



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



**IDENTIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE
NUEVOS FACTORES DE
TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA
PROGRESIÓN LEUCÉMICA Y LA
HEMATOPOYESIS**

Fernando A. Jiménez

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Universidad de Salamanca**

- Octubre 2011 -

Financiación Grupo del Dr. César Cobaleda

La investigación en el grupo de CC está parcialmente financiada por Fondos FEDER, Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI040261 y PI080164), Proyecto Intramural especial CSIC 200920I055, Proyectos de la Junta de Castilla y León SA060A09, SAN126/SA62/09, SAN673/SA27/08 y SA087A06, Consolider Oncobio CSD2007-0017, Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña, y una beca institucional de la Fundación Ramón Areces.

Financiación Grupo del Dr. Isidro Sánchez

La investigación en el grupo de ISG está parcialmente financiada por FEDER y por el MICINN (SAF2009-08803 a ISG), por la Junta de Castilla y León (REF. CSI007A11-2 y Proyecto Biomedicina 2009-2010), por el MEC OncoBIO Consolider-Ingenio 2010 (Ref. CSD2007-0017), por NIH grant (R01 CA109335-04A1), por la Fundación Sandra Ibarra, por Group of Excellence Grant (GR15) de la Junta de Castilla y León, y por ARIMMORA project (FP7-ENV-2011, European Union Seventh Framework Program), y por Proyecto en Red de Investigación en Células Madre Tumoraes en Cáncer de Mama, a través de Obra Social Kutxa y Conserjería de Sanidad de la Junta de Castilla y León. Toda la financiación española está co-financiada por el programa de la Unión Europea FEDER. ISG es un API lab del proyecto EuroSyStem.

Durante la realización de este proyecto he disfrutado de una beca predoctoral del Ministerio de Educación en el marco del programa FPU con centro de adscripción el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas, que de una u otra manera me han ayudado a llevar a cabo este trabajo, tanto profesional como personalmente;

En primer lugar, a mis directores de tesis por su ayuda durante la realización de este trabajo.

A César, de quien he aprendido todo lo que sé de este trabajo, y quien con mucha paciencia y dedicación ha dirigido mis pasos a lo largo de mi etapa predoctoral. También quiero agradecerle mucho a nivel personal, pues además de ser un gran jefe, es una gran persona al igual que su mujer Ana.

A Isidro, que me dio la oportunidad de formar parte de su laboratorio, y del cual he aprendido tantas buenas costumbres, así como a trabajar con verdadera dedicación, constancia, y optimismo.

Igualmente, a los Profesores Rafael Jiménez, M^a Eugenia Muñoz, y Ana Isabel Galán del Dto. De Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, no solo por dejarnos el espacio para poder desarrollar este proyecto de investigación, sino también por ayudarme a resolver tantas dificultades de toda índole que han ido surgiendo a lo largo de estos cuatro años, incluidas mis primeras andanzas en la docencia, y fundamentalmente por brindarme un apoyo y compañía personal inestimables.

A todos los miembros del Lab. 13, pasados y presentes, Camino, Katja, Alejandra, Dalia, Isabel Lara, Bea, Esther, Inés, Carolina, Isabel Romero, Marcos, Alberto, Lucia, Elena bueno, Amparo, y a Elena Campos (ahora ya en el laboratorio de César en Madrid) por su ayuda desinteresada y permanente en el desarrollo de este proyecto, especialmente a Esther e Inés por su minucioso trabajo en el animalario y su continuo apoyo profesional y personal, a Camino por ayudarme en mis inicios por el laboratorio, y a Carolina, que sin duda se ha convertido en uno de los principales apoyos para todos los que estamos aprendiendo en el laboratorio. A Isabel Lara, por el tiempo compartido en el B15, a Marcos, con el que comparto casi todas mis manías y que siempre sabe encontrar el lado bueno de las cosas, y a Isabel Romero por ser un gran apoyo y amiga dentro y fuera del laboratorio.

Al Dr. Jesús Pérez Losada y a todos los miembros de su laboratorio, Andrés, Lourdes, y M^a del Mar, por su ayuda y enriquecedoras discusiones a lo largo de todos los seminarios que

semanalmente hemos compartido, especialmente a Andrés, que siempre saca tiempo para ayudarnos a todos.

Al Dr. Dionisio Martín Zanca del Instituto de Biología Funcional y Genómica de Salamanca, por su visión tan crítica y por su afán de perfección, que han sido un ejemplo durante toda mi formación predoctoral, y los miembros de su laboratorio Talía y Laura.

Al Prof. Fco. Javier García Criado, del Dto. de Cirugía de la Universidad de Salamanca, por su ayuda sin límite y por facilitarnos el trabajo con los ratones y su colaboración en el desarrollo de este proyecto.

A todo el personal de apoyo del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca: mantenimiento, cocina, informática, etc. que hacen que el centro funcione.

A todo el personal de gestión del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca, especialmente a Javier Beltrán, que siempre se ha preocupado de todo.

A todo el personal del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

Al Servicio de Citometría de la Universidad de Salamanca, dirigido por el Dr. Alberto Orfao, especialmente a M^a Luz y a Paloma por su ayuda en los estudios de citometría.

Al Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca, que dirige el Prof. Jesús F. San Miguel Izquierdo, por facilitarnos las muestras de pacientes utilizadas en este proyecto.

A la Dra. M^a Luisa Toribio del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de Madrid, por darnos los RNAs de muestras humanas utilizados en este estudio para confirmar la expresión de *EN2*.

Al Dr. Juan Luis García Hernández del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca, por facilitarnos RNA de muestras humanas de glioma usadas como controles en este trabajo.

A la Dra. Belén Pintado, directora de la Unidad de Transgénesis del Centro Nacional de Biotecnología de Madrid, por su ayuda para la generación del modelo *LCK En2*.

A la Dra. Alexandra Joyner del *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* de Nueva York, por cedernos el modelo animal knock-out de *En2* usado en este trabajo.

Al Dr. José Ángel Martínez-Climent y la Dra. M^a Ángela Aznar del Centro de Investigación Médica Aplicada de Pamplona, por su ayuda en la realización de los estudios de expresión con microarrays mostrados en este trabajo.

A la Dra. Cynthia Guidos, del *Hospital for Sick Children* de Toronto, por cedernos el plásmido p1017 *LCK-hGH*, usado para generar los transgénicos *LCK-En2*.

A Edgar y a David, por haber hecho Salamanca un poco más amena.

También quiero agradecerse a mis amigos José Antonio, Juan Antonio, Verónica y especialmente José Enrique, que aun en la distancia, siempre dan fuerzas para seguir.

Pero sobre todo, debo agradecer el apoyo siempre incondicional a tres personas, a Cristina, por estar a mi lado y acompañarme todo este tiempo, a mi hermano Fran, que hace que todo sea siempre divertido y a mi madre Isabel, que siempre ha estado apoyándome y animándome en todos los pasos importantes de mi vida y por estar siempre ahí. Sin duda son las personas que más han sufrido el tiempo dedicado, el estrés generado, y demás circunstancias que rodean este trabajo.

Por último, quiero dedicársela a mi abuelo, que sin estar siempre ha estado, y a quien le debo mucho de quien soy.

Gracias

A Cristina, a mi hermano, a mi madre, y a mi abuelo

Índice General

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
DOCUMENTACIÓN.....	IX
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Preámbulo.....	3
1.2 Desarrollo normal y desarrollo tumoral. El cáncer como una alteración de la diferenciación.....	3
1.3 Diferenciación hematopoyética.....	6
1.4 Desarrollo de los linfocitos T.....	10
1.5 La metilación del DNA en el desarrollo normal y tumoral.....	12
1.6 La leucemia mieloide crónica (LMC).....	16
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....	25
CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1 Identificación de nuevos genes implicados en la progresión a crisis blástica.....	31
3.1.1 Identificación de islas CpG metiladas en la progresión a crisis blástica.....	31
3.1.1.1 Obtención y tipo de muestras utilizadas.....	31
3.1.1.2 Protocolo de extracción de DNA.....	32
3.1.1.3 Preparación de la columna de unión de DNA metilado en pares CpG.....	33
3.1.1.3.1 Expresión y purificación de la proteína HMBD.....	33
3.1.1.3.2 Unión de la proteína HMBD a Ni-NTA. Montaje de la columna de unión de DNA metilado.....	33
3.1.1.4 Digestión del DNA de pacientes con MseI.....	34
3.1.1.5 Fraccionamiento del DNA de pacientes en la columna FPLC-HMBD. Purificación de DNA no metilado.....	34
3.1.1.6 Siembra e hibridación seriada de la genoteca de islas CpG. Secuenciación y análisis de los clones metilados diferencialmente.....	35

3.1.2 Validación de los resultados encontrados en el screening.....	35
3.1.2.1 Análisis del estado de metilación del DNA mediante tratamiento con bisulfito y secuenciación.....	35
3.1.2.1.1 Amplificación por PCR del DNA tratado con bisulfito.	36
3.1.2.2 Ejemplo 1: HOXA1. Secuencia de la isla CpG del gen HOXA1 humano. Oligonucleótidos para la amplificación del DNA modificado por tratamiento con bisulfito sódico.	37
3.1.2.3 Ejemplo 2: HOXC13. Secuencia de la isla CpG del gen HOXC13 humano. Oligonucleótidos para la amplificación del DNA modificado por tratamiento con bisulfito sódico.	38
3.1.2.4 ENGRAILED-2. Secuencia de la isla CpG del gen ENGRAILED-2 (ENn2) humano. Oligonucleótidos para la amplificación del DNA modificado por tratamiento con bisulfito sódico... ..	39
3.1.3 Confirmación de la expresión de Engrailed 2 en el sistema hematopoyético	40
3.1.3.1 Extracción de RNA de las poblaciones celulares de ratones wild type separadas por citometría de flujo.....	40
3.1.3.2 Síntesis de cDNA a partir del RNA mensajero total purificado	40
3.1.3.3 Comprobación de los cDNA sintetizados.....	41
3.1.3.4 Detección de la expresión de En2 en ratón	41
3.1.3.5 Detección de la expresión de En1 en ratón	41
3.1.3.6 Detección de la expresión de EN2 en muestras humanas	42
3.1.3.7 Comprobación de la expresión mediante Southern Blot	42
3.1.3.7.1 Purificación del producto de PCR a partir del gel de agarosa.....	42
3.1.3.7.2 Clonación de los productos de PCR en un vector plasmídico	42
3.1.3.7.3 Transferencia e hibridación.....	43
3.1.4 Estudio de la hematopoyesis en ratones $En2^{-/-}$	45
3.1.4.1 Genotipado de los ratones $En2^{-/-}$	45
3.1.4.1.1 Obtención de DNA total genómico	45
3.1.4.1.2 Genotipado de los ratones $En2^{-/-}$ mediante PCR	45
3.1.4.2 Citometría de flujo.....	46
3.1.4.2.1 Obtención de las muestras.....	46
3.1.4.2.2 Estandarización de las muestras.....	47
3.1.4.2.3 Marcaje	47
3.1.4.2.4 Citometría de órganos de embriones.....	49
3.1.4.3 Estudio de la Función de los Linfocitos T en Ratones $En2^{-/-}$	49
3.1.4.3.1 Formación de centros germinales en ratones $En2^{-/-}$ tras inmunización con un estímulo dependiente de linfocitos T.....	49
3.1.4.3.2 Producción de citoquinas específicas de linfocitos T en esplenocitos activados de ratones $En2^{-/-}$	49
3.1.5 Estudio del mecanismo molecular de acción de En2 en el desarrollo linfoide T	51
3.1.5.1 Análisis transcriptómico diferencial de poblaciones hematopoyéticas purificadas de ratones de tipo silvestre y $En2^{-/-}$ mediante microarrays de cDNA.....	51
3.1.5.1.1 Separación de poblaciones celulares mediante citometría de flujo.....	51
3.1.5.1.2 Extracción y valoración de la calidad del RNA	52
3.1.5.1.3 Hibridación de los microarrays de expresión	52

3.1.6 Generación de un modelo de ratón de sobreexpresión de En2 en Linfocitos T...	53
3.1.6.1 Clonación de mEn2 bajo el control del promotor del gen LCK.....	53
3.1.6.1.1 Clonación de En2 de ratón (mEn2) en el vector pBlueScript (pBS).....	53
3.1.6.1.2 Clonación de mEn2 en el vector pBS-ires-hCD2t.....	54
3.1.6.1.3 Clonación de mEn2-ires-hCD2t en el vector p1017 LCK-hGH.....	54
3.1.6.1.4 Protocolos de ligación y comprobación	55
3.1.6.2 Generación del modelo murino LCK-En2.....	56
3.1.6.2.1 Genotipado de los ratones LCK-En2.....	57

CAPÍTULO 4: RESULTADOS..... 59

4.1 Identificación de islas CpG metiladas en la progresión de LMC a crisis blástica. 61

4.1.1 Preparación de la columna de unión de DNA metilado en pares CpG	61
4.1.1.1 <i>Expresión y purificación de la proteína HMBD.....</i>	61
4.1.2 Secuenciación y análisis de secuencias de los clones metilados diferencialmente.....	61

4.2 Resultados del screening..... 63

4.2.1 Estado de metilación del DNA	63
4.2.1.1 <i>El gen HOXA1 se metila en la progresión de LMC a crisis blástica.....</i>	63
4.2.1.2 <i>El gen HOXC13 se metila en la progresión de LMC a crisis blástica</i>	66
4.2.1.3 <i>El gen ENGRAILED-2 se metila en la progresión de LMC a crisis blástica</i>	69
4.2.2 Engrailed 2 se expresa en el sistema hematopoyético.	72
4.2.2.1 <i>En2 se expresa durante el desarrollo linfoide T en ratón.....</i>	72
4.2.2.2 <i>EN2 se expresa durante el desarrollo linfoide T humano.....</i>	73
4.2.2.3 <i>En1 no se expresa durante el desarrollo linfoide T de ratón</i>	73

4.3 Estudio del papel de Engrailed 2 en el desarrollo hematopoyético 74

4.3.1 Estudio de la Hematopoyesis en Ratones $En2^{-/-}$	74
4.3.1.1 <i>Los ratones $En2^{-/-}$ presentan un timo de menor tamaño</i>	76
4.3.1.2 <i>Ausencia de alteraciones visibles en el desarrollo hematopoyético en ratones $En2^{-/-}$ durante la embriogénesis a día E16.5</i>	77
4.3.1.3 <i>Ausencia de alteraciones visibles en el desarrollo hematopoyético en ratones $En2^{-/-}$ adultos.</i>	79
4.3.2 Estudios funcionales de los linfocitos en ratones $En2^{-/-}$	83
4.3.2.1 <i>Formación normal de centros germinales en ratones $En2^{-/-}$ tras inmunización con un estímulo dependiente de linfocitos T</i>	83
4.3.2.2 <i>La producción de citoquinas específicas de linfocitos T en esplenocitos activados presenta niveles prácticamente normales en los ratones $En2^{-/-}$</i>	84
4.3.3 Estudio del mecanismo molecular de acción de en2 en el desarrollo linfoide T .	87
4.3.3.1 <i>Los linfocitos T de ratones $En2^{-/-}$ presentan alteraciones en su patrón de expresión génica..</i>	87

4.3.4 Generación de un modelo de sobreexpresión de <i>en2</i> en linfocitos T	93
4.3.4.1 Generación del modelo transgénico <i>Lck-En2</i>	93
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN.....	97
5.1 Metilación diferencial de islas CpG en la progresión de la CML in vivo.....	99
5.2 Metilación in vivo de genes homeobox en la progresión de la CML... 105	105
5.3 Papel del gen Engrailed-2 en el desarrollo hematopoyético	107
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES.....	119
Bibliografía Completa.....	123
Apéndice I: LISTA COMPLETA DE GENES IDENTIFICADOS	135
Abreviaturas	147

Índice de figuras

Capítulo 1

FIGURA 1- 1. ELECCIÓN DEL DESTINO CELULAR.....	4
FIGURA 1- 2. POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN Y COMPROMISO A LINAJE.....	6
FIGURA 1- 3. ESQUEMA DEL DESARROLLO HEMATOPOYÉTICO TEMPRANO.	7
FIGURA 1- 4. REQUERIMIENTOS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN LA HEMATOPOYESIS.....	10
FIGURA 1- 5. FORMACIÓN DEL CROMOSOMA FILADELFIA.....	19
FIGURA 1- 6. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS GENES BCR, ABL, BCR-ABL, Y LAS PROTEÍNAS A LAS QUE DAN LUGAR.	21

Capítulo 3

FIGURA 3- 1. EJEMPLO DE GENOTIPADO DE LOS RATONES <i>EN2</i>	46
FIGURA 3- 2. ESQUEMA DE LA CLONACIÓN DE <i>mEN2</i> EN PBS-IRES-HCD2	54
FIGURA 3- 3. ESQUEMA DE LA CLONACIÓN DEL FRAGMENTO EN2-IRES-HCD2 BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR DE LCK.....	55
FIGURA 3- 4. DIGESTIÓN DE P1017 LCK EN2-IRES-HCD2T CON LA ENZIMA <i>NotI</i>	56

Capítulo 4

FIGURA 4- 1. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA HMBD.....	61
FIGURA 4- 2. DISTRIBUCIÓN DE LAS PRINCIPALES FUNCIONES ASOCIADAS A LOS GENES DIFERENCIALMENTE METILADOS EN LA PROGRESIÓN A LA CRISIS BLÁSTICA.....	62
FIGURA 4- 3. AMPLIFICACIÓN DE LA ISLA CPG DEL GEN <i>HOXA1</i> TRATADA CON BISULFITO, MEDIANTE EL USO DE PCRS ANIDADAS.....	64
FIGURA 4- 4. EL GEN <i>HOXA1</i> SE METILA EN LA PROGRESIÓN DE LMC A CRISIS BLÁSTICA.	65

FIGURA 4- 5. AMPLIFICACIÓN DE LA ISLA CpG DEL GEN <i>HOXC13</i> TRATADA CON BISULFITO, MEDIANTE EL USO DE PCRS ANIDADAS.	67
FIGURA 4- 6. EL GEN <i>HOXC13</i> SE METILA EN LA PROGRESIÓN DE LMC A CRISIS BLÁSTICA.....	68
FIGURA 4- 7. AMPLIFICACIÓN DE LA ISLA CpG DEL GEN <i>ENGRAILED-2</i> TRATADA CON BISULFITO, MEDIANTE EL USO DE PCRS ANIDADAS.	70
FIGURA 4- 8. EL GEN <i>ENGRAILED-2</i> SE METILA EN LA PROGRESIÓN DE LMC A CRISIS BLÁSTICA.	71
FIGURA 4- 9. <i>En2</i> SE EXPRESA EN EL DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T.	72
FIGURA 4- 10. <i>EN2</i> SE EXPRESA EN EL DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T HUMANOS.....	73
FIGURA 4- 11. <i>En1</i> NO SE EXPRESA EN EL DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T.....	74
FIGURA 4- 12. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA EN2 Y EL LOCI WILD TYPE Y MUTADO.....	75
FIGURA 4- 13. DISMINUCIÓN DEL PESO DEL TIMO EN LOS RATONES <i>En2^{-/-}</i>	76
FIGURA 4- 14. ANÁLISIS DE POBLACIONES TÍMICAS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL RATÓN <i>En2^{-/-}</i> - A DÍA E16.5.....	77
FIGURA 4- 15. ANÁLISIS DE POBLACIONES EN HÍGADO FETAL DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL RATÓN <i>En2^{-/-}</i>	78
FIGURA 4- 16. ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO DE LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS (LSK) EN RATONES <i>En2^{-/-}</i>	79
FIGURA 4- 17. ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO DEL DESARROLLO DEL LINAJE B EN MÉDULA ÓSEA DE RATONES <i>En2^{-/-}</i>	80
FIGURA 4- 18. ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO DEL LINAJE B EN LA PERIFERIA DE RATONES <i>En2^{-/-}</i>	81
FIGURA 4- 19. ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO DEL LINAJE T EN EL TIMO Y EN LA PERIFERIA DE RATONES <i>En2^{-/-}</i>	82
FIGURA 4- 20. ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO DE CÉLULAS MIELOIDES EN RATONES <i>En2^{-/-}</i> ...83	83
FIGURA 4- 21. FORMACIÓN DE CENTROS GERMINALES POR REACCIÓN FRENTE A ERITROCITOS DE CORDERO INYECTADOS INTRAPERITONEALMENTE.	84
FIGURA 4- 22. PRODUCCIÓN DE DIFERENTES CITOQUINAS TRAS LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS CD4-SP MEDIANTE PMA E INOMICINA.	85

FIGURA 4- 23. PRODUCCIÓN DE DIFERENTES CITOQUINAS TRAS LA ACTIVACIÓN DE LINFOTITOS CD8-SP MEDIANTE PMA E INOMICINA.	86
FIGURA 4- 24. GENES UP-REGULADOS EN TIMOCITOS DP DE RATONES <i>En2</i> ^{-/-}	88
FIGURA 4- 25. GENES DOWN-REGULADOS EN TIMOCITOS DP DE RATONES <i>En2</i> ^{-/-}	89
FIGURA 4- 26. GENES UP-REGULADOS EN ESPLENOCITOS CD8 ⁺ DE RATONES <i>En2</i> ^{-/-}	90
FIGURA 4- 27. GENES DOWN-REGULADOS EN ESPLENOCTIOS CD8 ⁺ DE RATONES <i>En2</i> ^{-/-}	91
FIGURA 4- 28. LISTA DE GENES IDENTIFICADOS COMO DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN TIMOCITOS DP Y ESPLENOCITOS CD8 ⁺ DE RATONES <i>En2</i> ^{-/-}	93
FIGURA 4- 29. PCR DE GENOTIPADO DE LOS RATONES NACIDOS TRAS LA MICROINYECCIÓN <i>LCK En2</i>	94

Capítulo 5

FIGURA 5- 1. PROGRESO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.	100
FIGURA 5- 2. PROGRESIÓN DE LA LMC A CRISIS BLÁSTICA DE TIPO T.	111

Documentación

D. ISIDRO SÁNCHEZ GARCÍA, INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (C.S.I.C) EN EL INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL CÁNCER (IBMCC) DE SALAMANCA, Y D. CÉSAR COBALEDA HERNANDEZ, CIENTÍFICO TITULAR DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (C.S.I.C) EN EL CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA (CBMSO) DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado "Identificación y caracterización funcional de nuevos factores de transcripción implicados en la progresión leucémica y la hematopoyesis" que presenta el doctorando D. Fernando Abollo Jiménez, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para ser presentado ante el correspondiente tribunal y optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca a veintinueve de Agosto de dos mil once.



Dr. César Cobaleda Hernández



Dr. Isidro Sanchez García

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

“...Y entonces, un día, llegó una criatura cuyo material genético no era muy diferente de las estructuras moleculares reproductoras de cualquier otra clase de organismos del planeta, que dicha criatura llamó Tierra. Pero era capaz de reflexionar sobre el misterio de su origen, de estudiar el extraño y tortuoso sendero por el cual había surgido desde la materia estelar. Era el material del Cosmos contemplándose a sí mismo. Consideró la enigmática y problemática cuestión de su futuro. Se llamó a sí mismo humano. Y ansió regresar a las estrellas”

Carl Sagan

1.1 Preámbulo

El punto de partida del presente trabajo es una hipótesis: la de que la pérdida de la expresión de genes necesarios para la diferenciación hematopoyética, debida a la hipermetilación de las islas CpG durante la fase crónica de la leucemia mieloide crónica, es una de las causas responsables de la progresión a la crisis blástica final característica de esta enfermedad. Si esta hipótesis es correcta, ha de ser posible identificar genes esenciales para el desarrollo hematopoyético a partir del estudio de la metilación diferencial de las islas CpG en la progresión de la fase crónica a la crisis blástica en muestras de DNA de pacientes.

En esta Introducción se presentan las evidencias fundamentales que, combinadas, sustentan esta hipótesis, junto con otros aspectos que nos han de permitir discutir posteriormente los resultados experimentales obtenidos: i) el concepto del cáncer como una alteración de los procesos normales de diferenciación, ii) la descripción somera del proceso de la diferenciación hematopoyética, con especial atención a la diferenciación de los linfocitos T, iii) el papel de la metilación del DNA en la regulación génica en el desarrollo normal y tumoral y iv) la biología de la leucemia mieloide crónica.

1.2 Desarrollo normal y desarrollo tumoral. El cáncer como una alteración de la diferenciación

Los procesos de desarrollo se basan en la existencia de progenitores primitivos indiferenciados que, de manera gradual, va a ir dando origen a intermediarios celulares con un potencial de diferenciación más limitado y que, a su vez, acabarán generando los distintos tipos celulares que constituyen un organismo, un órgano, o un tejido. Esta progresión está estrictamente controlada por factores de transcripción y reguladores epigenéticos que determinan los patrones finales de expresión génica de cada linaje y de cada estadio de diferenciación (Figura 1-1) (Abollo-Jimenez et al., 2010; Feinberg, 2007; Vicente-Duenas et al., 2009a). En general, las células progenitoras van perdiendo su potencia a medida que se van diferenciando (Figura 1-2). En este contexto, la alteración del equilibrio determinado por los factores de transcripción, o de la "memoria" epigenética celular, pueden llevar a serios defectos en el desarrollo del organismo o del tejido, y llevar a la aparición de enfermedades como resultado de la generación de tipos celulares no fisiológicos. Entre las patologías que resultan de la alteración de los controles

transcripcionales y/o epigenéticos de la identidad celular, las más relevantes son las alteraciones del desarrollo y el cáncer (Feinberg, 2007). En el caso de los defectos en el desarrollo, las interferencias con los programas genéticos responsables del mantenimiento de la identidad celular durante la embriogénesis o el desarrollo temprano son la causa de los fallos en la generación o funcionalidad de las células diferenciadas. Esto conlleva un mal funcionamiento de los órganos o, si los genes afectados son fundamentales para determinar el destino celular de muchos tejidos, puede comprometer la viabilidad de todo el organismo (Feinberg, 2007). En el caso del cáncer, se produce un proceso de reprogramación en el cual los eventos oncogénicos determinan la aparición de un nuevo linaje patológico, un linaje tumoral.

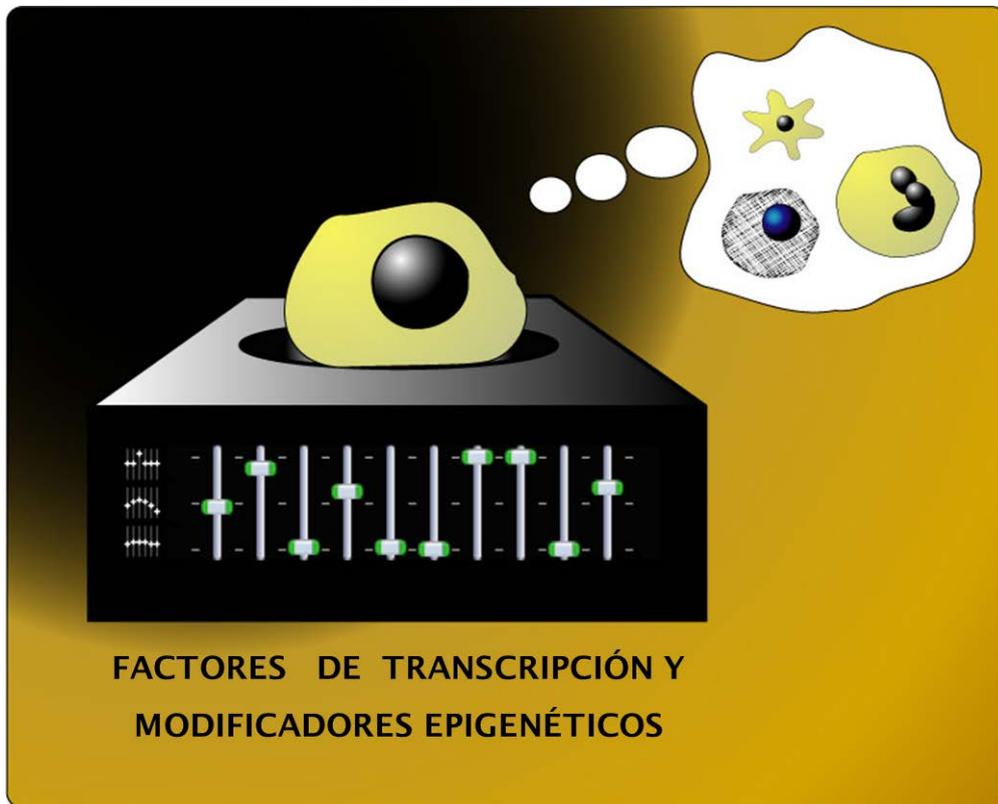


Figura 1- 1. Elección del destino celular. Las células se ven sometidas a una fina regulación transcripcional mediada fundamentalmente por factores de transcripción y modificadores epigenéticos, de manera que la célula indiferenciada es programada hacia un destino específico de entre todas las opciones (Vicente-Duenas et al., 2009b).

El cáncer es un problema de enorme importancia tanto desde el punto de vista médico y social como desde el punto de vista científico. A pesar de los grandes avances realizados en el conocimiento de la biología básica del cáncer, una gran parte de los

tumores no pueden ser curados con los tratamientos actuales y, aunque se consiguen remisiones en un gran número de casos, las recaídas son, en general, inevitables (Etzioni et al., 2003; Sanchez-Garcia et al., 2007). En los procesos tumorales se producen muchas alteraciones de la biología celular normal, cuya combinación da como resultado una desregulación de los controles de, entre otras funciones, la proliferación y la muerte celular (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). No obstante, la mayor parte de estas propiedades las comparten tanto los tumores benignos como los malignos (Lazebnik, 2010). Las terapias actuales, salvo contadas excepciones, se basan fundamentalmente en la consideración del cáncer como una enfermedad de la proliferación celular, y se dirigen contra esta propiedad tumoral. En consecuencia, los tratamientos son inespecíficos y altamente tóxicos y, como se ha indicado, en general no consiguen evitar las recaídas. Es un hecho bien conocido para los patólogos el que los tumores están formados por diferentes tipos celulares. Sin embargo, sólo recientemente se ha empezado a tener en cuenta este hecho para intentar entender el porqué de las recaídas en los pacientes con cáncer. Es en este contexto en el que surge la teoría de las células madre tumorales ("*cancer stem cells*", CSCs). Esta teoría, que cada vez tiene más apoyo experimental y clínico para muchos tipos de tumores (Clevers, 2011; Sanchez-Garcia et al., 2007), interpreta el cáncer como un tejido aberrante, pero también mantenido por una población de células madre, las CSCs, que son las únicas dentro de la masa tumoral capaces de regenerar el tumor. El resto de las células cancerosas, que componen la mayor parte de la masa tumoral, carecen de la capacidad de regenerar el tumor, de la misma forma que las células diferenciadas de un tejido sano no pueden regenerar dicho tejido, y sí pueden hacerlo las células madre. Las terapias antiproliferativas atacan esta masa y logran su reducción y la aparente curación. Sin embargo, las CSCs, por sus propiedades de células madre, son resistentes a las terapias y, con el tiempo, regeneran la masa tumoral (Clevers, 2011; Dalerba et al., 2007; Reya et al., 2001; Sanchez-Garcia et al., 2007). Este punto de vista refuerza el concepto del cáncer como una alteración patológica de la diferenciación celular, en la que el destino celular normal es reprogramado por los eventos oncogénicos para generar un nuevo linaje aberrante, mantenido por una célula madre tumoral y compuesto por tipos celulares patológicos más o menos diferenciados, que en general presentan similitudes con los tipos celulares de los tejidos normales a partir de los cuales han surgido. De esta manera, el estudio del desarrollo normal de los tejidos y el estudio de la biología del cáncer están estrechamente relacionados.

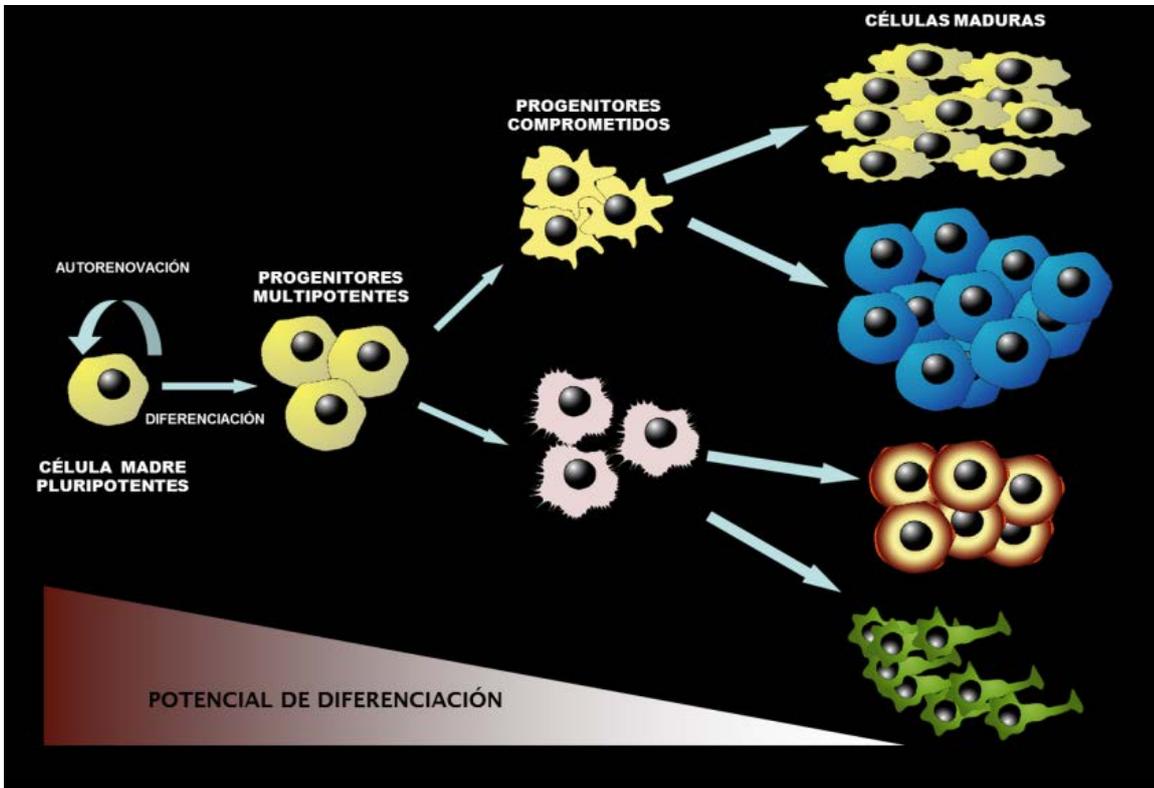


Figura 1- 2. Potencial de diferenciación y compromiso a linaje. Las células madre multipotentes son las encargadas de generar y mantener todos los tipos celulares de los diferentes tejidos que componen los organismos pluricelulares. Poseen capacidad de autorrenovación. A lo largo del proceso de diferenciación, las células van a ir eligiendo y comprometiéndose a determinados destinos celulares, perdiendo cada vez más potencial de diferenciación.

1.3 Diferenciación hematopoyética

El desarrollo del sistema hematopoyético es uno de los mejor estudiados dentro de los vertebrados, dadas las especiales características que le confiere el hecho de la movilidad de sus componentes celulares y el que sus distintos linajes pueden ser identificados a lo largo de su diferenciación mediante combinaciones específicas de marcadores de superficie.

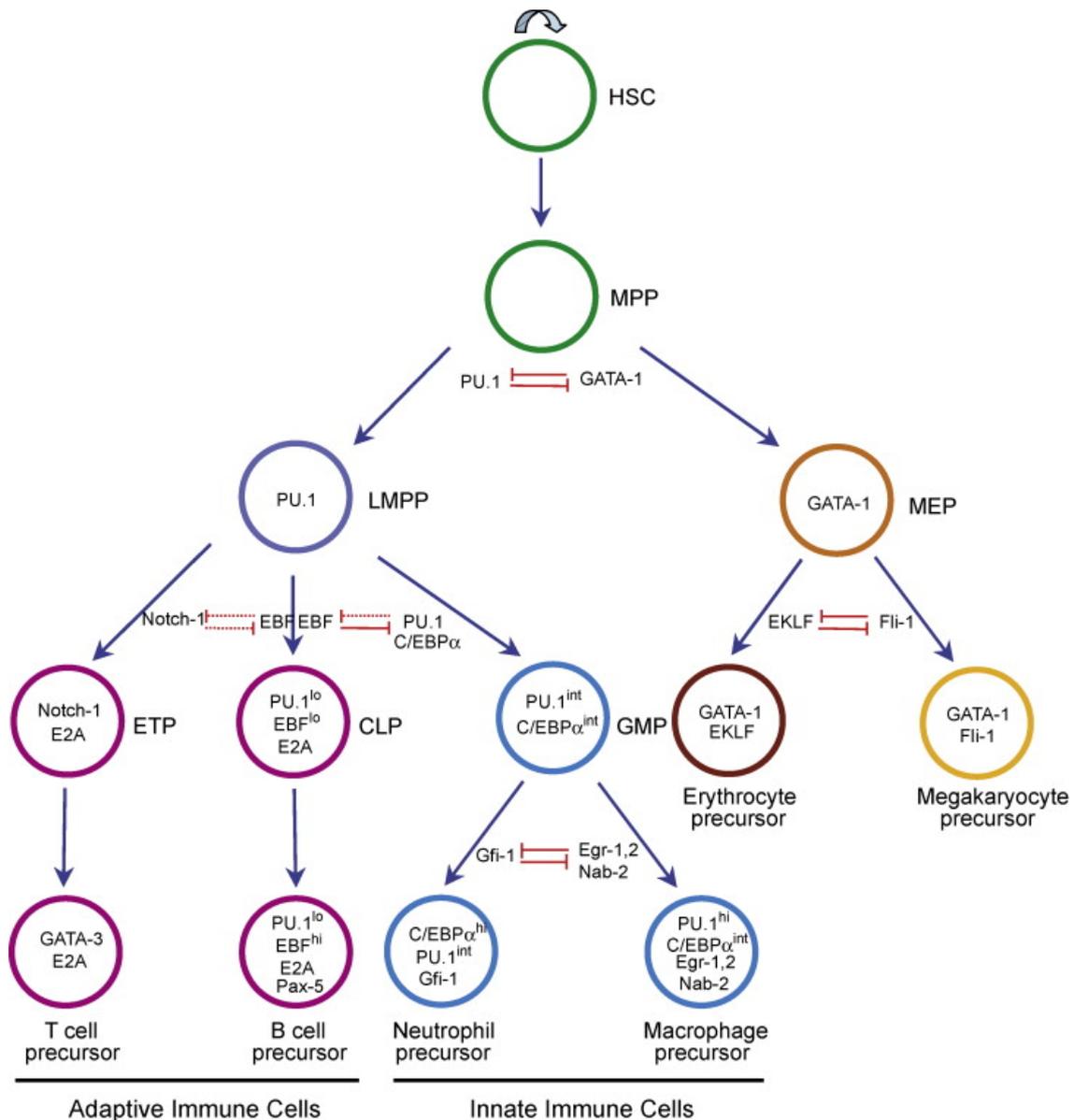


Figura 1- 3 Esquema del desarrollo hematopoyético temprano (Laslo et al., 2008). Se muestran los principales intermediarios de diferenciación de los principales linajes hematopoyéticos, las interacciones entre los factores que determinan la elección de uno u otro destino celular y, dentro de cada célula, los principales genes que son requeridos para originar dicho tipo celular.

La primera célula en la jerarquía es la célula madre hematopoyética ("*hematopoietic stem cell*", HSC), que posee las capacidades de autorrenovación y diferenciación y puede dar origen a todos los tipos celulares sanguíneos y regenerar todo el sistema hematopoyético de un receptor que ha sido previamente irradiado letalmente con radiación gamma (Purton and Scadden, 2007). Existen diferentes combinaciones de marcadores de superficie que se pueden utilizar para aislar las HSCs, pero el más universal las define como células negativas para marcadores de linaje (Lin⁻, siendo estos marcadores CD3, CD4, CD8, CD11c, CD19, DX5 o NK1.1, B220, TER119, GR1 y MAC1) y

positivas para Sca1 y cKit. Esta población $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{c-Kit}^{\text{HIGH}}$ de la médula ósea contiene las células capaces de repoblar un sistema hematopoyético a largo plazo y constituye aproximadamente un 0.1% del total de las células de la médula ósea de un ratón. A partir de estas HSCs se van a ir generando intermediarios celulares con capacidades de diferenciación cada vez más reducidas. En los últimos años, debido al enorme avance de la citometría de flujo, nuevos tipos celulares se han ido identificando con nuevas combinaciones de marcadores. Este es un campo en el cual todavía existe mucho debate, porque las poblaciones aisladas son muy minoritarias y transitorias y, además, lo avanzado de las tecnologías usadas hace muy difícil la reproducibilidad de los datos entre laboratorios. Esto ha hecho que en los últimos años se hayan propuesto numerosos modelos para explicar cómo se produce la pérdida de potencialidad progresiva en el camino que va desde las HSCs hasta las células ya comprometidas a un determinado linaje (Brown et al., 2007; Ceredig et al., 2009). Sin entrar en esta controversia, está relativamente aceptado que, por debajo de las HSCs en la jerarquía, las células $\text{CD34}^+ \text{Flt3}^+$ ya han perdido gran parte de su capacidad para contribuir a los linajes megacariocítico y eritroide. Dentro de este compartimento se encuentran los "*lymphoid-primed multipotent progenitors*" (LMPPs) (Adolfsson et al., 2005), ya sesgados hacia la diferenciación linfoide, pero todavía con capacidad para la diferenciación mieloide (Figura 1-3). Los LMPPs darán origen a los progenitores de granulocitos y macrófagos (GMPs) que, por otra parte, también pueden proceder de un "*common myeloid progenitor*" (CMP) anterior y con capacidad eritro-megacario-mieloide (Adolfsson et al., 2005; Akashi et al., 2000). Ya orientados hacia la diferenciación linfoide, dentro de los LMPPs se encuentran los "*early lymphoid progenitors*" (ELPs). Identificados mediante el uso de un ratón con un knock-in de GFP en el locus *RAG1* (Igarashi et al., 2002), los ELPs son muy eficaces en la generación de linfocitos por trasplante, mientras que su potencial mieloide está muy reducido, por lo que se considera que representan el estadio más temprano de especificación linfoide (Igarashi et al., 2002). A partir de este punto, cada vez está mejor definido lo que ocurre en el proceso de diferenciación de los linfocitos B, mientras que el origen celular de los linfocitos T es todavía motivo de mucha controversia. El siguiente paso hacia la diferenciación B lo forman los "*common lymphoid progenitors*" (CLPs), definidos inicialmente como $\text{Lin}^- \text{IL-7R}\alpha^+ \text{c-Kit}^{\text{Lo}} \text{Sca1}^+$ (Kondo et al., 1997); los CLPs, como su nombre indica, fueron originariamente aislados por su capacidad para dar origen a los linfocitos B, T y células NK, pero recientemente su capacidad para generar linfocitos T en condiciones normales en el desarrollo ha sido muy discutida, dado que es un intermediario

celular que se encuentra restringido a la médula ósea y no sale a la sangre, con lo cual es muy improbable que sean estos progenitores los que siembren el timo (Chi et al., 2009; Schwarz and Bhandoola, 2004). Parece que son los LMPPs o progenitores similares los que, saliendo de la médula ósea a la circulación, llegan hasta el timo. Los progenitores más indiferenciados identificados en este órgano ("*early thymic progenitors*", ETPs, definidos como $CD4^-CD8^-CD25^-CD44^+cKit^+$ o simplemente $Lin^-CD25^-cKit^+$) incluidos dentro de la población de dobles negativos-1 (DN1) tienen también potencial mielóide, dendrítico y de células NK, que se perderán como consecuencia de la señalización vía Notch en el timo (ver más adelante). En el caso de los linfocitos B, a partir de los CLPs se producirá la especificación de la identidad de los linfocitos B que se desarrollarán en la médula ósea (Cobaleda et al., 2007b; Hardy et al., 2007).

Todos estos pasos de diferenciación están estrictamente controlados por factores de transcripción y/o modificadores epigenéticos que, junto con las señales extrínsecas del medio (citoquinas) regulan las transiciones de unos estadios a otros de forma ordenada. Como ya hemos comentado, la alteración del equilibrio existente entre estos factores conlleva alteraciones en el desarrollo normal. Esto queda evidenciado por el estudio de los ratones knockout de genes esenciales para la diferenciación hematopoyética. La falta de un factor de transcripción origina un bloqueo en la diferenciación en el primer punto o puntos del desarrollo en el que ese factor es requerido de manera indispensable (Orkin and Zon, 2008). La Figura 1-4 ilustra este punto de manera gráfica. Se recogen en ella los ejemplos más relevantes de los bloqueos que se generan al faltar diferentes factores de transcripción (Orkin and Zon, 2008). Según la "posición" de estos genes en la jerarquía del desarrollo, su impacto afecta a más o menos linajes. Así, la falta de genes que son necesarios para el mantenimiento de las HSCs generalmente es letal, ya que el organismo carece de sistema hematopoyético. Por el contrario, la falta de genes que afectan a la diferenciación de linajes concretos, sólo afecta a este linaje y, si dicho linaje no es vital, no interfiere con la viabilidad del animal knockout. Este es el caso, por ejemplo, del factor de transcripción *Pax5* en los linfocitos B, cuya falta en el ratón knockout sólo produce (en el sistema hematopoyético) la carencia de linfocitos B (Cobaleda et al., 2007b; Nutt et al., 1999). Otro aspecto importante a resaltar en este contexto es el hecho de que la mayor parte de estos factores están directamente implicados en cánceres hematopoyéticos en humanos y/o en ratón, bien como oncogenes por sobreexpresión ectópica (generalmente debida a translocaciones cromosómicas), bien como supresores tumorales por inactivación.

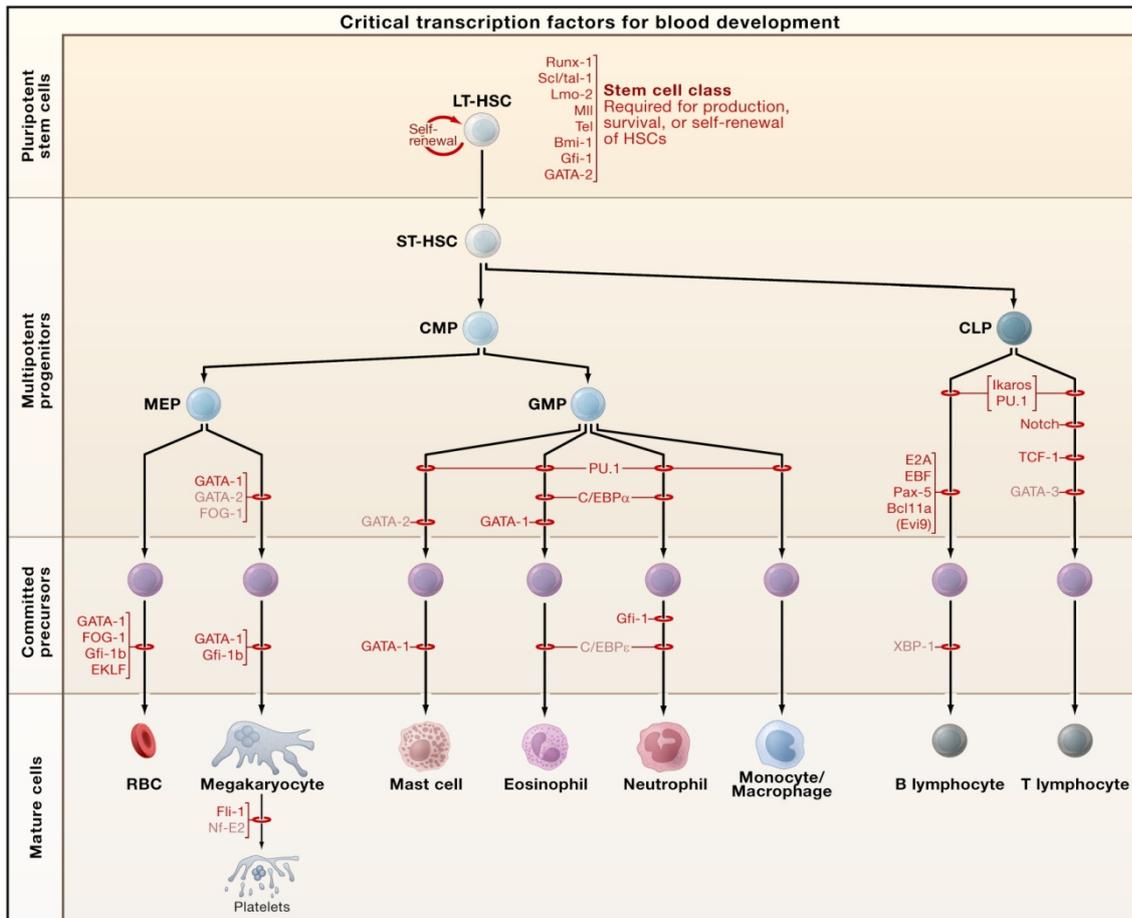


Figura 1- 4. Requerimientos de factores de transcripción en la hematopoyesis. Los puntos en los cuales la diferenciación hematopoyética es interrumpida como consecuencia de la falta de un determinado factor se indican con los anillos rojos. Los genes indicados en color rojo más oscuro han sido asociados con cáncer humano. Tomada de (Orkin and Zon, 2008).

1.4 Desarrollo de los linfocitos T

Los linfocitos T presentan la particularidad, desde el punto de vista del desarrollo, de que precisan un órgano específico para su diferenciación: el timo (Abbas et al., 2008). En el timo, y en localizaciones precisas dentro de la arquitectura del órgano, se va a producir todo el desarrollo y la maduración de los linfocitos T (Ciofani and Zuniga-Pflucker, 2007; Takahama, 2006). Los linfocitos T se pueden definir por su expresión de determinados marcadores de superficie y por el reordenamiento de los loci del receptor de los linfocitos T (TCR). Como ya hemos mencionado, los linfocitos T surgen de progenitores que carecen de los correceptores CD4 y CD8, dentro del compartimento celular conocido por tanto como “dobles negativos” (DN). Los DN se pueden subdividir a su vez en cuatro subtipos en función de los niveles de expresión de los marcadores CD25 y CD44. Las

células DN1 (CD44⁺CD25⁻) son las más primitivas y, dentro de ellas están comprendidos los ETPs, que son cKit⁺. El desarrollo de los linfocitos T comienza en el estadio DN2 (CD44⁺CD25⁺), pero el compromiso al linaje T no ocurre hasta el estadio DN3 (CD44⁻CD25⁺), que a su vez se subdivide en DN3a y DN3b. El reordenamiento de las regiones V-(D)J del TCR se inicia en DN2-DN3a. La generación de un reordenamiento funcional de la cadena β del TCR permite la formación del complejo preTCR y así la diferenciación progresa al estadio DN3b (Carpenter and Bosselut, 2010; Chi et al., 2009). Los timocitos DN3b se diferencian a DN4 (CD44⁻CD25⁻), que luego, a través del estadio de "*immature single-positive cells*" ISP, darán origen a los linfocitos T dobles positivos (DP) que coexpresan CD4 y CD8. En este punto se iniciará y completará el reordenamiento VJ del TCR α , llevando a la desaparición del preTCR y la expresión del $\alpha\beta$ TCR (TCR). A partir de este punto se producen los pasos de selección que van a garantizar que sólo las células que expresen TCRs que reconozcan antígenos ajenos, unidos a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) propias de cada individuo, sean seleccionadas para salir del timo a la periferia. La expresión del TCR permite en primer lugar a las células la interacción con autoantígenos presentados por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en el timo. Si los TCRs no reconocen el MHC (un 90% de ellos) mueren por apoptosis. Si reconocen los complejos de antígenos propios con una afinidad demasiado alta, las células sufren un proceso de selección negativa y son eliminados. Sólo los que reconozcan el MHC, pero con una baja afinidad, experimentarán una selección positiva y seguirán el proceso de diferenciación para generar células que expresen, bien el correceptor CD4, o el CD8 ("*single positive*", SP) (Abbas et al., 2008). Los linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ saldrán del timo y se dirigirán, fundamentalmente, al bazo y los nódulos linfáticos, donde llevarán a cabo sus funciones en la respuesta inmune. Las células CD8 son capaces de unir el MHC tipo I y se encargan de la destrucción de las células infectadas por patógenos (células T citotóxicas), mientras que las CD4 unen el MHC clase II y son células que regulan y ayudan a la respuesta inmune de otros tipos celulares (células CD4 reguladoras o helper)

Todo este proceso está regulado por diferentes factores extrínsecos e intrínsecos, que varían a medida que la célula se va diferenciando y además va migrando a nuevas localizaciones dentro del timo, que proporcionan a su vez nuevas señales. Aunque, dada esta complejidad, hay muchos factores que interaccionan entre sí, habiendo algunos elementos especialmente relevantes (Hayday and Pennington, 2007; Rothenberg, 2011; Rothenberg et al., 2008; Rothenberg et al., 2010). El factor más importante para la

diferenciación T es la interacción entre el receptor Notch1 expresado en los precursores que entran en el timo y los ligandos Delta-like (DLL, especialmente DLL1 y DLL4) que se expresan en la superficie de las células del epitelio tímico. La señalización por Notch es la única descrita hasta la fecha que es capaz de inducir la diferenciación de los linfocitos T. En ausencia de Notch1, hay un bloqueo en la diferenciación T al nivel de los progenitores tempranos (Radtke et al., 1999). Por el contrario, la sobreexpresión de una forma activa intracelular de Notch1 induce la formación de linfocitos T en la propia médula ósea, y bloquea la diferenciación B (Pui et al., 1999). Esta primera señal vía Notch es instructiva y además ejerce la función de bloquear el desarrollo de cualquier otro linaje que no sean los linfocitos T. Junto con la señal proporcionada por la interleukina-7 (IL-7), permiten la expansión y supervivencia de los progenitores y los inicia en la diferenciación T (García-Peydro et al., 2006). Se precisan niveles sostenidos de señalización a través de la vía de Notch para la progresión a través de las fases DN1 a DN3, y las funciones y los genes que son regulados por Notch en la diferenciación T son muchísimos (Hayday and Pennington, 2007; Rothenberg, 2011; Rothenberg et al., 2008; Rothenberg et al., 2010). Otro elemento fundamental a partir del momento de su aparición es el TCR (y el preTCR) que proporciona las señales necesarias para la supervivencia y la selección celular. Finalmente, hay una plétora de genes, fundamentalmente factores de transcripción, que son necesarios para la diferenciación de los linfocitos T, entre los cuales se encuentran, por ejemplo, *Gata3*, *Myb*, *Runx1*, *E2a*, *Heb*, *Tcf1*, *Gfi1* o *Ikaros* (Hayday and Pennington, 2007; Rothenberg, 2011; Rothenberg et al., 2008; Rothenberg et al., 2010). La falta de alguno de estos factores produce serias alteraciones y bloqueos en la diferenciación o el correcto funcionamiento de los linfocitos T.

1.5 La metilación del DNA en el desarrollo normal y tumoral

La epigenética estudia los cambios hereditarios en los patrones de expresión génica que no implican alteraciones en la secuencia del DNA. La regulación epigenética incluye fundamentalmente dos tipos de modificaciones químicas que afectan al DNA o a las proteínas estructurales que interaccionan con el mismo: la metilación del DNA y las modificaciones covalentes de las histonas. Las histonas pueden sufrir un elevado número de modificaciones postraduccionales (metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación), y todas ellas tienen distintas funciones reguladoras sobre el DNA que se encuentra interaccionando con dichas histonas, constituyendo, junto con la metilación del

DNA, un auténtico “código epigenético” que regula la función del DNA (Jenuwein and Allis, 2001; Kouzarides, 2007). En este trabajo nos hemos centrado en las alteraciones de la metilación del DNA en los procesos tumorales.

La metilación del DNA tiene lugar en la posición 5' del anillo de las citosinas que forman parte de dinucleótidos CpG (“p” representa el fosfato del enlace fosfodiéster). Estos pares CpG no se encuentran distribuidos aleatoriamente por el genoma, como sería de suponer, sino que, en la mayor parte del mismo, su frecuencia es inferior a la que sería de esperar estadísticamente, mientras que en otras zonas los pares CpG se concentran, formando lo que se denominan “islas CpG”, que se caracterizan por un porcentaje de C/G (frente a A/T) del 50% y una relación de pares CpG observados/esperados del 0.6 (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). Esas islas CpG se encuentran localizadas en las regiones 5' reguladoras del 60% de los genes humanos y, de hecho, se han utilizado como criterio para la búsqueda e identificación de los mismos (Takai and Jones, 2002). Las citosinas de los escasos pares CpG que no se encuentran en las islas se encuentran normalmente metiladas. Por el contrario, las citosinas de los pares CpG contenidos dentro de las islas normalmente se encuentran no metiladas, lo cual se asocia generalmente con un estado transcripcional activo del gen correspondiente. La metilación de la isla CpG conlleva la pérdida de la expresión del gen, pues desencadena un proceso de compactación de la cromatina de la región 5' que la hace inaccesible a la maquinaria transcripcional. Las enzimas responsables de llevar a cabo el proceso de metilación del DNA son las DNA metiltransferasas (DNMT). Hay tres enzimas DNMT: DNMT1 es la responsable de mantener el patrón de metilación tras la replicación del DNA, metilando las nuevas citosinas enfrentadas a pares CpG metilados en la hebra parental (Bestor and Ingram, 1983) y su eliminación conlleva una pérdida global de la metilación a través de todo el genoma (Li et al., 1992); por otro lado, las enzimas DNMT3a y DNMT3b son las metilasas *de novo*, que son las responsables de los cambios en el patrón de metilación (Okano et al., 1999; Okano et al., 1998). El mecanismo molecular de la desmetilación del DNA no está aún bien caracterizado, porque aún no se ha identificado de forma inequívoca la enzima o enzimas responsables del proceso. Parece bastante probable que las enzimas más importantes en este proceso sean las oxigenasas TET (1, 2 y 3), responsables de la conversión de la metilcitosina en hidroximetilcitosina, que tendría diferentes propiedades regulatorias y sería el primer paso para la generación de pares CpG sin metilar, bien mediante la intervención de otras enzimas, bien simplemente interfiriendo con la unión de DNMT1 en su tarea de mantenimiento de la metilación (Tahiliani et al., 2009).

Tradicionalmente se ha interpretado que, exceptuando algunos procesos puntuales (la inactivación del cromosoma X, o los genes sometidos a “imprinting”), el estado normal de las islas CpG era de ausencia de metilación. Sin embargo, cada vez hay más evidencias que sugirieren que esto no siempre es así, y que la metilación de las islas CpG varía durante los procesos de diferenciación celular, como corresponde con su papel en el desarrollo y con el hecho de que los patrones de expresión génica varían a lo largo del mismo. Los ejemplos más relevantes proceden del estudio del sistema hematopoyético, dónde se ha observado que la metilación, y en particular la mediada por DNMT1, es esencial para la regulación del proceso de autorrenovación de las HSCs y para el inicio del compromiso hacia los linajes linfoides (Broske et al., 2009; Trowbridge et al., 2009) de manera que, en ratones con un gen *Dnmt1* hipomórfico, hay una disminución de los números de CLPs y de los estadios DN1-3 en el timo. Esta dependencia se ve justificada en posteriores experimentos en los que se ha estudiado el patrón global de metilación (metiloma) de los más relevantes intermediarios celulares del proceso de diferenciación hematopoyética (MPPs, CLP, DN1, DN2, DN3, CMP, GMP) en ratón (Ji et al., 2010). Los resultados de este estudio indican que existen cambios globales en el patrón de metilación a lo largo del proceso de especificación del linaje, y que estos cambios afectan a genes concretos implicados en la regulación transcripcional y/o epigenética del desarrollo. Igualmente, este estudio, al analizar regiones diferencialmente metiladas durante el desarrollo hematopoyético, ha permitido identificar genes que anteriormente no se sabía que desempeñaban una función en este proceso, como los genes *Arl4c* o *Jdp2*, que participan en la elección entre los destinos linfoide y mieloides (Ji et al., 2010). Estos datos obtenidos en ratón se han visto recientemente confirmados por evidencias similares encontradas en muestras humanas (Bocker et al., 2011). En la misma línea se encuentran resultados obtenidos mediante el enriquecimiento de islas CpG por cromatografía de afinidad a partir de muestras celulares de sangre humana (Illingworth et al., 2008). Mediante esta aproximación experimental también se ha comprobado que existe una metilación específica de cada tipo celular que se centra sobre todo en los *loci* de los genes reguladores del desarrollo. Finalmente, también se ha descrito que no sólo las islas CpG situadas en el extremo 5' de los genes se ven afectadas en este proceso, sino que también islas CpG situadas en regiones intragénicas actúan como reguladoras de la expresión diferencial de genes en los estadios tempranos de la especificación de los linajes hematopoyéticos (Deaton et al., 2011). Todas estas evidencias demuestran que la función de la metilación de las islas CpG es dinámica y tiene un papel fundamental en el

establecimiento de la identidad celular durante el proceso de diferenciación, algo que ha sido puesto en evidencia a partir del estudio del sistema hematopoyético, fundamentalmente.

Las alteraciones epigenéticas desempeñan un papel muy importante en el desarrollo y la progresión de los tumores. Inicialmente se pensó que el cáncer era solamente debido a alteraciones genéticas que afectaban a la secuencia del DNA, pero hoy en día se sabe que no es así, y que todos los mecanismos epigenéticos que participan en el desarrollo normal intervienen también, de forma aberrante, en el proceso tumoral (Jones and Laird, 1999; Rodriguez-Paredes and Esteller, 2011). El primero en ser identificado fue precisamente la metilación del DNA. Existen dos manifestaciones principales, y aparentemente contrapuestas, de la alteración de los patrones de metilación en el proceso tumoral: por un lado hay una hipometilación global del genoma de las células cancerosas; por otro, hay una hipermetilación de las islas CpG asociadas a los genes. La hipometilación afecta fundamentalmente, aunque no sólo, a áreas del genoma desprovistas de genes y a regiones intrónicas (Baylin and Jones, 2007). La hipometilación contribuye al proceso tumoral fundamentalmente por tres mecanismos (Esteller, 2008): i) generación de inestabilidad cromosómica que lleva a la recombinación mitótica y la aparición de deleciones y translocaciones (Eden et al., 2003), ii) reactivación de elementos transponibles como las secuencias L1 y las repeticiones Alu (Bestor, 2005) y iii) pérdidas de "imprinting" (Feinberg, 1999).

La hipermetilación de las islas CpG es quizás el fenómeno mejor caracterizado de todas las alteraciones epigenéticas asociadas con el desarrollo y la progresión del cáncer, especialmente la hipermetilación y pérdida de expresión de genes supresores tumorales clásicos (Herman and Baylin, 2003). Los genes que han sido descritos como inactivados en los procesos tumorales han sido clasificados de forma muy general en tres amplias categorías (Baylin and Jones, 2007): i) genes que ya eran conocidos como genes supresores tumorales clásicos (*VHL*, *E-cadherina*, *p16Ink4a*, *MLH1*, *APC*, *Stk4*, *Rb*) y cuya pérdida de expresión por hipermetilación venía a añadir un nuevo mecanismo molecular de inactivación dentro del concepto de los "dos hits" de la hipótesis de Knudson; ii) genes que ya habían sido descritos como candidatos a ser supresores tumorales, pero en los que no se habían detectado frecuencias significativas de mutaciones inactivantes, y para los que la hipermetilación supondría un mecanismo de inactivación más frecuente (*FHIT*, *Rassf1a*, *O6-MGMT*, *Gst-Pi*, *GATAs 4 y 5*, *DAP-kinasa*); iii) genes que se han encontrado en screenings de búsqueda de genes metilados en cáncer, pero cuya función biológica en el

proceso tumoral (o incluso en condiciones normales) no es conocida (*HIC-1*, *SFRPs 1,2,4,5*, *BMP-3*, *SLC5A8*, *SS11*). Los potenciales mecanismos por los cuáles se produce una desregulación de la maquinaria de metilación en los procesos tumorales no son aún bien conocidos y, para evitar redundancias, los mencionaremos en la sección de Discusión, a la luz de los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Los patrones de expresión génica están en todo momento controlados transcripcional y epigenéticamente. Ambos aspectos están íntimamente relacionados entre sí, y cualquier desregulación de este delicado mecanismo resulta en una alteración que puede, bien ser letal para la célula, o bien reprogramarla para llevarla a un nuevo destino celular aberrante. Los esfuerzos tradicionales de la investigación en cáncer han estado enfocados hacia la definición de nuevos patrones transcripcionales y epigenéticos específicos del cáncer. Sin embargo, los datos más recientes parecen sugerir que en realidad nuestros esfuerzos deberían estar centrados en definir las alteraciones transcripcionales y epigenéticas en el cáncer como desviaciones del estrecho margen en el que se mantiene el desarrollo normal (Hansen et al., 2011).

1.6 La leucemia mieloide crónica (LMC)

La LMC constituye entre un 15 y un 20% del total de las leucemias, tiene una incidencia de 1-2 por cada 100.000 personas con una mediana de edad comprendida entre los 50 y los 60 años (Swerdlow et al., 2008). La LMC es una enfermedad de la célula madre hematopoyética que se caracteriza por la anemia, granulocitosis y presencia de granulocitos inmaduros en sangre, basofilia, frecuente trombocitosis y esplenomegalia. Generalmente se detecta de forma casual (un 20-40% de los casos son asintomáticos) en análisis sanguíneos de rutina, en los cuales el rasgo más significativo es un conteo de leucocitos anormalmente alto. Otros hallazgos encontrados son fatiga, pérdida de peso y sudoración nocturna (San Miguel and Sanchez-Guijo, 2009; Sans-Sabrafen et al., 2007).

Desde el punto de vista molecular, la LMC fue la primera patología que se asoció con una translocación cromosómica, la $t(9;22)(q34;q11)$ que genera el denominado cromosoma Filadelfia (por eso se habla de leucemias Ph^+) (Baikie et al., 1960; Melo and Barnes, 2007; Nowell, 1962) y da como resultado la proteína quimérica BCR-ABLp210, responsable del desarrollo tumoral.

La LMC es una enfermedad que presenta dos (o tres) fases secuenciales. Surge como consecuencia de la transformación de una HSC por acción del oncogén BCR-ABL. La descendencia celular de la HSC-Ph⁺ tiene una ventaja proliferativa sobre el resto de las células, y de esta manera el clon Ph⁺ va desplazando la hematopoyesis normal. La translocación puede detectarse en todos los linajes hematopoyéticos, como prueba del origen molecular de la enfermedad en una célula madre. La expansión hematopoyética en esta primera fase, la fase crónica, implica fundamentalmente un aumento de la masa de células mieloides, tanto maduras como precursores. Durante la fase crónica las células son poco invasivas y se encuentran restringidas a los órganos hematopoyéticos. En el hemograma lo más característico es una elevada leucocitosis que varía entre 30.000 y 300.000 leucocitos/mm³, (los valores en condiciones normales oscilan entre 5.000 y 9.000 leucocitos/mm³). Se trata, como se ha dicho, de una leucocitosis granulocítica, en la que se hayan representados todos los estadios madurativos de la granulopoyesis, con mayor predominio de las formas más maduras. En algunos casos la leucocitosis puede ser oscilante, dificultando el tratamiento. Se observa también cierta basofilia de manera constante y en cambio la eosinofilia es menos frecuente. La aparición de eritroblastos en sangre ocurre con el 50% de los enfermos, siendo frecuente la anemia. En cuanto al recuento plaquetario suele ser normal o existir una ligera trombocitosis. Otro factor que puede llegar a ser diferencial es la reducción del factor de la fosfatasa alcalina granulocitaria (FAG) que será muy baja en la LMC, mientras que en leucocitosis provocadas por infecciones severas dicha fosfatasa se encontrará elevada. La LMC suele detectarse en el 95% de los casos en la fase crónica, siendo un 50% de los casos asintomáticos, como ya se ha mencionado, y el resto presentando síntomas muy generales y variables de cansancio, anemia ligera, sudoración nocturna, fiebre, etc. (Perrotti et al., 2010). El 60% de los pacientes presenta esplenomegalia de grado variable y casi un tercio presenta hepatomegalia.

Aproximadamente con una mediana de 5 años los enfermos entran bruscamente en una fase más agresiva, resistente a la terapia, y que se caracteriza y comporta como una leucemia aguda: ésta es la denominada crisis blástica. Aproximadamente en el 45% de los casos el paso a esta crisis blástica ocurre menos bruscamente, pudiéndose diferenciar una segunda fase intermedia denominada fase de aceleración. En estos pacientes los cambios son más progresivos y los síntomas de la fase crónica se empeoran y agravan, con una esplenomegalia creciente, sudoraciones nocturnas continuas e intensos dolores óseos. A nivel hematológico se observan anemias más severas,

plaquetopenia, basofilia muy marcada (>20%), y las células blásticas aparecen en la periferia a niveles mayores (6-14%) que los observados en las fases crónicas. Esta fase suele durar aproximadamente 1 año, y desemboca inevitablemente en una crisis blástica (CB). Algunos pacientes pueden fallecer durante esta fase sin llegar a la CB a causa de hemorragias e infecciones incontroladas (San Miguel and Sanchez-Guijo, 2009; Sans-Sabrafen et al., 2007).

La crisis blástica surge como consecuencia de un bloqueo en la diferenciación que dará origen a precursores o blastos que se acumularán e invadirán la periferia extramedular. La mediana de supervivencia en la crisis blástica es de 4 a 5 meses, y sus principales síntomas son el recrudecimiento de la sintomatología crónica: los dolores óseos se vuelven más intensos, sudoraciones profusas a lo largo de la noche, las molestias que genera un bazo ya muy hiperplásico también son importantes, también el efecto de la hepatomegalia, y síndrome anémico, aunque son las infecciones, las hemorragias y leucostasis en el sistema nervioso central, pulmón o miocardio las que generalmente acaban con la vida del enfermo (San Miguel and Sanchez-Guijo, 2009; Sans-Sabrafen et al., 2007). La naturaleza de los blastos es generalmente mielóide, aunque un 30% de los casos evolucionan a una crisis blástica de tipo linfóide casi siempre de tipo B, siendo las de tipo T muy raras. Generalmente las crisis de tipo linfóide suelen ser de aparición más abrupta y sin fase de aceleración (Ye et al., 2002).

En general, las crisis blásticas recuerdan a una leucemia aguda del mismo tipo de linaje, y los criterios para su diagnóstico son (Sans-Sabrafen et al., 2007; Swerdlow et al., 2008): i) blastos $\geq 20\%$ en médula ósea o $\geq 15\%$ en sangre periférica; ii) blastos + promielocitos $\geq 50\%$ en médula ósea o $\geq 30\%$ en sangre periférica; iii) infiltración blástica extramedular

A nivel molecular, la aparición de la LMC está asociada en la mayoría de los casos con la formación patológica del cromosoma Filadelfia, denominándose leucemia mielóide crónica atípica (Ph⁻) la que carece de dicha aberración. Dicho cromosoma Ph, es el resultado de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 en una célula madre hematopoyética dejando unidos los genes BCR y ABL (Figura 1-5). El cromosoma Filadelfia (aunque con puntos de ruptura ligeramente diferentes (Sugimoto, 2003)) también se observa en un 20% de leucemias linfoblásticas agudas (LLA) del adulto, en un 5% de las leucemias linfoblásticas agudas de la infancia, y en menos del 3% de las leucemias mieloblásticas agudas (LMA) (Sans-Sabrafen et al., 2007).

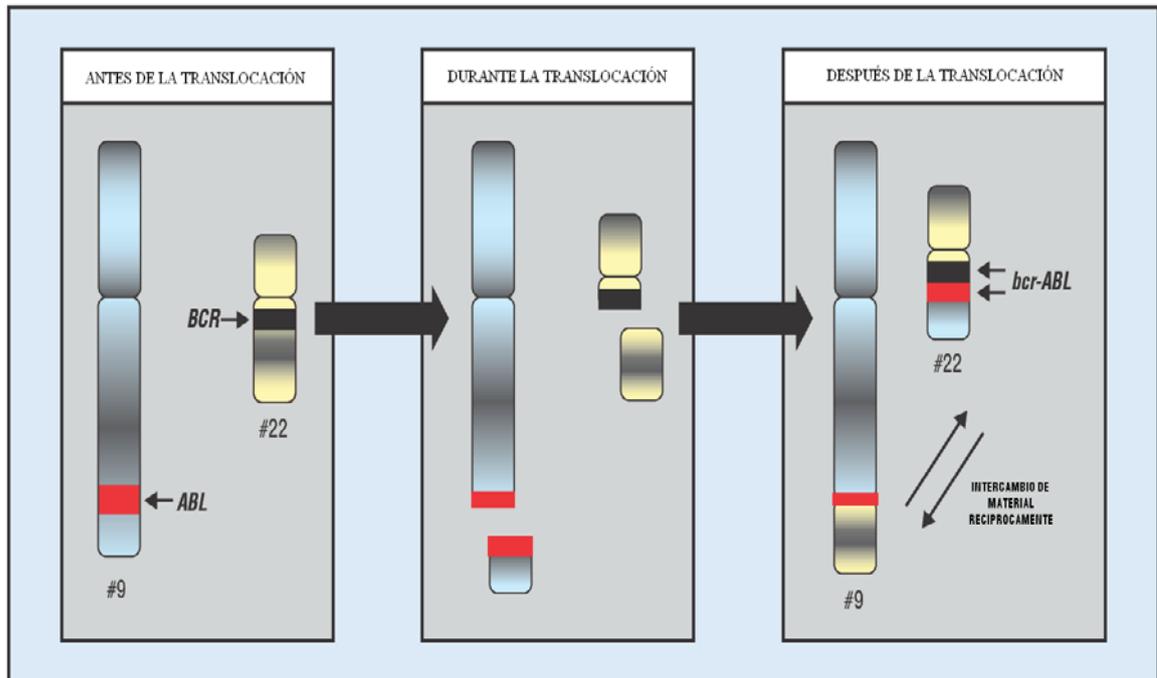


Figura 1- 5. Formación del cromosoma Filadelfia. Adaptado de Hazlehurst, L. A., Bewry, N. N., et al. (2009)

La proteína BCR (*Breakpoint Cluster Region*) se expresa de manera ubicua, aunque los mayores niveles de expresión se han encontrado en cerebro y en el tejido hematopoyético. En este último se ha visto que se expresa durante las etapas tempranas de la diferenciación mieloide y que dicha expresión disminuye significativamente cuando las células maduran a leucocitos polimorfonucleares. Actualmente se sabe que es una proteína con numerosos dominios funcionales, siendo capaz de fosforilar histonas *in vitro*, y presentando un dominio de unión SH2 que usa para unirse a Grb-2 perteneciente a la vía de Ras. Otra función que se ha descrito usando un modelo de ratón carente de BCR es la producción de superóxidos, mediados por RAC, durante la activación de neutrófilos. También presenta un dominio que lo regula transcripcionalmente de manera negativa y que se encuentra en la principal zona de ruptura del gen perdiéndose dicho mecanismo de autocontrol en la quimeras p210 y p190 BCR-ABL (Adams et al., 1992; Laurent et al., 2001; Maru and Witte, 1991; McWhirter et al., 1993; Pendergast et al., 1993; Stewart et al., 1994).

La familia de proteínas ABL está muy conservada, existiendo en vertebrados dos parálogos, ABL-1 (ABL) y ABL-2 (ARG) (Colicelli, 2010) que se encuentran tanto citoplasmáticamente como en el núcleo, predominando esta última localización (Melo and Barnes, 2007). Participan en la regulación de los procesos de organización del citoesqueleto, división y adhesión celular, y respuesta ante el estrés, enlazando señales provenientes de receptores tirosín-quinasa de factores de crecimiento encargados de dichas funciones. También se ha relacionado a abl con la señalización procedente del TCR con implicaciones en el desarrollo y activación de los linfocitos T (Gu et al., 2009; Pendergast, 2002; Plattner et al., 2004). El ratón knockout de Abl1 presenta diversos fenotipos como enanismo, alta mortalidad al nacer, y deficiencias en el sistema inmunológico (Koleske et al., 1998; Schwartzberg et al., 1991; Tybulewicz et al., 1991). ABL se activa por fosforilación de determinadas tirosinas (Y) como la Y245 en el dominio SH2 y en la Y412 en el asa de activación del dominio quinasa (Gu et al., 2009; Pendergast, 2002; Tanis et al., 2003). Hay distintas translocaciones en las que *ABL* adquiere un papel oncogénico al fusionarse con nuevos dominios que permiten la oligomerización de las proteínas quiméricas y posibilitarán la trans-fosforilarán de ABL activando su señal. Ejemplo de ello son las proteínas quiméricas TEL-ABL, y TEL-ARG, respectivamente asociadas a casos raros de LMC y LMA en humanos, y también se ha visto como pareja de NUP214 y de AML1 en leucemias linfoblásticas agudas de tipo T (T-ALL) (Cazzaniga et al., 1999; De Keersmaecker et al., 2005; Golub et al., 1996; Graux et al., 2004).

En la LMC el gen *c-ABL*, considerado como protooncogén, se trasloca al brazo largo del cromosoma 22 junto al gen BCR [t(9;22)(q34;q11),BCR-ABL], formándose un nuevo gen quimérico denominado BCR-ABL que se traducirá a una proteína de fusión de 210 kDa conocida como p210BCR-ABL que tendrá una función tirosín-quinasa aberrantemente aumentada. En el caso de las LLA la proteína de fusión que se forma es ligeramente más pequeña con un peso de 190 kDa, existiendo también la posibilidad de formarse una proteína de fusión mayor, p230, que se ha visto implicada en la variante neutrofílica de la enfermedad (Figura 1-6).

La proteína p210BCR-ABL se localiza en el citoplasma y proporciona nuevos dominios de unión proteína-proteína, con lo que ve aumentada la diversidad de dianas que dependan de dicha señalización, y acaba proporcionando ventajas en la supervivencia y crecimiento celular a los clones que la portan. De esta manera las células así

transformadas muestran una proliferación aberrante, independencia de factores de crecimiento, y resistencia a la apoptosis. Molecularmente hablando, la señalización por debajo de BCR-ABL es muy compleja y con una multitud de participantes, pero parece esencial la fosforilación de la Y177, perteneciente a BCR, en la génesis leucémica. La Y177 funciona como un sitio de acoplamiento para Grb-2 en el dominio SH2, lo que desencadena la activación de la ruta de RAS y de GAB2 (Quintas-Cardama and Cortes, 2009; Sattler et al., 2002; Zhang et al., 2001).

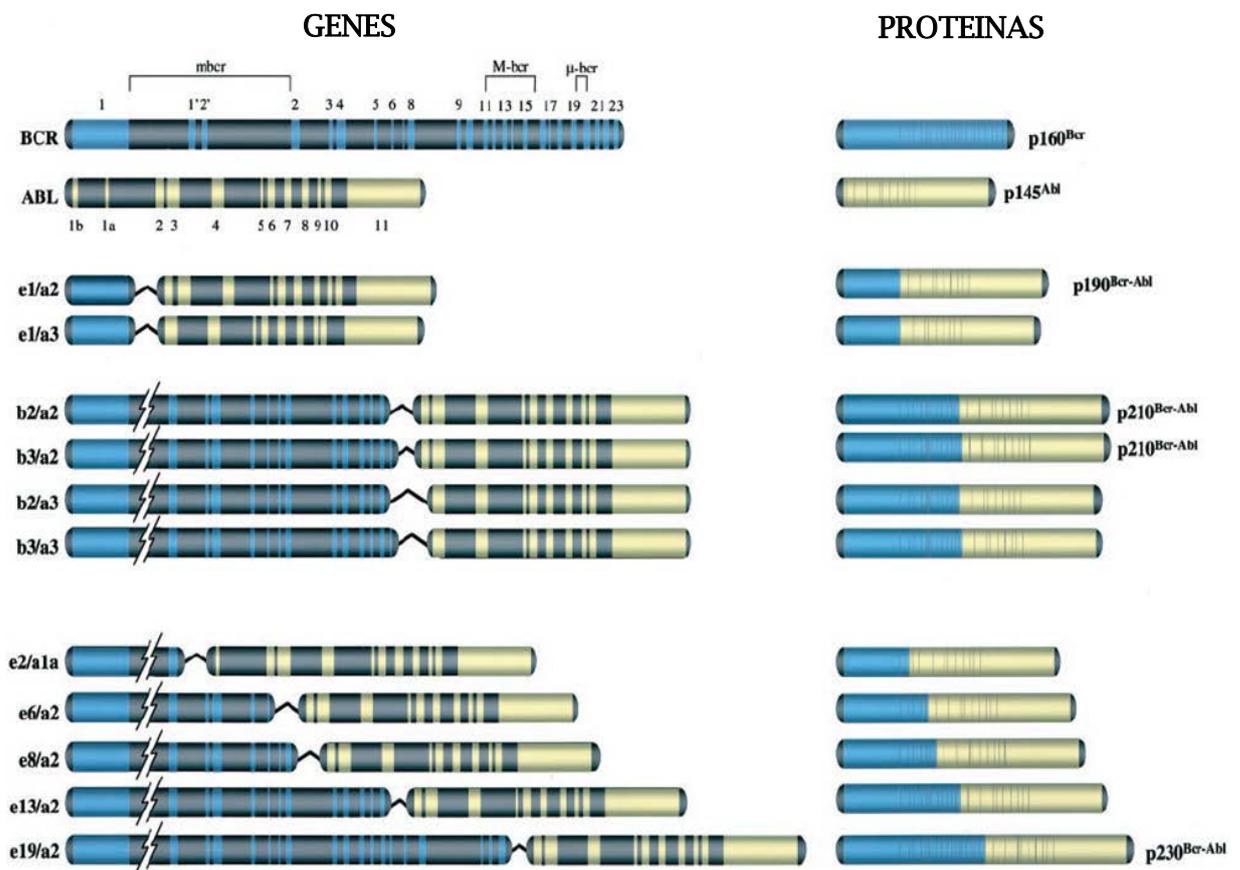


Figura 1- 6. Representación esquemática de los genes BCR, ABL, BCR-ABL, y las proteínas a las que dan lugar. Los números se corresponden a los exones. También se pueden observar una serie de proteínas fusión en la columna de la derecha, las carentes de peso son predictivas. Adaptada de Laurent, E., Talpaz, M., et al. (2001)

El cromosoma Ph (es decir, la proteína quimérica BCR-ABL) es el responsable molecular directo de la enfermedad, y su presencia se considera patognomónica de la LMC. Sin embargo, como hemos visto, la LMC es una enfermedad que progresa hacia la crisis blástica, y esta progresión está directamente relacionada con alteraciones

moleculares secundarias (Melo and Barnes, 2007). Se han descrito diferentes tipos de alteraciones moleculares que tienen lugar a lo largo de la fase crónica, y que pueden resultar en fallos en los sistemas de detección de daño al DNA (*BRCA1*), deficiencias en los mecanismos de reparación del DNA (*DNA-PKcs*, *RAD51*), aparición de fenotipos mutadores (DNA-polimerasa), acortamiento de telómeros (*TERT*), pérdida de supresores tumorales clásicos (*TP53*, *PP2A*, *CDKN2A*, *INK4A*, *ARF*, *RB1*) etc. (Melo and Barnes, 2007). De esta manera, la alteración de genes con funciones reguladoras de diversa índole tiene como consecuencia la génesis de nuevas alteraciones, y así sucesivamente, mientras no se comprometa la propia viabilidad celular. Una de las consecuencias es la inducción del bloqueo de la diferenciación, como ha sido descrito en la supresión del factor de transcripción C/EBP α por parte del propio oncogén BCR-ABL. C/EBP α es necesario para diferenciación granulocítica y su falta de función genera un bloqueo en la generación de este tipo celular en las progresiones a CB de tipo mieloide (Perrotti et al., 2002). De manera similar, la pérdida de *Ikaros*, un factor transcripcional imprescindible para el desarrollo linfoide, se observa en crisis blásticas de tipo linfoide B, así como en leucemias linfoblásticas agudas de tipo B (Mullighan et al., 2008; Quintas-Cardama and Cortes, 2009). También la aparición de translocaciones cromosómicas secundarias puede llevar a la formación de proteínas dominantes negativas que interfieren con la diferenciación mieloide, como son las proteínas quiméricas NUP98-HOXA9 o AML1-EV11 (Cuenco and Ren, 2001; Dash et al., 2002). Finalmente, las alteraciones epigenéticas también han sido postuladas como una de las causas de la progresión de la enfermedad (ver Discusión).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

- I. Identificación de aquellos genes cuyas islas CpG se metilan en muestras de DNA procedentes de pacientes con crisis blásticas, en comparación con muestras procedentes de fases crónicas. Analizar el estado de metilación de los genes identificados en muestras humanas de diferentes orígenes: a) donantes sanos; b) LMC en fase crónica; c) crisis blásticas; d) leucemias linfoblásticas; e) líneas celulares leucémicas humanas. Este análisis, realizado a partir de muestras de leucemias "in vivo" permitirá establecer la existencia de un modelo molecular de progresión hacia la crisis blástica en el que la hipermetilación de promotores de genes esenciales para la diferenciación celular juega un papel fundamental en el desarrollo de la patología leucémica. Al mismo tiempo posibilitará la identificación de nuevos genes implicados en desarrollo hematopoyético (y, en condiciones patológicas, en desarrollo tumoral) o asignar un nuevo papel en hematopoyesis a genes previamente conocidos por su función en otros sistemas.

- II. Una vez probado que existe metilación diferencial de genes en la progresión leucémica, para el/los genes de mayor interés potencial se realizará la validación funcional del papel que dichos genes desempeñan en la hematopoyesis mediante i) el estudio inicial del patrón de expresión de los genes identificados en la hematopoyesis normal y ii) el análisis de ratones knockout como modelos de pérdida de función y transgénicos como modelos de ganancia de función.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Identificación de nuevos genes implicados en la progresión a crisis blástica.

3.1.1 Identificación de islas CpG metiladas en la progresión a crisis blástica

3.1.1.1 Obtención y Tipo de Muestras Utilizadas

Las muestras de DNA humano de controles y pacientes fueron obtenidas del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Se trata de muestras de DNA genómico de sangre periférica. Los códigos utilizados para las muestras utilizadas en este trabajo fueron:

- Donantes sanos (C: control):
 - C#1 (varón sano).
 - C#2 (varón sano).
 - C#3 (mujer sana).
- Leucemias mieloides crónicas en fase crónica (CML):
 - CML#1 (CML al diagnóstico, 9×10^4 leucocitos).
 - CML#2 (CML fase crónica).
 - CML#3 (CML fase crónica).
 - CML#4 (CML al diagnóstico, 2×10^5 leucocitos).
 - CML#5 (CML, fase de aceleración, 7.6×10^4 leucocitos, 5% blastos).
 - CML#6 (CML al diagnóstico, 1.53×10^4 leucocitos).
 - CML#7 (CML fase crónica, 1.33×10^4 leucocitos).
- Crisis blásticas (CB):
 - CB#1 (Crisis blástica T, 70% de blastos; 2×10^4 leucocitos; evolución de fase crónica CML#3).
 - CB#2 (Crisis blástica, 38% de blastos; evolución de la fase crónica CML#2).
 - CB#3 (Crisis blástica, 60% de blastos).

- CB#4 (Crisis blástica).
- CB#5 (Crisis blástica, 60% de blastos).
- CB#6 (Crisis blástica, 70% blastos).
- Leucemias linfoblásticas agudas:
 - B#1 (B-ALL Ph+, 90% blastos)
 - T#1 (T-ALL, 60% blastos)
 - T#2 (T-ALL, 93% blastos)

También se obtuvo DNA de las siguientes líneas celulares (obtenidas del "German Collection of Microorganisms and Cell Cultures", DSMZ):

- K652 (crisis blástica).
- TOM1 (pre B-ALL, Ph⁺).
- U937 (linfoma histiocítico).
- JK1 (crisis blástica).
- LAMA84 (crisis blástica).
- EM2 (crisis blástica).
- EM3 (crisis blástica).

Estas líneas celulares se crecieron siguiendo las recomendaciones de la DSMZ.

3.1.1.2 Protocolo de Extracción de DNA

Para la obtención del DNA genómico, las muestras se trataron como se describe en el apartado 3.1.4.1.1.

3.1.1.3 Preparación de la columna de unión de DNA metilado en pares CpG

3.1.1.3.1 Expresión y purificación de la proteína HMBD

Con el fin de separar las islas CpG en función de su estado de metilación, se construyó una columna de afinidad basada en la proteína HMBD (Histidine Methyl Binding Domain), que contiene el dominio de unión a metil-CpG de la proteína MeCP2 de rata, unido a una cola de 6 histidinas para facilitar su posterior interacción y fijación en una columna de Ni²⁺-NTA agarosa. La proteína HMBD se expresó a partir del plásmido pET6HMBD (amablemente cedido por el Dr. Adrian Bird, Edimburgo), creciéndose en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. El extracto bacteriano se preparó por sonicación del sedimento celular en 5 M urea, 50 mM NaCl, 20 mM HEPES (pH 7.9), 1 mM EDTA, 10% glicerol, 0.1% Triton X-100, 0.5 mM PMSF y los inhibidores de proteasas pepstatina, leupeptina, quimostatina y antipaina, cada una a una concentración de 5µg/ml. Tras la sonicación, el extracto se centrifugó a 15.000 rpm durante 30 min en un rotor Beckman JA-20. El sobrenadante se dializó frente a solución amortiguadora "A" (Buffer A: 50 mM NaCl, 20 mM fosfato sódico pH 7.0, 10% glicerol, 0.1% Triton X-100, 10 mM β-mercaptoetanol, 0.5 mM PMSF) en pasos secuenciales: en primer lugar, Buffer A+ 2.5 M urea, y luego, 1.25 M urea, 0.6 M urea, 0.3 M urea y finalmente sin urea. El extracto dializado se centrifugó de nuevo y el sobrenadante se cargó en una columna de 7.5 ml de Fractogel EMD SO₃-650(M) (Merck). La columna se lavó con Buffer A y las proteínas retenidas en la misma se eluyeron pasando Buffer A + 1 M NaCl. La fracción eluida se dializó frente a Buffer A y se cargó en una columna Pharmacia/GE Healthcare HR 10/10 que contenía Fractogel EMD SO₃-650(M), en un sistema de FPLC de Pharmacia/GE Healthcare. La columna se lavó con Buffer A, luego con Buffer A + 0.4 M NaCl y luego con 60 ml de un gradiente lineal de NaCl de 0.4 a 1 M. La proteína HMBD eluyó pura en el intervalo entre 0.6 y 0.85M NaCl.

3.1.1.3.2 Unión de la proteína HMBD a Ni-NTA. Montaje de la columna de unión de DNA metilado.

La proteína HBMD purificada se unió a Ni²⁺-NTA (Qiagen Ni²⁺-NTA Superflow) mezclándola con la resina y lavando la mezcla con 8mM imidazol, 50 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.9, 10% glicerol, 0.1% Triton X-100, 10 mM β-Mercaptoethanol y 0.5 mM PMSF. Esta mezcla se montó en una columna de FPLC Pharmacia/GE Healthcare HR 5/10. Esta columna HMBD-Agarosa se utilizó directamente para la separación de las islas CpG diferencialmente metiladas, según se describe a continuación.

3.1.1.4 Digestión del DNA de pacientes con *MseI*

Entre 50 y 100 μg de DNA genómico obtenido de pacientes con crisis blásticas de CML con más de un 60% de blastos se digirieron, siguiendo las instrucciones del fabricante, con la enzima *MseI* (New England Biolabs) que libera las islas CpG intactas (Cross et al., 1994).

3.1.1.5 Fraccionamiento del DNA de pacientes en la columna FPLC-HMBD. Purificación de DNA no metilado.

La columna de HMBD-Agarosa, preparada como se describe anteriormente, se equilibró en primer lugar con solución amortiguadora B (Buffer B: 100 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.9, 10% glicerol, 0.1% Triton X-100, 10 mM β -Mercaptoethanol y 0.5 mM PMSF). El DNA digerido con *MseI* se cargó en la columna en un volumen de 2 ml de Buffer B. La columna se lavó con 10 ml de Buffer B, luego con 8 ml de Buffer B + 0.4 M NaCl y luego con 60 ml de un gradiente lineal de 0.4 a 1 M de NaCl en Buffer B y, finalmente, con 12 ml de Buffer B + 1M NaCl. Durante estos lavados se recogieron fracciones de 2 ml. El DNA de cada fracción fue precipitado con etanol.

Con el fin de demostrar el correcto funcionamiento de la columna, se partió de DNA de una donante sana, que se procesó como se ha expuesto anteriormente. Las fracciones individuales se precipitaron y se corrieron en gel de agarosa, se transfirieron a membrana de nylon y se hibridaron con una sonda correspondiente a la isla CpG del gen de la monoaminoxidasa A (MAO), que es un gen ligado al cromosoma X y que, por tanto, en mujer, presenta una copia metilada y otra sin metilar. Este experimento permitió demostrar que, en nuestras condiciones experimentales, el DNA no metilado (10 a 20% de la carga total) eluye en los primeros ml; el DNA unido débilmente (islas sin metilar) eluye al principio del lavado con 0.4 M NaCl (fracciones 2-3) y el DNA densamente metilado eluye en los últimos dos tercios del gradiente salino.

El DNA débilmente unido (islas CpG no metiladas) fue concentrado y utilizado para el screening de la genoteca de islas CpG, como se describe a continuación.

3.1.1.6 Siembra e hibridación seriada de la genoteca de islas CpG. Secuenciación y análisis de los clones metilados diferencialmente.

La genoteca de islas CpG (disponible para usos de investigación académicos en el Human Genome Mapping Project Resource Centre, Reino Unido), clonada en el sitio *Nde*I de pGEM5Zf(-) y transformada en la cepa XL1-blue de *E. coli*, se creció en placas de LB-Ampicilina para obtener el número representativo de 60.000 clones independientes. Las colonias se transfirieron a membranas Hybond (Amersham/GE Healthcare) y luego se permitió su recrecimiento en placa. Las colonias transferidas a la membrana se lisaron *in situ* en la misma y su DNA desnaturalizado se unió covalentemente ("cross-link") mediante rayos UV a la misma. Las membranas se hibridaron con sondas de DNA de pacientes marcado con ³²P preparadas a partir de las fracciones de islas no metiladas obtenidas de la columna, tal y como se ha descrito en la sección anterior. Se hibridaron las membranas de forma consecutiva con muestras procedentes de distintos pacientes. Superponiendo las autorradiografías correspondientes a una misma placa obtenidas con distintas sondas, se seleccionaron los clones que no habían sido marcados con muestras de DNA procedentes de distintos pacientes (es decir, clones correspondientes a islas que no formaban parte de la sonda radiactiva porque habían quedado retenidas en la columna al encontrarse metiladas). Se utilizaron para la selección final de los clones las autorradiografías correspondientes a las hibridaciones de la genoteca con las muestras CB#1, CB#3 y CB#6. Los clones seleccionados fueron recrecidos y secuenciados por ambos extremos utilizando como primers los oligonucleótidos T7 y SP6. Las secuencias obtenidas fueron comparadas frente a las bases de datos del GenBank usando el programa BLAST (Altschul et al., 1990), para identificar los genes asociados con las secuencias obtenidas.

3.1.2 Validación de los resultados encontrados en el screening.

3.1.2.1 Análisis del estado de metilación del DNA mediante tratamiento con bisulfito y secuenciación.

Para el estudio del estado de metilación de cada una de las islas CpG seleccionadas se utilizó el método de secuenciación por bisulfito (Clark et al., 1994). El tratamiento del DNA previamente desnaturalizado con bisulfito sódico lleva a la pérdida del grupo amino en posición 5 de las citosinas no metiladas (el grupo metilo protege de esta reacción), y a la conversión de las citosinas no metiladas en uracilos. La posterior amplificación de cada

una de las hebras por PCR convierte los uracilos en timidinas, y en la secuenciación del producto resultante sólo aparecen como citosinas aquellas que estuviesen metiladas (en este caso, siempre en pares CpG). Para la conversión con bisulfito, 4 µg de DNA genómico se digirieron con *MseI* y posteriormente se purificaron mediante extracción con fenol/cloroformo y, tras precipitación con DNA, se disolvieron en tampón TE a una concentración de 2 µg de DNA en 5 µl de TE. El DNA se desnaturalizó añadiendo 3 µl de agua y 12 µl de 0.5 M NaOH preparado fresco (concentración final de NaOH 0.3 M). Para la conversión por bisulfito se añadieron 120 µl de una suspensión 3.6 M de bisulfito sódico con 0.6 mM hidroquinona, y los 140 µl finales se incubaron en un termociclador con el siguiente programa: [95°C, 30" + 55°C, 15'] durante al menos 7 horas (aproximadamente 28 ciclos). El DNA así tratado fue posteriormente purificado usando el "Wizard Clean-up DNA system" (Promega), eluido en 50 µl de TE, tratado de nuevo con NaOH a una concentración final de 0.3 M (50 µL DNA en TE buffer + 10 µL agua + 90 µL 0.5M NaOH) durante 15 min a 37°C, precipitado con acetato amónico y etanol y resuspendido en 50 µl de TE. 5 µl de este DNA se utilizaron para cada reacción de PCR.

3.1.2.1.1 Amplificación por PCR del DNA tratado con Bisulfito.

Principios básicos del diseño de primers para DNA tratado con bisulfito:

- Los primers deben ser de 26 a 30 bases de largo.
- Tras la conversión con el bisulfito, las hebras de partida ya no son complementarias, con lo cual habrá que diseñar un par de primers para cada una de las hebras, si se desea analizarlas las dos (en principio con una basta, pues la metilación en CpG es simétrica entre las hebras).
- Intentar diseñar los primers en una secuencia con una distribución homogénea de Citosinas. Evitar en lo posible los pares CpG. Si hay que incluirlos, introducir la base degenerada en la posición T/C.
- Diseñar PCRs anidadas.

- Mezcla para la reacción de PCR:

- 5 μ l dNTP's 2mM
- 5 μ l Cl_2Mg 25 mM
- 5 μ l Buffer 10X Taq Mg-free
- 5 μ l + 5 μ L de cada primer (de una dilución 1/100 del stock 1nmol/ μ l)
- 0.5 μ l *Taq* Promega
- 5 μ l molde (DNA modificado con bisulfito en TE)
- 19.5 μ l agua millipore

- Condiciones de la reacción de PCR:

(95°C, 4' + [95°C, 1' + 50°C, 1' + 72°C, 1'] x35 + 72°C, 10')

Se purificó la reacción de PCR en una columna de Sephadex G-50 para eliminar los primers y se utilizaron 10 μ l de este producto como molde para la segunda PCR anidada, con los mismos reactivos (excepto los primers) y en las mismas condiciones. El producto de PCR se corrió en un minigel de agarosa y la banda de PCR se cortó y se clonó mediante ligación T-A. Un mínimo de 5 clones independientes fueron secuenciados por cada banda clonada.

3.1.2.2 Ejemplo 1: HOXA1. Secuencia de la isla CpG del gen HOXA1 humano.

Oligonucleótidos para la amplificación del DNA modificado por tratamiento con bisulfito sódico.

La secuencia de la isla asociada al gen *HOXA1*, tal y cómo se ha identificado a partir del screening de la genoteca es:

5' aaatcaggaagcagaCGtaagtgggtgggtacccccagtgCGctccCGctgtttactctggaat
 ctctcatctccatgggtccagcatcaccaccaccaccagggttatgctgggggCGCGgtgggctCG
 cctcaatacatcaccactcatatggacaggagcaccagagcctggcctggctaCGtataataac
 tccttgccccctctccaCGccagccaccaagaagcctgtCGctccccCGcatCGgagacatctct
 ccagCGcagacttttgactggatgaaagtcaaaagaaacctccaaaacaggtcagtcctgctgg
 ttggtggatgctccttgaattattctggaaggagctggatgctta3'

Se resaltan en negrita los dinucleótidos CpG. Se indican en bloques de color las posiciones a partir de las cuáles se han diseñado los oligonucleótidos para la amplificación del DNA modificado con bisulfito: los primers para la primera PCR (más externos) se muestran en amarillo (forward) y azul (reverse), y los de la PCR anidada, en rosa (forward) y verde (reverse).

Las secuencias de los primers utilizados para amplificar la hebra "sense" tras su modificación con bisulfito, son:

- 5' **ttat**tttggaaat**tttttattttttat**gg**3'**
- 5' att**attattattatt**agg**gttatg**ttgg**ggg3'**
- 5' **tct**ttta**actttcatcca**atca**aaaa**t**cta3'**
- 5' **tca**aaaa**acatccacca**cca**aaaa**act**ta3'**

Aunque normalmente se ha estudiado la hebra "sense", Las secuencias de los primers a utilizar para amplificar la hebra "antisense" tras su modificación con bisulfito serían, a modo de ejemplo:

- 5' **ttact**ctaaaa**atctctcatctcc**ata**at3'**
- 5' **atc**accaccacc**acaaa**attata**actaaaa3'**
- 5' **tttt**ttg**atttttatt**tag**ttaaa**g**tttg3'**
- 5' **tta**aggag**tatttatta**attag**taggattg3'**

3.1.2.3 Ejemplo 2: HOXC13. Secuencia de la isla CpG del gen HOXC13 humano.

Oligonucleótidos para la amplificación del DNA modificado por tratamiento con bisulfito sódico.

La secuencia de la isla asociada al gen *HOXC13*, tal y cómo se ha identificado a partir del screening de la genoteca es:

5' ttaaaaagctccagcagatca**tg**tc**atga****CGacttCG**ctgctcctgcatcc**aCG**ctggc**CG**ga
gagccttatgta**CG**tctatgaggacag**CGCGgCG**gagag**CG**gcat**CGgCGgCGgCGgCG**gaggag
gagg**CGgCG**gca**CGggCG**gag**CG**gggggtggctg**CG**gag**CG**ag**gcccCG**gcaaag**cccCG**agc
atggatggtc**tg**ggcagcagctg**CG**gccagccactgc**CGCG**acctgcttc**CG**cacc**CG**tgctg
ggc**CG**cc**CGcCG**gctccccctggg**CG**ccccctcagg**CGcCG**tctata**CG**gagatcc**CG**gccc**CG**ga
gg**CGgCGCG**ccagtgtgccc**CGcCG**cc**CG**cacccccacct**CG**tccag**CG**ccaccctgggcta**CG**
gctacc**CG**ggggcagctacta**CG**gctgc**CG**cctgt**CG**cacaa**CG**tgaacctgcagcagaagc
cttg**CG**cctaccacc**CG**gg**CG**ataaatacc**CG**gagc**CG**t**CG**gg**CG**ccctg**CG**gtga**CG**a**cctg**
tcctctagggccaaggagttCGcctt**ct**accccagctt**CG**ccagctcctaccagg**3'**

Se resaltan en negrita el ATG y los dinucleótidos CpG. Se indican en bloques de color las posiciones a partir de las cuáles se han diseñado los oligonucleótidos para la

amplificación del DNA modificado con bisulfito: los primers para la primera PCR (más externos) se muestran en amarillo (forward) y azul (reverse), y los de la PCR anidada, en rosa (forward) y verde (reverse).

Las secuencias de los primers utilizados para amplificar la hebra "sense" tras su modificación con bisulfito, son:

- 5'tggtatgaygatttygttgtttttgtattt3'
- 5'gtttyggtaaagtttygagtatggatggtt3'
- 5'cctaataaaaactaacraaactaaaataa3'
- 5'aaaacraactccttaaccctaaaaaacaaa3'

3.1.2.4 ENGRAILED-2. Secuencia de la isla CpG del gen ENGRAILED-2 (EN2) humano.

Oligonucleótidos para la amplificación del DNA modificado por tratamiento con bisulfito sódico.

La secuencia de la isla asociada al gen *EN2*, tal y cómo se ha identificado a partir del screening de la genoteca es:

5' caaaaatccagagtgaaagtgtctcaggttgCGcCGagtggcctggaaatttcCGagccCGCG
CGgaggcCGaggCGgCGagggCGgCGgaCGgcCGgggagCGCGggCGgcccagccCGgcccCGgc
CGggccctggcctCGCGtctctcaccctatCGactCGggcCGCGgagctctgCGgggctCGgCGg
gggCGCGgcCGcaCGcCGgtggggCGcccCGgcccCGcagCGgggCGgCGgcCGCGaggaggggg
cctccatgtgCGtgCGggCGgtggCGggCGCGctgacCGCGggCGccCGgcaccctCGagggcC
GgctagggCGtgCGggCGgggaCGgcCGggCGgCGgCGgCGgcCGgagcCGgcccCGggCGggCG
tgagCGcCGgggaaCGCGctgcctgcatgCGCGcagctctCGcccCGggCGgcccagggCGgCGg
CGcCGgagccCGaggCGgcCGgaCGCGgagaggagCGgggagccCGggaggCGgcccCGCGtccc
CGcCGgaccactgCGactgtctagaccCGgctgCGCGgCGaagtCGaggacttggctctgttga
atctctcatCGtctgggCGagCGgggCGgctCGtggtgtttctaaccagttCGtggattcaaag
gtggctcCGCGcCGagCGCGgcCGgCGacttgttaggaacctcagccctggcCGCGgcCGcCGCGc
aCGccctCGgaagactCGgCGgggtgggggCGCGggggtctcCGtgtgCGcCGCGggagggcCG
aaggctgatttgaagggCGtcccCGgagaaccagtggtgggatttactgtgaacagc**atg**gaggag
aatgacccaagcctggCG3'

Se resaltan en negrita el ATG y los dinucleótidos CpG. Se indican en bloques de color las posiciones a partir de las cuáles se han diseñado los oligonucleótidos para la amplificación del DNA modificado con bisulfito: los primers para la primera PCR (más externos) se muestran en amarillo (forward) y azul (reverse), y los de la PCR anidada, en rosa (forward) y verde (reverse).

Las secuencias de los primers utilizados para amplificar la hebra “sense” tras su modificación con bisulfito, son:

- 5'ggtttagttyggttyggt3'
- 5'gggttttggtttygygttttttatttat3'
- 5'accaaaactaaaatcctacaaatcacc3'
- 5'aaatctaacaatcrcaataatccracraaa3'

3.1.3 Confirmación de la expresión de Engrailed 2 en el sistema hematopoyético

3.1.3.1 *Extracción de RNA de las poblaciones celulares de ratones wild type separadas por citometría de flujo*

Las poblaciones celulares fueron preparadas como se ha descrito (apartado 3.1.4.1.3) y separadas en el servicio de citometría de la Universidad de Salamanca. Se separaron las poblaciones celulares DN, DP, CD4-SP y CD8-SP del timo y CD4-SP y CD8-SP del bazo (ver definiciones de los marcadores para cada uno de los compartimentos hematopoyéticos en la sección 3.1.4.1.5). Fueron recogidas en 500µl de RNAlater (solución estabilizadora de RNA, Ambion) y seguidamente centrifugadas durante 5 min a 4°C 13.000rpm, eliminándose dicha solución estabilizadora. A continuación, se procedió a la extracción de RNA mediante el uso del TRIzol (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La calidad e integridad del RNA obtenido fue testada mediante electroforesis en gel de agarosa libre de RNAsa y calculada en función de la relación resultante del cociente entre la longitud de onda del RNA a 260nm y de las proteínas a 280nm. Un cociente cercano a 2 indica una calidad óptima del RNA extraído.

3.1.3.2 *Síntesis de cDNA a partir del RNA mensajero total purificado*

Partiendo de una cantidad de 1µg de RNA purificado, se utilizó un kit comercial para la síntesis de cDNA (Reverse Transcription System, Promega) usando oligonucleótidos al azar (“random”). El cDNA así sintetizado fue analizado mediante espectrofotometría para comprobar su pureza y concentración, conservándose a -20°C hasta su utilización.

3.1.3.3 Comprobación de los cDNA sintetizados

Para la comprobación de la correcta síntesis del cDNA en muestras de ratón se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR para la detección de genes cuya expresión es constitutiva en todos los tipos celulares, en general de los genes *HPRT* o *actina*.

3.1.3.4 Detección de la expresión de *En2* en ratón

Para la detección de la expresión de *En2* de ratón se diseñaron oligonucleótidos interexónicos específicos cuyo producto tiene un tamaño de 404bp.

- GTTCCTTGGATGGAGTGC -> mEn2-FP2-new
- CAAAGTGTCTTGTTGCC -> mEn2-RP2-new

La PCR se realizó utilizando *Taq* polimerasa de la casa 5`PRIME con el siguiente programa en el termociclador:

95°C, 4' + [95°C, 1' + 56°C, 1' + 72°C, 1'] x40 ciclos + 72°C, 10'

Como control positivo para confirmar la capacidad de detectar el transcrito de *En2* se utilizaron muestras de cDNA obtenido de cabeza de embrión de ratón a día 16. El producto de PCR obtenido fue clonado, secuenciado y posteriormente utilizado como sonda radiactiva para comprobar la identidad de los transcritos amplificados por RT-PCR a partir de las muestras de linfocitos T murinos.

3.1.3.5 Detección de la expresión de *En1* en ratón

Para la detección de la expresión de *En1* de ratón se diseñaron oligonucleótidos interexónicos específicos cuyo producto tiene un tamaño de 473bp.

- CCTCGAAGCCCTCGGACAGT -> mEn1-FPnew
- TCCCTGGCCATGAGGTGCA -> mEn1-RPnew

La PCR se realizó utilizando *Taq* polimerasa de la casa 5`PRIME con el siguiente programa en el termociclador:

95°C, 4' + [95°C, 1' + 60°C, 1' + 72°C, 1'] x40 ciclos + 72°C, 10'

3.1.3.6 Detección de la expresión de EN2 en muestras humanas

Para la detección de la expresión de *hEN2* se utilizó RNA de muestras de linfocitos T humanos (cedido por la Dra. M^a L. Toribio, CBMSO, Madrid). Se sintetizó el cDNA correspondiente como se ha descrito en el apartado 3.1.3.2, comprobándose en este caso su calidad con una RT-PCR del gen *GADPH* humano.

Se diseñaron oligonucleótidos interexónicos específicos cuyo producto tiene un tamaño de 421bp.

- TGGACGGGTCGCTCAAGG-> hEN2-FP1
- CCCTGTGCCATGAGGTGC -> hEN2-RP2-new

La PCR se realizó utilizando Taq polimerasa de la casa 5` PRIME con el siguiente programa en el termociclador:

95°C, 4' + [95°C, 1' + 65°C, 1' + 72°C, 30''] x5 ciclos + [95°C, 1' + 62°C, 1' + 72°C, 30''] x40 ciclos + 72°C, 10'

Como control positivo para confirmar la capacidad de detectar el transcrito de *EN2* humano se utilizaron muestras de glioma de zona cerebelar (cedidos por el Dr. Juan Luis García Hernández, CIC, Salamanca). El producto de PCR obtenido a partir de los gliomas fue clonado, secuenciado y posteriormente utilizado como sonda radiactiva para comprobar la identidad de los transcritos amplificados por RT-PCR a partir de las muestras de linfocitos T humanos.

3.1.3.7 Comprobación de la expresión mediante Southern Blot

3.1.3.7.1 Purificación del producto de PCR a partir del gel de agarosa

Se cortó el fragmento de agarosa que contenía el producto de PCR bajo luz UV, y se purificó utilizando el kit "QIAquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN), el cual utiliza una columna de sílice de unión específica para purificar el DNA del gel de agarosa, eluyéndose finalmente en 40 µL de MPW.

3.1.3.7.2 Clonación de los productos de PCR en un vector plasmídico

Una vez purificado el producto de PCR y aprovechando la terminación de las hebras por la *Taq* polimerasa (terminación con una adenina sobresaliente) se utilizó el vector

comercial del kit “pGEM®-T Easy Vector Systems” (Promega) para clonarlo. La ligación resultante fue utilizada para transformar la cepa DH5 α de *Escherichia coli* previamente tratada, según se describe en (Inoue et al., 1990) para hacerla competente. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB (1% agar; 1% triptona (OXOID); 0,5% extracto levadura (DIFCO), 1% NaCl (PANREAC), ajustado a pH: 7,4) suplementadas con 50 μ g/ml de Ampicilina para seleccionar aquellas células que habían incorporado el vector. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 16 horas. De estas se eligieron 10 colonias al azar y se crecieron para posteriormente purificar el plásmido y se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca con un secuenciador automático capilar 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystem), usando los oligonucleótidos T7 y SP6. Una vez verificado que los productos amplificados mediante PCR y clonados se corresponden con el gen que queríamos amplificar fue utilizado dicho fragmento como sonda radiactiva específica.

3.1.3.7.3 *Transferencia e hibridación*

Se realizó la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos y los geles resultantes se desnaturalizaron mediante la inmersión del gel en una solución alcalina desnaturalizante (1.5M NaCl; 0.5M NaOH) y agitación continua a temperatura ambiente durante 60 min. El objetivo es romper los enlaces de hidrógeno que unen las dos cadenas y obtener fragmentos de DNA monocatenario. Acto seguido, se neutralizó la reacción de desnaturalización con una solución neutralizante (1.5M NaCl; 0.5M Tris-HCl pH 7.5) durante 90 min a temperatura ambiente y agitación continuada. Finalmente, se realizó la transferencia del DNA a la membrana de *nylon* (Hybond-N®) durante 16 horas mediante la técnica de Southern-blot, utilizando como tampón de transferencia 20X SSC (6M NaCl; 0.6M citrato sódico dibásico, pH 7.0). Tras la transferencia y con el fin de conseguir una unión covalente del DNA a la membrana, ésta fue sometida a una fuente de luz UV de 312nm durante 20 s. (UV Stratalinker 2400, Stratagene).

La hibridación de estas membranas con las sondas específicas marcadas con [α 32P]-dCTP, así como el lavado y la exposición de las membranas a películas de autorradiografía se realizaron de la siguiente manera:

a.- Una primera etapa de prehibridación, cuya finalidad es bloquear la hibridación no específica del DNA a la membrana. Para ello, se incubó la membrana durante 2 horas a

65°C en agitación constante en 25 ml de solución de prehibridación (3X SSC (0.9 M NaCl; 0.09M citrato sódico dibásico pH: 7.0); 0,1% SDS; 1x solución de Denhardt's (0.2 mg/ml polivinilpirrolidona (Sigma); 0.2 mg/ml seroalbúmina bovina (Sigma); 0.2 mg/ml Ficoll 400 (Amersham Pharmacia Biotech)); 5% sulfato dextrano y 10mg/ml DNA heterólogo sonificado y desnaturalizado (Sigma)).

b.- En la etapa de hibridación propiamente dicha, se añadió a la mezcla de prehibridación una sonda de DNA correspondiente, en cada caso, a los productos de PCR secuenciados descritos en el apartado anterior marcados radiactivamente con [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP mediante el sistema "Oligolabelling Kit" (Amersham Pharmacia Biotech). La reacción de marcaje se realizó a 37°C y se emplearon aproximadamente 50 ng de sonda con 2 μl de [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (3000 Ci/mmol). La sonda radiactiva se purificó mediante centrifugación en columnas de Sephadex G50 durante 5 minutos a 1500 rpm. Los nucleótidos y hexanucleótidos libres quedaron retenidos en la columna, mientras que la sonda marcada se recuperó en la solución de elución. La eficiencia de la reacción y cantidad de sonda marcada se midió con un contador de radiación β (Quick Count 2000, Bioscan). La hibridación se realizó a 65°C durante 16 horas con 106 dpm/ml de sonda marcada radiactivamente y previamente desnaturalizada durante 5 minutos a 100°C.

c.- Las membranas así hibridadas se lavaron dos veces en una solución precalentada a 65°C de 1xSSC (0.3 M NaCl; 30 mM citrato sódico dibásico pH: 7); 0.1%SDS. Esta solución confiere condiciones de alta astringencia y permite, de este modo, que la sonda unida inespecíficamente sea eliminada. Después de varios lavados, las membranas se expusieron en películas autorradiográficas (Kodak-X-Omat-AR) con un intensificador de señal (ReflectionTMIntesifying Screen, DuPont) durante un tiempo variable de 4 a 24h a -70°C, en función de la calidad del marcaje, determinado previamente en cada caso.

3.1.4 Estudio de la hematopoyesis en ratones *En2*^{-/-}

3.1.4.1 Genotipado de los ratones *En2*^{-/-}

3.1.4.1.1 Obtención de DNA total genómico

El DNA total de los ratones se obtuvo a partir de un fragmento de cola. El tejido fue triturado y digerido en tubos Eppendorf en 500µl de tampón Proteinasa K (0.25M sacarosa, 50mM Tris pH 7.4, 25mM KCl, 5mM MgCl₂; 1% SDS; 20mM EDTA pH 8; 1µg de Proteinasa K (ROCHE)) durante 16 horas a 55°C. Tras esta incubación se realizó una extracción fenol-cloroformo para limpiar el DNA de restos celulares. Se añadió a la mezcla incubada un volumen de fenol (Gibco BRL) y posteriormente un volumen de cloroformo (Merck). La solución sobrenadante portadora del DNA se precipitó en 2.5 volúmenes de etanol frío (Merck) al 100% a -20°C y el precipitado de DNA obtenido se lavó con etanol al 70%. Tras una breve centrifugación a 13000 rpm y la total eliminación de los restos de etanol, se procedió a la disolución del DNA en tampón TE 1X (Tris-HCl 10mM pH 7.50; EDTA 1mM) o en agua bidestilada (ddH₂O) cuantificándose la concentración de DNA a partir de la medida de la absorbancia a 260 nm en un espectofotómetro (Nanodrop 1000, THERMO scientific).

3.1.4.1.2 Genotipado de los ratones *En2*^{-/-} mediante PCR

Para el genotipado de los ratones *En2*^{-/-} se utilizaron los siguientes oligonucleótidos;

- En-2(1): TGTACAACCATTCACCACG
- En-2(2): ACACATGTCCTCTAGATTCCG
- NEO-En2: TCTCATGCTGGAGTTCTTCG

Combinándolos de la siguiente manera podemos identificar tanto el alelo silvestre como el alelo mutado que presenta la delección del homeodominio de En2;

- *Alelo Wild Type*: [En-2(1)] + [En-2(2)] = 1144 bp
- *Alelo nulo*: [NEO-En2] + [En-2(2)] = 800 bp

Las muestras de partida están muy concentradas, por lo que para usar este DNA genómico se diluyó la muestra DNA genómico 1:10 para usar esta dilución como molde en la reacción de PCR con el siguiente programa en el termociclador;

(95°C, 4' + [95°C, 1' + 50°C, 1' + 72°C, 10']x30 ciclos + 72°C, 10')

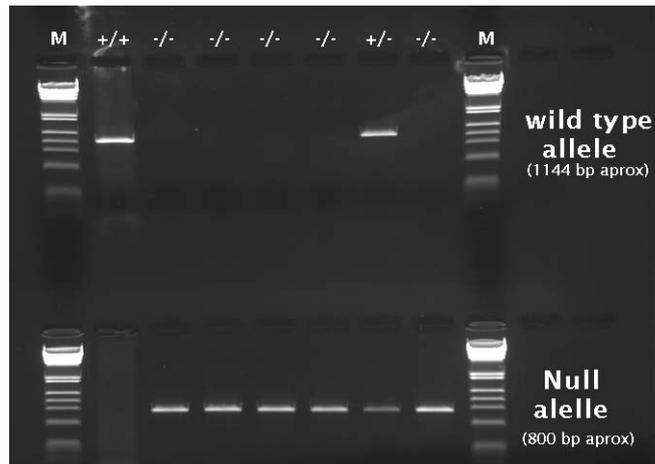


Figura 3- 1. Ejemplo de genotipado de los ratones *En2*^Δ. Gel de agarosa en donde se muestran los genotipos de 7 ratones. Las bandas correspondientes al alelo silvestre se muestran en el carril superior (con un tamaño de 1144bp) y las bandas correspondientes al alelo mutado se muestran en el carril inferior (con un tamaño de 800bp). La presencia de una o ambas bandas define los genotipos +/+, +/-, y -/-. (M corresponde al marcador de peso molecular)

3.1.4.2 Citometría de flujo

3.1.4.2.1 Obtención de las muestras

Los diferentes órganos analizados fueron extraídos a la vez del ratón experimental y del control wild type para poder así comparar los resultados, conservándolos en todo momento en FACS BUFFER (tampón fosfato salino (Na⁺) con 1% de suero fetal bovino (Cambrex) inactivado a 56°C durante 30') excepto la sangre periférica que se extrajo y se incubó 20' con una solución de lisis para eritrocitos, RCLB (Red Cell Lysis Buffer; cloruro amónico 0.38%, bicarbonato potásico, EDTA, y pH ajustado a 7.4) que, tras agitar por inversión, también se mantiene en hielo.

La disgregación de los órganos se llevó a cabo mediante el tamizado de los mismos en un filtro "cell strainer" de 70 μm de nylon (BD FALCON), colocado este en una placa de Petri con 10mL de FACS Buffer sobre hielo, de esta manera las células quedan en suspensión en el FACS Buffer, el cual fue recogido en un Falcon de 50ml.

La obtención de la médula ósea se efectuó a partir de los huesos fémur y tibia intactos, seccionando con cuidado por la articulación coxofemoral, por la rodilla, y por el talón, de tal manera que las cabezas de los huesos estén intactas, se cortaron las cabezas de cada hueso, y se inyectó FACS buffer en las cañas de los mismos y también en las cabezas usando una aguja adecuada (27G), para extraer la médula ósea.

3.1.4.2.2 Estandarización de las muestras

Una vez obtenidas las suspensiones celulares se procedió a estandarizar las muestras, de tal manera que se tengan aproximadamente $2 \cdot 10^5$ células por tinción.

Para ello se contó la celularidad de cada muestra usando un contador celular (Coulter Z2, Beckman). Se lavaron dos veces con FACS buffer frío y se centrifugaron 7' a 1500 rpm a 4°C, y finalmente se llevaron las muestras a una concentración de $40 \cdot 10^6$ células/ml, de las que se usaron 50µl de muestra (200.000 células) para cada tinción, excepto para algunas poblaciones muy poco abundantes para las cuales se usa 5 o 6 veces más muestra.

3.1.4.2.3 Marcaje

Previamente al marcaje con anticuerpos unidos a fluoróforos, se incubaron durante 20' las muestras con solución CD16/CD32 Fc-block (BD PharMingen) que bloquea los receptores FC evitando así una unión inespecífica de los anticuerpos. Los citómetros analíticos disponibles durante la realización de esta tesis (FACScalibur, BD y C6 Flow Cytometer, ACCURI) sólo permiten la combinación de 4 fluoróforos diferentes, limitando así las tinciones efectuadas. Una vez añadidos los anticuerpos correspondientes se incubaron las muestras durante 30' en hielo y a oscuras.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se lavaron con FACS buffer, se centrifugaron 7' a 1500 rpm y 4°C, resuspendiéndose finalmente en 75 µL de FACS buffer que contiene Ioduro de Propidio (PI) diluido, que nos permitirá descartar durante el análisis las células muertas (PI⁺).

Los análisis de citometría se llevaron a cabo usando los siguientes anticuerpos: anti-B220 (RA3-6B2), CD4 (L3T4), CD8a (53-6.7), CD19 (1D3), CD21 (7G6), CD23 (B3B4),

CD25/IL-2Ra (PC61), CD95/Fas (Jo2), CD117/c-Kit (2B8), CD138 (281-2), IgD (1.19), IgM (M41.42), Ly-77 (GL7), Sca1 (D7) (PharMingen). Los diferentes compartimentos hematopoyéticos estudiados se definieron en función de su tamaño y granularidad y de acuerdo a la expresión de los siguientes marcadores (Cobaleda et al., 2007a; Delogu et al., 2006; Schebesta et al., 2007)

- Células madre hematopoyéticas (HSC): células Lin⁻Sca1^{hi}c-Kit^{hi} de la médula ósea (Lin: B220, CD19, CD3ε, CD4, CD8a, TCRβ, Gr1, Mac1, CD11b, y Ter119).
- Células pro-B de la médula ósea: B220⁺cKit⁺ o CD19⁺cKit⁺.
- Células pre-B de la médula ósea: B220⁺CD25⁺IgM⁻.
- Células B inmaduras en la médula ósea: B220^{int}IgM⁺IgD⁻.
- Células B inmaduras en el bazo: B220⁺IgM^{hi}IgD^{low/-}.
- Células B transicionales en el bazo B220⁺IgM^{hi}IgD^{hi}.
- Células B maduras en el bazo y los nódulos linfáticos: B220⁺IgM^{lo}IgD^{hi}.
- Células B recirculantes en la médula ósea: B220^{hi}IgM^{lo}IgD⁺.
- Linfocitos B de zona marginal en el bazo: B220⁺CD21^{hi}CD23^{lo}.
- Linfocitos B foliculares en bazo y nódulos linfáticos: B220⁺CD21^{int}CD23^{hi}.
- Células B del centro germinal en bazo y nódulos linfáticos: B220⁺FAS^{hi}GL7^{hi}.
- Timocitos dobles negativos DN: CD4⁻CD8⁻.
- Timocitos dobles negativos DN1: CD44⁺CD25⁻c-Kit⁺ Lin⁻ (Lin: CD4, CD8a, Mac1, Gr1, B220)
- Timocitos dobles negativos DN2: CD44⁺CD25⁺c-Kit⁺ Lin⁻ (Lin: CD4, CD8a, Mac1, Gr1, B220)
- Timocitos dobles negativos DN3: CD44⁻CD25⁻c-Kit⁻ Lin⁻ (Lin: CD4, CD8a, Mac1, Gr1, B220)
- Timocitos dobles negativos DN4: CD44⁻CD25⁻c-Kit⁻ Lin⁻ (Lin: CD4, CD8a, Mac1, Gr1, B220)
- Timocitos dobles positivos (DP): CD4⁺CD8⁺.
- Linfocitos T CD8-SP en timo, bazo y nódulos linfáticos: CD4⁻CD8⁺.
- Linfocitos T CD4-SP en timo, bazo y nódulos linfáticos: CD4⁺CD8⁻.
- Granulocitos en la médula ósea y bazo: Gr1^{hi}Mac^{hi}.
- Monocitos/macrófagos en médula ósea y bazo: Gr1^{low/int}Mac1^{hi}.

Para la citometría preparativa se utilizó un citómetro de flujo FACS Aria (Becton Dickinson). Para la citometría analítica se utilizaron un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) o un citómetro C6 Flow Cytometer (ACCURI). Los datos se exportaron como archivos FCS y se analizaron con el Software FlowJo (TreeStar Inc.).

3.1.4.2.4 *Citometría de órganos de embriones*

La citometría efectuada con órganos de embriones de ratón solo se diferencia en la extracción de los órganos. Se consideró como el día de gestación E0.5 al día en que se detectaba tapón vaginal en la hembra a primera hora de la mañana. Se sacrificó a la hembra gestante en el día indicado y se extrajeron los embriones directamente seccionando los dos cuernos uterinos y estos se sumergieron en FACS buffer enfriado en hielo para sacrificar los embriones por hipotermia. Una vez sacrificados se extrajeron individualmente y se separó la placenta con un juego de pinzas diferente al que se usó en la disección del embrión, evitando así contaminar la muestra del embrión con restos celulares de la madre. La extracción de timo e hígado fetal se realizó bajo lupa, y una vez extraídos se procesaron al igual que los tejidos adultos descritos en los apartados anteriores.

3.1.4.3 ***Estudio de la Función de los Linfocitos T en Ratones $En2^{-/-}$***

3.1.4.3.1 *Formación de centros germinales en ratones $En2^{-/-}$ tras inmunización con un estímulo dependiente de linfocitos T*

Para inducir la formación de centros germinales en los ratones se procedió a la inmunización de los mismos con eritrocitos de cordero (SRB, sheep red blood cells, Patricell) los cuales se prepararon en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo. Se tomó una alícuota de SRB y se diluyó en 50 ml de PBS, se centrifugó a 2500 rpm 10' a 4°C, y así se lavó 3 veces, y se llevó finalmente a una concentración de $1-2 \cdot 10^9$ células/ml. Una vez preparados se inyectaron intraperitonealmente 100 μ l en ratones control y $En2^{-/-}$. El tiempo para ver la reacción de formación de centro germinal en el bazo fue de 10 días, periodo tras el cual se sacrificaron los animales inmunizados, junto con un control no inmunizado, y se procedió al análisis mediante citometría de flujo de los esplenocitos. El procedimiento y los anticuerpos utilizados para realizar el análisis por citometría de flujo se describen en el apartado 3.1.4.1.5.

3.1.4.3.2 *Producción de citoquinas específicas de linfocitos T en esplenocitos activados de ratones $En2^{-/-}$*

La producción de citoquinas se indujo en esplenocitos de ratones adultos usando el kit "Intracellular Cytokine Staining Starter Kit for mouse" (BD Pharmingen). Se sacrificaron

ratones control y ratones *En2^{-/-}* a los cuales se les extrajo el bazo. Se disgregaron dichos órganos para obtener una suspensión de células individualizadas en medio RPMI completo (RPMIc) que contiene RPMI (GIBCO) 10% suero fetal bovino inactivado filtrado con filtro de 0.45µm (Millipore), 2mM L-Glutamina (BioWhittaker), 50 µg/ml estreptomicina (BioWhittaker) y 50 U/ml de penicilina (BioWhittaker).

Se centrifugaron las células a 500xg durante 5 min a 10°C y se resuspendieron e incubaron durante 5 min en 3ml de buffer de lisis de eritrocitos ACK (NH₄Cl 0.15M, KHCO₃ 1M, Na₂EDTA 0.1M, pH 7.2-7.4). Se lavaron las muestras con RPMIc y se llevaron a una concentración celular de 2·10⁶ Cél/ml. A 6 ml de la anterior suspensión (12·10⁶ Células) se les añadieron 10µL del cocktail de activación policlonal de leucocitos, que contiene éster de forbol (12-Miristato 13-acetato; PMA), Ionomicina, y un inhibidor del transporte proteínico del aparato de Golgi (GolgiPlug, BD, que contiene brefeldina A), y se incubaron las muestras durante 4h a 37°C en un incubador con CO₂.

Las muestras, tras ser lavadas de nuevo con RPMIc se tiñeron con los anticuerpos anti-CD4 (FITC) y anti-CD8 (APC) en proporción 1:100 durante 30' en hielo y protegidos de la luz. Tras esto se lavaron de nuevo y se continuó con el protocolo para la tinción intracelular. Para ello se llevó la concentración de las muestras a 2·10⁷ cél/ml, y se cogieron 50 µl para cada tinción (10⁶ células para cada tinción).

Se lavaron con 100 µl FBS (BD Pharmingen Stain buffer) y, tras centrifugar, se resuspendieron en 100 µl de BD Cytotfix/cytoperm buffer, que contiene una mezcla de paraformaldehído y saponina, que fija y permeabiliza las células para las tinciones intracelulares contra las citoquinas producidas y retenidas en el aparato de Golgi. Todos los pasos de lavado a partir de ese momento incluían saponina (BD Wash/perm buffer), y tras finalizar éstos se procedió a realizar las tinciones usando los siguientes controles y anticuerpos presentes en el kit;

- PE- conjugado con anti-IL2 (ratón)
- PE- conjugado con anti-IFN-γ (ratón)
- PE- conjugado con anti-TNF-α (ratón)
- Cocktail de control de isotipo PE- conjugado
- Cocktail de bloqueo de anticuerpos purificado

Se incubaron durante 15' a temperatura ambiente las muestras con las diferentes combinaciones de anticuerpos;

1. Control negativo (sin teñir)
2. Control de isotipo (con Cocktail de control de isotipo PE- conjugado)
3. Control de IL-2 (anti IL-2 + Cocktail de bloqueo)
4. Producción de IL-2 (anti IL-2)
5. Control sin activar de IL-2 (anti IL-2)
6. Control de IFN γ (anti IFN γ + Cocktail de bloqueo)
7. Producción de IFN γ (anti IFN γ)
8. Control sin activar de IFN γ (anti IFN γ)
9. Control de TNF α (anti TNF α + Cocktail de bloqueo)
10. Producción de TNF α (anti TNF α)
11. Control sin activar de TNF α (anti TNF α)

Una vez lavadas las muestras se procedió a su análisis mediante citometría de flujo (Accuri) y usando el software FlowJo (TreeStar Inc.).

3.1.5 Estudio del Mecanismo Molecular de Acción de En2 en el desarrollo linfocitario T

3.1.5.1 Análisis transcriptómico diferencial de poblaciones hematopoyéticas purificadas de ratones de tipo silvestre y En2^{-/-} mediante microarrays de cDNA.

3.1.5.1.1 Separación de poblaciones celulares mediante citometría de flujo

Las poblaciones celulares fueron separadas en función de su tamaño-granularidad y en función de la señal emitida por los fluorocromos en un citómetro de flujo FACS Aria (Becton Dickinson) en el servicio de citometría de la Universidad de Salamanca. Se

separaron las poblaciones celulares del timo tal y como se ha indicado anteriormente, procediéndose a continuación a la extracción de RNA de las poblaciones seleccionadas.

3.1.5.1.2 Extracción y valoración de la calidad del RNA

La extracción de RNA se realizó utilizando TRIzol (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) y los RNA, una vez purificados se comprobaron en cuanto a calidad y concentración en el espectrofotómetro Nanodrop-1000 (THERMO scientific). Además de comprobar la calidad mediante el cociente de las absorbancias a 260/280nm, se evaluó el RNA con el kit de RNA 6000 Nano LabChip y con el Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Este aparato lleva a cabo el análisis de la calidad del RNA en un chip en el que se separa el RNA por electroforesis de manera automatizada (Mueller et al., 2000) y posteriormente el RNA se detecta mediante fluorescencia activada por láser. El resultado es un gráfico (electroferograma) donde la cantidad de fluorescencia medida en cada punto es proporcional a la cantidad de RNA de un tamaño dado. Con las cuantificaciones de RNA ribosómico de 28S y 18S calculadas con el electroferograma se obtiene el RIN (del inglés "RNA Integration Number"), que es una medida de la calidad de las muestras de RNA. De este modo se seleccionaron las muestras con RNA de alta calidad ($RIN \geq 8.0$). Así, se hibridaron en los microarrays de expresión las muestras de CD8-SP de bazo y DP de timo obtenidas de ratones wild type frente a las purificadas de ratones *En2^{-/-}*.

3.1.5.1.3 Hibridación de los microarrays de expresión

El RNA de cada muestra se amplificó y transformó en RNA complementario (cRNA) marcado con biotina. Posteriormente las muestras se hibridaron en los microarrays de expresión Gene Chips HG-U133 plus 2.0 de la compañía Affymetrix (Affymetrix Inc). Estos microarrays contienen alrededor de 54000 sondas que detectan la expresión de aproximadamente 38500 genes. Finalmente los microarrays se revelaron con un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina y se escanearon en GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix Inc) para detectar la cantidad de luz emitida a 570 nm, que es proporcional a la cantidad de cRNA de cada gen que ha hibridado.

Se empleó el algoritmo RMA en R/Bioconductor para la normalización y sumarización de los datos de expresión. A continuación se realizó un filtrado de intensidad

por el cual se seleccionaron todas aquellas sondas cuyo valor de expresión fuese superior a 5 (en logaritmo en base 2). El análisis de expresión diferencial entre las distintas muestras se realizó usando el paquete LIMMA ("*Linear Models for Microarray Data*") de R/Bioconductor (Smyth, 2004). Con este algoritmo se obtuvieron los parámetros estadísticos utilizados para la selección de genes en análisis posteriores: el valor de probabilidad asociado al test estadístico (*p-value*), la estimación del cambio de cada gen ("*Fold-Change*", FC), la tasa de falsos positivos incluidos en la selección ("*False Discovery Rate*", FDR) (Storey and Tibshirani, 2003) y el parámetro estadístico B (valor asociado a cada uno de los genes y que se define como el logaritmo del cociente de la probabilidad de que dicho gen esté diferencialmente expresado entre la probabilidad de que no lo esté). Todo el procesamiento experimental y bioinformático de los estudios del transcriptoma se llevó a cabo en colaboración con el grupo del Dr. J.A. Martínez Climent (CIMA, Navarra).

3.1.6 Generación de un Modelo de Ratón de Sobreexpresión de En2 en Linfocitos T

3.1.6.1 Clonación de *mEn2* bajo el control del promotor del gen LCK

Los diferentes pasos de clonación requeridos para la construcción final LCK-En2-ires-hCD2t se han llevado a cabo según se describe más adelante en el apartado 3.1.6.1.4.

3.1.6.1.1 Clonación de *En2* de ratón (*mEn2*) en el vector *pBlueScript* (*pBS*)

La clonación de *mEn2* se realizó mediante PCR a partir de cDNA total de cabeza de embrión de ratón. La purificación de RNA y síntesis del cDNA correspondiente se hizo de la misma forma descrita en los apartados 3.1.3.1-3.

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para clonar *mEn2*:

- TATGGAGGAGAAGGATTCC -> FI *mEn2* FP (desde el comienzo de *mEn2*, en rojo el ATG de inicio)
- TATTGCATTGTTTCGCGCG -> FI *mEn2* RP (desde la región 3' no traducida del segundo exón de *mEn2*)

El producto resultante de dicha PCR se correspondía al cDNA de *mEn2* completo y con una sola mutación conservativa cambiando un codón GTC por GTA dando ambos lugar a una valina. Dicho producto se insertó en el vector pBS en los sitios *SaI* y *HindIII*.

3.1.6.1.2 Clonación de *mEn2* en el vector *pBS-ires-hCD2t*

El cDNA de *mEn2* se extrajo de pBS-En2 y se clonó en un vector que ya tenía insertado un IRES (de *internal ribosomal entry site*), que permite la formación de un mensajero bicistrónico, y la secuencia del gen humano *CD2* truncado (careciendo de la región citosólica y por tanto incapaz de transducir señales a la célula). La extracción se realizó mediante digestión con las enzimas de restricción *SaI* y *HindIII* y se clonó en el sitio *EcoRI* de pBS-ires-hCD2 con extremos romos ("*blunt ends*"), destruyéndose todos ellos.

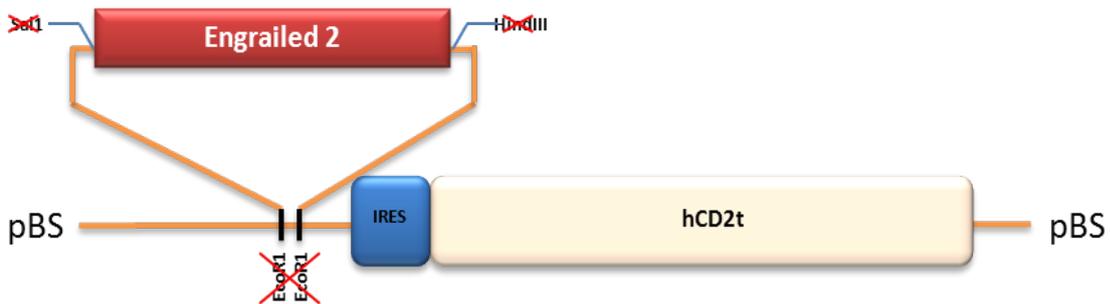


Figura 3- 2. Esquema de la clonación de *mEn2* en pBS-ires-hCD2

3.1.6.1.3 Clonación de *mEn2-ires-hCD2t* en el vector *p1017 LCK-hGH*

La clonación del fragmento En2-ires-hCD2t se realizó mediante la digestión de pBS-En2-ires-hCD2t con las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI* clonándose este fragmento en el sitio *BamHI* del plásmido p1017-LCK-hGH (cedido por la Dra. Cynthia Guidos) con extremos romos, destruyéndose todos los sitios implicados.

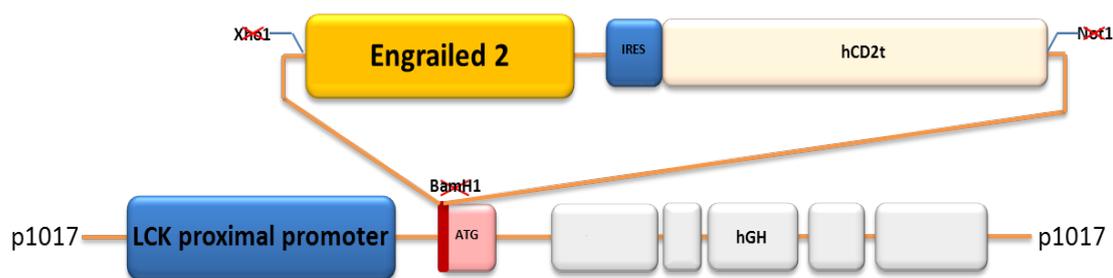


Figura 3- 3. Esquema de la clonación del fragmento En2-ires-hCD2 bajo el control del promotor de LCK.

3.1.6.1.4 Protocolos de ligación y comprobación

Los fragmentos obtenidos por digestión de los plásmidos que los contienen fueron tratados con 1 unidad del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Roche) para generar los extremos romos y posteriormente se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa la banda correspondiente a los insertos usando el kit "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen). Por otro lado los plásmidos receptores de los insertos se digirieron con las enzimas correspondientes y se utilizó la enzima Klenow para la realización de los extremos romos. Todas las enzimas de restricción utilizadas fueron suministradas por New England Biolabs.

Posteriormente se utilizó 1 unidad de la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs) que cataliza la formación del enlace fosfodiéster entre los extremos 5' y 3' de dos hebras independientes de DNA según se describe en (Sambrook and Russell, 2001) para llevar a cabo la reacción de unión del inserto al plásmido receptor. Tras incubar estas mezclas de ligación 2 horas a temperatura ambiente y durante 14 horas a 16°C, se utilizaron 5µl de las mismas para transformar bacterias competentes y seleccionar las colonias portadoras de los insertos.

La cepa utilizada fue la DH5α de Escherichia coli previamente tratada, según se describe en (Inoue et al., 1990), para hacerla competente. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB (1% agar; 1% triptona (OXOID); 0,5% extracto levadura (DIFCO), 1% NaCl (PANREAC), ajustado a pH: 7,4) suplementadas con 50µg/ml de Ampicilina para seleccionar aquellas células que habían incorporado el vector. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 16 horas. Haciendo uso del método de búsqueda rápida o turboscreening se seleccionaron aquellas colonias bacterianas que habían incorporado el inserto diferenciándolas de aquellas que habían incorporado el vector vacío.

El método de búsqueda rápida o turboscreening radica en la lisis de las bacterias, desnaturalización del DNA y fijación del mismo a membranas de nylon en un solo paso (García-Hernández et al., 1997). Para la fijación las membranas se tratan con una fuente de luz UV de 312nm durante 20 segundos (UV Stratalinker 2400, Stratagene) con el fin de unir covalentemente el DNA a la membrana. Finalmente, las membranas son hibridadas con una sonda radiactiva que reconoce la secuencia del fragmento incorporado o parte del mismo, permitiendo la identificación de las colonias que han incorporado el inserto como se describe en los puntos a-c del apartado 3.1.3.7.3 de este capítulo.

3.1.6.2 Generación del modelo murino LCK-En2

Con el objeto de estudiar los efectos de la ganancia de función de *En2 in vivo* se generaron ratones transgénicos mediante la inyección de la construcción LCK-En2-ires-hCD2t, linealizada con *NotI* (ver figura 3-4), en el pronúcleo masculino de óvulos fecundados obtenidos de ratones C57B6/CBA empleando técnicas estándar (Hogan B, 1995). Estos óvulos fecundados se implantaron en una hembra pseudopreñada, generándose 4 fundadores de ratones transgénicos *LCK En2* (ver figura 4-29), que se encuentran en este momento en cruce para transmitir el transgén a la descendencia y originar líneas estables. La microinyección se llevó a cabo en el servicio de transgénesis del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) por la Dra. Belén Pintado.

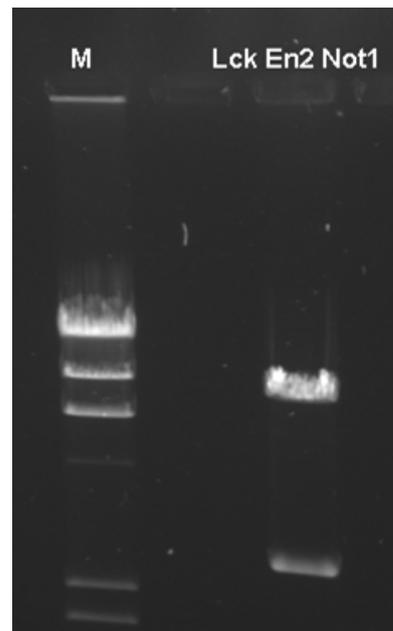


Figura 3- 4. Digestión de p1017 LCK En2-ires-hCD2t con la enzima *NotI*. En donde el carril de la derecha muestra dos bandas, la inferior se corresponde al vector vacío (3 kb), y la superior se corresponde con inserto *Lck-En2-ires-hCD2t* (8 kb). Dicha banda es el DNA a microinyectar para la generación de los ratones transgénicos *Lck-En2*.

3.1.6.2.1 Genotipado de los ratones LCK-En2

Para el análisis de genotipo de los fundadores se utilizó la técnica de PCR para la cual se extrajo DNA genómico de la cola de los ratones (ver apartado 3.1.4.1.1) y se usaron los siguientes oligonucleótidos con un tamaño de producto esperado de 500pb:

- TCGGAGAAATGATGAGGAGC -> hCD2t genoF01
- GGAGCTGGAGACAAGAGCC -> hGH genoRev1

La muestra de DNA genómico se diluyó 1:10 para usarla como molde en la reacción de PCR con el siguiente programa en el termociclador;

(95°C, 4:30' + [95°C, 30" + 58°C, 30" + 72°C, 45"] x35 ciclos + 72°C, 10')

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

“Lo peor no es cometer un error, sino tratar de justificarlo, en vez de aprovecharlo como aviso providencial de nuestra ligereza o ignorancia.”

Santiago Ramón y Cajal

4.1 Identificación de islas CpG metiladas en la progresión de LMC a crisis blástica.

4.1.1 Preparación de la columna de unión de DNA metilado en pares CpG

4.1.1.1 Expresión y purificación de la proteína HMBD

La proteína HBMD se expresó y purificó tal y como se describe en la Sección 3.1.1.3.1 de Materiales y Métodos. En la Figura 4-1 se muestra la pureza de la proteína tras el proceso de aislamiento y previamente a su incorporación a la matriz de Ni^{2+} - NTA para formar la columna de afinidad.

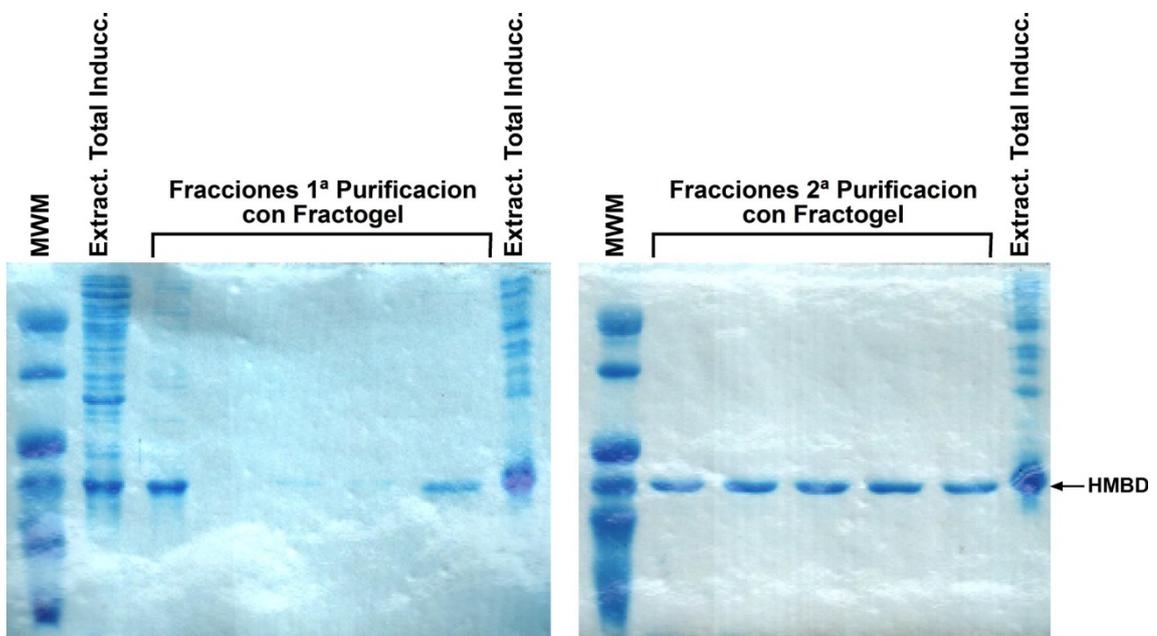


Figura 4- 1. Purificación de la proteína HMBD. Se muestran los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en los que se recoge la pureza de la proteína en los diferentes pasos de su purificación a partir del extracto de bacterias inducidas, según se describe en la sección 3.1.1.3.1 de Materiales y Métodos.

4.1.2 Secuenciación y análisis de secuencias de los clones metilados diferencialmente.

Una vez secuenciados todos los clones de la genoteca, las secuencias obtenidas fueron comparadas frente a las bases de datos del GenBank usando el programa BLAST (Altschul et al., 1990), para identificar los genes asociados con las secuencias obtenidas. De las 539 islas secuenciadas, 217 se pudieron asociar con más de un 99% de homología con regiones de genes conocidos, los cuales se pueden ver en el Apéndice I.

Estadísticamente, los genes identificados se pueden agrupar en siete categorías principales en base a sus funciones conocidas. La distribución de acuerdo con estas categorías se muestra en la Figura 4-2 y se discute con detalle en el apartado 4.2.



Figura 4- 2. Distribución de las principales funciones asociadas a los genes diferencialmente metilados en la progresión a la crisis blástica. Se muestran las funciones génicas distribuidas en 7 categorías. Un mismo gen puede estar asignado a más de una función. El total de los genes identificados positivamente con más de un 99% de homología mediante BLAST, y utilizados para la elaboración de esta gráfica es de 217.

4.2 Resultados del screening.

4.2.1 Estado de metilación del DNA

4.2.1.1 El gen *HOXA1* se metila en la progresión de LMC a crisis blástica.

La secuencia de la isla asociada al gen *HOXA1*, tal y cómo se ha identificado a partir del screening de la genoteca es:

```

5'aaatcaggaagcagaCGtaagtggtaggggtacccccagtgCGctccCGct
gtttactctggaaatctctcatctccatgggccagcatcaccaccaccacc
agggttatgctgggggCGCGgtgggctCGcctcaatacattcaccactcat
atggacaggagcaccagagcctggccctggctaCGtataataactccttgt
ccctctccaCGccagccaccaagaagcctgtCGctccccCGcatCGgaga
catcttctccagCGcagacttttgactggatgaaagtcaaaagaaaccctc
ccaaaacaggtcagtcctgctgggttggtggatgctccttgattattctggaa
ggagctgggatgctta3'

```

Esta secuencia se corresponde con la región marcada mediante una línea azul en la figura 4-4. Se resaltan en negrita en la secuencia los dinucleótidos CpG. Se indican en bloques de color las posiciones a partir de las cuáles se han diseñado los oligonucleótidos para la amplificación del DNA modificado con bisulfito: los primers para la primera PCR (más externos) se muestran en amarillo (forward) y azul (reverse), y los de la PCR anidada, en rosa (forward) y verde (reverse). El producto de PCR obtenido y utilizado para su clonación y secuenciación se muestra en la Figura 4-3. En la Figura 4-4 se muestra un esquema de la distribución de los pares CpG metilados en diferentes clones secuenciados pertenecientes a las distintas muestras analizadas. Se aprecia el incremento en la densidad de metilación desde los controles hasta las crisis blásticas o las leucemias agudas, así como en varias de las líneas celulares (ver Discusión).

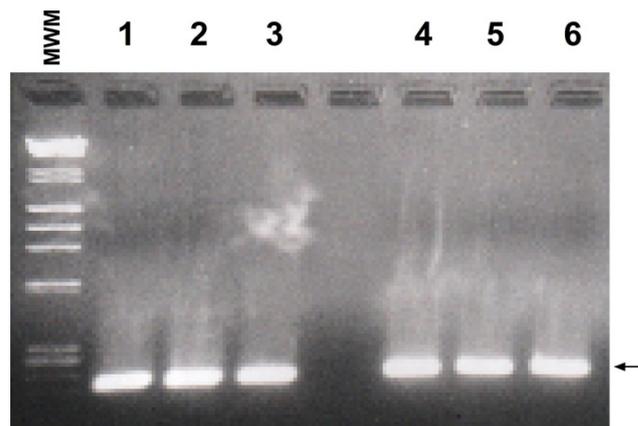


Figura 4- 3. Amplificación de la isla CpG del gen *HOXA1* tratada con bisulfito, mediante el uso de PCRs anidadas. Se muestra el gel de agarosa de un grupo de las muestras analizadas en el que se indica mediante una flecha la banda del producto de PCR.

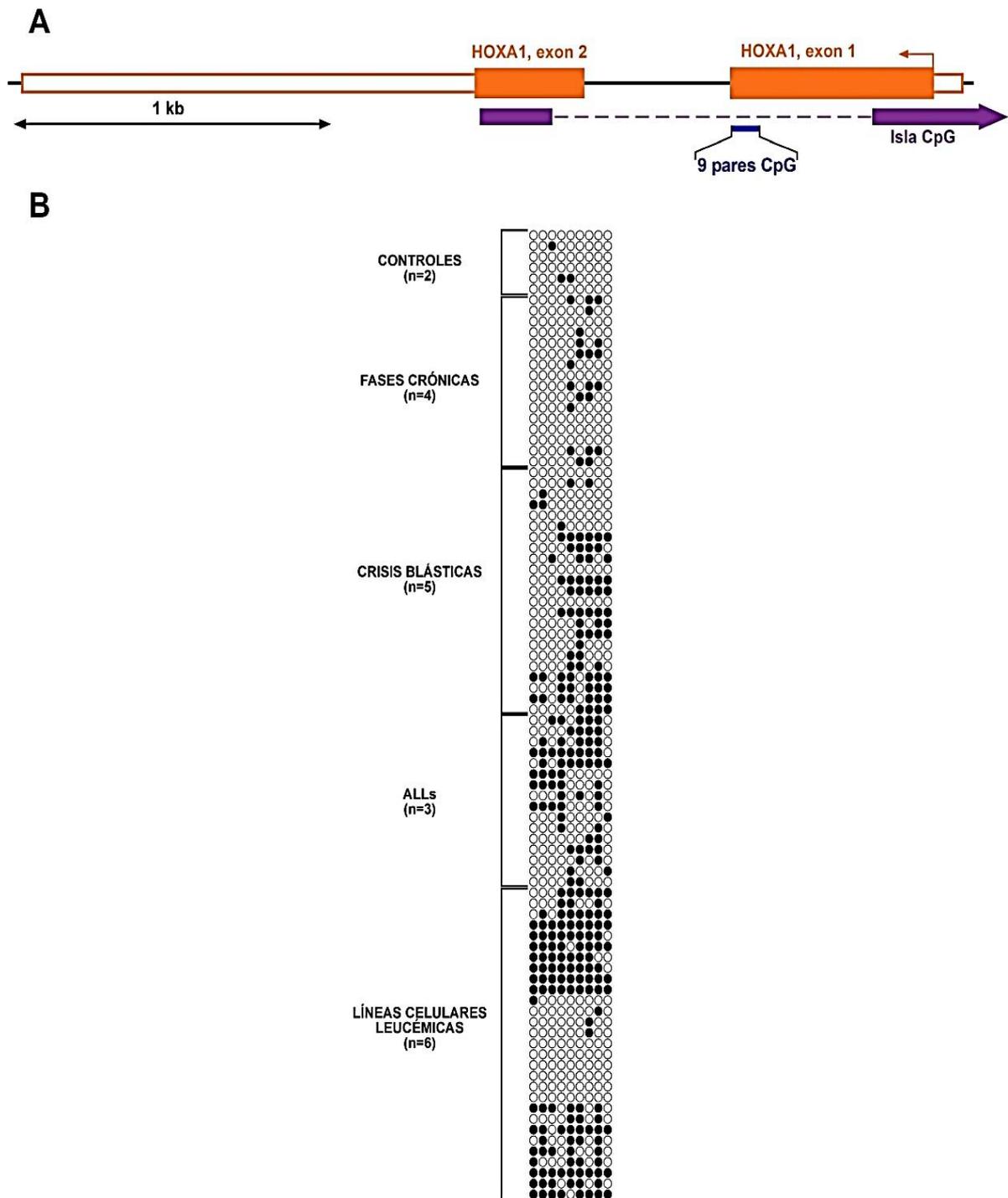


Figura 4- 4. El gen *HOXA1* se metila en la progresión de LMC a crisis blástica. A) Esquema del gen *HOXA1* humano. Las cajas naranjas rellenas representan los exones transcritos (CDS); las cajas vacías representan el mRNA no codificante. La flecha violeta representa la isla CpG y la caja azul, el segmento analizado por bisulfito. B) Representación esquemática del estado de metilación de los pares CpG en la secuencia indicada en azul, para los diferentes tipos de muestras analizadas. Cada par CpG se representa por un círculo (en negro cuando está metilado). Cada fila representa uno de los clones secuenciados para cada muestra. n: número de muestras (pacientes, o líneas celulares) distintas analizadas.

4.2.1.2 El gen HOXC13 se metila en la progresión de LMC a crisis blástica

La secuencia de la isla asociada al gen *HOXC13*, tal y cómo se ha identificado a partir del screening de la genoteca es:

```

5' ttaaaaagctccagcagatcatgcatgaCGacttCGctgctcctgcatccaCGctggcCG
gagagccttatgtaCGtctatgaggacagCGCGgCGgagagCGgcatCGgCGgCGgCGgCGga
ggaggaggCGgCGgcaCGggCGgagCGgggggtggctgcagCGgagCGagcccCGgcaaagcc
cCGagcatggatggtctgggcagcagctgccCGgccagccactgcCGCGacctgcttcCGcacc
cCGtgctgggcCGccCGcCGgctccccctgggCGcccctcagggCGcCGtctataCGgagatcc
CGgcccCGgaggCGgCGCGccagtgtgcccCGcCGccCGcacccccacctCGtccagCGcca
ccctgggctaCGgctacccttCGggggcagctactaCGgctgcCGcctgtCGcacaaCGtga
acctgcagcagaagccttgCGcctaccaccCGggCGataaataccCGgagcCGtCGggCGccc
tgccCGgtgaCGacctgtcctctagggccaaggagttCGccttctacccagcttCGccagctc
ctaccagg3'
    
```

Esta secuencia se corresponde con la región marcada mediante una línea azul en la figura 4-6. Se resaltan en negrita el ATG y los dinucleótidos CpG. Se indican en bloques de color las posiciones a partir de las cuáles se han diseñado los oligonucleótidos para la amplificación del DNA modificado con bisulfito: los primers para la primera PCR (más externos) se muestran en amarillo (forward) y azul (reverse), y los de la PCR anidada, en rosa (forward) y verde (reverse). El producto de PCR obtenido y utilizado para su clonación y secuenciación se muestra en la Figura 4-5. En la Figura 4-6 se muestra un esquema de la distribución de los pares CpG metilados en diferentes clones secuenciados pertenecientes a las distintas muestras analizadas. Se aprecia un incremento gradual y moderado en la densidad de metilación desde los controles hasta las crisis blásticas, y una metilación casi completa en las leucemia linfoblásticas agudas T analizadas, así como en todas las líneas celulares estudiadas (ver Discusión).

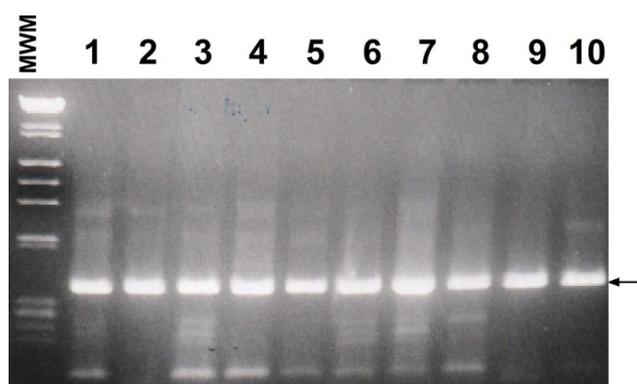


Figura 4- 5. Amplificación de la isla CpG del gen *HOXC13* tratada con bisulfito, mediante el uso de PCRs anidadas. Se muestra el gel de agarosa de un grupo de las muestras analizadas en el que se indica mediante una flecha la banda del producto de PCR.

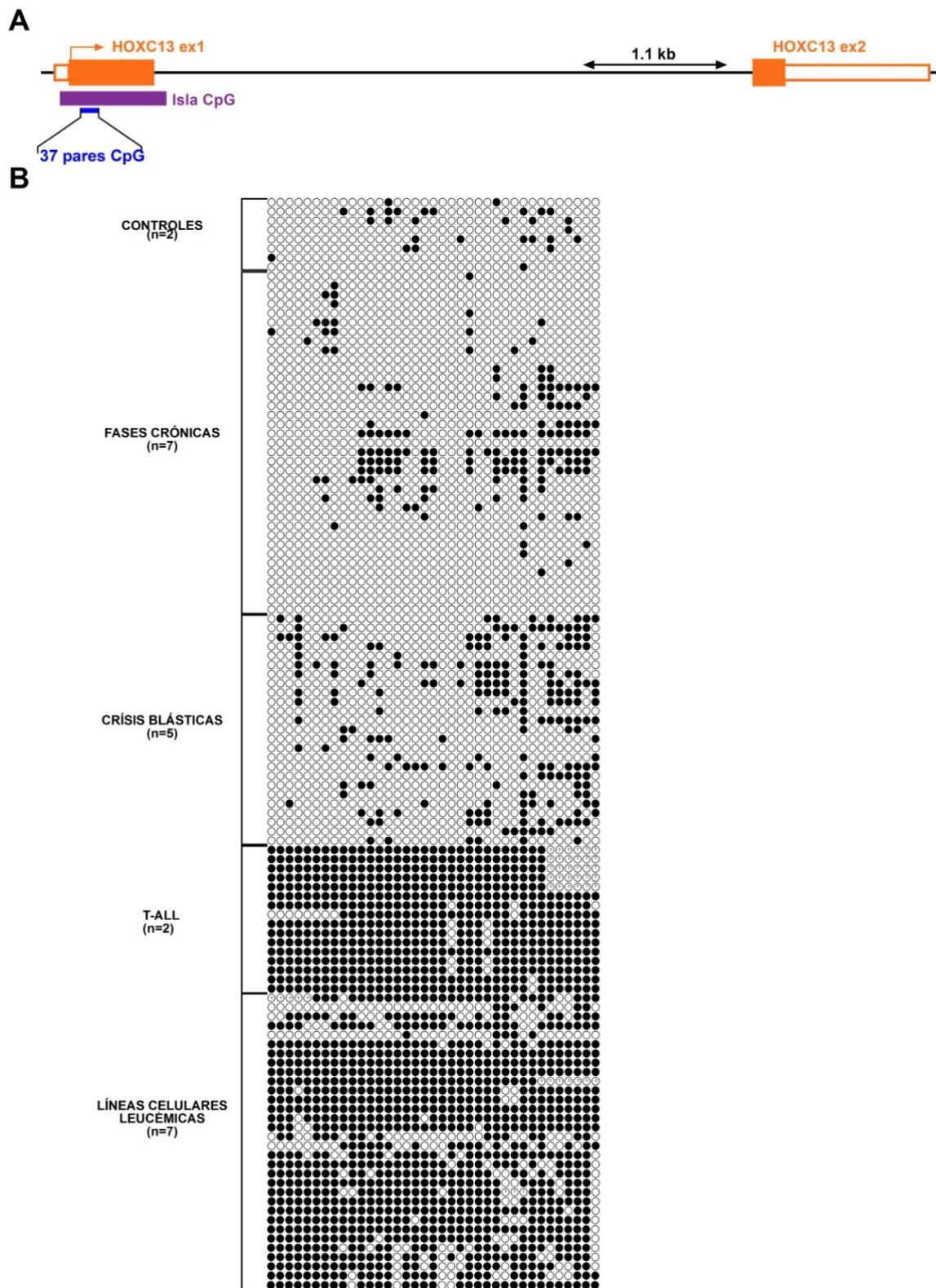


Figura 4- 6. El gen *HOXC13* se metila en la progresión de LMC a crisis blástica. A) Esquema del gen *HOXC13* humano. Las cajas naranjas rellenas representan los exones transcritos (CDS); las cajas vacías representan el mRNA no codificante. La barra violeta representa la isla CpG y la caja azul, el segmento analizado por bisulfito. B) Representación esquemática del estado de metilación de los pares CpG en la secuencia indicada en azul, para los diferentes tipos de muestras analizadas. Cada par CpG se representa por un círculo (en negro cuando está metilado). Cada fila representa uno de los clones secuenciados para cada muestra. n: número de muestras (pacientes, o líneas celulares) distintas analizadas.

4.2.1.3 El gen ENGRAILED-2 se metila en la progresión de LMC a crisis blástica

La secuencia de la isla asociada al gen *En2*, tal y cómo se ha identificado a partir del screening de la genoteca es:

```

5' caaaaatccagagtgaaagtgtctcaggttgCGcCGagtggcctggaaattt
cCGagccCGCGCGgagggCGaggCGgCGagggCGgCGgaCGgcCGgggagCGCGggCG
gcccagccCGgccCGgcCGggccctggcctCGCGtctctcaccatgCGactCGggcCG
CGgagctctgCGgggctCGgCGggggCGCGgcCGcaCGcCGgtggggCGcccCGgccC
GcagCGgggCGgCGgcCGCGaggagggggcctccatgtgCGtgCGggCGgtggCGggC
GCGctgacCGCGggCGccCGgcaccctCGagggcCGgctagggCGtgCGggCGgggaC
GgcCGggCGgCGgCGgCGgcCGgagcCGgccCGggCGggCGtgagCGcCGgggaaCGC
GctgcctgcatgCGCGcagctctCGcccCGggCGgcccaggCGgCGgCGcCGgagccC
GaggCGgcCGgaCGCGgagaggagCGgggagccCGggaggCGgccCGCGtcccCGcCG
gaccactgCGactgtctagaccCGgctgCGCGgCGaagtCGaggacttggtctgttg
aatctctcatCGtctgggCGagCGgggCGgctCGtggtgtttctaaccagttCGtggg
ttcaaaggtggctcCGCGcCGagCGCGgcCGgCGacttgtaggacctcagccctggcCG
CGgcCGcCGCGcaCGccctCGgaagactCGgCGgggtgggggCGCGggggtctcCGtg
tgCGcCGCGggagggcCGaaggctgatttggaggggCGtcccCGgagaaccagtgtggg
atctactgtgaacagcatggaggagaatgacccaagcctggCG3'

```

Esta secuencia se corresponde con la región marcada mediante una línea azul en la figura 4-8. Se resaltan en negrita el ATG y los dinucleótidos CpG. Se indican en bloques de color las posiciones a partir de las cuáles se han diseñado los oligonucleótidos para la amplificación del DNA modificado con bisulfito: los primers para la primera PCR (más externos) se muestran en amarillo (forward) y azul (reverse), y los de la PCR anidada, en rosa (forward) y verde (reverse). El producto de PCR obtenido y utilizado para su clonación y secuenciación se muestra en la Figura 4-7. En la Figura 4-8 se muestra un esquema de la distribución de los pares CpG metilados en diferentes clones secuenciados pertenecientes a las distintas muestras analizadas. Se aprecia una falta de metilación del gen en controles, en fases crónicas, en crisis blásticas no de tipo T, y en B-ALL. Por el contrario, se puede observar un alto grado de metilación en la crisis blástica T, en las leucemias linfoblásticas agudas T analizadas, así como en todas las líneas celulares estudiadas (ver Discusión).

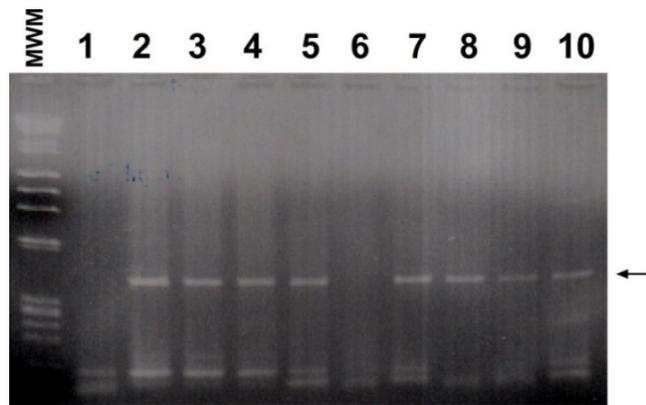


Figura 4- 7. Amplificación de la isla CpG del gen *ENGRAILED-2* tratada con bisulfito, mediante el uso de PCRs anidadas. Se muestra el gel de agarosa de un grupo de las muestras analizadas en el que se indica mediante una flecha la banda del producto de PCR.

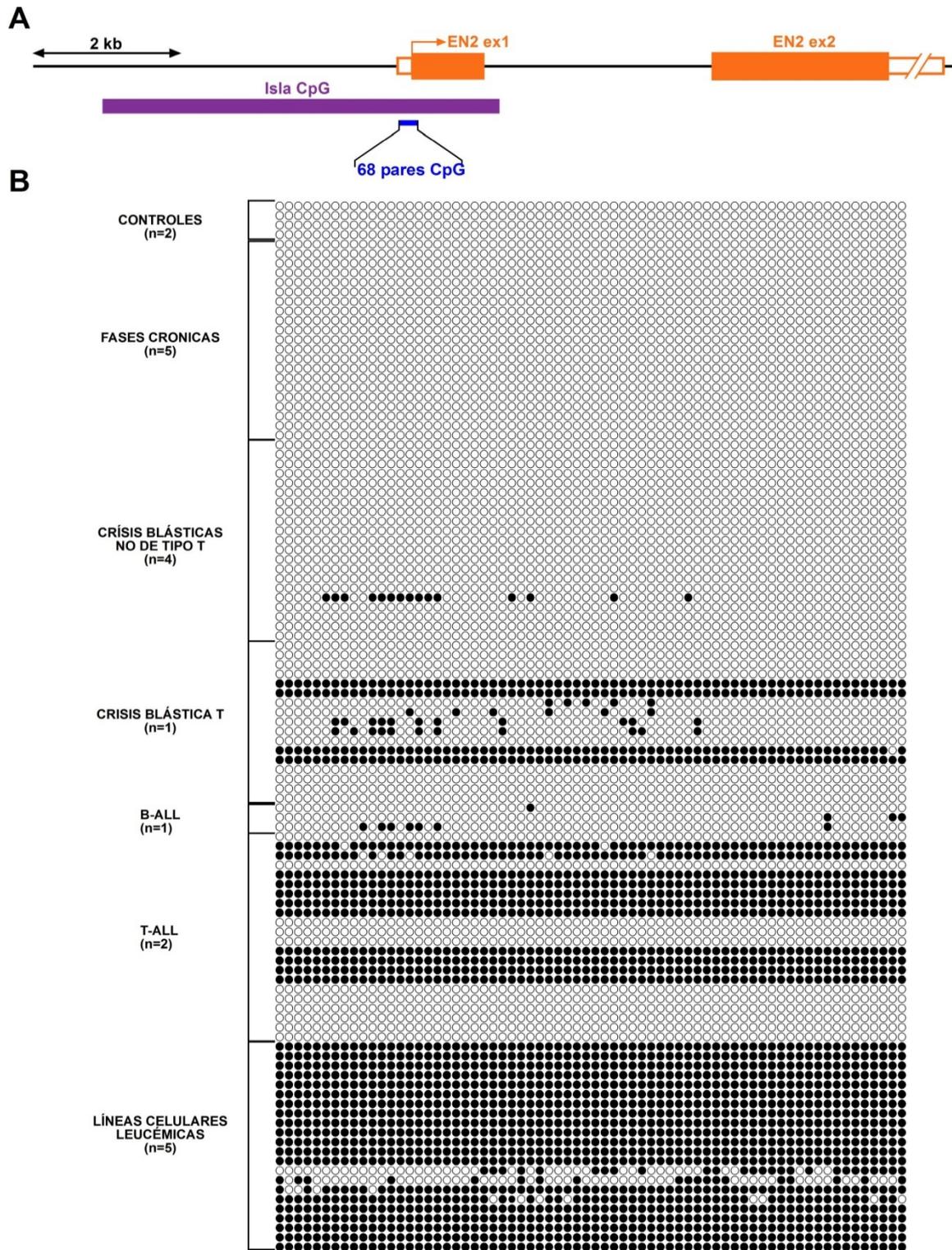


Figura 4- 8. El gen *ENGRAILED-2* se metila en la progresión de LMC a crisis blástica. A) Esquema del gen *EN2* humano. Las cajas naranjas rellenas representan los exones transcritos (CDS); las cajas vacías representan el mRNA no codificante. La barra violeta representa la isla CpG y la caja azul, el segmento analizado por bisulfito. B) Representación esquemática del estado de metilación de los pares CpG en la secuencia indicada en azul, para los diferentes tipos de muestras analizadas. Cada par CpG se representa por un círculo (en negro cuando está metilado). Cada fila representa uno de los clones secuenciados para cada muestra. n: número de muestras (pacientes, o líneas celulares) distintas analizadas.

4.2.2 *Engrailed 2* se expresa en el sistema hematopoyético.

4.2.2.1 *En2* se expresa durante el desarrollo linfoide T en ratón

Dado que el patrón de metilación sugiere una asociación con crisis blásticas y leucemias de tipo T, de acuerdo con la hipótesis de partida del presente estudio cabía suponer que *En2* jugase algún papel durante el desarrollo de los linfocitos T. Con el fin de comprobar este hecho, en primer lugar se estudió si se expresaba en algún compartimento celular a lo largo de la linfopoyesis T. Para ello se preparó cDNA a partir de poblaciones celulares de ratón WT de 8 semanas, separadas mediante citometría de flujo. Se purificaron dobles negativos (DN), dobles positivos (DP), SP-CD4 y SP-CD8 de timo y CD4⁺ y CD8⁺ de bazo. Se estudió la expresión de *En2* mediante el uso de oligonucleótidos interexónicos específicos, usando como controles cDNAs de células madre embrionarias de ratón y de cabeza embrionaria de ratón de día 16 (E16).

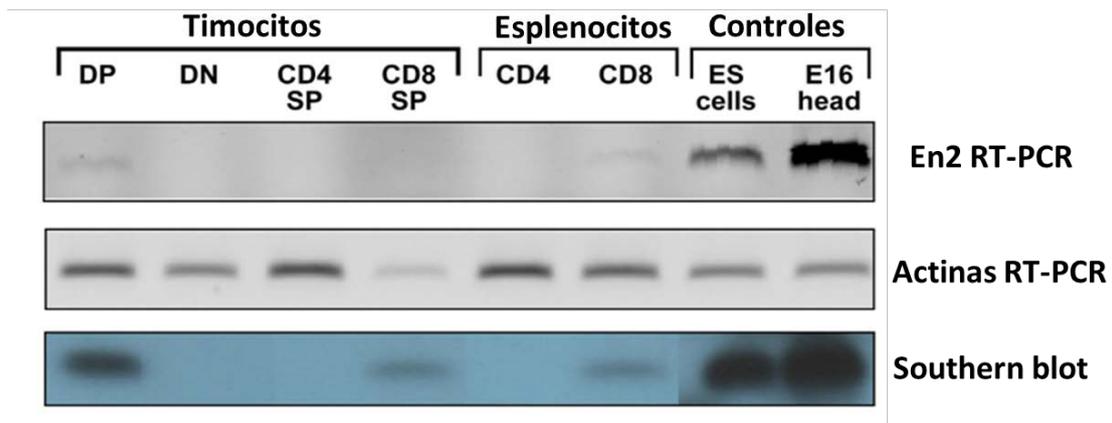


Figura 4- 9. *En2* se expresa en el desarrollo de los linfocitos T. En el primer carril, RT-PCR de *mEn2*, en el segundo carril se muestran las actinas de las mismas muestras como control, y el tercer carril muestra la hibridación del primer carril con una sonda dirigida contra *mEn2* mediante la técnica de southern blot.

Como se puede observar en la Figura 4-9, *Engrailed-2* se expresa en timocitos dobles positivos y CD8 SP y en linfocitos T CD8⁺ en el bazo. Para confirmar que el producto detectado se trataba de *Engrailed-2* se clonó y secuenció el producto de PCR obtenido del control positivo de cabeza embrionaria de ratón (E16). Una vez verificado que la secuencia corresponde al gen *En2* de ratón, se utilizó como sonda en la técnica de Southern blot contra los productos de PCR.

4.2.2.2 *EN2 se expresa durante el desarrollo linfoide T humano*

Con el objetivo de confirmar en humanos el resultado de la expresión de *En2* observado en ratón, se realizó el mismo tipo de experimento usando en este caso muestras de timocitos humanos y de gliomas de pacientes humanos como control positivo de expresión de *hEN2*.

El producto de PCR obtenido de las muestras de glioma se clonó y secuenció para verificar que se trata de *hEN2* y se utilizó posteriormente como sonda en un ensayo de southern blot para confirmar la expresión en las muestras de timo. Con este método, aunque los oligonucleótidos interexónicos diseñados para detectar *hEN2* generaron un producto muy poco visible (mediante tinción de los geles de agarosa con bromuro de etidio) por RT-PCR en muestras de timocitos, la hibridación con sonda específica permitió detectar la expresión de bajos niveles de *ENGRAILED-2* en DP de timo humano.

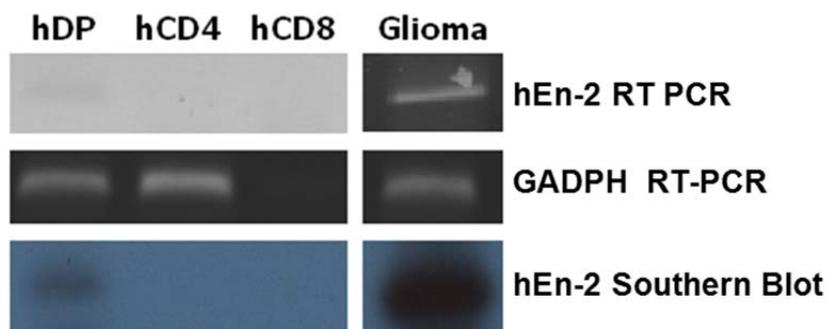


Figura 4- 10. En2 se expresa en el desarrollo de los linfocitos T humanos. En el primer carril se muestra la RT-PCR de *hEn2*, en el segundo carril, como control, la expresión de GADPH, y en el tercer carril se muestra la hibridación del primer carril con una sonda dirigida contra *hEn2* mediante la técnica de southern blot.

4.2.2.3 *En1 no se expresa durante el desarrollo linfoide T de ratón*

En vertebrados existen dos homólogos de *Engrailed*, 1 y 2. Dado que durante el desarrollo del sistema nervioso *En1* y *En2* tienen funciones redundantes allí donde se expresan ambos, se analizó si *Engrailed-1* también se expresaba durante el desarrollo de los timocitos. (Figura 4-11)

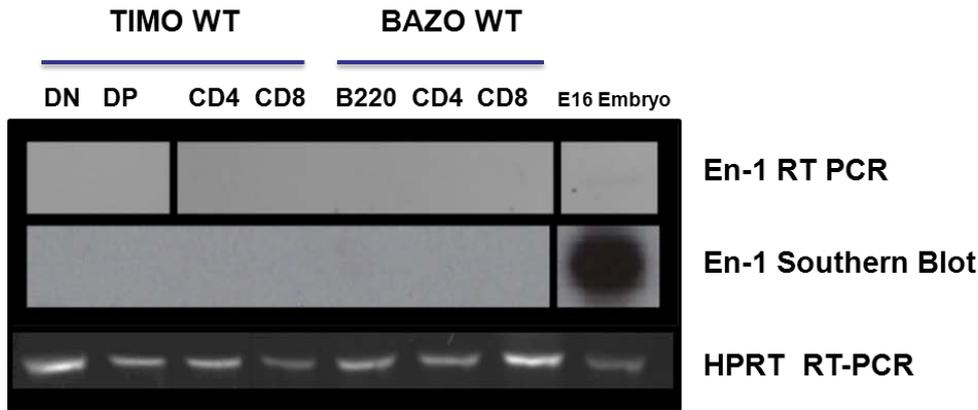


Figura 4- 11. *En1* no se expresa en el desarrollo de los linfocitos T. En el primer carril, RT-PCR de *mEn1*, en el segundo carril se muestra la hibridación del primer carril con una sonda dirigida contra *mEn1* mediante la técnica de southern blot, y en el tercer carril se muestran las actinas de las mismas muestras como control.

Como podemos observar en la figura 4-11 no se detectó expresión de *En1* en las diferentes poblaciones analizadas mediante PCR. Para confirmar la ausencia de expresión de este homólogo se clonó y secuenció el producto obtenido en dicha PCR del control positivo de cabeza embrionaria de ratón (E16). Una vez verificado que la secuencia corresponde a *mEn1* se utilizó como sonda en la técnica de southern blot contra los productos de PCR anteriores, confirmándose que *En1* no juega un papel en el desarrollo de los linfocitos T.

4.3 Estudio del Papel de Engrailed 2 en el Desarrollo Hematopoyético

4.3.1 Estudio de la Hematopoyesis en Ratones *En2*^{-/-}

Un vez confirmada la expresión de *En2* tanto en los linfocitos T humanos como murinos, se procedió a continuación a estudiar la función de *En2* en la hematopoyesis. Para los estudios relacionados con la pérdida de función de *En2* se utilizó un modelo murino que se desarrolló en el laboratorio de Alexandra Joyner y se publicó en 1991 (Joyner et al., 1991). El modelo en concreto se nombró inicialmente como *En2HD* (por *homeobox deletion* o *En2*^{-/-} en adelante) y el nombre del alelo mutante según la nomenclatura internacional es *En2*^{m¹Aj}, en el cual 300 bp del intrón y 700 bp del segundo exón (correspondiente al homeodominio y al extremo C-terminal de *En2*) fueron

sustituidos por una secuencia que incluía el promotor de la β -actina humana seguida de la resistencia a neomicina (Figura 4-12) Dicha eliminación del dominio homeobox elimina la función de unión al DNA de la proteína y genera por tanto un alelo nulo, lo cual ha sido confirmado en numerosas publicaciones que han caracterizado el fenotipo (fundamentalmente en el sistema nervioso central) de este ratón, desde su generación en 1991.

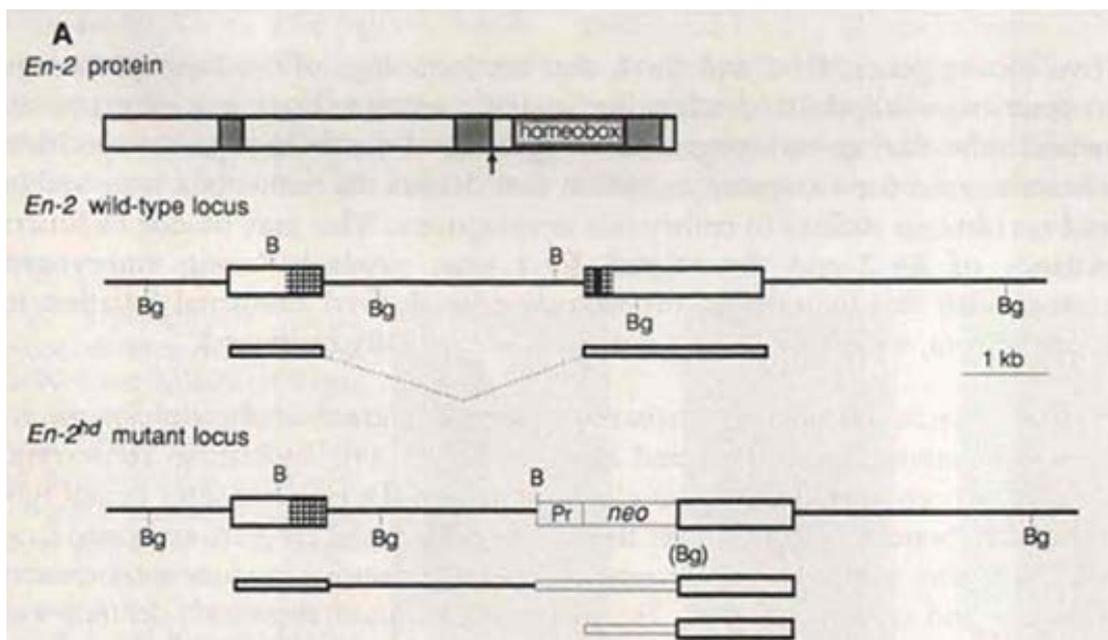


Figura 4- 12. Estructura de la proteína En2 y el loci wild type y mutado. La imagen de la proteína esquematiza la presencia de los 4 dominios conservados de En2, en donde los 60 aminoácidos correspondientes al dominio homeobox están indicados. La flecha indica la posición del intrón. Tanto el locus wild type como el locus mutado se muestran los exones como cajas en donde la parte rayada indica la secuencia codificante. Dentro de ésta, en el 2º exón del locus WT se identifica la secuencia codificante para el homeobox mediante una barra negra. En el locus mutado dicha parte ha sido intercambiada por el gen de resistencia a la neomicina (neo) precedido de la región promotora (Pr) de la β -actina humana. Tomada de Joyner, A. L., Herrup, K., et al. (1991).

Durante el desarrollo embrionario la pérdida funcional de *En2* no causa problemas, debido fundamentalmente a la redundancia funcional entre *En1* y *En2*, y sólo en aquellos órganos en donde sólo *En2* sea expresado sí aparecen anomalías, como ocurre en el cerebelo adulto. Los ratones *En2*^{-/-} presentaban alteraciones morfológicas en el cerebelo al compararlos con los ratones heterocigotos y wild type. A pesar de ello, no tienen graves problemas de ataxia ni de coordinación de movimientos en diversas situaciones como la natación o balanceo. Hasta el momento no hay, según la información de que nosotros

disponemos, estudios publicados en los que se analice el desarrollo hematopoyético de los ratones *En2*^{-/-}.

4.3.1.1 Los ratones *En2*^{-/-} presentan un timo de menor tamaño

En la figura 4-13 se muestran las diferencias observadas respecto al tamaño del timo, órgano que fue pesado sistemáticamente en el momento de su disección. La existencia de dimorfismo sexual respecto al tamaño del órgano, que a su vez varía entre las diferentes cepas de ratones (Dunn, 1954; Peleg and Nesbitt, 1984), junto a la variación del tamaño del timo con la edad, hace que los grupos a comparar deban de ser muy homogéneos en cuanto a sexo y edad. De esta manera, se pueden apreciar diferencias consistentes en el tamaño del timo entre los dos tipos de ratones.

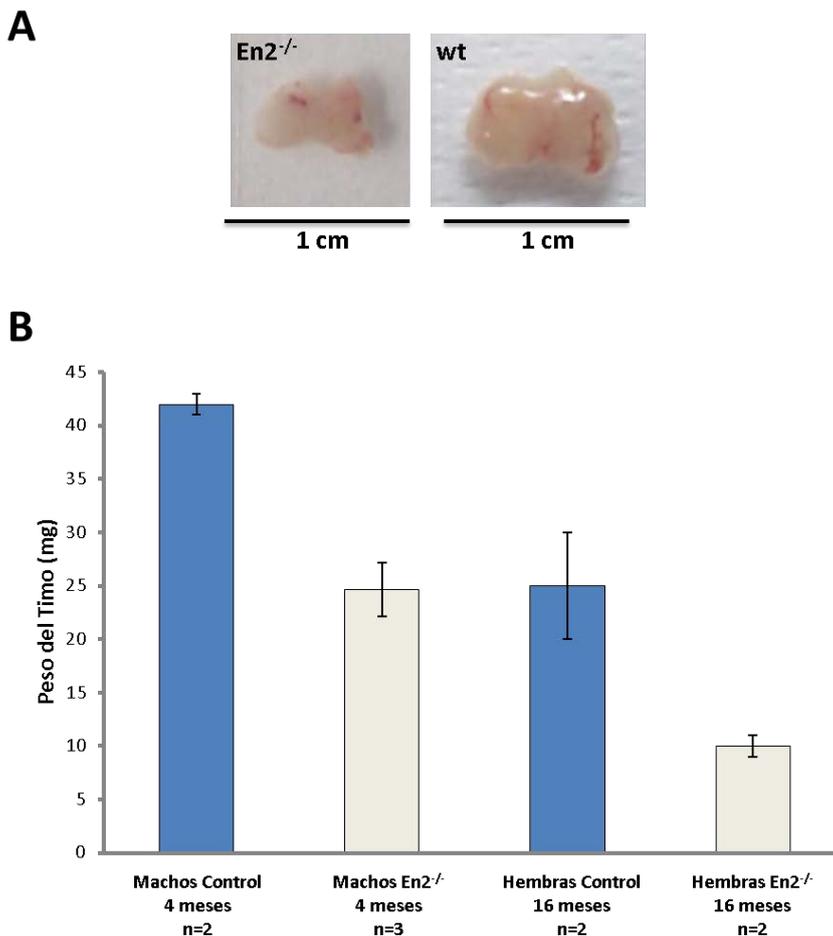


Figura 4- 13. Disminución del peso del timo en los ratones *En2*^{-/-}. A) Se muestran dos fotos representativas de los timos de ratones machos control y *En2*^{-/-} de la misma edad (4 meses), al mismo aumento, en las que se puede apreciar el menor tamaño del timo en los animales mutantes. B) Resumen gráfico de las diferencias en los pesos de los timos entre ratones control y ratones *En2*^{-/-}, tanto machos como hembras y en función de la edad. Las barras representan la desviación estándar.

4.3.1.2 Ausencia de alteraciones visibles en el desarrollo hematopoyético en ratones *En2*^{-/-} durante la embriogénesis a día E16.5

Para estos estudios se usaron hembras jóvenes (6-8 semanas) preñadas que se encontraban en el día 16 postcoital (estadio E16.5) y se analizaron todos los embriones de la camada, genotipándose mediante PCR cada uno de los embriones. Los órganos analizados fueron el timo y el hígado fetal, que es en ese estadio el órgano hematopoyético fundamental. Los resultados del estudio se muestran en las Figuras 4-14 y 4-15.

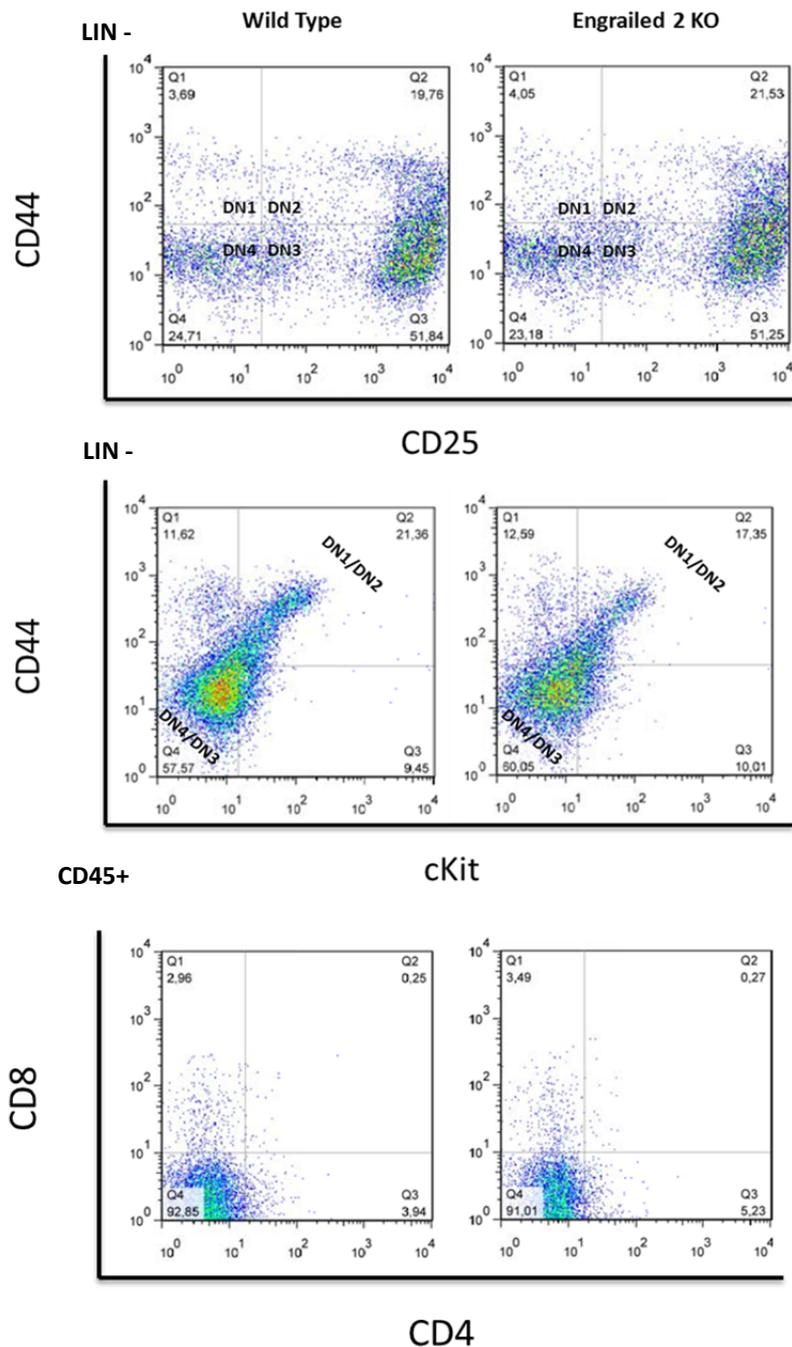


Figura 4- 15 Análisis de poblaciones tímicas durante el desarrollo embrionario del ratón *En2*^{-/-} a día E16.5. Tanto en la representación de CD44 frente a CD25 como en la de cKit frente a CD44, no se observan anomalías hematopoyéticas durante el desarrollo embrionario de los timocitos en las distintas etapas de los dobles negativos (DN). Para el coctel de linaje se usó anti-B220, anti-CD4, anti-CD8, anti-Mac1, y anti-Gr1. Tampoco se observan diferencias en las poblaciones usando los marcadores CD4 y CD8.

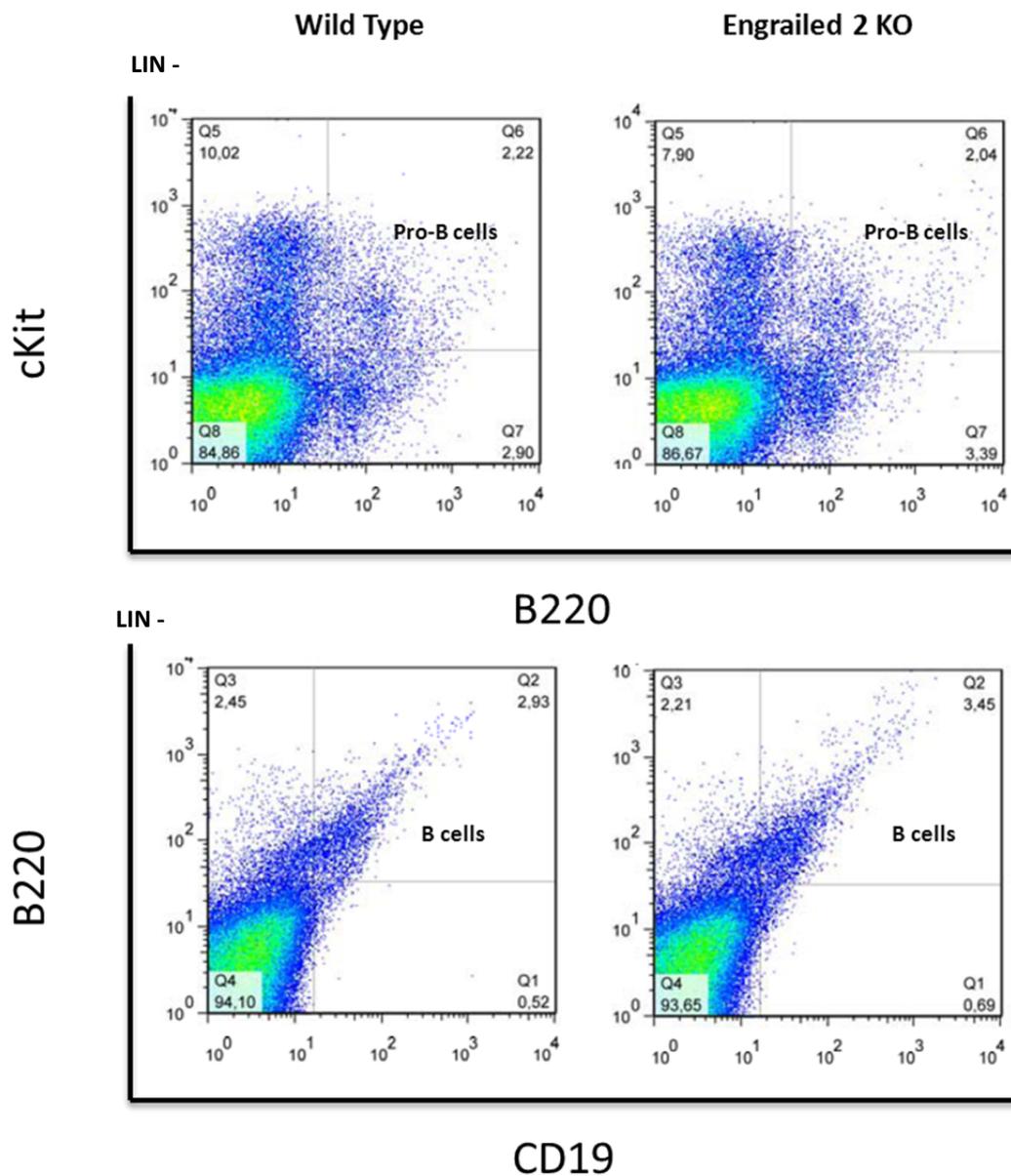


Figura 4- 16 Análisis de poblaciones en hígado fetal durante el desarrollo embrionario del ratón *En2*^{-/-}. En la parte superior se ha usado una tinción B220 vs cKit, en donde no se observan anomalías hematopoyéticas durante el desarrollo embrionario de la serie linfocita B a nivel de linfocitos pro-B, y tampoco en aquellas poblaciones más maduras B220⁺ CD19⁺ representadas en la parte inferior.

De los análisis de citometría realizados por lo tanto podemos concluir que los ratones *En2*^{-/-} presentan un desarrollo aparentemente normal para las poblaciones estudiadas durante la etapa embrionaria.

4.3.1.3 Ausencia de alteraciones visibles en el desarrollo hematopoyético en ratones $En2^{-/-}$ adultos.

Para el análisis mediante citometría de flujo se sacrificaron ratones jóvenes (6-8 semanas) junto con ratones de tipo silvestre de la misma edad, analizándose diferentes tejidos hematopoyéticos como son: timo, bazo, nódulos linfáticos, médula ósea y sangre periférica. Resultados representativos de los análisis realizados los ratones $En2^{-/-}$ se muestran en las figuras 4-16 a 4-20.

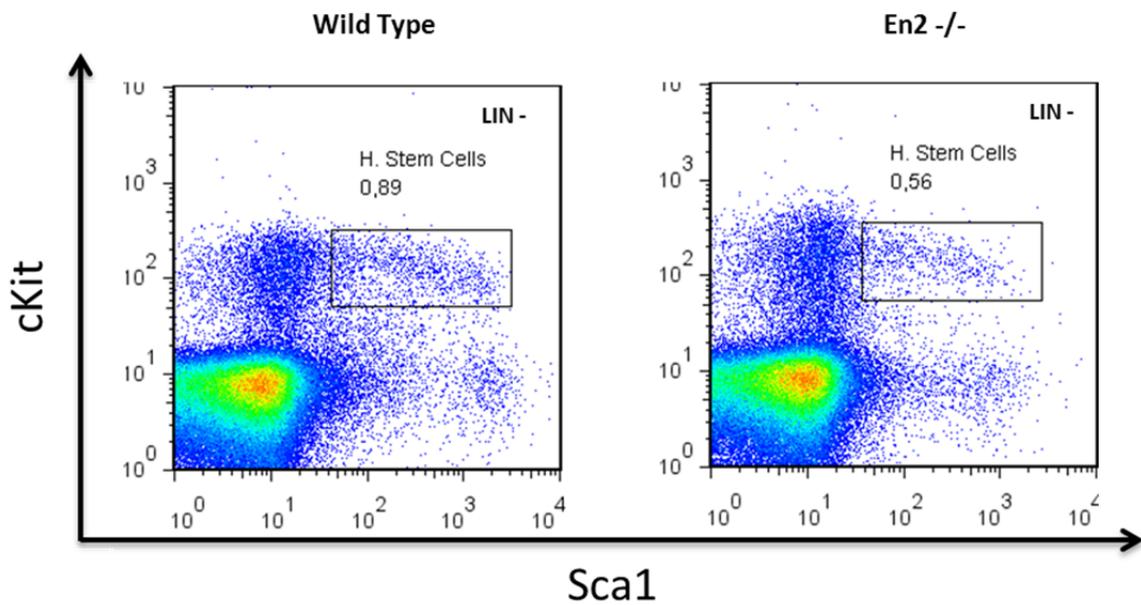


Figura 4- 17. Análisis mediante citometría de flujo de las células madre hematopoyéticas (LSK) en ratones $En2^{-/-}$. Se representan como Sca1⁺ cKit⁺ dentro de la población Lin⁻. (Lin: anti-B220, anti-CD19, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD3e, anti-ter119, anti-Mac1, anti-Gr1).

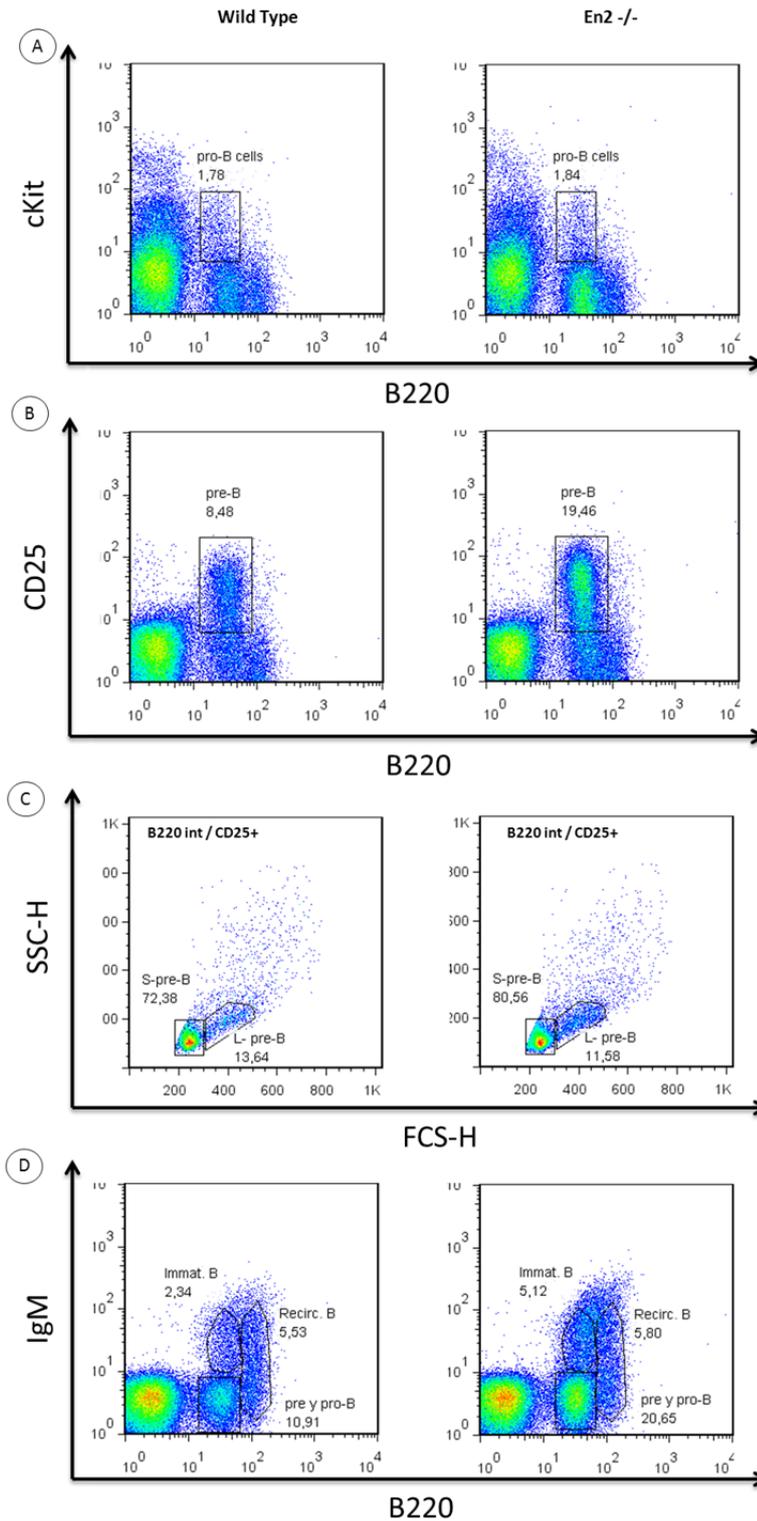


Figura 4- 18. Análisis mediante citometría de flujo del desarrollo del linaje B en médula ósea de ratones *En2*^{-/-}. A) Estadio pro-B (B220^{int} cKit⁺). B) Estadio pre-B (B220^{int} IgM⁻ CD25⁺). C) Se muestra la diferenciación entre células "large" pre-B y "small" pre-B dentro de la población B220^{int} IgM⁻ CD25⁺ mostrada en el panel B. D) Se muestra el conjunto de las poblaciones pro- y pre-B (B220^{int} IgM⁻), los linfocitos inmaduros (B220^{int} IgM⁺) y la población de linfocitos B recirculantes (B220^{HIGH} IgM^{low}).

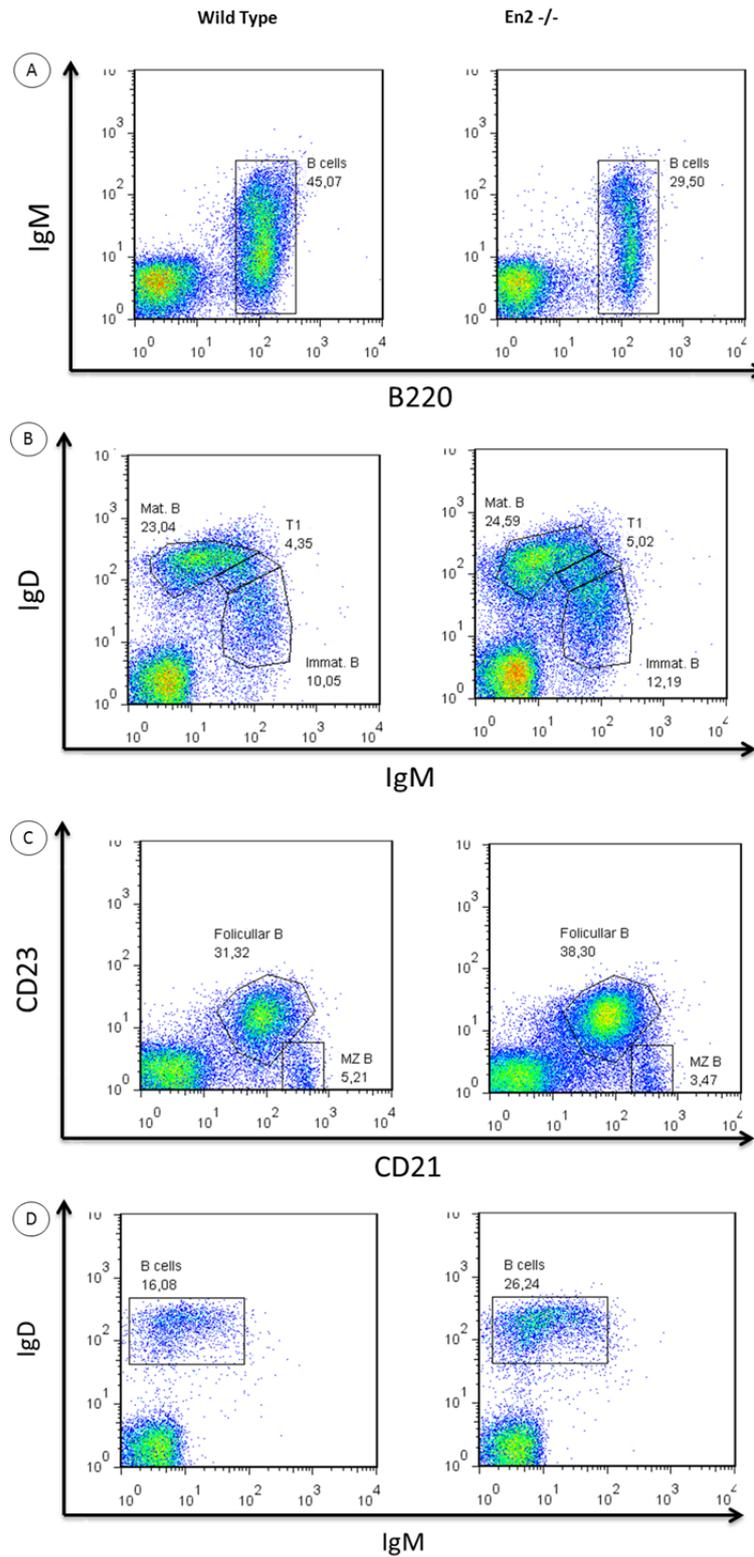


Figura 4- 19. Análisis mediante citometría de flujo del linaje B en la periferia de ratones *En2*^{-/-}. A) Linfocitos B presentes en sangre periférica (B220⁺ IgM⁺). B) Estadios inmaduros (IgM⁺ IgD^{low}) y maduros (IgM^{low} IgD⁺) de linfocitos B presentes en el bazo. C) Linfocitos foliculares (CD21^{low} CD23⁺) y de la zona marginal (CD21⁺ CD23^{low/-}) del bazo. D) Linfocitos B maduros presentes en nódulos linfáticos.

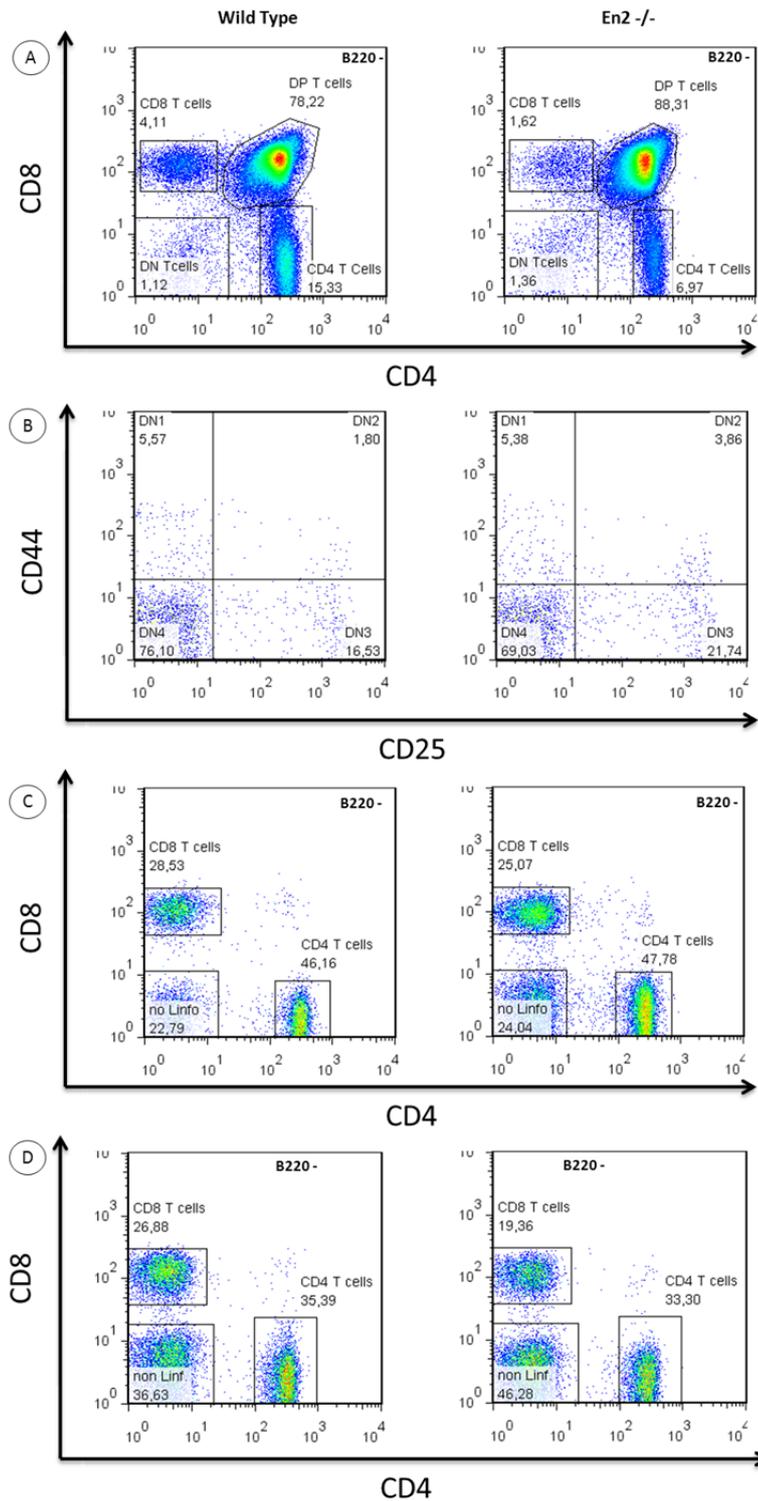


Figura 4- 20. Análisis mediante citometría de flujo del linaje T en el timo y en la periferia de ratones *En2*^{-/-}. A) Se representan en las gráficas de CD4 frente a CD8 (previamente seleccionados como B220⁻) los linfocitos inmaduros DN (CD4⁻ CD8⁻) y DP (CD4⁺ CD8⁺), junto con las poblaciones maduras de SP-CD4 y SP-CD8. B) Se muestran las diferentes etapas de desarrollo dentro del estadio de DN en el timo, diferenciándose en DN1, DN2, DN3, y DN4 representándose como CD25 frente a CD44 dentro de la población Lin⁻, usando para ello un coctel de linaje (Lin⁻; anti-B220, anti-CD4, anti-CD8, anti-Mac1, y anti-Gr1). C) y D) muestran la distribución de linfocitos T maduros en bazo y sangre periférica respectivamente.

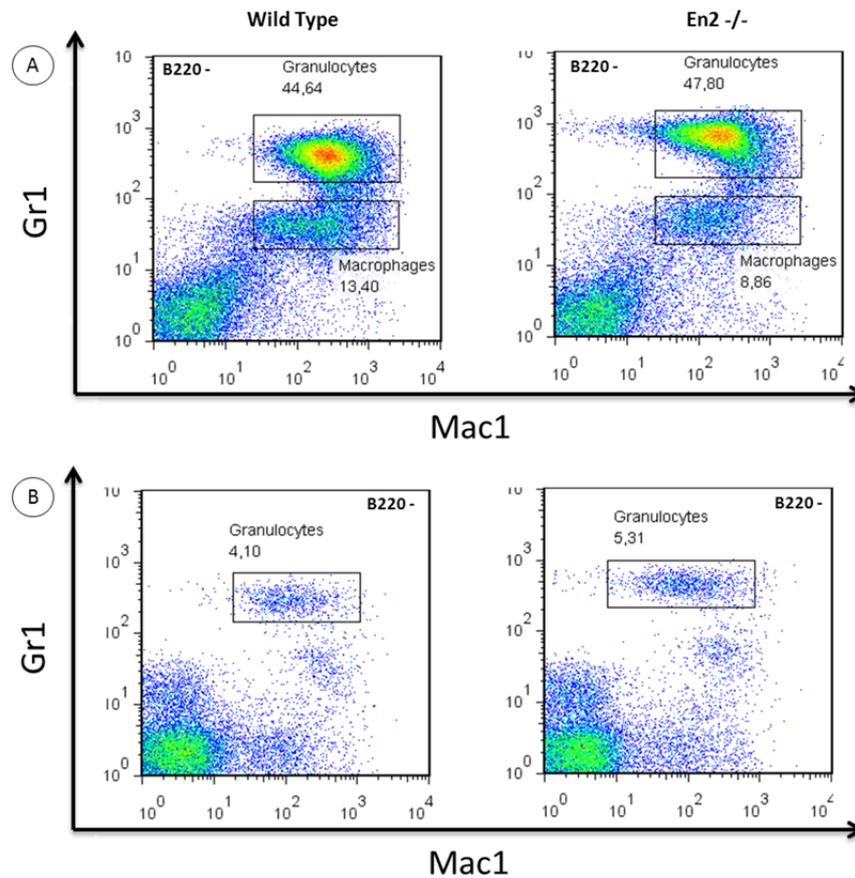


Figura 4- 21. Análisis mediante citometría de flujo de células mieloides en ratones *En2*^{-/-}. A) Se muestran las poblaciones de granulocitos (Mac1⁺ Gr1⁺) y macrófagos (Mac1⁺ Gr1^{int}) presentes en la médula ósea de ratones *En2*^{-/-}. B) Se observa la población granulocítica en bazo.

Los resultados mostrados parecen sugerir que no se detectan alteraciones significativas en la distribución de las distintas poblaciones hematopoyéticas analizadas en los ratones *En2*^{-/-}.

4.3.2 Estudios funcionales de los linfocitos en ratones *En2*^{-/-}

4.3.2.1 Formación normal de centros germinales en ratones *En2*^{-/-} tras inmunización con un estímulo dependiente de linfocitos T

Con el fin de estudiar si los linfocitos T de los ratones *En2*^{-/-} son funcionales para la formación de una respuesta inmune, se analizó en primer lugar la capacidad de inducir la formación de linfocitos B de centro germinal en respuesta a un estímulo antigénico dependiente de linfocitos T. Para ello, se inyectaron eritrocitos de cordero intraperitonealmente en ratones *En2*^{-/-} y en ratones control, y se analizaron por citometría

los esplenocitos a los diez días de la inyección (ver apartado 3.1.4.2.1). Los datos que se recogen en la Figura 4-21 indican que los ratones *En2*^{-/-} son capaces de reaccionar frente los eritrocitos de cordero formando centros germinales evidentes por citometría de flujo (Fas⁺B220⁺ y Fas⁺GL7⁺) a los 10 días de la inyección.

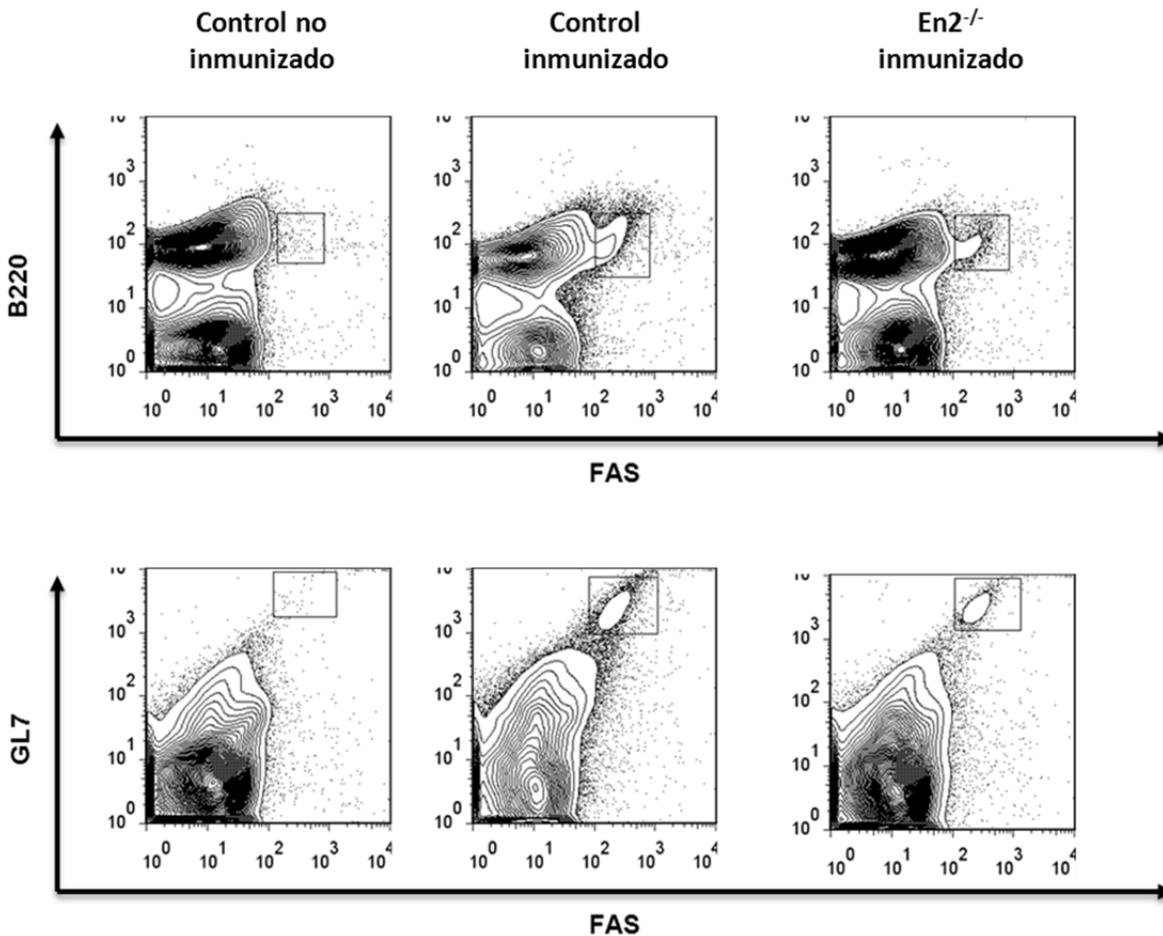


Figura 4- 22. Formación de centros germinales por reacción frente a eritrocitos de cordero inyectados intraperitonealmente. La formación de reacción de centros germinal, detectable por la aparición de células B Fas⁺, GL7⁺, tiene lugar en ratones *En2*^{-/-} (3ª columna) al igual que los ratones control inmunizados (columna central). Se muestra también un control sin inmunizar.

4.3.2.2 *La producción de citoquinas específicas de linfocitos T en esplenocitos activados presenta niveles prácticamente normales en los ratones En2^{-/-}*

Para evaluar la capacidad de respuesta funcional de los linfocitos T se evaluó la capacidad de producción de citoquinas específicas tras la activación de los mismos. Para la activación de los linfocitos T se partió de esplenocitos que fueron incubados con un

inductor químico (PMA e ionomicina) que activa linfocitos *in vitro*, junto con un inhibidor del transporte proteínico en el aparato de Golgi (Brefeldina A) (ver apartado 3.1.4.2.2). Posteriormente se detectó la acumulación de las citoquinas mediante citometría de flujo por tinción intracelular, utilizando anticuerpos específicos contra las citoquinas interleukina-2 (IL-2), interferón gamma (INF γ), y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), junto con anticuerpos de superficie de linaje; anti-B220, anti-CD4, y anti-CD8. Los resultados, que se recogen en las Figuras 4-22 y 4-23, demuestran que no existen grandes diferencias en la capacidad de respuesta de los linfocitos T mediada por las citoquinas estudiadas.

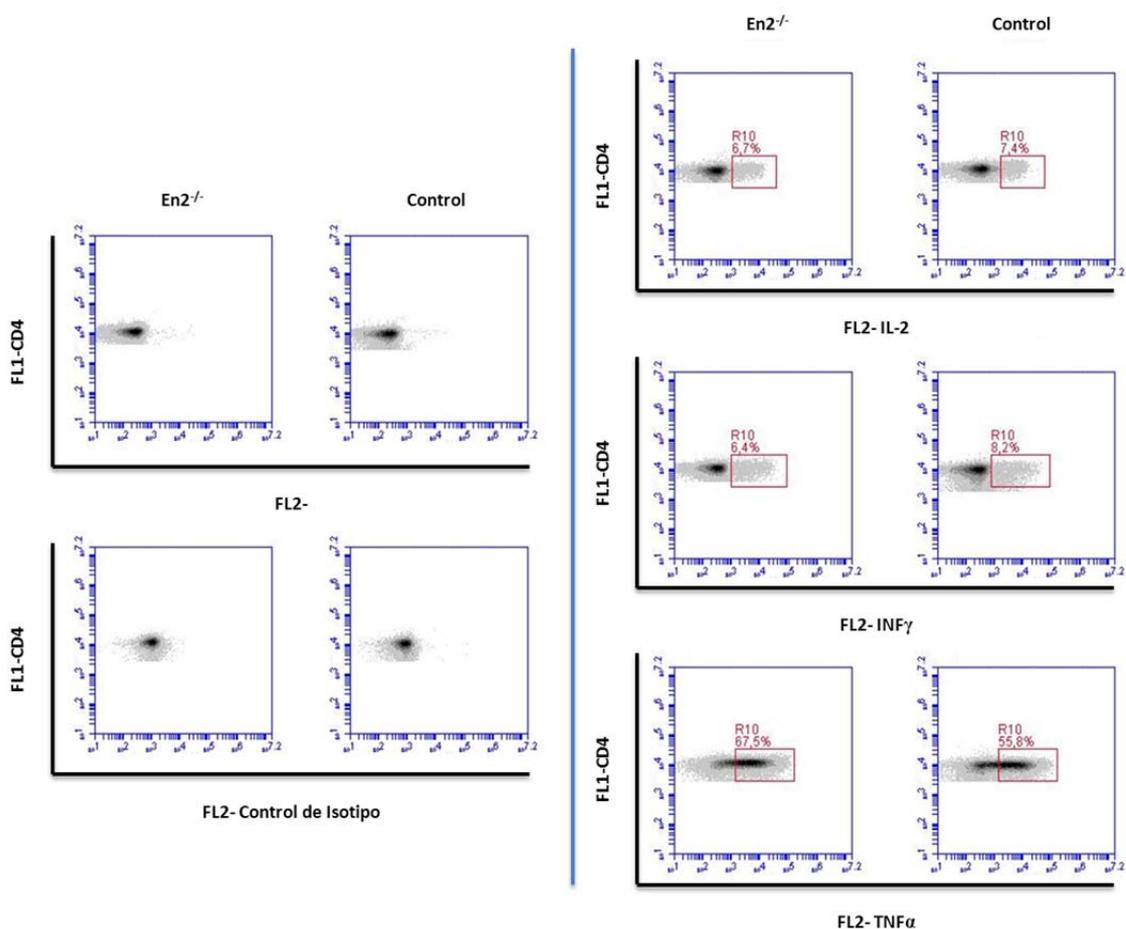


Figura 4- 23. Producción de diferentes citoquinas tras la activación de linfocitos CD4-SP mediante PMA e inomicina. En el panel de la izquierda se observan los controles de las tinciones intracelulares en ratones *En2^{-/-}* y ratones control. Control negativo (arriba), y marcados con un anticuerpo que actúa como control de isotipo (abajo). En el panel de la derecha se observan los porcentajes de linfocitos T CD4 productores de citoquinas. Las tinciones se realizaron con anticuerpos anti-IL2(PE), anti-INF γ (PE), anti-TNF α (PE), y anti-CD4 (FITC)

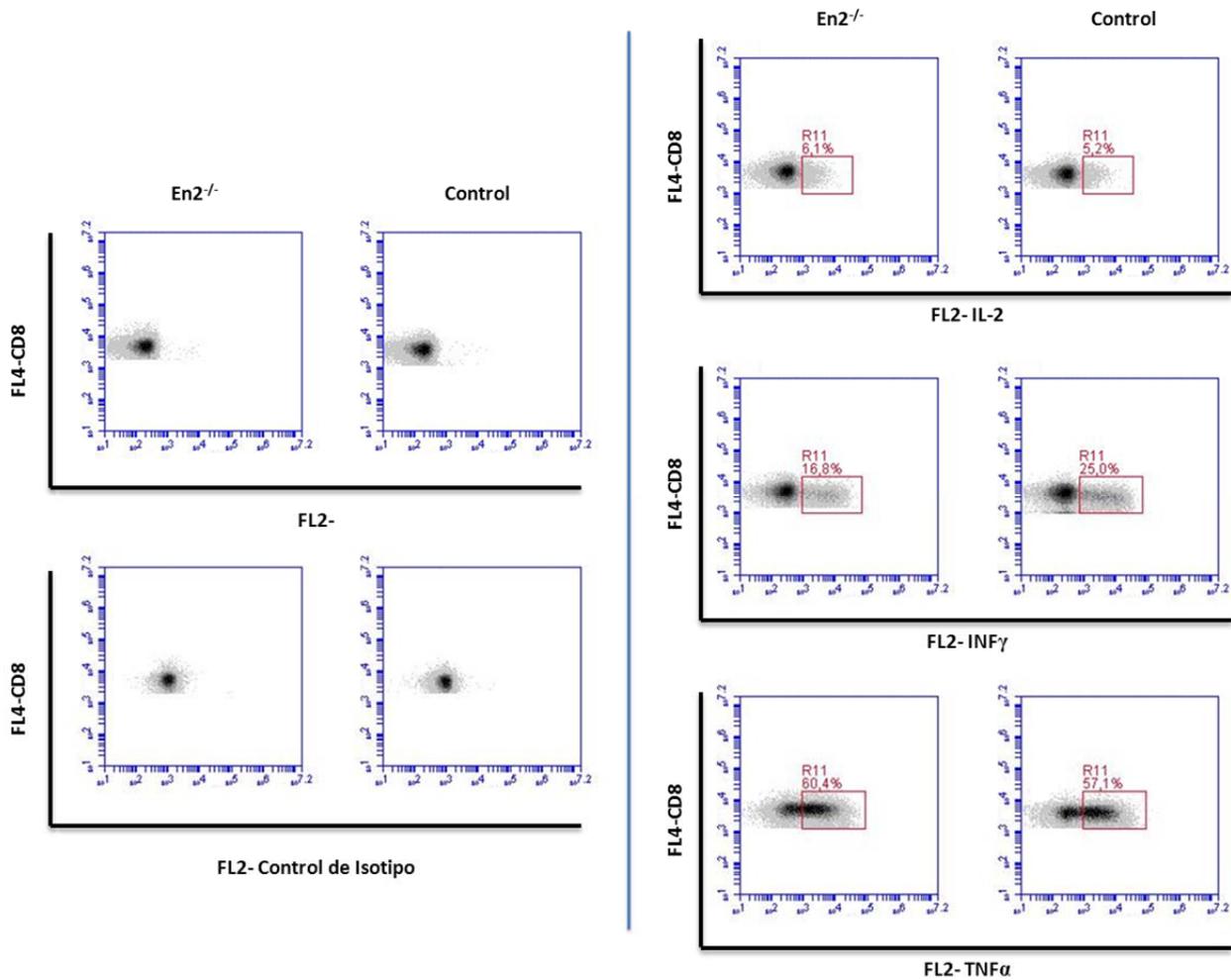


Figura 4- 24. Producción de diferentes citoquinas tras la activación de linfocitos CD8-SP mediante PMA e inomicina. En el panel de la izquierda se observan los controles de las tinciones intracelulares en ratones *En2*^{-/-} y ratones control. Control negativo (arriba), y marcados con un anticuerpo que actúa como control de isotipo (abajo). En el panel de la derecha se observan los porcentajes de linfocitos T CD8 productores de citoquinas. Las tinciones se realizaron con anticuerpos anti-IL2(PE), anti-INF γ (PE), anti-TNF α (PE), y anti-CD8 (APC)

4.3.3 Estudio del mecanismo molecular de acción de *en2* en el desarrollo linfocitario T

4.3.3.1 *Los linfocitos T de ratones $En2^{-/-}$ presentan alteraciones en su patrón de expresión génica.*

Con el fin de conocer el papel que *En2* pueda estar desempeñando a nivel molecular durante el desarrollo y/o función de los linfocitos T, se procedió a comparar mediante microarrays de cDNA el transcriptoma de dos de las poblaciones en que se expresa *En2*, entre ratones WT y ratones *En2^{-/-}*. Para ello se purificaron mediante citometría de flujo las poblaciones de DP del timo y de linfocitos T CD8⁺ del bazo, tanto de ratones controles como experimentales, y se procesaron tal y como se describe en el apartado 3.1.5. Un esquema de los resultados obtenidos para cada una de las poblaciones se muestra en las Figuras 4-24 a 4-28. Los resultados muestran que existen diferencias consistentes en los patrones de expresión génica en los linfocitos T en ausencia o en presencia de *En2*.

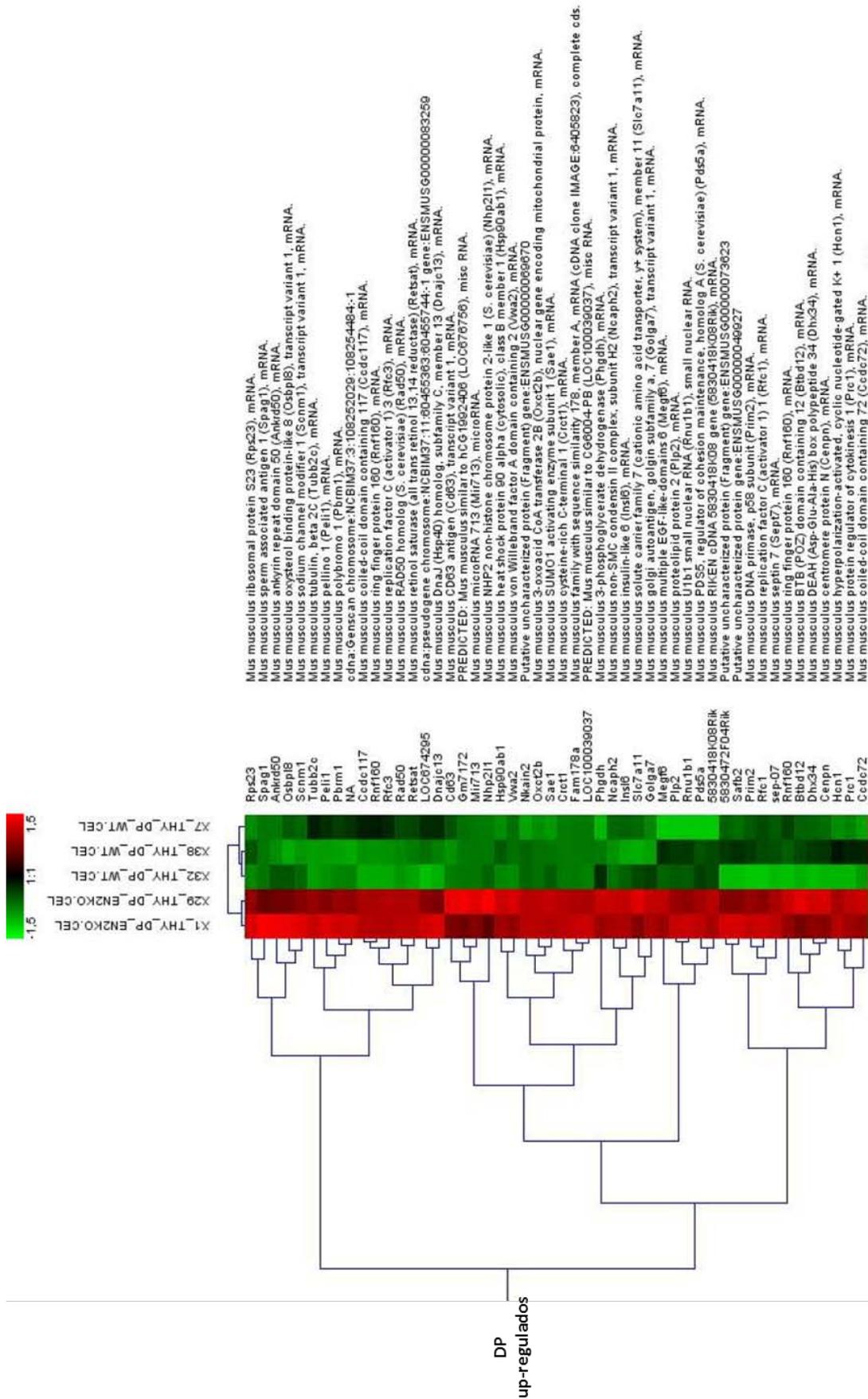


Figura 4- 25. Genes up-regulados en timocitos DP de ratones *En2^{-/-}*.

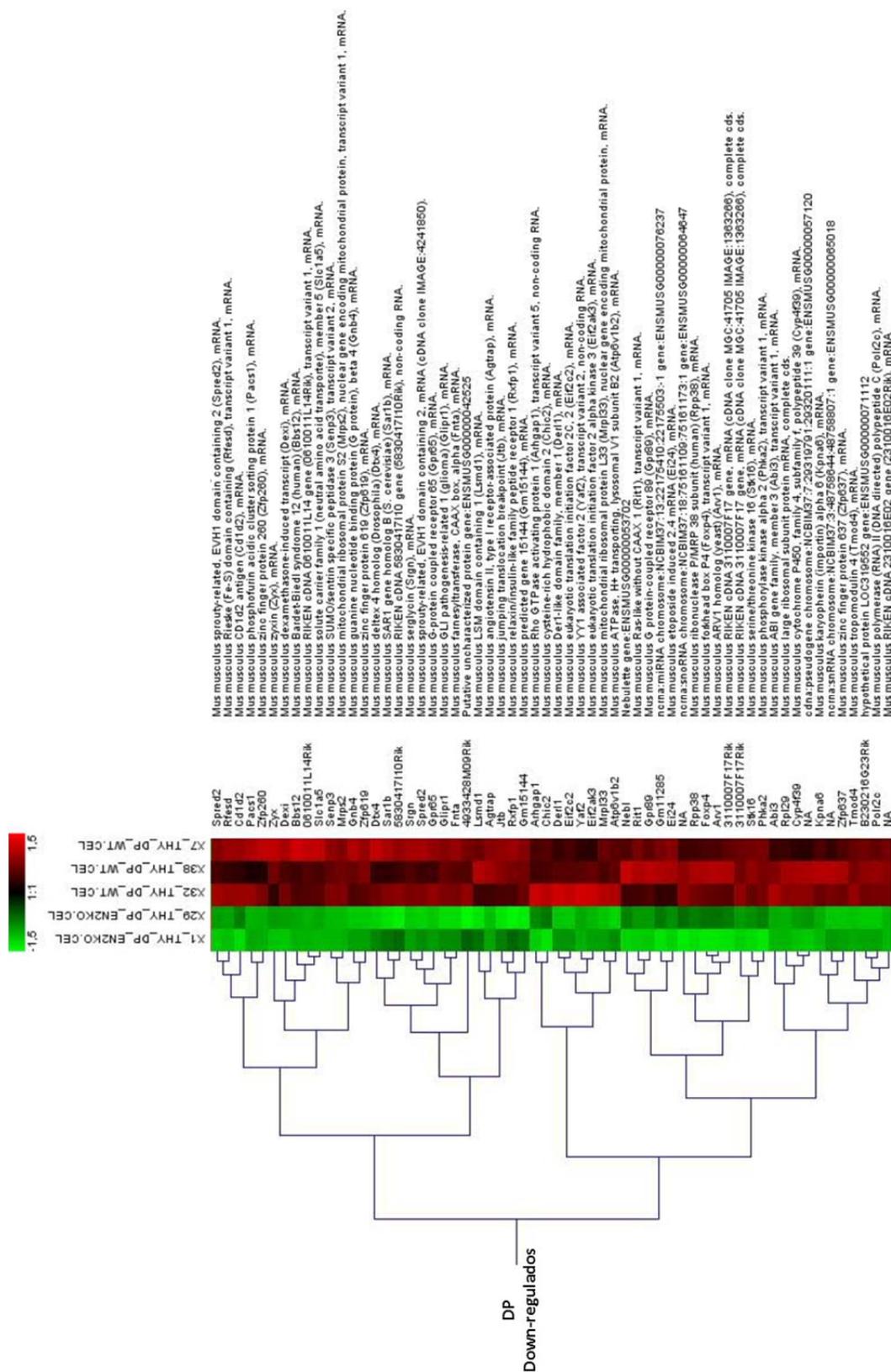


Figura 4- 26. Genes Down-regulados en timocitos DP de ratones *En2^{-/-}*.

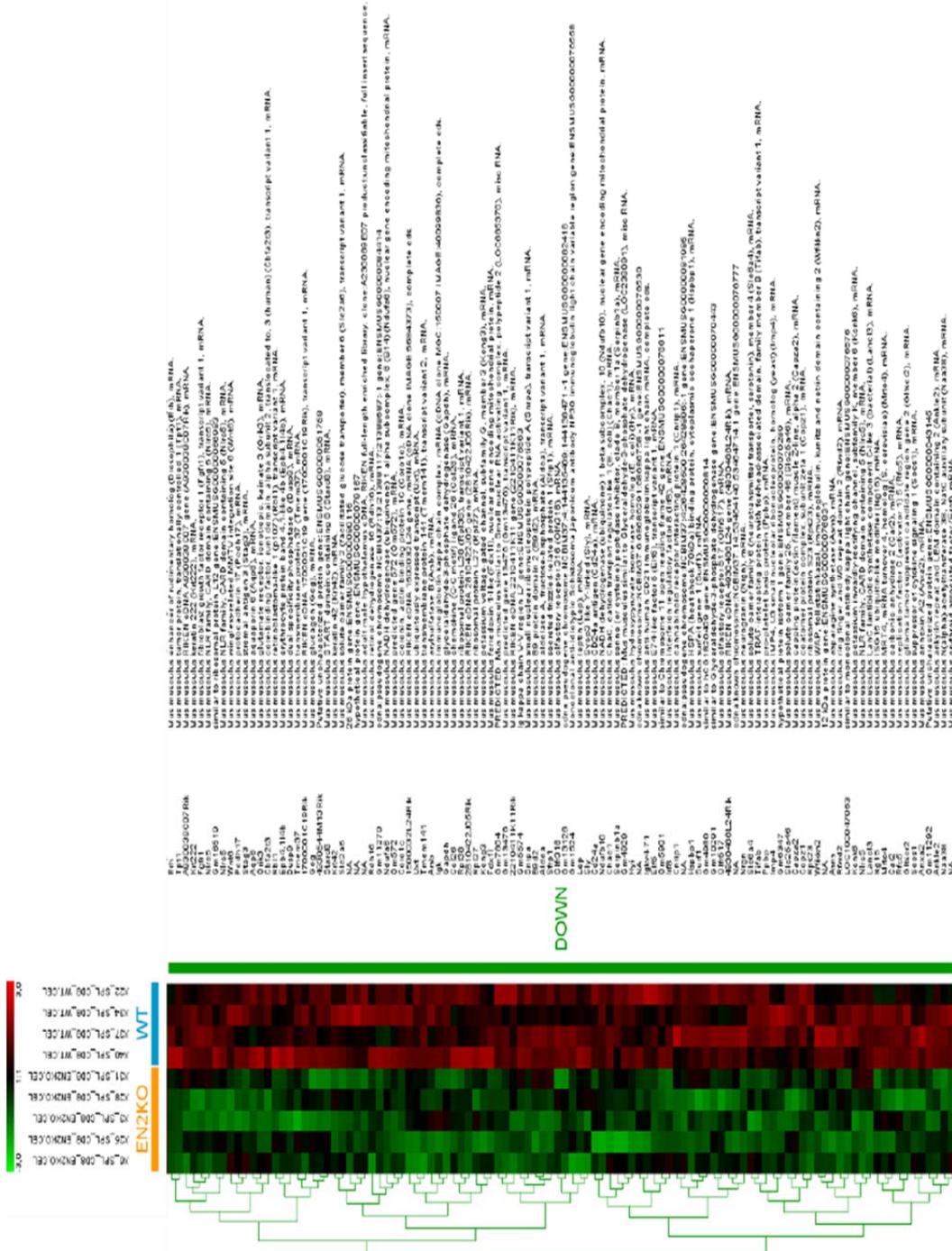


Figura 4- 28. Genes down-regulados en esplenocitos CD8⁺ de ratones *En2^{-/-}*.

La lista de genes identificados en los arrays se muestra a continuación en la Figura 4-28:

Up-Regulados		Down-Regulados	
CD8	DP	CD8	DP
<i>Aslx1</i>	<i>btbd12</i> (<i>Slx4</i>)	<i>aldoa</i>	<i>abi3</i>
<i>Atf7ip</i>	<i>cd63</i>	<i>anxa2</i>	<i>agtrap</i>
<i>atrx</i>	<i>cenpn</i>	<i>aqp6</i>	<i>arhgap1</i>
<i>Brf2</i>	<i>dhx34</i>	<i>arsb</i>	<i>arv1</i>
<i>cdk2</i>	<i>golga7</i>	<i>asns</i>	<i>atp6v1b2</i>
<i>cep350</i>	<i>hcn1</i>	<i>b9d2</i>	<i>chic2</i>
<i>cflar</i>	<i>hsp90ab1</i>	<i>capza2</i>	<i>cyp4f39</i>
<i>ddb2</i>	<i>insl6</i>	<i>cbfa2t3</i>	<i>derl1</i>
<i>ezh2</i>	<i>Ltn1</i> (<i>rnf160</i>)	<i>ccl26</i>	<i>dtx4</i>
<i>fam3c</i>	<i>ncaph2</i>	<i>cd24a</i>	<i>ei24</i>
<i>fbxl17</i>	<i>nhp2l1</i>	<i>chac1</i>	<i>EIF2AK3</i>
<i>grk4</i>	<i>nkain2</i>	<i>cnrip1</i>	<i>EIF2C2</i>
<i>hint3</i>	<i>osbp18</i>	<i>copz1</i>	<i>fnta</i>
<i>hist1h4b</i>	<i>oxct2</i>	<i>coro1c</i>	<i>foxp4</i>
<i>Hmgb1</i>	<i>pbrm1</i>	<i>dusp9</i>	<i>glipr1</i>
<i>Ltn1</i> (<i>Rnf160</i>)	<i>pel1</i>	<i>elf5</i>	<i>gnb4</i>
<i>mex3b</i>	<i>phgdh</i>	<i>erh</i>	<i>gpr89</i>
<i>Myo9a</i>	<i>plp2</i>	<i>fgfr1</i>	<i>grp65</i>
<i>ncln</i>	<i>prc1</i>	<i>gapdh</i>	<i>kpna6</i>
<i>nebl</i>	<i>prim2</i>	<i>gltsr2</i>	<i>lsmd1</i>
<i>nek3</i>	<i>psd5a</i>	<i>grik3</i>	<i>mrpl33</i>
<i>olfr68</i>	<i>rad50</i>	<i>hspbp1</i>	<i>mrps2</i>
<i>plk1</i>	<i>rcf3</i>	<i>irf8</i>	<i>nebl</i>
<i>ppm1b</i>	<i>retsat</i>	<i>isg15</i>	<i>pacs1</i>
<i>ralgps1</i>	<i>rfc1</i>	<i>kcng3</i>	<i>phka2</i>
<i>Rpl27A</i>	<i>Rps23</i>	<i>kcnk6</i>	<i>polr2c</i>
<i>Rpl29</i>	<i>sae1</i>	<i>lep</i>	<i>rit1</i>
<i>Rsf1</i>	<i>safb2</i>	<i>mrto4</i>	<i>rpl29</i>
<i>setx</i>	<i>scnm1</i>	<i>naa38</i>	<i>rpp38</i>
<i>Slfn3</i>	<i>slc7a11</i>	<i>ndufa6</i>	<i>rxfp1</i>
<i>Smap1</i>	<i>spag1</i>	<i>ndufb10</i>	<i>sar1b</i>
<i>Socs4</i>	<i>tubbb2</i>	<i>nirc5</i>	<i>senp3</i>
<i>spef2</i>		<i>nirc5</i>	<i>slc1a5</i>
<i>spopl</i>		<i>nrgn</i>	<i>spread2</i>

Up-Regulados		Down-Regulados	
CD8	DP	CD8	DP
<i>tesk2</i>		<i>pcdh17</i>	<i>spred2</i>
<i>tet1</i>		<i>ppbp</i>	<i>srgn</i>
<i>tfdp2</i>		<i>rbl1</i>	<i>stk16</i>
<i>Tmx2</i>		<i>rfc5</i>	<i>tmod4</i>
<i>tnrc6b</i>		<i>rfwd2</i>	<i>yaf2</i>
<i>upf2</i>		<i>rpl27</i>	<i>znf260</i>
<i>xiap</i>		<i>rpl38</i>	<i>znf619</i>
<i>zfp420</i>		<i>rps23</i>	<i>zyx</i>
<i>zfyve21</i>		<i>sfrp1</i>	
<i>zmym3</i>		<i>slc6a4</i>	
		<i>snrpa</i>	
		<i>socs1</i>	
		<i>stag3</i>	
		<i>stard8</i>	
		<i>surf1</i>	
		<i>tifab</i>	
		<i>tmem37</i>	
		<i>wfikkn2</i>	
		<i>wnt6</i>	

Figura 4- 29. Lista de genes identificados como diferencialmente expresados en timocitos DP y esplenocitos CD8⁺ de ratones *En2*^{-/-}.

4.3.4 Generación de un modelo de sobreexpresión de *en2* en linfocitos T

4.3.4.1 Generación del modelo transgénico *Lck-En2*

La segunda aproximación experimental que utilizamos para estudiar la función de *En2* en el sistema hematopoyético fue la generación de un modelo de sobreexpresión de *En2* en linfocitos T. Con este fin se clonó el cDNA de *mEn2* bajo el control del promotor proximal del gen *Lck*, cuya expresión fisiológica está restringida a linfocitos T (Chaffin et al., 1990; Garvin et al., 1990; Lewis et al., 1991; Sartor et al., 1989; Shimizu et al., 2001; Yu et al., 2002). El transgén final contiene además un IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*, que permite la creación de un RNA mensajero bicistrónico) seguido de la versión truncada de la proteína humana CD2 (hCD2t) carente de la cola citoplasmática (y por lo tanto de función) y que sirve como marcador de la expresión ectópica del transgén.

La construcción de los plásmidos requeridos y la generación de los animales se llevaron a cabo según se describe en el apartado 3.1.6. La figura 4-29 muestra el genotipado de los cuatro ratones fundadores obtenidos tras la microinyección

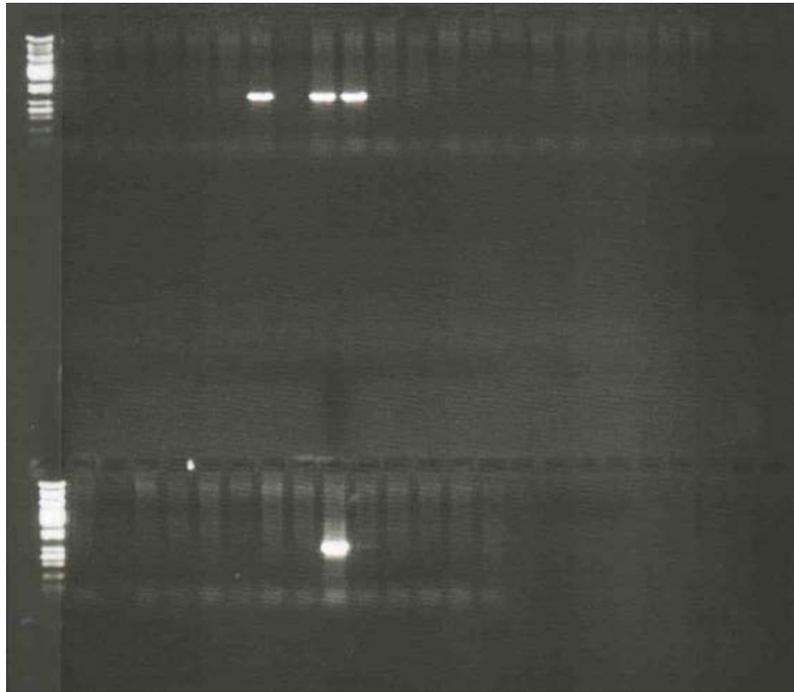


Figura 4- 30. PCR de genotipado de los ratones nacidos tras la microinyección de *LCK En2*. Se pueden ver los 4 fundadores que portan el transgén.

CAPITULO 5

DISCUSIÓN

“La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio”.

Gregorio Marañón

5.1 Metilación diferencial de islas CpG en la progresión de la CML in vivo

En los procesos tumorales confluyen numerosos tipos de alteraciones de la biología celular normal, cuya combinación da como resultado una desregulación de los controles de proliferación y muerte celular (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). No obstante, estas propiedades las comparten tanto los tumores benignos como los malignos (Lazebnik, 2010). Una de las propiedades biológicas que caracterizan los procesos malignos es la alteración de la diferenciación de las células tumorales. Como se ha descrito en la Introducción, la leucemia mieloide crónica es una enfermedad que, por su naturaleza bifásica, constituye un modelo ideal para el estudio de la progresión tumoral, dado que es posible analizar las alteraciones que se producen a medida que ocurre la evolución de la enfermedad, y en qué forma contribuyen a la misma (Melo and Barnes, 2007). La fase crónica se caracteriza por una alteración proliferativa que conlleva la generación de un exceso de células mieloides, fundamentalmente en los órganos hematopoyéticos, pero también en otros tejidos, como por ejemplo el hígado.

Esta alteración proliferativa es directamente dependiente de la actividad quinasa de la proteína de fusión BCR-ABLp210, y puede ser controlada parcialmente mediante terapias dirigidas que atacan específicamente esta actividad (Druker, 2008; Savona and Talpaz, 2008). En la fase crónica no existen alteraciones de la diferenciación celular, por lo cual las células se diferencian y mueren de manera normal. La transición a la crisis blástica surge como consecuencia del daño genético acumulado durante la expansión proliferativa incontrolada, sostenida durante años de fase crónica (Calabretta and Perrotti, 2004). El signo clínico de la crisis blástica es la aparición de un bloqueo en la diferenciación celular en algún linaje hematopoyético que se manifiesta con la aparición de estadios celulares inmaduros (blastos) de dicho linaje. La crisis blástica es la fase final de la evolución tumoral y supone la muerte del paciente (ver Figura 5-1). La mayor parte de las crisis blásticas son mieloides (acumulación de precursores mieloides, en un 70% de los casos) o linfoides B (20-30 % de los casos) (Swerdlow et al., 2008), y sólo en un número muy reducido de casos aparecen crisis blásticas linfoides T (Advani et al., 1991; Cervantes et al., 1991). Dadas estas características, la LMC proporciona un modelo ideal para diseccionar la progresión tumoral, ya que la disociación temporal entre la alteración proliferativa y el bloqueo de la diferenciación nos permite estudiar de forma independiente cuáles pueden ser las causas moleculares de este último fenómeno.

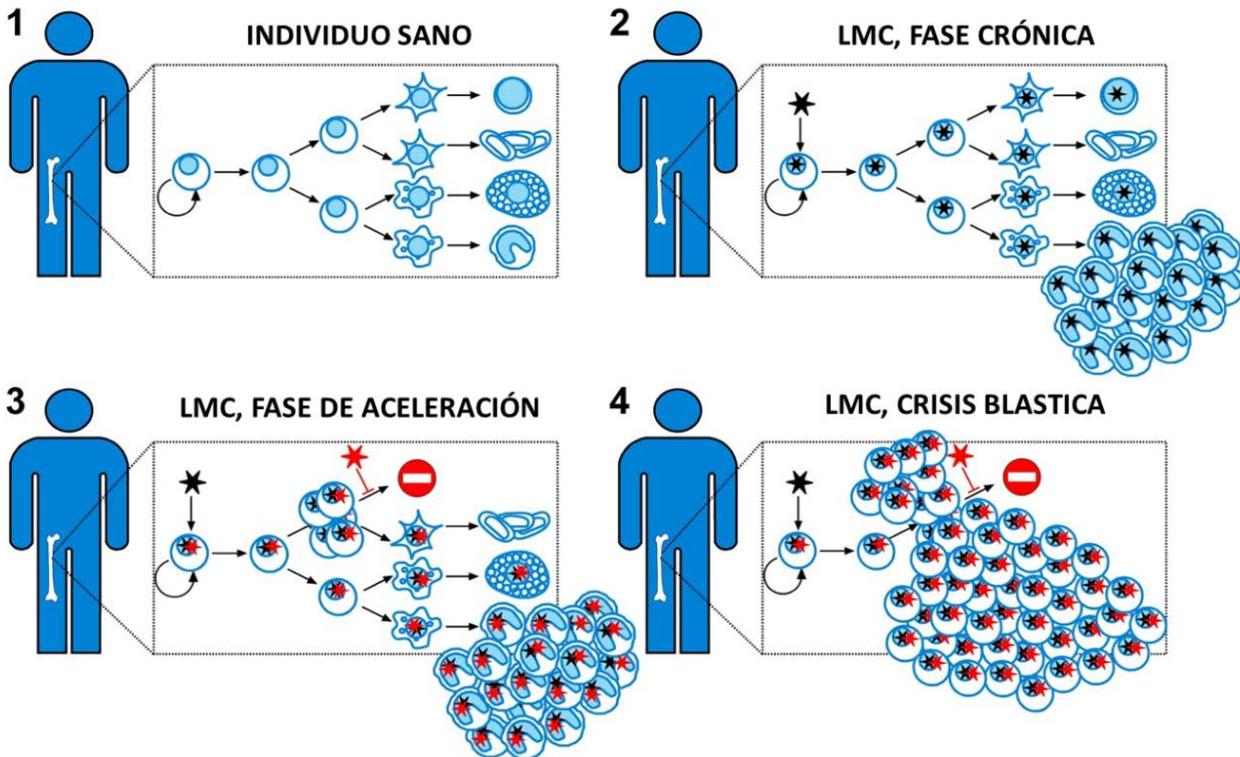


Figura 5- 1. Progreso de la leucemia mieloide crónica. En la fase crónica se produce una desregulación de la maquinaria de la metilación, de forma que se va acumulando metilación aberrante en las islas CpG, lo que, con el tiempo, conduce a la formación de un “knockout epigenético” que inactiva algún factor que es necesario para la diferenciación de algún linaje hematopoyético. Esto causa un bloqueo en dicho linaje y lleva a la crisis blástica con acumulación de células indiferenciadas (ver texto para más detalles).

La hematopoyesis está finamente regulada por el equilibrio entre distintos factores de transcripción y reguladores epigenéticos que determinan los programas de expresión génica de cada uno de los diferentes linajes de la sangre. Cualquier desregulación de esta delicada maquinaria conduce a un desarrollo hematopoyético anormal. Modelos experimentales “knockouts” de ratón han demostrado que la ausencia de distintos factores de transcripción causa un bloqueo en la diferenciación en el primer punto del desarrollo hematopoyético en el que dicho factor es requerido (Orkin, 2000; Orkin and Zon, 2008). Por ello, y en función de todo lo expuesto, es razonable suponer que la crisis blástica surge como consecuencia de la pérdida de expresión de genes (“knockouts” naturales) que son necesarios para la correcta diferenciación hematopoyética, y que esta pérdida de función génica va a ser la responsable de la acumulación de las formas inmaduras que caracterizan la crisis blástica.

De entre los posibles mecanismos moleculares que pueden producir estos “knockouts” naturales que de manera inexorable llevan a la CB, nosotros pensamos que la metilación del DNA es el mejor candidato ya que i) es un proceso biológico que acompaña a la proliferación celular, característica de la fase crónica de la LMC y ii) puede explicar la inactivación sistemática y aleatoria de los 2 alelos de un mismo gen no esencial con el fin de configurar un “knockout” natural que definiría una CB mieloide o linfoide. La hipermetilación de las islas CpG es una de las principales causas de inactivación génica en el proceso tumoral, como ya se ha descrito en la Introducción (Esteller, 2008; Esteller et al., 2002; Rodríguez-Paredes and Esteller, 2011). Este fenómeno ha sido investigado fundamentalmente en el contexto de la inactivación de los principales genes supresores tumorales (*p53*, *p16*, *RB*, *VHL*) en modelos secuenciales de cánceres de origen epitelial, pero también se han descrito ejemplos en tumores hematológicos, incluyendo la leucemia mieloide aguda (Kroeger et al., 2008), la leucemia linfoblástica aguda (Kuang et al., 2008; Takeuchi et al., 2011) y la leucemia linfática crónica (Kanduri et al., 2010; Liu et al., 2006; Rush et al., 2004). Así, por ejemplo, la hipermetilación de *p15/INK4B* se ha descrito tanto en leucemias agudas como en síndromes mielodisplásicos (Cameron et al., 1999; Herman et al., 1997). En leucemias linfoblásticas agudas y en linfoma de Burkitt se ha encontrado que el gen *p73* se silencia transcripcionalmente por metilación de su isla CpG (Corn et al., 1999; Kawano et al., 1999). En el caso de la LMC, numerosos estudios han identificado varios genes cuyo estado de metilación varía con la enfermedad, por ejemplo el gen de la calcitonina (Nelkin et al., 1991), el del receptor de estrógenos (Issa et al., 1996), el gen *HIC1* (Issa et al., 1997), el de la *cadherina-13* (Roman-Gomez et al., 2003), genes del complejo *HOXA* (Strathdee et al., 2007) u otros (Jelinek et al., 2011). Sin embargo, la mayoría de estos estudios parten, o dependen en gran medida, del estudio de líneas celulares de LMC, como la línea K562 (Lozzio and Lozzio, 1975), y es un hecho bien descrito (Antequera et al., 1990) y corroborado por nuestros propios resultados (ver más adelante) que las líneas celulares presentan altos grados de metilación en las islas CpG de todos aquellos genes que no son necesarios para la viabilidad celular en cultivo. Por otra parte, hasta ahora no se ha establecido en ningún caso si las alteraciones descritas tienen algún tipo de consecuencia en el desarrollo de la enfermedad, o son más bien potenciales marcadores de progresión leucémica.

Por el contrario, nuestra hipótesis sugiere que la identificación de los genes metilados en el curso de la progresión de la LMC a la CB podría ser una fuente para identificar i) genes responsables del bloqueo de la diferenciación, determinando el fenotipo

de la CB y, al mismo tiempo, ii) identificar genes importantes para el desarrollo hematopoyético.

En nuestro estudio se han identificado un total de 539 clones de la genoteca de islas CpG, correspondientes a regiones CpG que se han metilado en la progresión a la crisis blástica. Este resultado se corresponde aproximadamente con el cálculo derivado del uso del método de RLGS ("*restriction landmark genomic scanning*", un método basado en la diferente susceptibilidad del DNA genómico frente a determinados enzimas de restricción en función de su estado de metilación) (Costello et al., 2000). Dicho estudio demuestra que una media de 600 islas CpG se metilan de manera aberrante en distintos tipos de tumores humanos, incluyendo tumores en estadios primitivos (Costello et al., 2000). Se ha sugerido que el patrón de metilación, aunque aberrante, no es aleatorio, sino que distintos mecanismos, como la presión selectiva durante el crecimiento tumoral, o distintas susceptibilidades individuales de cada isla CpG pueden influenciar los patrones de metilación tumoral. Por otra parte, también se ha demostrado, en el caso de leucemias mieloides agudas, que la metilación aberrante es consecuencia directa de la desregulación de la maquinaria celular de control del proceso de metilación. De esta forma, parecería que la metilación, en lugar de estar limitada a genes concretos, ocurriría de forma generalizada (Melki et al., 1999). Esta cuestión está directamente relacionada con la naturaleza del mecanismo implicado en la desregulación de la actividad de metilación en tumores, un proceso que es básicamente desconocido. Cada vez está más claro, sin embargo, que la metilación aberrante de islas CpG específicas refleja una pérdida global de la protección que las islas presentan frente a la metilación, lo cual sugeriría un cambio en los factores que regulan los patrones generales de metilación del DNA (Jones and Laird, 1999). Se han descrito incrementos en la expresión de la DNA-metiltransferasa-1 en tumores de colon (el-Deiry et al., 1991), de pulmón (Belinsky et al., 1996) y en leucemias (Melki et al., 1998). Esto sugeriría que una actividad desregulada de las DNA-metiltransferasas, sostenida durante años de desarrollo tumoral, llevaría finalmente a la represión de genes necesarios para la diferenciación. De hecho, la mayor parte de las líneas celulares tumorales analizadas en la bibliografía (Antequera et al., 1990) y en el presente trabajo, presentan una metilación masiva de todos aquellos genes que no son estrictamente necesarios para su supervivencia en cultivo, indicando que la metilación afecta a todo el genoma y sólo la selección del medio determina que ciertos genes permanezcan como no metilados en una población celular. Por lo tanto, la aparición de un pequeño grupo de genes metilados en varios tipos tumorales implicaría que confieren una

cierta ventaja selectiva, más que una mayor tendencia de esas secuencias a ser metiladas. El resto de los genes que parecen metilados de forma inespecífica serían en realidad “ruido de fondo” del incremento inespecífico de la metilación global (Costello et al., 2000).

En el caso de la LMC, los genes que confieren una ventaja selectiva serían aquellos que causan un bloqueo en la diferenciación celular. Este efecto podría ser debido, bien a la pérdida de expresión de un único gen (por ejemplo, un factor de transcripción) o bien a una desregulación del equilibrio entre los niveles de expresión de varios genes que se requieran para un determinado proceso. En este contexto, como discutiremos en detalle a continuación, en este trabajo se han identificado, como genes que se metilan en la progresión de LMC a crisis blástica, varios genes que contienen homeodominios y participan en la regulación de la expresión génica, como son *HOXA1*, *HOXC13* y *EN2*. No sólo esto, sino que la validación usando el método del bisulfito ha confirmado que estos genes se encuentran metilados también en otros tipos de leucemias, como las linfoblásticas agudas y (aunque este resultado era de esperar, como ya se ha mencionado) en líneas celulares leucémicas humanas.

Una vez aislados los 539 clones, se procedió a su secuenciación y análisis, con el fin de identificar los genes con los que están asociados utilizando el programa BLAST (Altschul et al., 1990). 217 clones (36.6% del total) presentaban más de un 98% de homología con regiones localizadas en genes que codifican proteínas de función ya conocida. Estos 217 genes se clasificaron en base a sus funciones, previamente descritas en la bibliografía, definiendo 7 grupos de funciones (un mismo gen puede estar asociado a más de una función) (ver Figura 4.2 y Apéndice I): 1) genes de expresión constitutiva, implicados en funciones metabólicas y estructurales básicas; 2) genes implicados en los procesos de diferenciación celular; 3) genes implicados en los procesos de control de la proliferación o el ciclo celular; 4) reguladores transcripcionales; 5) reguladores epigenéticos; 6) genes que han sido descritos como involucrados en procesos tumorales y 7) otras funciones (por ejemplo, genes con funciones específicas en algún tipo celular diferenciado concreto). El restante 43,4% de las secuencias, correspondientes a los otros 322 clones identificados, aparecen en regiones intergénicas y no parecen estar directamente relacionadas con ningún gen identificado hasta la fecha. En nuestro análisis hemos identificado numerosas secuencias metiladas que no se corresponden con el “centro” de la isla propiamente dicha, sino con regiones adyacentes a la misma, bien situadas en el extremo 5' o en el 3', y de un tamaño medio de 0.5 kb. Un fenómeno similar había sido ya descrito en otro trabajo en el que se usó la columna de HMBD para

separar DNA metilado de adenocarcinomas de pulmón (Shiraishi et al., 1999). En este estudio se encontró que, de más de 1000 clones analizados, sólo 60 contenían fragmentos de más de 0.8kb y muchos de ellos no eran verdaderas islas en función de su punto de fusión. Recientemente se ha descrito, mediante estudios genómicos, la existencia de lo que se han denominado "*CpG island shores*" (literalmente "orillas de las islas CpG"), regiones situadas en los extremos o la periferia de las islas (hasta 2 kb) y en las que la densidad de los pares CpG va decayendo con respecto a la que existe en el centro de la isla (Irizarry et al., 2009). Desde su descripción inicial, se ha comprobado que muchos de los cambios con consecuencias relevantes para el control de la expresión génica, tanto en tumores como en desarrollo normal, se producen en las "CpG island shores". Así, en cáncer de colon se ha encontrado que la mayor parte de la metilación aberrante se concentra en las "CpG island shores" (hasta el 76% de la hipermetilación asociada a la progresión tumoral) (Hansen et al., 2011; Irizarry et al., 2009). Igualmente, en estudios de los cambios epigenéticos que tienen lugar durante el desarrollo hematopoyético normal, se ha descrito recientemente que los patrones de expresión génica se correlacionan mejor con la metilación diferencial al nivel de las "CpG island shores" que de las propias islas CpG (Ji et al., 2010). Otro aspecto interesante es que las regiones metiladas en el proceso tumoral se agrupan en sitios que también están implicados en la regulación epigenética del desarrollo normal y se metilan también de forma diferencial en el proceso de reprogramación hasta pluripotencia, lo cual refuerza el enlace entre metilación-desarrollo-cáncer-reprogramación (Doi et al., 2009; Irizarry et al., 2009).

De esta manera, el análisis global de los datos obtenidos en nuestro screening nos permite concluir que:

- Existe un proceso de metilación diferencial aberrante en la progresión desde la LMC a la crisis blástica, y que este proceso implica tanto islas CpG asociadas con genes como regiones estructural y funcionalmente menos definidas, pero que podrían con gran probabilidad corresponderse a las descritas con "CpG island shores", en consonancia con lo descrito en la bibliografía.

- De entre las islas asociadas a genes concretos, la metilación supondría la pérdida funcional de genes implicados en numerosas categorías, entre ellas la regulación de la diferenciación celular.

- La identificación de determinadas islas metiladas de forma sistemática en la progresión leucémica nos ha permitido identificar genes que, hasta el momento, no habían

sido implicados en los procesos de diferenciación hematopoyética, validando de esta forma la hipótesis y la aproximación experimental empleadas.

5.2 Metilación in vivo de genes homeobox en la progresión de la CML

Las proteínas que contienen dominios homeobox u homeodominios son proteínas capaces de unirse a secuencias específicas de DNA en virtud de esta característica estructural y, en general, son reguladores de la expresión génica con papeles esenciales en los procesos de diferenciación celular y desarrollo global del organismo. Una gran parte de los genes con homeodominios se agrupan en los clusters génicos HOX (4 clusters, de HOXA a HOXD); en humanos, comprenden 39 genes que forman la Clase I de genes con homeodominios (Cillo et al., 2001; Grier et al., 2005) y desempeñan un papel esencial en el establecimiento del patrón anteroposterior del organismo durante la embriogénesis. El resto de los genes que contienen homeodominios (hasta un total de casi 200 genes homeobox en el genoma humano, (Abate-Shen, 2002)) se agrupan dentro de la clase II (divergentes, o no-HOX) y están dispersos a lo largo del genoma (Owens and Hawley, 2002). Prácticamente todos ellos son reguladores transcripcionales, en virtud de su capacidad de unión al DNA. Muchos de los genes homeobox participan en el desarrollo hematopoyético a muy diversos niveles y hay numerosos estudios en los que se demuestra que tanto su sobreexpresión como su pérdida de función juegan papeles muy importantes tanto en desarrollo normal como tumoral (Abramovich and Humphries, 2005; Grier et al., 2005; Owens and Hawley, 2002). En el caso de las leucemias, la desregulación de la actividad de los genes homeobox está implicada en varios ejemplos, bien como el agente directamente causante (proteínas quiméricas de fusión del gen *NUP98* con genes *HOX* como *HOXA9*, *HOXC11*, *HOXC13* o *HOXD13*, ver (Grier et al., 2005)) o bien como un fenómeno secundario relacionado con la biología tumoral (Daser and Rabbitts, 2004; Ernst et al., 2004; Owens and Hawley, 2002; Soulier et al., 2005; Thompson et al., 2003). En este contexto, los genes homeobox podrían comportarse en ciertos contextos como supresores tumorales cuya pérdida de función contribuiría a la progresión del proceso tumoral. La hipermetilación de islas CpG de genes homeobox en leucemias ha sido descrita anteriormente (Strathdee et al., 2007). Por ejemplo, *HOXA4* se hipermetila y su transcripción se silencia en la leucemia linfática crónica (Strathdee et al., 2006). En el caso de la LMC, se ha asociado la hipermetilación de *HOXA4* y *HOXA5* con la progresión de la enfermedad, y la reintroducción de *HOXA5* en células de crisis blástica induce la

reexpresión de marcadores de diferenciación granulocítica (Strathdee et al., 2007). En el presente trabajo hemos identificado y confirmado mediante secuenciación con bisulfito la hipermetilación de la isla CpG del gen *HOXA1* humano. En otros estudios se ha descrito la hipermetilación de *HOXA1* como un fenómeno asociado a la progresión tumoral en cáncer de mama (Selamat et al.; Strathdee et al., 2006), de pulmón (Tsou et al., 2007), de colédoco (Kim et al., 2007) o de estómago (Kang et al., 2008). Nuestros resultados, mostrados en la Figura 4.4, indican que hay un incremento progresivo de la metilación del fragmento de la isla CpG de *HOXA1* analizado, desde las fases crónicas hasta las crisis blásticas. Esta hipermetilación se puede encontrar también en las leucemias linfoblásticas agudas estudiadas y en las líneas celulares leucémicas analizadas, lo cual, con la precaución que se necesita para interpretar los resultados procedentes de líneas celulares, parece sin embargo sugerir que, al igual que ocurre con los ejemplos de genes *HOX* anteriormente descritos, la metilación de *HOXA1* es un proceso que afecta a varios tipos distintos de leucemias.

Otro de los genes homeobox identificados en nuestro estudio es *HOXC13*. El patrón de expresión de *Hoxc13* durante el desarrollo normal del ratón es muy definido y restringido a estructuras concretas, ya que se expresa en la uñas, en la cola, en la vibras, en las papilas filiformes de la lengua y en los folículos pilosos (Godwin and Capecchi, 1998). Es por ello que el fenotipo del ratón knockout para *Hoxc13* es bastante menos grave que el de los genes *HOX* en general (que son letales en la embriogénesis), y los ratones *Hoxc13*^{-/-} presentan alopecia y alteraciones en todas las estructuras, anteriormente descritas, en que se expresa en gen (Godwin and Capecchi, 1998). A pesar del hecho de que, por tanto, *HOXC13* no parece tener tanta relevancia durante el desarrollo normal como otros de los genes *HOX*, sin embargo ha sido directamente implicado en leucemias mieloides agudas, en las que forma parte de la proteína quimérica NUP98-HOXC13 como consecuencia de la translocación t(11;12)(p15;q13) (La Starza et al., 2003; Panagopoulos et al., 2003). El gen *NUP98* forma fusiones quiméricas con varios genes *HOX* (hasta ocho distintos *HOX* han sido descritos, (Argiropoulos and Humphries, 2007)), de forma que estas oncoproteínas contienen, por una parte, el dominio N-terminal de NUP98, lo que les confiere actividad transcripcional por el reclutamiento de los coactivadores CREB-BP y p300 (Kasper et al., 1999), y por otra, el dominio C-terminal de los *HOX*, que incluye el homeodominio y les confiere capacidad de unión al DNA (Argiropoulos and Humphries, 2007). Por tanto, existen evidencias sólidas que enlazan al gen *HOXC13* con el desarrollo hematopoyético aberrante. Nuestros resultados indican que

la pérdida de función de *HOXC13* debida a la hipermetilación de su promotor puede tener un papel en la progresión de la leucemia mieloide crónica. Efectivamente, como se puede apreciar en la Figura 4.6, la isla CpG de *HOXC13* se hipermetila en la transición de la fase crónica a la crisis blástica. Aunque el incremento de la metilación desde los controles sanos hasta las crisis blásticas no es tan dramático como en el caso de *HOXA1* o de *EN2* (Figura 4.8), sin embargo es aún apreciable, y los resultados se ven confirmados por la densa metilación que se observa en el caso de la leucemia linfoblástica aguda T analizada y, una vez más, por la completa metilación de la isla que se aprecia en las cinco distintas líneas celulares leucémicas analizadas.

De esta manera, los resultados del análisis de la metilación de las islas de los genes *HOXA1* y *HOXC13*, además de su propio interés intrínseco nos permiten concluir, a modo de "*proof of principle*", que la aproximación experimental utilizada es adecuada para la identificación de reguladores de la diferenciación hematopoyética normal.

5.3 Papel del gen *Engrailed-2* en el desarrollo hematopoyético

De entre los genes identificados en el screening, hemos decidido centrarnos en el estudio del papel del factor de transcripción *Engrailed-2* en el desarrollo hematopoyético. Una de las razones de esta elección es que *En2* es un gen que nunca se había descrito como implicado en el desarrollo hematopoyético, siendo nuestros resultados los primeros que sugieren su participación en este proceso. Además, es un gen con funciones bien caracterizadas en la regulación de la diferenciación y el desarrollo de otros sistemas del organismo, como discutimos más adelante, y existen numerosas herramientas genéticas y moleculares para su estudio. Finalmente, se da la circunstancia de que, en vertebrados, las principales funciones descritas hasta el momento para *En2* tienen lugar en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), y está cada vez más aceptado (Terskikh et al., 2001) el hecho de que existen numerosas similitudes entre los genes y mecanismos moleculares que participan en el control transcripcional del desarrollo del SNC y los que controlan la diferenciación hematopoyética. No sólo eso, sino que muchos de los genes y proteínas que están relacionados funcionalmente con *En2* en otros organismos o sistemas (por ejemplo, los genes *Wnt*, *Pax* o *Hedgehog*) tienen también funciones importantes descritas en el sistema hematopoyético. Todas estas evidencias hacían bastante plausible el que *Engrailed-2* pudiese participar también en el desarrollo hematopoyético.

Engrailed fue descrito inicialmente hace más de 70 años como una mutación espontánea en *Drosophila melanogaster* que causaba varias alteraciones en el desarrollo de los segmentos torácicos y las alas (Eker, 1929). Posteriormente se identificó como un gen homeobox que es crucial para el establecimiento y el mantenimiento de la compartimentalización durante el desarrollo de la mosca (Morgan, 2006; Simon and Alavian, 2009). El gen *engrailed* está implicado en la formación de patrones (Hidalgo, 1998; Wurst and Bally-Cuif, 2001) y es esencial para el establecimiento de la polaridad anteroposterior de los segmentos en insectos (Ingham and Martinez Arias, 1992). Además, participa en neurogénesis (Condrón et al., 1994) y en diferenciación neuronal (Marie et al., 2000). *Engrailed* presenta dos homólogos en mamíferos, *Engrailed-1* y *Engrailed-2*, clonados por su similitud con el gen de mosca, y que son muy importantes para el desarrollo del encéfalo y las extremidades. En el desarrollo embrionario temprano de ratón, a partir del día 8.5 poscoito, *En1* y *En2* se expresan en dominios restringidos en la zona de frontera entre el prosencéfalo y el mesencéfalo, que es la zona en la que surgirá el cerebelo (Davis et al., 1991; Davis and Joyner, 1988; Davis et al., 1988; Joyner et al., 1991). Posteriormente su expresión se restringe a grupos celulares del colículo, la *substantia nigra* y el puente. En el cerebelo, *En1* no se expresa, mientras que *En2* se expresa de forma generalizada en el cerebelo embrionario y, postnatalmente, en células de las capas granulosa y molecular. *En1* se expresa también en el ectodermo ventral de las yemas de las extremidades y en regiones del prosencéfalo, la médula espinal y las somitas (Wurst et al., 1994). *En2* también se expresa en los arcos branquiales durante la embriogénesis (Davis et al., 1991; Davis and Joyner, 1988; Davis et al., 1988; Joyner et al., 1991). Los ratones knockout de *En2* son viables y no muestran excesivos problemas motores. Sin embargo, tienen un cerebelo reducido y con un patrón de foliación alterado, especialmente en la región posterior del órgano (Joyner et al., 1991; Joyner et al., 1989; Millen et al., 1994). Por el contrario, los ratones knockout de *En1* mueren al nacimiento y carecen de una amplia región del cerebelo y del colículo y numerosas malformaciones en las extremidades (Wurst et al., 1994). La viabilidad del mutante de *En2* se explica porque solapa en la mayor parte de sus dominios de expresión con *En1*, excepto precisamente en el cerebelo, y los dos genes presentan redundancia funcional (Hanks et al., 1995). Aún es más, si se sustituye mediante knock-in el gen *En1* por *En2*, el ratón es perfectamente funcional, lo cual indica que la diferencia entre *En1* y *En2* radica en sus diferentes patrones de expresión (Hanks et al., 1995). Yendo más allá, incluso se ha demostrado que el gen *engrailed* de *Drosophila* puede rescatar la mayor parte del fenotipo cerebral consecuencia de la falta de *En1*, en un ratón knock-in de *engrailed* en el locus *En1*,

demostrando el alto grado de conservación estructural y funcional de estas proteínas durante la evolución (Hanks et al., 1998).

Desde el punto de vista molecular, el estudio de numerosos genes *engrailed* en diferentes taxones ha permitido definir la existencia de 5 regiones de homología de Engrailed (EHs), de las que EH4 comprende el homeodominio con capacidad de unión al DNA (Han and Manley, 1993). Las regiones EH1 y EH5 median la función de represión transcripcional, fundamentalmente EH1 al interactuar con los correpresores de la familia Groucho (Jaynes and O'Farrell, 1991; Jimenez et al., 1997). Las regiones EH2 y EH3 se unen a otra proteína con homeodominios, PBX1 (Peltenburg and Murre, 1997), que posiblemente modula la actividad de Engrailed. En función de esta estructura, la actividad principal de las proteínas Engrailed es la represión transcripcional de numerosos genes para definir tipos celulares y estructuras concretas durante el desarrollo (Han and Manley, 1993; Jaynes and O'Farrell, 1991; John et al., 1995). En el caso de *Drosophila*, son numerosos los genes de desarrollo que han sido descritos como genes reprimidos por *engrailed*, como por ejemplo *cubitus interruptus*, *wingless* o *patched* (Alexandre and Vincent, 2003). Engrailed también participa en la activación de importantes genes implicados en desarrollo, como pueden ser *hedgehog* o *polyhomeotic*, o incluso el propio *engrailed*. Sin embargo, y aunque no está bien claro todavía, parece ser lo más probable que esta activación sea un resultado indirecto de la represión de otros represores transcripcionales (Alexandre and Vincent, 2003). Además de todo lo expuesto, parece que Engrailed también puede actuar como un regulador de la traducción a proteínas, además de la transcripción, en virtud de su capacidad de interactuar con el factor de elongación de la traducción eIF4E (Nedelec et al., 2004). Finalmente, se ha descrito que las proteínas *engrailed* pueden ser secretadas por algunas células e internalizadas por otras, probablemente asociadas a vesículas, y funcionar de esa manera como señales que establecen gradientes morfogénicos, por ejemplo en la formación de las alas en *Drosophila* (Layalle et al., 2011), o guiando a los axones retinales en *Xenopus* (Brunet et al., 2005).

Siendo, como hemos visto, unos genes de tanta relevancia en el desarrollo, resulta sorprendente que no se hayan descrito apenas ejemplos de la implicación de *En1* y/o *En2* en procesos patológicos. Se ha comprobado que ambos son necesarios para garantizar la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*, las principales células afectadas en la enfermedad de Parkinson, sugiriendo que *En1* y *En2* puedan estar así implicados en el desarrollo de esta patología y que, en cualquier caso, los ratones

knockout de estos genes pueden ser útiles como modelos para el estudio de la misma (Alberi et al., 2004; Simon et al., 2004). En otra patología distinta, el autismo, se ha comprobado realizando estudios de "linkage" genético y "genome wide association screenings" en pacientes que hay dos SNPs intrónicos en la región del homeodominio de *EN2* que están fuertemente asociados con la enfermedad (Benayed et al., 2005). Esto, unido al hecho de que las alteraciones estructurales del sistema nervioso central más frecuentemente asociadas con el autismo están localizadas en el cerebelo, ha llevado a postular un posible papel de *EN2* en el desarrollo de esta enfermedad (Benayed et al., 2005). En el caso del cáncer, existen muy pocos ejemplos en la bibliografía que relacionen esta enfermedad con los genes *ENGRAILED*. El ejemplo más relevante es la descripción de que *EN2* puede ser un oncogén en cáncer de mama, dado que se expresa de manera ectópica en un grupo reducido (7.3% del total) de muestras de pacientes y en numerosas líneas celulares de esta enfermedad (Martin et al., 2005). Además, su expresión ectópica en líneas celulares mamarias no tumorales hace que las células pierdan la inhibición por contacto, aumenten su proliferación, pierdan su capacidad de diferenciación y sean capaces de generar adenocarcinomas al injertarlas en ratones receptores (Martin et al., 2005). El mecanismo molecular que causa la sobreexpresión de *EN2*, así como el de la forma en que media sus efectos, son desconocidos.

En función de todas estas evidencias experimentales, nuestro primer paso, una vez identificado en el screening el clon de la genoteca que contenía la isla de *EN2*, fue estudiar mediante secuenciación con bisulfito el estado de metilación de la isla en diferentes muestras de pacientes y líneas celulares. Los resultados, recogidos en la Figura 4.8, revelan una total ausencia de metilación en los controles sanos, en las fases crónicas, en las crisis blásticas que no son T, y en las leucemias linfoblásticas agudas B. Por el contrario, hay una metilación densa en la crisis blástica de tipo T, en las leucemias linfoblásticas agudas T y en todas las líneas celulares analizadas. Estas evidencias parecían sugerir que la metilación de *EN2* podría estar asociada con una alteración (bloqueo) de la diferenciación de los linfocitos T, apuntando, por tanto, a un posible papel de *EN2* este proceso (ver figura 5-2).

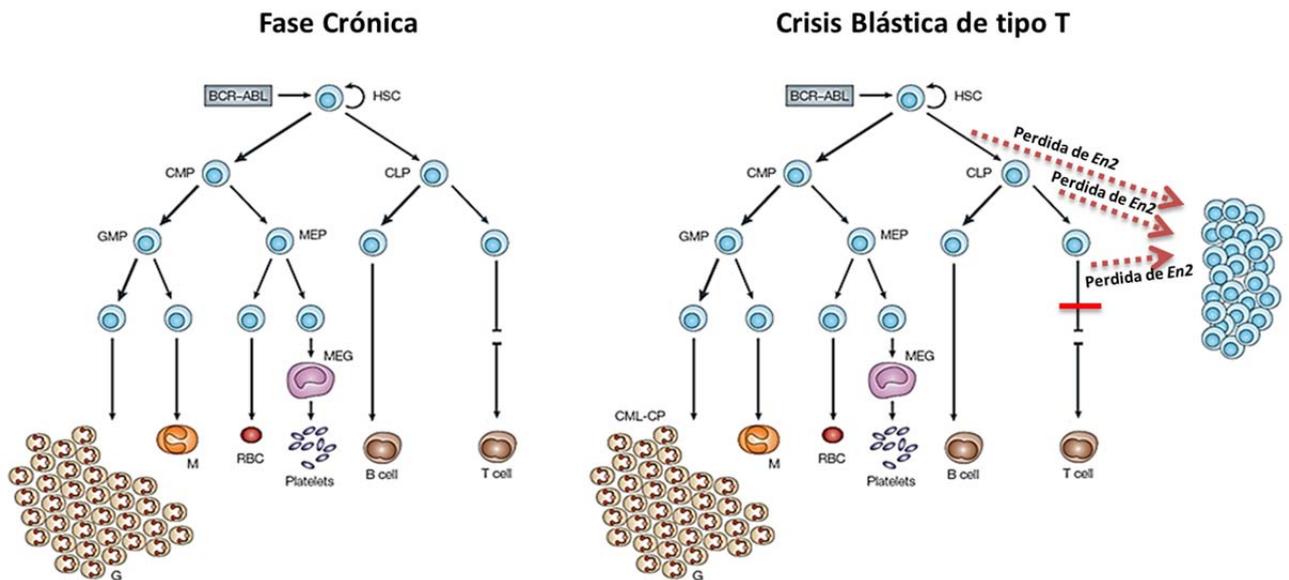


Figura 5- 2. Progresión de la LMC a crisis blástica de tipo T. La pérdida de función de *En2*, causada por la hipermetilación de la isla CpG asociada, produce un bloqueo en la diferenciación de los linfocitos T que lleva a la crisis blástica de tipo T. Basado en (Ren, 2005) .

Para comprobar este punto, se procedió a estudiar el patrón de expresión de *Engrailed-2* en los principales tipos celulares durante la diferenciación T, tanto en humanos como en ratón. En las Figuras 4-9 y 4-10 se muestran los resultados del análisis de la expresión de *Engrailed-2* en poblaciones de linfocitos T en el timo y el bazo de ratón (Figura 4-9) o en el timo humano (Figura 4-10) mediante RT-PCR. Como se puede apreciar, *En2* se expresa en linfocitos DP en el timo de ratón y en linfocitos CD8⁺ tanto en timo como en bazo. Un patrón de expresión similar se puede ver en el timo humano (Figura 4-10). Estos resultados corroboran la hipótesis de partida y refuerzan la idea de que *En2* ha de desempeñar algún papel durante el desarrollo o la función de los linfocitos T.

Para estudiar el papel que un gen pueda tener en el desarrollo o función de un tejido, una de las aproximaciones experimentales más poderosas es el estudio del fenotipo del knockout de dicho gen. Por ello, una vez confirmado que *En2* se expresa durante el desarrollo de los linfocitos T, obtuvimos del grupo de Alexandra Joyner el ratón knockout al que le falta el homeodominio de *En2* y que, como hemos explicado, es un alelo nulo (alelo *En2^{tm1Alj}*) (Joyner et al., 1991; Millen et al., 1994). Dado que nunca se había descrito la expresión o la participación de *En2* en el desarrollo hematopoyético, no existían datos sobre este proceso en los ratones *En2^{-/-}*. Por ello, en primer lugar procedimos a analizar

las poblaciones celulares sanguíneas más relevantes en los distintos órganos hematopoyéticos (médula ósea, bazo, nódulos linfáticos, timo, sangre periférica e hígado fetal). Un primer aspecto relevante es la reducción del tamaño del timo que se observa en los animales knockout frente a los WT. Como se puede observar en la Figura 4.13, el timo es claramente menor en los animales *En2*^{-/-} que en los controles. Es un hecho conocido que existe dimorfismo sexual en ratón en el tamaño del timo, tanto en valor absoluto como en términos relativos con respecto al peso total del animal (Dunn, 1954; Peleg and Nesbitt, 1984). Además, este dimorfismo varía entre las diferentes cepas de ratón, siendo en algunas el peso del timo mayor en los machos que en las hembras y en otras al revés. Por eso no es posible agrupar todos los ejemplares analizados para este parámetro, y hay que representar los dos sexos por separado. En cualquier caso, en ambos sexos la diferencia entre ratones WT y knockout es clara. No se apreciaron diferencias en otros órganos, con excepción del cerebelo, en el que se confirmó visualmente el fenotipo previamente descrito en la bibliografía (datos no mostrados).

Los resultados del análisis mediante citometría de flujo, recogidos en las Figuras 4-14 a 4-20, no muestran diferencias significativas en la composición o el número de tipos celulares linfoides B, linfoides T o mieloides, en los compartimentos hematopoyéticos en los estadios del desarrollo analizados. Estos resultados, aunque en principio parecen sugerir que la falta de *En2* no tiene efecto sobre el desarrollo del sistema hematopoyético, no son definitivos con respecto a este punto, pues existen bloqueos del desarrollo que no aparecen de forma manifiesta en el análisis de los ratones knockout. La razón de este fenómeno es que, aunque exista algún bloqueo en la diferenciación, si éste no es absoluto, siempre existe un porcentaje de células (tanto mayor cuanto menos severo sea el bloqueo) que pueden completar el proceso de forma que resulta aparentemente normal. Dado que no existe competencia, pues todas las células del organismo tienen la misma alteración, el efecto neto es un desarrollo que, en apariencia, es normal. Por ello, la única manera de revelar la existencia de estos bloqueos parciales es mediante experimentos de reconstitución de médula ósea en condiciones competitivas. En estos experimentos se inyectan en un ratón receptor células procedentes de la médula ósea del ratón knockout mezcladas en proporciones variables con células obtenidas de un ratón control, pudiendo distinguirse el origen de las células inyectadas mediante el uso de distintos marcadores. En este contexto experimental, las células del ratón knockout han de competir con las células WT en todos y cada uno de los nichos. Por ello, si existe algún bloqueo en el desarrollo, las células knockout no contribuyen a la generación de ese tipo celular

concreto, que es generado a partir de las células WT. En la actualidad estamos llevando a cabo experimentos de este tipo, inyectando las células en ratones receptores *RAG1*^{-/-}, que carecen de linfocitos T a partir del punto en que ocurren los reordenamientos del TCR. De esta forma, analizando el sistema hematopoyético de estos ratones inyectados al cabo de 6-8 semanas, esperamos poder revelar la existencia de un bloqueo en la diferenciación de los linfocitos T de los ratones *En2*^{-/-}.

Otra forma de evaluar la participación de un gen en un determinado proceso es la generación de modelos de ganancia de función, en los que la expresión del gen de interés se incrementa artificialmente en el compartimento celular o el órgano en el que dicha función se quiere estudiar. Esta aproximación experimental ha sido especialmente exitosa precisamente en el estudio de las funciones de los genes homeobox en *Drosophila* (McGinnis and Krumlauf, 1992). Por ello, en el presente trabajo hemos generado un modelo de ganancia de función de *En2* en los linfocitos T, en el que *En2* se expresa bajo el control del promotor proximal del gen *Lck*, que codifica una quinasa que se expresa en altos niveles en linfocitos T. El uso del promotor *Lck* para la generación de modelos de ganancia de función en linfocitos T está ampliamente aceptado, y son numerosos los ratones transgénicos que ha sido generados con esta construcción (Chaffin et al., 1990; Garvin et al., 1990; Lewis et al., 1991; Sartor et al., 1989; Shimizu et al., 2001; Yu et al., 2002). Hasta el momento de la redacción de esta Memoria se han obtenido 4 ratones potenciales fundadores tras el proceso de microinyección del plásmido *Lck-EN2* en oocitos de ratón. De estos cuatro fundadores, uno ha transmitido el transgén a la descendencia y otro hubo de ser sacrificado a los 2.5 meses de edad al mostrar evidentes signos de enfermedad. La disección de este único ejemplar reveló una total ausencia de timo y alteraciones generales en los compartimentos linfoides (datos no mostrados). Dado que, de momento, se trata sólo de un animal de una única línea transgénica, no se pueden extraer conclusiones firmes. Sin embargo, es interesante mencionar en este contexto que la expresión ectópica de *En2* en las células cerebelares de Purkinje de ratones transgénicos causa una reducción del tamaño cerebelar a un tercio del tamaño normal, y una gran reducción en el número de células de Purkinje (Baader et al., 1998).

En paralelo con los experimentos que nos permitan concluir cuál es el papel que *En2* juega en el desarrollo linfoide (reconstitución de médula ósea en condiciones competitivas y modelos de ganancia de función), hemos realizado otros estudios para determinar la funcionalidad de los linfocitos B y T en ausencia de *En2*. En primer lugar, hemos estudiado la capacidad de los ratones *En2*^{-/-} para generar una respuesta inmune

dependiente de linfocitos T, caracterizada por la formación de centros germinales. Para ello hemos inmunizado ratones *En2*^{-/-} y controles WT mediante la inyección intraperitoneal de eritrocitos de cordero (SRBC). Al cabo de 10 días se analizó la presencia de linfocitos B de centros germinales mediante citometría de flujo. Los resultados, que se presentan en la Figura 4-21, indican que los ratones *En2*^{-/-} pueden montar una respuesta inmune humoral y celular normal, caracterizada por la presencia de linfocitos B del centro germinal (B200⁺FAS⁺Gl7⁺), frente al estímulo de los SRBCs.

Otra forma de evaluar la correcta funcionalidad de los linfocitos T es estudiar su capacidad de producir citoquinas específicas tras su estimulación *in vitro* con PMA e inonomicina. En presencia de inhibidores de la secreción del aparato de Golgi (Brefeldina A) las citoquinas no son secretadas al exterior, y se puede detectar su presencia por citometría de flujo mediante tinciones intracelulares con anticuerpos específicos. En las Figuras 4-22 y 4-23 se muestran los patrones de expresión de las citoquinas interleukina-2 (IL-2), interferón gamma (INF γ), y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Se puede apreciar que no hay diferencias en la capacidad funcional, evaluada mediante este método, entre los linfocitos T *En2*^{-/-} y los controles WT.

De los resultados presentados, y a falta de los datos de la reconstitución de médula ósea en condiciones competitivas y el modelo de ganancia de función, parece que el efecto de la falta de *En2* en linfocitos T produce un fenotipo bastante sutil, sólo apreciable por la diferencia del tamaño del timo entre ratones *En2*^{-/-} y controles WT. Como hemos expuesto anteriormente, también el fenotipo del SNC de los ratones *En2*^{-/-} es bastante moderado, y esto se debe en gran medida a la redundancia funcional con *En1*, que compensa en la mayor parte de los órganos, excepto el cerebelo, la falta de *En2*. Con el fin de comprobar si esto era cierto también en el caso del timo, procedimos a estudiar si existía expresión de *En1* en este órgano, al igual que habíamos hecho antes con *En2*. Sin embargo, tal y como se recoge en la Figura 4-11, no hemos detectado ninguna expresión de *En1* en el desarrollo de los linfocitos T de ratón mediante RT-PCR, mientras que sí hemos sido capaces de detectarla en cDNA obtenido a partir de cabeza de embrión de ratón. Por tanto, parece que el timo es un órgano donde sólo se expresa *En2*, por lo que no puede existir redundancia funcional o rescate de un potencial fenotipo por la expresión de *En1*.

Desde un punto de vista biológico, es altamente improbable que un gen se exprese en un contexto celular y no tenga ningún papel en el mismo. Esto debería ser

especialmente cierto en el caso de un regulador transcripcional tan potente como *En2*. Por ello, con el fin de establecer las diferencias entre timocitos WT y timocitos *En2*^{-/-} a nivel de los patrones de expresión génica, hemos realizado estudios transcriptómicos mediante microarrays de cDNA, comparando poblaciones celulares purificadas derivadas de ambos tipos de ratones. Así, hemos comparado, entre ratones WT y *En2*^{-/-}, timocitos dobles positivos (DP) y esplenocitos CD8⁺, dos poblaciones en las que la expresión de *En2* es claramente detectable. Los resultados de los análisis de expresión génica se recogen en las Figuras 4-24 a 4-28. Los patrones son muy similares entre ambas poblaciones, como era esperable dada la ausencia de fenotipos dramáticos y el hecho de los niveles de expresión de *En2* son moderados ya de entrada. Sin embargo, existen diferencias consistentes en los niveles de expresión de algunos genes potencialmente relevantes. Se han seleccionado para las figuras los genes que muestran diferencias de expresión de 1.5x (para DPs) o 2x (para esplenocitos CD8⁺). Dado que *En2* es fundamentalmente un represor transcripcional y su potencial efecto transactivador sería más bien debido, como hemos comentado anteriormente, a la represión de represores, los genes potencialmente más interesantes de los identificados en el estudio por microarrays son aquellos que aparecen upregulados en las células *En2*^{-/-} frente a las WT. En este conjunto se encuentran genes relevantes para el proceso de diferenciación T, como por ejemplo:

- *Slfm3*, que se sabe que está diferencialmente regulado durante la diferenciación T y cuya sobreexpresión interfiere con la maduración de los DP y disminuye el número de timocitos (Geserick et al., 2004; Schwarz et al., 1998).

- *Asx1/1*, una proteína de unión a cromatina, miembro del grupo Polycomb, que se encuentra mutada en síndromes mielodisplásicos y leucemia linfática crónica (Sugimoto et al., 2010).

- *Ezh2*, una proteína esencial de los procesos de regulación epigenética por su capacidad para metilar la histona H3 en las lisinas 9 y 27, estableciendo así patrones de represión transcripcional (Cao and Zhang, 2004).

- *Hmgb1*, implicada en los reordenamientos V(D)J por su capacidad de interactuar con las proteínas RAG (Dai et al., 2005).

En resumen, nuestros resultados sugieren que, efectivamente, *Engrailed-2* participa en el desarrollo de los linfocitos T, regulando los niveles de expresión de genes que son necesarios para este proceso. La falta de *Engrailed-2* causa alteraciones en estos

patrones de expresión y puede interferir con una correcta diferenciación de los linfocitos T. Como hemos visto, la pérdida de expresión de *EN2* causada por la hipermetilación de la isla CpG del gen a lo largo de la fase crónica de la LMC, puede ser la responsable de un bloqueo de la diferenciación que, unido a la actividad quinasa desregulada de BCR-ABLp210, desencadene una crisis blástica de tipo T (Figura 5-2). En la actualidad, con el objetivo de reproducir este efecto en modelos animales, estamos procediendo a cruzar el modelo transgénico Sca1-BCR-ABLp210 (Perez-Caro et al., 2009; Vicente-Duenas et al., 2009b), que sufre LMC y posterior progresión a la crisis blástica, en un fondo *En2*^{-/-}. De esta manera esperamos poder recapitular el fenotipo tumoral de la crisis blástica de tipo T en un modelo de ratón.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

- I. Existe un proceso de metilación aberrante del DNA en la progresión desde la leucemia mieloide crónica a la crisis blástica. Este proceso afecta tanto a las islas CpG clásicas, asociadas con el extremo 5' de genes, como a otras regiones del genoma ricas en pares CpG. La metilación de las islas CpG en la progresión de la LMC puede causar un "knockout epigenético", produciendo la pérdida de expresión de reguladores transcripcionales importantes para la diferenciación celular, y causando así el bloqueo de la diferenciación que caracteriza la crisis blástica.

- II. La identificación de las islas CpG que se metilan en la progresión de la LMC permite, por tanto, identificar genes implicados en los procesos de diferenciación hematopoyética. Así, hemos podido vincular por primera vez al gen *Engrailed-2* con el proceso de diferenciación linfoide T: el gen homeobox *Engrailed-2* se hipermetila en la progresión de la LMC y su metilación está asociada con el desarrollo de crisis blásticas de tipo T y con leucemias linfoblásticas agudas de tipo T. *EN-2* se expresa durante el desarrollo de los linfocitos T, tanto en ratón como en humano. La falta de *Engrailed-2* en ratones knockout produce una disminución del tamaño del timo y un cambio en los patrones de expresión génica durante el desarrollo de los linfocitos T.

Bibliografía

- Abate-Shen, C. (2002).** Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer* 2, 777-785.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2008). *Inmunología Celular y Molecular* 6ª Edición (ELSEVIER).
- Abollo-Jimenez, F., Jimenez, R., and Cobaleda, C. (2010).** Physiological cellular reprogramming and cancer. *Semin Cancer Biol* 20, 98-106.
- Abramovich, C., and Humphries, R.K. (2005).** Hox regulation of normal and leukemic hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol* 12, 210-216.
- Adams, J.M., Houston, H., Allen, J., Lints, T., and Harvey, R. (1992).** The hematopoietically expressed vav proto-oncogene shares homology with the dbl GDP-GTP exchange factor, the bcr gene and a yeast gene (CDC24) involved in cytoskeletal organization. *Oncogene* 7, 611-618.
- Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A., et al. (2005).** Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121, 295-306.
- Advani, S.H., Malhotra, H., Kadam, P.R., Iyer, R.S., Nanjangud, G., Balsara, B., Saikia, T., Gopal, R., and Nair, C.N. (1991).** T-lymphoid blast crisis in chronic myeloid leukemia. *Am J Hematol* 36, 86-92.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000).** A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
- Alberi, L., Sgado, P., and Simon, H.H. (2004).** Engrailed genes are cell-autonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons. *Development* 131, 3229-3236.
- Alexandre, C., and Vincent, J.P. (2003).** Requirements for transcriptional repression and activation by Engrailed in *Drosophila* embryos. *Development* 130, 729-739.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
- Antequera, F., Boyes, J., and Bird, A. (1990).** High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 62, 503-514.
- Argiropoulos, B., and Humphries, R.K. (2007).** Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* 26, 6766-6776.
- Baader, S.L., Sanlioglu, S., Berrebi, A.S., Parker-Thornburg, J., and Oberdick, J. (1998).** Ectopic overexpression of engrailed-2 in cerebellar Purkinje cells causes restricted cell loss and retarded external germinal layer development at lobule junctions. *J Neurosci* 18, 1763-1773.
- Baikie, A.G., Court-Brown, W.M., Buckton, K.E., Harnden, D.G., Jacobs, P.A., and Tough, I.M. (1960).** A possible specific chromosome abnormality in human chronic myeloid leukaemia. *Nature* 188, 1165-1166.
- Baylin, S.B., and Jones, P.A. (2007). Epigenetics Determinants of Cancer. In *Epigenetics*, C.D. Allis, T. Jenuwein, and D. Reinberg, eds., pp. 457-477.
- Belinsky, S.A., Nikula, K.J., Baylin, S.B., and Issa, J.P. (1996).** Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4045-4050.
- Benayed, R., Gharani, N., Rossman, I., Mancuso, V., Lazar, G., Kamdar, S., Bruse, S.E., Tischfield, S., Smith, B.J., Zimmerman, R.A., et al. (2005).** Support for the homeobox transcription factor gene ENGRAILED 2 as an autism spectrum disorder susceptibility locus. *Am J Hum Genet* 77, 851-868.
- Bestor, T.H. (2005).** Transposons reanimated in mice. *Cell* 122, 322-325.
- Bestor, T.H., and Ingram, V.M. (1983).** Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 5559-5563.

- Bocker, M.T., Hellwig, I., Breiling, A., Eckstein, V., Ho, A.D., and Lyko, F. (2011).** Genome-wide promoter DNA methylation dynamics of human hematopoietic progenitor cells during differentiation and aging. *Blood* 117, e182-189.
- Broske, A.M., Vockentanz, L., Kharazi, S., Huska, M.R., Mancini, E., Scheller, M., Kuhl, C., Enns, A., Prinz, M., Jaenisch, R., et al. (2009).** DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nat Genet* 41, 1207-1215.
- Brown, G., Hughes, P.J., Michell, R.H., Rolink, A.G., and Ceredig, R. (2007).** The sequential determination model of hematopoiesis. *Trends Immunol* 28, 442-448.
- Brunet, I., Weinl, C., Piper, M., Trembleau, A., Volovitch, M., Harris, W., Prochiantz, A., and Holt, C. (2005).** The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* 438, 94-98.
- Calabretta, B., and Perrotti, D. (2004).** The biology of CML blast crisis. *Blood* 103, 4010-4022.
- Cameron, E.E., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (1999).** p15(INK4B) CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. *Blood* 94, 2445-2451.
- Cao, R., and Zhang, Y. (2004).** The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* 14, 155-164.
- Carpenter, A.C., and Bosselut, R. (2010).** Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol* 11, 666-673.
- Cazzaniga, G., Tosi, S., Aloisi, A., Giudici, G., Daniotti, M., Pioltelli, P., Kearney, L., and Biondi, A. (1999).** The tyrosine kinase abl-related gene ARG is fused to ETV6 in an AML-M4Eo patient with a t(1;12)(q25;p13): molecular cloning of both reciprocal transcripts. *Blood* 94, 4370-4373.
- Ceredig, R., Rolink, A.G., and Brown, G. (2009).** Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nat Rev Immunol* 9, 293-300.
- Cervantes, F., Urbano-Ispizua, A., Escoda, L., Ordi, J., Montserrat, E., and Rozman, C. (1991).** [T lymphoid blast crisis of Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia: analysis of 3 cases]. *Med Clin (Barc)* 97, 21-23.
- Cillo, C., Cantile, M., Faiella, A., and Boncinelli, E. (2001).** Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol* 188, 161-169.
- Ciofani, M., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2007).** The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 463-493.
- Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L., and Frommer, M. (1994).** High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 22, 2990-2997.
- Clevers, H. (2011).** The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 17, 313-319.
- Cobaleda, C., Jochum, W., and Busslinger, M. (2007a).** Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature* 449, 473-477.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., and Busslinger, M. (2007b).** Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* 8, 463-470.
- Colicelli, J. (2010).** ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity. *Sci Signal* 3, re6.
- Condrón, B.G., Patel, N.H., and Zinn, K. (1994).** Engrailed controls glial/neuronal cell fate decisions at the midline of the central nervous system. *Neuron* 13, 541-554.
- Corn, P.G., Kuerbitz, S.J., van Noesel, M.M., Esteller, M., Compitello, N., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (1999).** Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res* 59, 3352-3356.
- Costello, J.F., Fruhwald, M.C., Smiraglia, D.J., Rush, L.J., Robertson, G.P., Gao, X., Wright, F.A., Feramisco, J.D., Peltomaki, P., Lang, J.C., et al. (2000).** Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 24, 132-138.
- Cuenco, G.M., and Ren, R. (2001).** Cooperation of BCR-ABL and AML1/MDS1/EVI1 in blocking myeloid differentiation and rapid induction of an acute myelogenous leukemia. *Oncogene* 20, 8236-8248.

- Chaffin, K.E., Beals, C.R., Wilkie, T.M., Forbush, K.A., Simon, M.I., and Perlmutter, R.M. (1990).** Dissection of thymocyte signaling pathways by in vivo expression of pertussis toxin ADP-ribosyltransferase. *EMBO J* 9, 3821-3829.
- Chi, A.W., Bell, J.J., Zlotoff, D.A., and Bhandoola, A. (2009).** Untangling the T branch of the hematopoiesis tree. *Curr Opin Immunol* 21, 121-126.
- Dai, Y., Wong, B., Yen, Y.M., Oettinger, M.A., Kwon, J., and Johnson, R.C. (2005).** Determinants of HMGB proteins required to promote RAG1/2-recombination signal sequence complex assembly and catalysis during V(D)J recombination. *Mol Cell Biol* 25, 4413-4425.
- Dalerba, P., Cho, R.W., and Clarke, M.F. (2007).** Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 58, 267-284.
- Daser, A., and Rabbitts, T.H. (2004).** Extending the repertoire of the mixed-lineage leukemia gene MLL in leukemogenesis. *Genes Dev* 18, 965-974.
- Dash, A.B., Williams, I.R., Kutok, J.L., Tomasson, M.H., Anastasiadou, E., Lindahl, K., Li, S., Van Etten, R.A., Borrow, J., Housman, D., et al. (2002).** A murine model of CML blast crisis induced by cooperation between BCR/ABL and NUP98/HOXA9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7622-7627.
- Davis, C.A., Holmyard, D.P., Millen, K.J., and Joyner, A.L. (1991).** Examining pattern formation in mouse, chicken and frog embryos with an En-specific antiserum. *Development* 111, 287-298.
- Davis, C.A., and Joyner, A.L. (1988).** Expression patterns of the homeo box-containing genes En-1 and En-2 and the proto-oncogene int-1 diverge during mouse development. *Genes Dev* 2, 1736-1744.
- Davis, C.A., Noble-Topham, S.E., Rossant, J., and Joyner, A.L. (1988).** Expression of the homeo box-containing gene En-2 delineates a specific region of the developing mouse brain. *Genes Dev* 2, 361-371.
- De Keersmaecker, K., Graux, C., Odero, M.D., Mentens, N., Somers, R., Maertens, J., Wlodarska, I., Vandenberghe, P., Hagemeijer, A., Marynen, P., et al. (2005).** Fusion of EML1 to ABL1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia with cryptic t(9;14)(q34;q32). *Blood* 105, 4849-4852.
- Deaton, A.M., Webb, S., Kerr, A.R., Illingworth, R.S., Guy, J., Andrews, R., and Bird, A. (2011).** Cell type-specific DNA methylation at intragenic CpG islands in the immune system. *Genome Res* 21, 1074-1086.
- Delogu, A., Schebesta, A., Sun, Q., Aschenbrenner, K., Perlot, T., and Busslinger, M. (2006).** Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* 24, 269-281.
- Doi, A., Park, I.H., Wen, B., Murakami, P., Aryee, M.J., Irizarry, R., Herb, B., Ladd-Acosta, C., Rho, J., Loewer, S., et al. (2009).** Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet* 41, 1350-1353.
- Druker, B.J. (2008).** Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* 112, 4808-4817.
- Dunn, T.B. (1954).** Normal and pathologic anatomy of the reticular tissue in laboratory mice, with a classification and discussion of neoplasms. *J Natl Cancer Inst* 14, 1281-1433.
- Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A., and Jaenisch, R. (2003).** Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 300, 455.
- Eker, R. (1929).** The Recessive Mutant Engrailed in *Drosophila Melanogaster*. *Hereditas* 12, 217-222.
- el-Deiry, W.S., Nelkin, B.D., Celano, P., Yen, R.W., Falco, J.P., Hamilton, S.R., and Baylin, S.B. (1991).** High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3470-3474.
- Ernst, P., Mabon, M., Davidson, A.J., Zon, L.I., and Korsmeyer, S.J. (2004).** An Mll-dependent Hox program drives hematopoietic progenitor expansion. *Curr Biol* 14, 2063-2069.
- Esteller, M. (2008).** Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358, 1148-1159.

- Esteller, M., Fraga, M.F., Paz, M.F., Campo, E., Colomer, D., Novo, F.J., Calasanz, M.J., Galm, O., Guo, M., Benitez, J., *et al.* (2002). Cancer epigenetics and methylation. *Science* 297, 1807-1808; discussion 1807-1808.
- Etzioni, R., Urban, N., Ramsey, S., McIntosh, M., Schwartz, S., Reid, B., Radich, J., Anderson, G., and Hartwell, L. (2003). The case for early detection. *Nat Rev Cancer* 3, 243-252.
- Feinberg, A.P. (1999). Imprinting of a genomic domain of 11p15 and loss of imprinting in cancer: an introduction. *Cancer Res* 59, 1743s-1746s.
- Feinberg, A.P. (2007). Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 447, 433-440.
- Garcia-Hernandez, B., Castellanos, A., Lopez, A., Orfao, A., and Sanchez-Garcia, I. (1997). Murine hematopoietic reconstitution after tagging and selection of retrovirally transduced bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13239-13244.
- Garcia-Peydro, M., de Yébenes, V.G., and Toribio, M.L. (2006). Notch1 and IL-7 receptor interplay maintains proliferation of human thymic progenitors while suppressing non-T cell fates. *J Immunol* 177, 3711-3720.
- Gardiner-Garden, M., and Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196, 261-282.
- Garvin, A.M., Abraham, K.M., Forbush, K.A., Farr, A.G., Davison, B.L., and Perlmutter, R.M. (1990). Disruption of thymocyte development and lymphomagenesis induced by SV40 T-antigen. *Int Immunol* 2, 173-180.
- Geserick, P., Kaiser, F., Klemm, U., Kaufmann, S.H., and Zerrahn, J. (2004). Modulation of T cell development and activation by novel members of the Schlafen (slfn) gene family harbouring an RNA helicase-like motif. *Int Immunol* 16, 1535-1548.
- Godwin, A.R., and Capecchi, M.R. (1998). Hoxc13 mutant mice lack external hair. *Genes Dev* 12, 11-20.
- Golub, T.R., Goga, A., Barker, G.F., Afar, D.E., McLaughlin, J., Bohlander, S.K., Rowley, J.D., Witte, O.N., and Gilliland, D.G. (1996). Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol Cell Biol* 16, 4107-4116.
- Graux, C., Cools, J., Melotte, C., Quentmeier, H., Ferrando, A., Levine, R., Vermeesch, J.R., Stul, M., Dutta, B., Boeckx, N., *et al.* (2004). Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 36, 1084-1089.
- Grier, D.G., Thompson, A., Kwasniewska, A., McGonigle, G.J., Halliday, H.L., and Lappin, T.R. (2005). The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol* 205, 154-171.
- Gu, J.J., Ryu, J.R., and Pendergast, A.M. (2009). Abl tyrosine kinases in T-cell signaling. *Immunol Rev* 228, 170-183.
- Han, K., and Manley, J.L. (1993). Functional domains of the Drosophila Engrailed protein. *EMBO J* 12, 2723-2733.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hanks, M., Wurst, W., Anson-Cartwright, L., Auerbach, A.B., and Joyner, A.L. (1995). Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2. *Science* 269, 679-682.
- Hanks, M.C., Loomis, C.A., Harris, E., Tong, C.X., Anson-Cartwright, L., Auerbach, A., and Joyner, A. (1998). Drosophila engrailed can substitute for mouse Engrailed1 function in mid-hindbrain, but not limb development. *Development* 125, 4521-4530.
- Hansen, K.D., Timp, W., Bravo, H.C., Sabunciyan, S., Langmead, B., McDonald, O.G., Wen, B., Wu, H., Liu, Y., Diep, D., *et al.* (2011). Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet* 43, 768-775.
- Hardy, R.R., Kincade, P.W., and Dorshkind, K. (2007). The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity* 26, 703-714.

- Hayday, A.C., and Pennington, D.J. (2007).** Key factors in the organized chaos of early T cell development. *Nat Immunol* 8, 137-144.
- Herman, J.G., and Baylin, S.B. (2003).** Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349, 2042-2054.
- Herman, J.G., Civin, C.I., Issa, J.P., Collector, M.I., Sharkis, S.J., and Baylin, S.B. (1997).** Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 57, 837-841.
- Hidalgo, A. (1998).** Growth and patterning from the engrailed interface. *Int J Dev Biol* 42, 317-324.
- Hogan B, C.F.L. (1995).** Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual. (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY.).
- Igarashi, H., Gregory, S.C., Yokota, T., Sakaguchi, N., and Kincade, P.W. (2002).** Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity* 17, 117-130.
- Illingworth, R., Kerr, A., Desousa, D., Jorgensen, H., Ellis, P., Stalker, J., Jackson, D., Clee, C., Plumb, R., Rogers, J., et al. (2008).** A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol* 6, e22.
- Ingham, P.W., and Martinez Arias, A. (1992).** Boundaries and fields in early embryos. *Cell* 68, 221-235.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Irizarry, R.A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., Cui, H., Gabo, K., Rongione, M., Webster, M., et al. (2009).** The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* 41, 178-186.
- Issa, J.P., Zehnauer, B.A., Civin, C.I., Collector, M.I., Sharkis, S.J., Davidson, N.E., Kaufmann, S.H., and Baylin, S.B. (1996).** The estrogen receptor CpG island is methylated in most hematopoietic neoplasms. *Cancer Res* 56, 973-977.
- Issa, J.P., Zehnauer, B.A., Kaufmann, S.H., Biel, M.A., and Baylin, S.B. (1997).** HIC1 hypermethylation is a late event in hematopoietic neoplasms. *Cancer Res* 57, 1678-1681.
- Jaynes, J.B., and O'Farrell, P.H. (1991).** Active repression of transcription by the engrailed homeodomain protein. *EMBO J* 10, 1427-1433.
- Jelinek, J., Gharibyan, V., Estecio, M.R., Kondo, K., He, R., Chung, W., Lu, Y., Zhang, N., Liang, S., Kantarjian, H.M., et al. (2011).** Aberrant DNA methylation is associated with disease progression, resistance to imatinib and shortened survival in chronic myelogenous leukemia. *PLoS One* 6, e22110.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001).** Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Ji, H., Ehrlich, L.I., Seita, J., Murakami, P., Doi, A., Lindau, P., Lee, H., Aryee, M.J., Irizarry, R.A., Kim, K., et al. (2010).** Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature* 467, 338-342.
- Jimenez, G., Paroush, Z., and Ish-Horowicz, D. (1997).** Groucho acts as a corepressor for a subset of negative regulators, including Hairy and Engrailed. *Genes Dev* 11, 3072-3082.
- John, A., Smith, S.T., and Jaynes, J.B. (1995).** Inserting the Ftz homeodomain into engrailed creates a dominant transcriptional repressor that specifically turns off Ftz target genes in vivo. *Development* 121, 1801-1813.
- Jones, P.A., and Laird, P.W. (1999).** Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21, 163-167.
- Joyner, A.L., Herrup, K., Auerbach, B.A., Davis, C.A., and Rossant, J. (1991).** Subtle cerebellar phenotype in mice homozygous for a targeted deletion of the En-2 homeobox. *Science* 251, 1239-1243.
- Joyner, A.L., Skarnes, W.C., and Rossant, J. (1989).** Production of a mutation in mouse En-2 gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 338, 153-156.

- Kanduri, M., Cahill, N., Goransson, H., Enstrom, C., Ryan, F., Isaksson, A., and Rosenquist, R. Differential genome-wide array-based methylation profiles in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 115, 296-305.
- Kanduri, M., Cahill, N., Goransson, H., Enstrom, C., Ryan, F., Isaksson, A., and Rosenquist, R. (2010). Differential genome-wide array-based methylation profiles in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 115, 296-305.
- Kang, G.H., Lee, S., Cho, N.Y., Gandamihardja, T., Long, T.I., Weisenberger, D.J., Campan, M., and Laird, P.W. (2008). DNA methylation profiles of gastric carcinoma characterized by quantitative DNA methylation analysis. *Lab Invest* 88, 161-170.
- Kasper, L.H., Brindle, P.K., Schnabel, C.A., Pritchard, C.E., Cleary, M.L., and van Deursen, J.M. (1999). CREB binding protein interacts with nucleoporin-specific FG repeats that activate transcription and mediate NUP98-HOXA9 oncogenicity. *Mol Cell Biol* 19, 764-776.
- Kawano, S., Miller, C.W., Gombart, A.F., Bartram, C.R., Matsuo, Y., Asou, H., Sakashita, A., Said, J., Tatsumi, E., and Koeffler, H.P. (1999). Loss of p73 gene expression in leukemias/lymphomas due to hypermethylation. *Blood* 94, 1113-1120.
- Kim, B.H., Cho, N.Y., Choi, M., Lee, S., Jang, J.J., and Kang, G.H. (2007). Methylation profiles of multiple CpG island loci in extrahepatic cholangiocarcinoma versus those of intrahepatic cholangiocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 131, 923-930.
- Koleske, A.J., Gifford, A.M., Scott, M.L., Nee, M., Bronson, R.T., Miczek, K.A., and Baltimore, D. (1998). Essential roles for the Abl and Arg tyrosine kinases in neurulation. *Neuron* 21, 1259-1272.
- Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Kroeger, H., Jelinek, J., Estecio, M.R., He, R., Kondo, K., Chung, W., Zhang, L., Shen, L., Kantarjian, H.M., Bueso-Ramos, C.E., *et al.* (2008). Aberrant CpG island methylation in acute myeloid leukemia is accentuated at relapse. *Blood* 112, 1366-1373.
- Kuang, S.Q., Tong, W.G., Yang, H., Lin, W., Lee, M.K., Fang, Z.H., Wei, Y., Jelinek, J., Issa, J.P., and Garcia-Manero, G. (2008). Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia. *Leukemia* 22, 1529-1538.
- La Starza, R., Trubia, M., Crescenzi, B., Matteucci, C., Negrini, M., Martelli, M.F., Pelicci, P.G., and Mecucci, C. (2003). Human homeobox gene HOXC13 is the partner of NUP98 in adult acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Genes Chromosomes Cancer* 36, 420-423.
- Laslo, P., Pongubala, J.M., Lancki, D.W., and Singh, H. (2008). Gene regulatory networks directing myeloid and lymphoid cell fates within the immune system. *Semin Immunol* 20, 228-235.
- Laurent, E., Talpaz, M., Kantarjian, H., and Kurzrock, R. (2001). The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res* 61, 2343-2355.
- Layalle, S., Volovitch, M., Mugat, B., Bonneaud, N., Parmentier, M.L., Prochiantz, A., Joliot, A., and Maschat, F. (2011). Engrailed homeoprotein acts as a signaling molecule in the developing fly. *Development* 138, 2315-2323.
- Lazebnik, Y. (2010). What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer* 10, 232-233.
- Lewis, D.B., Yu, C.C., Forbush, K.A., Carpenter, J., Sato, T.A., Grossman, A., Liggitt, D.H., and Perlmutter, R.M. (1991). Interleukin 4 expressed in situ selectively alters thymocyte development. *J Exp Med* 173, 89-100.
- Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915-926.
- Liu, T.H., Raval, A., Chen, S.S., Matkovic, J.J., Byrd, J.C., and Plass, C. (2006). CpG island methylation and expression of the secreted frizzled-related protein gene family in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 66, 653-658.
- Lozzio, C.B., and Lozzio, B.B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-334.

- Marie, B., Bacon, J.P., and Blagburn, J.M. (2000).** Double-stranded RNA interference shows that Engrailed controls the synaptic specificity of identified sensory neurons. *Curr Biol* 10, 289-292.
- Martin, N.L., Saba-El-Leil, M.K., Sadekova, S., Meloche, S., and Sauvageau, G. (2005).** EN2 is a candidate oncogene in human breast cancer. *Oncogene* 24, 6890-6901.
- Maru, Y., and Witte, O.N. (1991).** The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell* 67, 459-468.
- McGinnis, W., and Krumlauf, R. (1992).** Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68, 283-302.
- McWhirter, J.R., Galasso, D.L., and Wang, J.Y. (1993).** A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* 13, 7587-7595.
- Melki, J.R., Vincent, P.C., and Clark, S.J. (1999).** Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 59, 3730-3740.
- Melki, J.R., Warnecke, P., Vincent, P.C., and Clark, S.J. (1998).** Increased DNA methyltransferase expression in leukaemia. *Leukemia* 12, 311-316.
- Melo, J.V., and Barnes, D.J. (2007).** Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 441-453.
- Millen, K.J., Wurst, W., Herrup, K., and Joyner, A.L. (1994).** Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse Engrailed-2 mutants. *Development* 120, 695-706.
- Morgan, R. (2006).** Engrailed: complexity and economy of a multi-functional transcription factor. *FEBS Lett* 580, 2531-2533.
- Mueller, O., Hahnenberger, K., Dittmann, M., Yee, H., Dubrow, R., Nagle, R., and Ilsley, D. (2000).** A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis* 21, 128-134.
- Mullighan, C.G., Miller, C.B., Radtke, I., Phillips, L.A., Dalton, J., Ma, J., White, D., Hughes, T.P., Le Beau, M.M., Pui, C.H., et al. (2008).** BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 453, 110-114.
- Nedelec, S., Foucher, I., Brunet, I., Bouillot, C., Prochiantz, A., and Trembleau, A. (2004).** Emx2 homeodomain transcription factor interacts with eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in the axons of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10815-10820.
- Nelkin, B.D., Przepiorka, D., Burke, P.J., Thomas, E.D., and Baylin, S.B. (1991).** Abnormal methylation of the calcitonin gene marks progression of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 77, 2431-2434.
- Nowell, P.C. (1962).** The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut* 8, 65-66.
- Nutt, S.L., Heavey, B., Rolink, A.G., and Busslinger, M. (1999).** Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401, 556-562.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999).** DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247-257.
- Okano, M., Xie, S., and Li, E. (1998).** Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 19, 219-220.
- Orkin, S.H. (2000).** Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 1, 57-64.
- Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008).** Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631-644.
- Owens, B.M., and Hawley, R.G. (2002).** HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* 20, 364-379.
- Panagopoulos, I., Isaksson, M., Billstrom, R., Strombeck, B., Mitelman, F., and Johansson, B. (2003).** Fusion of the NUP98 gene and the homeobox gene HOXC13 in acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Genes Chromosomes Cancer* 36, 107-112.
- Peleg, L., and Nesbitt, M.N. (1984).** Genetic control of thymus size in inbred mice. *J Hered* 75, 126-130.

- Peltenburg, L.T., and Murre, C. (1997).** Specific residues in the Pbx homeodomain differentially modulate the DNA-binding activity of Hox and Engrailed proteins. *Development* *124*, 1089-1098.
- Pendergast, A.M. (2002).** The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Adv Cancer Res* *85*, 51-100.
- Pendergast, A.M., Quilliam, L.A., Cripe, L.D., Bassing, C.H., Dai, Z., Li, N., Batzer, A., Rabun, K.M., Der, C.J., Schlessinger, J., et al. (1993).** BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* *75*, 175-185.
- Perez-Caro, M., Cobaleda, C., Gonzalez-Herrero, I., Vicente-Duenas, C., Bermejo-Rodriguez, C., Sanchez-Beato, M., Orfao, A., Pintado, B., Flores, T., Sanchez-Martin, M., et al. (2009).** Cancer induction by restriction of oncogene expression to the stem cell compartment. *EMBO J* *28*, 8-20.
- Perrotti, D., Cesi, V., Trotta, R., Guerzoni, C., Santilli, G., Campbell, K., Iervolino, A., Condorelli, F., Gambacorti-Passerini, C., Caligiuri, M.A., et al. (2002).** BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat Genet* *30*, 48-58.
- Perrotti, D., Jamieson, C., Goldman, J., and Skorski, T. (2010).** Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *J Clin Invest* *120*, 2254-2264.
- Plattner, R., Koleske, A.J., Kazlauskas, A., and Pendergast, A.M. (2004).** Bidirectional signaling links the Abelson kinases to the platelet-derived growth factor receptor. *Mol Cell Biol* *24*, 2573-2583.
- Pui, J.C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Lee, J.Y., Kadesch, T., Hardy, R.R., Aster, J.C., et al. (1999).** Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* *11*, 299-308.
- Purton, L.E., and Scadden, D.T. (2007).** Limiting factors in murine hematopoietic stem cell assays. *Cell Stem Cell* *1*, 263-270.
- Quintas-Cardama, A., and Cortes, J. (2009).** Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* *113*, 1619-1630.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., and Aguet, M. (1999).** Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* *10*, 547-558.
- Ren, R. (2005).** Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* *5*, 172-183.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001).** Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* *414*, 105-111.
- Rodriguez-Paredes, M., and Esteller, M. (2009).** Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* *17*, 330-339.
- Rodriguez-Paredes, M., and Esteller, M. (2011).** Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* *17*, 330-339.
- Roman-Gomez, J., Castillejo, J.A., Jimenez, A., Cervantes, F., Boque, C., Hermosin, L., Leon, A., Granena, A., Colomer, D., Heiniger, A., et al. (2003).** Cadherin-13, a mediator of calcium-dependent cell-cell adhesion, is silenced by methylation in chronic myeloid leukemia and correlates with pretreatment risk profile and cytogenetic response to interferon alfa. *J Clin Oncol* *21*, 1472-1479.
- Rothenberg, E.V. (2011).** T cell lineage commitment: identity and renunciation. *J Immunol* *186*, 6649-6655.
- Rothenberg, E.V., Moore, J.E., and Yui, M.A. (2008).** Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol* *8*, 9-21.
- Rothenberg, E.V., Zhang, J., and Li, L. (2010).** Multilayered specification of the T-cell lineage fate. *Immunol Rev* *238*, 150-168.
- Rush, L.J., Raval, A., Funchain, P., Johnson, A.J., Smith, L., Lucas, D.M., Bembea, M., Liu, T.H., Heerema, N.A., Rassenti, L., et al. (2004).** Epigenetic profiling in chronic lymphocytic leukemia reveals novel methylation targets. *Cancer Res* *64*, 2424-2433.

- Sambrook, J., and Russell, D. (2001).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition edn (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- San Miguel, J.F., and Sanchez-Guijo, F.M. (2009).** HEMATOLOGÍA. Manual básico razonado, 3ª edn.
- Sanchez-Garcia, I., Vicente-Duenas, C., and Cobaleda, C. (2007).** The theoretical basis of cancer-stem-cell-based therapeutics of cancer: can it be put into practice? *Bioessays* 29, 1269-1280.
- Sans-Sabrafen, J., Raebel, C.B., and Corrons, J.L.V. (2007).** Hematología Clínica, 5ª edn.
- Sartor, O., Gregory, F.S., Templeton, N.S., Pawar, S., Perlmutter, R.M., and Rosen, N. (1989).** Selective expression of alternative lck mRNAs in human malignant cell lines. *Mol Cell Biol* 9, 2983-2988.
- Sattler, M., Mohi, M.G., Pride, Y.B., Quinnan, L.R., Malouf, N.A., Podar, K., Gesbert, F., Iwasaki, H., Li, S., Van Etten, R.A., et al. (2002).** Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell* 1, 479-492.
- Savona, M., and Talpaz, M. (2008).** Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 8, 341-350.
- Schebesta, A., McManus, S., Salvagiotto, G., Delogu, A., Busslinger, G.A., and Busslinger, M. (2007).** Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity* 27, 49-63.
- Schwartzberg, P.L., Stall, A.M., Hardin, J.D., Bowdish, K.S., Humaran, T., Boast, S., Harbison, M.L., Robertson, E.J., and Goff, S.P. (1991).** Mice homozygous for the ablm1 mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell* 65, 1165-1175.
- Schwarz, B.A., and Bhandoola, A. (2004).** Circulating hematopoietic progenitors with T lineage potential. *Nat Immunol* 5, 953-960.
- Schwarz, D.A., Katayama, C.D., and Hedrick, S.M. (1998).** Schlafen, a new family of growth regulatory genes that affect thymocyte development. *Immunity* 9, 657-668.
- Selamat, S.A., Galler, J.S., Joshi, A.D., Fyfe, M.N., Campan, M., Siegmund, K.D., Kerr, K.M., and Laird-Offringa, I.A.** DNA methylation changes in atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma in situ, and lung adenocarcinoma. *PLoS One* 6, e21443.
- Shimizu, C., Kawamoto, H., Yamashita, M., Kimura, M., Kondou, E., Kaneko, Y., Okada, S., Tokuhisa, T., Yokoyama, M., Taniguchi, M., et al. (2001).** Progression of T cell lineage restriction in the earliest subpopulation of murine adult thymus visualized by the expression of lck proximal promoter activity. *Int Immunol* 13, 105-117.
- Shiraishi, M., Chuu, Y.H., and Sekiya, T. (1999).** Isolation of DNA fragments associated with methylated CpG islands in human adenocarcinomas of the lung using a methylated DNA binding column and denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2913-2918.
- Simon, H.H., and Alavian, K.N. (2009).** Transcriptional regulation of their survival: the Engrailed homeobox genes. *Adv Exp Med Biol* 651, 66-72.
- Simon, H.H., Thuret, S., and Alberi, L. (2004).** Midbrain dopaminergic neurons: control of their cell fate by the engrailed transcription factors. *Cell Tissue Res* 318, 53-61.
- Soulier, J., Clappier, E., Cayuela, J.M., Regnault, A., Garcia-Peydro, M., Dombret, H., Baruchel, A., Toribio, M.L., and Sigaux, F. (2005).** HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood* 106, 274-286.
- Stewart, M.J., Cox, G., Reifel-Miller, A., Kim, S.Y., Westbrook, C.A., and Leibowitz, D.S. (1994).** A novel transcriptional suppressor located within a downstream intron of the BCR gene. *J Biol Chem* 269, 10820-10829.
- Strathdee, G., Holyoake, T.L., Sim, A., Parker, A., Oscier, D.G., Melo, J.V., Meyer, S., Eden, T., Dickinson, A.M., Mountford, J.C., et al. (2007).** Inactivation of HOXA genes by hypermethylation in myeloid and lymphoid malignancy is frequent and associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 13, 5048-5055.

- Strathdee, G., Sim, A., Parker, A., Oscier, D., and Brown, R. (2006).** Promoter hypermethylation silences expression of the HoxA4 gene and correlates with IgVh mutational status in CLL. *Leukemia* 20, 1326-1329.
- Sugimoto, T. (2003).** [Diversity of BCR and ABL gene breakpoints in chronic myelogenous leukemia]. *Rinsho Ketsueki* 44, 61-64.
- Sugimoto, Y., Muramatsu, H., Makishima, H., Prince, C., Jankowska, A.M., Yoshida, N., Xu, Y., Nishio, N., Hama, A., Yagasaki, H., et al. (2010).** Spectrum of molecular defects in juvenile myelomonocytic leukaemia includes ASXL1 mutations. *Br J Haematol* 150, 83-87.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., and Vardiman, J.W. (2008).** WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues 4th edn (WHO press).
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., et al. (2009).** Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930-935.
- Takahama, Y. (2006).** Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6, 127-135.
- Takai, D., and Jones, P.A. (2002).** Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3740-3745.
- Takeuchi, S., Matsushita, M., Zimmermann, M., Ikezoe, T., Komatsu, N., Seriu, T., Schrappe, M., Bartram, C.R., and Koeffler, H.P.** Clinical significance of aberrant DNA methylation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.*
- Takeuchi, S., Matsushita, M., Zimmermann, M., Ikezoe, T., Komatsu, N., Seriu, T., Schrappe, M., Bartram, C.R., and Koeffler, H.P. (2011).** Clinical significance of aberrant DNA methylation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.*
- Tanis, K.Q., Veach, D., Duewel, H.S., Bornmann, W.G., and Koleske, A.J. (2003).** Two distinct phosphorylation pathways have additive effects on Abl family kinase activation. *Mol Cell Biol* 23, 3884-3896.
- Terskikh, A.V., Easterday, M.C., Li, L., Hood, L., Kornblum, H.I., Geschwind, D.H., and Weissman, I.L. (2001).** From hematopoiesis to neurogenesis: evidence of overlapping genetic programs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7934-7939.
- Thompson, A., Quinn, M.F., Grimwade, D., O'Neill, C.M., Ahmed, M.R., Grimes, S., McMullin, M.F., Cotter, F., and Lippin, T.R. (2003).** Global down-regulation of HOX gene expression in PML-RARalpha + acute promyelocytic leukemia identified by small-array real-time PCR. *Blood* 101, 1558-1565.
- Trowbridge, J.J., Snow, J.W., Kim, J., and Orkin, S.H. (2009).** DNA methyltransferase 1 is essential for and uniquely regulates hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* 5, 442-449.
- Tsou, J.A., Galler, J.S., Siegmund, K.D., Laird, P.W., Turla, S., Cozen, W., Hagen, J.A., Koss, M.N., and Laird-Offringa, I.A. (2007).** Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for lung adenocarcinoma. *Mol Cancer* 6, 70.
- Tybulewicz, V.L., Crawford, C.E., Jackson, P.K., Bronson, R.T., and Mulligan, R.C. (1991).** Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell* 65, 1153-1163.
- Vicente-Duenas, C., Gutierrez de Diego, J., Rodriguez, F.D., Jimenez, R., and Cobaleda, C. (2009a).** The role of cellular plasticity in cancer development. *Curr Med Chem* 16, 3676-3685.
- Vicente-Duenas, C., Perez-Caro, M., Abollo-Jimenez, F., Cobaleda, C., and Sanchez-Garcia, I. (2009b).** Stem-cell driven cancer: "hands-off" regulation of cancer development. *Cell Cycle* 8, 1314-1318.
- Wurst, W., Auerbach, A.B., and Joyner, A.L. (1994).** Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* 120, 2065-2075.

- Wurst, W., and Bally-Cuif, L. (2001).** Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat Rev Neurosci* 2, 99-108.
- Ye, C.C., Echeverri, C., Anderson, J.E., Smith, J.L., Glassman, A., Gulley, M.L., Claxton, D., and Craig, F.E. (2002).** T-cell blast crisis of chronic myelogenous leukemia manifesting as a large mediastinal tumor. *Hum Pathol* 33, 770-773.
- Yu, C.T., Feng, M.H., Shih, H.M., and Lai, M.Z. (2002).** Increased p300 expression inhibits glucocorticoid receptor-T-cell receptor antagonism but does not affect thymocyte positive selection. *Mol Cell Biol* 22, 4556-4566.
- Zhang, X., Subrahmanyam, R., Wong, R., Gross, A.W., and Ren, R. (2001).** The NH₂-terminal coiled-coil domain and tyrosine 177 play important roles in induction of a myeloproliferative disease in mice by Bcr-Abl. *Mol Cell Biol* 21, 840-853.

Apéndice I: LISTA COMPLETA DE GENES IDENTIFICADOS

Gen Identificado	Diferenciación	Constitutivos	Proliferación	Otras Funciones	Regulación Epigenética	Implicados en Cáncer	Regulación Transcripcional	Nº de Clon
SYT3				X				001-t7
IGFBP2			X					002-t7
EPHA10	X			X				009fused(t7direction)
WAS				X				011-sp6
ABLIM2				X				014-(fused)t7
RPL11		X						016-t7
ANKRD6				X				025-t7
STAM	X		X					027-fused-t7
SETMAR					X			029-t7
ADD1a		X						031-t7
Neurl4	X			X				032-t7
c-Myc	X		X			X	X	036-(fused)-t7
SNAPIN				X				039-fused(t7)
MSRA		X						042-t7
RUNX2	X						X	044-t7
IPO8		X						047-t7
RPS27		X						048-t7
FOXD4	X						X	050-t7
BARHL2	X						X	055-t7
SMARCA2					X		X	059-fused(t7)

Gen Identificado	Diferenciación	Constitutivos	Proliferación	Otras Funciones	Regulación Epigenética	Implicados en Cáncer	Regulación Transcripcional	Nº de Clon
TRH				X				060-t7
GMNN			X					062-t7
CHMP4C			X	X				070-fused(t7)
METAP1D		X				X		071-fused-(t7)
UXS		X						073-fused-t7
ALDH1A3		X						076-t7
AKAP12			X	X		X		080-sp6
MAGOH	X	X		X				083-t7
SLIT1	X			X				085-t7
SEPT7		X	X					086-fused-t7
E3 UBI-PROT NEDD4 LIKE				X		X		091-fused-t7
ZKSCAN4				X		X	X	097-fused-t7
BIN3				X				104-t7
MN1				X		X		105-fused-t7
MIA			X			X		111-t7
ERBB4	X		X			X		118-fused-t7
RTTN	X							124-t7
EGFR	X		X			X		133-fused-t7
PNPLA7	X							137-t7
FOXB1				X				145-sp6
NAA38		X						146-t7
RAB8B				X				151-sp6
PDK3		X						154-t7

Gen Identificado	Diferenciación	Constitutivos	Proliferación	Otras Funciones	Regulación Epigenética	Implicados en Cáncer	Regulación Transcripcional	Nº de Clon
WDR86				X				155-t7
OXR1		X						157-t7
hPARG		X						158-fused-t7
LTA4h				X				159-fused-t7
SF3a1		X						163-t7
HES1	X							168-fused- t7
SHH	X					X	X	169-t7
RPL3		X						174-fused
AF9/MLLT3	X				X	X		175-t7
COL4a1				X				182-t7
SAP30					X			187-t7
UBQLN1				X				195-sp6
CTTNBP2		X						200-t7
KBTBD11				X		X		202-t7
DCLRE		X	X					203-fused-t7
SHQ1		X		X				204-sp6
PTGFRN				X				207-t7
SCG5/7B2 PROTEÍN				X				209-sp6
GABRB4				X				210-sp6
DNAJA4				X				212-t7
IPMK				X				217-t7
RN18s1				X				221-t7
SCUBE1				X				222-t7
CHCHD2				X				224-sp6
RSL24D1				X				225-t7

Gen Identificado	Diferenciación	Constitutivos	Proliferación	Otras Funciones	Regulación Epigenética	Implicados en Cáncer	Regulación Transcripcional	Nº de Clon
KIR2DL4				X				227-t7
Alkaline phosphatase		X						230-t7
COL1A2				X				235-t7
DHPS		X						239-sp6
DKK2	X			X		X		240-t7
RPL23AP7								241-sp6
BNC2	X			X			X	242-t7
ARHGEF7		X		X				244-sp6
CD300A				X				245-fused-t7
DSCAML1				X				246-sp6
PAX7	X					X	X	247-t7
NXPH1				X				259-t7
PRDM8							X	260-sp6
SLFN12L	X			X				261-sp6
CHP		X						263-fused-t7
DCTN4				X				265-fused-t7
PSMB4				X				268-fused-t7
CDC27			X					270-fused-t7
ETF1		X						272-fused-t7
OXA1L		X						274-sp6
GTF3C1		X						276-sp6
BARD1			X	X		X		277-t7
TRAF4AF1				X				278-t7
UMPS		X						279-fused-t7

Gen Identificado	Diferenciación	Constitutivos	Proliferación	Otras Funciones	Regulación Epigenética	Implicados en Cáncer	Regulación Transcripcional	Nº de Clon
GRASP		X						281-t7
SMYD4	X						X	282-sp6
NCAM2	X			X				285-sp6
ENGRAILED-2	X			X			X	287 fused from PAC seq
CXCR4	X			X				288-sp6
CASC1				X		X		290-t7
CDH13			X	X		X		291-fused-t7
SUN3				X				294-sp6
RBM38	X		X					296-t7
CHMP2B				X				300-t7
RB1			X			X	X	301-t7
METTL1				X				302-t7
STAB2				X				304-t7
TIAM1				X		X		305-sp6
SMTNL2				X				308-fused-t7
MTRNR2L8				X				314-t7
CEP97				X				320-t7
CTNBL1				X				321-t7
SLC43A3				X				322-sp6
EXOSC7				X				330-sp6
NRP2	X					X		331-t7
HSPA4				X				332-t7
six1	X						X	335-fused-t7
trip4				X			X	336-sp6
MOBP				X				343-t7

Gen Identificado	Diferenciación	Constitutivos	Proliferación	Otras Funciones	Regulación Epigenética	Implicados en Cáncer	Regulación Transcripcional	Nº de Clon
CREB3L2	X						X	346-t7
HOXC13	X						X	347-sp6
EP400		3			X			350-t7
PFKM		X		X				357-sp6
POTEI				X				358-sp6
HOXA13	X						X	364-t7
CENPW			X					366-sp6
DHPS		X		X				367-sp6
NTF3	X			X				379-sp6
COX7A2L		X				X		380-fused-t7
PIH1D1				X				382-sp6
ZNF704				X				383-sp6
GABBR1				X				385-sp6
EXO1		X						386-sp6
EPOR	X		X					391-fused-t7
ALDH1A3		X						392-sp6
COL3A1				X				393-fused-t7
NDUFA2		X						401-fused-t7
FOXO3	X					X	X	404-t7
C2orf28	X			X				405-t7
TFCP2	X						X	406-t7
TRIM46				X				407-sp6
NASP			X					408-t7
SETDB1					X			409-t7
TOPORS			X	X		X		410-t7
POLE			X					414-sp6

Gen Identificado	Diferenciación	Constitutivos	Proliferación	Otras Funciones	Regulación Epigenética	Implicados en Cáncer	Regulación Transcripcional	Nº de Clon
MATR3				X				416-t7
LHX9	X						X	417-t7
PDE7A				X				420-t7
MLLT6				X		X		422-fused-t7
CFTR				X				425-fused-t7
PRKCG				X				426-t7
EPAS1				X			X	427-t7
ZNF765							X	431-t7
SYBU				X				434-sp6
CD3 zeta				X				436-sp6
acyl-coenzyme A oxidase-like protein		X						437-sp6
AQPEP				X				441-fused-t7
KLC4		X						442-sp6
NR2E1	X			X				443-t7
ELMOD2				X				444-fused-t7
IRF2Bp1				X			X	446-t7
NETO1				X				448-t7
PTTG1IP				X		X		449-t7
SERBP1		X						452-t7
HOXA1	X						X	455-sp6
NME7		X						456-t7
MNAT1			X					458-t7
RPL23		X						460-t7
ST3GAL5	X		X					466-sp6
MTRNR2L6				X				469-t7
CATSPERG				X				479-t7

Gen Identificado	Diferenciación	Constitutivos	Proliferación	Otras Funciones	Regulación Epigenética	Implicados en Cáncer	Regulación Transcripcional	Nº de Clon
Rinchik				X				480-t7
GSE1				X				481-fused-t7
AGFG1				X				484-sp6
THBS1				X		X		488-t7
RGL2				X				492-t7
KLC4		X						497-fused-t7
PER1				X				498-t7
UBE2E1		X						500-t7
BRWD1			X	X			X	501-sp6
WASH3P				X				502-t7
NEFM				X				505-t7
ELOVL1		X						506-t7
COG1				X				512-t7
CAV2		X		X				513-sp6
SPTLC3		X						515-sp6
CCL28				X				516-t7
HS1BP3				X				520-fused-t7
PGM5		X						525-sp6
CRYM				X				528-sp6
XRCC6	X							529-sp6
histone H4		X						534-t7
RBFOX1	X							537-t7
PBX4	X						X	538-t7
KDM3A					X			540-t7
FAM157C				X				547-t7

Gen Identificado	Diferenciación	Constitutivos	Proliferación	Otras Funciones	Regulación Epigenética	Implicados en Cáncer	Regulación Transcripcional	Nº de Clon
ANXA8L2				X		X		550-t7
IGFBP2	X			X				551-t7
ERCC-1				X		X		556-sp6
MCC			X	X		X		558-sp6
LAPTM4A				X				559-fused-t7
squalene monooxygenase		X						560-t7
SETD7					X			561-t7
NME7		X						563-t7
PSMB4		X						564-fused-t7
RCN2				X				570-t7
MafB	X					X	X	580-t7
EIF5B		X						584-sp6
ACTR1A				X				588-t7
VWC2L				X				589-t7
MAD1L1			X			X		593-t7
ALG1L		X						595-t7
GNMT				X				596-t7
ZNF12	X						X	597-t7
NEK8			X					601-t7
DLC1				X		X		603-t7
KCNQ5				X				604-t7
LRRC16A				X				605-t7

Gen Identificado	Diferenciación	Constitutivos	Proliferación	Otras Funciones	Regulación Epigenética	Implicados en Cáncer	Regulación Transcripcional	Nº de Clon
ABT1		X						607-fused-t7
TOTALES	45	53	27	118	8	32	29	312

Abreviaturas

- APC; *"Allophycocyanin"*
- CB; Crisis Blástica
- cDNA; DNA Codificante
- CLP; *"Common Lymphoid Progenitor"*
- CMP; *"Common Myeloid Progenitor"*
- CpG; Citosina y Guanosina unidas por un enlace fosfodiéster
- CSC; *"Cancer Stem Cells"*
- DNA; *"Deoxyribonucleic acid"*
- ELP; *"Early Lymphoid progenitor"*
- ETP; *"Early Thymic Progenitor"*
- FACS; *"Fluorescent-Activated Cell Sorting"*
- FAG; Fosfatasa Alcalina Granulocitaria
- FITC; *"Fluorescein isothiocyanate"*
- GMP; *"Granulocyte Macrophage progenitor"*
- HMBD; *"Histidine Methyl Binding Domain"*
- HSC; *"Hematopoietic Stem Cell"*
- IP; Ioduro de Propidio
- LMA; Leucemia Mieloide Aguda
- LMC; Leucemia Mieloide Crónica
- LMPP; *"Lymphoid- Primed multipotent progenitor"*
- MAO; Monoaminooxidasa
- MHC; *"Major Histocompatibility Complex"*
- MPW; Agua ultra pura Millipore
- PCR; *"Polymerase Chain Reaction"*
- PE; *"Phycoerythrin"*
- Ph; Cromosoma Filadelfia
- RCLB; *"Red Cell Lysis Buffer"*
- RT-PCR; *"Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction"*
- SNC; Sistema Nervioso central
- SRB; *"Sheep Red Blood Cells"*
- TCR; *"T cell Receptor"*
- WT; *"Wild type"*

