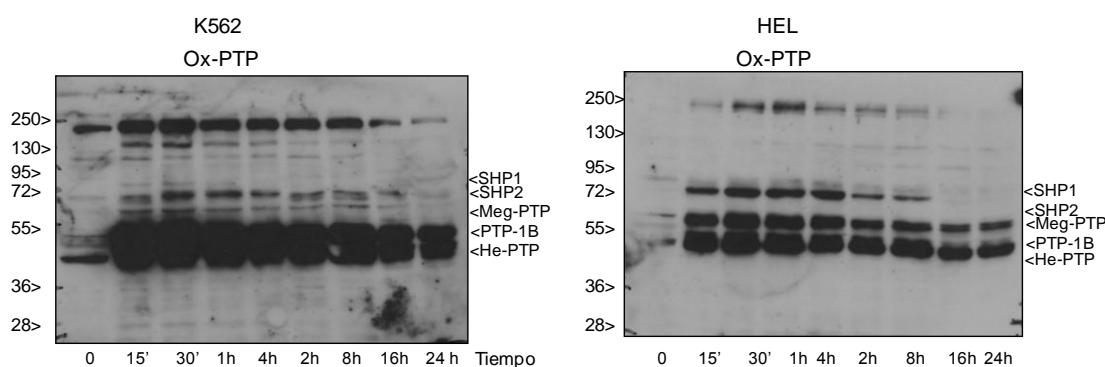
En cuanto a la actividad de SHP1, comprobamos que el DPI, un inhibidor de NADPH oxidasas, no permite que se produzca la bajada de actividad asociada al tratamiento con PMA para desencadenar la megacariopoyesis. Esta actividad es significativamente mayor a 5 y 15 minutos. A los 30 minutos, la actividad de SHP1 sigue siendo superior en células tratadas con PMA y DPI que en las células solo tratadas con PMA. En cuanto a la actividad de SHP2 cuando se añade el DPI, la actividad se mantiene por encima a 5 y 15 minutos con respecto a la actividad con PMA. Aunque las diferencias que hemos encontrado no son significativas, pensamos que las NADPH oxidasas sí que pueden estar jugando un papel en la regulación de la actividad de SHP2, aunque no sea tan acusado como en el caso anterior. El efecto del DPI es especialmente significativo. El hecho de que la oxidación bloquea la actividad de las PTPs está ampliamente descrito (Meng et al., 2002) y nuestros resultados así lo avalan. Sin embargo, el DPI provoca que SHP1 presente unos niveles de fosforilación menores, lo que debería coincidir con una menor tasa de actividad (Bhattacharya et al., 2008), cosa que no ocurre. Independientemente de lo que ocurra con la actividad, el hecho de que SHP1 presente unos niveles de fosforilación en tirosina menores puede que sea debido a que otras tirosina fosfatasa se encuentran más activas por una menor presencia de ROS en la célula debido al DPI.

#### 4.1.6 Medida del estado de oxidación de PTPs en la diferenciación megacariocítica.

En conjunto, los resultados anteriores muestran que SHP1 y SHP2 juegan un papel importante en la diferenciación megacariocítica de células HEL. Además, su actividad, y por lo tanto su regulación, parece estar influenciada por las ROS que las NADPH oxidasas producen

en los momentos iniciales de esta diferenciación. Esto sugiere que la regulación de esta actividad podría ser, al menos en parte, por oxidación de su centro activo. Por lo tanto, nos pareció interesante intentar medir el estado de oxidación de las proteína tirosina fosfatasas en la diferenciación megacariocítica. Esto es posible gracias a que existe un anticuerpo comercial que reconoce el centro activo oxidado de las PTPs (Ostman et al., 2011).

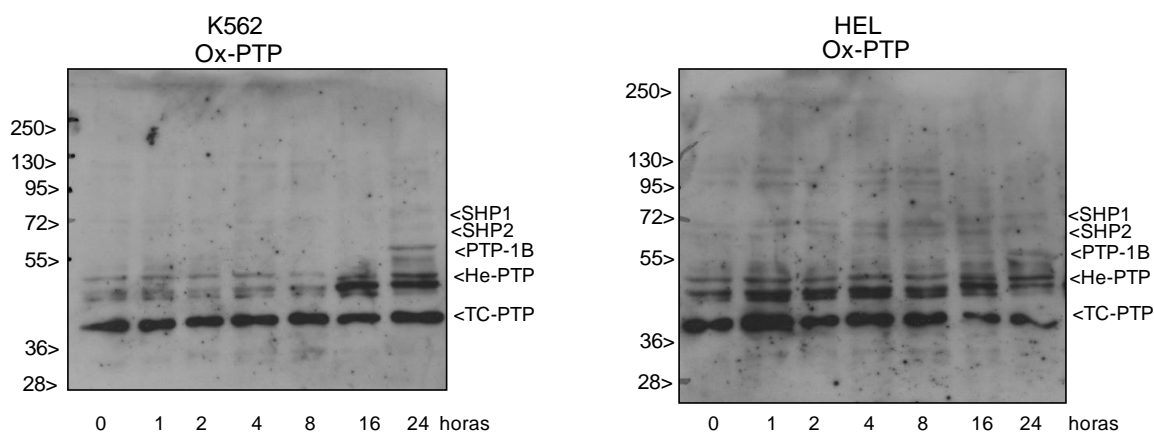
En una primera aproximación tratamos las células con pervanadato. Como inhibidor de PTPs que es, el pervanadato provoca una fuerte bajada de la actividad PTPásica, entre otras cosas, porque oxida irreversiblemente su centro activo. El tratamiento con pervanadato provoca cambios en la oxidación del centro activo de numerosas PTPs (Figura R.20).



**Figura**

**R.20: Las PTPs se oxidan con pervanadato:** Células HEL y K562 fueron tratadas con pervanadato 100  $\mu$ M durante los tiempos que se indican en la figura. Los extractos celulares se resolvieron en un Western blot y se hibridaron con un anticuerpo que reconoce el centro activo oxidado de las PTPs. Los números de la izquierda indican el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular. Se muestra un experimento representativo.

En general, se observa un aumento de la oxidación de diferentes bandas. Por tamaño, y en una aproximación grosera, podría tratarse de las PTPs que se indican en la parte derecha. Nos pareció especialmente interesante que a la altura del marcador de 72 kilodaltons aparecieran una o dos bandas oxidadas, las cuales podrían ser SHP1 y SHP2, que pesan 70 y 72 KDa respectivamente. Para seguir indagando en esta posibilidad, repetimos el experimento tratando a las células con PMA 20 nM, concentración que utilizamos para desencadenar la diferenciación megacariocítica (Figura R.21).

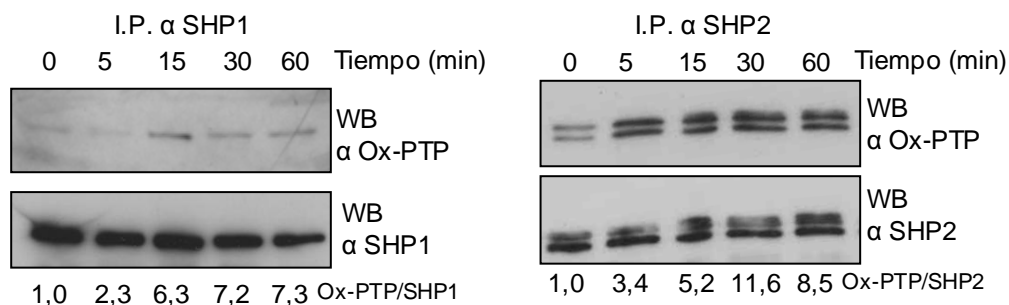


**Figura R.21: Algunas PTPs se oxidan durante la diferenciación megacariocítica:** Células HEL y K562 fueron tratadas con PMA 20 nM durante los tiempos que se indican en la figura. Los extractos celulares se resolvieron en un Western blot y se hibridaron con un anticuerpo que reconoce el centro activo oxidado de las PTPs. Los números de la izquierda indican el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular. Se muestra un experimento representativo.

Como era de esperar, en este caso, la oxidación es menos evidente, pero probablemente se deba a que la inducción con PMA no es capaz de desencadenar totalmente la oxidación el grupo sulfhidriilo. Como hemos comentado en el apartado metodológico, la cisteína se debe encontrar totalmente oxidada (ácido sulfínico o sulfónico) para que el anticuerpo la detecte. No obstante, se observa cómo el estado de oxidación de algunas bandas aumenta durante la diferenciación megacariocítica, lo que podría indicar que la regulación por oxidación de PTPs puede ser importante durante la diferenciación megacariocítica. Por eso decidimos seguir adelante con el estudio, e intentar dilucidar el estado de oxidación concreto de SHP1 y SHP2 durante la diferenciación megacariocítica.

#### 4.1.7 Medida del estado de oxidación de SHP1 y SHP2 durante la diferenciación megacariocítica de células HEL.

Como la bajada de actividad de SHP1 y SHP2 se produce en los primeros minutos de diferenciación con PMA, en primer lugar tratamos de medir los niveles de oxidación a estos tiempos. Como se puede ver (Figura R.22), en los minutos iniciales de diferenciación megacariocítica de células HEL con PMA se produce una oxidación de SHP1 y SHP2, que se prolonga, al menos, hasta los 60 minutos de estimulación.

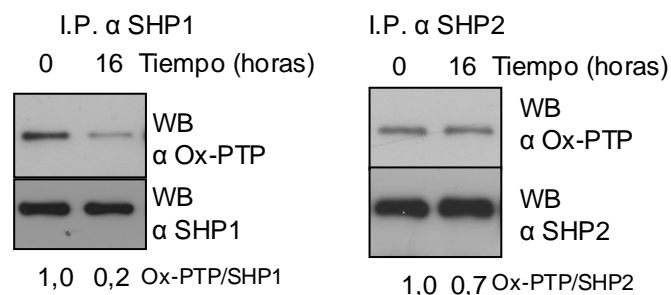


**Figura R.22: SHP1 y SHP2 se oxidan durante las fases iniciales de la diferenciación megacariocítica:** Células HEL fueron tratadas con PMA 20 nM durante los tiempos que se indican en la figura. Los extractos celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpos frente a SHP1 o SHP2 y se resolvieron en un Western blot. Posteriormente se hibridaron con un anticuerpo que reconoce el centro activo oxidado de las PTPs. La proteína total de SHP1 o SHP2 se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

Este aumento en la oxidación de SHP1 y SHP2 coincide en el tiempo con la bajada de su actividad (Figura R.18) y, a su vez, con el aumento de las ROS, que son producidas por las NADPH oxidasas en el inicio de la diferenciación (Sardina et al., 2010). También coincide con el aumento de la fosforilación de SHP1. Como ya hemos dicho, según la bibliografía, la fosforilación de SHP1 la activa. Sin embargo, nosotros observamos que en nuestro sistema de diferenciación megacariocítica, la bajada de actividad coincide con la subida de la fosforilación de SHP1. Como, además, también coincide con la oxidación de SHP1, se nos

plantean dos explicaciones para este fenómeno. La primera, que en nuestro modelo de trabajo la fosforilación de SHP1 implique una bajada de actividad, al contrario de lo que han propuesto otros autores (Bhattacharya et al., 2008). Y la segunda, que SHP1 reciba dos señales diferentes, la fosforilación y la oxidación, siendo restrictiva la segunda y, por tanto, prioritaria, ya que la oxidación inactiva su centro activo y la fosforilación se ha relacionado con la capacidad para interactuar con otras moléculas (Martin et al., 1999). Para SHP2 la bajada de la fosforilación coincide con la subida en la oxidación de esta proteína, dos fenómenos que conducen a la bajada de actividad de la misma, como también hemos observado nosotros.

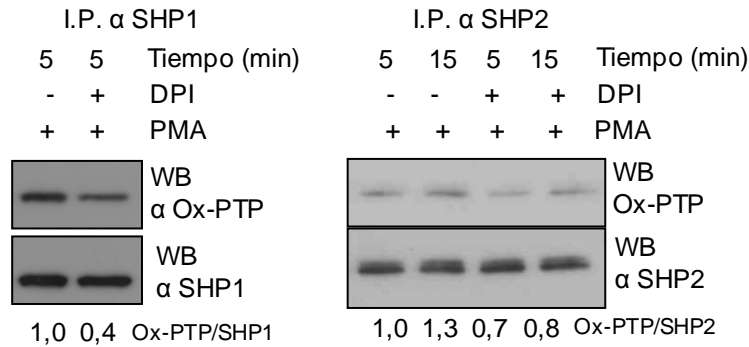
Además, a tiempos más largos, y coincidiendo con la subida de la actividad de estas proteínas (Figura R.17), se produce una bajada de la oxidación en la cisteína crítica en el funcionamiento de estas proteínas (Figura R.23).



**Figura R.23: SHP1 y SHP2 presentan un estado menos oxidado a tiempos largos de diferenciación megacariocítica:** Células HEL fueron tratadas con PMA 20 nM durante los tiempos que se indican en la figura. Los extractos celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpos frente a SHP1 o SHP2 y se resolvieron en un Western blot. Posteriormente se hibridaron con un anticuerpo que reconoce el centro activo oxidado de las PTPs. La proteína total de SHP1 o SHP2 se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

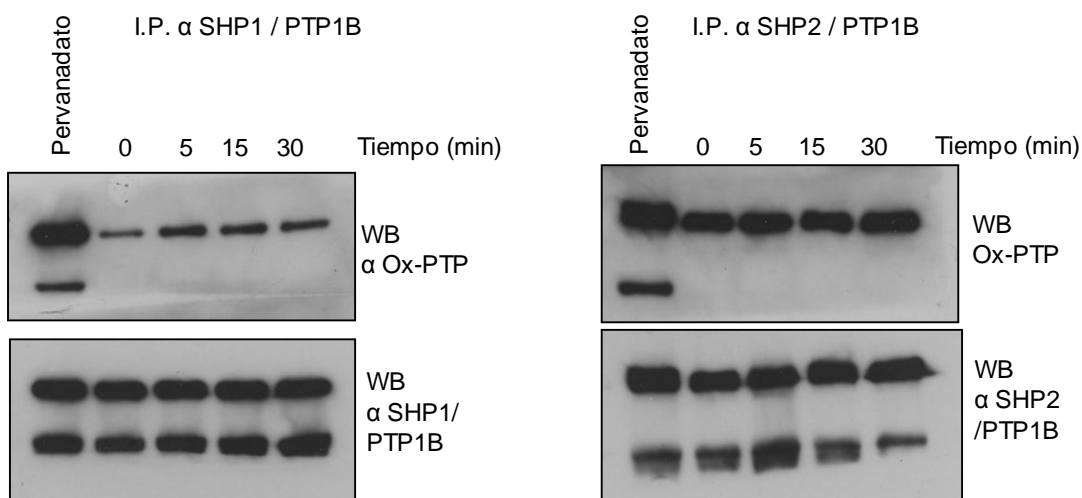
Para SHP2 no hemos conseguido detectar una reducción de la oxidación tan clara como para SHP1. No obstante, los niveles son notablemente más bajos que en los primeros minutos de estimulación con PMA.

En cualquier caso, tomando los datos en su conjunto, se produce un aumento de la oxidación de SHP1 y SHP2 en la parte inicial de la megacariopoyesis que coincide con la bajada de su actividad. Esta bajada es coincidente en el tiempo con la subida de las ROS producidos por NADPH oxidasas en el inicio de la megacariopoyesis (Sardina et al., 2010), lo que sugiere que ambas PTPs se oxidan por las ROS producidas por NADPH oxidasas. Para comprobar esta hipótesis analizamos los niveles de oxidación de SHP1 y SHP2 en presencia de un inhibidor de NADPH oxidasas (DPI). En presencia de DPI se produce un descenso en la oxidación de SHP1 y SHP2. Este efecto es más marcado, nuevamente, en el caso de SHP1 (Figura R.24).



**Figura R.24: El DPI reduce los niveles de oxidación de SHP1 y SHP2:** Células HEL fueron tratadas con PMA 20 nM o PMA20 nM y DPI 5  $\mu$ M durante los tiempos que se indican en la figura. Los extractos celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpos frente a SHP1 o SHP2 y se resolvieron en un Western blot. Posteriormente se hibridaron con un anticuerpo que reconoce el centro activo oxidado de las PTPs. La proteína total de SHP1 o SHP2 se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

Si tenemos en cuenta estos datos de SHP1 y SHP2, y los de las figuras R. 20 y R.21, con ligeras diferencias, podríamos pensar que el fenómeno de oxidación de PTPs durante la diferenciación megacariocítica se produciría de manera inespecífica. Para comprobar si este fenómeno ocurriría con todas las PTPs de la célula, tal como estos datos podrían sugerir, medimos de la misma forma la oxidación de PTP1B. PTP1B es una PTP ampliamente extendida. Está relacionada con el metabolismo por su actuación en la señal del receptor de insulina. Además, se expresa abundantemente en plaquetas, donde está relacionada con la expresión de la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (Elchebly et al., 1999; Ragab et al., 2003). De manera simultánea inmunoprecipitamos PTP1B con cada una de nuestras PTPs en estudio, SHP1 o SHP2. Esto es posible porque los pesos moleculares de SHP1 y SHP2 son mayores que el de PTP1B y, al resolverlas en el mismo gel, se separan de forma adecuada. (Figura R.25).



**Figura R.25: PTP1B no se oxida durante de la diferenciación megacariocítica:** Células HEL fueron tratadas con PMA 20 nM durante los tiempos que se indican en la figura o pervanadato 100  $\mu$ M durante 15 minutos. Los extractos celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpos frente a SHP1 y PTP1B o SHP2 y PTP1B y se resolvieron en un Western blot. Posteriormente se hibridaron con un anticuerpo que reconoce el centro activo oxidado de las PTPs. A continuación de detecto la proteína total de SHP1 y PTP1B o SHP2 y PTP1B. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

El anticuerpo contra el centro activo oxidado de las PTPs detecta a SHP1 y SHP2. Sin embargo, sólo detecta el centro activo oxidado de PTP1B bajo tratamiento con pervanadato, un fuerte oxidante de las PTPs. Además, como se puede ver en el control de carga, la cantidad de proteína PTP1B inmunoprecipitada al tratar con pervanadato o con PMA es muy similar. Por ello, si la detección de la oxidación no se produce, no es porque no se haya producido un inmunoprecipitado adecuado de la proteína, sino porque PTP1B no se oxida durante la diferenciación megacariocítica.

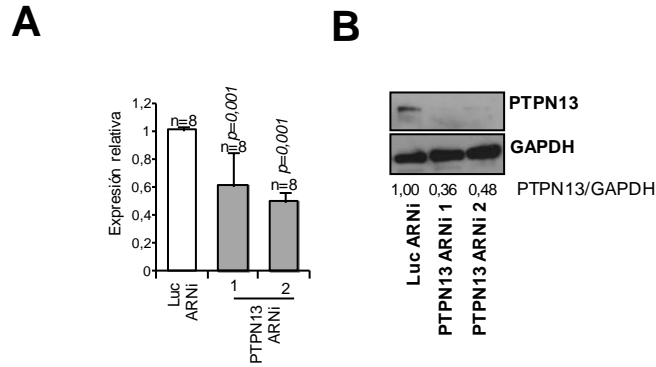
A la vista de nuestros resultados proponemos el siguiente modelo para la diferenciación megacariocítica: para que se produzca la megacariopoyesis, SHP1 y SHP2, que ejercen de reguladores negativos en este contexto, tienen que oxidarse en las etapas iniciales del proceso. Nuestros datos sugieren que esto se produciría por un aumento de las ROS intracelulares producidas por las NADPH oxidasas. Las ROS provocan que SHP1 y SHP2 se inhiban y que las rutas de señalización que cursan con fosforilaciones se activen. Esta activación conduce a que la célula se comprometa hacia la diferenciación. Una vez que esto ha sucedido, y cuando los niveles de ROS vuelven a bajar, SHP1 y SHP2 vuelven a un estado de oxidación menor, se activan y desfosforilan sustratos. Estas desfosforilaciones acabarían llevando a las rutas de señalización intracelular al estado basal.

## **4.2 PTPN13 y $\beta$ -Catenina en la megacariopoyesis**

### **4.2.1 PTPN13 en la megacariopoyesis**

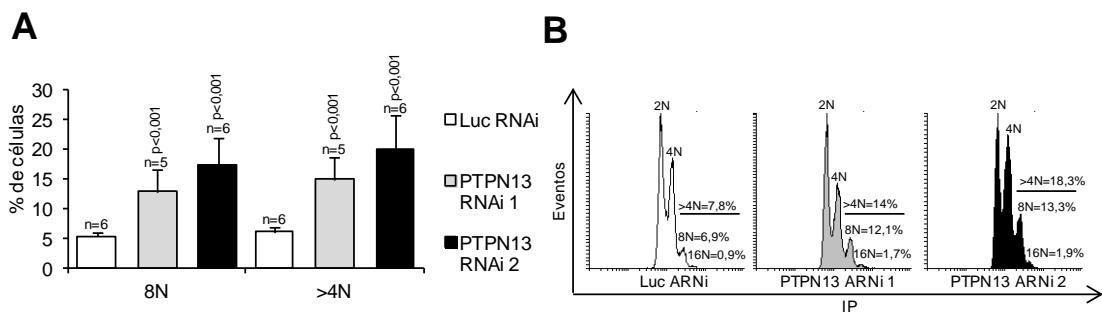
Aunque, como hemos visto, las oxidaciones no ocurren con todas las PTPs de la célula, es obvio, y la biografía así lo acredita, que SHP1 y SHP2 no son las únicas PTPs que intervienen en la diferenciación del megacariocito. Además, la oxidación no es el único mecanismo de regulación de las PTPs. En este sentido, en nuestro laboratorio, hace tiempo que demostramos que PTPN13 se acumulaba en plaquetas (Vidal-Cardalda, 2006) y que está implicada en la diferenciación megacariocítica (Sardina, 2010). En este último trabajo se muestra que la sobreexpresión de PTPN13 inhibe la diferenciación megacariocítica. Células HEL que sobreexpresan PTPN13 presentan una disminución de los niveles de marcadores megacariocíticos CD41 y CD61. Además, células con niveles reducidos de PTPN13 mediante ARNi muestran estos mismos marcadores megacariocíticos aumentados. A continuación voy a mostrar una serie de experimentos que hemos aportado durante la parte experimental de esta memoria de tesis para esclarecer la función de PTPN13 durante la megacariopoyesis.

Para completar el estudio redujimos de nuevo los niveles de PTPN13 siguiendo la misma estrategia que con SHP1 y SHP2, y silenciamos esta proteína con dos construcciones de ARN de interferencia. Como se ve en la figura R.26, logramos reducir los niveles de ARN mensajero y de proteína de PTPN13.



**Figura R.26: Silenciamiento de PTPN13:** A) Los niveles de ARN mensajero de PTPN13 en células HEL infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa (Luc), control, y dos secuencias de silenciamiento de PTPN13 se midieron por RT-qPCR. Las barras muestran la media  $\pm$  la desviación estándar. Los valores de  $p$  representan la significación frente al control (ARNi de Luciferasa). B) Los extractos celulares de estas mismas células se resolvieron en un Western blot y se hibridaron con anticuerpos frente a PTPN13. La GAPDH se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

Para completar el estudio realizado con marcadores, medimos el contenido de ADN durante la megacariopoyesis, ya que, durante este proceso se producen células poliploides (Kanz et al., 1982). Comprobamos que la interferencia de PTPN13 en células HEL, donde se ha inducido la diferenciación megacariocítica por tratamiento con PMA durante 7 días, altera el porcentaje de células poliploides, con respecto a las células control (Figura R.27), en consonancia con un aumento de los marcadores megacariocitos CD61 y CD41 (Sardina, 2010).



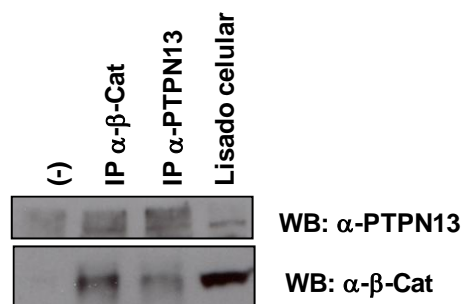
**Figura R.27: El silenciamiento de PTPN13 aumenta la poliploidía.** Utilizando células HEL infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa (Luc), control, y dos secuencias de silenciamiento de PTPN13 y diferenciadas con PMA 20 nM durante 7 días. Se midió el contenido de DNA por tinción con iodo de propidio mediante citometría de flujo. En A) las barras muestran la media  $\pm$  la desviación estándar del porcentaje de células que presentan el contenido de ADN indicado. Los valores de  $p$  representan la significación frente al control (ARNi de Luciferasa). En B) se muestra un experimento representativo donde se indica el porcentaje de células en cada pico de la figura.

Así, las células con una menor expresión de esta proteína presentan un mayor número de células poliploides por encima de 4N. Conviene recordar, como se ha comentado en el apartado de la introducción, que la poliploidía es uno de los aspectos que caracteriza al megacariocito maduro (Kanz et al., 1982). Sabemos que PTPN13 está implicada en la citocinesis y un defecto podría dificultar esta acción, produciéndose una célula poliploide. De

hecho, estos resultados están en sintonía con los obtenidos por (Herrmann et al., 2003), donde demuestran que la sobreexpresión de PTPN13 dificulta la ploidía de células HeLa.

#### 4.2.2 Interacción de PTPN13 Y $\beta$ -Catenina

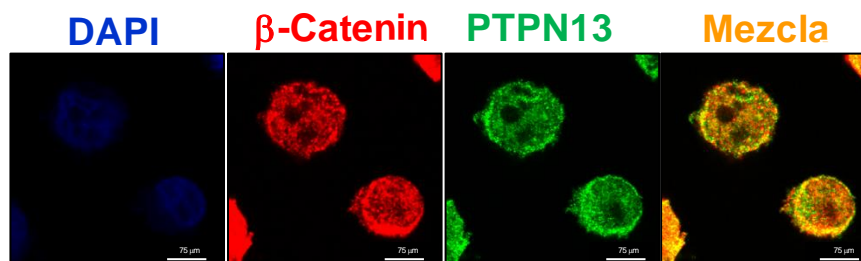
Recientemente se ha relacionado a PTPN13 con  $\beta$ -Catenina en células hematopoyéticas, que expresan BCR-ABL, a través de la modulación que PTPN13 provoca en los niveles de GSK3 $\beta$  (Huang et al., 2013).  $\beta$ -Catenina es una proteína muy interesante sobre la que existe un gran interés y controversia en el contexto de la hematopoyesis (Luis et al., 2012). Como ya hemos dicho en el apartado de introducción, diferentes estrategias experimentales han conducido a diferentes resultados en cuanto al estudio de la  $\beta$ -Catenina en el contexto de la hematopoyesis. La sobreexpresión de  $\beta$ -Catenina en células en HSC provoca que éstas pierdan la capacidad para estar quiescentes y altera la hematopoyesis (Kirstetter et al., 2006), pero la delección en ratones de  $\gamma$ - y  $\beta$ -Catenina no altera la hematopoyesis de estos ratones (Jeannet et al., 2008). Además, como también hemos explicado en la introducción, ambas proteínas pueden unirse a APC, por lo que decidimos comprobar si PTPN13 y  $\beta$ -Catenina formaban parte de un mismo complejo. Para ello, coimmunoprecipitamos PTPN13 y  $\beta$ -Catenina (Figura R.28).



**Figura R.28: PTPN13 y  $\beta$ -Catenina forman parte del mismo complejo.** Extractos celulares de células HEL fueron inmunoprecipitados sin anticuerpos (-), con anticuerpos frente a  $\beta$ -Catenina o frente a PTPN13. A continuación resolvieron en un Western blot y se revelaron con anticuerpos frente a  $\beta$ -Catenina y a PTPN13. El lisado celular se utilizó como control de detección del anticuerpo. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

Como se puede ver, cuando inmunoprecipitamos  $\beta$ -Catenina se puede detectarse señal a la altura de PTPN13, y cuando lo que inmunoprecipitamos es PTPN13 detectamos señal a la altura de  $\beta$ -Catenina. Dado que inmunoprecipitan juntas, estas dos proteínas forman parte del mismo complejo, lo que debería suponer que se localicen en las mismas regiones dentro de la célula. Para demostrarlo realizamos una tinción con inmunofluorescencia. Como se ve en la figura R.29, ambas proteínas presentan una gran colocalización, señal amarilla de solapamiento de los canales rojo y verde.



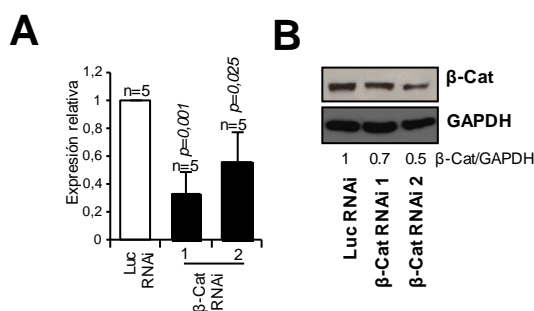


**Figura R.29: PTPN13 y β-Catenina colocalizan.** La localización de PTPN13 y β-Catenina en células HEL fue analizada con anticuerpos específicos frente a PTPN13 y β-Catenina y seguida por fluorescencia. Los núcleos celulares fueron detectados usando DAPI.

Por lo tanto, PTPN13 y β-Catenina forman parte del mismo complejo. Datos de nuestro laboratorio muestran que PTPN13 es capaz de modular la fosforilación de β-Catenina. La reducción de la expresión de PTPN13 produce un aumento de los niveles de fosforilación de β-Catenina en las tirosinas 86 y 654 y en la serina 33. El residuo de serina se debe desfosforilar de manera indirecta porque, como ya hemos dicho, PTPN13 es una tirosina fosfatasa. La fosforilación en la serina 33 la realiza la quinasa GSK3β. La fosforilación en la serina 33 marca a la β-Catenina para su degradación en el proteosoma. Un trabajo reciente ha descrito que PTPN13 es capaz de desfosforilar a GSK3β en la tirosina 216 y esto reduce la actividad de GSK3β, lo que estaría indirectamente afectando a la estabilización de β-Catenina. Este trabajo se realizó en células U937, que se utilizan como modelo de leucemia mielomonocítica (Huang et al., 2013). Por ello nos planteamos discernir si en nuestro sistema ocurría algo parecido. En células en las que habíamos reducido los niveles de PTPN13 mediante ARNi medimos los niveles de fosforilación en la tirosina 216 de la GSK3β. Pese a que los resultados preliminares apuntaban a que la reducción de PTPN13 aumentaba los niveles de fosfoGSK3β, los resultados no se han repetido de manera consistente. Sin embargo, realmente pensamos que este podría ser el mecanismo, aunque debido a la falta de consistencia de estos resultados hemos preferido dejarlos fuera de la presente memoria.

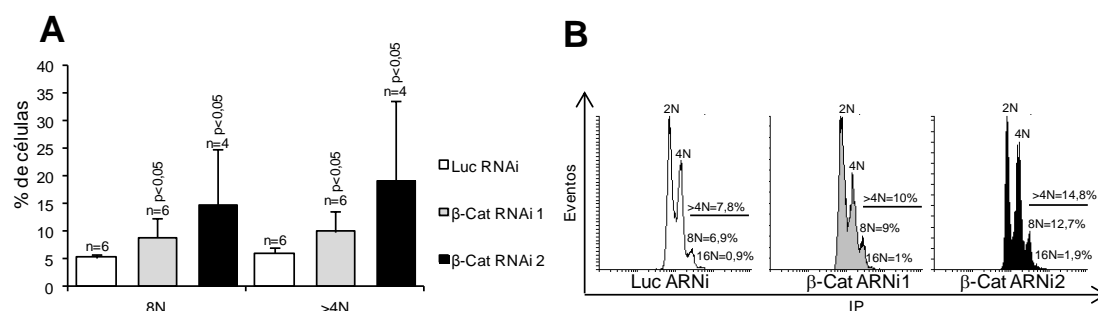
#### 4.2.1 β-Catenina en la megacariopoyesis

No obstante, si PTPN13 interviene en la diferenciación megacariocítica y, además, modula indirectamente la degradación de β-Catenina, β-Catenina también podría estar interviniendo en la megacariopoyesis. Para comprobarlo diseñamos dos secuencias de interferencia dirigidas al mensajero de β-Catenina y, como se puede ver en la figura R.30, conseguimos reducir tanto los niveles de mensajero como los de proteína de β-Catenina en células HEL.



**Figura R.30: Silenciamiento de  $\beta$ -Catenina:** A) Los niveles de mensajero de  $\beta$ -Catenina en células HEL infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa (Luc), control, y dos secuencias de silenciamiento de  $\beta$ -Catenina se midieron por RT-qPCR. Las barras muestran la media  $\pm$  la desviación estándar. Los valores de  $p$  representan la significación frente al control (ARNi de Luciferasa). B) Los extractos celulares de estas mismas células se resolvieron en un Western blot y se hibridaron con anticuerpos frente a  $\beta$ -Catenina. La GAPDH se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

A continuación, al igual que para PTPN13, comprobamos si la interferencia de  $\beta$ -Catenina alteraba la diferenciación megacariocítica. De hecho, datos de nuestro laboratorio mostraban que la interferencia de  $\beta$ -Catenina aumentaba los niveles de marcadores megacariocíticos CD41 y CD61. Para ello medimos el porcentaje de células poliploides (Figura R.31).



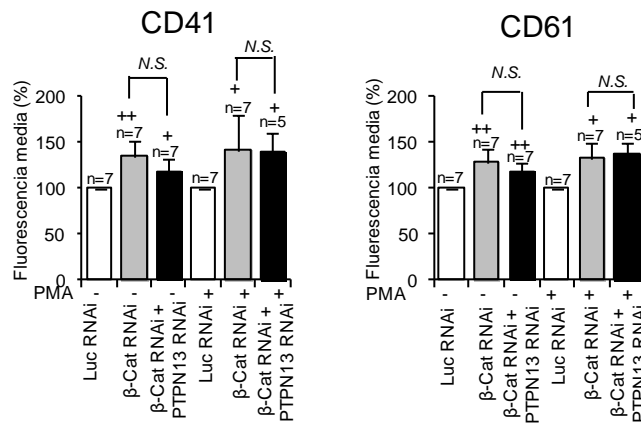
**Figura R.31: El silenciamiento de  $\beta$ -Catenina aumenta la poliploidía.** Utilizando células HEL infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa (Luc), control, y dos secuencias de silenciamiento de  $\beta$ -Catenina ( $\beta$ -CAT) y diferenciadas con PMA 20 nM durante 7 días. Se midió el contenido de DNA por tinción con iodo de propidio mediante citometría de flujo. En A) las barras muestran las medias  $\pm$  la desviación del porcentaje de células que presentan el contenido de ADN indicado. Los valores de  $p$  representan la significación frente al control (ARNi de Luciferasa). En B) se muestra un experimento representativo donde se indica el porcentaje de células en cada pico de la figura.

Como se puede ver, el fenotipo encontrado para la reducción de  $\beta$ -Catenina es muy similar al encontrado cuando reducimos PTPN13. En los dos casos se favorece la diferenciación megacariocítica y, en ambos casos, corrobora lo encontrado en marcadores de diferenciación (Sardina et al., 2014). Este fenotipo similar lo hemos encontrado durante todo el trabajo experimental con PTPN13 y  $\beta$ -Catenina.

Una explicación para que esto ocurra es que la reducción de los niveles de PTPN13 podría provocar un aumento de los niveles de GSK3 $\beta$  fosforilada en la tirosina 216. Esto hace que GSK3 $\beta$  se encuentre más activa, por lo que es capaz de fosforilar con más intensidad a

$\beta$ -Catenina en la Ser33. Esta fosforilación provoca que la  $\beta$ -Catenina se degrade con mayor rapidez, con lo que, en la práctica, una reducción de los niveles de PTPN13 provoca una reducción de los niveles de  $\beta$ -Catenina. Esto haría que un fenotipo similar se produzca cuando reducimos  $\beta$ -Catenina o PTPN13.

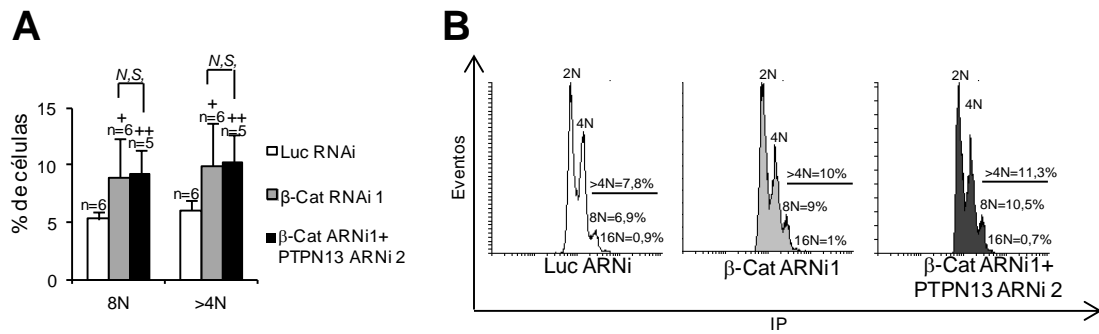
Si lo comentado en el anterior párrafo es correcto, ambas proteínas trabajan en la misma ruta de señalización, por lo que, la reducción de los niveles de PTPN13, en células que previamente ya tenían reducida la expresión de  $\beta$ -Catenina, no debería aumentar el de las células de partida, que presentan niveles reducidos de  $\beta$ -Catenina. Para comprobar esta hipótesis, en células donde ya se había reducido la expresión de  $\beta$ -Catenina, se redujo a continuación la expresión de PTPN13 (descritas en Sardina et al., 2014). Los resultados para marcadores megacariocíticos se muestran en la figura R.32.



**Figura R.32: El doble silenciamiento de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina no aumenta el fenotipo conseguido por el silenciamiento de  $\beta$ -Catenina.** Células HEL con silenciamiento de  $\beta$ -Catenina fueron infectadas nuevamente con lentivirus con la construcción de silenciamiento de PTPN13 y diferenciadas o no con PMA 20 nM durante 48 h como se indica en la figura. Los marcadores de superficie CD41a y CD61 se midieron con anticuerpos fluorescentes específicos mediante citometría de flujo. Las barras muestran la media  $\pm$  la desviación estándar.  $+p < 0,05$ ,  $++p < 0,01$ ,  $+++p < 0,001$  representan la significación frente al control (ARNi de Luciferasa, columna blanca). No se encontraron diferencias entre la columna gris, interferencia para  $\beta$ -Catenina con respecto a la columna negra doble interferencia  $\beta$ -Catenina y PTPN13.

Como se puede ver en la figura superior, tanto para células no estimuladas como para células en las que se indujo la diferenciación megacariocítica con PMA, los niveles de marcadores, cuando interferimos las dos proteínas en la mismas células (columna negra), son superiores a la columna blanca, células control, transducidas con la secuencia que reduce los niveles de Luciferasa; pero no lo son con respecto a la columna gris, las células que tienen interferida la  $\beta$ -Catenina y que se usaron para generar las doblemente interferidas,  $\beta$ -Catenina y PTPN13. Esto, que en esta figura se puede observar con marcadores de superficie típicamente megacariocíticos, también lo observamos cuando medimos el porcentaje de células poliploides después de una estimulación de 7 días con PMA. El porcentaje de células

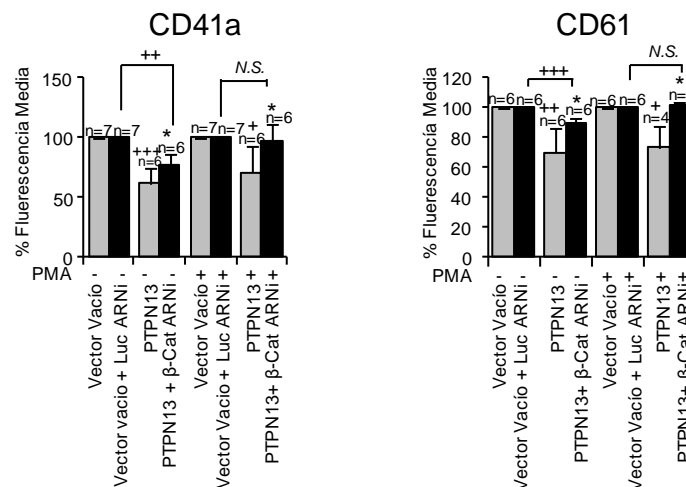
con contenido de ADN superior a 4N es muy similar cuando interferimos  $\beta$ -Catenina que cuando interferimos las dos proteínas a la vez. (Figura R.33).



**Figura**

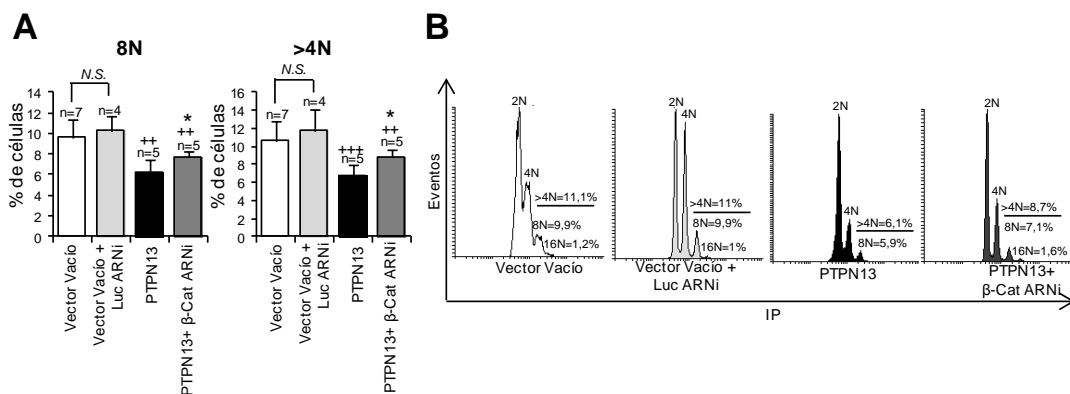
**R.33: El doble silenciamiento de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina no aumenta la poliploidía conseguida por el silenciamiento de  $\beta$ -Catenina.** Células HEL con silenciamiento de  $\beta$ -Catenina fueron infectadas nuevamente con lentivirus con la construcción de silenciamiento de PTPN13 y diferenciadas con PMA 20 nM durante 7 días. Se midió el contenido de DNA por tinción con yoduro de propidio mediante citometría de flujo. En A) las barras muestran las medias  $\pm$  la desviación del porcentaje de células que presentan el contenido de ADN indicado. Los valores de *p* representan la significación frente al control (ARNi de Luciferasa). No se encontraron diferencias entre la columna gris, interferencia para  $\beta$ -Catenina, con respecto a la columna negra, doble interferencia  $\beta$ -Catenina y PTPN13. En B) se muestra un experimento representativo donde se indica el porcentaje de células en cada pico de la figura.

Además de esto, dado que conocíamos que la sobreexpresión de PTPN13 produce un fenotipo inverso a la interferencia de esa proteína (Sardina, 2010), intentamos comprobar si al introducir la interferencia de  $\beta$ -Catenina, que en nuestro modelo estaría por debajo de PTPN13 en la ruta de señalización, en células que sobreexpresaban PTPN13 se rescataba el fenotipo que producía la sobreexpresión de PTPN13 (estas células están descritas en (Sardina et al., 2014)). Aunque, cuando no inducimos la diferenciación megacariocítica, los niveles de marcadores megacariocíticos CD41 y CD61 no se recuperan totalmente, estos niveles sí que están por encima de los detectados cuando sobreexpresamos PTPN13. (Columna negra vs gris, (Figura R.34)). El rescate es total cuando inducimos la diferenciación megacariocítica con PMA.



**Figura R.34: El silenciamiento de  $\beta$ -Catenina en células que sobreexpresan PTPN13 rescata el fenotipo provocado por la sobreexpresión de PTPN13.** Células HEL con sobreexpresión de PTPN13 se infectaron nuevamente con lentivirus con la construcción de silenciamiento de  $\beta$ -Catenina ( $\beta$ -Cat) y se diferenciaron o no con PMA 20 nM durante 48 h como se indica en la figura. Los marcadores de superficie CD41a y CD61 se midieron con anticuerpos fluorescentes específicos mediante citometría de flujo, las barras muestran la media  $\pm$  la desviación estándar. ++= $p < 0,01$ , +++= $p < 0,001$  representan la significación frente a los controles \*= $p < 0,05$  representa las diferencias encontradas entre sobreexpresión de PTPN13 + interferencia de  $\beta$ -Catenina y las células con sobreexpresión para PTPN13 (columnas negras frente a la gris).

Un rescate parcial también se produce cuando medimos el porcentaje de células poliploides tras siete días de estimulación con PMA. El número de células poliploides (>4N) es superior en células donde se interfiere  $\beta$ -Catenina, donde ya estaba aumentada la expresión de PTPN13 con respecto a las células donde solo se había sobreexpresado PTPN13. (Figura R.35).



**Figura**

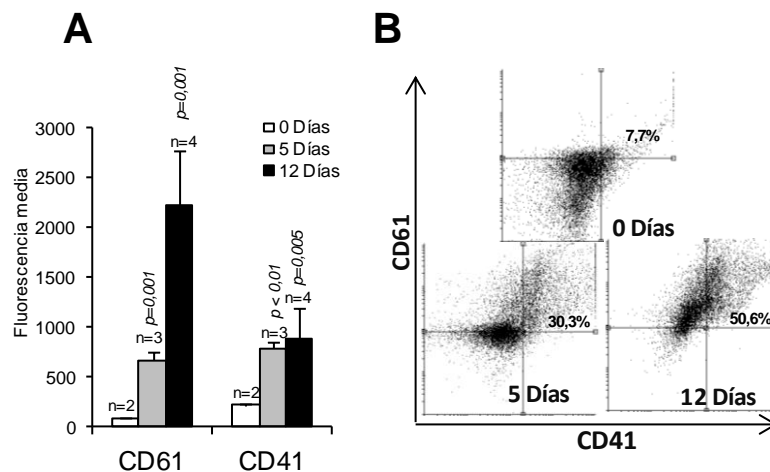
**R.35: El silenciamiento de  $\beta$ -Catenina en células que sobreexpresan PTPN13 rescata parcialmente el defecto en la ploidía provocado por la sobreexpresión de PTPN13.** Células HEL con sobreexpresión de PTPN13 se infectaron nuevamente con lentivirus con la construcción de silenciamiento de  $\beta$ -Catenina y se diferenciaron PMA 20 nM durante 7 días. Se midió el contenido de DNA por tinción con yoduro de propidio mediante citometría de flujo. En A) las barras muestran las medias  $\pm$  la desviación estándar del porcentaje de células que presentan el contenido de ADN indicado. No se encontraron diferencias entre la columna gris clara, vector vacío de sobreexpresión + interferencia de Luciferasa, con respecto a la columna blanca, vector vacío de sobreexpresión. ++= $p < 0,01$ , +++= $p < 0,001$  representa la significación con respecto a los controles. \*= $p < 0,05$  representa diferencias entre la columna negra, sobreexpresión de PTPN13, con respecto a la columna gris oscura, sobreexpresión de PTPN13 + interferencia de  $\beta$ -Catenina. En B) se muestra un experimento representativo donde se indica el porcentaje de células en cada pico de la figura.

En este caso, y no como ocurre en el caso de los marcadores, el fenotipo no se recupera de forma total. Esto podría ser debido a la implicación que PTPN13 tiene en la mitosis y citocinesis, y que una alteración de ésta, por sobreexpresión de PTPN13, entorpezca el rescate que debería producir la  $\beta$ -Catenina, porque la implicación de PTPN13 en citocinesis no esté relacionada con la  $\beta$ -Catenina (Herrmann et al., 2003) o porque PTPN13 puede tener funciones independientes de  $\beta$ -Catenina. Con todos estos datos podemos afirmar que PTPN13 y  $\beta$ -Catenina actúan como reguladores negativos de la megacariopoyesis, que forman parte de un mismo complejo y que PTPN13 regula los niveles de  $\beta$ -Catenina, formando ambas parte de la misma ruta de señalización.

#### 4.2.4 $\beta$ -Catenina y PTPN13 en la diferenciación megacariocítica *ex vivo*.

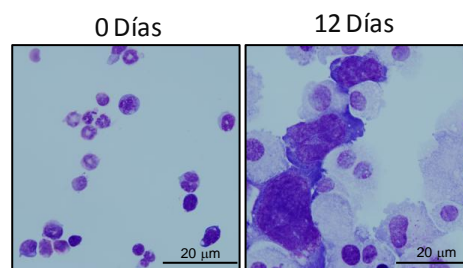
A continuación quisimos comprobar si los efectos, al reducir los niveles de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina, en células HEL tenían una equivalencia sobre células primarias de ratón. Para

validar este modelo cultivamos, durante diferentes tiempos, progenitores hematopoyéticos de ratón con mTPO. Como ya hemos comentado, la TPO es la citoquina fundamental que dirige la formación de megacariocitos. Además, añadimos al medio mL1 $\beta$  que mejora la supervivencia de las células. Comprobamos que a día 5 y día 12, la fluorescencia media, debida a la expresión de marcadores megacariocitos, aumentaba para los dos marcadores estudiados. Y de hecho, el porcentaje de células que expresan CD61/CD41 al mismo tiempo también estaba aumentado (Figura R.36).



**Figura R.36: Diferenciación megacariocítica *in vitro* de células Lin-.** Células de la médula ósea de ratones C57BL/6 se enriquecieron en células Lin-. Estas células se cultivaron con mTPO 100 ng/ml y mL1 $\beta$  10 ng/ml durante los tiempos que se indican en la figura. Los marcadores de superficie CD41 y CD61 se midieron con anticuerpos fluorescentes específicos mediante citometría de flujo. En A) las barras muestran la media  $\pm$  la desviación estándar. Los valores de  $p$  representan la significación frente al control (0 días). En B) se muestra un experimento representativo donde se indica el porcentaje de células dobles positivas representadas en el cuadrante superior derecho.

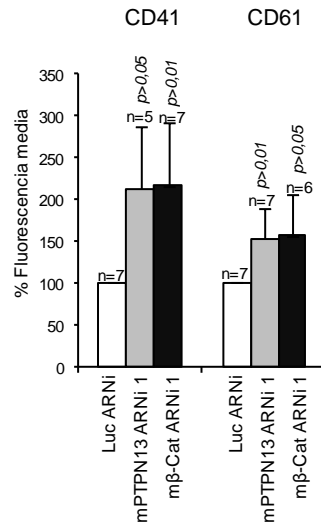
Además, con la tinción de May-Grünwald-Giemsa, a los 12 días de cultivo se puede observar como un gran número de células presenta un fenotipo claramente megacariocítico, es decir, células con un gran citoplasma y núcleos polilobulados. (Figura R.37).



**Figura R.38: Morfología de células Lin- sometidas a diferenciación megacariocítica *in vitro*.** Células de la médula ósea de ratones C57BL/6 se enriquecieron en células Lin-. Estas células se cultivaron con mTPO 100 ng/ml y mL1 $\beta$  10 ng/ml durante 12 días. Las células se tiñeron con el método May-Grünwald-Giemsa.

A la vista de estos resultados, pensamos que este modelo puede ser utilizado para estudiar la megacariopoyesis *ex vivo* y, más concretamente, para comprobar si  $\beta$ -Catenina y/o PTPN13 están jugando un papel en la megacariopoyesis, como indican los resultados de

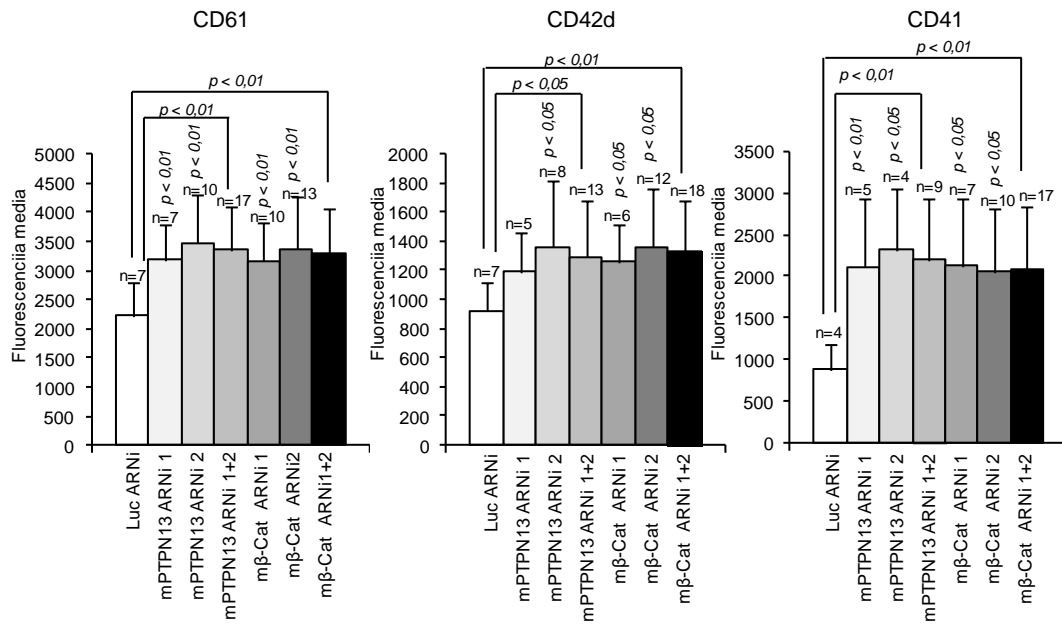
células HEL. Para ello, comprobamos si células cultivadas en estas condiciones, a las que les hemos reducido los niveles de una de estas proteínas, tienen afectada la expresión marcadores megacariocitos (Figura R.39).



**Figura R.38: El silenciamiento de PTPN13 o  $\beta$ -Catenina aumenta la diferenciación megacariocítica de células Lin- a los 5 días de diferenciación.** Células de la médula ósea de ratones C57BL/6 se enriquecieron en células Lin-. Estas células fueron infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, o una secuencia de silenciamiento de mPTPN13, o una secuencia de silenciamiento de m  $\beta$ -Catenina. Se cultivaron con mTPO 100 ng/ml y mL1 $\beta$  10 ng/ml durante 5 días. Los marcadores de superficie CD41 y CD61 se midieron con anticuerpos fluorescentes específicos mediante citometría de flujo. Las barras muestran la media  $\pm$  la desviación estándar. Los valores de *p* representan la significación frente al control (Luc ARNi).

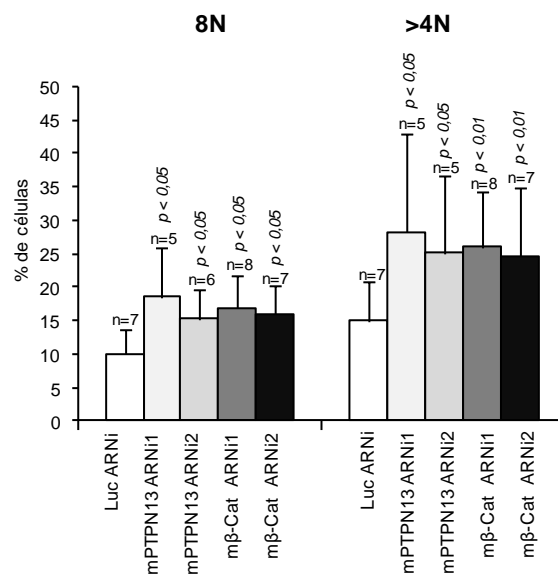
A los 5 días de cultivo en las condiciones anteriores, encontramos que tanto la reducción de PTPN13 como la de  $\beta$ -Catenina provocan un aumento de los marcadores megacariocíticos CD61 y CD41 con respecto a las células control. No se observaban diferencias en el marcador CD42d, no mostrado.

Permitiendo discurrir la diferenciación megacariocítica, en las condiciones descritas, durante 12 días, también observamos aumento de otro marcador megacariocítico, el CD42d, además de aumentos en CD41 y CD61 que ya observábamos a los 5 días de diferenciación (Figura R.38).



**Figura R.39: El silenciamiento de PTPN13 o β-Catenina aumenta la diferenciación megacariocítica de células Lin- a los 12 días de diferenciación.** Células de la médula ósea de ratones C57BL/6 se enriquecieron en células Lin-. Estas células fueron infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, dos secuencias de silenciamiento de mPTPN13, o dos secuencias de silenciamiento de m β-Catenina. Se cultivaron con mTPO 100 ng/ml y mL1β 10 ng/ml durante 12 días. Los marcadores de superficie CD41, CD42d y CD61 se midieron con anticuerpos fluorescentes específicos mediante citometría de flujo. Las barras muestran la media ± la desviación estándar. Los valores de *p* representan la significación frente al control (Luc ARNi).

Este aumento de la diferenciación megacariocítica, seguido gracias a los marcadores megacariocíticos de superficie, se vio correlacionado con el porcentaje de células poliploides (Figura R.40). El número de células poliploides aumentó significativamente cuando introdujimos una secuencia de interferencia para PTPN13 o β-Catenina.

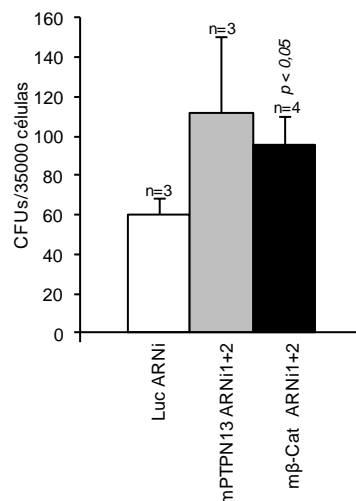


**Figura R.40: El silenciamiento de PTPN13 o β-Catenina aumenta el porcentaje de células poliploides de células Lin- a los 12 días de diferenciación.** Células de la médula ósea de ratones C57BL/6 se enriquecieron en células Lin-.



fueron infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, dos secuencias de silenciamiento de mPTPN13, o dos secuencias de silenciamiento de m  $\beta$ -Catenina. Se cultivaron con mTPO 100 ng/ml y mL1 $\beta$  10 ng/ml durante 12 días. Se midió el contenido de DNA por tinción con yoduro de propidio mediante citometría de flujo. Las barras muestran la media  $\pm$  la desviación estándar del porcentaje de células que presentan el contenido de ADN indicado. Los valores de *p* representan la significación frente al control (Luc ARNi).

Por último, otra aproximación, para abordar el estudio de la megacariopoyesis *ex vivo*, es la aparición de unidades formadoras de colonias en un medio semisólido. Células Lin- de ratón, transducidas con el plásmido de elección, se sembraron y cultivaron en un medio semisólido suplementado con mTPO y mL1 $\beta$  durante 14 días. Después del recuento de colonias GFP+, al microscopio y con luz ultravioleta, observamos que el número de éstas en los pocillos donde las células habían sido transducidas con secuencias con interferencia para PTPN13 o  $\beta$ -Catenina, era mayor a los pocillos control, aunque para PTPN13 esta diferencia no es significativa. (Figura R.41).



**Figura R.41: El silenciamiento de  $\beta$ -Catenina aumenta el número de unidades formadoras de colonias a los 14 días de diferenciación.** Células de la médula ósea de ratones C57BL/6 se enriquecieron en células Lin-. Estas células fueron infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa (Luc), control, o dos secuencias de silenciamiento de mPTPN13, o dos secuencias de silenciamiento de m  $\beta$ -Catenina (m $\beta$ -Cat). Se cultivaron con mTPO 100 ng/ml y mL1 $\beta$  10 ng/ml durante 14 días en medio semisólido. Las colonias fueron contadas bajo fluorescencia azul para detectar el color verde de la GFP. Las barras muestran la media  $\pm$  la desviación estándar. Los valores de *p* representan la significación frente al control (Luc ARNi).

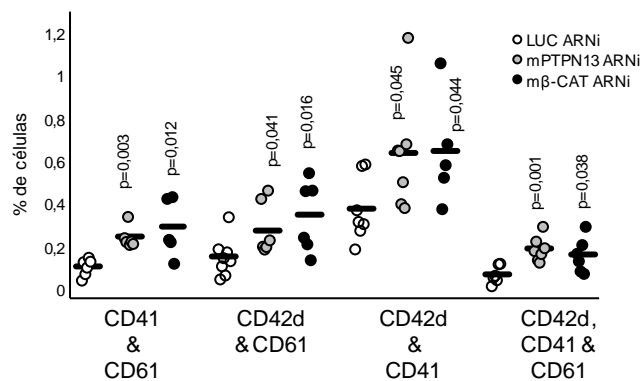
Con los datos expuestos en la presente memoria, además de otros resultados anteriores de nuestro laboratorio, acabamos de publicar un trabajo en el que presentamos a PTPN13 como regulador de la señalización celular y la función de  $\beta$ -Catenina en la diferenciación megacariocítica (Sardina et al., 2014).

### **4.3 PTPN13 y $\beta$ -Catenina en la hematopoyesis in vivo**

#### **4.3.1 Estudio de PTPN13 y $\beta$ -Catenina en la megacariopoyesis in vivo.**

Como hemos dicho, el papel de la  $\beta$ -Catenina en la hematopoyesis es controvertido. Diferentes modelos animales donde se sobreexpresa  $\beta$ -Catenina detectan alteración en la

hematopoyesis y, sin embargo, otro autores aseguran que la delección de esta proteína no produce ningún efecto (Kirstetter et al., 2006; Jeannet et al., 2008). Nuestros resultados sugieren un papel de  $\beta$ -Catenina en la megacariopoyesis, al menos *ex vivo*. Por ello, nos preguntamos si, en un entorno fisiológico, la actuación de  $\beta$ -Catenina podría ser relevante. Así, células Lin<sup>-</sup> fueron transducidas con lentivirus que contenían la secuencia de ARNi para Luciferasa (control) o mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina. Después de 24 horas se introdujeron por vía intravenosa, vena safena de la cola, en ratones C57BL/6 irradiados letalmente 6 y 4 horas antes del trasplante con una dosis de 5 Gy. Ocho semanas después se llevó a cabo el análisis de la hematopoyesis en los ratones trasplantados. Se extrajeron las células de la médula ósea y se marcaron con marcadores megacariocíticos. Para el análisis se utilizaron únicamente las células que emitían fluorescencia verde gracias a la GFP. A pesar de que los megacariocitos son células muy escasas, conseguimos detectar la expresión de marcadores megacariocíticos en la médula ósea de estos ratones (Figura R.42).

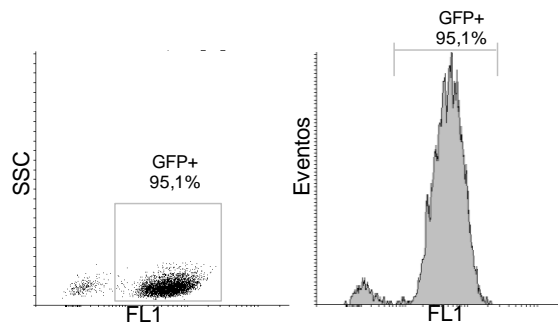


**Figura R.42: El silenciamiento de PTPN13 o  $\beta$ -Catenina aumenta la diferenciación megacariocítica *in vivo*.** Se muestra el análisis de las células de la médula ósea de los ratones trasplantados mediante marcadores de superficie CD41, CD42d y CD61 por citometría de flujo. Los valores de *p* representan la significación frente al control (Luc ARNi).

Según se puede ver en la figura R.42, la introducción de un RNAi contra m $\beta$ -Catenina o mPTPN13 aumenta los niveles de marcadores megacariocíticos. Así, aumenta significativamente la proporción de células que son positivas para CD41/CD61, CD42d/CD41, CD42d/CD61 y el porcentaje de células que expresan los tres marcadores a la vez. Por ello, el silenciamiento de ambas proteínas estaría acelerando la diferenciación megacariocítica. PTPN13 ha sido implicado en la diferenciación de adipocitos. Los niveles de mPTPN13 durante la diferenciación de adipocitos aumentan. Y la reducción de la expresión de mPTPN13, tanto en la línea celular 3T3-L1 como en fibroblastos embrionarios de ratón, suprime la diferenciación de adipocitos (Glondou-Lassis et al., 2009). Estos datos, junto a los mostrados en esta memoria, indican que PTPN13 puede ser un importante regulador de diferentes tipos de diferenciación celular.

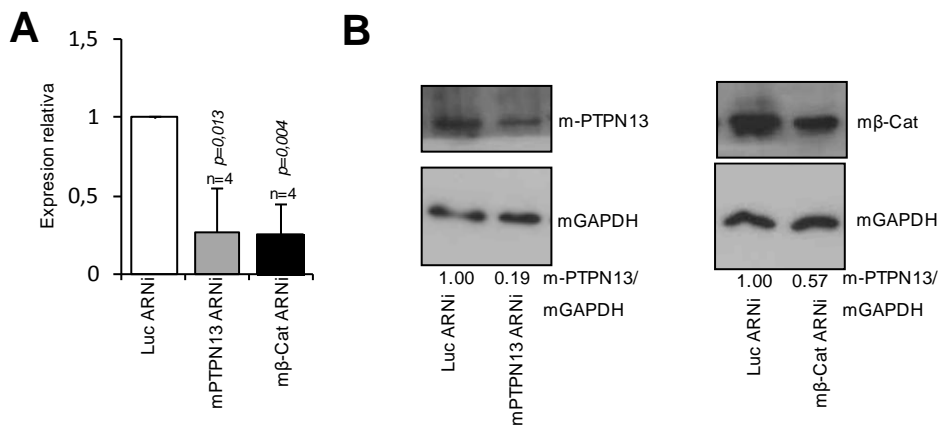
### 4.3.2 Análisis de la reducción de los niveles de expresión de $\beta$ -CATENINA y PTPN13 IN VIVO en los diferentes linajes celulares sanguíneos.

Aunque las secuencias de ARNi que hemos utilizado ya habían sido validadas previamente en líneas celulares de ratón (Sardina et al., 2014), quisimos comprobar si la interferencia se seguía produciendo en el contexto del modelo animal. Para ello purificamos las células de bazo que expresaban GFP de ratones que habían sido trasplantados con células Lin<sup>-</sup> que contenían las diferentes construcciones (Figura R.43). Hemos obtenido enriquecimientos del más del 95% de células GFP<sup>+</sup>.



**Figura R.43: Porcentaje de enriquecimiento de células GFP<sup>+</sup>.** Las células GFP<sup>+</sup> del bazo de los ratones trasplantados se separaron en un separador FASCaria. El porcentaje de células positivas después de la separación se midió en el mismo aparato. Los porcentajes indican el número de células dentro de la caja o en el pico (células GFP<sup>+</sup>).

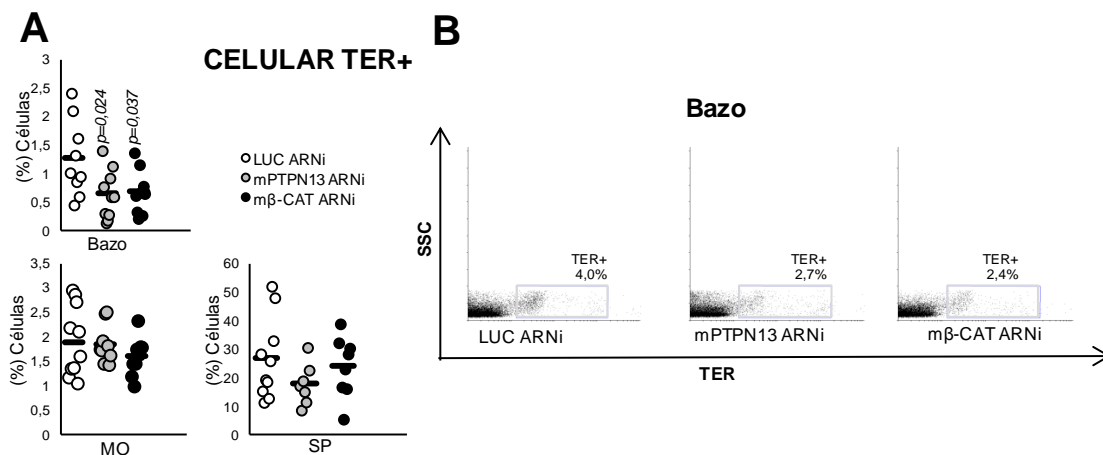
En estas células medimos los niveles de ARNm, tanto de PTPN13 como de  $\beta$ -Catenina, por RT-qPCR a tiempo real (Figura R.44A). También hemos medido los niveles de proteína mediante transferencia en western (Figura R.44B).



**Figura R.44: Silenciamiento de mPTPN13 y  $\beta$ -Catenina.** Células de la médula ósea de ratones C57BL/6 se enriquecieron en células Lin<sup>-</sup>. Estas células fueron infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa (Luc), control, o una secuencia de silenciamiento de mPTPN13, o una secuencia de silenciamiento de m $\beta$ -Catenina (m $\beta$ -Cat). 8 semanas después del trasplante se extrajo el bazo y se purificaron las células GFP<sup>+</sup>. En A) los niveles de mensajero se midieron por RT-qPCR. Las barras muestran la media  $\pm$  la desviación estándar. Los valores de *p* representan la significación frente al control (Luc ARNi). En B) los extractos celulares de estas mismas células se resolvieron en transferencia de Western y se detectaron con anticuerpos frente a PTPN13 o  $\beta$ -Catenina. La GAPDH se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

Se puede ver que conseguimos reducir tanto los niveles de ARNm como de proteína para m $\beta$ -Catenina y mPTPN13.

Como ya se ha comentado en el apartado de introducción de la presente memoria de tesis, los megacariocitos se forman en el linaje mieloide a partir del progenitor eritromegacariocítico (Revisado en (Kaushansky, 2006)). A partir de aquí las células se comprometerán hacia megacariocitos o hacia eritrocitos. Por ello nos pareció interesante estudiar si la reducción de los niveles de m $\beta$ -Catenina o mPTPN13 tenía algún efecto en el linaje eritroide. (Figura R.45).

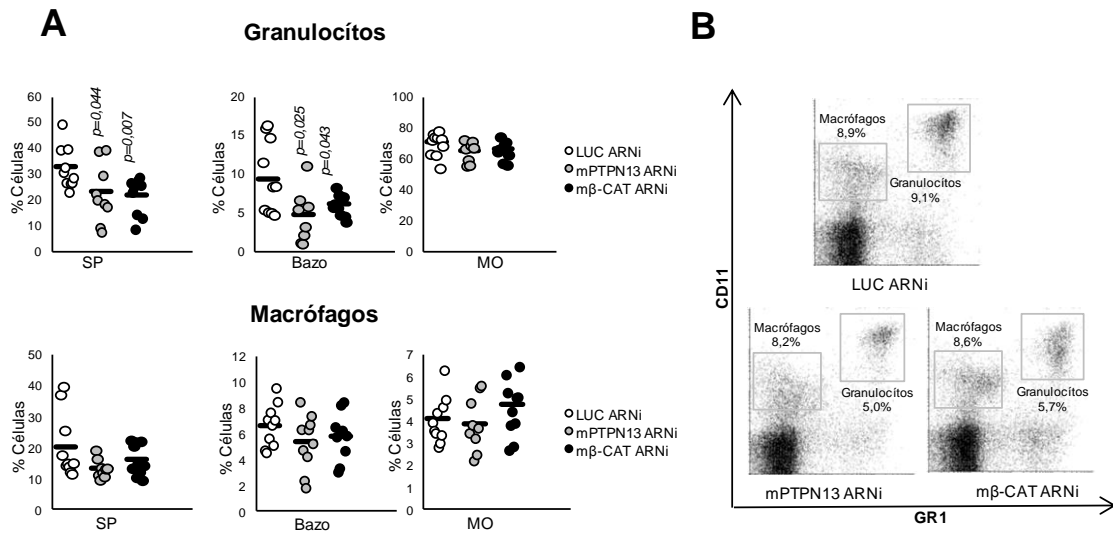


**Figura R.45: El silenciamiento de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina reduce el número de células eritroides bazo.** El análisis de las células eritroides de los diferentes compartimentos de los ratones trasplantados se realizó mediante el marcador de superficie TER por citometría de flujo. A) Los valores de  $p$  representan la significación frente al control (Luc ARNi). B) Se muestra un experimento representativo.

Hemos encontrado evidencias de una reducción en el porcentaje de células Ter+, que es significativa en el bazo de los ratones con niveles reducidos de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina, aunque no hemos visto esta reducción en la medula ósea o la sangre periférica. Por tanto, estos datos, junto a los de la figura R.42, sugieren que mPTPN13 y m $\beta$ -Catenina estarían actuando a nivel del progenitor eritromegacariocítico (MEP), e intervienen en la decisión que este debe tomar de diferenciarse a eritrocitos o megacariocitos.

Por encima del MEP se sitúa el progenitor mieloide común (CMP). El CMP es el encargado de generar todas las estirpes de la línea mieloide. Como ya habíamos caracterizado los megacariocitos y los eritrocitos, para completar el estudio de la línea mieloide bastaba con analizar lo que ocurre con los monocitos/macrófagos y los distintos granulocitos. Para ello marcamos las células con CD11b y GR-1. Las células que expresan CD11B+/GR1- son los macrófagos, y las dobles positivas CD11B+/GR1+ son los granulocitos. Estudiamos estas células, en los mismos compartimentos que los eritrocitos, y encontramos

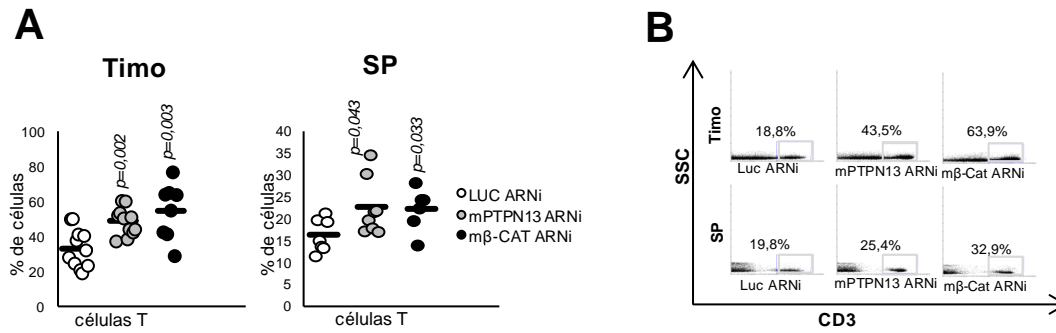
que los granulocitos están reducidos a la baja en bazo y sangre periférica, mientras no lo están en la médula ósea de los ratones con el ARNi de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina. (Figura R.46).



**Figura R.46: Efecto del silenciamiento de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina en la diferenciación de granulocitos y macrófagos.** Se muestra el análisis de las células de los diferentes compartimentos de los ratones trasplantados mediante los marcadores de superficie CD11 y GR1 por citometría de flujo. A) Los valores de  $p$  representan la significación frente al control (Luc ARNi). B) Se muestra un experimento representativo.

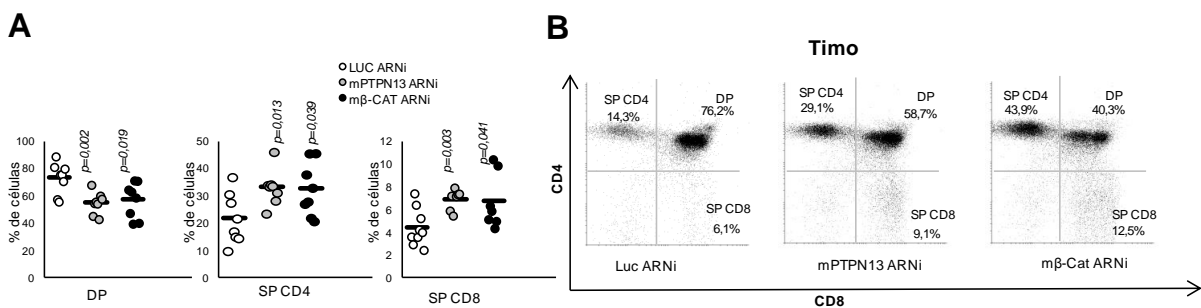
Además, los macrófagos muestran una tendencia a disminuir con la interferencia de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina al menos en sangre periférica y bazo, aunque esta bajada no es significativa. Estos datos, en su conjunto, ponen de manifiesto que, tanto mPTPN13 como m $\beta$ -Catenina, podrían tener un efecto parecido en la hematopoyesis, probablemente porque trabajan juntas, como ya hemos demostrado en nuestro grupo para el contexto de la diferenciación megacariocítica (Sardina et al., 2014). Por otro lado, parecen estar trabajando como reguladores negativos de la megacariopoyesis *in vivo* y, en general, contribuirían a la decisión que debe tomar el CMP en declinarse a la línea eritromegacariocítica o granulomonocítica.

Para terminar de analizar todos los linajes sanguíneos decidimos analizar los linfocitos. En primer lugar nos centramos en los linfocitos T, donde observamos que las células CD3 aumentaban significativamente cuando reducimos los niveles de PTPN13 o m $\beta$ -Catenina. (Figura R.47).



**Figura R.47: El silenciamiento de mPTPN13 o mβ-Catenina incrementa el porcentaje de linfocitos T en el timo.** Se muestra el análisis de las células de los diferentes compartimentos que se realizó 8 semanas después del trasplante mediante el marcador de superficie CD3 por citometría de flujo. A) Los valores de  $p$  representan la significación frente al control (Luc ARNi). B) Se muestra un experimento representativo.

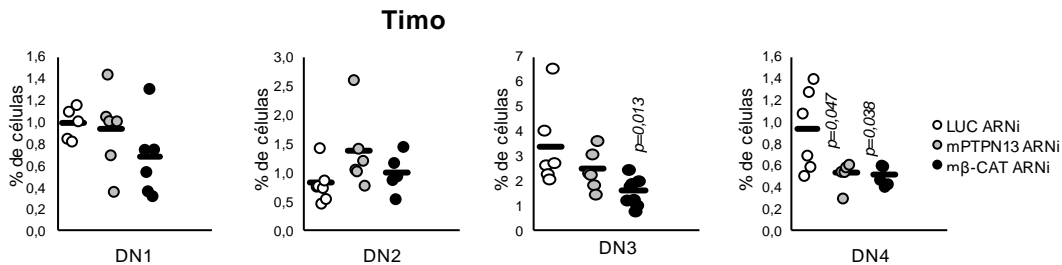
Además, dependiendo del complejo que expresen, los linfocitos T se pueden diferenciar en células CD4 y CD8. Los linfocitos T CD4, llamados también linfocitos T cooperadores, se encargan de iniciar la cascada de la respuesta inmune. Los linfocitos T CD8, llamados también linfocitos T citotóxicos, se encargan de reconocer células infectadas con el patógeno y destruirlas. Por ello, un marcaje con CD4 y CD8 conjunto nos da idea de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T que existen en el timo (Penit et al., 1995). Quisimos comprobar si estas poblaciones se alteraban con la interferencia de mPTPN13 o de mβ-Catenina. (Figura R.48).



**Figura R.48: El silenciamiento de mPTPN13 o mβ-Catenina acelera la diferenciación terminal de linfocitos T.** Se muestra el análisis de las células del timo de los ratones trasplantados que se realizó con los marcadores de superficie CD4 y CD8 por citometría de flujo. A) Los valores de  $p$  representan la significación frente al control (Luc ARNi). B) Se muestra un experimento representativo.

Cuando comparamos las diferentes poblaciones comprobamos que, tanto los linfocitos T CD4 como los linfocitos T CD8, se encuentran incrementados. Además, mientras esto sucede, disminuyen las células que expresan ambos marcadores. Por lo tanto, parece que se acelera la diferenciación de este linaje celular cuando reducimos los niveles de mPTPN13 o mβ-Catenina, al igual que ocurre con los megacariocitos. Durante la maduración de los linfocitos T, los progenitores de estas células no expresan ni CD4 ni CD8. Estas células son las más inmaduras dentro de los linfocitos T y pasan por una serie de etapas que se pueden

caracterizar fácilmente mediante marcadores de superficie. Son considerados dobles negativos (DN), no expresan CD4 y CD8, sin embargo expresan en orden preciso y determinado CD25 y CD44 (Penit et al., 1995). Así, tenemos 4 etapas, DN1 (CD25-/CD44+), DN2 (CD25+/CD44+), DN3 (CD25+/CD44-), DN4 (CD25-/CD44-). La caracterización de estas etapas se puede ver en la figura R.49.

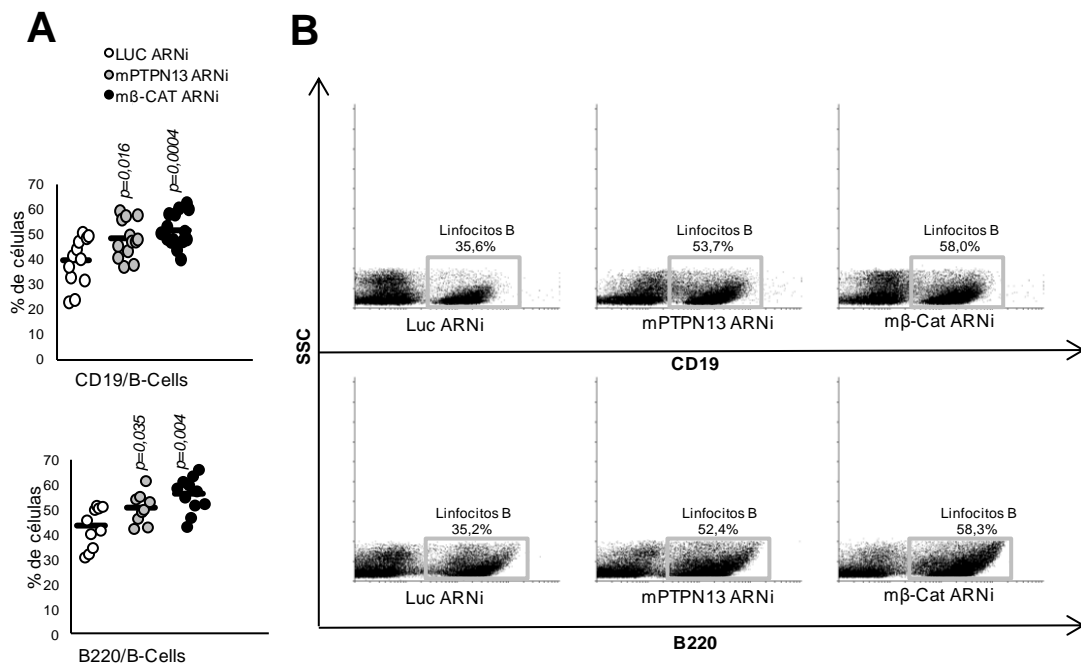


**Figura R.49: Efecto del silenciamiento de mPTPN13 o mβ-Catenina durante los estadios iniciales de la diferenciación de linfocitos T.** Se muestra el análisis de las células del timo de los ratones trasplantados que se realizó con los marcadores de superficie CD4, CD8, CD25 y CD44 por citometría de flujo, para diferenciar los distintas etapas de diferenciación de linfocitos T: DN1 (CD25-/CD44+), DN2 (CD25+/CD44+), DN3 (CD25+/CD44-) y DN4 (CD25-/CD44-). Todas estas poblaciones ellos son CD4-/CD8-. Los valores de *p* representan la significación frente al control (Luc ARNi).

Encontramos que, en las últimas etapas de la maduración inicial de linfocitos T, hay significativamente un menor número de células cuando interferimos la expresión de mPTPN13 o mβ-Catenina. Esto confirmaría, junto con la reducción del porcentaje de células DP (Figura R.49), que se produce una aceleración en el proceso de diferenciación que conduce a una acumulación de linfocitos T funcionales, ya sean CD4 o CD8 (Figura R.49). Hace ya algún tiempo que se relacionó a mPTPN13 con los linfocitos T. En concreto, las células del timo de ratones con delección de mPTN13 cultivadas *in vitro* presentan una mayor diferenciación de linfocitos T CD4 (Nakahira et al., 2007). Aunque la implicación de mβ-Catenina en la hematopoyesis es más controvertida, también hay trabajos que ponen de manifiesto su importancia en la línea linfoide. Por ejemplo, la sobreexpresión de una forma estable de β-Catenina en ratón provoca un bloqueo de los linfocitos T en fase DN1, y la expresión de una forma de β-Catenina activa en el sistema hematopoyético de ratón provoca una acumulación de los linfocitos T en fase DN (Kirstetter et al., 2006; Scheller et al., 2006). Estos resultados, junto con los nuestros, apoyan la idea de que mPTPN13 y mβ-Catenina modulan la diferenciación de los linfocitos T en la hematopoyesis *in vivo*.

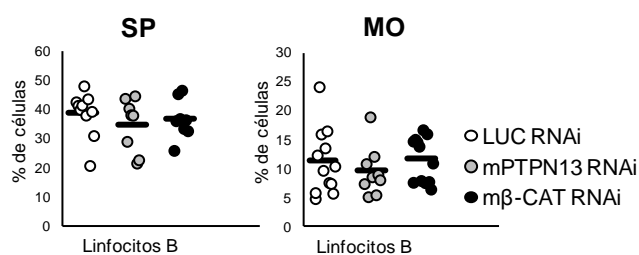
Para terminar de caracterizar las alteraciones que se producen por la interferencia de mPTPN13 o mβ-Catenina en la hematopoyesis de ratón, necesitábamos analizar lo que ocurría con los linfocitos B. Los linfocitos B pueden ser diferenciados fácilmente porque, desde muy temprano en su proceso de diferenciación, expresan los marcadores de superficie CD19 y B220 (Nadler et al., 1983). Utilizando estos marcadores, encontramos un aumento de

las células que expresan tanto CD19 como B220 en las células con interferencia para mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina en bazo (Figura R.50).



**Figura R.50: El silenciamiento de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina incrementa el porcentaje de linfocitos B en bazo.** Se muestra el análisis de las células del bazo de los ratones trasplantados que se realizó con los marcadores de superficie CD19 y B220 por citometría de flujo. A) Los valores de  $p$  representan la significación frente al control (Luc ARNi). B) Se muestra un experimento representativo.

Los porcentajes de ambos marcadores son muy parecidos, como se puede observar en la figura. Por ello, en sangre periférica y médula ósea, solo analizamos el porcentaje de células que expresan el marcador CD19 sin encontrar diferencias significativas. (Figura R.51).

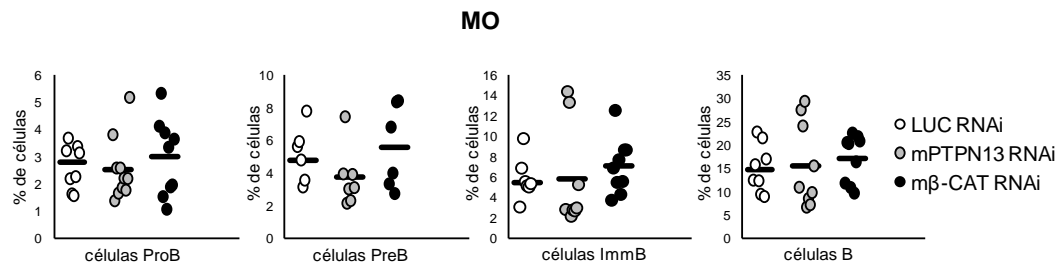


**Figura R.51: El silenciamiento de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina no altera el porcentaje de linfocitos B en sangre periférica o médula ósea.** Se muestra el análisis de las células de sangre periférica (SP) y médula ósea (MO) de los ratones trasplantados que se realizó con el marcador de superficie CD19 por citometría de flujo.

Al igual que en el caso de los linfocitos T, el proceso de maduración de los linfocitos B también está determinado por una serie de etapas, que pueden ser fácilmente seguidas, porque expresan de forma secuencial marcadores B220, CD43 e IgM. Así, se pueden diferenciar células Pro-B (CD43+/IgM-), Pre-B (CD43-/IgM-), B inmaduras (CD43-/IgM+) y células B en general, donde tomamos todas las células que expresan B220. Cuando



redujimos la expresión de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina en nuestro estudio, no encontramos alteradas estas subpoblaciones de linfocitos B (Figura R.52).



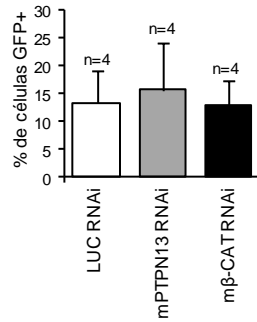
**Figura R.52: Efecto del silenciamiento de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina sobre la diferenciación de linfocitos B en médula ósea.** Se muestra el análisis de las células de la médula ósea (MO) de los ratones trasplantados que se realizó con los marcadores de superficie B220, CD43 e IgM por citometría de flujo, para diferenciar las etapas de maduración de linfocitos B: Pro-B (CD43+ IgM- B220-), Pre-B (CD43- IgM- B220-), B inmaduras (CD43- IgM+ B220-) y células B (B220+).

En la bibliografía se describe un bloqueo en la fase de células pre-proB cuando se sobreexpresa en ratones una forma no degradable de m $\beta$ -Catenina, y una reducción de todas las poblaciones de maduración de linfocitos B cuando lo que se sobreexpresa en células sanguíneas de ratón es una m $\beta$ -Catenina activa (Kirstetter et al., 2006; Scheller et al., 2006).

Tomando todos los datos en conjunto, hemos encontrado que la interferencia de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina, en células Lin- que son introducidas en ratones C57BL/6 irradiados letalmente, produce una alteración de la hematopoyesis que se traduce en acumulación de linfocitos T y B maduros, además de megacariocitos. Sin embargo los macrófagos y la línea eritroide se encuentran en porcentajes inferiores con respecto a los ratones control. De hecho, tanto linfocitos B como granulocitos y células eritroides presentan los cambios más acusados en el bazo. Al contrario que en humanos, donde la hematopoyesis en adultos solo se produce en médula ósea, en el bazo de ratones se lleva a cabo también la hematopoyesis (Suttie, 2006). Nuestros datos sugieren que PTPN13 y  $\beta$ -Catenina podrían estar jugando un papel en la hematopoyesis de ratón en el contexto del bazo.

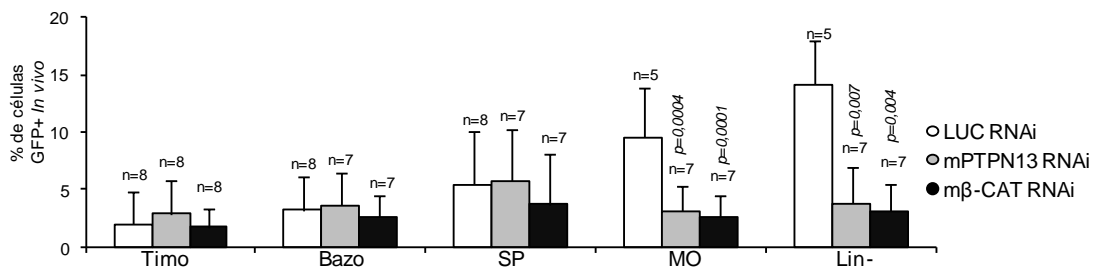
#### 4.3.3 Estudio del papel de mPTPN13 y m $\beta$ -Catenina en los progenitores hematopoyéticos inmaduros de la médula ósea.

Los progenitores hematopoyéticos son bastante difíciles de infectar con lentivirus. En células Lin- mantenidas en cultivo durante 5 días en IMDM suplementado con un 20% de FBS e IL-3, SCF, TPO y FLT3 10 ng/ml, hemos detectado porcentajes de infección, GFP+, de en torno al 15%. (Figura R.53). No hemos encontrado diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales en cuanto al porcentaje de infección.



**Figura R.53: El silenciamiento de mPTPN13 y mβ-Catenina no afecta al porcentaje de células transducidas (GFP+) *in vitro*.** Una parte de las células Lin<sup>-</sup> que iban a trasplantar en los ratones se mantuvieron en cultivo durante 5 días en IMDM 20% de FBS e IL-3, SCF, TPO y FLT3 a una concentración final de 10 ng/ml. El análisis de la expresión de GFP+ se realizó mediante citometría de flujo. Las barras muestran la media ± la desviación estándar.

Sin embargo, durante los experimentos que hemos expuesto en las páginas anteriores, nos percatamos de que el porcentaje de células GFP+ que encontrábamos al analizar los diferentes compartimentos: bazo, timo, sangre periférica o médula ósea era diferente dependiendo de los ratones y del grupo problema del que se tratara. En un intento de normalizar los valores brutos obtenidos, relativizamos estos valores al porcentaje de células GFP+, medidos a los 5 días *in vitro*, de los que se ofrece la media en la figura R53. Después de relativizar el porcentaje de células GFP+ obtenidas en cada compartimento, y en cada ratón, al porcentaje de células GFP+ pinchadas, en ese mismo ratón, nos encontramos con el gráfico de la figura R.54.

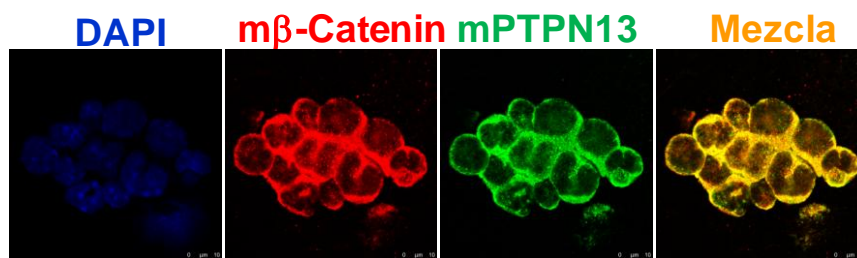


**Figura R.54: El silenciamiento de mPTPN13 y mβ-Catenina reduce el porcentaje de células GFP+ en médula ósea.** Se muestra la medida de la expresión de la GFP de las células de los diferentes compartimentos que se realizó mediante citometría de flujo 8 semanas después del trasplante. Las barras muestran la media ± la desviación estándar. Los valores de *p* representan la significación frente al control (Luc ARNi).

A nuestro juicio, de forma muy interesante, nos encontramos con que en los tres compartimentos donde se encuentran la mayoría de las células hematopoyéticas en su estado maduro: timo, bazo y sangre periférica, no existen diferencias significativas. Sin embargo, en el caso de las células de la médula ósea y en la población Lin<sup>-</sup>, encontramos un menor porcentaje de células transducidas (GFP+), en los ratones a los que habíamos pinchado células con niveles reducidos de mPTPN13 o mβ-Catenina. Esto nos hizo pensar que el papel que están jugando estas proteínas puede estar ocurriendo en las etapas iniciales

de la diferenciación hematopoyética. Para intentar aclarar esta circunstancia, analizamos las distintas subpoblaciones que se encuentran en la población Lin<sup>-</sup>. Esta población es inminentemente progenitora y ninguna de sus células presenta marcadores de células maduras.

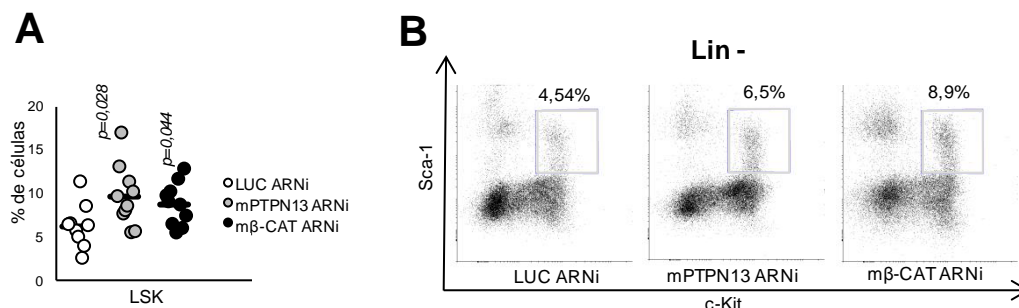
Con una tinción inmunofluorescente comprobamos que, efectivamente, estas proteínas se encontraban en progenitores hematopoyéticos. Además, observamos que en células Lin<sup>-</sup>, mPTPN13 y mβ-Catenina presentan una fuerte colocalización (Figura R.55).



**Figura R.55: mPTPN13 y mβ-Catenina colocalizan en células Lin<sup>-</sup>.** La localización de mPTPN13 y mβ-Catenina en células Lin<sup>-</sup> de ratones C57BL/6 fue analizada con anticuerpos específicos y seguida por fluorescencia. Los núcleos celulares fueron detectados usando DAPI.

La expresión y colocalización de ambas proteínas en los progenitores hematopoyéticos de ratón, además de los datos de la figura R.55, nos permite sugerir que ambas proteínas puedan jugar un papel en las etapas iniciales de la hematopoyesis.

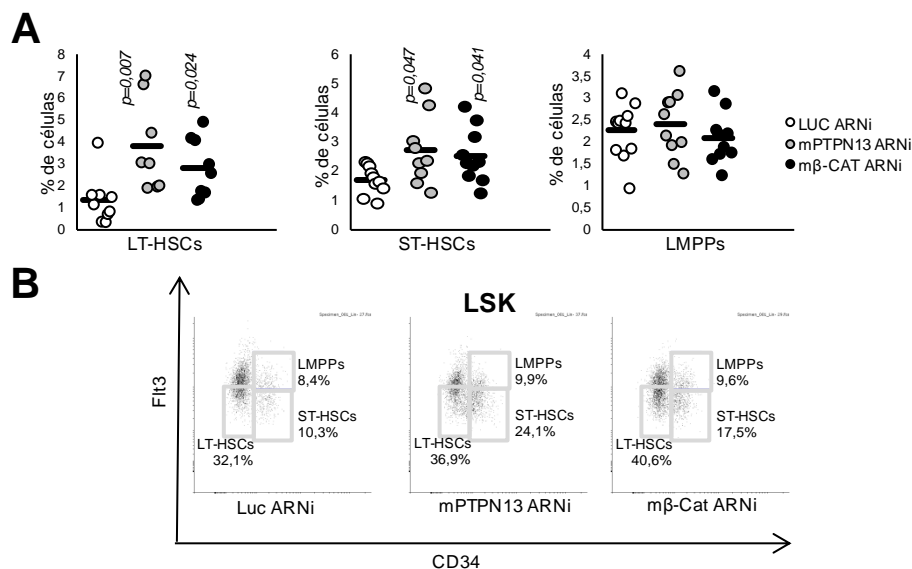
Sca-1 y c-Kit han sido tomados como dos marcadores que aparecen en las células madre hematopoyéticas de ratón y que desaparecen a lo largo de la diferenciación hacia células hematopoyéticas maduras (Abramson et al., 1977). De hecho, tradicionalmente se han tomado como HSCs en ratón a células Lin<sup>-</sup> c-Kit<sup>+</sup> Sca1<sup>+</sup>. Por lo tanto, lo primero que quisimos comprobar es si esta población sufría algún cambio cuando reducíamos los niveles de PTPN13 o mβ-Catenina. (Figura R.56).



**Figura R.56: El silenciamiento de mPTPN13 o mβ-Catenina aumenta los porcentajes de células LSK.** Las células Lin<sup>-</sup> fueron aisladas a partir de la médula ósea de los ratones trasplantados. Se muestra el análisis de dichas células con los marcadores de superficie Sca1 y c-Kit por citometría de flujo. A) Los valores de *p* representan la significación frente al control (Luc ARNi). B) Se muestra un experimento representativo. El número junto a la caja indica el % de células LSKs.

Efectivamente, nos encontramos con que, dentro de la población que habíamos enriquecido en Lin<sup>-</sup>, el porcentaje de células LSK aumentaba significativamente. Lo que parece confirmar que estas proteínas pueden estar ejerciendo un rol desde el principio de la diferenciación hematopoyética. Por lo tanto, por un lado, la interferencia de estas dos proteínas provoca una reducción de los porcentajes de células GFP<sup>+</sup> y, por otro, que dentro de estas células GFP<sup>+</sup> la población de progenitores (LSK) se encuentre enriquecida.

En el apartado de la introducción hemos comentado que dentro de las células LSK se pueden hacer hasta tres subdivisiones por los marcadores que expresan. Estas tres poblaciones, que estarían más o menos comprometidas hacia la diferenciación, son, de más a menos indiferenciada, LT-HSC, ST-HSC, LMPPs. Además de formar parte de la población LSK, estarían caracterizadas por ser CD34<sup>-</sup>/FLT3<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>/FLT3<sup>-</sup> y CD34<sup>+</sup>/FLT3<sup>+</sup> respectivamente. Por ello, además de marcar las células LSK, dentro de ellas utilizamos los marcadores CD34 y FLT3. (Figura R.57).

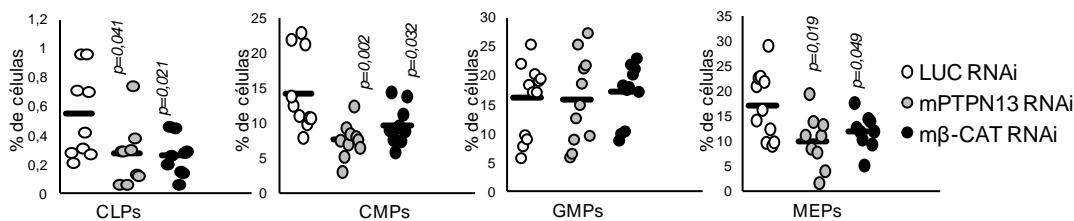


**Figura R.57: El silenciamiento de mPTPN13 o mβ-Catenina aumenta los porcentajes de células LT-HSC y ST-HSC.** Las células Lin<sup>-</sup> fueron aisladas a partir de la médula ósea de los ratones trasplantados. Dichas células fueron marcadas con anticuerpos frente a Sca1, c-Kit para identificar la población LSK. Los marcadores de superficie CD34 y FLT3 fueron empleados para diferenciar por citometría de flujo LT-HSCs (CD34<sup>-</sup> FLT3<sup>-</sup>), ST-HSCs (CD34<sup>+</sup> FLT3<sup>-</sup>) y LMPPs (CD34<sup>+</sup> FLT3<sup>+</sup>) dentro de las células LSKs. A) Los valores de p representan la significación frente al control (Luc ARNi). B) Se muestra un experimento representativo. El número junto a las cajas indica el % de las distintas poblaciones celulares.

Como se puede ver en la figura R.57, tanto la población de LT-HSC como de ST-HSC están aumentadas significativamente, en las células con bajos niveles de mPTPN13 y mβ-Catenina. Nótese que los porcentajes expresados son sensiblemente inferiores en los gráficos superiores (figura R.57A), en ellos se representa el porcentaje de estas poblaciones con respecto al total de células Lin<sup>-</sup> purificadas y adquiridas; mientras abajo (figura R.57B), todas las células que se muestran son LSK y los porcentajes corresponden a esta población.

Aunque mostramos este experimento representativo para que el lector observe el aspecto que tomaban las células al adquirirlas en el citómetro de flujo, el análisis correcto nos parece el superior, ya que, como la población LSK se encuentra alterada en las células con silenciamiento para mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina, esto podría enmascarar el efecto en las poblaciones en las que se puede dividir dicha población LSK.

Para terminar con el análisis de todos los progenitores analizamos las poblaciones que, si bien son multipotenciales, se encuentran ya orientadas a un linaje concreto dentro de la diferenciación hematopoyética. (Figura R.58).



**Figura R.58: Efectos del silenciamiento de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina en progenitores de ratón.** Las células Lin<sup>-</sup> fueron aisladas a partir de la médula ósea de los ratones trasplantados. Dichas células fueron marcadas con anticuerpos frente a Sca-1, c-Kit, IL-7R $\alpha$ , CD16/32 y CD34, para identificar diferentes poblaciones de progenitores hematopoyéticos: CLPs (Lin<sup>-</sup>, Sca1<sup>bajo</sup>, cKit<sup>bajo</sup>, IL-7R $\alpha$  +), CMPs, (Lin<sup>-</sup>, Sca1<sup>-</sup>, cKit<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD16/32<sup>-</sup>), GMPs (Lin<sup>-</sup>, Sca1<sup>-</sup>, cKit<sup>+</sup>, IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD16/32<sup>+</sup>) y MEPs (Lin<sup>-</sup>, Sca1<sup>-</sup>, cKit<sup>+</sup>, IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD16/32<sup>-</sup>). Los valores de *p* representan la significación frente al control (Luc ARNi).

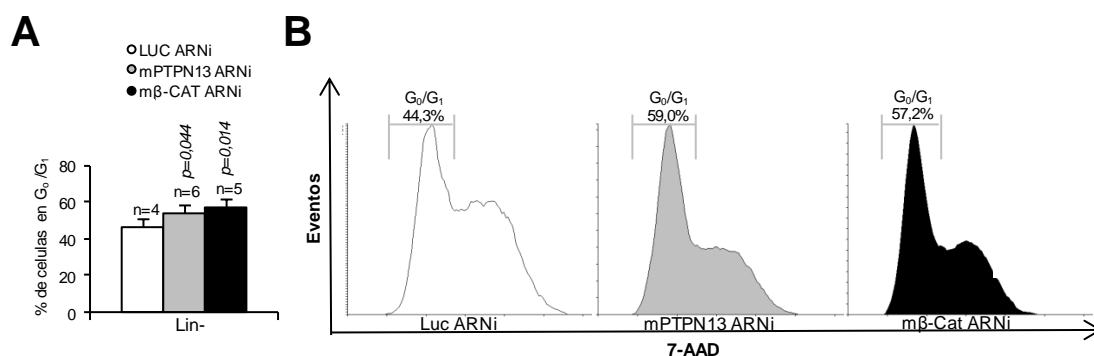
Encontramos bajadas significativas, tanto para el progenitor linfoide común (CLP), como para como para el progenitor mieloide común (CMP). Además, en el mismo linaje mieloide observamos una bajada significativa del progenitor eritromegacariocítico, pero no para del granulomonocítico. Estos datos, y los de las figuras R.42, R.45, R.46, R.47, y R.50, sugieren, como ya apuntábamos entonces, que la interferencia de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina produce en el linaje mieloide una aceleración de la diferenciación hacia megacariocitos maduros, ya que estos están aumentados y el linaje eritroide está disminuido. Por lo tanto, estas dos proteínas parecen jugar un papel importante en diferentes puntos de decisión durante la hematopoyesis. Por ejemplo, en la decisión que deben tomar los MEPs a la hora de diferenciarse hacia megacariocitos o hacia eritrocitos. También tienen una implicación en el linaje granulomonocítico, aunque en menor medida, dado que la interferencia de estas proteínas provoca un fenotipo menos acusado en este linaje. El ARNi de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina produce una bajada importante en la población CLP, con lo que sugiere una acción de estas dos proteínas en el linaje linfoide. En concreto, apunta a una aceleración de la diferenciación de linfocitos hacia células maduras, lo que concuerda con lo sugerido en la bibliografía. Ya que, por un lado, la delección de mPTPN13 en células del Timo provoca una mayor diferenciación de linfocitos T CD4. Y por otro, la sobreexpresión de una forma activa o

no degradable de m $\beta$ -Catenina bloquea la diferenciación de linfocitos T y B (Nakahira et al., 2007; Kirstetter et al., 2006; Scheller et al., 2006)

Por lo tanto, tomando todos estos datos en conjunto, tanto mPTPN13 como m $\beta$ -Catenina están jugando un papel importante en la diferenciación hematopoyética. La reducción de la expresión de ambas proteínas pone de manifiesto un mismo fenotipo, y este fenotipo alterado se muestra en poblaciones celulares que van a producir todos los linajes hematopoyéticos.

#### 4.3.3.1 Modulación del ciclo celular por parte de mPTPN13 y m $\beta$ -Catenina.

Uno de los resultados que más nos llamó la atención fue la reducción del número de células GFP+, lo que podría explicarse por un menor grado de proliferación de estas células. Para comprobar esta hipótesis, en un siguiente paso del estudio, quisimos indagar en el mecanismo por el cual se producen estas alteraciones en los porcentajes celulares de las LT-HSC, ST-HSC y LSK en general. Este es un compartimento especialmente interesante por su función de propiciar y mantener la hematopoyesis. Dado que el fenotipo mostrado es una variación de los porcentajes con respecto al control, pensamos que podría deberse a un cambio en el ciclo celular de estas células. Uno de los problemas de trabajar con estas poblaciones es que el número total de células de las que se dispone es limitado. Por ello, en un primer intento de aproximación, realizamos los perfiles de ciclo con 7AAD sobre la población enriquecida en Lin-, de la que sí disponíamos de una cantidad suficiente para formar un perfil de ciclo típico (Figura R.59).

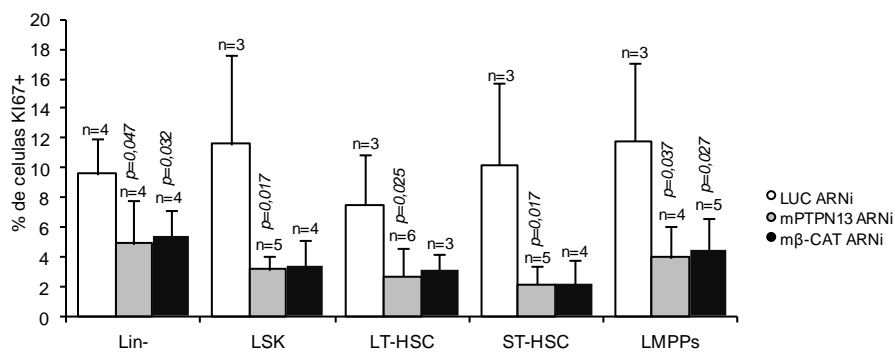


**Figura R.59: El silenciamiento de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina incrementa el porcentaje de células Lin- en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.** Las células Lin- fueron aisladas a partir de la médula ósea de los ratones trasplantados. Dichas células se marcaron con 7-AAD y el perfil de ciclo celular se analizó. En A) las barras muestran las medias  $\pm$  la desviación del porcentaje de células que se encuentran en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Los valores de *p* representan la significación frente al control (Luc ARNi). En B) se muestra un experimento representativo donde se indica el porcentaje de células en el pico que corresponde a las células G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

Como se puede ver en la figura R.59, se observa una alteración en el ciclo muy sutil. Las células no se paran en ninguna de las fases del ciclo, sin embargo, al analizar los porcentajes en cada fase, nos encontramos que el porcentaje de células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> era

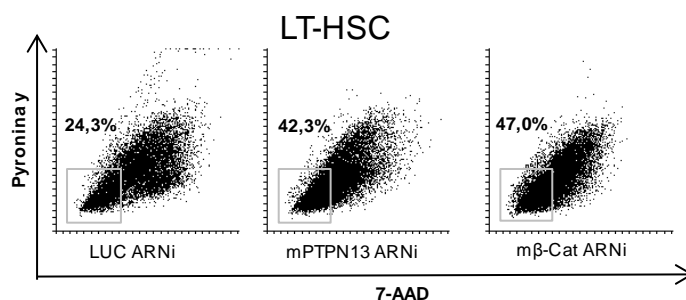
significativamente mayor en las células que tienen interferida la expresión de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina. De nuevo nos encontramos con que la reducción de ambas proteínas provoca el mismo efecto. El hecho de que haya más células en este pico del ciclo celular puede ser debido, a que haya más células en fase G<sub>0</sub>, o que haya es más células en G<sub>1</sub>. Estos sucesos son en realidad contrarios, ya que las primeras son células que se encuentran fuera del ciclo celular, no se dividen, y las segundas son células que están iniciando el ciclo para dividirse. Por estas razones, decidimos intentar discernir más a fondo esta fase del ciclo celular que parecía alterada.

Para ello marcamos las diferentes poblaciones mostradas en las figuras R.56 y R.57 con Ki67, una proteína intracelular que se expresa cuando la célula entra en ciclo, es decir, en fase G<sub>1</sub>/M/G<sub>2</sub> pero no en fase G<sub>0</sub> (Figura R.60).



**Figura R.61: El del silenciamiento de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina aumenta las células que se encuentran en estado de quiescencia:** Las células Lin<sup>-</sup> fueron aisladas a partir de la médula ósea de los ratones trasplantados. Dichas células se marcaron con anticuerpos frente a Sca1, c-Kit, CD34 y FLT3 para identificar las LT-HSCs (LSK, CD34<sup>-</sup>, Flt3<sup>-</sup>). Además se tiñeron con Pironina Y y con 7AAD, y se analizaron por citometría de flujo. El porcentaje representa el número de células quiescentes dentro de la caja. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

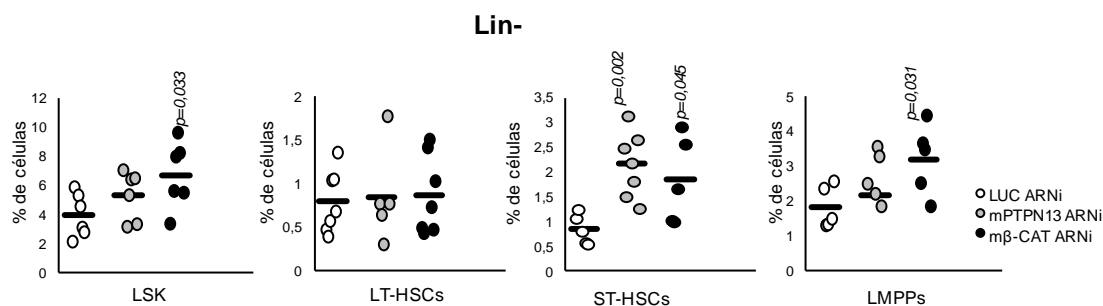
A nuestro juicio, de forma muy interesante y sorprendente, todas las poblaciones de células progenitoras analizadas presentaban una reducción de los niveles de Ki67. Esto nos llevó a pensar que el porcentaje de células que se encuentran en fase G<sub>0</sub> es mayor en las células que incorporaron el ARNi contra mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina. La interferencia de estas proteínas está afectando a la entrada de estas células en ciclo y haría que sean más quiescentes. Para corroborarlo marcamos ls celulas LT-HSCs, que por definición son las más quiescentes de todas las analizadas, con Pironina Y y 7-AAD (Toba et al., 1995). Las células quiescentes presentan bajos niveles ARN y ADN. La Pironina Y se une a ARN y la 7AAD al ADN; así, células que presenten baja fluorescencia para Pironina Y y para la 7-AAD se consideran células quiescentes. De este modo, cuando marcamos la población de células LT-HSC corroboramos que esta población presentaba un porcentaje mayor de células en estado quiescente en las células que presentan menores niveles de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina (Figura R.61).



**Figura R.61: El del silenciamiento de mPTPN13 o mβ-Catenina aumenta las células que se encuentran en estado de quiescencia:** El análisis de las células Lin<sup>-</sup> de la médula ósea se realizó 8 semanas después del trasplante con los marcadores de superficie Sca1, c-Kit, CD34 y FLT3. Además se tiñeron con Pironina Y y con 7AAD, y se analizaron por citometría de flujo. El porcentaje representa el número de células dentro de la caja. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

Como las alteraciones en el fenotipo, de las células con niveles reducidos de PTPN13 y β-Catenina, se producen fundamentalmente en el compartimento de las HSC, decidimos probar qué sucedía con un trasplante secundario. En él, a unos nuevos ratones irradiados letalmente les introdujimos células de la médula ósea de los ratones del trasplante primario.

Al analizar los progenitores hematopoyéticos encontramos un aumento de las LSK en las células GFP<sup>+</sup>, que son las células con bajos niveles de mPTPN13 o mβ-Catenina. Este aumento se debe principalmente a un aumento de las poblaciones ST-HSC y LMPPs. Sin embargo, no encontramos diferencias en la población LT-HSC (Figura R.62).



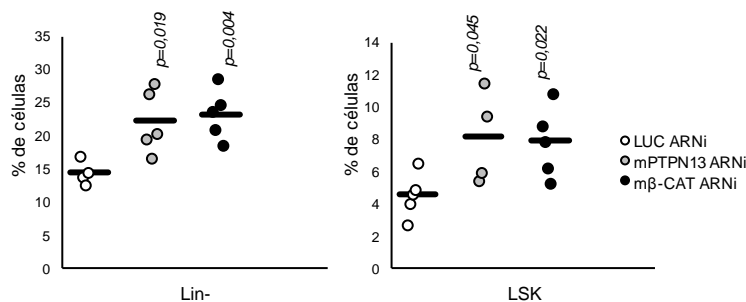
**Figura R.62: El silenciamiento de mPTPN13 o mβ-Catenina aumenta los porcentajes de células ST-HSC y LMPPs en un trasplante secundario.** Células de la médula ósea de ratones C57BL/6 se enriquecieron en células Lin<sup>-</sup>. Estas células fueron infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa (Luc), control, o una secuencia de silenciamiento de mPTPN13, o una secuencia de silenciamiento de mβ-Catenina (mβ-Cat). Estas células se trasplantaron en ratones irradiados letalmente, 8 semanas después del trasplante se sacrificaron los ratones y 3000000 de células de la médula ósea fueron introducidas en un segundo receptor. El análisis de las células Lin<sup>-</sup> de la médula ósea se realizó 8 semanas después del segundo trasplante con los marcadores de superficie Sca1, c-Kit, CD34 y FLT3 por citometría de flujo. Los valores de *p* representan la significación frente al control (Luc ARNi).

Como era de esperar, las células de los ratones primarios eran capaces de mantener la hematopoyesis en los ratones secundarios, ya que los ratones primarios presentaban un mayor número de HSC, que son las encargadas de mantener la hematopoyesis.



#### 4.3.4 Estudio de PTPN13 Y $\beta$ -Catenina en la adhesión celular

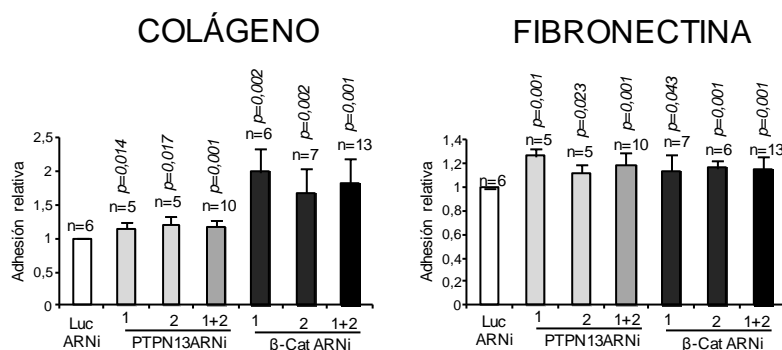
Las células con reducción de la expresión de mPTPN13 y  $\beta$ -Catenina presentaban mayor porcentaje de células quiescentes y, además, estaban acumuladas en estos mismos ratones (figuras R.55 y R.60). Uno de los factores que juega un papel fundamental en la quiescencia de las HSCs es el contacto con el nicho celular (Smith-Berdan et al., 2011). Por tanto, nos pareció conveniente analizar si la capacidad de adhesión celular estaba alterada cuando se reducían los niveles de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina. Para ello analizamos las células más íntimamente unidas al hueso. Estas células solo se separan del hueso cuando son tratadas con colagenasa y dispasa. Comprobamos que la población de células CD45+ (un marcador de células hematopoyéticas), Lin- y LSK es mayor en proporción en las células que incorporan la interferencia para mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina. En otras palabras, la población de células GFP+ unidas íntimamente al nicho es mayor cuando interferimos mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina. (Figura R.63).



**Figura R.63: Análisis en la expresión de GFP en las células más fuertemente unidas al nicho osteoblástico.** 8 semanas después del trasplante se extrajeron las células de los fémures de los ratones pasando PBS a través de la diáfisis, posteriormente los huesos se sometieron a tratamiento con colagenasa/dispasa durante 2 horas a 37 °C. Las células así obtenidas se marcaron con CD45 para identificar las células hematopoyéticas (CD45+), con un cóctel de anticuerpos Lin+, c-Kit y Sca-1, lo que permitió identificar las células Lin- y LSK. En la figura se muestra el porcentaje de células GFP+ Lin- y GFP+ LSKs en los ratones trasplantados. Los valores de *p* representan la significación frente al control (Luc ARNi).

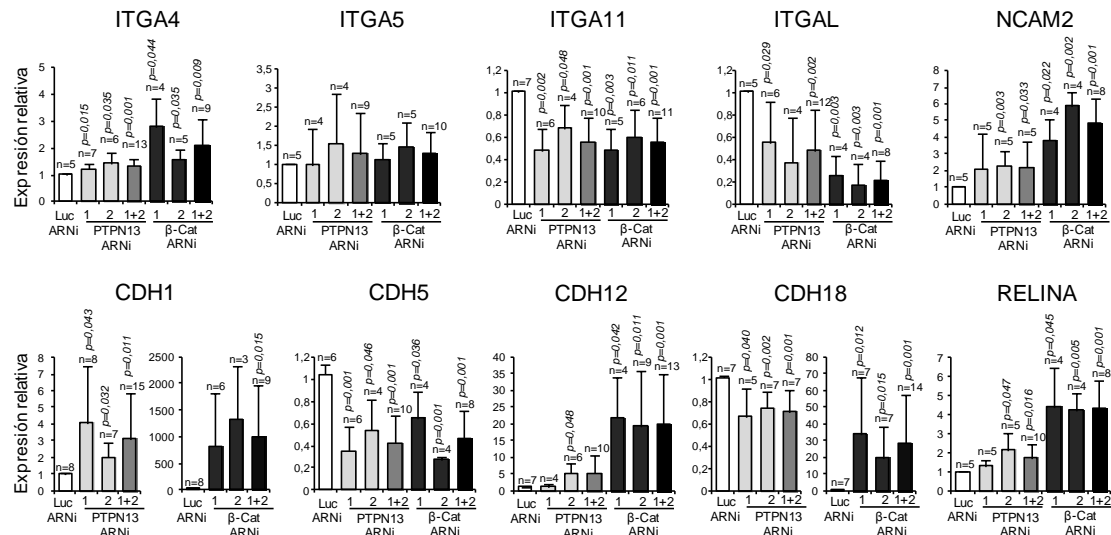
Por lo tanto, la interferencia de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina en HSCs provoca, por un lado, que estas células estén más íntimamente unidas al hueso y, por otro, disminuye la proliferación y aumenta la quiescencia de estas células bloqueándolas en los estados más indiferenciados, ST-HSC y LT-HSC, lo que provoca una acumulación y aumento del porcentaje de esas células. Dos fenómenos íntimamente relacionados, ya que precisamente las células que más íntimamente están unidas al nicho son las células que presentan tasas de quiescencia más altas. Así, las HSCs establecen contactos célula-célula o célula-matriz celular que hace que se mantenga el balance entre proliferación y quiescencia (Yoshihara et al., 2007).

Para comprobar si realmente el silenciamiento de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina aumentaba la adhesión, en células HEL donde se había interferido PTPN13 y  $\beta$ -Catenina, llevamos a cabo ensayos de adhesión en placas recubiertas con fibronectina y colágeno, dos de los componentes más abundantes en la matriz ósea del nicho de las HSC (Figura R.64).



**Figura R.64: El silenciamiento de PTPN13 o  $\beta$ -Catenina aumenta la adhesión de células HEL:** Células HEL y infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, dos secuencias de silenciamiento de PTPN13 o dos secuencias de silenciamiento de  $\beta$ -Catenina ( $\beta$ -Cat) se sembraron en placas recubiertas de colágeno o fibronectina durante 3 horas. Se retiraron las células no adheridas y se realizó un MTT para medir la cantidad de células adheridas. Las barras muestran las medias  $\pm$  la desviación la desviación estándar. Los valores de  $p$  representan la significación frente al control (Luc ARNi).

Como se puede observar, tanto la interferencia de PTPN13 como la de  $\beta$ -Catenina provocan un aumento de la adhesión de las células HEL. Los datos de la figura R.63 y los de la figura R.64 sugieren que PTPN13 y  $\beta$ -Catenina actúan en la adhesión celular, por lo que quisimos intentar comprobar cómo realizan esta función. De hecho, se nos planteaban dos hipótesis: que el proceso de adhesión podría estar relacionado con la relación entre  $\beta$ -Catenina y las cadherinas o ser un proceso de regulación de la expresión de moléculas de adhesión, jugando la  $\beta$ -Catenina un papel como factor de transcripción. Para ello elegimos 10 genes que se relacionan con adhesión celular: cuatro integrinas, relacionados con la unión celular a matriz extracelular, cuatro cadherinas, relacionadas con unión célula a célula y muy relacionadas con  $\alpha$  y  $\beta$ -Catenina; y además la proteína de unión a calcio NCAM2 y la Relina. No escogimos la N-Cadherina por la polémica que hay en torno a si se encuentra o no en HSC (Li y Zon, 2010) (Figura R.65).



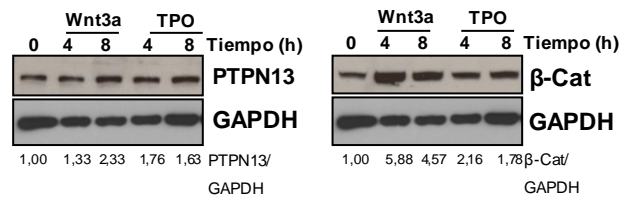
**Figura R.65: El silenciamiento de PTPN13 o  $\beta$ -Catenina altera la expresión de diversos genes que codican moléculas implicadas en la adhesión celular:** En células HEL infectadas con lentivirus con la construcción para el silenciamiento de Luciferasa, control, dos secuencias de silenciamiento de PTPN13 o dos secuencias de silenciamiento de  $\beta$ -Catenina ( $\beta$ -Cat) Se analizó la expresión de los 10 genes que se muestran en la figura mediante RT-qPCR. Las barras muestran las medias  $\pm$  la desviación ESTANDAR. Los valores de  $p$  representan la significación frente al control (Luc ARNi).

Observamos cómo ITGA4, CDH1, CDH12, NCAM2 y la Relina aumentan su expresión cuando interferimos PTPN13 o  $\beta$ -Catenina; mientras ITGA11, ITGAL y CDH5 disminuyen su expresión. ITGA5 lo encontramos inalterado y constatamos una divergencia en la expresión de CDH18: mientras la interferencia de PTPN13 reduce los niveles de expresión de CDH18, la interferencia de  $\beta$ -Catenina los aumenta. Lo primero que llamó la atención es que ambos ARNi muestran fenotipos muy similares, apoyando la idea de que ambas proteínas trabajan en la misma vía. En segundo lugar, puesto que lo que hemos analizado es el nivel de expresión de ARN mensajero, parece que PTPN13 y  $\beta$ -Catenina regulan la expresión de las proteínas analizadas. No obstante, no podemos desestimar la posibilidad de que el aumento de adhesión se deba al papel que ejerce la  $\beta$ -Catenina en los contactos célula-célula y célula-matriz. En concordancia con esto, se ha descrito que AKT es capaz de regular a la  $\beta$ -Catenina indirectamente a través de GSK3 $\beta$  y esto modifica la expresión de algunas moléculas de adhesión (Buitenhuis et al., 2010).

#### 4.3.5 Modulación de los niveles de PTPN13 Y $\beta$ -Catenina por la TPO y Wnt3a.

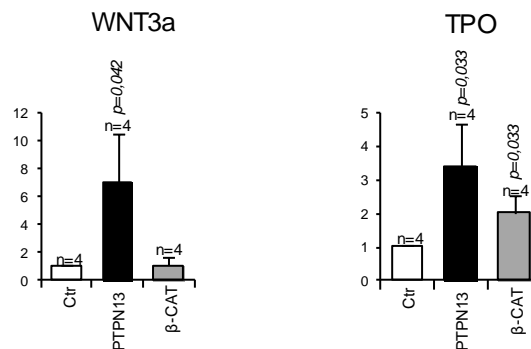
Como ya hemos comentado, las HSCs reciben señales del entorno que son las que deciden el destino de estas células, ya sea la autorrenovación, quiescencia o diferenciación. Recientemente se ha sugerido que la TPO, la citoquina más importante en la diferenciación megacariocítica, puede estar implicada en la regulación de la quiescencia de las HSCs (Yoshihara et al., 2007; Qian et al., 2007; Sanjuan-Pla et al., 2013). Nos pareció interesante indagar en la relación de la TPO con PTPN13 y  $\beta$ -Catenina. Por otra parte, el papel que la  $\beta$ -Catenina tiene en la adhesión celular, y su papel como intermediario en la ruta canónica de

Wnt, nos llevó a explorar también la posibilidad de que los factores Wnt canónicos regularan este proceso. En el presente trabajo hemos comprobado que la estimulación de células HEL, con Wnt3a, ligando clásico de la ruta de Wnt, y con TPO, aumenta los niveles de PTPN13 y de  $\beta$ -Catenina (Figura R.66).



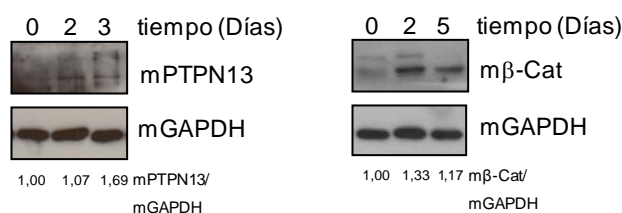
**Figura R.66: Cambios en los niveles de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina a nivel de proteína.** Células HEL fueron tratadas con Wnt3a o TPO 100 ng/ml durante los tiempos que se indican en la figura. El cambio en los niveles de mPTPN13 y m $\beta$ -Catenina se siguió mediante transferencia de western y revelado con los anticuerpos específicos frente a estas proteínas. La mGAPDH se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

En cuanto a los niveles de ARN mensajero de estas proteínas, la estimulación de WNT3a provoca una subida de los niveles PTPN13, pero no de  $\beta$ -Catenina, ya que el fenómeno de la estabilización de  $\beta$ -Catenina, en la ruta de WNT, es un fenómeno postraduccional (Valenta et al., 2012). (Figura R.67).



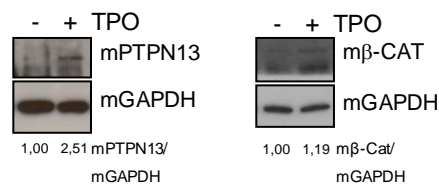
**Figura R.67: Cambios en la expresión de mPTPN13 y m $\beta$ -Catenina a nivel de ARN mensajero.** Células HEL fueron tratadas con Wnt3a o TPO a una concentración final de 100 ng/ml durante 8 horas. El cambio en la expresión de mPTPN13 y m $\beta$ -Catenina se siguió mediante RT-qPCR. Las barras muestran la media  $\pm$  la desviación estándar. Los valores de  $p$  representan la significación frente al control (células no tratadas).

Sin embargo, la estimulación con TPO consigue, en células HEL, un aumento de los niveles de ARN mensajero de PTPN13 y de  $\beta$ -Catenina. (Figura R.67). Sus homólogos en ratón mPTPN13 y m $\beta$ -Catenina también se estabilizan cuando las células de la médula ósea son tratadas *in vitro* con mTPO (Figura R.68).



**Figura R.68: Cambios en la expresión de mPTPN13 y mβ-Catenina en células de la médula ósea de ratón *in vitro*.** Células de la médula ósea de ratones C57BL/6 se trataron con TPO 100 ng/ml durante los tiempos que se indican en la figura. El cambio en los niveles de mPTPN13 y mβ-Catenina se siguió mediante transferencia de western y revelado con los anticuerpos específicos frente a estas proteínas. La mGAPDH se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

Además, esta estabilización se produce también *in vivo*, ya que ratones a los que se les inyectó mTPO a diario, durante 4 días, presentan unos niveles mayores de mPTPN13 y mβ-Catenina. Esto se midió en células de la médula ósea comparando con sus hermanos control a los que se le había inyectado la misma cantidad de agua bidestilada, que fue usada como vehículo de la mTPO. (Figura R.69).

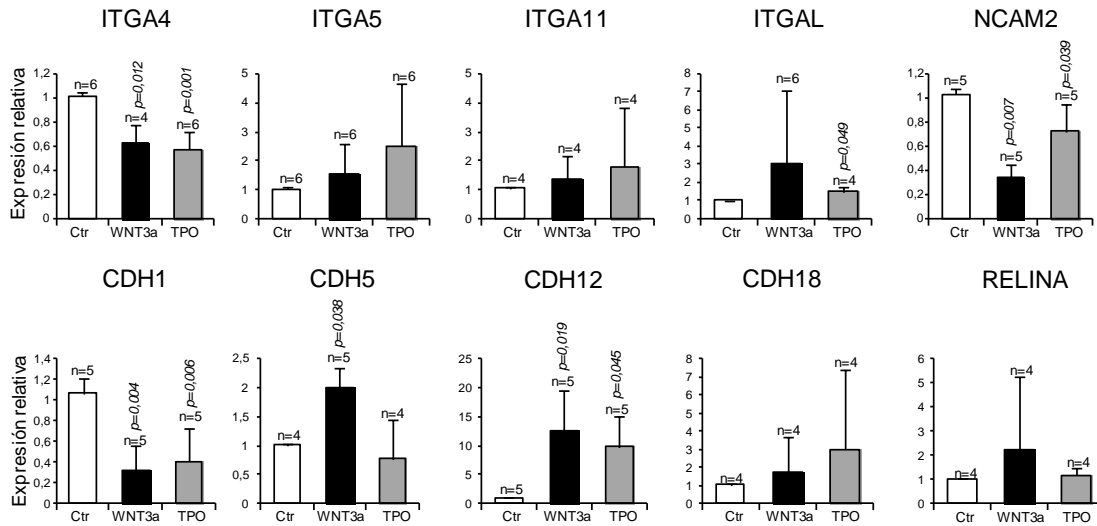


**Figura R.69: Cambios en la expresión de mPTPN13 y mβ-Catenina en células de la médula ósea de ratón *in vivo*.** Ratones C57BL/6 se trataron con TPO durante 5 días con una dosis intravenosa de 100 µg/Kg. El cambio en los niveles de mPTPN13 y mβ-Catenina de las células de la médula ósea se siguió mediante transferencia de western y revelado con los anticuerpos específicos frente a estas proteínas. La mGAPDH se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados

Tratados en su conjunto, creemos que estos datos sugieren que tanto PTPN13 como β-Catenina podrían regular las respuestas que las HSC producen a señales externas producidas por el entorno, como WNT3a y TPO, dos citoquinas son secretadas por diferentes tipos de células de la médula ósea. Así, dos tipos de células de la medula ósea han sido descritos como productores de WNT3a, osteoblastos y células endoteliales (Lento et al., 2013). Además expresan multitud de otros ligandos WNT. Los osteoblastos también se han relacionado con la producción de TPO (Qian et al., 2007).

#### 4.3.5.1 TPO y Wnt3a modulan genes de de adhesión celular.

Si la alteración de los niveles de PTPN13 o β-Catenina altera la expresión de numerosas moléculas de adhesión, y la TPO y Wnt3a estabilizan a PTPN13 y β-Catenina, sería esperable que WNT3a y TPO pudieran regular la expresión de dichas moléculas de adhesión a través de estas proteínas. Para comprobarlo tratamos células HEL con TPO o Wnt3a durante 8h y analizamos los mismos diez genes de proteínas de adhesión recogidos en la figura R.64. Los resultados se muestran en la figura R.70.

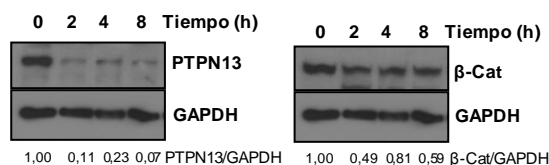


**Figura R.70: Cambios en la expresión de genes que codifican moléculas implicadas en la adhesión celular producidos por la TPO y Wnt3a.** Células HEL fueron tratadas con Wnt3a o TPO a una concentración final de 100 ng/ml durante 8 horas. Se analizó la expresión de los 10 genes que se muestran en la figura mediante RT-qPCR. Las barras muestran la media  $\pm$  la desviación estándar. Los valores de *p* representan la significación frente al control (células sin tratar).

Como se puede ver en la figura R.70, tres de los cinco genes que aumentaban su expresión cuando interferimos PTPN13 o  $\beta$ -Catenina, ITGA4, CDH1 y NCAM2, ahora disminuyen su expresión. Permaneciendo la Relina inalterada. CDH12 también aumenta su expresión en estas condiciones. ITGA11, ITGAL y CDH5 (que cuando reducimos PTPN13 o  $\beta$ -Catenina también reducen su expresión), cuando estimulamos con TPO o Wnt3a, muestran una tendencia menos definida, si bien es cierto que aumentan su expresión en algunos casos, y en otros parecen mostrar esa tendencia. ITGA5 permanece inalterada, al igual que cuando interferíamos la expresión de PTPN13 o  $\beta$ -Catenina. Estos datos están en consonancia con los descritos en otros trabajos. Por ejemplo, células LSK que son tratadas con TPO y SCF poseen unos niveles mayores de integrina 1 $\beta$  (ITGAB1) (Yoshihara et al., 2007).

#### 4.3.6 Otras citoquinas del nicho hematopoyético también modulan los niveles de PTPN13 y $\beta$ -Catenina.

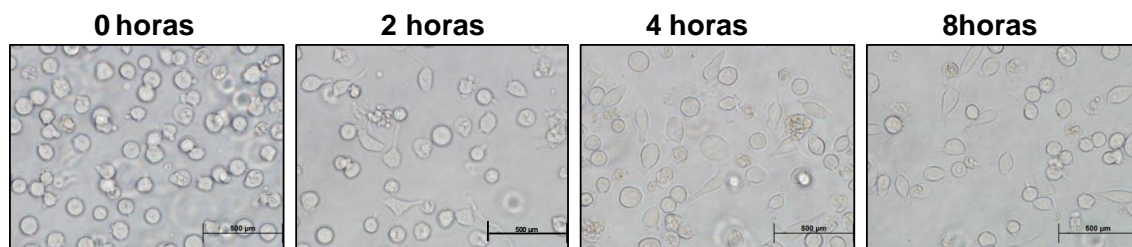
Para intentar reproducir las señales que se producen en el nicho hematopoyético de la médula ósea, usamos medio condicionado producido por la línea de células mesenquimales del estroma de la médula ósea inmortalizadas (hMSC-TERTs) (Mihara et al., 2003) (Figura R.71).



**Figura R.71: Cambios en la expresión de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina por tratamiento con medio condicionado de células mesenquimales.** Células HEL fueron cultivadas en medio en el que habían crecido células hMSC-TERTs durante 72 horas. El

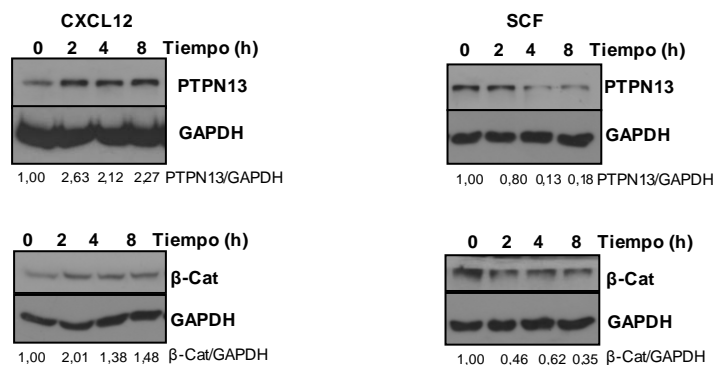
tiempo de cultivo de las células HEL en el medio de las células hMSC-TERTs se indica en la figura. El cambio en los niveles de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina se siguió mediante transferencia de western y revelado con los anticuerpos específicos frente a estas proteínas. La GAPDH se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

Como se puede observar, al cultivar las células HEL con medio condicionado por células mesenquimales, que fisiológicamente se encuentran en el nicho que rodea a las HSC, se provoca una bajada muy apreciable de los niveles de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina. Pero además, y para nuestra sorpresa por lo espectacular del fenómeno, cuando observamos al microscopio las placas donde se sembraron estas células descubrimos que este medio provocaba que las células HEL se adhirieran fuertemente a la placa de cultivo. (Figura R.72).



**Figura R.72: Las células HEL se vuelven adherentes al ser cultivadas en medio condicionado de células mesenquimales.** Células HEL fueron cultivadas en medio en el que habían crecido células hMSC-TERTs durante 72 horas. El tiempo de cultivo de las células HEL en el medio de las células hMSC-TERTs se indica en la figura. La adhesión de las células HEL a la placa de cultivo se pudo apreciar fácilmente al microscopio, como ilustran las imágenes representativas

Dos de las citoquinas fundamentales que en mayor medida desprenden las células mesenquimales y regulan la biología de las HSC son SCF y CXCL12 (Anthony y Link, 2014). Para comprobar si la alteración de los niveles de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina se debía a alguna de estas citoquinas, tratamos las células HEL, durante diferentes tiempos, con cada una de estas citoquinas. (Figura R.73).



**Figura R.73: Cambios en los niveles de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina por tratamiento con CXCL12 o SCF.** Células HEL fueron tratadas con CXCL12 o SCF a una concentración final de 100 ng/ml durante los tiempos que se indican en la figura. El cambio en los niveles de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina se siguió mediante transferencia de western y revelado con los anticuerpos específicos frente a estas proteínas. La GAPDH se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

Mientras CXCL12 estabilizaba a PTPN13 y a  $\beta$ -Catenina, similar al efecto producido por TPO y Wnt3a (Figura R.66), SCF disminuía claramente los niveles de estas proteínas. Por tanto, se puede interpretar que la bajada de estas dos proteínas que se produce cuando

cultivamos las células HEL en presencia de medio condicionado de células hMSC-TERTs es debida, al menos en parte, a la presencia en ese medio de SCF.

Aunque los estímulos que reciben las HSC en su nicho vital son múltiples y complejos, y las respuestas que en ellas provocan estas señales también lo son, interpretando los datos de las figuras R.63-R-73 en su conjunto, parece que PTPN13 y  $\beta$ -Catenina son moduladores intracelulares de las respuestas que las HSCs dan a los estímulos que reciben desde la médula ósea. Por tanto, PTPN13 y  $\beta$ -Catenina podrían mediar en el destino de las HSCs regulando la quiescencia, renovación y diferenciación.

En resumen, la interferencia de mPTPN13 o m $\beta$ -Catenina provoca un cambio en la hematopoyesis del ratón que es muy notorio especialmente en las células progenitoras. Este cambio también sucede en algunas de las células maduras, donde aumentan los porcentajes respecto al control de los linfocitos T y B, y de los megacariocitos, reduciéndose el número de granulocitos y de la línea eritroide. La alteración de las células inmaduras se produce porque en ellas se observa un descenso de la proliferación y un aumento del porcentaje de células en quiescencia. Por otra parte, la reducción de los niveles de estas proteínas altera la interacción de estas HSC con el nicho en la médula ósea, posiblemente modificando el reparto de moléculas de adhesión celular. Además, puesto que los niveles de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina son regulados por varias citoquinas producidas por el nicho, sugerimos que estas dos proteínas son importantes reguladores intracelulares dentro de las HSCs. Los niveles de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina serían un determinante fundamental para determinar si las HSCs proliferan o se mantienen quiescentes. A su vez, los niveles de ambas van a depender de la identidad e intensidad de las señales que las HSCs reciban desde el nicho.







## **Conclusiones**

---



## 5. CONCLUSIONES.

1. La reducción de los niveles de SHP1 y SHP2 favorece la diferenciación megacariocítica de células HEL y K562, lo que nos permite concluir que ambas enzimas son reguladores negativos de dicha diferenciación.
2. La actividad de SHP1 y SHP2 disminuye durante los primeros instantes de la diferenciación megacariocítica para aumentar después. Estos cambios en la actividad coinciden en el tiempo con cambios en la oxidación y la fosforilación de estas dos PTPs, por lo que estos procesos están relacionados con la regulación de SHP1 y SHP2 en la diferenciación megacariocítica.
3. El silenciamiento de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina incrementa la diferenciación megacariocítica tanto *in vitro* como *in vivo*.
4. La reducción de los niveles de PTPN13 y de  $\beta$ -Catenina, mediante ARN de interferencia en ratones, provoca que se acumulen linfocitos T y B y que el porcentaje de eritrocitos y granulocitos sea menor en dichos ratones.
5. La reducción de los niveles de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina altera el ciclo celular de las HSC de ratones provocando un incremento en el porcentaje de células quiescentes.
6. La adhesión de los progenitores hematopoyéticos al hueso se ve incrementada por el silenciamiento de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina.
7. PTPN13 y  $\beta$ -Catenina regulan la expresión de numerosos genes relacionados con la adhesión celular.
8. Diversas citoquinas desprendidas por el nicho hematopoyético regulan los niveles de PTPN13 y  $\beta$ -Catenina.



## **Bibliografía**

---





## 6. BIBLIOGRAFÍA.

### Reference List

- Abramson, S., R.G. Miller and R.A. Phillips: The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J. Exp. Med. Dev.* 145, 1567-1579 (1977).
- Adachi, T., D.R. Pimentel, T. Heibeck, X. Hou, Y.J. Lee, B. Jiang, Y. Ido and R.A. Cohen: S-glutathiolation of Ras mediates redox-sensitive signaling by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem. Dev.* 279, 29857-29862 (2004).
- Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto and I.L. Weissman: A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature Dev.* 404, 193-197 (2000).
- Alonso, A., J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon and T. Mustelin: Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell Dev.* 117, 699-711 (2004).
- Andersen, J.N., O.H. Mortensen, G.H. Peters, P.G. Drake, L.F. Iversen, O.H. Olsen, P.G. Jansen, H.S. Andersen, N.K. Tonks and N.P. Møller: Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol. Cell Biol. Dev.* 21, 7117-7136 (2001).
- Anthony, B.A. and D.C. Link: Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol. Dev.* 35, 32-37 (2014).
- Arai, F. and T. Suda: Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Ann. N.Y. Acad. Sci. Dev.* 1106, 41-53 (2007).
- Arai, F., H. Yoshihara, K. Hosokawa, Y. Nakamura, Y. Gomei, H. Iwasaki and T. Suda: Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum. *Ann. N.Y. Acad. Sci. Dev.* 1176, 36-46 (2009).
- Araki, T., M.G. Mohi, F.A. Ismat, R.T. Bronson, I.R. Williams, J.L. Kutok, W. Yang, L.I. Pao, D.G. Gilliland, J.A. Epstein and B.G. Neel: Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage-dependent effects of Ptpn11 mutation. *Nat. Med. Dev.* 10, 849-857 (2004).
- Ashman, L.K.: The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int. J. Biochem. Cell Biol. Dev.* 31, 1037-1051 (1999).
- Avecilla, S.T., K. Hattori, B. Heissig, R. Tejada, F. Liao, K. Shido, D.K. Jin, S. Dias, F. Zhang, T.E. Hartman, N.R. Hackett, R.G. Crystal, L. Witte, D.J. Hicklin, P. Bohlen, D. Eaton, D. Lyden, F. de Sauvage and S. Rafii: Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat. Med. Dev.* 10, 64-71 (2004).
- Avraham, H. and D.J. Price: Regulation of megakaryocytopoiesis and platelet production by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases. *Methods Dev.* 17, 250-264 (1999).

- Baksh,D. and R.S.Tuan: Canonical and non-canonical Wnts differentially affect the development potential of primary isolate of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J.Cell Physiol Dev.* 212, 817-826 (2007).
- Banville,D., S.Ahmad, R.Stocco and S.H.Shen: A novel protein-tyrosine phosphatase with homology to both the cytoskeletal proteins of the band 4.1 family and junction-associated guanylate kinases. *J.Biol.Chem. Dev.* 269, 22320-22327 (1994).
- Barker,J.E.: Early transplantation to a normal microenvironment prevents the development of Steel hematopoietic stem cell defects. *Exp.Hematol. Dev.* 25, 542-547 (1997).
- Behrens,J., J.P.von Kries, M.Kuhl, L.Bruhn, D.Wedlich, R.Grosschedl and W.Birchmeier: Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature Dev.* 382, 638-642 (1996).
- Bhattacharya,R., J.Kwon, E.Wang, P.Mukherjee and D.Mukhopadhyay: Src homology 2 (SH2) domain containing protein tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) dephosphorylates VEGF Receptor-2 and attenuates endothelial DNA synthesis, but not migration\*. *J.Mol.Signal. Dev.* 3, 8(2008).
- Buitenhuis,M., L.E.van der, L.H.Ulfman, F.M.Hofhuis, M.B.Bierings and P.J.Coffer: Protein kinase B (PKB/c-akt) regulates homing of hematopoietic progenitors through modulation of their adhesive and migratory properties. *Blood Dev.* 116, 2373-2384 (2010).
- Buza-Vidas,N., J.Antonchuk, H.Qian, R.Mansson, S.Luc, S.Zandi, K.Anderson, S.Takaki, J.M.Nygren, C.T.Jensen and S.E.Jacobsen: Cytokines regulate postnatal hematopoietic stem cell expansion: opposing roles of thrombopoietin and LNK. *Genes Dev. Dev.* 20, 2018-2023 (2006).
- Carver-Moore,K., H.E.Broxmeyer, S.M.Luoh, S.Cooper, J.Peng, S.A.Burstein, M.W.Moore and F.J.de Sauvage: Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin-and c-mpl-deficient mice. *Blood Dev.* 88, 803-808 (1996).
- Castano,J., I.Raurell, J.A.Piedra, S.Miravet, M.Dunach and d.H.Garcia: Beta-catenin N- and C-terminal tails modulate the coordinated binding of adherens junction proteins to beta-catenin. *J.Biol.Chem. Dev.* 277, 31541-31550 (2002).
- Chan,R.J., Y.Li, M.N.Hass, A.Walter, C.S.Voorhorst, W.C.Shelley, Z.Yang, C.M.Orschell and M.C.Yoder: Shp-2 heterozygous hematopoietic stem cells have deficient repopulating ability due to diminished self-renewal. *Exp.Hematol. Dev.* 34, 1230-1239 (2006).
- Chen,J., L.Herceg-Harjacek, J.E.Groopman and J.Grabarek: Regulation of platelet activation in vitro by the c-Mpl ligand, thrombopoietin. *Blood Dev.* 86, 4054-4062 (1995).
- Chen,Y., R.Wen, S.Yang, J.Schuman, E.E.Zhang, T.Yi, G.S.Feng and D.Wang: Identification of Shp-2 as a Stat5A phosphatase. *J.Biol.Chem. Dev.* 278, 16520-16527 (2003).
- Chishti,A.H., A.C.Kim, S.M.Marfatia, M.Lutchman, M.Hanspal, H.Jindal, S.C.Liu, P.S.Low, G.A.Rouleau, N.Mohandas, J.A.Chasis, J.G.Conboy, P.Gascard, Y.Takakuwa, S.C.Huang, E.J.Benz, Jr., A.Bretscher, R.G.Fehon, J.F.Gusella, V.Ramesh, F.Solomon, V.T.Marchesi, S.Tsukita, S.Tsukita, K.B.Hoover and .: The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem.Sci. Dev.* 23, 281-282 (1998).

- Choi,H.K., T.H.Kim, G.J.Jhon and S.Y.Lee: Reactive oxygen species regulate M-CSF-induced monocyte/macrophage proliferation through SHP1 oxidation. *Cell Signal. Dev.* 23, 1633-1639 (2011).
- Chung,Y.J., B.B.Park, Y.J.Kang, T.M.Kim, C.J.Eaves and I.H.Oh: Unique effects of Stat3 on the early phase of hematopoietic stem cell regeneration. *Blood Dev.* 108, 1208-1215 (2006).
- Ciccarelli,F.D., P.Bork and E.Kerkhoff: The KIND module: a putative signalling domain evolved from the C lobe of the protein kinase fold. *Trends Biochem.Sci. Dev.* 28, 349-352 (2003).
- Cuppen,E., H.Gerrits, B.Pepers, B.Wieringa and W.Hendriks: PDZ motifs in PTP-BL and RIL bind to internal protein segments in the LIM domain protein RIL. *Mol.Biol.Cell Dev.* 9, 671-683 (1998).
- Daeron,M., S.Jaeger, P.L.Du and E.Vivier: Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol.Rev. Dev.* 224, 11-43 (2008).
- Deutsch,V.R. and A.Tomer: Megakaryocyte development and platelet production. *Br.J.Haematol. Dev.* 134, 453-466 (2006).
- Diaz-Hernandez,J.I., A.Almeida, M.Delgado-Esteban, E.Fernandez and J.P.Bolanos: Knockdown of glutamate-cysteine ligase by small hairpin RNA reveals that both catalytic and modulatory subunits are essential for the survival of primary neurons. *J.Biol.Chem. Dev.* 280, 38992-39001 (2005).
- Dimitrova,Y.N., J.Li, Y.T.Lee, J.Rios-Esteves, D.B.Friedman, H.J.Choi, W.I.Weis, C.Y.Wang and W.J.Chazin: Direct ubiquitination of beta-catenin by Siah-1 and regulation by the exchange factor TBL1. *J.Biol.Chem. Dev.* 285, 13507-13516 (2010).
- Eklof,S.K., S.G.Fridman and W.I.Weis: Molecular mechanisms of beta-catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC-beta-catenin complex. *EMBO J. Dev.* 20, 6203-6212 (2001).
- Elchebly,M., P.Payette, E.Michaliszyn, W.Cromlish, S.Collins, A.L.Loy, D.Normandin, A.Cheng, J.Himms-Hagen, C.C.Chan, C.Ramachandran, M.J.Gresser, M.L.Tremblay and B.P.Kennedy: Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science Dev.* 283, 1544-1548 (1999).
- Engstrom,M., R.Karlsson and J.I.Jonsson: Inactivation of the forkhead transcription factor FoxO3 is essential for PKB-mediated survival of hematopoietic progenitor cells by kit ligand. *Exp.Hematol. Dev.* 31, 316-323 (2003).
- Erdmann,K.S.: The protein tyrosine phosphatase PTP-Basophil/Basophil-like. Interacting proteins and molecular functions. *Eur.J.Biochem. Dev.* 270, 4789-4798 (2003).
- Erdmann,K.S., J.Kuhlmann, V.Lessmann, L.Herrmann, V.Eulenburg, O.Muller and R.Heumann: The Adenomatous Polyposis Coli-protein (APC) interacts with the protein tyrosine phosphatase PTP-BL via an alternatively spliced PDZ domain. *Oncogene Dev.* 19, 3894-3901 (2000).
- Fontaine-Perus,J.C., F.M.Calman, C.Kaplan and N.M.Le Douarin: Seeding of the 10-day mouse embryo thymic rudiment by lymphocyte precursors in vitro. *J.Immunol. Dev.* 126, 2310-2316 (1981).

- Freedden-Jeffry,U., P.Vieira, L.A.Lucian, T.McNeil, S.E.Burdach and R.Murray: Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J.Exp.Med. Dev.* 181, 1519-1526 (1995).
- Gars,E. and S.Rafii: It takes 2 to thrombopoies in the vascular niche. *Blood Dev.* 120, 2775-2776 (2012).
- Geiger,H., G.de Haan and M.C.Florian: The ageing haematopoietic stem cell compartment. *Nat.Rev.Immunol. Dev.* 13, 376-389 (2013).
- Giannoni,E., M.L.Taddei and P.Chiarugi: Src redox regulation: again in the front line. *Free Radic.Biol.Med. Dev.* 49, 516-527 (2010).
- Glondou-Lassis,M., M.Dromard, C.Chavey, C.Puech, L.Fajas, W.Hendriks and G.Freiss: Downregulation of protein tyrosine phosphatase PTP-BL represses adipogenesis. *Int.J.Biochem.Cell Biol. Dev.* 41, 2173-2180 (2009).
- Goldstone,S.D., A.D.Milligan and N.H.Hunt: Oxidative signalling and gene expression during lymphocyte activation. *Biochim.Biophys.Acta Dev.* 1314, 175-182 (1996).
- Gordon,M.S. and R.Hoffman: Growth factors affecting human thrombocytopoiesis: potential agents for the treatment of thrombocytopenia. *Blood Dev.* 80, 302-307 (1992).
- Graham,T.A., W.K.Clements, D.Kimelman and W.Xu: The crystal structure of the beta-catenin/ICAT complex reveals the inhibitory mechanism of ICAT. *Mol.Cell Dev.* 10, 563-571 (2002).
- Gu,Y.M., Y.H.Ma, W.G.Zhao and J.Chen: Dickkopf3 overexpression inhibits pancreatic cancer cell growth in vitro. *World J.Gastroenterol. Dev.* 17, 3810-3817 (2011).
- Guerriero,A., L.Worford, H.K.Holland, G.R.Guo, K.Sheehan and E.K.Waller: Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells. *Blood Dev.* 90, 3444-3455 (1997).
- Habas,R. and I.B.Dawid: Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *J.Biol. Dev.* 4, 2(2005).
- Hernandez-Hernandez,A., J.Sanchez-Yague, E.M.Martin-Valmaseda and M.Llanillo: Oxidative inactivation of human and sheep platelet membrane-associated phosphotyrosine phosphatase activity. *Free Radic.Biol.Med. Dev.* 26, 1218-1230 (1999).
- Herrmann,L., T.Dittmar and K.S.Erdmann: The protein tyrosine phosphatase PTP-BL associates with the midbody and is involved in the regulation of cytokinesis. *Mol.Biol.Cell Dev.* 14, 230-240 (2003).
- Heuberger,J., F.Kosel, J.Qi, K.S.Grossmann, K.Rajewsky and W.Birchmeier: Shp2/MAPK signaling controls goblet/paneth cell fate decisions in the intestine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A Dev.* 111, 3472-3477 (2014).
- Hinck,L., I.S.Nathke, J.Papkoff and W.J.Nelson: Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J.Cell Biol. Dev.* 125, 1327-1340 (1994).
- Hitchcock,I.S. and K.Kaushansky: Thrombopoietin from beginning to end. *Br.J.Haematol. Dev.* 165, 259-268 (2014).

- Huang,H., A.J.Woo, Z.Waldon, Y.Schindler, T.B.Moran, H.H.Zhu, G.S.Feng, H.Steen and A.B.Cantor: A Src family kinase-Shp2 axis controls RUNX1 activity in megakaryocyte and T-lymphocyte differentiation. *Genes Dev. Dev.* 26, 1587-1601 (2012).
- Huang,J., Y.Zhang, A.Bersenev, W.T.O'Brien, W.Tong, S.G.Emerson and P.S.Klein: Pivotal role for glycogen synthase kinase-3 in hematopoietic stem cell homeostasis in mice. *J.Clin.Invest Dev.* 119, 3519-3529 (2009).
- Huang,W., L.Bei and E.A.Eklund: Fas-associated phosphatase 1 (Fap1) influences betacatenin activity in myeloid progenitor cells expressing the Bcr-abl oncogene. *J.Biol.Chem. Dev.* 288, 12766-12776 (2013).
- Huber,A.H., W.J.Nelson and W.I.Weis: Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell Dev.* 90, 871-882 (1997).
- Huber,A.H. and W.I.Weis: The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell Dev.* 105, 391-402 (2001).
- Ikuta,K. and I.L.Weissman: Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A Dev.* 89, 1502-1506 (1992).
- Irie,S., T.Hachiya, S.Rabizadeh, W.Maruyama, J.Mukai, Y.Li, J.C.Reed, D.E.Bredesen and T.A.Sato: Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75(NTR) and their effect on NF-kappaB activation. *FEBS Lett. Dev.* 460, 191-198 (1999).
- Iwasaki,H. and K.Akashi: Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene Dev.* 26, 6687-6696 (2007).
- Jeannot,G., M.Scheller, L.Scarpellino, S.Duboux, N.Gardiol, J.Back, F.Kuttler, I.Malanchi, W.Birchmeier, A.Leutz, J.Huelsken and W.Held: Long-term, multilineage hematopoiesis occurs in the combined absence of beta-catenin and gamma-catenin. *Blood Dev.* 111, 142-149 (2008).
- Jelkmann,W.: The role of the liver in the production of thrombopoietin compared with erythropoietin. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol. Dev.* 13, 791-801 (2001).
- Jiao,H., W.Yang, K.Berrada, M.Tabrizi, L.Shultz and T.Yi: Macrophages from motheaten and viable motheaten mutant mice show increased proliferative responses to GM-CSF: detection of potential HCP substrates in GM-CSF signal transduction. *Exp.Hematol. Dev.* 25, 592-600 (1997).
- Kanz,L., G.Straub, K.G.Bross and A.A.Fauser: Identification of human megakaryocytes derived from pure megakaryocytic colonies (CFU-M), megakaryocytic-erythroid colonies (CFU-M/E), and mixed hemopoietic colonies (CFU-GEMM) by antibodies against platelet associated antigens. *Blut Dev.* 45, 267-274 (1982).
- Kato,Y., A.Iwama, Y.Tadokoro, K.Shimoda, M.Minoguchi, S.Akira, M.Tanaka, A.Miyajima, T.Kitamura and H.Nakauchi: Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J.Exp.Med. Dev.* 202, 169-179 (2005).
- Kaushansky,K.: Thrombopoietin: the primary regulator of megakaryocyte and platelet production. *Thromb.Haemost. Dev.* 74, 521-525 (1995).

- Kaushansky, K.: The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J.Clin.Invest Dev.* 115, 3339-3347 (2005).
- Kaushansky, K.: Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N.Engl.J.Med. Dev.* 354, 2034-2045 (2006).
- Kaushansky, K.: Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood Dev.* 111, 981-986 (2008).
- Kaushansky, K., V.C.Broudy, N.Lin, M.J.Jorgensen, J.McCarty, N.Fox, D.Zucker-Franklin and C.Lofton-Day: Thrombopoietin, the Mp1 ligand, is essential for full megakaryocyte development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A Dev.* 92, 3234-3238 (1995).
- Keilhack, H., F.S.David, M.McGregor, L.C.Cantley and B.G.Neel: Diverse biochemical properties of Shp2 mutants. Implications for disease phenotypes. *J.Biol.Chem. Dev.* 280, 30984-30993 (2005).
- Kennedy, M.B.: Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends Biochem.Sci. Dev.* 20, 350(1995).
- Kent, D., M.Copley, C.Benz, B.Dykstra, M.Bowie and C.Eaves: Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/KIT signaling pathway. *Clin.Cancer Res. Dev.* 14, 1926-1930 (2008).
- Kim, J.A., Y.J.Kang, G.Park, M.Kim, Y.O.Park, H.Kim, S.H.Leem, I.S.Chu, J.S.Lee, E.H.Jho and I.H.Oh: Identification of a stroma-mediated Wnt/beta-catenin signal promoting self-renewal of hematopoietic stem cells in the stem cell niche. *Stem Cells Dev.* 27, 1318-1329 (2009).
- Kimelman, D. and W.Xu: beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene Dev.* 25, 7482-7491 (2006).
- Kimura, S., A.W.Roberts, D.Metcalf and W.S.Alexander: Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A Dev.* 95, 1195-1200 (1998).
- Kirstetter, P., K.Anderson, B.T.Porse, S.E.Jacobsen and C.Nerlov: Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat.Immunol. Dev.* 7, 1048-1056 (2006).
- Kiyomoto, H., B.Fouqueray, H.E.Abboud and G.G.Choudhury: Phorbol 12-myristate 13-acetic acid inhibits PTP1B activity in human mesangial cells. A possible mechanism of enhanced tyrosine phosphorylation. *FEBS Lett. Dev.* 353, 217-220 (1994).
- Klingmuller, U., U.Lorenz, L.C.Cantley, B.G.Neel and H.F.Lodish: Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell Dev.* 80, 729-738 (1995).
- Kollet, O., A.Dar, S.Shivtiel, A.Kalinkovich, K.Lapid, Y.Sztainberg, M.Tesio, R.M.Samstein, P.Goichberg, A.Spiegel, A.Elson and T.Lapidot: Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat.Med. Dev.* 12, 657-664 (2006).
- Kondo, M., I.L.Weissman and K.Akashi: Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell Dev.* 91, 661-672 (1997).

- Kontaridis, M.I., S. Eminaga, M. Fornaro, C.I. Zito, R. Sordella, J. Settleman and A.M. Bennett: SHP-2 positively regulates myogenesis by coupling to the Rho GTPase signaling pathway. *Mol. Cell Biol. Dev.* 24, 5340-5352 (2004).
- Kozlowski, M., L. Larose, F. Lee, D.M. Le, R. Rottapel and K.A. Siminovitch: SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain. *Mol. Cell Biol. Dev.* 18, 2089-2099 (1998).
- Kozlowski, M., I. Mlinaric-Rascan, G.S. Feng, R. Shen, T. Pawson and K.A. Siminovitch: Expression and catalytic activity of the tyrosine phosphatase PTP1C is severely impaired in motheaten and viable motheaten mice. *J. Exp. Med. Dev.* 178, 2157-2163 (1993).
- Ku, H., Y. Yonemura, K. Kaushansky and M. Ogawa: Thrombopoietin, the ligand for the Mpl receptor, synergizes with steel factor and other early acting cytokines in supporting proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice. *Blood Dev.* 87, 4544-4551 (1996).
- Kwon, J., C.K. Qu, J.S. Maeng, R. Falahati, C. Lee and M.S. Williams: Receptor-stimulated oxidation of SHP-2 promotes T-cell adhesion through SLP-76-ADAP. *EMBO J. Dev.* 24, 2331-2341 (2005).
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature Dev.* 227, 680-685 (1970).
- Lemarchandel, V., J. Ghysdael, V. Mignotte, C. Rahuel and P.H. Romeo: GATA and Ets cis-acting sequences mediate megakaryocyte-specific expression. *Mol. Cell Biol. Dev.* 13, 668-676 (1993).
- Lento, W., K. Congdon, C. Voermans, M. Kritzik and T. Reya: Wnt signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol. Dev.* 5, (2013).
- Li, P. and L.I. Zon: Resolving the controversy about N-cadherin and hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell Dev.* 6, 199-202 (2010).
- Liang, H., Q. Chen, A.H. Coles, S.J. Anderson, G. Pihan, A. Bradley, R. Gerstein, R. Jurecic and S.N. Jones: Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell Dev.* 4, 349-360 (2003).
- Linnekin, D.: Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol. Dev.* 31, 1053-1074 (1999).
- Luis, T.C., M. Ichii, M.H. Brugman, P. Kincade and F.J. Staal: Wnt signaling strength regulates normal hematopoiesis and its deregulation is involved in leukemia development. *Leukemia Dev.* 26, 414-421 (2012).
- Luis, T.C., F. Weerkamp, B.A. Naber, M.R. Baert, E.F. de Haas, T. Nikolic, S. Heuvelmans, R.R. De Krijger, J.J. van Dongen and F.J. Staal: Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation. *Blood Dev.* 113, 546-554 (2009).
- Maekawa, K., N. Imagawa, A. Naito, S. Harada, O. Yoshie and S. Takagi: Association of protein-tyrosine phosphatase PTP-BAS with the transcription-factor-inhibitory protein IkappaBalpha through interaction between the PDZ1 domain and ankyrin repeats. *Biochem. J. Dev.* 337 ( Pt 2), 179-184 (1999).

- Malhotra,S. and P.W.Kincade: Wnt-related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis. *Cell Stem Cell Dev.* 4, 27-36 (2009).
- Mann,P.J. and J.H.Quastel: Toxic effects of oxygen and of hydrogen peroxide on brain metabolism. *Biochem.J. Dev.* 40, 139-144 (1946).
- Maretzky,T., K.Reiss, A.Ludwig, J.Buchholz, F.Scholz, E.Proksch, B.de Strooper, D.Hartmann and P.Saftig: ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A Dev.* 102, 9182-9187 (2005).
- Martin,A., H.W.Tsui, M.J.Shulman, D.Isenman and F.W.Tsui: Murine SHP-1 splice variants with altered Src homology 2 (SH2) domains. Implications for the SH2-mediated intramolecular regulation of SHP-1. *J.Biol.Chem. Dev.* 274, 21725-21734 (1999).
- Mazharian,A., J.Mori, Y.J.Wang, S.Heising, B.G.Neel, S.P.Watson and Y.A.Senis: Megakaryocyte-specific deletion of the protein-tyrosine phosphatases Shp1 and Shp2 causes abnormal megakaryocyte development, platelet production, and function. *Blood Dev.* 121, 4205-4220 (2013).
- Meng,T.C., T.Fukada and N.K.Tonks: Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol.Cell Dev.* 9, 387-399 (2002).
- Meng,W. and M.Takeichi: Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb.Perspect.Biol. Dev.* 1, a002899(2009).
- Mihara,K., C.Imai, E.Coustan-Smith, J.S.Dome, M.Dominici, E.Vanin and D.Campana: Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells immortalized by enforced expression of telomerase. *Br.J.Haematol. Dev.* 120, 846-849 (2003).
- Mikkola,H.K. and S.H.Orkin: The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development Dev.* 133, 3733-3744 (2006).
- Mitra,S., C.Beach, G.S.Feng and R.Plattner: SHP-2 is a novel target of Abl kinases during cell proliferation. *J.Cell Sci. Dev.* 121, 3335-3346 (2008).
- Morrison,S.J. and D.T.Scadden: The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature Dev.* 505, 327-334 (2014).
- Nadler,L.M., K.C.Anderson, G.Marti, M.Bates, E.Park, J.F.Daley and S.F.Schlossman: B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. *J.Immunol. Dev.* 131, 244-250 (1983).
- Nakahira,M., T.Tanaka, B.E.Robson, J.P.Mizgerd and M.J.Grusby: Regulation of signal transducer and activator of transcription signaling by the tyrosine phosphatase PTP-BL. *Immunity. Dev.* 26, 163-176 (2007).
- Nakata,K., Y.Suzuki, T.Inoue, C.Ra, H.Yakura and K.Mizuno: Deficiency of SHP1 leads to sustained and increased ERK activation in mast cells, thereby inhibiting IL-3-dependent proliferation and cell death. *Mol.Immunol. Dev.* 48, 472-480 (2011).
- Neel,B.G., H.Gu and L.Pao: The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem.Sci. Dev.* 28, 284-293 (2003).



- Nemeth, M.J., K.K. Mak, Y. Yang and D.M. Bodine: beta-Catenin expression in the bone marrow microenvironment is required for long-term maintenance of primitive hematopoietic cells. *Stem Cells Dev.* 27, 1109-1119 (2009).
- Oda, A., Y. Miyakawa, B.J. Druker, K. Ozaki, K. Yabusaki, Y. Shirasawa, M. Handa, T. Kato, H. Miyazaki, A. Shimosaka and Y. Ikeda: Thrombopoietin primes human platelet aggregation induced by shear stress and by multiple agonists. *Blood Dev.* 87, 4664-4670 (1996).
- Orkin, S.H. and L.I. Zon: Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell Dev.* 132, 631-644 (2008).
- Ostman, A., J. Frijhoff, A. Sandin and F.D. Bohmer: Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation. *J. Biochem. Dev.* 150, 345-356 (2011).
- Ostman, A., C. Hellberg and F.D. Bohmer: Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat. Rev. Cancer Dev.* 6, 307-320 (2006).
- Ozawa, M., H. Baribault and R. Kemler: The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J. Dev.* 8, 1711-1717 (1989).
- Pallotta, I., M. Lovett, W. Rice, D.L. Kaplan and A. Balduini: Bone marrow osteoblastic niche: a new model to study physiological regulation of megakaryopoiesis. *PLoS. One. Dev.* 4, e8359 (2009).
- Palmer, A., M. Zimmer, K.S. Erdmann, V. Eulenburg, A. Porthin, R. Heumann, U. Deutsch and R. Klein: EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol. Cell Dev.* 9, 725-737 (2002).
- Pang, L., M.J. Weiss and M. Poncz: Megakaryocyte biology and related disorders. *J. Clin. Invest Dev.* 115, 3332-3338 (2005).
- Pao, L.I., K. Badour, K.A. Siminovitch and B.G. Neel: Nonreceptor protein-tyrosine phosphatases in immune cell signaling. *Annu. Rev. Immunol. Dev.* 25, 473-523 (2007).
- Paravicini, T.M. and R.M. Touyz: NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care Dev.* 31 Suppl 2, S170-S180 (2008).
- Pasquet, J.M., L. Quek, S. Pasquet, A. Poole, J.R. Matthews, C. Lowell and S.P. Watson: Evidence of a role for SHP-1 in platelet activation by the collagen receptor glycoprotein VI. *J. Biol. Chem. Dev.* 275, 28526-28531 (2000).
- Pawliuk, R., C. Eaves and R.K. Humphries: Evidence of both ontogeny and transplant dose-regulated expansion of hematopoietic stem cells in vivo. *Blood Dev.* 88, 2852-2858 (1996).
- Peled, A., O. Kollet, T. Ponomaryov, I. Petit, S. Franitza, V. Grabovsky, M.M. Slav, A. Nagler, O. Lider, R. Alon, D. Zipori and T. Lapidot: The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood Dev.* 95, 3289-3296 (2000).
- Penit, C., B. Lucas and F. Vasseur: Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+8+) thymocytes in normal and genetically modified mice. *J. Immunol. Dev.* 154, 5103-5113 (1995).

- Peschon, J.J., P.J. Morrissey, K.H. Grabstein, F.J. Ramsdell, E. Maraskovsky, B.C. Gliniak, L.S. Park, S.F. Ziegler, D.E. Williams, C.B. Ware, J.D. Meyer and B.L. Davison: Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* Dev. 180, 1955-1960 (1994).
- Pevny, L., M.C. Simon, E. Robertson, W.H. Klein, S.F. Tsai, V.D'Agati, S.H. Orkin and F. Costantini: Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature Dev.* 349, 257-260 (1991).
- Piedra, J., D. Martinez, J. Castano, S. Miravet, M. Dunach and A.G. de Herreros: Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* Dev. 276, 20436-20443 (2001).
- Pitchford, S.C., T. Lodie and S.M. Rankin: VEGFR1 stimulates a CXCR4-dependent translocation of megakaryocytes to the vascular niche, enhancing platelet production in mice. *Blood Dev.* 120, 2787-2795 (2012).
- Poole, A.W. and M.L. Jones: A SHP-ing tale: perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail. *Cell Signal.* Dev. 17, 1323-1332 (2005).
- Poy, F., M. Lepourcelet, R.A. Shivdasani and M.J. Eck: Structure of a human Tcf4-beta-catenin complex. *Nat. Struct. Biol.* Dev. 8, 1053-1057 (2001).
- Qian, H., N. Buza-Vidas, C.D. Hyland, C.T. Jensen, J. Antonchuk, R. Mansson, L.A. Thoren, M. Ekblom, W.S. Alexander and S.E. Jacobsen: Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell Dev.* 1, 671-684 (2007).
- Ragab, A., S. Bodin, C. Viala, H. Chap, B. Payrastre and J. Ragab-Thomas: The tyrosine phosphatase 1B regulates linker for activation of T-cell phosphorylation and platelet aggregation upon FcγRIIIa cross-linking. *J. Biol. Chem.* Dev. 278, 40923-40932 (2003).
- Reiss, K., T. Maretzky, A. Ludwig, T. Tousseyn, B. de Strooper, D. Hartmann and P. Saftig: ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J.* Dev. 24, 742-752 (2005).
- Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W.S. Marshall and A. Khvorova: Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* Dev. 22, 326-330 (2004).
- Rongvaux, A., T. Willinger, H. Takizawa, C. Rathinam, W. Auerbach, A.J. Murphy, D.M. Valenzuela, G.D. Yancopoulos, E.E. Eynon, S. Stevens, M.G. Manz and R.A. Flavell: Human thrombopoietin knockin mice efficiently support human hematopoiesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Dev. 108, 2378-2383 (2011).
- Sacchetti, B., A. Funari, S. Michienzi, S. Di Cesare, S. Piersanti, I. Saggio, E. Tagliafico, S. Ferrari, P.G. Robey, M. Riminucci and P. Bianco: Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell Dev.* 131, 324-336 (2007).
- Sanjuan-Pla, A., I.C. Macaulay, C.T. Jensen, P.S. Woll, T.C. Luis, A. Mead, S. Moore, C. Carella, S. Matsuoka, J.T. Bouriez, O. Chowdhury, L. Stenson, M. Lutteropp, J.C. Green, R. Facchini, H. Boukarabila, A. Grover, A. Gambardella, S. Thongjuea, J. Carrelha, P. Tarrant, D. Atkinson, S.A. Clark, C. Nerlov and S.E. Jacobsen: Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature Dev.* 502, 232-236 (2013).

Sardina, J. L. Regulación de la diferenciación megacariocítica por PTP-Bas y especies reactivas de oxígeno. 2010. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca. (GENERIC)

Ref Type: Generic

Sardina, J.L., G.Lopez-Ruano, R.Prieto-Bermejo, B.Sanchez-Sanchez, A.Perez-Fernandez, L.I.Sanchez-Abarca, J.A.Perez-Simon, L.Quintales, J.Sanchez-Yague, M.Llanillo, F.Antequera and A.Hernandez-Hernandez: PTPN13 regulates cellular signalling and beta-catenin function during megakaryocytic differentiation. *Biochim.Biophys.Acta Dev.* 1843, 2886-2899 (2014).

Sardina, J.L., G.Lopez-Ruano, L.I.Sanchez-Abarca, J.A.Perez-Simon, A.Gaztelumendi, C.Trigueros, M.Llanillo, J.Sanchez-Yague and A.Hernandez-Hernandez: p22phox-dependent NADPH oxidase activity is required for megakaryocytic differentiation. *Cell Death.Differ. Dev.* 17, 1842-1854 (2010).

Sardina, J.L., G.Lopez-Ruano, B.Sanchez-Sanchez, M.Llanillo and A.Hernandez-Hernandez: Reactive oxygen species: are they important for haematopoiesis? *Crit Rev.Oncol.Hematol. Dev.* 81, 257-274 (2012).

Sato, T., S.Irie, S.Kitada and J.C.Reed: FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science Dev.* 268, 411-415 (1995).

Scheller, M., J.Huelsken, F.Rosenbauer, M.M.Taketo, W.Birchmeier, D.G.Tenen and A.Leutz: Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat.Immunol. Dev.* 7, 1037-1047 (2006).

Schmid, I., S.W.Cole, Y.D.Korin, J.A.Zack and J.V.Giorgi: Detection of cell cycle subcompartments by flow cytometric estimation of DNA-RNA content in combination with dual-color immunofluorescence. *Cytometry Dev.* 39, 108-116 (2000).

Schreck, C., F.Bock, S.Grziwok, R.A.Oostendorp and R.Istvanffy: Regulation of hematopoiesis by activators and inhibitors of Wnt signaling from the niche. *Ann.N.Y.Acad.Sci. Dev.* 1310, 32-43 (2014).

Seke Etet, P.F., L.Vecchio, K.P.Bogne, N.E.Nchiwan, M.Krampera and A.H.Nwabo Kamdje: Normal hematopoiesis and hematologic malignancies: role of canonical Wnt signaling pathway and stromal microenvironment. *Biochim.Biophys.Acta Dev.* 1835, 1-10 (2013).

Senis, Y.A.: Protein-tyrosine phosphatases: a new frontier in platelet signal transduction. *J.Thromb.Haemost. Dev.* 11, 1800-1813 (2013).

Sesler, C.L. and M.Zayzafoon: NFAT signaling in osteoblasts regulates the hematopoietic niche in the bone microenvironment. *Clin.Dev.Immunol. Dev.* 2013, 107321(2013).

Shultz, L.D., P.A.Schweitzer, T.V.Rajan, T.Yi, J.N.Ihle, R.J.Matthews, M.L.Thomas and D.R.Beier: Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell Dev.* 73, 1445-1454 (1993).

Sipkins, D.A., X.Wei, J.W.Wu, J.M.Runnels, D.Cote, T.K.Means, A.D.Luster, D.T.Scadden and C.P.Lin: In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature Dev.* 435, 969-973 (2005).

- Smith-Berdan,S., A.Nguyen, D.Hassanein, M.Zimmer, F.Ugarte, J.Ciriza, D.Li, M.E.Garcia-Ojeda, L.Hinck and E.C.Forsberg: Robo4 cooperates with CXCR4 to specify hematopoietic stem cell localization to bone marrow niches. *Cell Stem Cell Dev.* 8, 72-83 (2011).
- Solanas,G., S.Miravet, D.Casagolda, J.Castano, I.Raurell, A.Corrionero, A.G.de Herreros and M.Dunach: beta-Catenin and plakoglobin N- and C-tails determine ligand specificity. *J.Biol.Chem. Dev.* 279, 49849-49856 (2004).
- Staudt,N.D., W.K.Aicher, H.Kalbacher, S.Stevanovic, A.K.Carmona, M.Bogyo and G.Klein: Cathepsin X is secreted by human osteoblasts, digests CXCL-12 and impairs adhesion of hematopoietic stem and progenitor cells to osteoblasts. *Haematologica Dev.* 95, 1452-1460 (2010).
- Sugiyama,T., H.Kohara, M.Noda and T.Nagasawa: Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity. Dev.* 25, 977-988 (2006).
- Suttie,A.W.: Histopathology of the spleen. *Toxicol.Pathol. Dev.* 34, 466-503 (2006).
- Tatla,S., V.Woodhead, J.C.Foreman and B.M.Chain: The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells. *Free Radic.Biol.Med. Dev.* 26, 14-24 (1999).
- Tavian,M., K.Biasch, L.Sinka, J.Vallet and B.Peault: Embryonic origin of human hematopoiesis. *Int.J.Dev.Biol. Dev.* 54, 1061-1065 (2010).
- Tenev,T., H.Keilhack, S.Tomic, B.Stoyanov, M.Stein-Gerlach, R.Lammers, A.V.Krivtsov, A.Ullrich and F.D.Bohmer: Both SH2 domains are involved in interaction of SHP-1 with the epidermal growth factor receptor but cannot confer receptor-directed activity to SHP-1/SHP-2 chimera. *J.Biol.Chem. Dev.* 272, 5966-5973 (1997).
- Thannickal,V.J. and B.L.Fanburg: Reactive oxygen species in cell signaling. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol Dev.* 279, L1005-L1028(2000).
- Thoren,L.A., K.Liuba, D.Bryder, J.M.Nygren, C.T.Jensen, H.Qian, J.Antonchuk and S.E.Jacobsen: Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J.Immunol. Dev.* 180, 2045-2053 (2008).
- Tien,S.C. and Z.F.Chang: Oncogenic Shp2 disturbs microtubule regulation to cause HDAC6-dependent ERK hyperactivation. *Oncogene Dev.* 33, 2938-2946 (2014).
- Toba,K., E.F.Winton, T.Koike and A.Shibata: Simultaneous three-color analysis of the surface phenotype and DNA-RNA quantitation using 7-amino-actinomycin D and pyronin Y. *J.Immunol.Methods Dev.* 182, 193-207 (1995).
- Tomer,A., P.Friese, R.Conklin, W.Bales, L.Archer, L.A.Harker and S.A.Burstein: Flow cytometric analysis of megakaryocytes from patients with abnormal platelet counts. *Blood Dev.* 74, 594-601 (1989).
- Tonks,N.K.: Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol. Dev.* 7, 833-846 (2006).
- Tonks,N.K.: Protein tyrosine phosphatases--from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. *FEBS J. Dev.* 280, 346-378 (2013).

- Tsui, F.W., A. Martin, J. Wang and H.W. Tsui: Investigations into the regulation and function of the SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase, SHP-1. *Immunol. Res. Dev.* 35, 127-136 (2006).
- Turrens, J.F.: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol Dev.* 552, 335-344 (2003).
- Uchida, N., B. Dykstra, K.J. Lyons, F.Y. Leung and C.J. Eaves: Different in vivo repopulating activities of purified hematopoietic stem cells before and after being stimulated to divide in vitro with the same kinetics. *Exp. Hematol. Dev.* 31, 1338-1347 (2003).
- Vainchenker, W., N. Debili, M.A. Mouthon and F. Wendling: Megakaryocytopoiesis: cellular aspects and regulation. *Crit Rev. Oncol. Hematol. Dev.* 20, 165-192 (1995).
- Valenta, T., G. Hausmann and K. Basler: The many faces and functions of beta-catenin. *EMBO J. Dev.* 31, 2714-2736 (2012).
- van de, W.M., R. Cavallo, D. Dooijes, M. van Beest, J. van Es, J. Loureiro, A. Ypma, D. Hursh, T. Jones, A. Bejsovec, M. Peifer, M. Mortin and H. Clevers: Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell Dev.* 88, 789-799 (1997).
- Van Os, E., Y.P. Wu, J.G. Pouwels, M.J. Ijsseldijk, J.J. Sixma, J.W. Akkerman, P.G. De Groot and G. Van Willigen: Thrombopoietin increases platelet adhesion under flow and decreases rolling. *Br. J. Haematol. Dev.* 121, 482-490 (2003).
- Veeman, M.T., J.D. Axelrod and R.T. Moon: A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev. Cell Dev.* 5, 367-377 (2003).
- Vidal-Cardalda, M. Identificación y caracterización de PTP-Bas en plaquetas humanas y ovinas. 2006. Trabajo de grado de la universidad de Salamanca. Departamento de bioquímica y biología molecular. (GENERIC)
- Ref Type: Report
- Vogel, W., R. Lammers, J. Huang and A. Ullrich: Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science Dev.* 259, 1611-1614 (1993).
- Weiler, S.R., S. Mou, C.S. DeBerry, J.R. Keller, F.W. Ruscetti, D.K. Ferris, D.L. Longo and D. Linnekin: JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood Dev.* 87, 3688-3693 (1996).
- Wheadon, H., N.R. Paling and M.J. Welham: Molecular interactions of SHP1 and SHP2 in IL-3-signalling. *Cell Signal. Dev.* 14, 219-229 (2002).
- Wieschaus, E. and R. Riggelman: Autonomous requirements for the segment polarity gene armadillo during *Drosophila* embryogenesis. *Cell Dev.* 49, 177-184 (1987).
- Wilson, A., E. Laurenti, G. Oser, R.C. van der Wath, W. Blanco-Bose, M. Jaworski, S. Offner, C.F. Dunant, L. Eshkind, E. Bockamp, P. Lio, H.R. Macdonald and A. Trumpp: Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell Dev.* 135, 1118-1129 (2008).
- Wodarz, A. and R. Nusse: Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol. Dev.* 14, 59-88 (1998).

- Wright,D.E., E.P.Bowman, A.J.Wagers, E.C.Butcher and I.L.Weissman: Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J.Exp.Med. Dev.* 195, 1145-1154 (2002).
- Wright,D.E., A.J.Wagers, A.P.Gulati, F.L.Johnson and I.L.Weissman: Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science Dev.* 294, 1933-1936 (2001).
- Xiao,W., H.Hong, Y.Kawakami, Y.Kato, D.Wu, H.Yasudo, A.Kimura, H.Kubagawa, L.F.Bertoli, R.S.Davis, L.A.Chau, J.Madrenas, C.C.Hsia, A.Xenocostas, T.J.Kipps, L.Hennighausen, A.Iwama, H.Nakauchi and T.Kawakami: Tumor suppression by phospholipase C-beta3 via SHP-1-mediated dephosphorylation of Stat5. *Cancer Cell Dev.* 16, 161-171 (2009).
- Yamada,S., S.Pokutta, F.Drees, W.I.Weis and W.J.Nelson: Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell Dev.* 123, 889-901 (2005).
- Yang,L., D.Bryder, J.Adolfsson, J.Nygren, R.Mansson, M.Sigvardsson and S.E.Jacobsen: Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood Dev.* 105, 2717-2723 (2005).
- Yang,W., L.D.Klaman, B.Chen, T.Araki, H.Harada, S.M.Thomas, E.L.George and B.G.Neel: An Shp2/SFK/Ras/Erk signaling pathway controls trophoblast stem cell survival. *Dev.Cell Dev.* 10, 317-327 (2006).
- Yoshihara,H., F.Arai, K.Hosokawa, T.Hagiwara, K.Takubo, Y.Nakamura, Y.Gomei, H.Iwasaki, S.Matsuoka, K.Miyamoto, H.Miyazaki, T.Takahashi and T.Suda: Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell Dev.* 1, 685-697 (2007).
- Yu,M., J.Luo, W.Yang, Y.Wang, M.Mizuki, Y.Kanakura, P.Besmer, B.G.Neel and H.Gu: The scaffolding adapter Gab2, via Shp-2, regulates kit-evoked mast cell proliferation by activating the Rac/JNK pathway. *J.Biol.Chem. Dev.* 281, 28615-28626 (2006).
- Yusa,S. and K.S.Campbell: Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2) can play a direct role in the inhibitory function of killer cell Ig-like receptors in human NK cells. *J.Immunol. Dev.* 170, 4539-4547 (2003).
- Zimmermann,P., K.Meerschaert, G.Reekmans, I.Leenarts, J.V.Small, J.Vandekerckhove, G.David and J.Gettemans: PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane. *Mol.Cell Dev.* 9, 1215-1225 (2002).
- Zimmet,J. and K.Ravid: Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp.Hematol. Dev.* 28, 3-16 (2000).
- Zon,L.I., Y.Yamaguchi, K.Yee, E.A.Albee, A.Kimura, J.C.Bennett, S.H.Orkin and S.J.Ackerman: Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood Dev.* 81, 3234-3241 (1993).