

Tesis Doctoral



Role of Mesenchymal Stromal Cells and their Extracellular Vesicles microRNAs in JAK2 Myeloproliferative Neoplasms

Directores

Prof^ª. Dra. M^a Consuelo Del Cañizo

Dr. Fermín Sánchez-Guijo

Dr. Luis Ignacio Sánchez-Abarca



Teresa da Conceição Lopes Ramos

Salamanca, 2016

Prof^a. Dra. María Consuelo Del Cañizo Fernández-Roldán, con D.N.I. 03404639H, Profesora Catedrática de Hematología y Hemoterapia de la Universidad de Salamanca (USAL) y Jefa de Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario de Salamanca (HUS).

Dr. Fermín Sánchez-Guijo Martín, con D.N.I. 07869479Y, Profesor Asociado de Ciencias de la Salud de la Universidad de Salamanca (USAL) y Responsable del Área de Terapia Celular y Hematopoyesis del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca (HUS).

Dr. Luis Ignacio Sánchez-Abarca Bernal con D.N.I. 07865299N Doctor en Farmacia e Investigador Posdoctoral en la Fundación Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca (IBMCC)

CERTIFICAN

que han dirigido esta Tesis Doctoral titulada ***"Role of Mesenchymal Stromal Cells and their Extracellular Vesicles microRNAs in the JAK2 Myeloproliferative Neoplasms"*** realizada por Dña. Teresa C. Lopes Ramos, que obtuvo su Diploma de Estudios Avanzados en la Universidad de Salamanca (USAL), a través del programa de Programa de Doctorado en Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional (CiC-IBMCC).

Y AUTORIZAN

la presentación de la misma, considerando que reúne las condiciones de originalidad y contenidos requeridos para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

En Salamanca, a 5 de Julio de 2016

Prof^a Dra. M. C. Del Cañizo

Dr. F. Sánchez-Guijo

Dr. L.I. Sánchez-Abarca

ÍNDICE

| | | |
|--|-------|-----------|
| Lista de Abreviaturas | | 4 |
| <u>Introducción</u> | | 9 |
| 1. Hematopoyesis | | 9 |
| 1.1 Micromedioambiente | | 11 |
| 2. Las Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) | | 13 |
| 2.1 Microambiente tumoral en las NMP | | 16 |
| 2.2. Vesículas Extracelulares | | 17 |
| <u>Hipótesis de Trabajo</u> | | 19 |
| <u>Resumen de la Metodología y Resultados</u> | | 20 |
| 1. Alteraciones funcionales y expresión génica de las células mesenquimales estromales de pacientes con neoplasias mieloproliferativas. | | 20 |
| 2. Estudios del efecto de las JAK2V617F-MSK sobre progenitores hematopoyéticos. | | 23 |
| 3. La sobre-expresión de HDAC8 en células mesenquimales estromales de pacientes con neoplasias mieloproliferativas JAK2+ ¿Una nueva diana terapéutica? | | 29 |
| 4. Las vesículas extracelulares pueden estar implicadas en la comunicación entre estroma y células progenitoras hematopoyéticas en las neoplasias mieloproliferativas. | | 35 |
| <u>Conclusiones</u> | | 38 |
| Bibliografía | | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS

A

AGM: aorta-gonad mesonephros

AML: Acute Myeloid Leukaemia

ANGPT1: Angiopoietin 1

APC: allophycocyanin

B

BM: bone marrow

BFU-e: burst forming unit-erythroid

BMP: bone morphogenetic protein

BCR-ABL: Breakpoint cluster region – Abelson murine leukaemia

BSA: Bovine serum albumin

BMP2: Bone morphogenetic protein-2

C

CD: Cluster of Differentiation

CAR cells: CXCL12-abundant reticular cells

CXCR4: C-X-C chemokine receptor type 4

CARL: Gene encoding calreticulin

CFU-GEMM: Colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte

CXCL12: Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 12 or stromal cell-derived factor 1 (SDF1)

CML: Chronic Myeloid Leukaemia

CM: conditioned medium

CCL3: Chemokine (C-C motif) ligand 3

D

DNMT3A: DNA cytosine methyltransferase 3A

DNA: Deoxyribonucleic acid

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium

E

EC: Endothelial cells

ECM: Extracellular matrix

ET: Essential Thrombocythemia

EZH2: Enhancer of zeste homolog 2

EV: Extracellular Vesicles

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid

F

FITC: Fluorescein isothiocyanate

FBS: Fetal bovine serum

G

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

H

HSC: Hematopoietic stem cells

HPC: Hematopoietic progenitor cells

HIF-1 α : Hypoxia-inducible transcription factor 1- α

HDAC8: Histone Deacetylase 8

I

IDH1/2: Isocitrate dehydrogenase 1 and 2

IL: Interleukin

ISCT: International Society for Cellular Therapy

IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium

J

JAK2: Janus Kinase 2

JAG-1: Jagged 1

L

LSC: leukemic stem cells (LSC)

LT-HSC: Long term – Haematopoietic Stem Cells

LTBMC: Long-term bone marrow cultures

M

MSC: Mesenchymal stromal cells

MPP: Multipotent progenitor cells

MPN: Myeloproliferative neoplasms

MKs: Megakaryocytes

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MDS: Myelodysplastic syndrome

MPL: Proto-oncogene – thrombopoietin receptor

MIF: Mean fluorescence intensity

MVB: Multivesicular bodies

MNC: Mononuclear cells

MFC: Multiparametric flow cytometry analysis

N

NF- κ B: Nuclear factor κ B

NTB/BCIP: Nitroblue tetrazolium chloride / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate

NTA: Nano-particle tracking analysis

O

OSTB: Osteoblast

P

PL: Plate lysate

PTH: Parathyroid hormone

Ph: Philadelphia chromosome

PB: Peripheral blood

PV: Polycythemia Vera

PMF: Primary Myelofibrosis

PD: Population doublings

PCR: Polymerase chain reaction

PE: Phycoerythrin

PerCP: Peridinin chlorophyll protein

PI3K: Phosphatidylinositol-3'-kinase

R

ROS: Reactive oxygen species

RUNX2: Runt-related transcription factor 2

RNA: Ribonucleic acid

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

S

SCF: Stem Cell Factor

SPP1: Secreted phosphoprotein 1

SOCS: Suppressors of cytokines signalling

STAT3/5: Signal transducer and activator of transcription 3/5

T

THPO: Thrombopoietin

Tie-2: Receptor tyrosine kinase of the Tie family

TGF- β : Transforming growth factor- β ()

TET1: Tet Methylcytosine Dioxygenase 1

TNF α : Tumour necrosis factor α

TEM: Transmission electron microscopy

V

VCAM-1: Vascular cell adhesion protein 1

W

WHO: World Health Organization

INTRODUCCIÓN

1. Hematopoyesis

La hematopoyesis es el proceso fisiológico responsable de la formación de células sanguíneas maduras a partir de una célula precursora pluripotente (*stem cell*) hematopoyética (CPH). La sangre es uno de los tejidos con mayor capacidad regenerativa, originándose más de un billón de células sanguíneas al día (*Emerson, et al 1987*).

En adulto, CPH se encuentran en la médula ósea (MO) y tiene capacidad de diferenciación a precursores del linaje mieloide y linfoide, y además mantiene la capacidad de auto-renovación (*Galloway and Zon 2003*).

La CPH se caracteriza por la expresión de distintos marcadores de membrana. El CD34 es el más importante y las CPH carecen de marcadores específicos de línea. La maduración de los precursores hematopoyéticos está asociado con dos procesos fundamentales que son la reducción de la auto-renovación y la adquisición de un fenotipo de linaje específico (**Figura 1**) (*Doulatov, et al 2012, Notta, et al 2011*).

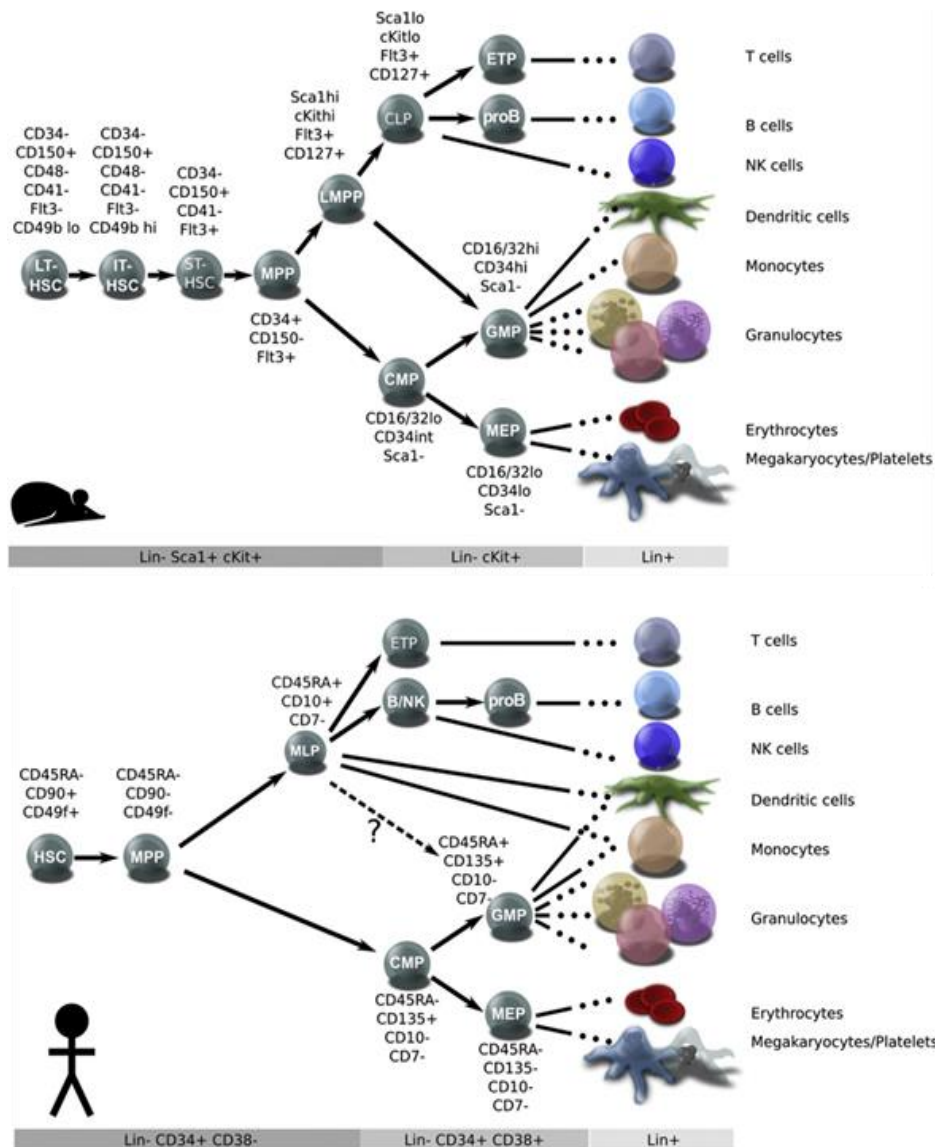


Figura 1: Modelo actual de organización jerarquizada del sistema hematopoyético. Figura tomada del trabajo desarrollado por Doulatov y colaboradores. *Cell stem Cell* (2012) (Doulatov, et al 2012).

El funcionamiento normal de la hematopoyesis resulta del equilibrio fisiológico entre la quiescencia, diferenciación, migración y apoptosis de la CPH como respuesta de la interacción entre mecanismos intracelulares y la influencia del microambiente, donde se desarrollan las células hematopoyéticas.

1.1 Micromedioambiente

En los años 70, Friedenstein y colaboradores, propusieron por primera vez la idea de la existencia en la MO de una población de células no hematopoyéticas, el estroma, que tiene la capacidad de mantener las propiedades de las células *stem* (Friedenstein, et al 1966). El estroma es una estructura compleja altamente vascularizada que contiene células estromales y elementos de la matriz extracelular.

La identificación de las células del nicho hematopoyético responsables del mantenimiento de las CPH, es una tarea complicada debido a su ubicación dentro del tejido óseo. Además se suma la dificultad añadida de determinar marcadores específicos que identifiquen las subpoblaciones de células estromales y los cambios dinámicos de marcadores genéticos que ocurren durante la diferenciación de los linajes mesenquimales.

Clásicamente se han descrito dos tipos de nicho:

- El primero localizado en la zona del endostio, donde los osteoblastos representan la población principal. Se denomina como nicho endosteal. Se ha postulado que éste nicho mantiene las CPH en estado quiescente (Arai, et al 2004, Calvi, et al 2003). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la importancia de esta población en el mantenimiento de la hematopoyesis. Los osteoblastos y las células osteoprogenitoras producen citoquinas importantes para la expansión de progenitores mieloides como G-CSF, GM-CSF, IL-6, IL-1 y TGF- β (Lam and Adams 2010). La osteopontina (OPN), angiopoyetina 1 (vía Ang1/Tie2) y la trombopoyetina (vía THPO/Mp1) son otras proteínas secretadas por esta población, que también juegan un importante papel en el mantenimiento de las CPH en estado quiescente (Wilson, et al 2009, Yoshihara, et al 2007).

La expresión del ligando CXC-Quimiocina 12 o factor 1 derivado del estroma (CXCL12 o SDF1) por las células que componen el estroma es crucial para el anidamiento y mantenimiento de las CPH en la MO. En modelos murinos se ha demostrado que la supresión condicional de CXCL12 en osteoprogenitores conduce a la movilización de progenitores hematopoyéticos de la

MO a la sangre periférica y al bazo, demostrando la importancia de esta citoquina en la hematopoyesis (*Calvi, et al 2003, Mishima, et al 2010*).

- El nicho vascular representa el otro componente importante del nicho hematopoyético. Estudios histoquímicos, utilizando marcadores de la familia SLAM, localizaron una población de CPH ubicadas en las inmediaciones de las células endoteliales sinusoidales. Distintos autores han demostrado la capacidad que tienen estas células de mantener la hematopoyesis. Además expresan citoquinas como CXCL12 y moléculas de adhesión celular como E-selectina y VCAM-1, que son importantes en la movilización, injerto y alojamiento de las CPH en la MO (*Winkler, et al 2012, Winkler, et al 2010*).

Recientes estudios han puesto de manifiesto la influencia de otros componentes celulares en el mantenimiento de las CPH en la MO, tales como: células progenitoras mesenquimales (CPM) inervadas por el sistema nervioso simpático, que presentan una alta expresión de receptores adrenérgicos tipo β_3 , CXCL12 y una proteína identificada en células madre neurales denominada nestina, células de Schwann y células reticulares localizadas cerca de los sinusoides, que derivan de células madre mesenquimales y que expresan niveles elevados de CXCL12 (células CAR) (*Mendez-Ferrer, et al 2010, Omatsu, et al 2010, Sacchetti, et al 2007*).

Se ha sugerido, que el nicho osteoblástico es clave en el mantenimiento de los progenitores comprometidos, mientras que el nicho vascular (espacio perivascular) es el responsable del mantenimiento de las CPH y de los progenitores mieloides (**Figura 2**) (*Schepers, et al 2015*).

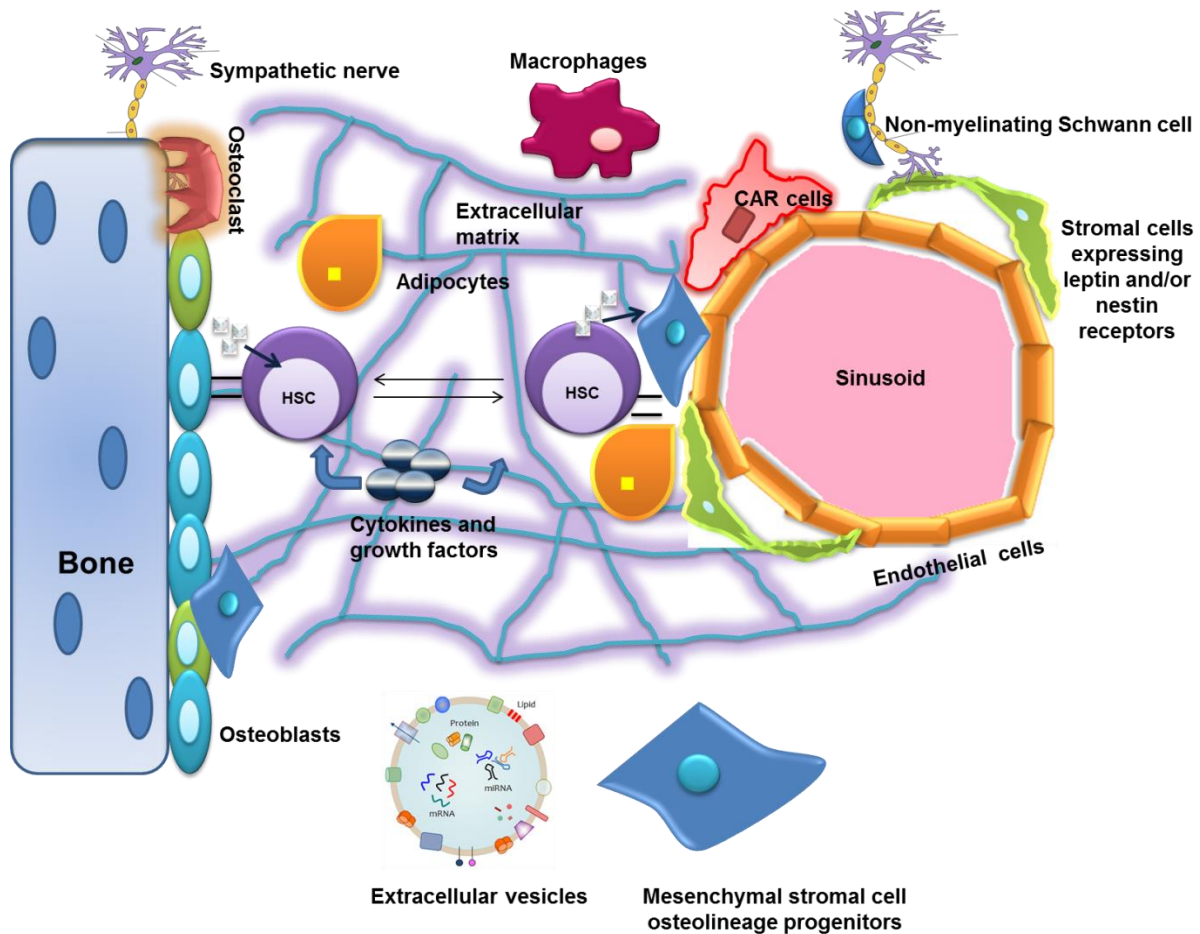


Figura 2: Componentes del nicho hematopoyético. Podemos identificar distintos tipos celulares de origen mesenquimal que constituyen el nicho osteoblástico y vascular

2. Las Neoplasias Mieloproliferativas (NMP)

Las NMP fueron inicialmente descritas por Dameshek en 1951, como enfermedades del sistema hematopoyético mielóide con cuadros clínico-patológicos diferentes entre sí, pero que compartían algunas características (*Dameshek 1951*). En 2008 la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto una serie de criterios de diagnóstico, donde clasifica las NMP como enfermedades clonales hematopoyéticas en las que se observa una proliferación no controlada de una o más linajes de la serie mielóide (*Tefferi, et al 2007*).

Tradicionalmente, las NMP se han clasificado en neoplasias Ph positivas donde se encuentra la Leucemia Mieloide Crónica (LMC) y las que no presentan el transcrito BCR-ABL (NMP Ph negativas) donde se encuadran la Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Esencial (TE) y la Mielofibrosis idiopática o primaria (MFP). Todas estas enfermedades tiene su origen en una célula pluripotencial hematopoyética (*Nowell 1962*).

En el año 2005, cinco grupos de investigación, de manera independiente describieron la presencia de una mutación somática en el gen JAK2 (*Baxter, et al 2005, James, et al 2005, Kralovics, et al 2005, Levine, et al 2005*). Janus kinase 2 o *Just another kinase 2* (JAK2) codifica para una tirosina kinase (TK) de localización citoplasmática y nuclear que está implicada en distintas vías de señalización fundamentales en la biología de las células hematopoyéticas, especialmente en la vía JAK-STAT (*Ihle, et al 1998, Parganas, et al 1998*). La actividad catalítica quinasa reside en el dominio TK carboxterminal o JH1 (JAK homology 1), hacia el extremo aminoterminal, se localiza el dominio JH2 (pseudoquinasa). Esta pseudoquinasa ejerce una función autoinhibitoria de la actividad TK (*Huang, et al 2001*). La mutación somática en el gen JAK2, consiste en una sustitución puntual de una Valina por una Fenilalanina en la posición 617 de JAK2 (V617F), como consecuencia del cambio 1849G>T en el exón 14 del gen (**Figura 3**). La mutación V617F afecta al dominio pseudoquinasa JH2 causa la pérdida de su función autoinhibitoria, haciendo que JAK2 permanezca constantemente activa (*Zhao, et al 2005*). Esto confiere a las células hematopoyéticas una hipersensibilidad a citoquinas y un crecimiento independiente de estas (*Gadina, et al 2001*). Además se ha descrito que esta mutación da lugar a la activación de múltiples vías de señalización intracelular, como JAK-STAT, MAPK y PI3K-AKT (*Levy and Darnell 2002, Staerk and Constantinescu 2012*).

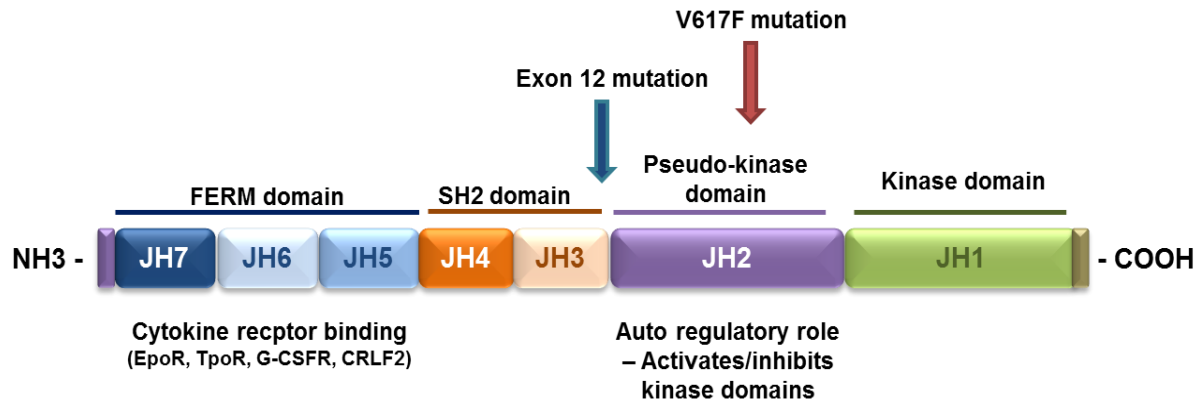


Figura 3: Estructura de JAK2, dividida en dominios. La mutación V617F afecta al dominio pseudoquinasa (JH2)

La presencia de la mutación JAK2V617F fue incorporada como criterio de diagnóstico mayor, por la OMS, en las NMP Ph negativas. La mutación JAK2V617 se detecta en el 90-95% de los pacientes con PV, 60% en los pacientes con TE y con MFP (*Barbui, et al 2015, Tefferi, et al 2007*).

Se han descrito además mutaciones en el *exón* 12 del gen JAK2 en caso de pacientes con PV negativos para JAK2V617F. Mutaciones en el gen que codifica el receptor de la trombopoyetina MPL se han descrito en el 5% de MFP y en el 1% de TE.

Recientemente se han descrito mutaciones en el gen que codifica la proteína calreticulina (CALR) que se localiza en el retículo endoplasmático (*Nangalia, et al 2013*). Las mutaciones CARL están presentes en el 50-70% de los pacientes con TE y MFP que no son portadores de mutaciones en JAK2 ni en el gen MPL (*Gianelli, et al 2014*).

2.1 Microambiente tumoral en las NMP

En los últimos años se ha puesto de manifiesto el importante papel del estroma en el mantenimiento de las células *stem* leucémicas (CSL). Se sugiere por tanto, que la progresión y el mantenimiento de las NMP se debe a la comunicación bidireccional entre las células del nicho y las CSL.

Dicho efecto está influenciado por los siguientes factores (**Figura 4**):

1. Daño neuroglial: los procesos inflamatorios como la producción de IL-1 por las células leucémicas induce daño en las neuronas del sistema nervioso simpático llevando a un agotamiento de las MSC Nestina⁺ y a la progresión de la enfermedad (*Arranz, et al 2014*).
2. Producción alterada de citoquinas pro-inflamatorias: las CSL generan un ambiente inflamatorio provocado por la producción de IL-6 e IL-1 α que puede inducir la disminución de la expresión de CXCL12 en las células MSC y al mismo tiempo aumentar la proliferación de estas células. La remodelación de las MSC resulta en una subexpresión de los osteoblastos que aumentan la expresión de IL-1 y de TNF- α induciendo una producción aberrante de células mieloides, generando un círculo vicioso (*Schepers, et al 2015, Schepers, et al 2013*). -

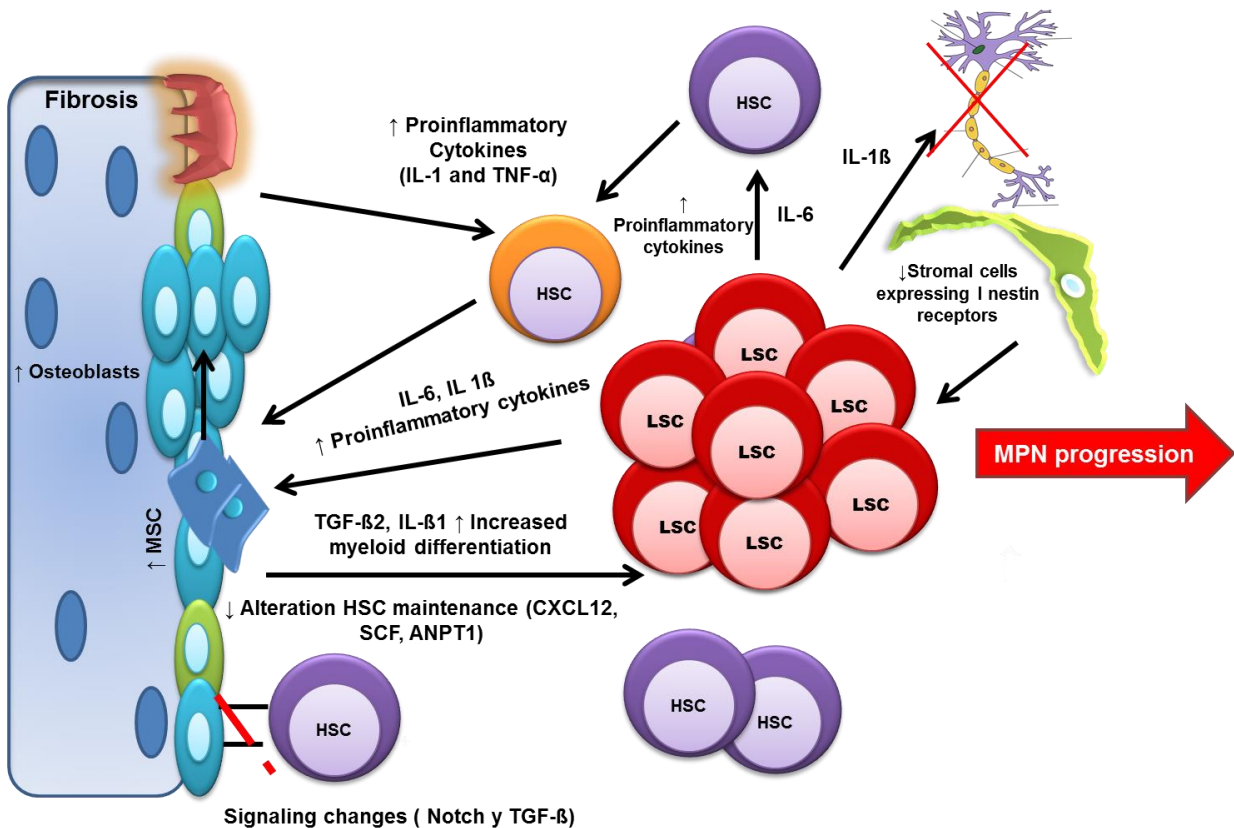


Figura 4: Modelo esquemático del nicho hematopoyético en las NMP.

2.2. Vesículas Extracelulares

La homeostasis de la hematopoyesis está basada en la capacidad que tienen las células de intercambiar información. Los mecanismos más estudiados de comunicación intercelular están relacionados con el establecimiento de un contacto directo entre células (conexiones sinápticas, nanotubos y “gap junctions”) y la liberación de moléculas solubles como citoquinas (Raimondo, et al 2015).

En los últimos años se ha propuesto otro mecanismo de comunicación intercelular basada en la secreción y transferencia de distintos tipos de vesículas, denominadas vesículas extracelulares (VE). Estas estructuras pueden funcionar como transportadores de diversas moléculas

bioactivas como son los lípidos, proteínas y material genético (mRNA, microRNA y DNA) *(Yanez-Mo, et al 2015)*.

Se ha descrito la presencia de estas vesículas tanto en fluidos corporales (sangre y orina) como en el medio extracelular de células en cultivo.

Dependiendo de su origen subcelular, tamaño y composición se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- Las microvesículas (MV) que se originan en la superficie de la membrana plasmática y que su tamaño puede variar entre 100nm y 1µm de diámetro.
- Los exosomas con tamaños más pequeños (30 y 100nm) y que tiene origen endosomal *(Yanez-Mo, et al 2015)*.

Numerosos estudios han puesto en evidencia las implicaciones de las VE en la transferencia bidireccional de información entre las células neoplásicas y el estroma. Por tanto las VE pueden inducir cambios en la proliferación celular, angiogénesis, remodelación de la matriz extracelular, metástasis y el escape al sistema inmune.

Publicaciones recientes de nuestro grupo de investigación han mostrado cómo las VE liberadas por células tumorales (BCR-ABL⁺) transportan el oncogén y que este oncogén se puede incorporar a células endoteliales, pudiendo expresar tanto el oncogén como la oncoproteína *(Ramos, et al 2015)*. Además, también comprobamos que las VE liberadas por células MSC procedentes de pacientes con síndromes mielodisplásicos transportan microRNA-10a y 15a y que tiene la capacidad de inducir cambios funcionales en las células progenitoras hematopoyéticas *(Muntion, et al 2016)*.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las neoplasias mieloproliferativas (NMP) son causadas por una mutación clonal en la células madre hematopoyéticas. La mutación JAK2V617F está presente en pacientes con policitemia vera (PV) y trombocitemia esencial (TE), entidades con características clínicas y biológicas muy diferentes. Además, el microambiente del estroma de la médula ósea ejerce un papel protagonista en la supervivencia, la proliferación y la resistencia a la quimioterapia de las células madre leucémicas. Por tanto, las características de las células estromales de pacientes con PV y TE JAK2+ podrían ser diferentes y justificar algunos cambios observados en la fisiopatología de estas entidades.

El objetivo principal de esta tesis es estudiar las características funcionales y genómicas de las células estromales mesenquimales de pacientes con NMP (JAK2) y las interacciones que se establecen entre el estroma patológico y las células hematopoyéticas.

Objetivos específicos:

1. Analizar las alteraciones fenotípicas, la capacidad de proliferación y diferenciación de las MSC procedentes de MO en pacientes con NMP (JAK2V617F).
2. Analizar la existencia de alteraciones genómicas en las MSC procedentes de pacientes con NMP y compararlas con MSC procedentes de donantes sanos.
3. Evaluar si las MSC procedentes de pacientes NMP son capaces de mantener la hematopoyesis sana y patológica.
4. Identificar los genes alterados y las vías de señalización de las MSC-NPM, verificando la posibilidad de emplearlos como futuras dianas terapéuticas.
5. Comparar el contenido de microARN en las vesículas extracelulares liberadas por las MSC de donantes sanos y pacientes con NMP. Estudiar las alteraciones funcionales que pueden inducir cuando se incorporan a las células progenitoras hematopoyéticas.

RESUMEN DE LA METODOLOGÍA Y RESULTADOS

1. Alteraciones funcionales y expresión génica de las células mesenquimales estromales de pacientes con neoplasias mieloproliferativas.

Material y Métodos: Se aislaron y expandieron MSC de MO de pacientes con la mutación JAV617F (PV y TE) y donantes sanos (DS). En fase 3, se realizó el estudio inmunofenotípico (por citometría de flujo) y se analizó la capacidad de diferenciación osteogénica y adipogénica. Se estudió el patrón de expresión génica mediante microarrays (Affymetrix de oligonucleótidos HuGene-1.0-st-v1). La extracción de ARN se realizó mediante el método de tiocianato-fenol-clororformo. Para el estudio de las vías de señalización se utilizó la plataforma DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7)

Resultados: Las MSC de los pacientes presentaron una morfología, una capacidad de proliferación y una capacidad de diferenciación similar a las de los DS.

El análisis fenotípico de las MSC, en todos los casos se alcanzó una pureza superior al 98%. Fueron negativas para los antígenos hematopoyéticos y positivos para los antígenos CD73, CD90, CD166 y CD105. Al comparar la intensidad de fluorescencia de los antígenos de las MSC se observó una mayor expresión de CD73, CD90 y CD44 y una menor expresión de CD105 en las MSC de pacientes en relación a las MSC de DS (**Figura 5**).

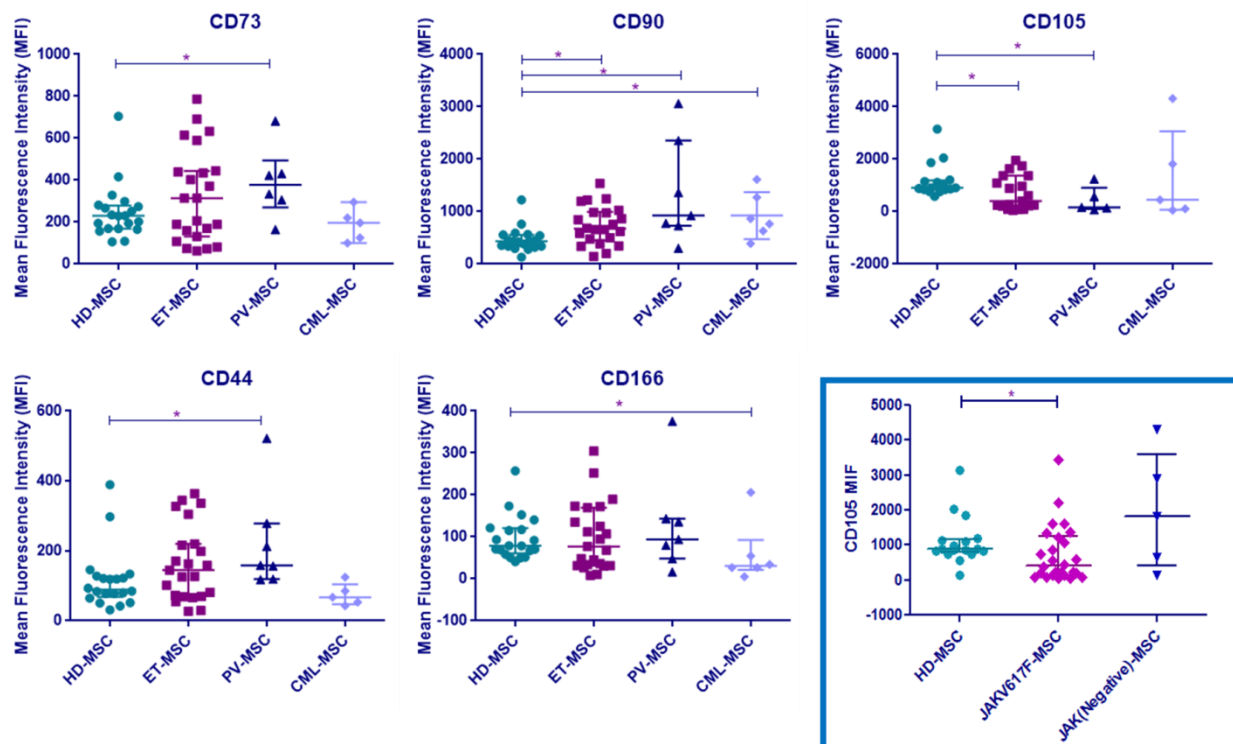


Figura 5: Diferencias en la expresión por citometría de flujo entre las MSC de pacientes y controles.

HD-MSc: Donantes Sanos, ET-MSc: Trombocitemia esencial, PV-MSc: Policitemia Vera y CML-MSc: Leucemia mieloide crónica. MIF – Mean Fluorescence Intensity. (* $p < 0.05$).

En relación a la expresión genética se identificaron una serie de genes sobreexpresados al compararlas con DS. Dichos genes están implicados en vías de señalización de transporte de proteínas y vesículas, complejo del retículo endoplasmático, actividad GTPasa, proliferación y apoptosis. Se identificaron 157 genes en la PV, 36 genes en la TE que están diferencialmente expresados y presentan diferencias significativas frente a las MSC de DS (**Tabla 1**).

Tabla 1: Perfil de expresión genética en las CSM de pacientes con PV y TE vs las CSM de donantes sanos.

Policitemia vera

Sobreexpresados: RAC2, PRPS1, SLC16A2, ADAM19, RP11-354P17.1, TMEM106A, RAB15, RPS26, ATP6V1G2, TGFBI, TMEM173, LDOC1, **RP11-249L21.3**, C16orf57, PRAF2, MEOX2, AC004967.6, TMEM104, EMD, PPT2, COX8A, **FIGU**, **MYADM**, KDELR3, DCAKD, **MLF2**, CDA, TAGLN2, RBMS2, AC007842.1, PPME1, ATP5J2, PLSCR3, CYB561D2, AC084031.2, **SPRYD4**, PEX11B, PLEKHO1, ALG3, OAZ2, PLP2, RAB1B, G6PC3, PLEK2, ZYX, DAG1, PIGS, TNFAIP1, **RP11-369J21.2**, **SDHC**, C16orf70, ZC4H2, **SCAMP2**, TMEM110, RHOG, LYPLA2P1, ZDHHC12, ANO10, SLC9A3R1, TRAPPC1, ABHD5, KIAA1191, C12orf32, RHOC, TEX261, WSB2, PFN1, OBFC2B, SLC4A8, UBE2A, EYA3, PTPRB, PDZD11, TMEM127, PTMS, C18orf10, **RBM4B**, SUOX, C16orf61, C17orf63, C16orf13, RPL10, TXNL4B, HOXA1, HDAC8, ORMDL2, SAP130, PSME3, TPI1, TMEM177, KDELR1, ARF3, GNG5, TIMM22, ATP5SL, **PPP6C**, CINP, TRMT2B, ZSWIM3, S100A11, TMEM214, POLR2D, CFL1, GRPEL1, SSBP3, AC012652.1, NCSTN, CS, ALG8, **GORASP2**, SAE1, BFAR, KIAA0090, TM9SF4, CRADD, **GMEB1**, RNF34, FKBP10, **ASB8**, UBAP2, WRAP53, RNASEK, DYNLRB1, VAPB, KDELR2, KPNA6, PSMB2, COPS3, FDXACB1, EIF2C1, RAB5C, UBE2Q1, GSTTP2, STT3A, MYL12B, EXT2, AL079307.1, EXD2, Y_RNA, OR5H1, OR1E2

Infraexpresados: **SURF6**, NTN1, AC137932.3, **RPL23**, 5S_rRNA, **TRIM56**, CDYL, TBCEL, H3F3C, PRDM5, PARD3B, SFRS5, **AC097526.11**, AC025627.1, **AC131055.17**, **AC073869.19**

Thrombocitemia esencial

Sobreexpresados: HIP1, **RP11-249L21.3**, AL122001.1, **FIGU**, **SDHC**, **RP11-369J21.2**, **MYADM**, CCDC92, **MLF2**, **SPRYD4**, **RBM4B**, **SCAMP2**, AC012652.1, **GMEB1**, C18orf10, PCDHGC5, **PPP6C**, **ASB8**, AL161756.1, COPS3, **GORASP2**, CPA6, SNORA25, OR8J1

Infraexpresados: AC107956.1, AC087885.1, C7orf46, CDYL, GOLGA2L1, **TRIM56**, **SURF6**, AC137932.3, **RPL23**, **AC097526.11**, **AC131055.17**, **AC073869.19**.

**Los genes que están diferencialmente expresados en ambas patologías se muestran en negrita.*

Confirmamos los arrays de expresión, analizando la expresión de MYADM y HDAC8 mediante RT-PCR. Se puede observar en la **Figura 6** la sobreexpresión de estos dos genes en las MO-
MSC de NMP.

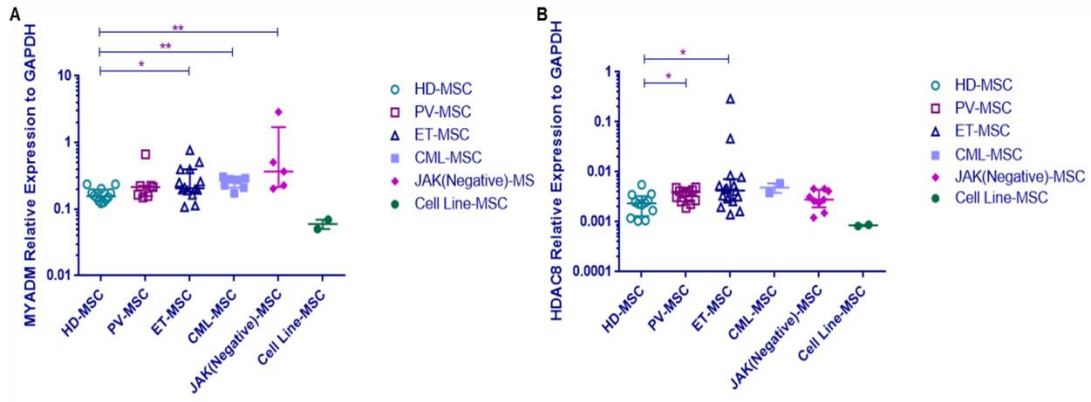


Figura 6: Expresión en las MO-MSC de MYADM y HDAC8

2. Estudios del efecto de las JAK2V617F-MSC sobre progenitores hematopoyéticos.

Material y Métodos: Para evaluar la influencia de las MSC patológicas sobre la población hematopoyética, se plantearon los siguientes estudios:

1. Cultivos semisólidos: Se plantaron en el fondo del *transwell* las MSC de DS y de pacientes (JAK2V617F). Cuando alcanzaron una confluencia en torno al 80-90% se añadieron, sobre la membrana, las células CD34 de MO de los pacientes con NMP y DS. Se mantuvieron en cultivo durante 48 horas. Las CPH fueron contadas y plantadas en medio semisólido para cuantificación de progenitores CFU-GM (unidad formadora de colonias granulocíticas).

2. Cultivos a largo plazo: Los cultivos se iniciaron a partir de una capa adherente de MSC confluyente. Se mantuvieron durante 1 semana en medio de cultivo a largo plazo. Con el fin de determinar si las MSC patológicas son capaces de mantener la hematopoyesis sana, se añadieron células CD34⁺ provenientes de leucoaféresis de un donante sano. Durante 5 semanas se cuantificaron los progenitores CFU-GM y BFU-e (unidad formadora de brote eritroide).

3. Análisis de la expresión de genes relacionados con la capacidad de soporte de la hematopoyesis, por RT-PCR: CXCL12, TP53, angiopoyetina 1, Jagged 1, TNF, NF-kB, c-Kit, BMP2, THPO y SPP1.

Resultados: Para estudiar la capacidad de las JAK2V617F-MSC de mantener las CPH sanas y patológicas, se realizaron ensayos de clonogenicidad.

Así, tras 48 horas de co-cultivo (transwell) se sembraron el mismo número de CPH de cada condición en medio semisólido de metilcelulosa más factores y al cabo de 14 días se procedió al recuento de las colonias presentes en la placa.

Cuando las células CD34 patológicas fueron co-cultivadas con el estroma patológico, el número de CFUs fue significativamente ($p=0.03$) mayor que cuando las CPH fueron cultivadas con HD-MSC. No se observaron diferencias en la capacidad de formar colonias cuando HD-CD34 fueron cultivadas con estroma sano o patológico (**Figura 7**).

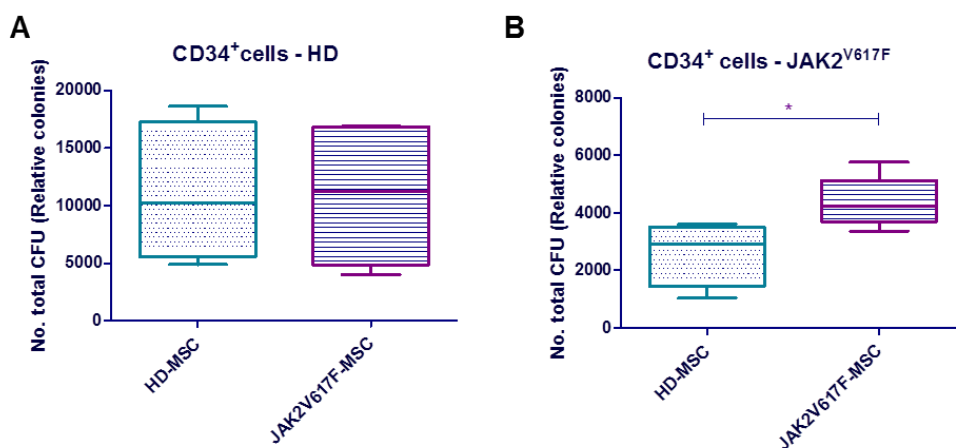


Figura 7: Total de CFU-GM producidas. CPH fueron co-cultivadas en transwell con MSC de HD y NMP (JAK2V617F) (* $p<0.05$).

Con el objetivo de estudiar la capacidad del estroma patológico de mantener la hematopoyesis sana a largo plazo se realizaron ensayos funcionales de producción de colonias CFU-GM y BFU-e a partir de las células obtenidas durante las 5 semanas de co-cultivo

La producción de colonias fue similar durante las dos primeras semanas y la última semana de cultivo entre ambos grupos (estroma patológico vs sano). Se observó un incremento

significativo ($p=0.004$ para la semana 4 y $p=0.02$ para la semana 3) en el número total de colonias producidas cuando las células progenitoras estaban en cultivo con JAK2V617F-MSC (Figura 8).

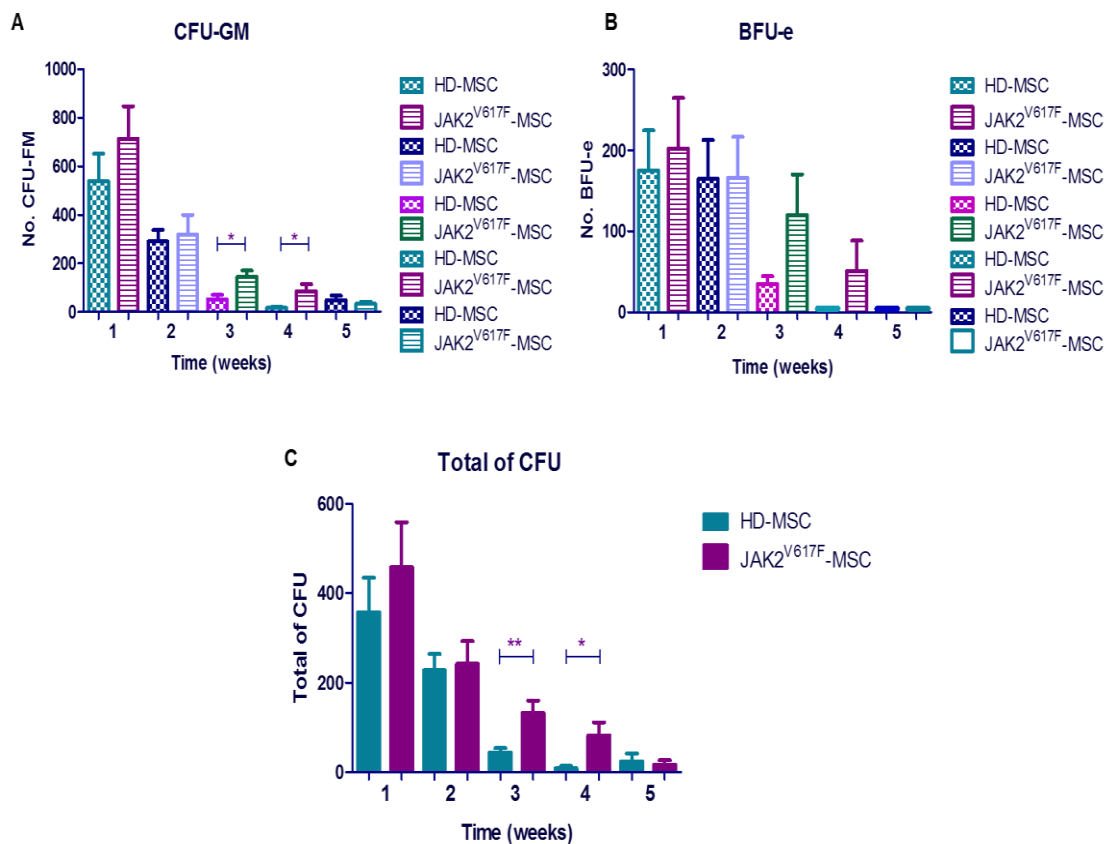


Figura 8: Capacidad clonogénica de las células producidas bajo cada una de las condiciones de cultivo. Producción durante la 5 semanas del número de CFU-GM y BFU-e. HD: Donantes Sanos JAK2V617F: pacientes con la mutación en JAK2 (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

Además, estudiamos los genes relacionados con el mantenimiento de la hematopoyesis. Por RT-PCR, no observamos diferencias significativas en relación a la expresión de CXCL12, cuando comparamos HD-MSC con MPN-MSC. Sin embargo, cuando se analizó la expresión de CXCL12 mediante inmunofluorescencia, se observaron diferencias entre los distintos grupos

estudiados, con una disminución de la expresión de esta proteína en las MSC patológicas cuando se compararon con las MSC control (**Figura 9**).

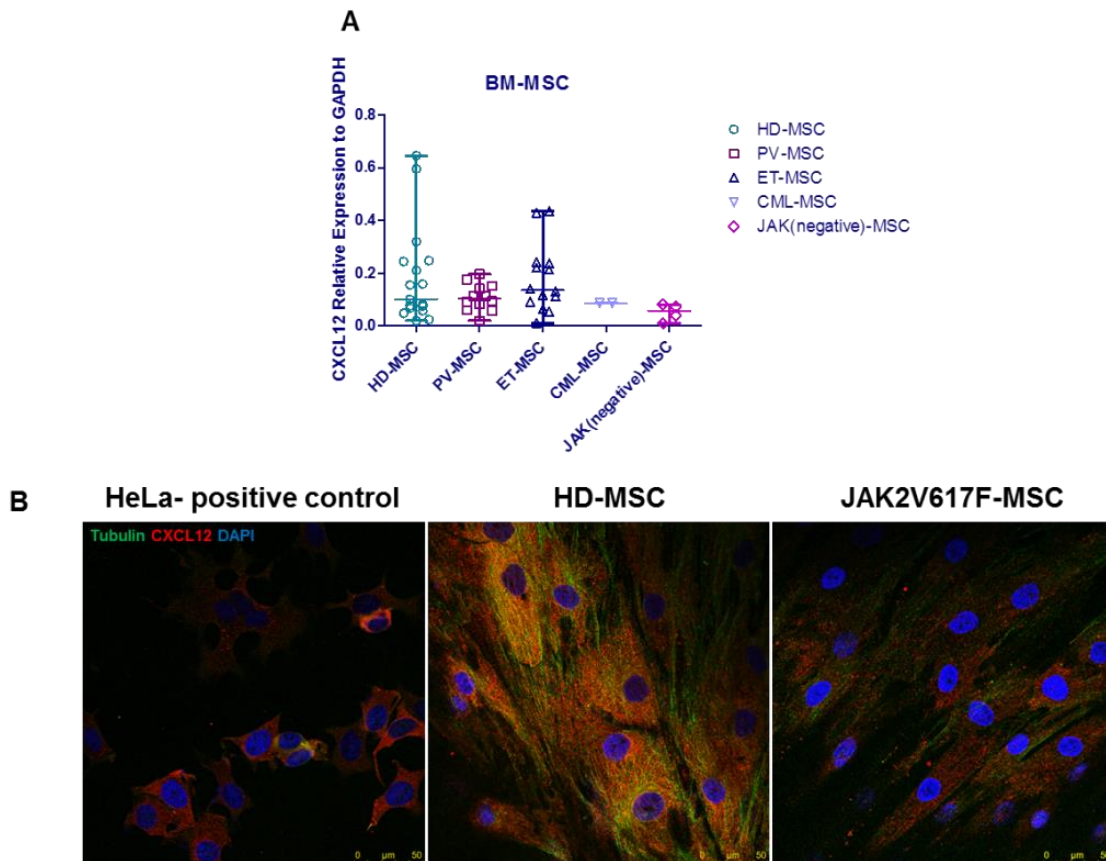
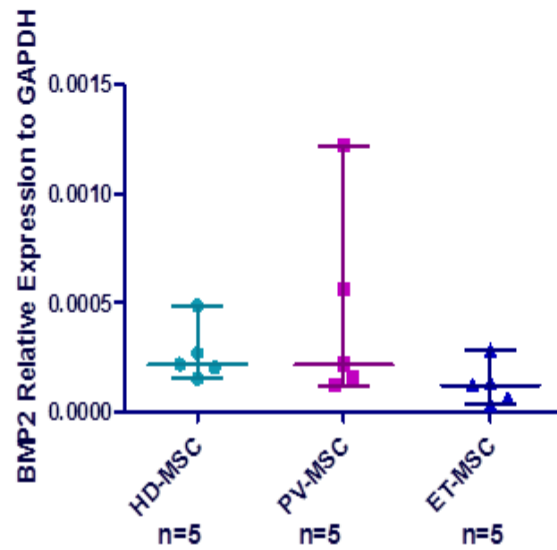
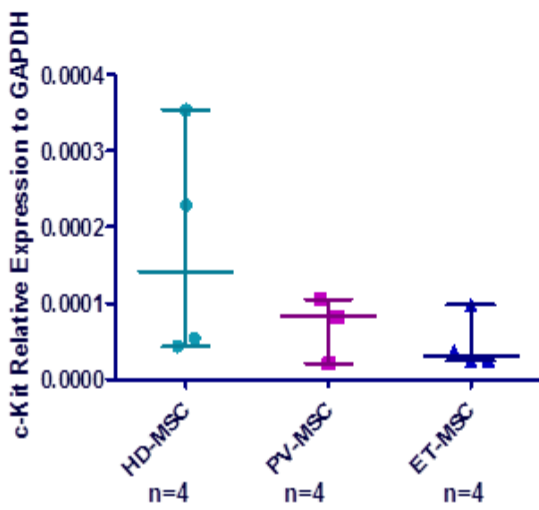
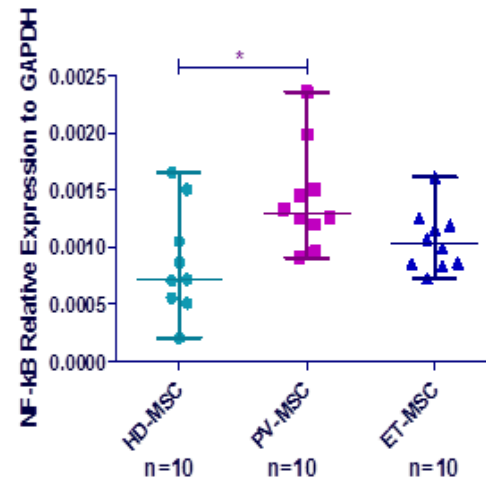
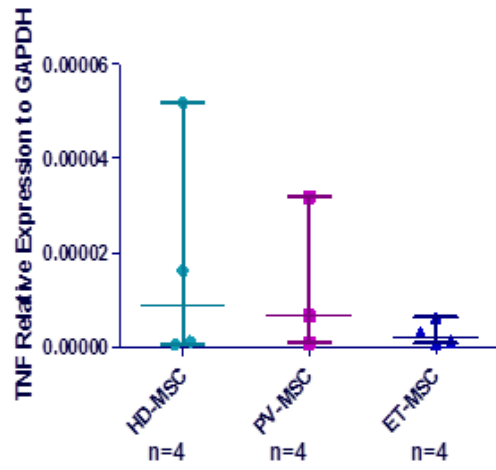
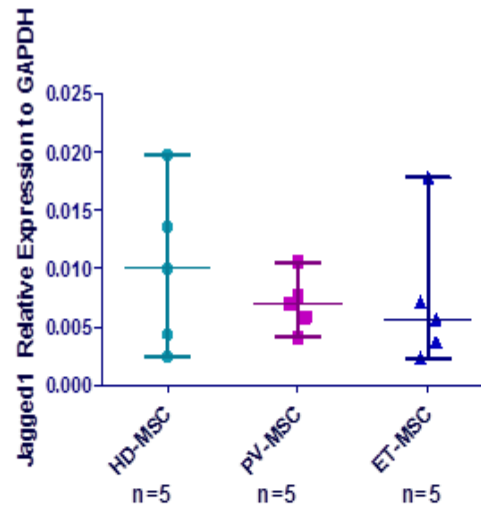
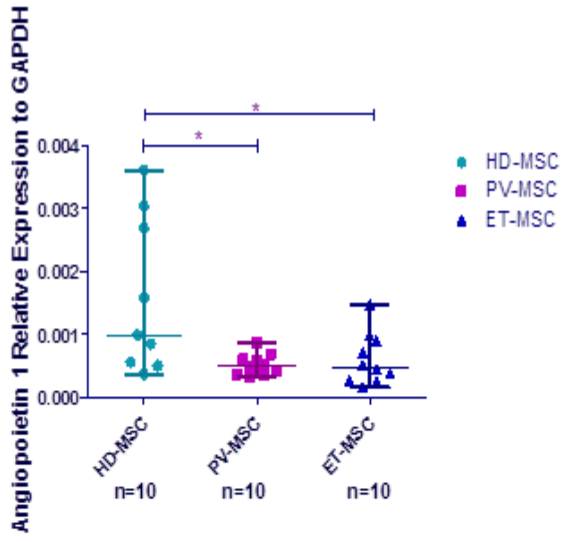


Figura 9: Expresión de CXCL12 en las MSC de MO de donantes sanos y pacientes. (A) por RT-PCR (B) por Inmunofluorescencia.

En relación a los otros genes estudiados, se observaron diferencias significativas ($p=0.04$ para TE-MSC y $p=0.02$ para PV-MSC) en la expresión de angiopoyetina-1, con una menor expresión en las JAK2V617F-MSC y una mayor expresión de NF- κ B y THPO (**Figura 10**).



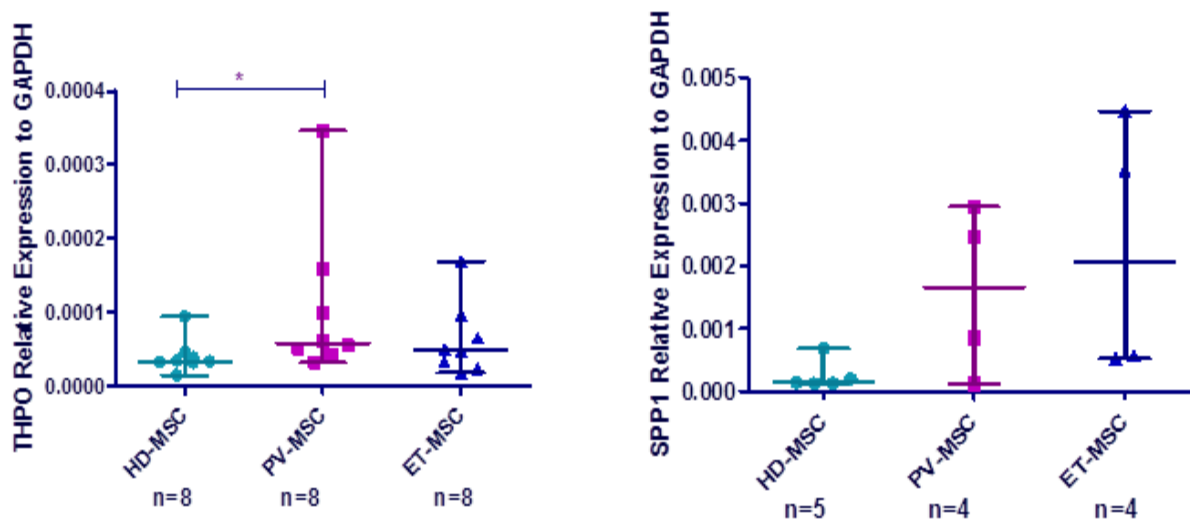


Figura 10: Expresión (RT-PCR) de los distintos genes implicados en la hematopoyesis en las MSC de MO de donantes sanos y pacientes. HD: Donantes Sanos; PV: Policitemia Vera; ET: Trombocitemia Esencial . (* p<0.05).

3. La sobre-expresión de HDAC8 en células mesenquimales estromales de pacientes con neoplasias mieloproliferativas JAK2⁺ ¿Una nueva diana terapéutica?

Desarrollo: Se aislaron y expandieron MSC-MO de pacientes con NMP con la mutación JAKV617F (JAK2-MSC) y de donantes sanos. Mediante RT-PCR se observó la sobre-expresión de HDAC8 en las JAK2-MSC frente a las DS-MSC y MPN (negativos para la mutación JAK2) (Figura 11 A). Los resultados se confirmaron mediante Western blot (Figura 11 B).

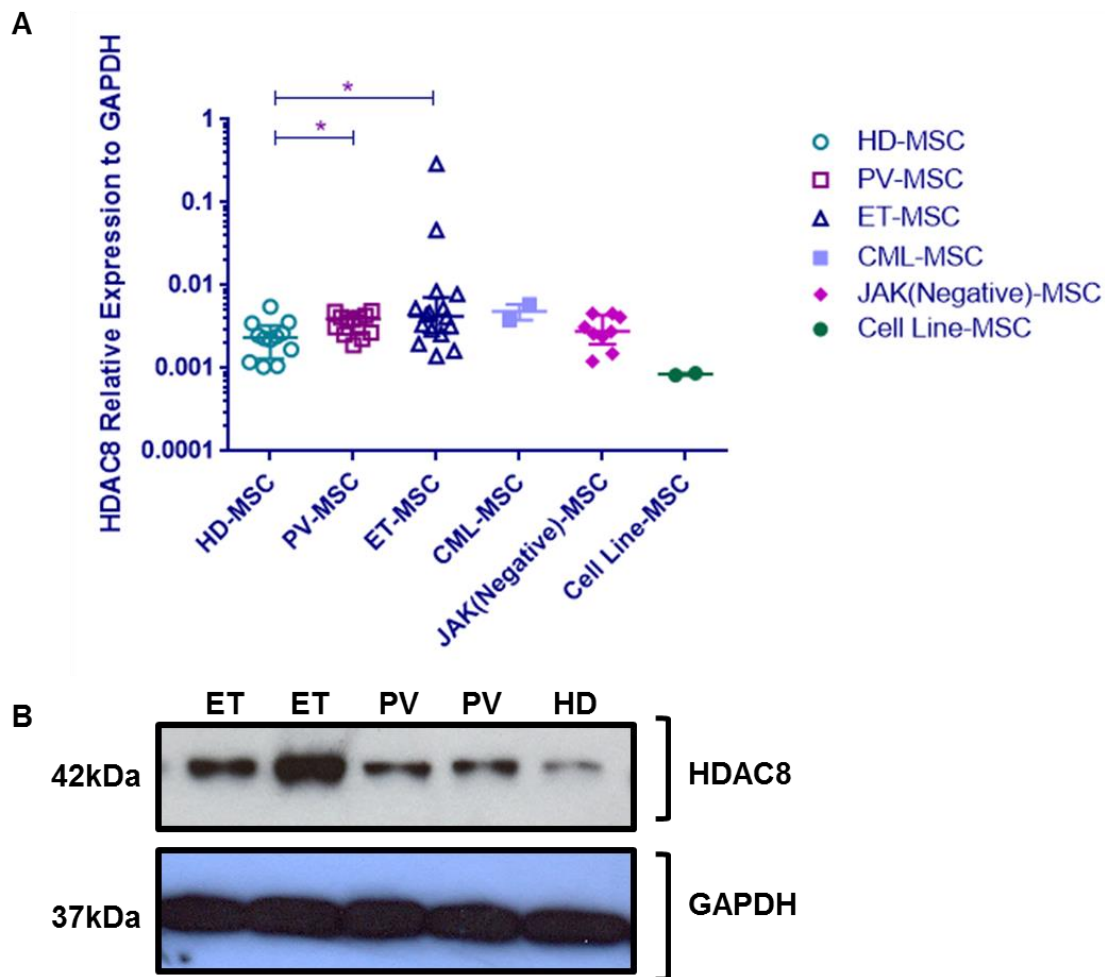
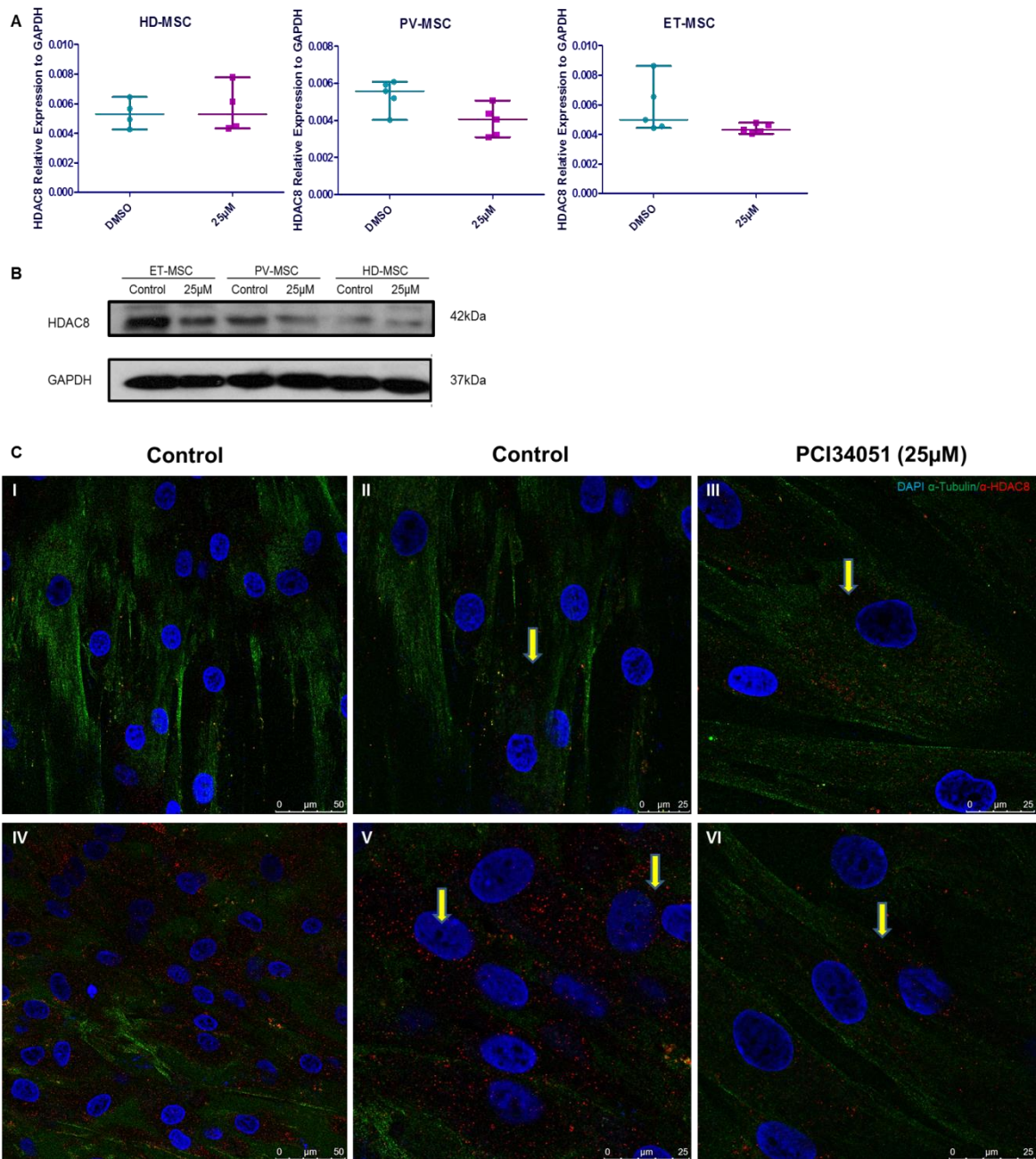


Figura 11: Expresión de HDAC8 en las MSC de MO de pacientes con la mutación JAK2. (A) RT-PCR, (B) Western Blot. HD: Donantes Sanos; PV: Policitemia Vera; ET: Trombocitemia Esencial; CML: Leucemia Mieloide Crónica. JAK (negativo): MSC de pacientes con NMP sin la mutación en JAK2. (* $p < 0.05$).

Con el fin de conocer la importancia de HDAC8 en la biología de la enfermedad se trataron las MSC de ambos orígenes con un inhibidor específico de HDAC8 denominado PCI34051. A la concentración de $25\mu\text{M}$, tras 48h de cultivo PCI34051 disminuyó la expresión de HDAC8 en las MSC de pacientes mientras que no se modificó la expresión de este gen en las DS-MSc (Figura 12).



A continuación estudiamos los cambios funcionales (apoptosis y ciclo celular) en las MSC sanas y patológicas cuando se trataron con el inhibidor PCI34051 a 25µM durante 48h. Observamos una disminución significativa en las MSC patológicas cuando fueron tratadas con el inhibidor, sin embargo no se observaron cambios en la apoptosis de las MSC de donantes sanos (**Figura 13**)

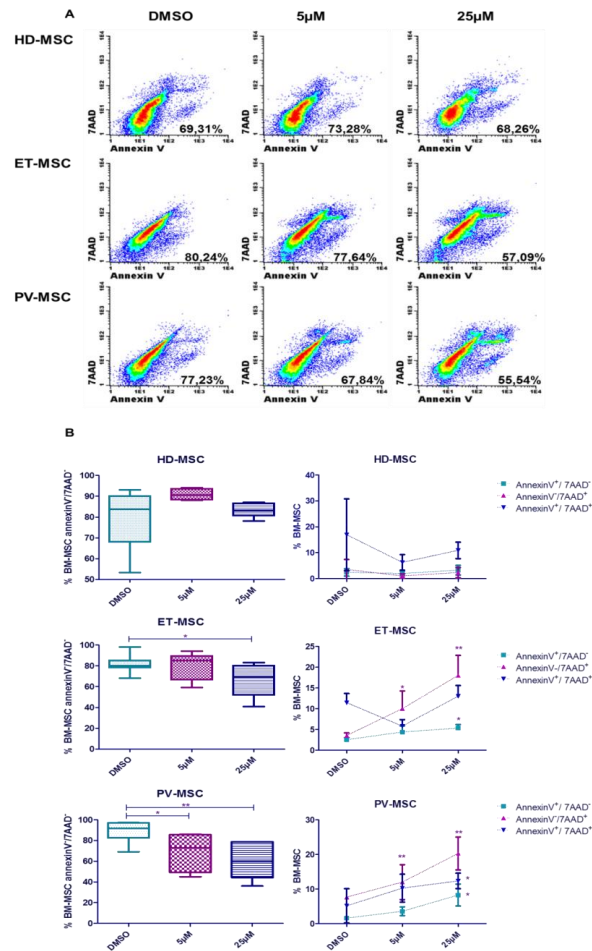
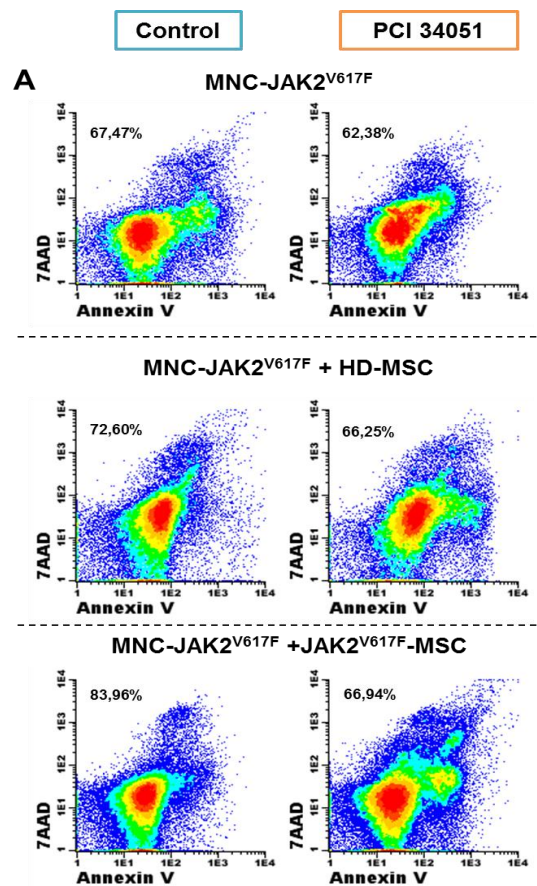


Figura 13: Apoptosis de MSC de MO de pacientes con la mutación JAK2 tardadas con inhibidor específico de HDAC8 (PCI34051). HD: Donantes Sanos; PV: Policitemia Vera; ET: Trombocitemia Esencial. (* p<0.05, ** p<0.01).

Con el fin de evaluar la influencia que la expresión de HDAC8 en las MSC puede tener en el mantenimiento de la hematopoyesis patológica, se cultivaron las MSC y se trataron o no con PCI-34051 25 μ M durante 48h. Se añadieron CMN-MO de pacientes (JAK2V617F) se mantuvo el co-cultivo en transwell durante 48h. Se recuperaron las CMN y se analizaron la viabilidad celular y el número de CFU-GM. La presencia del inhibidor de HDAC8 en el cultivo, disminuyó la viabilidad celular de las CMN principalmente en las CMN-JAK2V617F (**Figura 14 A, B y C**). En cuanto a los ensayos funcionales de producción de colonias CFU-GM, se comprobó que en los casos donde el estroma patológico se trató con PCI-34051 se produjo una clara disminución en la producción de colonias (**Figura 14 D**).



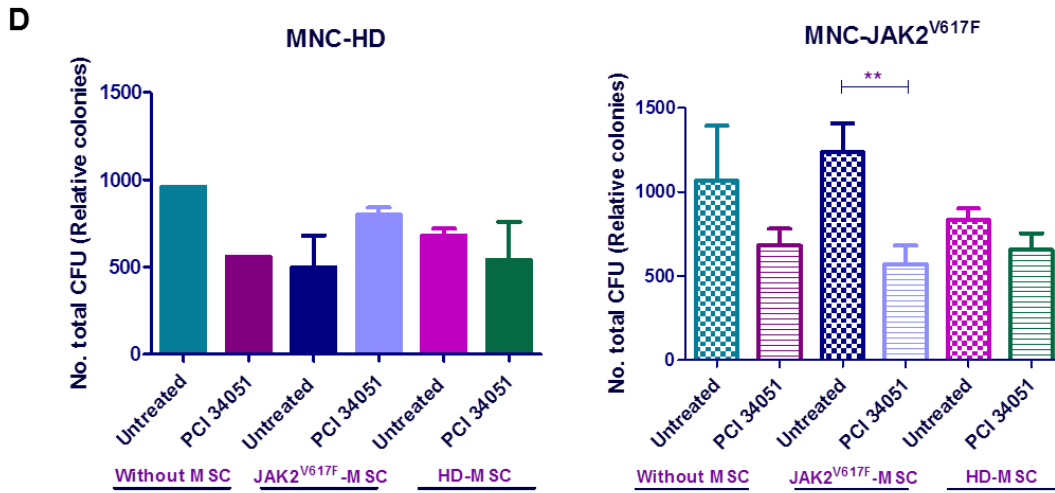
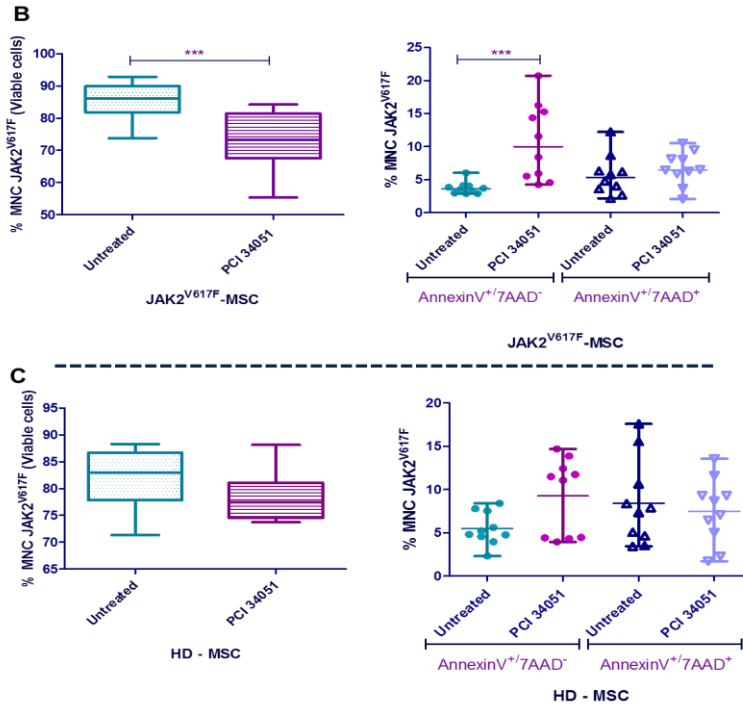


Figura 14: Evaluación del mantenimiento de la hematopoyesis tras co-cultivado con MSC tratadas con el inhibidor específico de HDAC8 (PCI34051). (A, B y C) Estudios de apoptosis; (D) Capacidad clonogénica (CFU-GM). HD: Donantes Sanos JAK2V617F: pacientes con la mutación en JAK2 (* p<0.05, ** p<0.01).

4. Las vesículas extracelulares pueden estar implicadas en la comunicación entre estroma y células progenitoras hematopoyéticas en las neoplasias mieloproliferativas.

Material y métodos: Se aislaron y expandieron MSC de MO de pacientes con NMP y de donantes sanos (DS). El aislamiento de las VE se realizó a partir de medio condicionado procedente del cultivo de las MSC tras deprivación de suero durante 24h. Las VE se aislaron por ultracentrifugación y se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión (MET), Western blot (CD63), citometría de flujo (CMF) (*Ramos, et al 2016*) y por un sistema de detección de micropartículas (NanoSight). Los microRNA de las VE de MSC de pacientes y DS se estudiarán mediante microarrays de expresión (Applied Biosystems) y se comprobaron por RT-PCR. Se aislaron células CD34⁺ de MO de pacientes (NMP) y de MO/aféresis de DS mediante selección inmunomagnética y se analizó la incorporación de las VE mediante inmunofluorescencia y CMF. Para los ensayos de incorporación, las VE de las MSC (sanas y patológicas) las CPH se cultivaron durante 48h con las VE y se analizó a continuación la apoptosis (annexina V), capacidad clonogénica (CFU-GM) y la expresión de microRNA (RT-PCR).

Resultados: La caracterización mediante ME y NanoSight reveló que las VE procedentes de las MSC de ambos grupos presentaban un tamaño y morfología característicos y eran positivas mediante WB para CD63 (marcador característico de las VE). Además por CMF las VE liberadas por las MSC se caracterizaron por su positividad para CD90, CD44 y CD73 (marcadores de MSC), CD81 y CD63 tetraspaninas características de las VE, mientras fueron negativas para marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45 y por tener un tamaño inferior a 1µm (**Figura 15**).

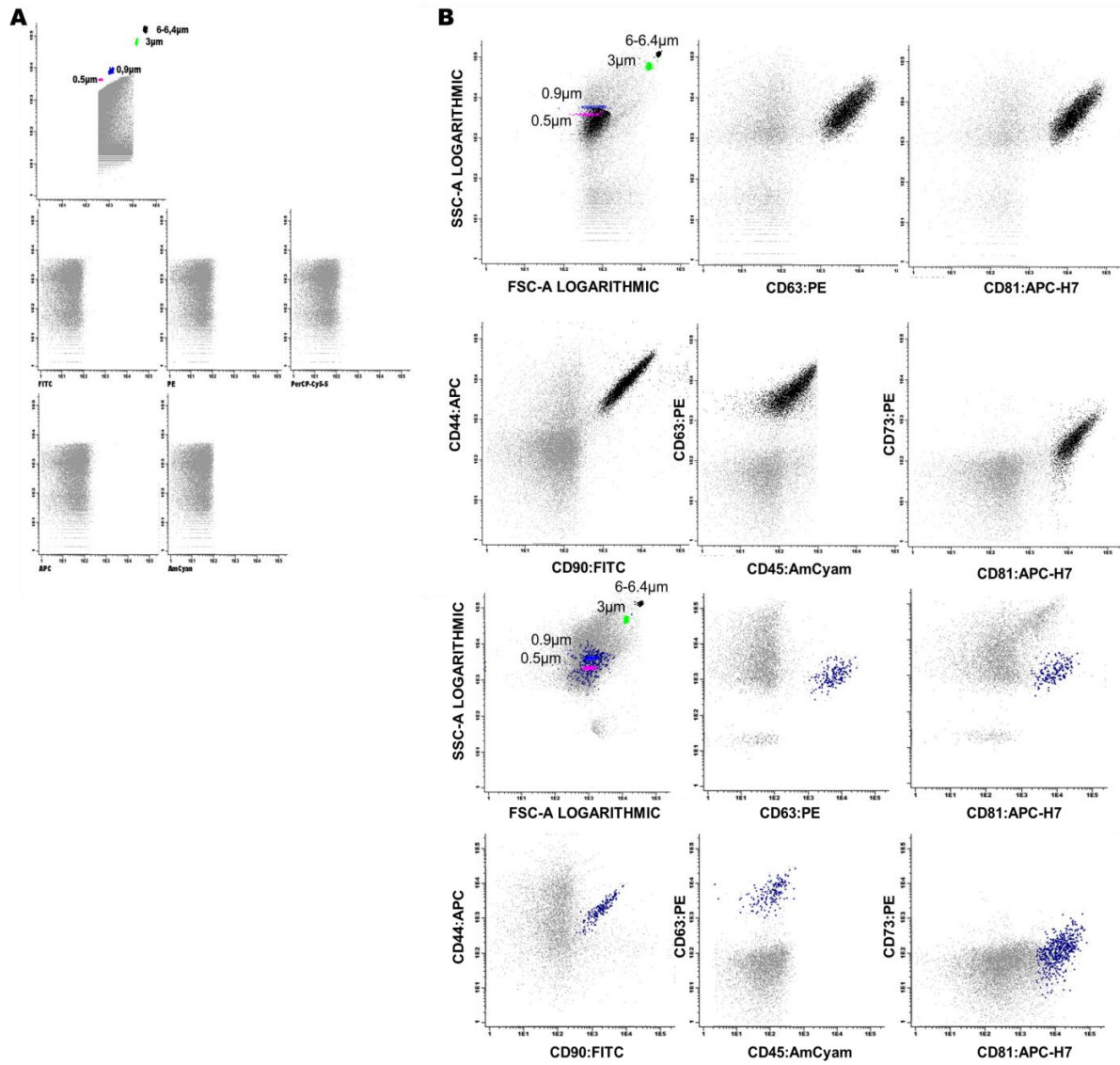


Figura 15: Evaluación por Citometría de Flujo de VE liberadas por MSC de donantes sanos (negro) y de pacientes (azul)

Cuando se analizó el contenido de microRNAs en las VE (8 DS-MSC y 11 NMP-MSC) se comprobó un aumento global de expresión en las VE procedentes de los pacientes aunque sin alcanzar la significación estadística. Quisimos comprobar por RT-PCR y observamos la sobreexpresión significativa ($p=0.032$) del miR-155 en las VE de NMP-MSC (**Figura 16**).

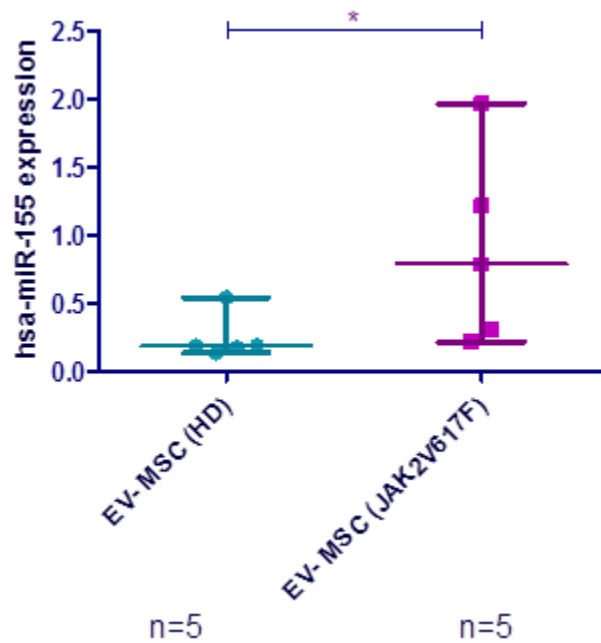


Figura 16: Expresión de microRNA155 en EV liberadas por MSC de donantes sanos y de pacientes con la mutación JAK2V617F

Tras la incorporación de VE en HPC, comprobamos por CMF un aumento de la viabilidad de las células CD34⁺ con las VE tanto de MSC de pacientes como de controles. El microRNA155 incremento su expresión en las CD34⁺ de DS que incorporaron las VE de NMP-MSC ($p=0.04$). En cuanto a la capacidad clonogénica, se observó un aumento de CFU-GM cuando las células

CD34⁺ incorporaron las VE de MSC, principalmente cuando las CD34⁺ eran de pacientes e incorporaron VE de MSC patológicas (p=0.056) (**Figura 17**).

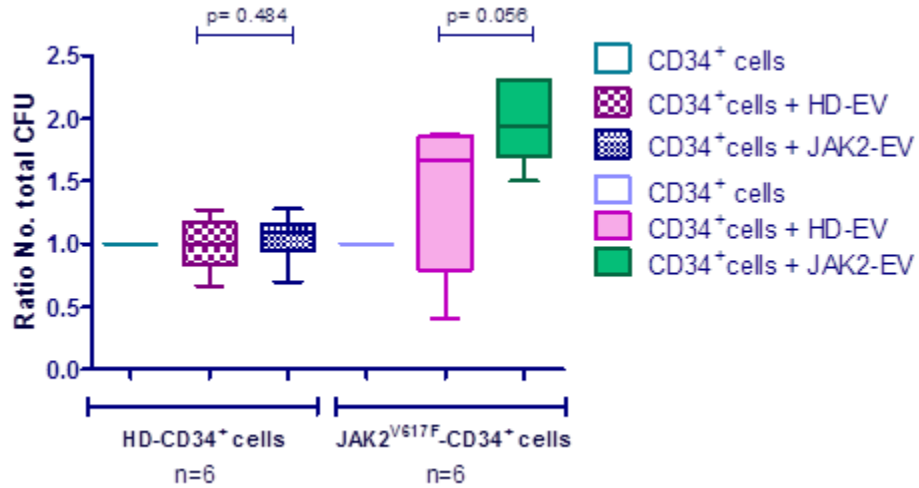


Figura 17: Capacidad clonogénica de las CPH bajo cada una de las condiciones de cultivo. HD: Donantes Sanos; JAK2V617F: pacientes con la mutación en JAK2 (* p<0.05).

CONCLUSIONES

1. En relación a la caracterización de MSC de pacientes MPN con la mutación en JAK2 (JAK2V617F):

1.1 Las MSC de NMP (JAK2) presentan una morfología y una capacidad de crecimiento *in vitro* similar a las MSC de sujetos sanos.

1.2 Las MSC de NMP presentan un fenotipo compatible con los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular. No obstante, se observó una mayor expresión de CD90, CD73 y una disminución de la expresión de CD105.

1.3 Las MSC de NMP presentan una capacidad de diferenciación a osteoblastos y adipocitos similar a la que presentan las MO-MSC control.

2. En relación a las alteraciones funcionales y genómicas:

2.1 Las MSC de NMP presentan un menor porcentaje de células en apoptosis en comparación con las MSC control. No encontramos diferencias en cuanto a su ciclo celular.

2.2 Las MSC de NMP mostraron alteraciones en su perfil de expresión génica al compararlas con MSC control. Las MO-MSC procedentes de pacientes con PV fueron las que presentaron un mayor porcentaje de genes sobreexpresados.

2.3 Se confirmaron los *arrays* de expresión mediante RT-PCR y se mostró una mayor expresión de los genes, MYADM y HDAC8 en las MO-MSC de NMP. Además, se demostró que la sobreexpresión de HDAC8 es específica de las MSC de pacientes con la mutación JAK2V617F.

2.4 Las MSC de NMP protegen selectivamente la hematopoyesis patológica, aumentando su capacidad clonogénica en un sistema de co-cultivo *in vitro*.

2.5 Las MSC de NMP presentan capacidad para mantener la hematopoyesis sana en cultivo a largo plazo.

2.6 Las MSC de NMP presentan alteraciones en la expresión de genes relacionados con la regulación de la hematopoyesis, con una infra-expresión de angiopoyetina-1, y una sobre-expresión de NF- κ B y THPO.

2.7 La inhibición de la expresión HDAC8 con un inhibidor específico (PCI34051) disminuye la capacidad del estroma patológico de soportar la hematopoyesis tumoral de pacientes NMP. Por tanto, HDAC8 podría constituir una potencial diana terapéutica.

3. En cuanto a las propiedades biológicas de las vesículas extracelulares liberadas por MSC de pacientes con NMP y su papel en la fisiopatología de estas enfermedades:

3.1 Las VE liberadas de las MSC de NMP aisladas por ultracentrifugación presentan las características descritas por la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares, con un tamaño inferior a 1 μ m, una morfología redonda y la expresión de la tetraspanina CD63.

3.2 Las VE liberadas por MSC de NMP presentaron un tamaño inferior a 1 μ m. Se caracterizaron mediante citometría de flujo por su positividad para las moléculas de adhesión específicas de las MSC CD90, CD44 y CD73 así como para las tetraspaninas CD81 y CD63 características de las VE, mientras que fueron negativas para los marcadores específicos hematopoyéticos CD34 y CD45.

3.3 Los resultados de los arrays de microARN no mostraron diferencias en el contenido entre VE liberadas por MSC sanas y patológicas.

3.4 Las VE liberadas por MSC de NMP presentaron una sobreexpresión del miR-155 cuando se compararon con las VE liberadas por las MSC de donantes sanos.

3.5 La incorporación de VE MSC de NMP por las células CD34⁺ induce un aumento en la expresión de miR-155.

3.6 La capacidad clonogénica se incrementa en las células CD34⁺ de pacientes con NMP cuando incorporan VE derivadas de MSC patológicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y. & Suda, T. (2004) Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, **118**, 149-161.
- Arranz, L., Sanchez-Aguilera, A., Martin-Perez, D., Isern, J., Langa, X., Tzankov, A., Lundberg, P., Muntion, S., Tzeng, Y.S., Lai, D.M., Schwaller, J., Skoda, R.C. & Mendez-Ferrer, S. (2014) Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms. *Nature*, **512**, 78-81.
- Barbui, T., Thiele, J., Vannucchi, A.M. & Tefferi, A. (2015) Rationale for revision and proposed changes of the WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. *Blood Cancer J*, **5**, e337.
- Baxter, E.J., Scott, L.M., Campbell, P.J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G.S., Bench, A.J., Boyd, E.M., Curtin, N., Scott, M.A., Erber, W.N. & Green, A.R. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*, **365**, 1054-1061.
- Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., Milner, L.A., Kronenberg, H.M. & Scadden, D.T. (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, **425**, 841-846.
- Dameshek, W. (1951) Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*, **6**, 372-375.
- Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E. & Dick, J.E. (2012) Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*, **10**, 120-136.
- Emerson, S.G., Sieff, C.A., Gross, R.G., Rozans, M.K., Miller, R.A., Rapoport, J.M. & Nathan, D.G. (1987) Decreased hematopoietic accessory cell function following bone marrow transplantation. *Exp Hematol*, **15**, 1013-1021.

- Friedenstein, A.J., Piatetzky, S., Il & Petrakova, K.V. (1966) Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, **16**, 381-390.
- Gadina, M., Hilton, D., Johnston, J.A., Morinobu, A., Lighvani, A., Zhou, Y.J., Visconti, R. & O'Shea, J.J. (2001) Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr Opin Immunol*, **13**, 363-373.
- Galloway, J.L. & Zon, L.I. (2003) Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr Top Dev Biol*, **53**, 139-158.
- Gianelli, U., Bossi, A., Cortinovis, I., Sabattini, E., Tripodo, C., Boveri, E., Moro, A., Valli, R., Ponzoni, M., A, M.F., G, F.O., Ascani, S., Bonoldi, E., Iurlo, A., Gugliotta, L. & Franco, V. (2014) Reproducibility of the WHO histological criteria for the diagnosis of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Mod Pathol*, **27**, 814-822.
- Huang, L.J., Constantinescu, S.N. & Lodish, H.F. (2001) The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell*, **8**, 1327-1338.
- Ihle, J.N., Stravapodis, D., Parganas, E., Thierfelder, W., Feng, J., Wang, D. & Teglund, S. (1998) The roles of Jaks and Stats in cytokine signaling. *Cancer J Sci Am*, **4 Suppl 1**, S84-91.
- James, C., Ugo, V., Le Couedic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, J.L., Constantinescu, S.N., Casadevall, N. & Vainchenker, W. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*, **434**, 1144-1148.
- Kralovics, R., Teo, S.S., Buser, A.S., Brutsche, M., Tiedt, R., Tichelli, A., Passamonti, F., Pietra, D., Cazzola, M. & Skoda, R.C. (2005) Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood*, **106**, 3374-3376.

- Lam, B.S. & Adams, G.B. (2010) Hematopoietic stem cell lodgment in the adult bone marrow stem cell niche. *Int J Lab Hematol*, **32**, 551-558.
- Levine, R.L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B.L., Wernig, G., Huntly, B.J., Boggon, T.J., Wlodarska, I., Clark, J.J., Moore, S., Adelsperger, J., Koo, S., Lee, J.C., Gabriel, S., Mercher, T., D'Andrea, A., Frohling, S., Dohner, K., Marynen, P., Vandenberghe, P., Mesa, R.A., Tefferi, A., Griffin, J.D., Eck, M.J., Sellers, W.R., Meyerson, M., Golub, T.R., Lee, S.J. & Gilliland, D.G. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, **7**, 387-397.
- Levy, D.E. & Darnell, J.E., Jr. (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 651-662.
- Mendez-Ferrer, S., Battista, M. & Frenette, P.S. (2010) Cooperation of beta(2)- and beta(3)-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization. *Ann N Y Acad Sci*, **1192**, 139-144.
- Mishima, S., Nagai, A., Abdullah, S., Matsuda, C., Taketani, T., Kumakura, S., Shibata, H., Ishikura, H., Kim, S.U. & Masuda, J. (2010) Effective ex vivo expansion of hematopoietic stem cells using osteoblast-differentiated mesenchymal stem cells is CXCL12 dependent. *Eur J Haematol*, **84**, 538-546.
- Muntion, S., Ramos, T.L., Diez-Campelo, M., Roson, B., Sanchez-Abarca, L.I., Misiewicz-Krzeminska, I., Preciado, S., Sarasquete, M.E., de Las Rivas, J., Gonzalez, M., Sanchez-Guijo, F. & Del Canizo, M.C. (2016) Microvesicles from Mesenchymal Stromal Cells Are Involved in HPC-Microenvironment Crosstalk in Myelodysplastic Patients. *PLoS One*, **11**, e0146722.
- Nangalia, J., Massie, C.E., Baxter, E.J., Nice, F.L., Gundem, G., Wedge, D.C., Avezov, E., Li, J., Kollmann, K., Kent, D.G., Aziz, A., Godfrey, A.L., Hinton, J., Martincorena, I., Van Loo, P., Jones, A.V., Guglielmelli, P., Tarpey, P., Harding, H.P., Fitzpatrick, J.D.,

- Goudie, C.T., Ortmann, C.A., Loughran, S.J., Raine, K., Jones, D.R., Butler, A.P., Teague, J.W., O'Meara, S., McLaren, S., Bianchi, M., Silber, Y., Dimitropoulou, D., Bloxham, D., Mudie, L., Maddison, M., Robinson, B., Keohane, C., Maclean, C., Hill, K., Orchard, K., Tauro, S., Du, M.Q., Greaves, M., Bowen, D., Huntly, B.J., Harrison, C.N., Cross, N.C., Ron, D., Vannucchi, A.M., Papaemmanuil, E., Campbell, P.J. & Green, A.R. (2013) Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*, **369**, 2391-2405.
- Notta, F., Doulatov, S., Laurenti, E., Poeppl, A., Jurisica, I. & Dick, J.E. (2011) Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science*, **333**, 218-221.
- Nowell, P.C. (1962) The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut*, **8**, 65-66.
- Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K. & Nagasawa, T. (2010) The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*, **33**, 387-399.
- Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D.J., Marine, J.C., Teglund, S., Vanin, E.F., Bodner, S., Colamonici, O.R., van Deursen, J.M., Grosveld, G. & Ihle, J.N. (1998) Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*, **93**, 385-395.
- Raimondo, S., Corrado, C., Raimondi, L., De Leo, G. & Alessandro, R. (2015) Role of Extracellular Vesicles in Hematological Malignancies. *Biomed Res Int*, **2015**, 821613.
- Ramos, T.L., Sanchez-Abarca, L.I., Lopez-Ruano, G., Muntion, S., Preciado, S., Hernandez-Ruano, M., Rosado, B., de las Heras, N., Chillon, M.C., Hernandez-Hernandez, A., Gonzalez, M., Sanchez-Guijo, F. & Del Canizo, C. (2015) Do endothelial cells belong to the primitive stem leukemic clone in CML? Role of extracellular vesicles. *Leuk Res*, **39**, 921-924.

- Ramos, T.L., Sanchez-Abarca, L.I., Muntion, S., Preciado, S., Puig, N., Lopez-Ruano, G., Hernandez-Hernandez, A., Redondo, A., Ortega, R., Rodriguez, C., Sanchez-Guijo, F. & del Canizo, C. (2016) MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry. *Cell Commun Signal*, **14**, 2.
- Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P.G., Riminucci, M. & Bianco, P. (2007) Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*, **131**, 324-336.
- Schepers, K., Campbell, T.B. & Passegue, E. (2015) Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell*, **16**, 254-267.
- Schepers, K., Pietras, E.M., Reynaud, D., Flach, J., Binnewies, M., Garg, T., Wagers, A.J., Hsiao, E.C. & Passegue, E. (2013) Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell*, **13**, 285-299.
- Staerk, J. & Constantinescu, S.N. (2012) The JAK-STAT pathway and hematopoietic stem cells from the JAK2 V617F perspective. *JAKSTAT*, **1**, 184-190.
- Tefferi, A., Thiele, J., Orazi, A., Kvasnicka, H.M., Barbui, T., Hanson, C.A., Barosi, G., Verstovsek, S., Birgegard, G., Mesa, R., Reilly, J.T., Gisslinger, H., Vannucchi, A.M., Cervantes, F., Finazzi, G., Hoffman, R., Gilliland, D.G., Bloomfield, C.D. & Vardiman, J.W. (2007) Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*, **110**, 1092-1097.
- Wilson, A., Laurenti, E. & Trumpp, A. (2009) Balancing dormant and self-renewing hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, **19**, 461-468.

- Winkler, I.G., Barbier, V., Nowlan, B., Jacobsen, R.N., Forristal, C.E., Patton, J.T., Magnani, J.L. & Levesque, J.P. (2012) Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat Med*, **18**, 1651-1657.
- Winkler, I.G., Barbier, V., Wadley, R., Zannettino, A.C., Williams, S. & Levesque, J.P. (2010) Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow in vivo: serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches. *Blood*, **116**, 375-385.
- Yanez-Mo, M., Siljander, P.R., Andreu, Z., Zavec, A.B., Borrás, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colas, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J.M., Ghobrial, I.M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., Heegaard, N.H., Hendrix, A., Kierulf, P., Kokubun, K., Kosanovic, M., Kralj-Iglic, V., Kramer-Albers, E.M., Laitinen, S., Lasser, C., Lener, T., Ligeti, E., Line, A., Lipps, G., Llorente, A., Lotvall, J., Mancek-Keber, M., Marcilla, A., Mittelbrunn, M., Nazarenko, I., Nolte-'t Hoen, E.N., Nyman, T.A., O'Driscoll, L., Olivan, M., Oliveira, C., Pallinger, E., Del Portillo, H.A., Reventos, J., Rigau, M., Rohde, E., Sammar, M., Sanchez-Madrid, F., Santarem, N., Schallmoser, K., Ostenfeld, M.S., Stoorvogel, W., Stukelj, R., Van der Grein, S.G., Vasconcelos, M.H., Wauben, M.H. & De Wever, O. (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*, **4**, 27066.
- Yoshihara, H., Arai, F., Hosokawa, K., Hagiwara, T., Takubo, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Miyazaki, H., Takahashi, T. & Suda, T. (2007) Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*, **1**, 685-697.
- Zhao, R., Xing, S., Li, Z., Fu, X., Li, Q., Krantz, S.B. & Zhao, Z.J. (2005) Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem*, **280**, 22788-22792.