

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Caracterización funcional de AF10**  
**durante la diferenciación hematopoyética**

**RAQUEL CHAMORRO GARCÍA**

**Madrid, 2009**



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Caracterización funcional de AF10  
durante la diferenciación hematopoyética**

Memoria que presenta la licenciada en Bioquímica **Raquel Chamorro García** para obtener el grado de doctor

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección de **Juan J. Arredondo Lamas**, profesor contratado doctor de Bioquímica

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid  
Madrid, 2009



Facultad de Medicina  
**Departamento de Bioquímica**

**Juan J. Arredondo Lamas**, profesor contratado doctor de la UAM, como  
Director de Tesis

CERTIFICA:

Que Doña Raquel Chamorro García con D.N.I.: 53408679B, licenciada en Bioquímica ha realizado, bajo la dirección del Director de Tesis, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid / Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, el trabajo titulado:

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE AF10 DURANTE LA  
DIFERENCIACIÓN HEMATOPOYÉTICA**

Una vez supervisado el trabajo, consideramos que reúne todos los requisitos necesarios en cuanto a originalidad y calidad para ser presentado como Tesis Doctoral con el objeto de optar al título de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 29 de Octubre de 2009

Juan J. Arredondo Lamas  
Director de Tesis





*A Virgilio y Cándida*





Si la obra de tu vida puedes ver destrozada  
y sin decir palabra volverla a comenzar,  
o perder en un día la ganancia de ciento  
sin un gesto ni un suspiro  
Si puedes ser amante y no estar loco de amor.  
Si consigues ser fuerte sin dejar de ser tierno,  
y sintiéndote odiado, sin odiar a tu vez, luchar y defenderte  
Si puedes soportar que falseen tus palabras los pícaros  
para excitar a los tontos  
y oír cómo sus lenguas falaces te calumnian sin que tú mismo mientas  
Si puedes seguir digno aunque seas popular  
Si consigues ser Pueblo y dar consejo a los Reyes  
y a todos tus amigos amar como a un hermano sin que ninguno te absorba  
Si sabes observar, meditar y conocer  
sin llegar a ser nunca destructor o escéptico;  
Soñar, más no dejar que el sueño te domine  
Pensar sin ser sólo un pensador  
Si puedes ser severo sin llegar a la cólera  
Si puedes ser audaz sin pecar de imprudente  
Si consigues ser bueno y logras ser un sabio sin ser moral ni pedante  
Si logras el triunfo después de la derrota  
y acoges con igual calma esas dos mentiras.  
Si puedes conservar tu valor y tu cabeza cuando los pierdan otros  
entonces  
los Reyes, los Dioses, la Suerte y la Victoria  
serán ya para siempre tus sumisos esclavos  
Y lo que vale más que la Gloria y los Reyes:  
Serás Hombre, hijo mío.

-Rudyard Kipling-





# **AGRADECIMIENTOS**









A lo largo de este trabajo, muchas han sido las personas que me han acompañado y que me han ayudado a seguir adelante. Por algún sitio hay que empezar.

Gracias a Juan, por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo. Gracias por la confianza depositada en mí y la libertad ofrecida para sacar adelante el proyecto.

Gracias también a Marga, por abrirme las puertas del B18... y después del B20. Gracias, por el apoyo a este trabajo.

Gracias a Belén, por hacer posible este último año y por transmitir un poco de tranquilidad en este mundo.

Gracias a Aurora, porque aún a pesar de no haber podido hablar a menudo, sé que siempre has estado dispuesta a hacerlo.

Gracias a todos *mis padres*.

Gracias a Carlos (el científico), por amar la Ciencia de la forma en que lo haces. Gracias porque un día me llevaste al borde del precipicio y me empujaste. Pronto descubrí que era capaz de volar... entonces empecé a quererte.

Gracias a Luci, MC y Susana, por volar a mi lado. Por hacer de la soledad una anécdota. Gracias, chicas, por ayudarme a seguir volando y obligarme a tomar tierra cuando me he encontrado demasiado cerca de las nubes. Mil gracias por vuestra aportación a mi trabajo y a mi vida, que ha sido mucha y muy buena.

Gracias a George y Letioak, por los buenos tiempos y por estar siempre dispuestos a un rápido vuelo a Caprabo, lo que implicaba hacer las tardes más largas... pero también más ricas!!

Gracias a David, por intentar explicar qué es lo que nos pasa cuando volamos demasiado alto... cuando la gravedad apenas puede tirar de nosotros. Gracias por cuidarme tanto.

Gracias a María, la chica nueva que ya empieza a dejar de serlo. Ánimo.

Gracias al equipo técnico: Yoli, Vane y Vero, con las que tantas cosas buenas, malas y regulares, he compartido. Gracias, también, a Noe y a Vir porque sin vuestra ayuda todo habría sido mucho más complicado.

Gracias a Raquel, de la que tanto aprendí, por ayudarme en el aterrizaje en el B18. Gracias a Jose, por sacar un ratito cada martes para hacernos una visita. Gracias a Javier

porque siempre me diste buenos consejos científicos. Gracias, también, a Elena. Gracias a Bea, una estudiante excelente y una excelente persona.

Gracias a lo que para mí fue el antiguo B20. A Luisja y Raúl, por formar parte de este equipo. Gracias a Aída, porque también me cuidaste siempre mucho. Gracias, Roberto.

Gracias a los chicos de enfrente: los que son y los que un día fueron B19's. Gracias porque cada uno, a vuestra manera, habéis contribuido a mi desarrollo personal y profesional. Gracias a Rafa por escuchar tanto, aún cuando el tiempo siempre te falta. Gracias, también a Miguel, por el apoyo prestado y por las múltiples horas compartidas en ese cuarto de cultivos donde tantas confesiones nos hemos hecho... Sólo quiero decirte que, para mí, la luz ultravioleta seguirá haciendo quiebros hasta conseguir alcanzarme.

Gracias al resto de los laboratorios del pasillo. Al B11, porque habéis sido increíblemente generosos conmigo, tanto personal como científicamente. Gracias al B13, por ser siempre tan participativos. Gracias Bea, por aquel año baloncestístico, por aquel congreso en Alicante y por todos los buenos momentos compartidos. Gracias al B15, con Susana y *sus niñas*, con las que también cultivé células muchas horas. Al B17, con Jesús, tan pronto dispuesto a organizar una fiesta como a ponernos firmes cuando ha sido necesario (siempre con una sonrisa, eso sí). Gracias a su gente, porque al final todos somos uno. Gracias también al C20, con Víctor y Manolo, por el interés mostrado. Gracias a la dulce Carla, por todos los buenos ratos pasados. Gracias por estar siempre ahí. Gracias a todas las personas del Departamento que habéis dedicado un tiempo precioso a echarme una mano.

Gracias a todos los miembros de los diferentes servicios de la Facultad de Medicina de la UAM y del IIBM, por hacernos la vida más sencilla. Gracias, Toño, por tu *santa paciencia*.

Gracias a Dani y Bea, *los chicos CNIO*, por abrirme las puertas de vuestro laboratorio y enseñarme cómo funcionan las cosas en otros lares. Bendita mi ignorancia.

Gracias a mis compañeros Bioquímicos, porque juntos descubrimos qué era eso de estar en un laboratorio... y lo que implicaba.

Gracias a Lidia, Maribel, Olga y Yolanda, con las que empecé esta aventura. Gracias, porque aún habiendo seguido caminos diferentes, hemos encontrado la manera de que éstos se crucen de vez en cuando.

Gracias a Virgilio y a Cándida, mis padres (los de verdad). Gracias, porque me distéis todo. Gracias, por enseñarme a utilizar las herramientas para aprender a volar; por enseñarme a mantener el vuelo cuando el viento sopla en contra y por haber volado cerca cuando la energía me ha faltado; cuando el riesgo de accidente ha sido demasiado alto. Gracias, porque sois mi origen y mi referencia. Gracias a Elena, mi hermana, porque juntas ensayamos nuestros primeros vuelos. Contigo tuve mis primeros accidentes y realicé los primeros aterrizajes de emergencia. Aún hoy, seguimos intentando perfeccionar nuestro viaje. Gracias a todos *Los Chamorro* y a todos *Los García*, porque también formáis parte de esta historia. Mi historia.

Gracias a Carlos y Mari y a Marta y Jose, por hacerme un hueco en vuestras vidas. Gracias por vuestro apoyo en los momentos complicados y por tenerme siempre presente. Gracias, por quererme tanto. Por supuesto, gracias a Sergio, por tener esa maravillosa y perpetua sonrisa que tanto me alegra el corazón y me tranquiliza el espíritu. Gracias también a todos *Los Castillo*.

Gracias a María porque contigo realicé esos vuelos locos sin motor. Esos vuelos que sólo se realizan con los buenos amigos. Gracias, porque te sentaste a mi lado el primer día del *cole*... y ya nunca te levantaste de mi lado.

Gracias a mi amigo Alberto, porque cuando yo sólo tenía 10 años me presentaste una mosquita pequeñita y preciosa, de nombre para mí, entonces, impronunciable (¿*Drosophila melano-sé-qué?*) y que además se escribía raro. Quizá tú seas el culpable de todo este lío porque me invitaste a hacer mi primer experimento. Gracias mil veces. Gracias, también a Alicia porque siempre estáis cuando os necesitamos.

Gracias a Agustín, porque han sido muchas cervezas vespertinas las que hemos compartido. Gracias porque también estás siempre.

Gracias a Emilio y a David y Belén, por recibirme con los brazos abiertos. Gracias a Lucía e Iván, porque me llenáis de ternura. Gracias, también a Raúl, Chema, Miguel y Nuria, por las noches *malasañeras* compartidas.

Y gracias a Carlos (el ser humano) por aquella partida que perdí ganando. Gracias por elegir el asiento contiguo al mío en este viaje.







# **RESUMEN**





La hematopoyesis es el proceso por el cual tiene lugar la generación de las células sanguíneas a partir de las células madre hematopoyéticas en la médula ósea. El equilibrio entre proliferación y diferenciación celular a lo largo de este proceso esta regulado mediante la coordinación de las respuestas a los estímulos recibidos por la célula desde el entorno celular o bien, desde regiones alejadas a la misma. El resultado final de la integración de estas señales es, con frecuencia, la modificación de la expresión de genes importantes que definen las características celulares. Las alteraciones producidas a lo largo de este proceso de regulación de la expresión génica durante la hematopoyesis puede dar lugar al desarrollo de leucemias.

La proteína AF10 es un factor de transcripción conservado desde levaduras hasta humanos aunque aún no se ha identificado a qué genes regula. No obstante, se ha descrito que el gen *AF10* aparece translocado con al menos dos genes, *MLL* y *CALM*, dando lugar a las proteínas de fusión MLL-AF10 y CALM-AF10, respectivamente. Estas proteínas de fusión aparecen en diferentes tipos de leucemia en las que se observa una alteración en el patrón de expresión de los genes *Hox*, lo que sugiere que AF10 pueda estar implicada en el proceso de regulación de estos genes.

En este trabajo se demuestra la participación de la proteína AF10 en las fases iniciales del proceso de diferenciación hematopoyética. La inducción de la diferenciación celular hematopoyética conlleva la reducción de los niveles de la proteína AF10. Por otro lado, se ha demostrado la importancia del mantenimiento de los niveles de la proteína AF10 en las células multipotenciales. De hecho, alteraciones de los niveles de dicha proteína en las células con un menor grado de diferenciación celular, mediante su sobreexpresión o la interferencia de su ARNm, produce la muerte celular por apoptosis. Las evidencias de estas dos líneas de trabajo sugieren que la proteína AF10 es fundamental para el mantenimiento del estado celular multipotencial.



# **SUMMARY**



The process of hematopoiesis consists in the generation of blood cells from bone marrow hematopoietic stem cells. Stimuli arriving to the cell from its environment, or from remote regions of the body, regulate the balance between cell proliferation and differentiation. The integration of these signals frequently has an effect on the expression of important genes that define cellular characteristics. Alterations in the regulation of the gene expression during hematopoiesis could lead to the development of leukemia. Also, leukemias can be frequently associated to chromosomal translocations between transcription factors genes.

AF10 is a transcription factor highly conserved from yeast to human even though the genes that are regulated by AF10 remain unknown. Nevertheless, it is known that *AF10* gene can be translocated with at least two other genes, *MLL* and *CALM*, generating MLL-AF10 and CALM-AF10 fusion proteins. These fusion proteins are present in different types of leukemia coinciding with an alteration of the expression pattern of several *Hox*. These facts suggest the implication of AF10 protein in the regulation of the expression of *Hox* genes.

In this work it has been demonstrated the participation of AF10 protein at the beginning of the hematopoietic differentiation. The induction of hematopoietic cell differentiation triggers the reduction of AF10 levels. In addition, it has been shown the important role of the maintenance of AF10 levels in multipotential cells. Alterations of AF10 levels, both because of the AF10 overexpression or its ARNm interference, produce apoptotic cell death. These results suggest that AF10 is essential for the maintenance of multipotential cell stages.



# ÍNDICE





<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
1. La sangre.....	21
2. El ciclo celular .....	22
3. La hematopoyesis .....	24
3.1. Las células madre hematopoyéticas .....	24
3.2. El nicho de las células madre .....	25
3.3. La diferenciación hematopoyética.....	25
4. La regulación de la expresión génica .....	27
4.1. La transducción de señales .....	27
4.2. Los factores de transcripción.....	28
4.3. La estructura de la cromatina .....	29
4.4. La regulación de la hematopoyesis y los genes <i>Hox</i> .....	30
5. Las leucemias .....	32
6. El factor de transcripción MLL .....	32
6.1. Estructura de la proteína MLL .....	33
6.2. Implicación del gen <i>MLL</i> en translocaciones génicas asociadas a leucemias ...	33
7. El factor de transcripción AF10.....	35
7.1. Estructura y función de la proteína AF10.....	35
7.2. Implicación de la proteína AF10 en translocaciones génicas asociadas a leucemias .....	37
8. Cultivos celulares como sistema modelo.....	39
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
1. Materiales .....	47
1.1. Anticuerpos.....	47
1.2. Cultivos celulares .....	47
1.2.1. Líneas celulares .....	47
1.2.2. Cultivos primarios .....	48
1.2.3. Medios de cultivo .....	48
1.2.4. Tratamientos celulares .....	48

1.2.5. Transfecciones .....	49
1.3. Citometría de flujo.....	49
1.4. Inmunofluorescencia .....	49
1.5. Western blot.....	49
1.6. PCR cuantitativa.....	49
1.7. Plásmidos.....	50
1.8. Oligonucleótidos.....	50
2. Métodos .....	51
2.1. Biología celular .....	51
2.1.1. Cultivos celulares.....	51
2.1.1.1. Inducción de la diferenciación celular .....	51
2.1.1.2. Inhibición del proteasoma.....	52
2.1.1.3. Transfecciones celulares .....	52
2.1.1.4. Cultivos primarios.....	53
2.1.2. Análisis por citometría de flujo .....	53
2.1.2.1. Contenido de ADN .....	53
2.1.2.2. Marcadores de superficie .....	54
2.1.2.3. Apoptosis .....	54
2.1.2.4. Inmunofluorescencia.....	54
2.1.3. Inmunofluorescencia.....	54
2.2. Biología molecular .....	55
2.2.1. Clonajes .....	55
2.2.2. Generación de un anticuerpo policlonal anti-AF10.....	56
2.2.3. Western blot.....	57
2.2.4. Purificación de ácidos nucleicos.....	57
2.2.5. PCR cuantitativa .....	58
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
1. Generación de un anticuerpo policlonal para la detección de la proteína AF10 .....	61
2. Estudio del perfil de expresión de la proteína AF10 durante la diferenciación hematopoyética .....	65
2.1. Expresión de la proteína AF10 durante el proceso de diferenciación megacariocítica.....	65

2.1.1. Inducción de la diferenciación megacariocítica .....	65
2.1.2. Caracterización de la proteína AF10 en la diferenciación megacariocítica.....	67
2.2. Expresión de la proteína AF10 en el proceso de diferenciación monocítica ....	70
2.2.1. Inducción de la diferenciación monocítica .....	70
2.2.2. Caracterización de la proteína AF10 en la diferenciación monocítica .....	72
2.3. Expresión de la proteína AF10 en las distintas líneas celulares .....	75
3. Sobreexpresión de la proteína AF10 .....	77
3.1. Sobreexpresión estable de la proteína AF10 .....	77
3.2. Sobreexpresión transitoria de la proteína AF10 .....	79
3.2.1. Estudio de la viabilidad celular.....	79
3.2.2. Efecto de la diferenciación celular sobre la proteína AF10 sobreexpresada .....	82
4. Silenciamiento de la proteína AF10 .....	85
4.1. Efecto del silenciamiento de la proteína AF10 sobre la viabilidad celular .....	87
5. Cultivos primarios .....	91
5.1. Inducción de la diferenciación monocítica de las células extraídas de la médula ósea de ratón .....	91
5.2. Caracterización de la proteína AF10 en cultivos primarios de ratón durante la diferenciación monocítica .....	93
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>95</b>
1. Los niveles de la proteína AF10 disminuyen al inducir la diferenciación celular .....	98
2. La alteración de los niveles de la proteína AF10 induce la apoptosis en células multipotenciales .....	101
3. La proteína AF10 como modulador de la transcripción .....	104
4. La proteína AF10 como regulador del ciclo celular .....	109
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>113</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>117</b>



# **ABREVIATURAS**



ADN: ácido desoxirribonucleico  
ADNc: ADN complementario  
AF10: Acute lymphoblastic leukemia-Fused gene from chromosome 10  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNi: ARN interferente  
ARNm: ARN mensajero  
ARNr: ARN ribosómico  
CALM: Clathrin-Assembly Lymphoid-Myeloid  
CBS: Clathrin binding site (sitio de unión a clatrina)  
CF: citometría de flujo  
CLP: common lymphoid progenitor (progenitor linfoide común)  
CMP: common myeloid progenitor (progenitor mieloide común)  
DAPI: 6-diamino-2 phenilindol  
DMSO: dimetil sulfato sódico  
ENTH: epsin N-terminal homology domain (Dominio N-terminal de homología con la epsina).  
FBS: fetal bovin serum (suero fetal bovino)  
GFP: green fluorescent protein (proteína verde fluorescente)  
GST: glutation-S-transferasa  
HSC: hematopoietic stem cell (célula madre hematopoyética)  
IF: inmunofluorescencia  
LZ: leucine zipper (cremallera de leucinas)  
M-CSF: monocytic-colony stimulator factor (factor estimulador de monocitos)  
MLL: Mixed Lineage Leukemia  
NLS: nuclear localization signal (señal de localización nuclear)  
PCR: polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)  
PHD: plant homedomain  
PO: peroxidasa  
PS: fosfatidil serina  
TBP: TATA-binding protein (proteína de unión a la caja TATA)  
TPA: 12-O-tetradecanoil-phorbol-13-acetato





# **INTRODUCCIÓN**



## 1. LA SANGRE

Los organismos multicelulares requieren un sistema que permita la comunicación entre las distintas partes de su estructura. En los organismos vertebrados, este sistema se denomina sistema circulatorio y está formado por largos conductos, los vasos sanguíneos, que permiten el transporte de nutrientes y otros elementos necesarios para el organismo a través de la sangre (Alberts et al., 2002).

La sangre es un tejido conectivo viscoso constituido por una parte líquida y por las células sanguíneas. La parte líquida se denomina plasma y está compuesta por agua, sales y proteínas. Las células sanguíneas ejercen diversas funciones en el organismo y se pueden clasificar en dos grupos: los glóbulos rojos o eritrocitos y los glóbulos blancos o leucocitos (Gartner and Hiatt, 2007).

Los eritrocitos son células carentes de núcleo y deben su nombre al color rojizo conferido por los altos niveles de la proteína hemoglobina. La principal función de los eritrocitos es el transporte de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> a través del cuerpo. Los leucocitos participan en la defensa del organismo ante posibles agentes infecciosos y engloban diferentes tipos celulares: neutrófilos, basófilos, eosinófilos, megacariocitos, monocitos y linfocitos (Gartner and Hiatt, 2007).

Los neutrófilos, basófilos y eosinófilos forman parte del grupo de los granulocitos, que reciben este nombre ya que muestran una apariencia *granulada* debido a la presencia de gran cantidad de lisosomas y vesículas secretoras en el citoplasma. Los neutrófilos participan en la respuesta a infecciones de bacterias mediante la fagocitosis de éstas. Los basófilos y los eosinófilos participan en los procesos alérgicos. Así, mientras los basófilos secretan histamina cuando el individuo se expone a un alérgeno, los eosinófilos participan en la respuesta inflamatoria típica de las reacciones alérgicas (Gartner and Hiatt, 2007).

Los megacariocitos son células de gran tamaño productoras de plaquetas. Las plaquetas, a su vez, participan en la cicatrización de los daños producidos en los vasos sanguíneos (Gartner and Hiatt, 2007). Los monocitos son células que, al abandonar los vasos sanguíneos e introducirse en el tejido conectivo, finalizan su maduración pasando

a denominarse macrófagos. Los macrófagos, junto con los neutrófilos, participan en la fagocitosis de agentes infecciosos (Gartner and Hiatt, 2007). Por último, los linfocitos están implicados en la respuesta inmune y se dividen en dos grupos: los linfocitos B y los linfocitos T. La función de los linfocitos B y T es la detección de antígenos ajenos al organismo para el desarrollo posterior de una respuesta específica cuyo objetivo es la eliminación de dicho antígeno (Gartner and Hiatt, 2007).

Las diferentes células sanguíneas se originan a partir de una célula madre hematopoyética común a todas ellas. Puesto que la vida media de las células sanguíneas es limitada, su producción es continua a lo largo de la vida del organismo. Este hecho implica la existencia de células madre hematopoyéticas en la médula ósea que pueden comenzar a proliferar y diferenciarse en el momento en el que el organismo lo requiera (Orkin and Zon, 2008).

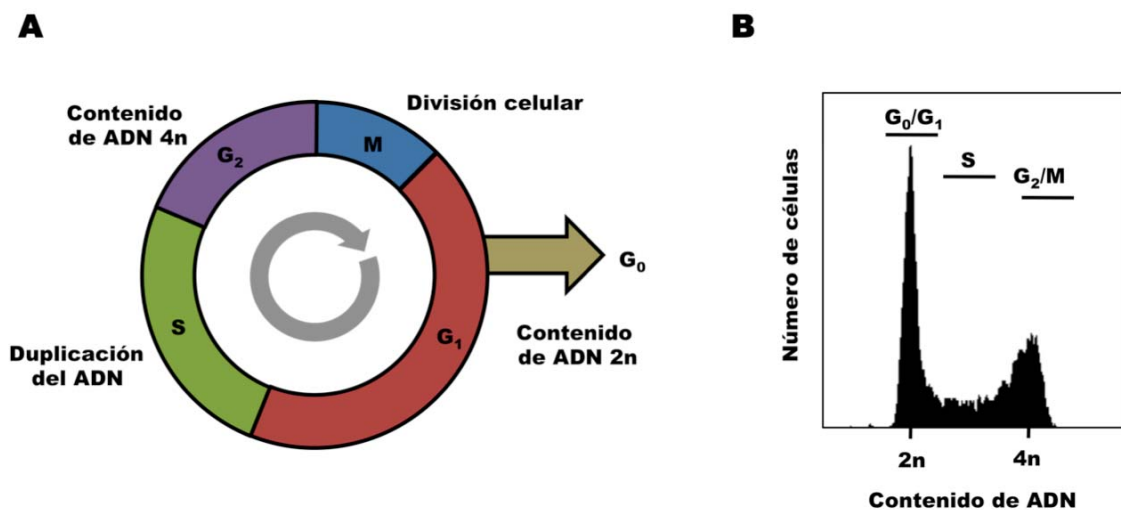
## **2. EL CICLO CELULAR**

El ciclo de división celular es el conjunto de eventos que dan lugar a dos células a partir de una célula. Este proceso se distribuye en cuatro fases, la última de las cuales es la citocinesis en la que se produce la división de la célula en dos *células hijas*. Para mantener la integridad genómica entre las dos células hijas, el ADN nuclear debe duplicarse justo antes de que se produzca la división celular (Nishitani and Lygerou, 2002).

Las fases del ciclo celular se denominan fases  $G_1$ , S,  $G_2$  y M (Figura 1). La fase  $G_1$  es aquella en la que la célula se prepara para la duplicación del ADN, sintetizándose toda la maquinaria de replicación que será requerida durante este proceso. En la fase S se produce la duplicación o síntesis del ADN, de forma que el contenido de ADN pasa de ser  $2n$  a ser  $4n$ , sin verse alterada la ploidía celular. Una vez se ha producido la duplicación del contenido cromosómico, comienza la fase  $G_2$ , en la que se comprueba que la síntesis de ADN se ha producido correctamente de forma que la célula está preparada para que comience la mitosis. La fase M, o mitosis, es aquella en la que se produce la distribución del contenido celular en dos células hijas de forma que cada una de ellas recupera el contenido cromosómico de  $2n$  (Nishitani and Lygerou, 2002; Blow

and Dutta, 2005). Cuando las células hijas son exactamente iguales entre ellas e iguales a la célula que las ha originado, la división celular se dice que es simétrica y cuando las células hijas son diferentes entre sí, se dice que la división celular es asimétrica (Orkin and Zon, 2008). Cuando las células se encuentran en estado quiescente se dice que están en fase  $G_0$ . Las células que se encuentran en fase  $G_0$  están fuera del ciclo celular y presentan un contenido de ADN de  $2n$  (Figura 1). Las células en estado  $G_0$  se mantienen en esta fase hasta que reciben señales que estimulan su entrada en el ciclo celular proliferativo (Vermeulen et al., 2003b).

Las alteraciones producidas durante el ciclo celular, activan los mecanismos necesarios para que se produzca la muerte celular por apoptosis (Vermeulen et al., 2003a). Si este mecanismo de muerte celular no se activa se puede producir la proliferación descontrolada de células con un contenido de ADN aberrante que puede dar lugar al desarrollo de tumores (Kirsch-Volders et al., 2002).



**Figura 1. El ciclo celular.** (A) Esquema de las diferentes fases que constituyen el ciclo celular. (B) Detección del contenido de ADN celular mediante citometría de flujo en distintas fases del ciclo celular. Las células que se encuentran en las fase  $G_0/G_1$  presentan un contenido de ADN de  $2n$ , mientras que las células que se encuentran en las fases  $G_2/M$  tienen un contenido de ADN de  $4n$ . Las células en fase S tienen un contenido de ADN que oscila entre  $2n$  y  $4n$ .

Las células pueden abandonar el ciclo celular como consecuencia de su entrada en el proceso de diferenciación. La diferenciación celular es el mecanismo por el cual una célula que presenta un grado de especialización reducido adquiere un mayor

compromiso funcional con un linaje celular determinado (Orkin, 2000). Cuando comienza el proceso de diferenciación, la parada del ciclo celular es paulatina, de forma que con cada división celular las células hijas aumentan su especialización funcional y disminuye su capacidad proliferativa (Orkin and Zon, 2008). Así, aún a pesar de que durante el proceso de diferenciación celular se definan estadios, este proceso en realidad presenta una continuidad entre un momento determinado de la diferenciación y el siguiente, lo que dificulta la definición de cada uno de ellos. Los cambios que definen las fases de este proceso están determinados por las modificaciones en la regulación de la expresión de los genes implicados en el control del ciclo celular (Orkin and Zon, 2008).

### **3. LA HEMATOPOYESIS**

#### **3.1. LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS**

Las células madre son células que presentan capacidad para diferenciar hacia distintos tipos celulares así como de autorrenovarse (Arai and Suda, 2007). Cuando las células madre se encuentran en un proceso proliferativo se dividen de forma simétrica, dando lugar a dos células hijas iguales entre sí e iguales a la célula madre originaria (Orkin and Zon, 2008). Sin embargo, cuando las células madre son inducidas para diferenciarse, se dividen de forma asimétrica (Oguro and Iwama, 2007), de manera que una de las células hijas mantiene las características de la célula madre originaria mientras que la otra comienza el proceso de diferenciación y el compromiso con determinados linajes celulares (Orkin, 2000; Orkin and Zon, 2008).

Las células madre hematopoyéticas (HSCs) son células que residen, en su mayoría, en la médula ósea de los mamíferos y que dan lugar a los diferentes tipos de células sanguíneas cuando son inducidas a diferenciar debido a la recepción de diversas señales (Orkin and Zon, 2008). Gracias a su capacidad proliferativa, las células madre hematopoyéticas mantienen la producción de células sanguíneas de forma continua. El balance entre la proliferación y la diferenciación de las células madre hematopoyéticas está controlado por diversos mecanismos reguladores cuyo origen viene determinado

por las interacciones físicas y químicas que se producen entre las células madre hematopoyéticas y su nicho celular (Arai and Suda, 2007).

### **3.2. EL NICHU DE LAS CÉLULAS MADRE**

El microambiente en el que se encuentran las células madre se denomina nicho celular y está formado por distintos tipos celulares que participan en la regulación del equilibrio entre quiescencia, proliferación y diferenciación celular (Ohlstein et al., 2004).

En la médula ósea, el nicho hematopoyético está dividido en dos regiones: la región osteoblástica y la región vascular. La región osteoblástica está formada por los osteoblastos. Cuando las células madre hematopoyéticas se encuentran en esta región de la médula ósea, se mantienen en estado quiescente (fase G<sub>0</sub> del ciclo celular) hasta que reciben los estímulos proliferativos que conllevan su entrada en el ciclo celular (Zhang et al., 2003; Suda et al., 2005; Arai and Suda, 2007). Cuando las células madre entran en el ciclo proliferativo asimétrico, una de las células hijas conserva las propiedades de la célula madre originaria, mientras que la otra migra a la región vascular del nicho, formada por células endoteliales y entra en el proceso de diferenciación (Arai and Suda, 2007).

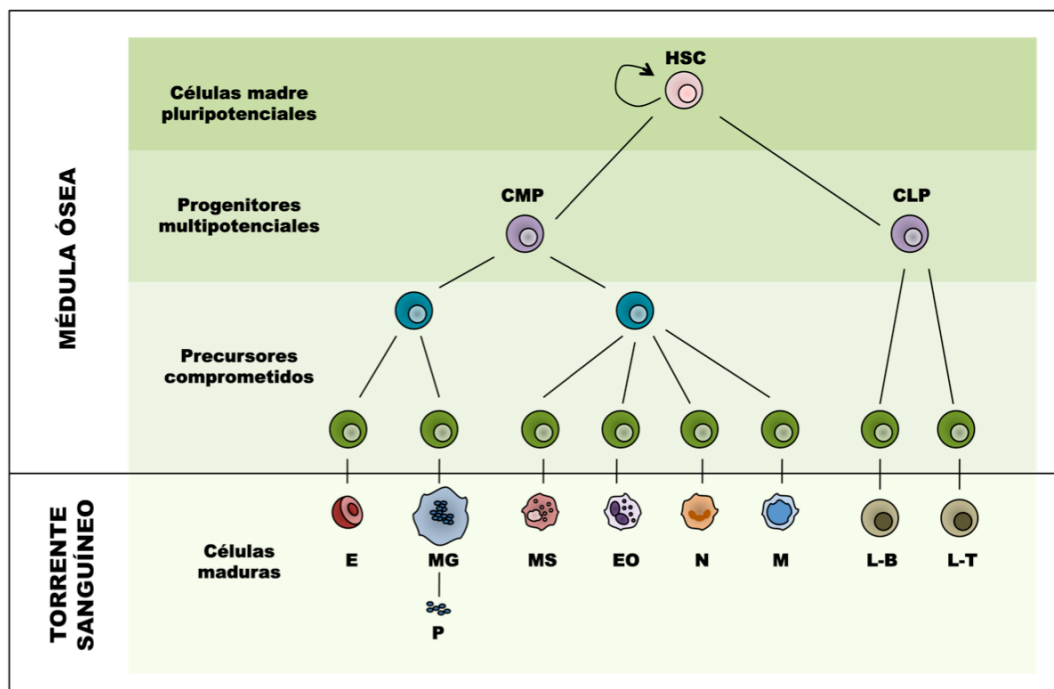
El mecanismo molecular que regula este proceso aún no se conoce en profundidad, pero existen evidencias que muestran la participación tanto de moléculas de adhesión celular como de *quimioquinas* secretadas por las células del nicho. El momento en el que las células madre hematopoyéticas abandonan su estado de quiescencia y comienzan a proliferar y diferenciarse marca el inicio de la hematopoyesis (Arai and Suda, 2007).

### **3.3. LA DIFERENCIACIÓN HEMATOPOYÉTICA**

La hematopoyesis comienza a partir de una población homogénea de células madre hematopoyéticas que se dividen de forma asimétrica dando lugar a precursores hematopoyéticos parcialmente comprometidos. Éstos a su vez, continúan su proceso hematopoyético hasta alcanzar el estado celular diferenciado maduro (Figura 2). En función de la vía de diferenciación con la que estos precursores estén comprometidos se

denominan precursores linfoides comunes (CLP), que darán lugar a los linfocitos, o precursores mieloides comunes (CMP), que darán lugar al resto de células sanguíneas (Orkin and Zon, 2008).

Los CLP y CMP son células multipotenciales que han perdido su capacidad de división simétrica, de manera que en cada proceso de división celular aumentan su grado de diferenciación dando lugar a los diferentes tipos de células sanguíneas maduras (Orkin and Zon, 2008). Este proceso está regulado por numerosos factores de crecimiento y citoquinas que son detectados por los receptores de membrana que internalizan la señal, lo que induce la modificación de la expresión génica que dará lugar a la respuesta celular correspondiente en cada caso (Gartner and Hiatt, 2007; Orkin and Zon, 2008). Cuando la células hematopoyéticas alcanza su máximo grado de maduración son liberadas al torrente sanguíneo (Orkin and Zon, 2008).



**Figura 2. La hematopoyesis.** Esquema de algunos de los estadios celulares a lo largo del proceso de diferenciación hematopoyética hacia diferentes destinos celulares. En la médula ósea, las células madre hematopoyéticas (HSCs) se dividen y diferencian dando lugar a los precursores mieloides y linfoides comunes (CMP y CLP). Los CMPs y CLPs, a su vez, se dividen y diferencian dando lugar a los diversos tipos de células sanguíneas maduras que serán expulsadas al torrente sanguíneo. HSC: célula madre hematopoyética; CMP: progenitor mieloides común; CLP: progenitor linfoides común; E: eritrocitos; MG: megacariocitos; P: plaquetas; MS: mastocitos; EO: eosinófilos; N: neutrófilos; M: monocitos; L-B: linfocitos B; L-T: linfocitos T.



## **4. LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA**

Todas las células de un mismo organismo provienen de una única célula cuando se forma el cigoto tras la fecundación. Aún a pesar de este origen común, los diferentes tipos celulares que forman parte de los organismos multicelulares presentan grandes diferencias tanto a nivel funcional como a nivel estructural. Esta diversidad se debe a que durante la diferenciación celular tienen lugar múltiples cambios en la expresión génica que son consecuencia de las señales externas que recibe la célula. Estas señales son integradas por las células, lo que conlleva el cambio en el patrón de expresión de los genes que definen las características funcionales y estructurales de las células y que pueden variar a lo largo de la vida de las mismas (Davidson et al., 2002).

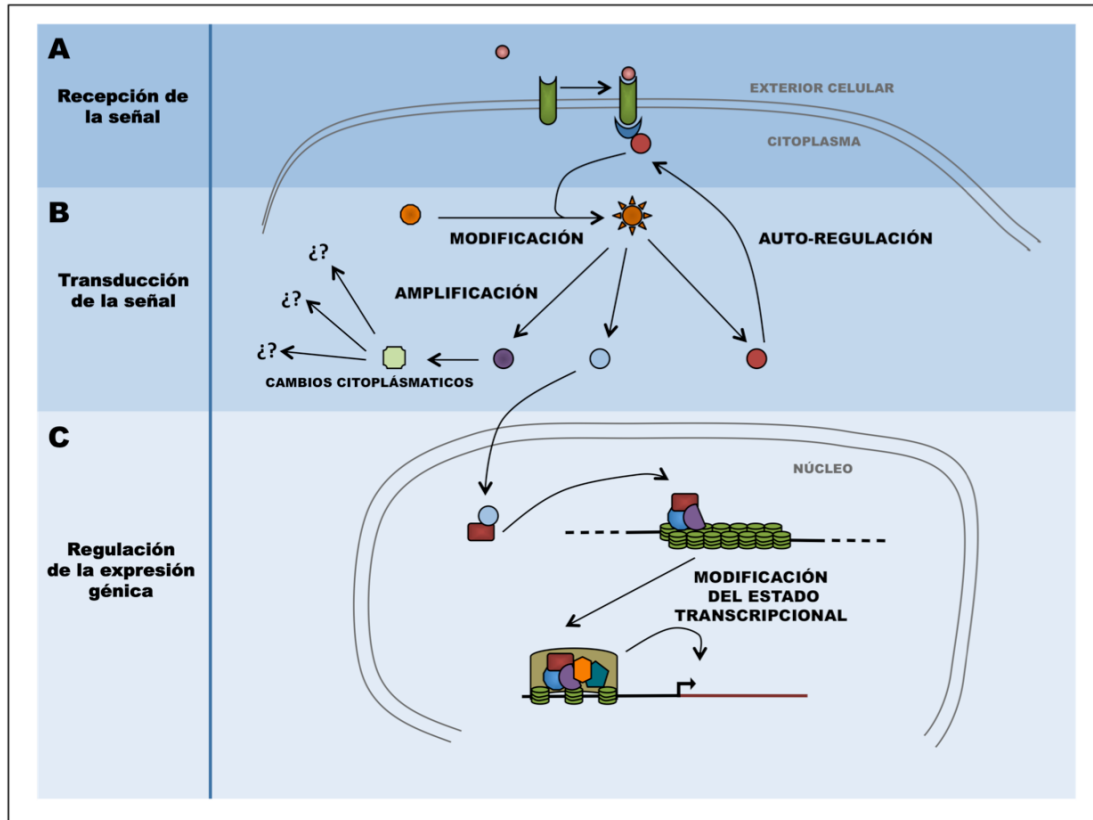
### **4.1. LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES**

Los mecanismos de comunicación entre las diferentes células dependen en gran medida de la *emisión* y *recepción* de moléculas secretadas por células del entorno o bien, por células que se encuentran muy alejadas del mismo. La respuesta celular a dichas señales depende de las características intrínsecas de la célula receptora, ya que diferentes tipos celulares pueden responder de forma distinta a la misma señal (Davidson et al., 2002).

Las señales que llegan a una célula son detectadas por proteínas receptoras que se encuentran en la superficie externa de la membrana celular (Figura 3A). Cuando el receptor de membrana detecta dichas señales, sufre una serie de cambios estructurales mediados por segundos mensajeros que modifican su interacción con proteínas que se encuentran en el interior de la célula. Estas proteínas citoplasmáticas amplifican y difunden la señal recibida en el interior celular hasta alcanzar las proteínas diana, cuya modificación afecta al comportamiento de la célula en función del estímulo recibido (Figura 3B; Davidson et al., 2002).

Algunas de estas proteínas diana son factores de transcripción que se encuentran en el interior del núcleo formando parte de la maquinaria de regulación de la expresión génica. Como consecuencia del proceso de transducción de la señal recibida por la célula, la maquinaria transcripcional puede verse modificada, lo que tiene como

resultado la variación del patrón de expresión génica (Figura 3C; Freiman et al., 2001; Davidson et al., 2002). En función de la señal recibida, se modificará el patrón de expresión de diversos genes que contribuyen a determinar el proceso que seguirá la célula (Davidson et al., 2002).



**Figura 3. La regulación de la expresión génica.** Esquema de las distintas fases implicadas en el proceso de regulación de la expresión génica. La señal es detectada por el receptor de membrana que interacciona con proteínas del citoplasma (A) que se encargan de la amplificación de la señal en el interior de la célula (B). La señal es transmitida al núcleo y se modifica el patrón de expresión génica (C).

## 4.2. LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

La maquinaria de regulación transcripcional está formada por múltiples complejos multiproteicos compuestos por factores de transcripción, así como por cofactores que participan en la regulación de la actividad de la ARN polimerasa. Si bien es cierto que existen factores de transcripción comunes a todos los procesos transcripcionales, como los denominados factores de transcripción para la ARN

polimerasa II (TFII), también existen factores de transcripción específicos para determinados grupos de genes. Estos factores específicos son activados o reprimidos para que se produzca la modulación de la transcripción de los genes afectados en cada proceso celular concreto (Wassarman and Sauer, 2001).

Los factores de transcripción presentan características estructurales que les permiten la interacción con el ADN así como con otras proteínas que formen parte de la maquinaria transcripcional (Garvie and Wolberger, 2001). Las regiones que permiten este tipo de interacciones se denominan *dominios* y, en función de la estructura terciaria que presenten, se unirán a diferentes regiones nucleotídicas o aminoacídicas (Garvie and Wolberger, 2001). Algunos factores de transcripción presentan, además de dominios de interacción con el ADN y con otras proteínas, dominios con actividad enzimática que les confiere la capacidad para modificar la estructura de la cromatina (Garvie and Wolberger, 2001). El grado de condensación de la cromatina es, a su vez, un punto de control en el proceso de regulación de la transcripción (Cairns, 2001).

### **4.3. LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA**

La cromatina es el conjunto formado por ADN y proteínas cuya unidad estructural básica es el nucleosoma. Los nucleosomas son complejos formados por un *core* de proteínas de la familia de las histonas que se encuentra rodeado por una porción de ADN de aproximadamente 156 pb. La familia de proteínas histónicas está formada por cinco proteínas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) que presentan una estructura globular y una *cola* en la región N-terminal que puede sufrir modificaciones mediante la acetilación o metilación de lisinas y argininas, y la fosforilación de serinas (Jenuwein and Allis, 2001; Alberts et al., 2002).

La modificación covalente de las colas de las histonas determina la estructura de la cromatina, ya que en función del tipo de modificación que se produzca aumentará o disminuirá el grado de condensación de los nucleosomas lo que repercutirá en la capacidad de los factores reguladores de la transcripción para acceder al ADN (Cairns, 2001; Jenuwein and Allis, 2001). Cuando la cromatina presenta un alto grado de condensación, la maquinaria transcripcional no puede acceder a estas regiones del ADN, por lo que los genes localizados en esa región del genoma se mantienen

silenciados. Así, los factores reguladores que podrán unirse a estas regiones son los que contribuyan a descondensar la cromatina mediante el cambio en las modificaciones covalentes de la cola de las histonas (Cairns, 2001).

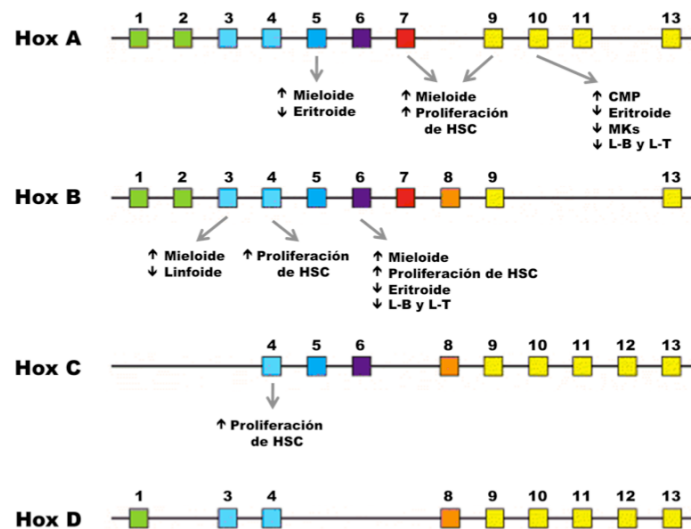
#### **4.4. LA REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS Y LOS GENES *HOX***

El inicio del proceso hematopoyético está regulado por las señales emitidas por las células que forman parte del nicho hematopoyético (Arai and Suda, 2007). Como consecuencia de la recepción de estos estímulos, las células madre hematopoyéticas sufren una serie de cambios en la expresión génica que implican el comienzo de diferenciación celular (Orkin, 2000; Orkin and Zon, 2008). El principal mecanismo de regulación de la expresión génica durante la diferenciación hematopoyética se produce mediante las modificaciones epigenéticas de las regiones promotoras de los genes implicados en este proceso (Lessard and Sauvageau, 2003).

Las proteínas del grupo Polycomb (PcG) y Tritórax (TrxG) son factores de transcripción que participan en la regulación de diferentes procesos celulares, entre los que se incluye la hematopoyesis (Lessard and Sauvageau, 2003). La función de las proteínas PcG y TrxG es antagónica, de forma que las proteínas PcG mantienen el estado transcripcional reprimido, mientras que las proteínas TrxG lo mantienen activado (Ringrose, 2007). Tanto las proteínas PcG como las proteínas TrxG están implicadas en el mantenimiento del estado transcripcional de, entre otros, los genes *Hox* (Ringrose, 2007). Los genes *Hox* son una familia de genes muy conservada a lo largo de la evolución que codifican factores de transcripción implicados en el desarrollo del eje anteroposterior de los animales (Krumlauf, 1994), así como en el proceso de la diferenciación hematopoyética (Argiropoulos and Humphries, 2007). En mamíferos, existen 39 genes *Hox* organizados en cuatro *clusters* o bloques génicos denominados A, B, C y D (Figura 4; Argiropoulos and Humphries, 2007).

Los genes *Hox* de los bloques génicos A, B y C, además de participar en distintos procesos durante el desarrollo temprano de los organismos, tienen una función esencial en el inicio de la diferenciación celular hematopoyética (Pineault et al., 2002; Argiropoulos and Humphries, 2007). El patrón de expresión de los *clusters* de genes *Hox* varía a lo largo del proceso de diferenciación hematopoyético. A pesar de ello,

diversos grupos de investigación han determinado que en los estadios iniciales de la diferenciación hematopoyética los niveles de expresión de estos genes en conjunto son mayores que al finalizar la hematopoyesis (ver revisiones Lawrence et al., 1996; Argiropoulos and Humphries, 2007).



**Figura 4. Organización de los bloques génicos en los que se encuentran los genes *Hox*.** Cada color indica un grupo de genes parálogos basado en la homología de sus secuencias. Debajo de cada gen se indica la vía hematopoyética que se ve afectada al producirse la sobreexpresión de dicho gen y en qué medida se ve afectada (↑: aumento; ↓: disminución). HSC: células madre hematopoyéticas; CMP: progenitor mieloide común; MKs: megacariocitos; L-B: linfocitos B; L-T: linfocitos T. Esquema adaptado de Argiropoulos and Humphries, 2007.

En diversos estudios, se ha descrito que la sobreexpresión en células extraídas de la médula ósea de ratón de distintos genes *Hox*, entre los que se encuentran los genes *Hoxa5*, *Hoxa7*, *Hoxa9*, *Hoxa10*, *Hoxb3*, *Hoxb4*, *Hoxb6* y *Hoxc4*, puede producir el bloqueo de la diferenciación celular y/o la aparición de síndromes proliferativos que afectan a diferentes linajes hematopoyéticos que tienen como consecuencia el desarrollo de distintos tipos de leucemia (Figura 4; Lawrence et al., 1996; Owens and Hawley, 2002; Ayton and Cleary, 2003; Grier et al., 2005; Okada et al., 2005; Okada et al., 2006). Estos datos sugieren la importancia de la regulación correcta de la expresión de estos genes a lo largo de la diferenciación hematopoyética.

## **5. LAS LEUCEMIAS**

La leucemia es una enfermedad de la sangre en la que se produce la proliferación descontrolada de uno o varios tipos de células sanguíneas (Gartner and Hiatt, 2007). Existen diferentes tipos de leucemias que se clasifican según el tipo celular que se ve afectado. Así, cuando las células implicadas en la enfermedad pertenecen a la vía de diferenciación mielocítica se denomina leucemia mieloide; mientras que cuando se ve afectado el número linfocitario se denomina leucemia linfoide. A su vez, estas leucemias pueden ser agudas, cuando se produce un incremento rápido de células inmaduras; o crónicas, cuando el crecimiento es constante pero más lento que en el caso de las leucemias agudas (Gartner and Hiatt, 2007).

Las leucemias están frecuentemente asociadas a alteraciones cromosómicas que afectan a genes que codifican factores de transcripción (Rabbitts, 1994; Orkin, 2000). Como consecuencia de estas translocaciones se puede producir la aparición de proteínas de fusión que generalmente presentan nuevas funciones distintas a aquéllas que tienen los factores de transcripción por separado (Rabbitts, 1994).

## **6. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN MLL**

El factor de transcripción MLL (**M**ixed **L**ineage **L**eukemia) pertenece a las proteínas del grupo Tritórax y está implicado en la regulación de la expresión de los genes *Hox* y en el proceso de diferenciación hematopoyética (Yu et al., 1995; Ernst et al., 2004; Hess, 2004a). El gen *MLL* es uno de los genes que con más frecuencia aparece implicado en proteínas de fusión asociadas al desarrollo de leucemia tanto mieloide como linfoide (Daser and Rabbitts, 2004) como consecuencia de su translocación con más de 70 genes diferentes (Slany, 2009). Estas translocaciones están asociadas a la alteración en el patrón de expresión de algunos de los genes *Hox* implicados en diferentes tipos de leucemias (Lawrence et al., 1996; Owens and Hawley, 2002; Ayton and Cleary, 2003; Grier et al., 2005; Okada et al., 2005; Okada et al., 2006; Orkin and Zon, 2008).

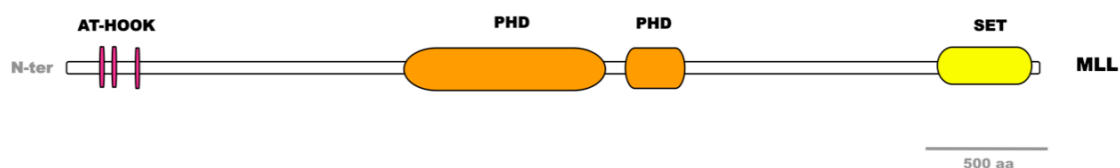
Las leucemias asociadas a la aparición de proteínas de fusión en las que participa la proteína MLL constituyen el 5% de las leucemias mieloides agudas y el

22% de las leucemias linfoides agudas (De Braekeleer et al., 2005; Meyer et al., 2006). El tipo de leucemia producida cuando se presentan estas mutaciones varía en función del gen con el que se transloca el gen *MLL*, lo que indica que no es este gen el único elemento de la fusión que confiere la propiedad leucemiogénica (Corral et al., 1996).

### 6.1. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA MLL

El factor de transcripción MLL, también denominado ALL-1 (Acute Lymphoblastic Leukemia) tiene un peso molecular de 431 KDa y está compuesto por 3931 residuos aminoacídicos.

La estructura de la proteína MLL presenta en la región N-terminal una región denominada gancho AT que le permite la interacción con el surco menor del ADN (Zelevnik-Le et al., 1994). A continuación, presenta dos dominios PHD (Plant-Homeodomain) que participan en la interacción con ADN y con otras proteínas (Martin et al., 2006; Mellor, 2006; Wysocka et al., 2006) y un dominio SET en la región C-terminal con actividad histona-metil-transferasa (Figura 5; Ayton and Cleary, 2001). Este último dominio se encarga de la metilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4) de las regiones promotoras de los genes cuya expresión es regulada por la proteína MLL (Milne et al., 2002; Schuettengruber et al., 2007). La metilación del residuo H3K4 es un marcador del inicio de los genes que están siendo transcritos (Gregory et al., 2007).



**Figura 5.** Esquema de la estructura de MLL. AT-HOOK: dominio de unión al ADN; PHD: dominio de interacción con otras proteínas y ADN; SET: dominio con actividad histona-metil-transferasa.

### 6.2. IMPLICACIÓN DEL GEN *MLL* EN TRANSLOCACIONES GÉNICAS ASOCIADAS A LEUCEMIAS

Como ya se ha mencionado, el gen *MLL* se transloca con al menos 70 genes diferentes (Slany, 2009). En todos los casos estudiados, estas reordenaciones

cromosómicas tienen como consecuencia la aparición de proteínas de fusión que pueden provocar un efecto de ganancia de función y/o de interferencia en la función normal de las proteínas afectadas por la translocación (Ayton and Cleary, 2001). Así, estas nuevas proteínas podrían atraer a elementos reguladores de la expresión génica hacia regiones en las que habitualmente no participan, lo que genera una alteración en el patrón normal de expresión de los genes afectados (Hess, 2004b).

En las proteínas de fusión producidas a partir de los reordenamientos cromosómicos en los que participa el gen *MLL*, se ha observado que sólo se conserva la región N-terminal, que incluye el gancho AT que le permite la interacción con el ADN (Daser and Rabbitts, 2004). De este modo, la proteína *MLL* pierde sus dominios PHD y SET, por lo que su actividad como histona-metil-transferasa, así como su interacción con otros elementos reguladores de la estructura de la cromatina, se pierde (Daser and Rabbitts, 2004). Diversos estudios han demostrado que la presencia de la región de los ganchos AT y la ausencia de los dedos PHD en las proteínas de fusión producidas por la translocación del gen *MLL*, son necesarias para que se produzca la transformación leucémica (Slany et al., 1998; Ayton et al., 2004; Chen et al., 2008; Muntean et al., 2008)

Los genes *AF4*, *AF9*, *ENL* y *AF10* son los que se translocan con más frecuencia con el gen *MLL* (Hess, 2004b). Así, constituyen el 78% de las translocaciones leucémicas en las que se ve implicado el gen *MLL* (Meyer et al., 2009). En los cuatro casos destacados se ha observado una alteración en los niveles de expresión de algunos de los genes *Hox* implicados en la hematopoyesis (Ayton and Cleary, 2003; Milne et al., 2005; Okada et al., 2005).

Los factores de transcripción *AF4*, *AF9*, *ENL* y *AF10* han sido descritos como componentes del mismo complejo multiproteico, lo que parece indicar que los reordenamientos cromosómicos de estos genes con el gen *MLL* no son aleatorios (Meyer et al., 2006). El gen *AF10* es el único que además de translocarse con el gen *MLL* sufre una translocación con al menos otro gen, denominado *CALM*, dando lugar a la proteína de fusión *CALM-AF10* que se ha observado en diferentes tipos de alteraciones leucémicas (Bohlander et al., 2000).



## **7. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AF10**

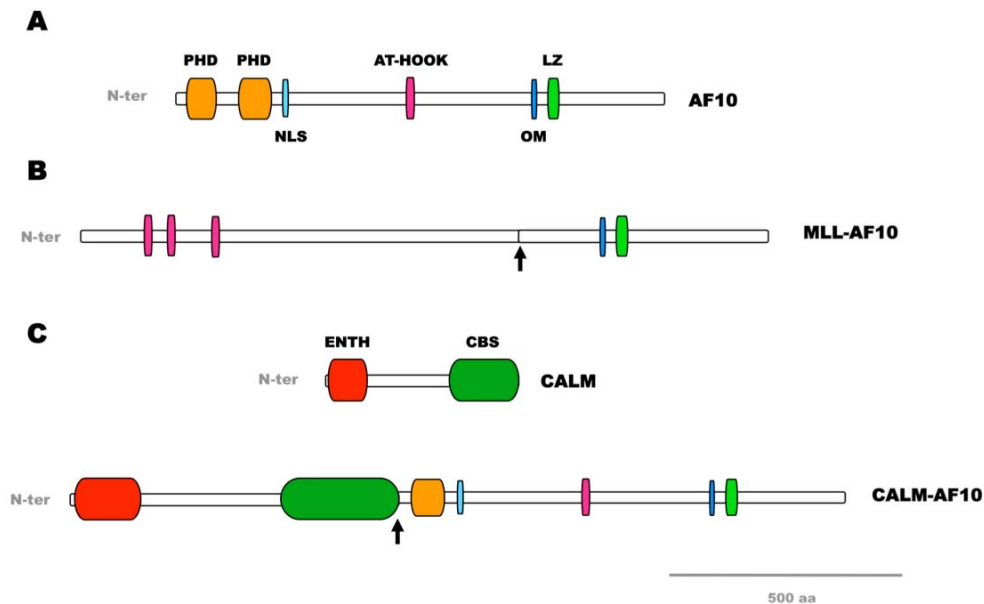
El factor de transcripción AF10 (**A**cute lymphoblastic leukemia-**F**used gene from chromosome **10**) está muy conservado desde levaduras hasta humanos. Aunque aún se desconoce a qué genes regula la proteína AF10, se ha descrito su expresión en testículos, cerebro, riñón, hígado y sangre periférica (Chaplin et al., 1995a; Linder et al., 1998; Forissier et al., 2007). Por otro lado, se ha descrito su participación en el desarrollo de distintos tipos de leucemia cuando aparece fusionada con las proteínas MLL y CALM (Chaplin et al., 1995a; Bohlander et al., 2000). El hecho de que el gen *AF10* sea el único descrito hasta ahora que además de translocarse con el gen *MLL* se transloque con otro gen y que en ambos casos se produzca el desarrollo de leucemia, sugiere que la proteína AF10 participa en el proceso de diferenciación hematopoyética.

### **7.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA AF10**

El factor de transcripción AF10 es una proteína nuclear con un peso molecular de 115 KDa que está constituida por 1027 aminoácidos (Linder et al., 1998). La estructura de la proteína AF10 presenta una región PHD, que le permite interactuar con el ADN y con otras proteínas (Martin et al., 2006; Mellor, 2006; Wysocka et al., 2006); una región de localización nuclear (NLS), un gancho AT que permite su interacción con el ADN; y una región constituida por un octapéptido (OM) y una cremallera de leucinas (LZ) que le permiten la interacción con otras proteínas (Figura 6A; Chaplin et al., 1995a).

Si bien aún se desconocen los genes a los que regula el factor de transcripción AF10, se ha descrito su interacción con varias proteínas, sugiriendo su participación en la regulación de la expresión génica. Una de estas proteínas es hDOT1L que pertenece a la familia de histona-metiltransferasas que carecen del dominio SET (Feng et al., 2002) y participa en la activación de la expresión génica mediante la metilación de la lisina 79 (K79) de la histona H3 (Singer et al., 1998). La proteína AF10 también interactúa con la proteína HP1, que en función de la región del genoma en la que actúa tiene una función represora o activadora (Linder et al., 2001; Fanti and Pimpinelli, 2008). Por otro lado, también se ha demostrado que tanto la proteína represora Ikaros, que participa en el proceso de diferenciación hematopoyética linfocítica, como las proteínas GAS41 y

SYT interaccionan con la región OM-LZ de la proteína AF10 y que a su vez interaccionan con factores remodeladores de cromatina que forman parte de la maquinaria activadora de la transcripción (Georgopoulos et al., 1992; de Bruijn et al., 2001; Debernardi et al., 2002; Greif et al., 2008). También se ha observado la interacción entre las proteínas AF10 y FLRG a través de el dominio PHD de la primera (Forissier et al., 2007). La proteína FLRG está implicada en la regulación de distintos procesos biológicos entre los que se encuentra la diferenciación eritrocítica (Maguer-Satta and Rimokh, 2004). Por último, se ha descrito la interacción la proteína AF10 con el factor de transcripción ENL, cuyo gen también se transloca con el gen *MLL* dando lugar a diferentes tipos de leucemia (Zeisig et al., 2005; Slany, 2009). La proteína ENL es una proteína que interacciona de manera indirecta con la enzima ARN polIII a través del factor de transcripción AF4 (Bitoun et al., 2007) participando en el proceso de elongación transcripcional. Todas estas interacciones proteicas parecen indicar que la proteína AF10 participa en el reclutamiento de otros factores de transcripción encargados de modificar la estructura de la cromatina participando así en la modulación de la expresión génica.



**Figura 6. Esquema de las estructuras de las proteínas AF10 (A), MLL-AF10 (B) y CALM y CALM-AF10 (C).** PHD: dominio de interacción con proteínas y con ADN; NLS: señal de localización nuclear; AT-HOOK: dominio de interacción con ADN; OM: octapéptido que interacciona con otras proteínas; LZ: cremallera de leucinas que interacciona con otras proteínas. ENTH y CBS: dominios de interacción con la clatrina. Las flechas indican los puntos donde se produce la fusión entre las proteínas.

La interacción de la proteína AF10 con las proteínas Ikaros y FLRG (Forissier et al., 2007; Greif et al., 2008) que participan en la diferenciación linfocítica y eritrocítica, respectivamente (Georgopoulos et al., 1992; Maguer-Satta and Rimokh, 2004); así como la implicación del gen *AF10* en procesos leucemogénicos (Chaplin et al., 1995a; Bohlander et al., 2000), sugiere la participación de la proteína AF10 en la diferenciación hematopoyética.

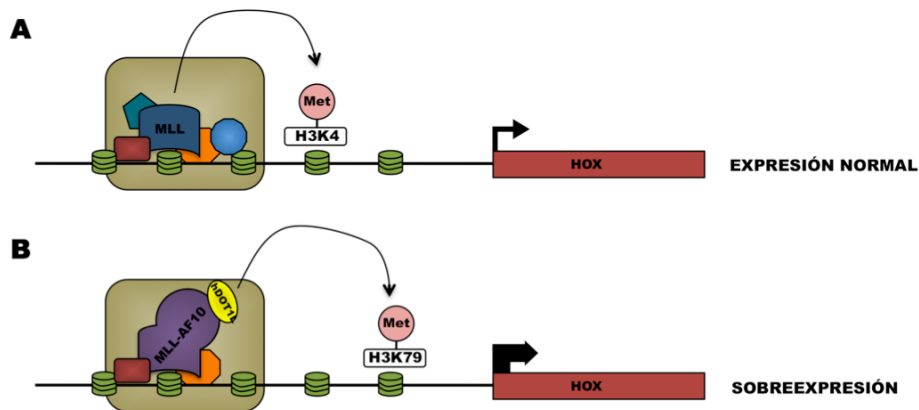
## **7.2. IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA AF10 EN TRANSLOCACIONES GÉNICAS ASOCIADAS A LEUCEMIAS**

Las translocaciones cromosómicas que dan lugar a la generación de la proteína de fusión MLL-AF10 tienen como consecuencia el desarrollo de diferentes tipos de leucemia (Chaplin et al., 1995a). Esta proteína de fusión está compuesta por la región N-terminal de la proteína MLL que sólo mantiene sus ganchos AT de unión al ADN y la región C-terminal de la proteína AF10 que únicamente conserva los dominios OM y LZ, implicados en la interacción con otras proteínas (Figura 6B; Chaplin et al., 1995b). De este modo, la nueva proteína de fusión puede unirse a las regiones de ADN a las que la proteína MLL se une, pero no puede modificar la cromatina, ya que carece del dominio SET con actividad histona-metiltransferasa. Por otro lado, se ha descrito que los dominios OM y LZ de la proteína AF10 son necesarios y suficientes para que se produzca la transformación leucémica (DiMartino et al., 2002; Perrin et al., 2003). A través de estos dominios se produce la interacción de la proteína AF10 con las proteínas hDOT1L, SYT y GAS41 que forman parte de la maquinaria reguladora de la expresión génica en la que participa la proteína AF10 (de Bruijn et al., 2001; Debernardi et al., 2002; Okada et al., 2005; Okada et al., 2006).

Como ya se ha comentado anteriormente, el gen *AF10* es el único gen descrito hasta ahora que además de translocarse con el gen *MLL* se transloca con otro gen, denominado *CALM*, produciendo tanto leucemia mieloide aguda como leucemia linfoide aguda (Bohlander et al., 2000). La proteína CALM (Clathrin-Assembly Lymphoid-Myeloid; también denominada PICALM) se localiza en el citoplasma celular e interacciona con la cadena pesada de la clatrina participando en el proceso de formación de las vesículas endosomales (Dreyling et al., 1996; Tebar et al., 1999; Caudell and Aplan, 2008). La proteína CALM está compuesta por 635 aminoácidos y

presenta los dominios ENTH (Epsin N-Terminal Homology domain) y CBS (Clathrin Binding Site) que le permiten interactuar con la clatrina (Figura 6C; Dreyling et al., 1996; Tebar et al., 1999; Caudell and Aplan, 2008).

Cuando se produce la translocación génica que da lugar a la proteína de fusión CALM-AF10, una parte de las proteínas de fusión producidas se localiza en el interior nuclear, mientras que la otra se mantiene en el citoplasma (Greif et al., 2008). En este caso, la proteína de fusión presenta en la región N-terminal la secuencia de la proteína CALM casi en su totalidad, ya que sólo pierde los 4 últimos aminoácidos; mientras que la proteína AF10 conserva un dominio PHD, el gancho AT de interacción con el ADN y los dominios OM y LZ (Figura 6C). En esta fusión, la única región de interacción con el ADN es aportada por la proteína AF10 (Caudell and Aplan, 2008).



**Figura 7. Modelo de regulación de la transcripción de los genes *Hox* por la proteína MLL y por la proteína de fusión MLL-AF10.** (A) La proteína MLL metila los residuos H3K4 de las regiones promotoras de los genes *Hox* contribuyendo a la expresión normal de estos genes. (B) La proteína de fusión MLL-AF10 recluta a la proteína hDOT1L modificando el patrón de metilación de histonas que implica el aumento de los niveles de expresión de los genes afectados. Adaptado de Okada et al., 2005.

El mecanismo molecular por el cual se produce leucemia cuando aparecen las proteínas de fusión MLL-AF10 y CALM-AF10 es desconocido, pero se ha demostrado que en ambos casos se produce la alteración en los niveles de expresión de algunos de los genes *Hox* implicados en hematopoyesis (Okada et al., 2005; Okada et al., 2006). El modelo propuesto por Okada y colaboradores en el año 2005 adaptado en la Figura 7 sugiere que la interacción de la proteína hDOT1L con los dominios LZ y OM de la

proteína AF10 modifica el patrón de metilación de la región promotora de los genes *Hox* afectados cuando se produce la proteína de fusión MLL-AF10. De este modo, se produce la hipometilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4) y la hipermetilación de la lisina 79 de la histona H3 (H3K79) produciendo la reestructuración de la cromatina y, como consecuencia de ello, la sobreexpresión del gen afectado (Okada et al., 2005). Este modelo también es aplicable a los procesos leucemiogénicos asociados a la presencia de la proteína de fusión CALM-AF10 (Okada et al., 2006).

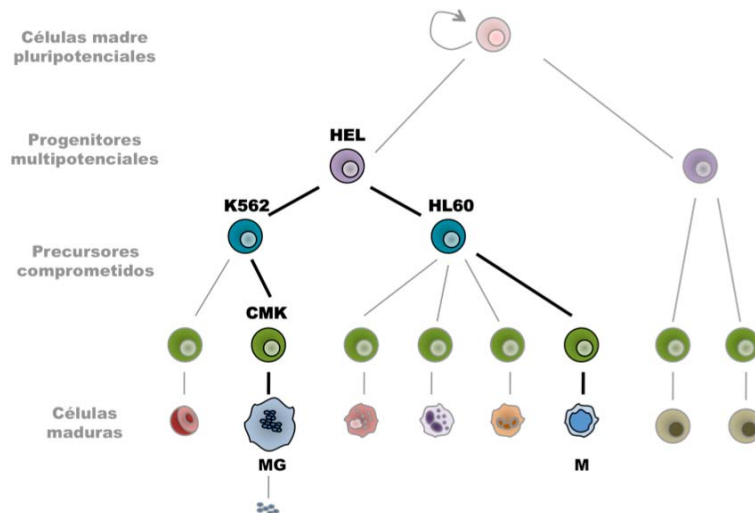
## **8. CULTIVOS CELULARES COMO SISTEMA MODELO**

La implicación de la proteína AF10 en el desarrollo de diferentes tipos de leucemia cuando se produce la translocación de su gen (Chaplin et al., 1995a; Bohlander et al., 2000) y su interacción con las proteínas Ikaros y FLRG, implicadas en la hematopoyesis (Georgopoulos et al., 1992; Forissier et al., 2007; Greif et al., 2008), hacen pensar que la proteína AF10 puede tener un papel importante en el proceso de diferenciación hematopoyética tanto linfocítica como eritrocítica. En este trabajo se ha estudiado si la proteína AF10 realiza una función en los procesos de diferenciación megacariocítica y monocítica. Para el abordaje experimental de esta tesis se han utilizado como sistema modelo líneas celulares hematopoyéticas establecidas a partir de pacientes con distintos tipos de leucemias así como cultivos primarios extraídos de la médula ósea de ratón.

La línea celular HEL fue generada a partir de sangre de un paciente con leucemia eritroide (Papayannopoulou et al., 1983). Estudios previos han demostrado su capacidad de diferenciación siguiendo diferentes vías hematopoyéticas como la megacariocítica, monocítica y eritroide en presencia del estímulo adecuado (Long et al., 1990). La línea celular K562 se estableció a partir de un paciente con leucemia mieloide crónica (Lozzio and Lozzio, 1975). Esta línea celular tiene capacidad de diferenciar siguiendo la vía eritrocítica y la vía megacariocítica en función del agente diferenciador empleado (Lozzio and Lozzio, 1975). La línea celular CMK fue establecida a partir de un paciente con leucemia megacarioblástica y sólo responde a la diferenciación megacariocítica (Sato et al., 1989). Por último, la línea celular HL60 se estableció a partir de un paciente con leucemia promielocítica y puede diferenciar hacia monocitos o hacia los diferentes

tipos celulares englobados en el grupo de los granulocitos en función del estímulo aplicado (Collins, 1987).

Las líneas celulares HEL, K562, CMK y HL60 presentan diferente grado de diferenciación hematopoyética. Así, la línea celular HEL es la que presenta un menor grado de diferenciación seguida de las líneas celulares K562 y CMK en la diferenciación megacariocítica y, de la línea celular HL60, en la diferenciación monocítica (Figura 8). El comportamiento de la proteína AF10 se ha estudiado utilizando estas cuatro líneas celulares. Este análisis permite aproximarse a conocer la función de la proteína AF10 en las vías de diferenciación megacariocítica y monocítica, así como el estudio de los efectos de la sobreexpresión y silenciamiento de la proteína AF10 en los diferentes estadios de diferenciación celular. Con objeto de confirmar los resultados obtenidos en estas líneas celulares, se han empleado también cultivos primarios extraídos a partir de la médula ósea de ratón inducidos a diferenciar siguiendo la vía monocítica.



**Figura 8. Sistema modelo.** Esquema orientativo de la localización de las líneas celulares empleadas en este trabajo durante la hematopoyesis. La línea celular HEL pertenece a los precursores multipotenciales, seguida de las líneas celulares K562 y CMK a lo largo de la vía de diferenciación monocítica, y de la línea celular HL60, hacia la vía monocítica. MG: megacariocitos; M: monocitos.

# **OBJETIVOS**





En los últimos años, se ha producido un avance importante en la investigación de los mecanismos por los cuales se producen las leucemias. Muchas leucemias vienen asociadas a diferentes translocaciones cromosómicas que dan lugar a proteínas de fusión con nuevas funciones. La determinación de la función de las proteínas implicadas en estas fusiones es esencial para comprender dichos procesos leucemiogénicos. El gen que codifica el factor de transcripción AF10 aparece implicado en translocaciones génicas que dan lugar a distintos tipos de leucemia.

El objetivo de esta tesis ha sido estudiar el papel de la proteína AF10 en el proceso de diferenciación hematopoyética mediante el análisis del perfil de expresión del gen *AF10*, así como los efectos causados por la variación de los niveles de proteína sobre dicho proceso de diferenciación.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. MATERIALES

### 1.1. ANTICUERPOS

Los anticuerpos empleados en este trabajo se indican en la Tabla 1

**Tabla 1. Anticuerpos**

ANTICUERPO	MARCAJE	CASA COMERCIAL	UTILIDAD
ANTI-AF10 monoclonal		Abcam	WB (1:1000) IF (1:500)
ANTI-AF10 policlonal		Fabricado en el laboratorio	WB (1:5000)
ANTI-CD33	APC	Immunostep	CF ( 1:30)
ANTI-CD34	PE	Pharmigen	CF (1:30)
ANTI-CD41	FITC	Immunostep	CF (1:30)
ANTI-F4/80	PECy5	Serotec	CF (1:30)
ANTI-FLAG		Stratagene	WB (1:2000)
ANTI-IgG de conejo	PO	Nordic	WB (1:3000)
ANTI-IgG de conejo	ALEXA 488	Invitrogen	IF (1:1000) CF (1:1000)
ANTI-IgG de conejo	ALEXA 647	Invitrogen	IF (1:1000) CF (1:1000)
ANTI-IgG de ratón	PO	Nordic	WB (1:3000)
ANTI-IgG de ratón	ALEXA 488	Invitrogen	IF (1:1000) CF (1:1000)
ANTI-IgG de ratón	ALEXA 647	Invitrogen	IF (1:1000) CF (1:1000)
ANTI-TBP		Santa Cruz	WB (1:2000)

**Tabla 1. Anticuerpos empleados durante el desarrollo de este trabajo.** Se indica el nombre del anticuerpo, el marcaje que presentan, la casa comercial donde se han adquirido y el uso que se les ha dado con la dilución correspondiente entre paréntesis. WB: western blot; CF: citometría de flujo; IF: inmunofluorescencia.

### 1.2. CULTIVOS CELULARES

#### 1.2.1. Líneas celulares

CMK: línea celular humana obtenida a partir de sangre periférica de un paciente con leucemia megacarioblástica (Sato et al., 1989). Cedida por el doctor Miguel Ángel Piris.

HEL (Human Erythroleukemia): línea celular humana establecida a partir de un paciente con leucemia eritrocítica (Papayannopoulou et al., 1983). Cedida por la doctora Carmela Calés.

HL60: línea celular mielóide humana, establecida a partir de un paciente con leucemia promielocítica (Gallagher et al., 1979). Cedida por el doctor Miguel Ángel Piris.

K562: línea celular mielóide derivada de un paciente con leucemia mielóide crónica en crisis blástica (Lozzio and Lozzio, 1975). Cedida por la doctora Carmela Calés.

L929: fibroblastos de tejido conectivo de ratón (DSMZ). Cedida por la doctora Susana Alemany.

C2C12: mioblastos de ratón (DSMZ). Cedida por la doctora Margarita Cervera.

### **1.2.2. Cultivos primarios**

Ratón CD1: ratón albino macho de entre 10-12 semanas.

### **1.2.3. Medios de cultivo**

Medio RPMI 1640 completo: Medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% FBS (Gibco), 1% glutamina (Gibco) y 50 µg/ml gentamicina (Normon Laboratories S.A).

Medio DMEM completo: Medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% FBS, 1% glutamina y 50 µg/ml gentamicina.

Medio M-CSF: Medio RPMI completo con un 30% de factor estimulador de monocitos obtenido a partir del cultivo de células L929 (ver Métodos).

### **1.2.4. Tratamientos celulares**

Blasticidina (Invitrogen): antibiótico utilizado a una concentración de 5.5 µg/ml.

Doxiciclina (Sigma): antibiótico empleado a una concentración de 0.5 µg/ml.

MG132 (Sigma): inhibidor del proteasoma utilizado a una concentración final de  $10^{-8}$  M.

TPA (Sigma): éster de forbol utilizado en este trabajo para la diferenciación celular en líneas hematopoyéticas.

Zeocina (Invitrogen): antibiótico empleado a una concentración de 150 µg/ml.

### **1.2.5. Transfecciones**

Lipofectamine™ Transfection Reagent (Invitrogen): lipofectamina

Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V (Lonza): kit de nucleofección.

### **1.3. CITOMETRÍA DE FLUJO**

Anexina V-DYE-634 (Immunostep): se emplearon 3 µl en 100 µl de tampón de unión.

Tampón de unión: 10 mM Hepes pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>.

Ioduro de propidio (Sigma): utilizado a 50 µg/ml en PBS.

RNAasa (Qiagen): utilizada a una concentración final de 5 µg/ml.

### **1.4. INMUNOFLUORESCENCIA**

Tampón de permeabilización: 5% Tritón-X100 y 0.1 M glicina diluido en PBS.

Prolong (Invitrogen): medio de montaje para la preparación de muestras para analizar al microscopio.

DAPI (Invitrogen): intercalante del ADN.

Fibronectina (Sigma): utilizada a una concentración final de 20 µg/ml.

### **1.5. WESTERN BLOT**

RIPA: 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato sódico y 0.1% SDS.

Coctel de inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free; Roche): se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **1.6. PCR CUANTITATIVA**

Sondas TaqMan® (Applied Biosystems)

Hs00946024\_m1: sonda que reconoce el ADNc de AF10 humana.

Mm00487708\_m1: sonda que reconoce el ADNc de AF10 murina.

Human Euk 18S rRNA: sonda control que reconoce el ADNc del ARNr 18S de eucariotas.

TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems): empleado siguiendo las indicaciones del fabricante.

## 1.7. PLÁSMIDOS

pGEX-2T (Amersham Biosciences): producción de proteínas de fusión con la Glutathion-S-Transferasa (GST).

pcDNA4/TO (Invitrogen): clonaje de productos de PCR.

pcDNA6/TR (Invitrogen): expresión del represor de la tetraciclina (TR).

pcDNA-6.2-GW/EmGFP-miR (Invitrogen): empleado en los estudios de silenciamiento. El plásmido forma parte del kit BLOCK-iT™ POL II miR RNAi Expression Vector Kit (Invitrogen) y se utilizó siguiendo las instrucciones del mismo.

## 1.8. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos empleados para la generación de los distintos productos de clonaje se indican en la Tabla 2.

**Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en PCR**

<b>NOMBRE</b>	<b>SECUENCIA (5'-3')</b>
AF10 -	5´GACACCTAGAAACATCTAGA 3´
AF10 +	5´GGTACCATGGTCTCTAGCGA 3´
BGH	5´TAGAAGGCACAGTCGAGG 3´
CMV	5´CGCAAATGGCGGTAGGCCGTG 3´
FLAG-AF10 +	5´GGTACCGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGATGGTCTCTAGCGAC 3´
GFP -	5´AACTATACAAATAAGGTACC 3´
GFP +	5´GGTACCATGGCTAGCAAAGG 3´
GFP-AF10 -	5´GTCGCTAGAGACCATTTATTTGTATAGTTC 3´
GFP-AF10 +	5´GAACTATACAAATAAATGGTCTCTAGCGAC 3´
M13/pUC	5´CAGGAAACAGCTATGAC 3´

**Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos empleados en PCR.** Se indica el nombre que se le ha asignado a cada oligonucleótido así como su secuencia en sentido 5´-3´.



Los oligonucleótidos empleados para la generación del sistema de interferencia del ARNm de AF10 se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en la interferencia del ARNm de AF10**

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	REGIÓN DEL ARNm INTERFERIDA
AF10i_1	TGCT <u>GATCCCGAGCCAGATACTACAT</u> GTTTTGGCCACTGACTGACATGTAGTATGGCTCGGGAT	2135-2155 pb
AF10i_2	TGCT <u>GTTTCAGACTGAGCTATAAGAGC</u> GTTTTGGCCACTGACTGACGCTCTTATCTCAGTCTGAA	2353-2373 pb
AF10ni	TGCT <u>GAAATGTACTGCGCGTGGAGAC</u> GTTTTGGCCACTGACTGACGCTCTCCACGCAGTACATTT	-

**Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para los experimentos de interferencia.** En rojo se muestra las regiones complementarias que hibridan entre sí para dar lugar al ARN de doble cadena. La región subrayada muestra la secuencia que hibrida con el ARNm de AF10 que causa la interferencia. El oligo AF10ni se emplea como control negativo ya que no reconoce ninguna región del genoma de vertebrados.

## 2. MÉTODOS

### 2.1. BIOLOGÍA CELULAR

#### 2.1.1. Cultivos celulares

Todas las incubaciones de los cultivos celulares se realizaron a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Las líneas celulares, HEL, K562, CMK y HL60 se incubaron a una densidad de 2×10<sup>5</sup>-1×10<sup>6</sup> células/ml en medio RPMI 1640 completo.

##### 2.1.1.1. Inducción de la diferenciación celular

La inducción de la diferenciación se realizó añadiendo al medio de crecimiento el estímulo correspondiente para cada línea celular, estando las células en una fase exponencial de crecimiento. Las células se incubaron con el agente diferenciador durante 72 horas. Para la diferenciación megacariocítica, las células HEL, K562 y CMK fueron tratadas con TPA (12-O-tetradecanoil-phorbol-13-acetato) a una concentración final de 10<sup>-8</sup> M. La diferenciación monocítica se realizó tratando las células HEL con TPA a una concentración de 10<sup>-6</sup> M, mientras que la línea celular HL60, fue tratada con 10<sup>-8</sup> M de TPA.

### **2.1.1.2. Inhibición del proteasoma**

Para los experimentos de inhibición de la actividad del proteasoma, las células se incubaron con un primer estímulo de  $10^{-8}$  M de TPA durante 24 horas y a continuación, se añadió MG132 a una concentración de  $10^{-8}$  M y las células se incubaron durante 24 horas más.

### **2.1.1.3. Transfecciones celulares**

Las transfecciones de la línea celular C2C12 para testar el anticuerpo generado en el laboratorio se realizaron con lipofectamina. Las células se sembraron 18 horas antes de la transfección a una densidad de entre  $1.50-1.75 \times 10^5$  células en placas de 3.5 centímetros de diámetro (p6). En el momento de la transfección, las células se lavaron dos veces con medio DMEM sin suero. La mezcla de transfección está compuesta por 1.5  $\mu$ g de ADN y 10  $\mu$ l de lipofectamina en 200  $\mu$ l de medio DMEM sin suero que se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, la mezcla de transfección se añadió a 800  $\mu$ l de medio DMEM sin suero en cada placa. Después de entre 4-6 horas de incubación con el medio de transfección, éste se retiró y se lavaron las células con medio DMEM sin suero 2 veces. A continuación, a las células se les añadió medio DMEM completo y se incubaron durante 24 horas.

Para las transfecciones mediante electroporación se recogieron  $10^7$  células y se lavaron con PBS. Las células se resuspendieron en medio de transfección, compuesto por 700  $\mu$ l de medio RPMI frío y 5  $\mu$ g del ADN correspondiente y se introdujeron en una cubeta de 0.4 cm (Bio-Rad). La electroporación se realizó a 250 V y 1000  $\mu$ F en el aparato Progenetor II (Hoefler Scientific). Las células se incubaron 10 minutos en hielo y se sembraron en 25 ml de medio RPMI 1640 completo.

Las transfecciones mediante nucleofección se realizaron con el Kit V de Lonza. Se recogieron  $10^6$  células para cada transfección y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de tampón de transfección con 5  $\mu$ g de plásmido. Los programas empleados en el Nucleofector® para cada línea celular fueron los recomendados por la casa comercial que suministra el kit de nucleofección (Lonza).

#### **2.1.1.4. Cultivos primarios**

Para realizar los experimentos con cultivos primarios de médula ósea de ratón se utilizaron el fémur y la tibia de ratones machos CD1 sanos de entre 10 y 12 semanas de edad. El ratón se sacrificó con CO<sub>2</sub> y se extrajeron las células de la médula ósea lavando el interior del hueso con una jeringuilla con medio RPMI completo. Una vez finalizada la extracción, el medio se filtró a través de una membrana de nylon con un tamaño de poro de 100 µm y se centrifugó a 300 ×g durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en 10 ml de medio RPMI completo y se sembraron en placas de 10 cm de diámetro (p100). Tras 24 horas de incubación, las células en suspensión se recuperaron, contaron y sembraron a una densidad de 5×10<sup>5</sup> células/ml en placas p100 cuyo plástico carece de cualquier tratamiento (FALCON; ref: 351005), lo que evita la adhesión excesiva de las células. Se cultivaron en medio RPMI completo con un 30% de medio M-CSF durante 7 días.

El medio M-CSF se obtuvo a partir del cultivo de la línea celular L929 (Boltz-Nitulescu et al., 1987). Las células se incubaron en 15 ml de medio DMEM completo en una botella de 75 cm<sup>2</sup> (flask T<sub>75</sub>). Cuando la población alcanzó el 90% de confluencia, se cambió el medio y se incubó durante 72 horas. A continuación, se recogió el medio, se filtró y se mantuvo a -20 °C hasta el momento de su uso.

#### **2.1.2. Análisis por citometría de flujo**

Todos los ensayos analizados por citometría de flujo se realizaron con 5×10<sup>5</sup> células centrifugadas a 300 ×g durante 5 minutos. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron de nuevo. Los análisis se realizaron utilizando el citómetro Beckman Coulter-FC 500 MLP con el software CXP.

##### **2.1.2.1. Contenido de ADN**

Para determinar el contenido de ADN, las células se recogieron y se fijaron con etanol al 70% mantenido a -20° C. Las células se incubaron a -20° C durante, al menos, 30 minutos, se retiró el etanol y se resuspendieron en PBS con 50 µg/ml de yoduro de propidio y 5 µg/ml de RNAsa.

#### **2.1.2.2. Marcadores de superficie**

El estudio de los marcadores de superficie se realizó mediante la incubación de las células con el anticuerpo correspondiente en 100 µl de PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, se añadieron 400 µl de PBS y se analizaron en el citómetro.

#### **2.1.2.3. Apoptosis**

Para los análisis con Anexina-V, las células se incubaron con 3 µl de Anexina-V en 100 µl de tampón de unión (ver apartado 1.3 de los Materiales y Métodos) durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras la incubación, se añadieron 400 µl de tampón de unión y se procedió al análisis por citometría de flujo.

#### **2.1.2.4. Inmunofluorescencia**

El protocolo de inmunofluorescencia se describe en el apartado 2.1.3. Para el análisis en el citómetro, el protocolo se realizó en los tubos de 5 ml de citometría.

#### **2.1.3. Inmunofluorescencia**

Todas las incubaciones se realizaron con agitación suave a temperatura ambiente excepto cuando se indique lo contrario. Las células se lavaron y fijaron con 3.7% paraformaldehído durante 15 minutos. A continuación, las células se lavaron 2 veces con PBS durante 5 minutos y se incubaron durante 30 minutos con el tampón de permeabilización (ver apartado 1.4 de los Materiales y Métodos). La muestra se lavó 2 veces con PBS durante 5 minutos y se añadió el anticuerpo primario (Tabla 1) diluido en PBS incubándose toda la noche a 4 °C. El medio con el anticuerpo se retiró y las células se lavaron 2 veces con PBS durante 5 minutos. El anticuerpo secundario (Tabla 1) se diluyó en PBS y se incubó durante 1 hora en oscuridad y, a continuación, se realizaron dos lavados con PBS durante 5 minutos.

Las inmunofluorescencias en placa se realizaron tras la incubación de  $5 \times 10^4$  células durante 24 horas en placas de 35 milímetros (MatTek Corporation) tratadas con fibronectina. Una vez realizada las correspondientes incubaciones con cada uno de los

anticuerpos, se añadió Prolong con DAPI a una concentración de 1 µg/ml como medio de montaje. El análisis se realizó en el microcopio de fluorescencia Nikon Eclipse E400. La detección de AF10 se realizó con una exposición constante de 1 milisegundo.

El análisis por citometría de flujo se realizó en los tubos de citometría siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Finalmente, las células se resuspendieron en 500 µl de PBS para proceder a su análisis.

## **2.2. BIOLOGÍA MOLECULAR**

Los kits y agentes que se indican en los siguientes apartados se emplearon siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **2.2.1. Clonajes**

En todos los casos la amplificación de los ADNc correspondientes mediante PCR se realizó introduciendo en el extremo 5' una diana de restricción para Kpn I y en el extremo 3' una diana para Xba I. Tras la amplificación, tanto el inserto como el plásmido correspondiente fueron digeridos con las enzimas Kpn I y Xba I para su posterior ligación. A continuación, los plásmidos se transformaron en bacterias DH5α para su amplificación y purificación siguiendo el protocolo estándar descrito por Sambrook y colaboradores (Sambrook and Russell, 2001). Para determinar si la ligación se había producido de forma adecuada se secuenció el ADN con el oligonucleótido M13/pUC en el caso del plásmido pGEX-2TK, mientras que en el caso del plásmido pcDNA4/TO los oligonucleótidos empleados fueron CMV en sentido 5'-3' y BGH en sentido 3'-5' (Tabla 2).

pGEX-2TK-AF10. Para la generación de la proteína de fusión GST-AF10 empleada en la producción del anticuerpo anti-AF10 se utilizó el plásmido pGEX-2TK (Amersham Biosciences) que presenta el ADNc de la proteína GST en la región 5' al sitio de policlonaje. El ADNc de AF10 se amplificó con los oligonucleótidos AF10 + y AF10 - (Tabla 2) tomando como molde el ADNc de células K562 y se ligó en fase en el plásmido pGEX-2TK.

pcDNA4/TO-GFP. El clonaje del ADNc de GFP se realizó mediante una PCR realizada tomando como molde el pPStinger que presenta dicho ADNc (Barolo et al., 2000). La PCR se realizó con los plásmidos GFP + y GFP - . El producto de PCR se ligó en el plásmido pcDNA4/TO.

pcDNA4/TO-AF10. El ADNc de AF10 se amplificó con los oligonucleótidos AF10 + y AF10 - tomando como molde el ADNc de la línea celular K562 y se ligó con el plásmido pcDNA4/TO.

pcDNA4/TO-GFP-AF10. El ADNc de GFP se amplificó mediante PCR tomando como molde el plásmido que presenta dicho ADNc con los oligonucleótidos GFP + y GFP-AF10 - . El producto de esta PCR se denominó GFP'. Por otro lado, el ADNc de AF10 se amplificó mediante PCR tomando como molde el plásmido pPStinger (Barolo et al., 2000) con los oligonucleótidos GFP-AF10 + y AF10 - , y el producto amplificado se denominó AF10'. Puesto que parte de AF10' y GFP' solapan, a continuación, se realizó una última PCR tomando como molde ambos a una concentración equimolar empleando los oligonucleótidos GFP + y AF10 -. El producto de esta última PCR, GFP-AF10, se ligó en el plásmido pcDNA4/TO.

pcDNA4/TO-FLAG-AF10. El ADNc de AF10 se amplificó con los oligonucleótidos FLAG-AF10 + y AF10 - y se ligó con el plásmido pcDNA4/TO. El oligonucleótido FLAG-AF10 + presenta la secuencia completa del epítipo FLAG.

### **2.2.2. Generación de un anticuerpo policlonal anti-AF10**

El ADNc de la forma humana de AF10 se clonó en el plásmido pGEX-2TK (Amersham Biosciences) para obtener la proteína de fusión GST-AF10. La construcción se transformó en células BL21. Las bacterias se crecieron toda la noche a 37 °C con agitación constante en 2 ml de medio 2×YT con 100 µg/ml ampicilina y 30 µg/ml cloranfenicol. Para inducir la expresión, se diluyó el cultivo anterior hasta un volumen final de 400 ml y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.5 uDO. A continuación, se añadió IPTG a una concentración final de 0.4 mM y se incubó a 25 °C durante 3 horas. Las células se centrifugaron a 20.000 ×g y se lisaron en 20 ml de tampón de lisis (50 mM HEPES-KOH, 0.2 M EDTA, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 20% glicerol,

0.5 M NaCl, 0.1% NP-40, inhibidores de proteasas y 50 µg/µl de lisozima) por cada litro de medio de cultivo y se mantuvo en rotación durante 30 minutos a 4 °C. Las bacterias se sonicaron en dos rondas de 30 segundos con una amplitud de 15-25 micras. El lisado se centrifugó 20 minutos a 20.000 ×g a 4°C .

Para la generación del anticuerpo se necesitaba purificar la proteína GST-AF10. Puesto que la proteína se encontraba en forma mayoritaria en el precipitado (ver resultados) se tomaron 50 µg de proteína total del precipitado obtenido tras la lisis bacteriana y se separaron por electroforesis en geles SDS-PAGE al 8%. La banda correspondiente a la proteína de fusión GST-AF10 (140 KDa) se cortó y se pulverizó con nitrógeno líquido. La inmunización de los conejos se realizó siguiendo un protocolo estándar (Harlow and Lane, 1988).

### **2.2.3. Western blot**

El protocolo de western blot se realizó siguiendo las indicaciones descritas por Sambrook y colaboradores (Sambrook and Russell, 2001). Los geles de SDS-PAGE se realizaron al 8%. La cuantificación de proteína total en los extractos celulares se realizó con el kit D<sub>c</sub> Protein assay (Bio-Rad).

Para obtener los extractos proteicos,  $5 \times 10^5$  células se lisaron en 50 µl de tampón RIPA (ver apartado 1.5 de los Materiales y Métodos) con inhibidores de proteasas. Los lisados se incubaron 10 minutos en hielo y se centrifugaron a máxima velocidad a 4 °C durante 5 minutos y se guardó el sobrenadante a -80 °C. Se cuantificó la cantidad de proteína total y se cargaron en el gel 20 µg de proteína total.

### **2.2.4. Purificación de ácidos nucleicos**

La purificación de los plásmidos se realizó con los kits SpinClean™ Plasmid miniprep (Mbiotech) o Genopure Plasmid Maxi Kit (Roche). La extracción de ARN se realizó con TRIzol® Reagent (Invitrogen). En todos se siguieron las instrucciones del fabricante.

### **2.2.5. PCR cuantitativa**

La retrotranscripción del ARNm se realizó con Quantitech Reverse Transcription Kit (Qiagen). Cada ADNc se cargó por triplicado en placas de 386 pocillos (Applied Biosystems). Las sondas empleadas se indicarán en cada caso y están listadas en el apartado 1.6 de los Materiales y Métodos. El análisis se realizó en el aparato 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y los resultados se analizaron utilizando el programa SDS 2.



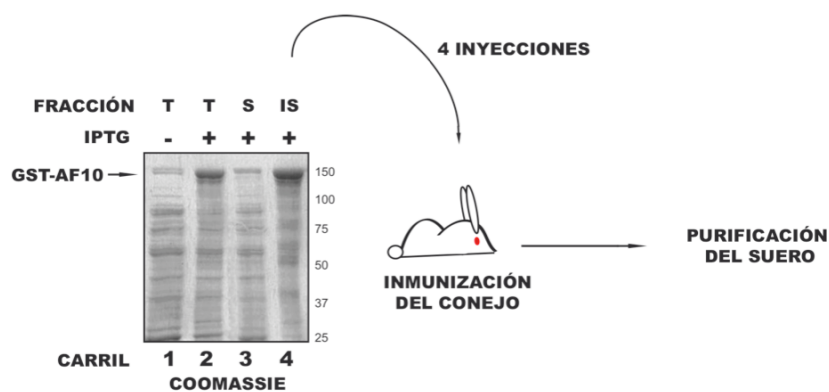
# **RESULTADOS**



## **1. GENERACIÓN DE UN ANTICUERPO POLICLONAL PARA LA DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA AF10**

En el inicio de este proyecto no se disponía de un anticuerpo comercial que reconociese la proteína AF10. Por esta razón, el primer paso que se dio fue la generación de un anticuerpo policlonal que reconociese la forma humana de la proteína AF10. Para ello, el ADNc correspondiente a la proteína AF10 se clonó en el plásmido pGEX-2TK (Amersham Biosciences) para obtener la proteína fusionada con GST (ver Materiales y Métodos). La obtención de proteínas fusionadas con GST permite su purificación, en caso de ser necesario, en columnas de glutation así como la purificación de los anticuerpos obtenidos.

El plásmido pGEX-2TK-AF10 se transformó en bacterias competentes BL21 y, a continuación, se indujo la expresión de la proteína GST-AF10 con IPTG (ver Materiales y Métodos). Con objeto de determinar si se expresaba la proteína GST-AF10, se tomaron muestras de las bacterias antes y después de la incubación con IPTG y se resolvieron en un gel de acrilamida. El gel se tiñó con el colorante azul de Coomassie y se observó una banda de 140 KDa en el extracto de las células que habían sido incubadas con IPTG, mientras que en el extracto de las bacterias antes de la inducción esta banda no se veía (Figura 9). El peso molecular estimado para GST-AF10 es 140 KDa, lo que sugería que la inducción se había llevado a cabo de forma adecuada. Además de estas muestras, se añadieron dos muestras pertenecientes a las fracciones soluble e insoluble de los extractos obtenidos de las bacterias tras inducir la expresión de la proteína con IPTG. En la Figura 9 se observa que la banda de 140 KDa perteneciente a GST-AF10 aparecía en el extracto correspondiente a la fracción insoluble de las bacterias, mientras que en la fracción soluble no se observaba con la misma intensidad. Por esta razón, se empleó la fracción insoluble de las células inducidas con IPTG para preparar las muestras que se le inyectarían al conejo para su inmunización (ver Materiales y Métodos).



**Figura 9. Esquema del proceso de inmunización del conejo para la generación del anticuerpo anti-AF10.** A la izquierda se muestra el gel SDS-PAGE al 8% teñido con el colorante azul de Coomassie en el que se cargaron extractos de las bacterias antes y después de la inducción de la expresión de la proteína GST-AF10 con IPTG. En el carril 1 se cargó el extracto total de las bacterias antes de la inducción de la expresión con GST-AF10 (T-). En el carril 2 se muestra el extracto total de las bacterias que habían sido tratadas con IPTG (T+). El carril 3 pertenece a la fracción soluble de las bacterias incubadas con IPTG (S+). En el carril 4 se cargó la fracción insoluble de las bacterias incubadas con IPTG (IS+). A la derecha del gel se observa un esquema del protocolo seguido en la inmunización de los conejos. La proteína GST-AF10 se purificó a partir de la fracción insoluble obtenido tras la incubación con IPTG y se le inyectó al conejo en cuatro ocasiones, tras lo que se sacrificó al conejo y se purificó el suero (Ver Materiales y Métodos).

Una vez se obtuvo el suero del conejo inmunizado, se procedió a estudiar la especificidad del anticuerpo generado. Para ello, se empleó la línea celular C2C12 establecida a partir de mioblastos de ratón. La elección de este sistema se debió a que estas células no presentan niveles altos de la proteína AF10, y aunque la conservación de la secuencia entre ratones y humanos es alta, no se detectaría la proteína endógena.

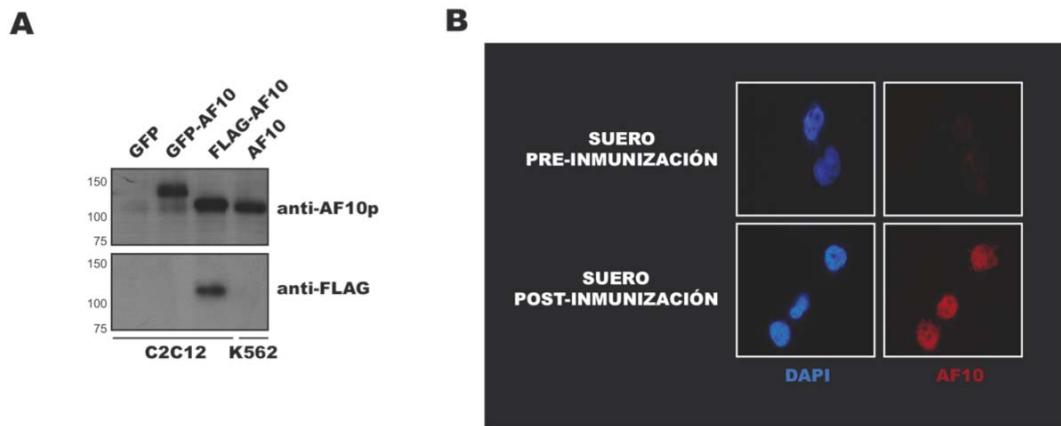
Las células C2C12 se transfectaron con los plásmidos que expresan los ADNc correspondientes a las proteínas GFP, GFP-AF10 y FLAG-AF10. Transcurridas 24 horas desde la transfección, las células se recogieron y procesaron para realizar un western blot. Los extractos obtenidos a partir de las células transfectadas se resolvieron en dos gels SDS-PAGE al 8%. Tras la transferencia de las proteínas a membranas de PVDF, una de las membranas se incubó con el suero obtenido a partir del conejo inmunizado con la proteína GST-AF10 mientras que la otra membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal comercial anti-FLAG (Figura 10A). Esto permitiría determinar si el anticuerpo generado en el laboratorio reconoce la proteína AF10. De ser así, se esperaría observar una banda similar en ambas membranas en el carril de la muestras obtenidas a partir de las células transfectadas con el plásmido que expresa el ADNc de

la proteína FLAG-AF10. De este modo, para testar la especificidad del anticuerpo se emplearon los extractos de las células que expresaban las proteínas GFP-AF10 y FLAG-AF10 y como control negativo se empleó el extracto de las células que expresaban la proteína GFP. Por último, se añadió un extracto obtenido de la línea celular K562 que permitiría comprobar que el anticuerpo generado reconoce la proteína endógena en una de las líneas celulares elegidas para el desarrollo de este trabajo. Estudios previos basados en la detección del ARNm de la proteína AF10 mediante northern blot realizados en el laboratorio habían mostrado la presencia del ARNm de la proteína AF10 en la línea celular K562 (datos no mostrados).

En la Figura 10A se muestra el resultado del western blot con el anticuerpo generado en el laboratorio y con el anticuerpo anti-FLAG. En el western blot incubado con el suero obtenido del conejo, en los carriles en los que se cargaron los extractos obtenidos de las células transfectadas con GFP y GFP-AF10 se observa una banda poco nítida del tamaño estimado para la proteína AF10. Esta banda podría corresponder a la forma murina de la proteína AF10, lo que parece indicar que el anticuerpo generado también reconoce la forma murina de la proteína.

Los resultados mostrados en la Figura 10A indican que la especificidad del anticuerpo generado es buena. Así, se observa que en el carril en el que se resolvió el extracto de las células que expresan la proteína GFP, no se reconoce ninguna banda además de la correspondiente a la proteína de ratón; en el carril con el extracto de las células que expresan la proteína GFP-AF10, se observa una banda de aproximadamente 145 KDa que es el peso molecular estimado para la proteína de fusión GFP-AF10; y en el carril en el que se resolvió el extracto obtenido de la transfección de las células que expresan la proteína FLAG-AF10 se observa una banda de aproximadamente 115 KDa, que es el peso molecular estimado para dicha proteína. Con el anticuerpo anti-FLAG se observó una única banda en el carril correspondiente al extracto de las células que expresan la proteína FLAG-AF10. De este modo, se confirmó que el suero obtenido reconocía la proteína AF10 de manera específica. Por último, en el carril correspondiente al extracto celular obtenido de las células K562 se observa una banda del tamaño estimado de la proteína AF10, lo que confirma que en esta línea celular se

expresa dicha proteína y que su nivel de expresión es suficientemente alto como para poder ser detectado con el anticuerpo generado en el laboratorio.



**Figura 10. Estudio de la especificidad del anticuerpo anti-AF10 generado.** (A) Western blots realizados con los extractos de células C2C12 transfectadas con los plásmidos que expresan los ADNc de las proteínas GFP, GFP-AF10 y FLAG-AF10 y en el último carril se resolvió el extracto de células K562. La membrana superior se incubó con el anticuerpo primario generado en el laboratorio (anti-AF10p) y la inferior con el anticuerpo anti-FLAG. (B) Inmunofluorescencia realizada de la línea celular K562 con el suero preinmune y el suero obtenido del conejo tras la inmunización. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI.

Puesto que la inmunodetección por western blot se realiza en condiciones desnaturalizantes y teniendo en cuenta que no todos los anticuerpos son igualmente efectivos en técnicas no desnaturalizantes, se realizaron inmunofluorescencias para comprobar que el anticuerpo era adecuado para detectar la proteína en condiciones nativas. Para ello, se empleó la línea celular K562 y el suero extraído del conejo antes de la inmunización, o suero preinmune, se empleó como control negativo. En la Figura 10B se observa que sólo en el caso de la incubación con el suero del conejo tras la inmunización se detecta señal, lo que confirmó que el suero podía ser empleado en inmunofluorescencias. Además, se observa que la proteína AF10 se localiza en el núcleo, ya que colocaliza con la señal emitida por el DAPI, como ya habían demostrado Linder y colaboradores (Linder et al., 1998).

Durante el desarrollo del proyecto, se comercializó un anticuerpo monoclonal que reconoce tanto la forma humana como la murina de la proteína AF10. A lo largo de este texto, se indica cuál ha sido el anticuerpo empleado en cada caso, de forma que el

anti-AF10m es el anticuerpo comercial monoclonal, mientras que el anti-AF10p es el anticuerpo policlonal generado en el laboratorio.

## **2. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA AF10 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN HEMATOPOYÉTICA**

El primer objetivo de este trabajo fue determinar cómo se comporta la proteína AF10 durante la diferenciación hematopoyética monocítica y megacariocítica. Por esta razón, se tomaron como sistema modelo varias líneas celulares hematopoyéticas que representan diversos estadios de la diferenciación hacia cada uno de estos dos destinos hematopoyéticos.

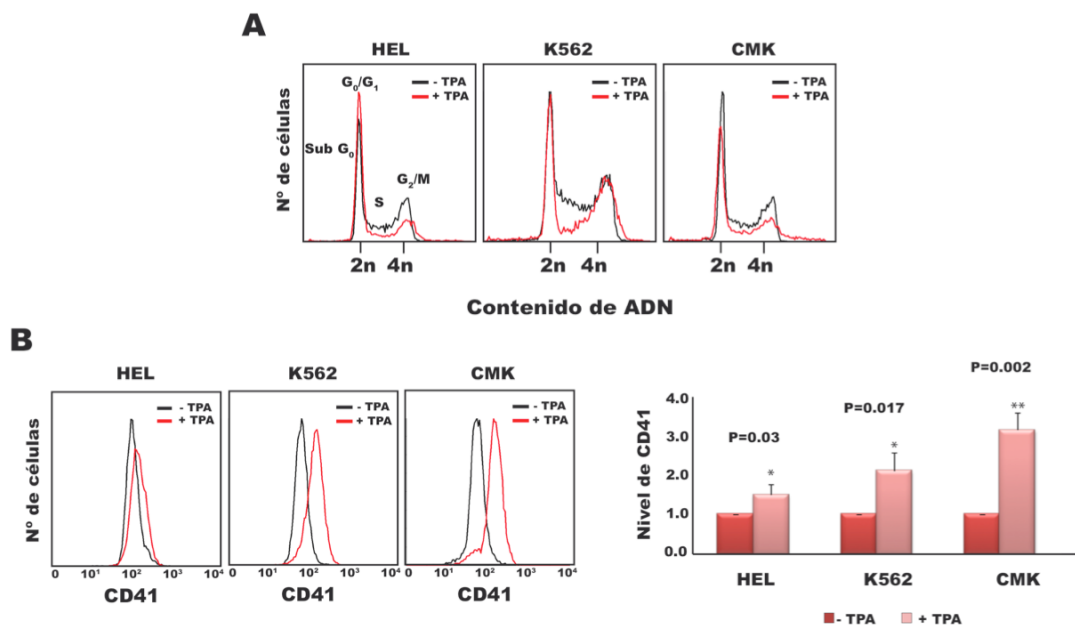
Para el estudio de la diferenciación megacariocítica se emplearon las líneas celulares HEL, K562 y CMK en orden creciente de compromiso celular (Figura 8). Puesto que las células HEL también son capaces de diferenciar siguiendo la vía monocítica, se empleó esta línea celular junto con las células HL60 para el estudio de la diferenciación monocítica.

### **2.1. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA AF10 DURANTE EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA**

#### **2.1.1. Inducción de la diferenciación megacariocítica**

La vía de diferenciación megacariocítica es aquella en la que a partir de un progenitor mieloide común, la célula va madurando hasta alcanzar las características propias de los megacariocitos. Al inducirse la diferenciación de las células, éstas van perdiendo su capacidad proliferativa. Esta parada progresiva del ciclo celular, se puede detectar mediante el análisis del contenido de ADN celular. Cuando las células mantienen su estado proliferativo, se mantiene un flujo constante entre las diferentes fases del ciclo celular, pero al detenerse el ciclo se observa que la mayoría de ellas se encuentran en fase  $G_0/G_1$ , con un contenido de ADN de  $2n$ , y un descenso en el número de células que se encuentran en fase S y  $G_2/M$ , siendo esta última fase la que representa a las células con un contenido de ADN de  $4n$ .

El TPA es un éster de forbol que, en el caso de las líneas celulares hematopoyéticas, induce la diferenciación celular produciéndose la parada del ciclo celular (Stuart and Hamilton, 1980) aunque también ha sido descrito como un inductor de tumores en otros sistemas celulares. La diferenciación megacariocítica de las células HEL, K562 y CMK se indujo mediante la incubación con  $10^{-8}$  M TPA durante 72 horas. Tras este periodo se recogieron las muestras y se incubaron con ioduro de propidio, que es un intercalante del ADN que permite su cuantificación mediante citometría de flujo. Al analizar las tres líneas celulares se observó un aumento del número de células que se encuentran en fase  $G_0/G_1$ , con un contenido de ADN de  $2n$ , que no pasan a la fase de síntesis del ADN o bien que están en estado quiescente ( $G_0$ ); y una bajada en el número de células que se encuentran en las fases S y  $G_2/M$  (Figura 11A). Este resultado confirma la parada del ciclo celular tras la inducción de la diferenciación.



**Figura 11. Inducción de la diferenciación megacariocítica en las líneas celulares HEL, K562 y CMK.** (A) Medida del contenido de ADN en las líneas celulares antes (-TPA) y después (+TPA) del tratamiento con TPA mediante citometría de flujo. (B) A la izquierda se representa la medida del marcador de superficie CD41 en las líneas celulares HEL, K562 y CMK antes (-TPA) y después (+TPA) del tratamiento con TPA mediante citometría de flujo. A la derecha, se muestra la representación gráfica de los niveles de expresión del marcador de superficie CD41 en las células antes (-TPA) y después (+TPA) del tratamiento con TPA. El análisis estadístico se realizó aplicando un t-test. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .  $n \geq 3$



Cada tipo celular presenta en su superficie proteínas que determinan el linaje celular al que pertenece. Estas proteínas se denominan marcadores de superficie. Asociada a la diferenciación celular se produce la variación de los niveles de determinados marcadores de superficie característicos de cada linaje celular. El marcador de superficie CD41 es identificativo de los megacariocitos (Phillips et al., 1988). En los precursores mieloides, la presencia de la proteína CD41 en la superficie celular es baja, mientras que en megacariocitos, su presencia en la membrana celular aumenta. En la Figura 11B, se observa que las tres líneas celulares, al ser tratadas con TPA, presentan un incremento estadísticamente significativo de los niveles de la proteína CD41 en su superficie con respecto a las células que no han sido tratadas con TPA. Estos resultados confirman que estas líneas celulares siguen la vía megacariocítica una vez han sido inducidas a ello con TPA.

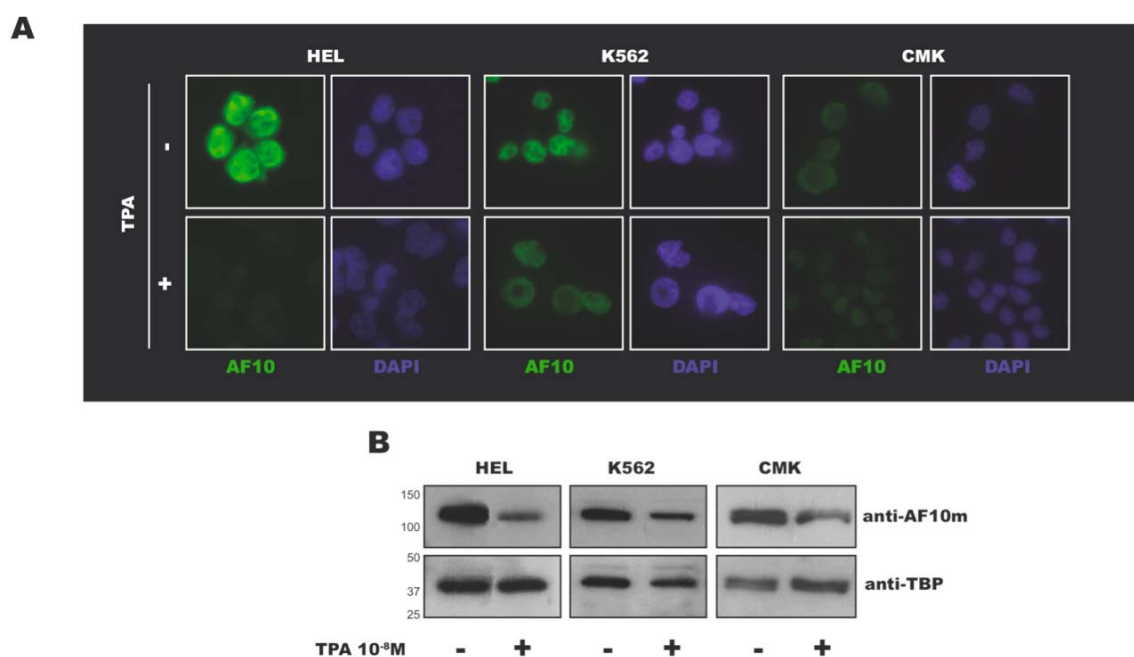
### **2.1.2. Caracterización de la proteína AF10 en la diferenciación megacariocítica**

Una vez quedó confirmado que el TPA induce la diferenciación celular megacariocítica en las líneas celulares HEL, K562 y CMK, se procedió al estudio del perfil de expresión de la proteína AF10 durante este proceso.

Para analizar la localización subcelular de la proteína AF10 durante la diferenciación megacariocítica, se tomaron muestras de las tres líneas celulares antes y después del tratamiento con TPA y se realizó una inmunofluorescencia en placa con el anticuerpo anti-AF10m. El ADN nuclear fue marcado con DAPI, que es un agente intercalante del ADN. Las muestras se analizaron en el microscopio de fluorescencia y se observó que la proteína AF10 colocaliza con la señal emitida por el DAPI, por lo que parece que la localización subcelular de la proteína no se ve alterada por la inducción de la diferenciación. No obstante, en estas imágenes se puede observar cómo el nivel de fluorescencia disminuye tras el tratamiento con TPA de las tres líneas celulares, sugiriendo que los niveles de la proteína AF10 descienden tras la inducción de la diferenciación (Figura 12A). Por otro lado, la inmunofluorescencia muestra que las líneas celulares presentan una menor cantidad de la proteína AF10 en el estadio previo a la inducción de la diferenciación cuanto más diferenciada está la célula. Así, las células HEL presentan una mayor intensidad de señal de la proteína AF10 que las células K562

y, éstas a su vez, mayor intensidad de señal que las células CMK, que es la línea que presenta un mayor grado de diferenciación inicial (Figura 12A).

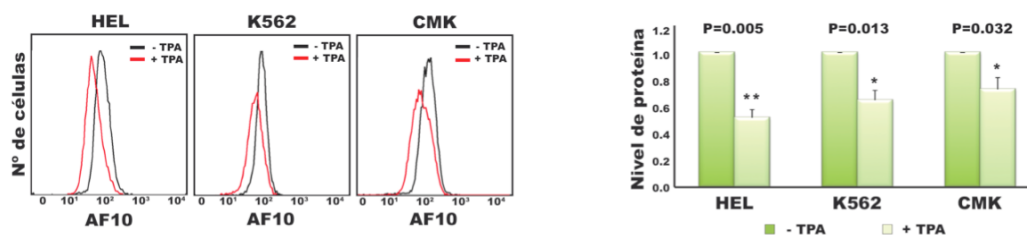
Además de la inmunofluorescencia, se realizó el análisis de la cantidad de la proteína AF10 mediante western blot. Este análisis se llevó a cabo con los extractos de las tres líneas celulares tratadas y sin tratar con TPA. La proteína TBP se empleó como control de carga. En las tres líneas celulares se observó, al igual que en la inmunofluorescencia, que los niveles de la proteína AF10 disminuyen al inducir la diferenciación megacariocítica (Figura 12B).



**Figura 12. Detección de la proteína AF10 tras la inducción de la diferenciación megacariocítica en las líneas celulares HEL, K562 y CMK. (A)** Detección de la proteína AF10 antes (-) y después (+) del tratamiento con TPA mediante inmunofluorescencia. El anticuerpo primario que se empleó fue el anti-AF10m. En todos los casos la exposición fue de 1 milisegundo. Los núcleos se marcaron con DAPI. **(B)** Detección la proteína AF10 mediante western blot con los extractos de las tres líneas celulares antes (-) y después (+) del tratamiento con TPA. La detección de la proteína AF10 se realizó con el anticuerpo primario anti-AF10m. La proteína TBP se empleó como control de carga.

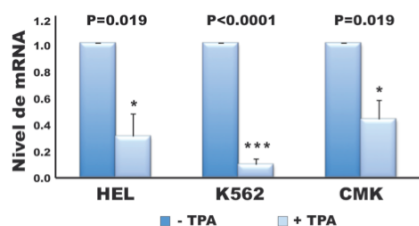
Para confirmar si el descenso de los niveles de la proteína AF10 es significativo, se realizó la cuantificación mediante el análisis por citometría de flujo. Para ello, se tomaron las tres líneas celulares antes y después del tratamiento con TPA sobre las que se había realizado una inmunofluorescencia en tubo con el anticuerpo anti-AF10m. En

la Figura 13 se observa que en todos los casos se produce la bajada estadísticamente significativa de los niveles de la proteína AF10 tras la inducción de la diferenciación celular megacariocítica. Estos resultados parecen indicar que la proteína AF10 es importante en estadios iniciales de la diferenciación celular megacariocítica.



**Figura 13. Detección de la proteína AF10 mediante citometría de flujo.** A la izquierda, se muestran las curvas obtenidas de la detección de los niveles de la proteína AF10 en las líneas celulares HEL, K562 y CMK antes (- TPA) y después (+ TPA) del tratamiento con TPA mediante citometría de flujo. A la derecha, se muestra la representación gráfica de los niveles de la proteína AF10 detectados por citometría de flujo. El análisis estadístico se ha realizado aplicando un t-test. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .  $n \geq 3$

Con objeto de determinar si la disminución de los niveles de la proteína AF10 se debía a una reducción de la transcripción de su gen, se realizó el análisis de los niveles del ARNm de la proteína AF10 mediante PCR cuantitativa. Para ello, se tomaron muestras de las líneas celulares HEL, K562 y CMK tratadas y sin tratar con TPA y se extrajo el ARN total. A continuación, se realizó la retrotranscripción y el ADNc de la proteína AF10 se amplificó usando una sonda Taqman específica para esta proteína (ver Materiales y Métodos). La cantidad de ADNc de la proteína AF10 se normalizó con el ADNc del gen que expresa el ARNr 18S. En la Figura 14 se observa que en las tres líneas celulares se produce una disminución estadísticamente significativa de los niveles del ARNm de la proteína AF10. Este resultado indica que el descenso de los niveles de la proteína AF10 al inducir la diferenciación celular se debe, al menos en parte, a una caída de los niveles de expresión de su gen. Este resultado no descarta que la proteína pueda estar siendo degradada de forma activa, algo que se discutirá más adelante en este trabajo.



**Figura 14. Cuantificación de los niveles del ARNm de la proteína AF10.** Los niveles de ARNm de la proteína AF10 se cuantificaron mediante PCR cuantitativa a partir de los ADNc de las líneas celulares HEL, K562 y CMK antes (-TPA) y después (+TPA) del tratamiento con TPA. Los valores obtenidos con la sonda específica del ADNc de la proteína AF10 en humanos se normalizaron con los valores obtenidos de la cuantificación del ADNc del ARNr 18S. El análisis estadístico se realizó aplicando un t-test. \* P<0.05; \*\*\* P<0.001. n ≥ 3

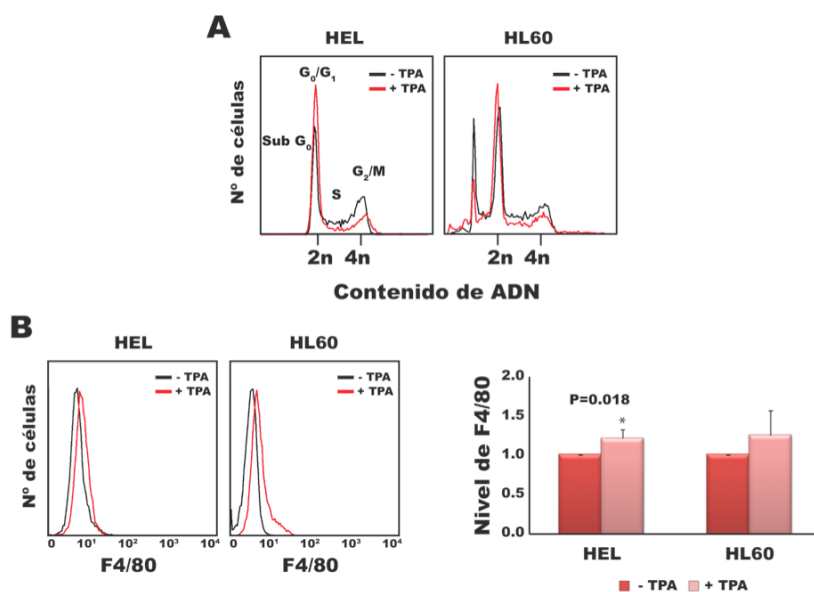
## 2.2. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA AF10 EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN MONOCÍTICA

A continuación, se procedió al estudio del perfil de expresión de la proteína AF10 durante la diferenciación monocítica. La inducción de la diferenciación monocítica se llevó a cabo en las líneas celulares HEL y HL60. Las células HEL pueden diferenciar siguiendo la vía monocítica al ser tratada con TPA a una concentración de  $10^{-6}$  M (Long et al., 1990). En el caso de la línea celular HL60, la diferenciación monocítica se produce con el tratamiento con  $10^{-8}$  M TPA .

### 2.2.1. Inducción de la diferenciación monocítica

Al igual que en el caso de la diferenciación megacariocítica, se comprobó que la diferenciación monocítica se había producido adecuadamente. Las líneas celulares HEL y HL60 fueron incubadas con TPA durante 72 horas y se tomaron muestras de las dos líneas celulares antes y después del tratamiento. A continuación, se procedió al análisis mediante citometría de flujo de su contenido de ADN tras la incubación con yoduro de propidio. En la Figura 15A se observa que, tras inducir la diferenciación celular se observa un aumento del número de células que se encuentran en las fases  $G_0/G_1$  en ambas líneas celulares. Además, se produce una disminución del número de células que se encuentran en la fase S y en la fase  $G_2/M$  con respecto a las células que no han sido estimuladas con TPA. Estos resultados muestran que las células han sufrido la parada del ciclo celular esperada tras la inducción de la diferenciación. La línea celular HL60

muestra una población celular que se encuentra en fase Sub G<sub>0</sub>. La fase Sub G<sub>0</sub> engloba a las células apoptóticas que presentan un contenido de ADN inferior a 2n debido a la disgregación del ADN nuclear en los denominados cuerpos apoptóticos. Así, la señal emitida por el yoduro de propidio es debida a un contenido de ADN inferior a 2n. La línea celular HL60 parece presentar siempre un porcentaje de su población en estado apoptótico (Figura 15A).



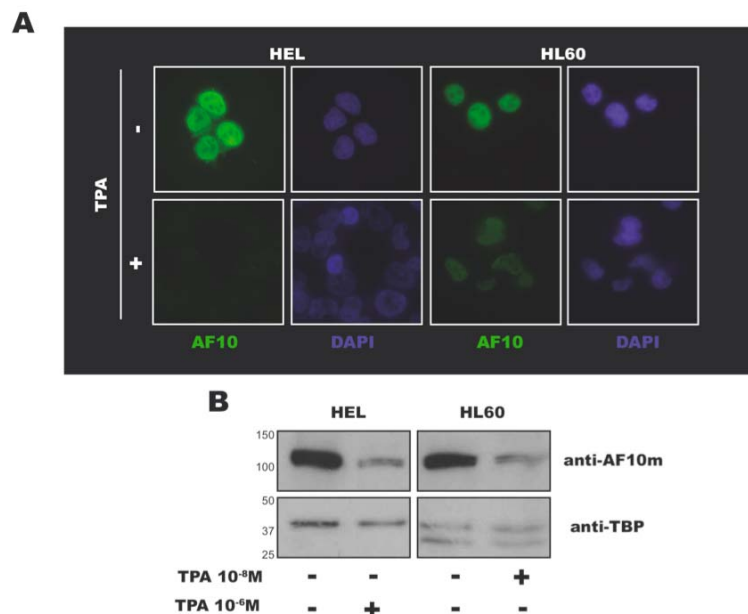
**Figura 15. Inducción de la diferenciación monocítica en las líneas celulares HEL y HL60.** (A) Detección mediante citometría de flujo del contenido de ADN en las dos líneas celulares antes (- TPA) y después (+ TPA) de la inducción de la diferenciación monocítica con TPA. (B) A la izquierda, se muestra la detección de los niveles del marcador de superficie F4/80 la superficie de las células antes (- TPA) y después (+ TPA) del tratamiento con TPA. A la derecha, se muestra la representación gráfica de los valores obtenidos por citometría de flujo. El análisis estadístico se realizó aplicando un t-test. \*  $P < 0.05$ .  $n \geq 3$

El marcador de superficie F4/80 es el más característico en el caso de los monocitos (Austyn and Gordon, 1981), de manera que se observa un aumento de los niveles de la proteína F4/80 una vez ha finalizado la diferenciación celular con respecto a los estadios anteriores. Al realizar el análisis de la variación de los niveles de la proteína F4/80 en la superficie de las células antes y después del tratamiento con TPA, se observó que en el caso de la línea celular HEL el incremento es estadísticamente significativo, mientras que en el caso de las células HL60 se observa un incremento aunque éste no es estadísticamente significativo (Figura 15B). Este resultado se puede deber al hecho de que la línea celular HL60 presenta un mayor grado de diferenciación

monocítica inicial, lo que implica que en su superficie ya existe un número suficientemente elevado de moléculas de la proteína F4/80. Así, al inducir la diferenciación, se produce un aumento del número de moléculas pero esta variación no es tan grande al compararlo con el estadio inicial.

### 2.2.2. Caracterización de la proteína AF10 en la diferenciación monocítica

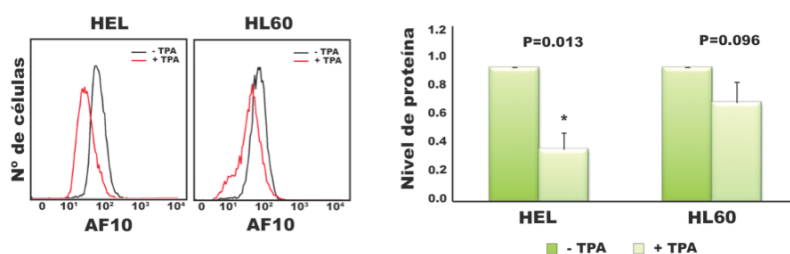
Tras comprobar que el proceso de diferenciación se había producido correctamente, se procedió al estudio del comportamiento de la proteína AF10. Para ello, al igual que en el caso de la diferenciación megacariocítica, se analizó la localización de la proteína AF10 antes y después del tratamiento con TPA mediante inmunofluorescencia en placa con el anticuerpo anti-AF10m. Para el marcaje del núcleo se utilizó DAPI. Los resultados mostraron que se mantiene la localización nuclear, ya que la señal emitida por la proteína AF10 colocaliza con la señal del DAPI en ambas líneas celulares (Figura 16A). Además, al igual que ocurre en la diferenciación megacariocítica parece producirse una bajada en los niveles de la proteína AF10 durante la diferenciación monocítica.



**Figura 16. Detección de la proteína AF10 tras la inducción de la diferenciación monocítica en las líneas celulares HEL y HL60. (A)** Inmunofluorescencia para la detección de la proteína AF10 en las dos líneas celulares antes (- TPA) y después (+TPA) de la inducción de la diferenciación celular con TPA. La inmunofluorescencia se llevó a cabo con el anticuerpo anti-AF10m (ver Materiales y Métodos). Los núcleos se marcaron con DAPI. **(B)** Detección mediante western blot de los niveles de la proteína AF10 en las líneas celulares sin diferenciadas (- TPA) y diferenciadas (+TPA). La proteína TBP se empleó como control de carga.

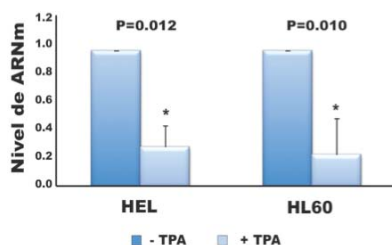
La inmunofluorescencia también muestra la diferencia en los niveles de la proteína AF10 entre ambas líneas celulares antes de ser tratadas con TPA. Así, las células HEL, con un menor grado de diferenciación inicial, presenta una mayor intensidad de señal emitida por la proteína AF10 que las células HL60 (Figura 16A). Estas diferencias entre las distintas líneas celulares también se observaron en la diferenciación megacariocítica (Figura 12A). Para confirmar la disminución de los niveles de proteína, se realizó un western blot con los extractos de las células antes y después del tratamiento con TPA. En los western blots presentados en la Figura 16B se observa un descenso en los niveles de la proteína AF10 en las dos líneas celulares tras el tratamiento con TPA, lo que apoya el resultado obtenido en las inmunofluorescencias.

Para confirmar la relevancia estadística de los descensos detectados mediante inmunofluorescencia y western blot, se realizó el análisis cuantitativo de los niveles de proteína mediante citometría de flujo. Para ello, se realizó una inmunofluorescencia en tubo con el anticuerpo anti-AF10m en las líneas celulares HEL y HL60 antes y después del tratamiento con TPA para su posterior análisis. En la Figura 17 se observa que en el caso de las células HEL, la caída de los niveles de la proteína AF10 es estadísticamente significativa. En el caso de las células HL60, si bien se detecta también un descenso de los niveles de proteína, éste no es significativo. Este hecho se podría explicar, al igual que en el caso del marcador de superficie F4/80, debido a que la línea celular HL60 presenta un mayor grado de diferenciación celular. Puesto que los resultados obtenidos hasta ahora muestran que los niveles de la proteína AF10 disminuyen durante la diferenciación celular, se esperaría observar que la disminución de los niveles de esta proteína en las células HL60 no sea tan drástica como para las células HEL.



**Figura 17. Cuantificación de la variación de los niveles de la proteína AF10 durante la diferenciación monocítica.** A la izquierda, se muestran las curvas obtenidas de la detección mediante citometría de flujo de los niveles de la proteína AF10 antes (- TPA) y después (+TPA) de la diferenciación monocítica en las líneas celulares HEL y HL60. A la derecha, se muestra la representación gráfica de los valores obtenidos de los análisis por citometría de flujo. El análisis estadístico se realizó aplicando un t-test. \*  $P < 0.05$ .  $n \geq 3$

Además del estudio de la variación de los niveles de la proteína, se realizó el análisis de los niveles del ARNm de la proteína AF10 mediante PCR cuantitativa. Para ello, al igual que en el caso de la diferenciación megacariocítica, se tomaron muestras de las líneas celulares HEL y HL60 antes y después del tratamiento con TPA, se extrajo el ARN que, posteriormente se retrotranscribió. Para la cuantificación de los niveles de ARNm de la proteína AF10 se empleó la sonda específica para la forma humana de dicho ARNm y se normalizó con la cuantificación de los niveles del ARNm del ARNr 18S. Los resultados mostraron un descenso estadísticamente significativo de los niveles de ARNm de la proteína AF10 tras el tratamiento con TPA tanto en las células HEL como en las células HL60 (Figura 18).



**Figura 18. Representación gráfica de los niveles del ARNm de la proteína AF10 durante la diferenciación monocítica.** La cuantificación de los niveles de ARNm de la proteína AF10 en las líneas celulares HEL y HL60 antes (-TPA) y después (+TPA) de la diferenciación monocítica se realizó mediante PCR. Se empleó una sonda específica para el ARNm de la forma humana de dicha proteína. Los valores obtenidos se normalizaron con los valores del ARNm del ARNr 18S. El análisis estadístico se realizó aplicando un t-test. \*  $P < 0.05$ .  $n \geq 3$ .

De los resultados presentados se puede concluir que, asociado al proceso de diferenciación hematopoyética, se produce un descenso de los niveles de la proteína AF10 y que ese descenso es debido, al menos en parte, a la bajada de los niveles de transcripción de su gen.

Estudios preliminares realizados en el laboratorio han mostrado que la inducción de la diferenciación eritrocítica conlleva el descenso de los niveles de la proteína AF10 en las líneas celulares HEL y K562 (datos no mostrados). Estos resultados apoyan los descritos anteriormente y sugieren que la proteína AF10 ejerce su función en los estadios previos a la diferenciación hematopoyética.



### 2.3. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA AF10 EN LAS DISTINTAS LÍNEAS CELULARES

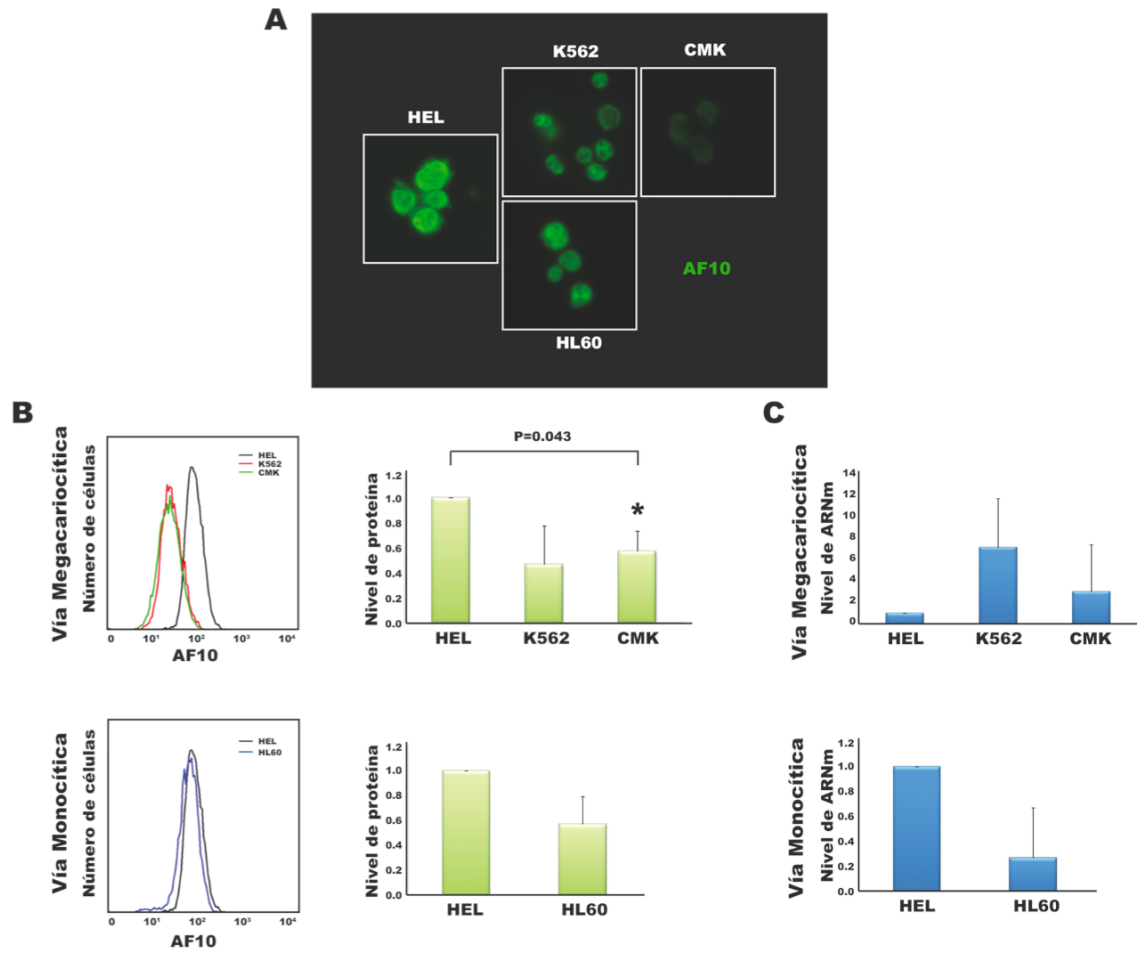
Las inmunofluorescencias en placa realizadas en los experimentos de inducción de la diferenciación celular sugieren que las distintas líneas celulares tienen un contenido distinto de la proteína AF10 en su estado basal (Figura 19A). Así, cuanto menos diferenciada esté la línea celular, mayor será el nivel de expresión de la proteína AF10. Dado que las inmunofluorescencias en placa no dan una información cuantitativa, se reanalizaron los valores obtenidos de la cuantificación de los niveles de proteína por citometría de flujo y de la cuantificación de los niveles de ARNm mediante PCR cuantitativa. El análisis se realizó normalizando los datos de cada una de las líneas celulares con los valores obtenidos en la línea celular HEL, ya que ésta es la que presenta un menor grado de diferenciación celular y, además, es común a los dos linajes celulares.

Los resultados obtenidos de la detección de la proteína AF10 por citometría de flujo muestran que la línea celular HEL es la que presenta una mayor cantidad de dicha proteína (Figura 19B) al compararla tanto con las líneas celulares que diferencian siguiendo la vía megacariocítica, K562 y CMK, como con la línea celular que diferencia siguiendo la vía monocítica, HL60. Esta diferencia de los niveles de proteína es estadísticamente significativa en el caso de CMK ( $P=0.043$ ), que es la que presenta un mayor grado de diferenciación celular.

En cuanto al análisis de los niveles del ARNm de la proteína AF10, sólo se observa un menor nivel de ARNm en el caso de las células HL60 al compararla con las células HEL (Figura 19C). El hecho de que las líneas celulares K562 y CMK presenten niveles de ARNm mayores que la línea celular HEL puede deberse a las múltiples alteraciones cromosómicas que presentan estas líneas celulares. Este hecho podría favorecer la expresión del gen *AF10*, de forma que la regulación de los niveles de proteína se produciría a nivel post-traducciona l mediante la degradación de la proteína y así presentar una menor cantidad de la proteína AF10 que la línea celular HEL.

Estos estudios apoyan los resultados obtenidos al inducir la diferenciación celular en cada una de las líneas que muestran que a medida que la célula adquiere un

mayor grado de diferenciación, los niveles de AF10 descienden (Apartados 2.1.2 y 2.2.2 de los Resultados).



**Figura 19. Comparación de los niveles basales de la proteína AF10 entre las líneas celulares HEL, K562, CMK y HL60. (A)** Inmunofluorescencia en placa realizada con el anticuerpo anti-AF10m en las cuatro líneas celulares. **(B)** A la izquierda, se muestran las curvas obtenidas a partir de la detección de la proteína AF10 mediante citometría de flujo. A la derecha, se muestra la representación gráfica de los valores de los niveles de la proteína AF10 en las líneas celulares megacariocíticas y monocíticas normalizados con los valores obtenidos en la línea celular HEL. **(C)** Representación gráfica de los niveles del ARNm de la proteína AF10 en las cuatro líneas celulares normalizadas con los valores obtenidos de la línea celular HEL. El análisis estadístico se ha realizado aplicando un t-test. \*  $P < 0.05$ .  $n \geq 3$

### **3. SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA AF10**

#### **3.1. SOBREEXPRESIÓN ESTABLE DE LA PROTEÍNA AF10**

Una vez se completó la caracterización AF10 durante la diferenciación celular, se procedió a sobreexpresar la proteína para estudiar su efecto. Para llevar a cabo este estudio se realizó un primer experimento en las líneas celulares HEL y K562. El objetivo era obtener líneas celulares estables que sobreexpresaran AF10 tanto de manera constitutiva como de manera inducible mediante un sistema controlado por el represor de la tetraciclina.

Las líneas celulares HEL y K562 se transfectaron mediante electroporación con el plásmido pcDNA6/TR. Este plásmido expresa el represor de la tetraciclina y el gen de resistencia a la blasticidina, lo que permite seleccionar los clones que presentan el plásmido mediante la tratamiento con este antibiótico. Tras el tratamiento con blasticidina se seleccionaron seis clones resistentes para cada línea celular. Para comprobar que estos clones resistentes expresaban el represor de tetraciclina se recogieron muestras celulares y se extrajo el ARN. Mediante RT-PCR se comprobó que todos los clones expresaban el represor (datos no mostrados). A partir de este punto, las líneas celulares HEL y K562 que presentan el represor de tetraciclina se denominarán HEL/TetR y K562/TetR, respectivamente (Tabla 4).

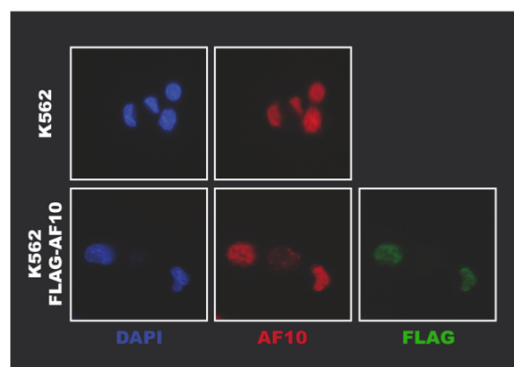
**Tabla 4. Clones obtenidos en las transfecciones para la sobreexpresión de la proteína AF10**

TIPO DE EXPRESIÓN	GENOTIPO	LINEAS CELULARES	
		HEL	K562
INDUCIBLE	TetR pcDNA4/TO	3	3
	TetR GFP-AF10	0	2
	TetR FLAG-AF10	0	2
CONSTITUTIVA	TetR	6	6
	pcDNA4/TO	3	3
	GFP-AF10	0	2
	FLAG-AF10	0	3

**Tabla 4. Clones obtenidos de las transfecciones para sobreexpresar de forma inducible y constitutiva AF10 en las líneas celulares HEL y K562.**

A continuación, las líneas celulares HEL, K562, HEL/TetR y K562/TetR se transfectaron mediante electroporación con los plásmidos que expresan las proteínas FLAG-AF10 y GFP-AF10. El plásmido pcDNA4/TO, en el que se clonaron los ADNc de dichas proteínas, presenta el gen de resistencia a zeocina y tres sitios de unión del represor de tetraciclina en su región promotora, por lo que en presencia del represor de tetraciclina no se expresará el ADNc insertado en el sitio de policlonaje. Como control se empleó el plásmido pcDNA4/TO vacío. Tras cuatro semanas de incubación en medio completo con zeocina, se obtuvieron clones que expresaban las proteínas FLAG-AF10 y GFP-AF10 en las líneas celulares K562 y K562/TetR y no en las líneas celulares HEL y HEL/TetR. Sin embargo, se obtuvieron clones de las transfecciones con el plásmido vacío con las cuatro líneas celulares, K562, K562/TetR, HEL y HEL/TetR. Teniendo en cuenta que se habían obtenido clones de las células HEL que expresan de forma estable el represor de la tetraciclina y que presentaban el plásmido pcDNA4/TO vacío, no parecía probable que la ausencia de clones positivos que sobreexpresasen la proteína AF10 se debiese a un problema del proceso de transfección. No obstante, se repitieron las transfecciones con las líneas celulares HEL y HEL/TetR y tampoco se consiguieron clones que sobreexpresasen la proteína AF10 ni de forma constitutiva ni de forma inducible (Tabla 4).

Uno de los clones obtenidos a partir de K562 que expresan FLAG-AF10 se empleó para estudiar el comportamiento de la proteína sobreexpresada. Para ello, se realizó una inmunofluorescencia en placa utilizando el anticuerpo anti-AF10p y el anticuerpo anti-FLAG y se marcó el ADN nuclear con DAPI. En la Figura 20 se observa que la proteína sobreexpresada se localiza en el interior del núcleo ya que la señal de AF10 colocaliza con la señal de FLAG-AF10 y que éstas, a su vez, colocalizan con la señal del DAPI, lo que indica que la proteína sobreexpresada presenta la misma localización subcelular que la proteína nativa.



**Figura 20. Localización de la proteína AF10 sobreexpresada.** Inmunofluorescencia en placa en las líneas celulares K562 y K562 FLAG-AF10 con el anticuerpos anti-AF10p y anti-FLAG en el caso de la línea celular K562 FLAG-AF10.

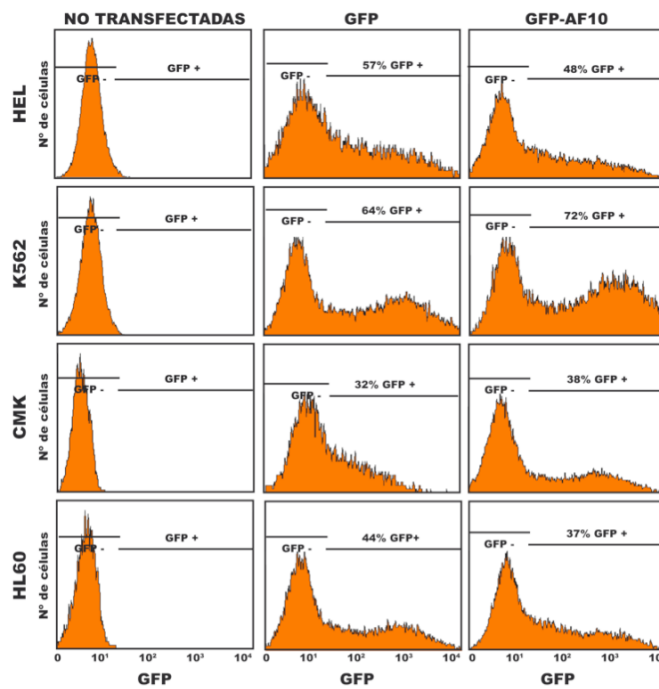
## 3.2. SOBREENPRESIÓN TRANSITORIA DE LA PROTEÍNA AF10

### 3.2.1. Estudio de la viabilidad celular

El hecho de que no se consiguiera obtener ningún clon que sobreexpresase la proteína AF10 de forma estable en las líneas celulares HEL y HEL/TetR sugiere que la sobreexpresión de la proteína en estas líneas celulares inducía la muerte de las células. Para confirmar esta hipótesis, se realizó un estudio del efecto de la sobreexpresión de la proteína AF10 sobre la viabilidad celular mediante transfecciones transitorias y su posterior análisis con anexina-V. Las transfecciones se realizaron con el plásmido pcDNA4/TO en el que se había clonado el ADNc de la proteína GFP-AF10, de forma que se puede detectar la presencia de la proteína AF10 mediante citometría de flujo gracias a la señal de la proteína GFP. El plásmido que expresa sólo la proteína GFP se empleó como control.

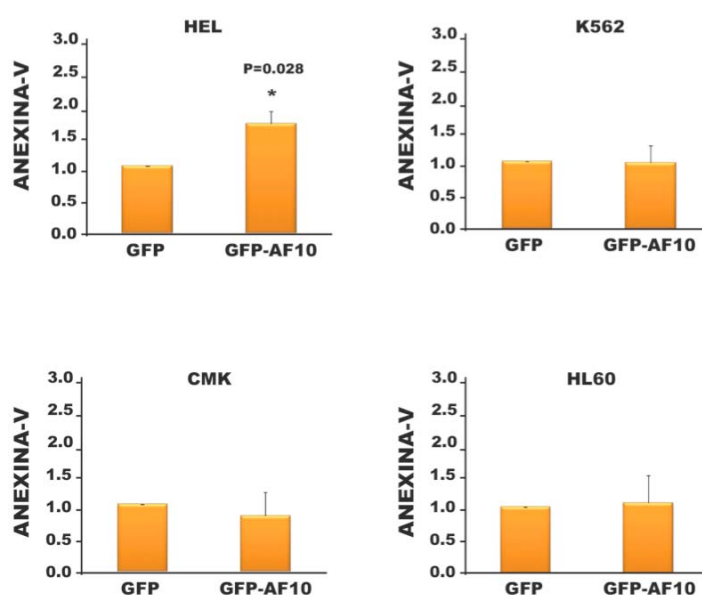
La anexina-V es una molécula que se une a la fosfatidil-serina (PS) a través de uniones de calcio (Koopman *et al.*, 1994). La PS es un fosfolípido que forma parte de la membrana plasmática de las células. En condiciones normales, la PS se encuentra en la superficie interna de la membrana citoplasmática de forma mayoritaria. En las primeras fases del proceso apoptótico, la membrana se modifica exponiendo al exterior la PS, por lo que podrá interactuar con la anexina-V. Así, la PS se puede utilizar como marcador de apoptosis.

Las líneas celulares HEL, K562, CMK y HL60 se transfectaron mediante nucleofección con los plásmidos que expresan las proteínas GFP y GFP-AF10 y se mantuvieron en cultivo con medio completo durante 18 horas. El porcentaje de células que expresaban las proteínas GFP y GFP-AF10 se cuantificó mediante citometría de flujo y se observó que en todas las líneas celulares transfectadas con cada uno de los plásmidos la eficiencia de transfección es inferior al 100% (Figura 21). Este hecho implica que los análisis de viabilidad que se describen a continuación se realizaron sobre una población heterogénea en la que existe un fondo de células que no han sido transfectadas.



**Figura 21. Detección de la eficiencia de transfección con GFP y GFP-AF10.** La eficiencia de transfección de las líneas celulares HEL, K562, CMK y HL60 transfectadas con los plásmidos que expresan GFP y GFP-AF10 se midió mediante la detección de la señal de GFP mediante citometría de flujo. Como control se emplearon las células no transfectadas. Estas gráficas corresponden a un único experimento que representa la eficiencia de transfección habitual para cada línea celular con estos plásmidos.

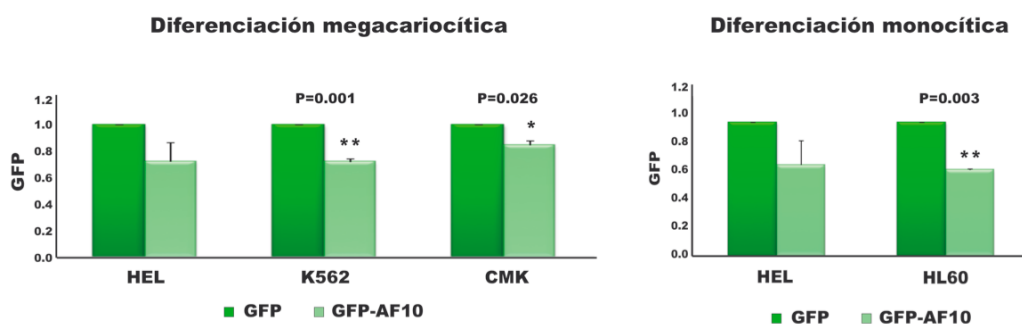
Las células se incubaron con anexina-V y se cuantificó la señal mediante su detección por citometría de flujo. Los datos de los niveles de anexina-V obtenidos de las transfecciones con el plásmido que expresa la proteína GFP-AF10 se normalizaron con los datos obtenidos del control con el plásmido que expresa la proteína GFP. Los resultados muestran que en el caso de las células HEL, se produce un incremento estadísticamente significativo de la apoptosis ( $P=0.028$ ) cuando se transfectan con la construcción que expresa la proteína GFP-AF10 frente al control que sólo expresa la proteína GFP. En el resto de las líneas celulares K562, CMK y HL60 no se observa ninguna variación en cuanto al número de células que se encuentran en estado apoptótico entre la expresión de la proteína GFP y la de la proteína GFP-AF10 (Figura 22). Estos resultados confirman que la sobreexpresión de la proteína AF10 en la línea celular HEL podría inducir la muerte celular por apoptosis.



**Figura 22. Estudio de la viabilidad celular.** Representación gráfica del análisis de viabilidad celular mediante la detección de la anexina-V por citometría de flujo de las líneas celulares HEL, K562, CMK y HL60 transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas GFP y GFP-AF10. El análisis estadístico se realizó aplicando un t-test. \*  $P < 0.05$ .  $n \geq 3$

### 3.2.2. Efecto de la diferenciación celular sobre la proteína AF10 sobreexpresada

La proteína fusión GFP-AF10 permite hacer un seguimiento de la proteína AF10 sobreexpresada mediante citometría de flujo, por lo que se decidió estudiar el efecto de la diferenciación celular sobre la proteína AF10 exógena. Este estudio permitiría determinar si la proteína AF10 sobreexpresada sigue el mismo curso que la proteína nativa. Para llevar a cabo este experimento, tras la transfección de las líneas celulares HEL, K562, CMK y HL60 con los plásmidos que expresan las proteínas GFP y GFP-AF10 cada una de las transfecciones se dividió en dos poblaciones. Una de estas poblaciones se cultivó con medio completo mientras que la otra se cultivó con medio de diferenciación (medio completo con TPA). Las transfecciones realizadas con la línea células HEL se separaron en tres poblaciones para hacer el estudio siguiendo la vía de diferenciación megacariocítica y monocítica tras la estimulación con bajos y altos niveles de TPA, respectivamente.



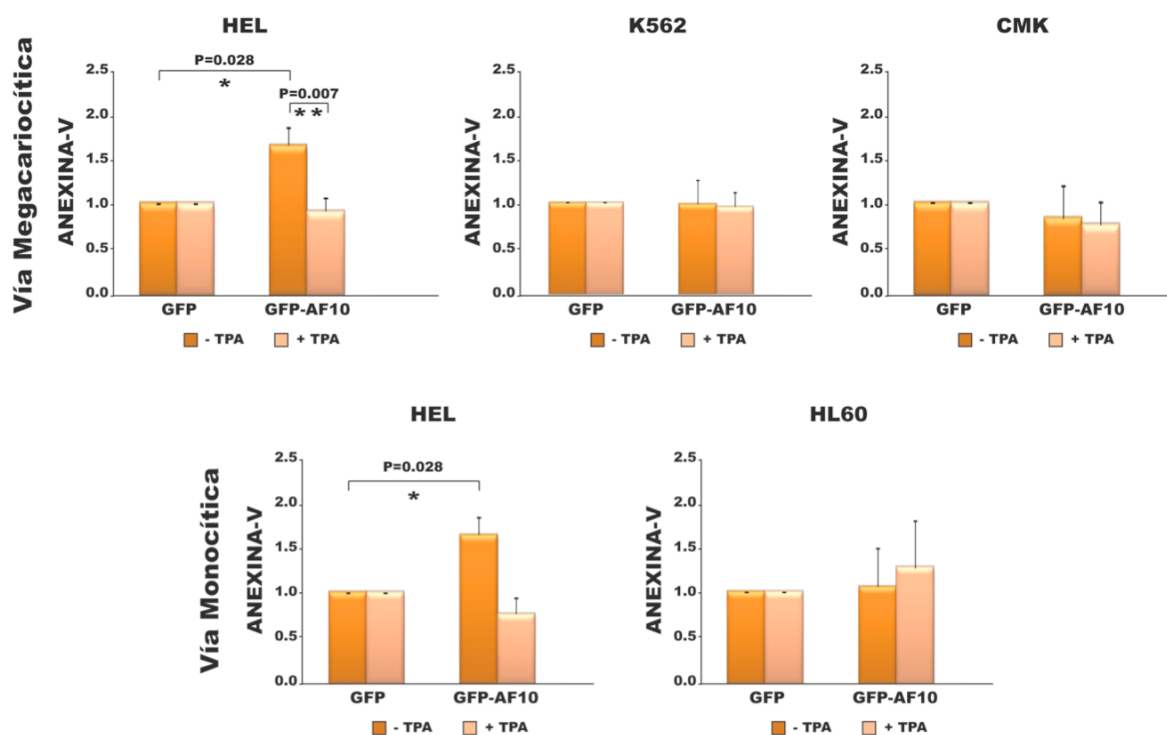
**Figura 23. Detección de la señal de GFP.** Representación gráfica del análisis mediante citometría de flujo de la señal emitida GFP-AF10 en las líneas celulares HEL, K562, CMK y HL60 tras la inducción de la diferenciación celular con TPA. Los valores se normalizaron frente a los datos obtenidos con las células transfectadas con GFP. El análisis estadístico se realizó aplicando un t-test. \* P<0.05; \*\* P<0.01. n ≥ 3

Tras 18 horas de incubación en medio completo o medio de diferenciación, se realizó el análisis mediante citometría de flujo de la señal de la proteína GFP en las células. En la Figura 23 se observa que en las cuatro líneas celulares se produce una disminución de los niveles de la proteína de fusión GFP-AF10 cuando las células han sido tratadas con TPA algo que no ocurre en las células transfectadas con el plásmido que expresa la proteína GFP. Este hecho demuestra que el promotor del plásmido no



está silenciado ya que, de ser así, también se observaría una disminución de la señal de las células transfectadas con la proteína GFP. Estos resultados muestran que la proteína exógena se está degradando de forma activa tras la inducción de la diferenciación celular.

Para poder determinar si la diferenciación celular de las células transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas GFP y GFP-AF10 modificaba su efecto sobre la viabilidad celular, las células también fueron incubadas con anexina-V. En la Figura 24, se observan los gráficos de los datos de los niveles de anexina-V en las células transfectadas antes y después del tratamiento con TPA.



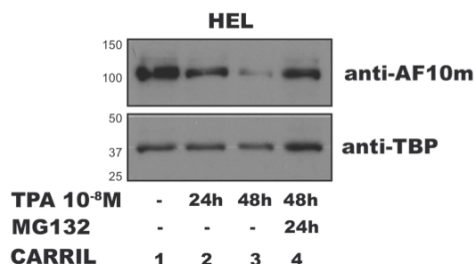
**Figura 24. Detección de la viabilidad celular antes y después de la inducción de la diferenciación.** Representación gráfica de los datos obtenidos al analizar mediante citometría de flujo la señal emitida de anexina-V en las líneas celulares HEL, K562, CMK y HL60 transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas GFP y GFP-AF10 antes (-TPA) y después (+TPA) de la inducción de la diferenciación con TPA. El análisis estadístico se realizó aplicando un t-test. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .  $n \geq 3$

En el caso de la línea celular HEL se observa una disminución de los niveles de anexina-V en las células que sobreexpresan la proteína AF10 que han sido estimuladas

con TPA para diferenciarse tanto hacia megacariocitos como hacia monocitos con respecto a las células que sobreexpresan la proteína AF10 y no se les ha inducido la diferenciación celular. Este resultado indica que el número de células apoptóticas en la línea celular HEL es menor cuando se induce la diferenciación celular, mientras que en el resto de las líneas celulares no se observa ningún cambio. Estos datos sugieren que la sobreexpresión de la proteína AF10 afecta a la viabilidad de las células que se encuentran en estadios tempranos de la diferenciación celular, mientras que cuando la célula va adquiriendo un mayor compromiso celular, la viabilidad de la célula deja de verse afectada con el incremento de los niveles de la proteína.

En los experimentos de inducción de la diferenciación celular megacariocítica y monocítica se había demostrado que los niveles de la proteína AF10 endógena disminuían como consecuencia del silenciamiento de su gen al inducir la diferenciación celular. El hecho de que la proteína sobreexpresada sufra una degradación activa al inducir la diferenciación celular, llevó a pensar en la posibilidad de que la proteína endógena también fuese degradada activamente al inducirse la diferenciación celular. Para comprobar esta hipótesis se realizó un estudio del efecto de la inhibición del proteasoma en la línea celular HEL. El proteasoma es un macrocomplejo proteico cuya función es la degradación final de las proteínas. El agente bloqueante del proteasoma que se empleó es el MG132, que se une a su región catalítica de manera reversible (Lee and Goldberg, 1998).

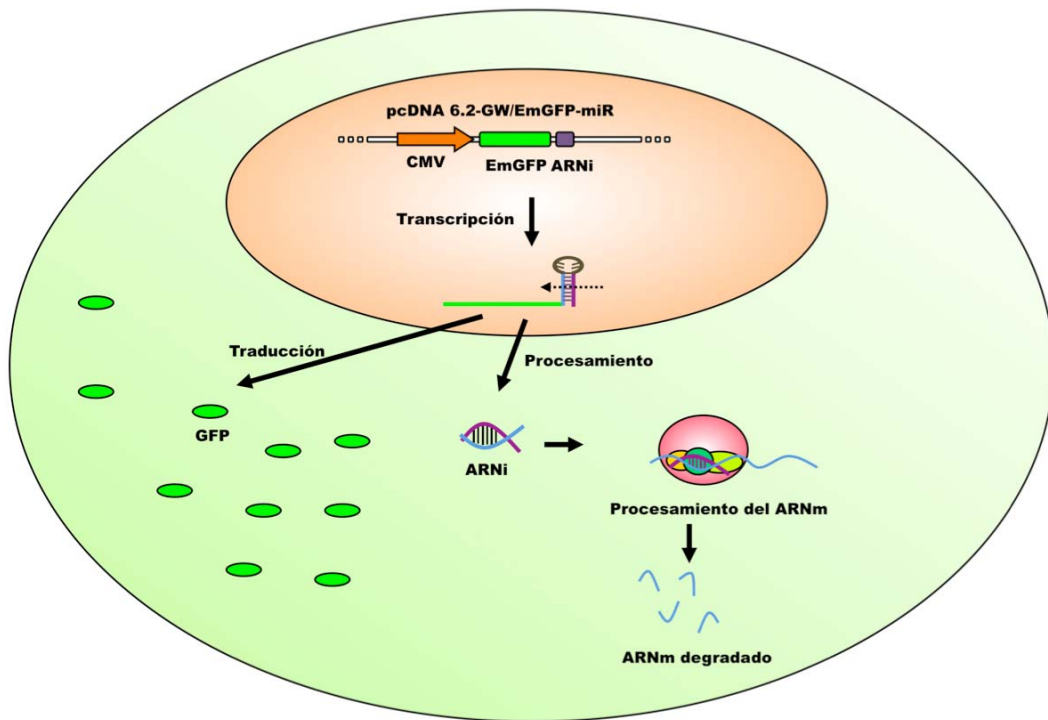
En la Figura 25, se muestra el western blot con los extractos de las células con los distintos tratamientos. La primera muestra pertenece al extracto de las células que no habían recibido ningún tratamiento. A continuación, se cargaron las muestras pertenecientes a los extractos de las células que habían sido incubadas con TPA durante 24 horas y 48 horas y se observa que hay una disminución progresiva de los niveles de la proteína AF10 con respecto a la muestra de células sin tratar. Por último, se añadió una muestra del extracto de las células que habían sido incubadas con TPA durante 48 horas, de las cuales, la 24 últimas horas, además se habían incubado con el agente MG132. En esta última muestra, se observa que al bloquear el proteasoma no se produce la disminución de los niveles de la proteína AF10. Este resultado indica que la proteína se degrada a través del proteasoma al inducirse la diferenciación celular.



**Figura 25. Inhibición de la actividad del proteasoma con el agente bloqueante MG132.** Western blot de los extractos proteicos de la línea celular HEL en los distintos puntos del experimento: En el primer carril se cargó el extracto proteico de las células HEL sin haber sido tratadas ni con TPA ni con MG132 (TPA -, MG132 -). El segundo carril corresponde al extracto obtenido de las células incubadas durante 24h con TPA (TPA 24h, MG132-). El tercer carril se cargó con los extractos proteicos de las células incubadas con TPA durante 48h (TPA 48h; MG132 -). El cuarto carril corresponde con los extractos proteicos obtenidos de las células tratadas durante 48h con TPA y 24h con MG132 (TPA 48h; MG132 24h). La detección de la proteína AF10 se realizó con el anticuerpo anti-AF10m. La proteína TBP se empleó como control de carga.

#### **4. SILENCIAMIENTO DE LA PROTEÍNA AF10**

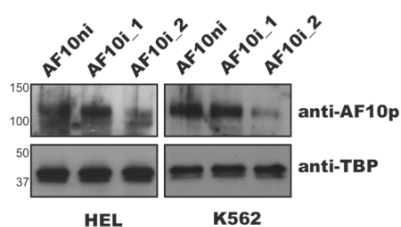
Tras la caracterización de los efectos de la sobreexpresión de la proteína AF10 en las líneas celulares HEL, K562, CMK y HL60, se procedió al estudio del efecto de la interferencia de su ARNm. Para ello, se utilizó el sistema de interferencia del ARNm BLOCK-iT POL II miR RNAi de Invitrogen. Este sistema permite clonar la secuencia interferente a continuación del ARNm de la proteína GFP de forma que ambas secuencias se transcriben a la vez. Así, cuando el ARNm de la proteína GFP se traduce, la señal emitida por esta proteína indicaría la expresión de la molécula de interferencia. Así, la horquilla interferente será procesada dando lugar a moléculas de ARN que hibridarán con el ARNm de la proteína AF10 formando una molécula de ARN de doble cadena. Esta molécula de ARN de doble cadena activará la maquinaria que degradará dicha molécula (Agrawal et al., 2003). En la Figura 26 se muestra un esquema del funcionamiento del sistema empleado.



**Figura 26. Esquema del funcionamiento del sistema empleado en los experimentos de interferencia del ARNm.** Tras la transfección de los plásmidos que expresan la horquilla que interferirá con el ARNm diana se produce la transcripción de la secuencia y el posterior procesamiento. El ARNm de la proteína GFP se traduce mientras que la horquilla interferente es procesada generando una molécula de ARNi que reconocerá al ARNm diana. La formación de una molécula de ARN de doble cadena activará la maquinaria de degradación que procesará la molécula hasta degradarla.

Para comprobar si se producía la interferencia del ARNm de la proteína AF10 con alguna de las construcciones empleadas, se realizó un primer experimento con las líneas celulares HEL y K562. Las células se transfectaron con los plásmidos AF10i\_1 y AF10i\_2, que presentan la secuencia del ARNm de la proteína AF10 con la que hibridará para activar la interferencia. Como control se empleó el plásmido denominado AF10ni (no interferente) cuya secuencia no hibrida con ningún ARNm de eucariotas. Después de 18 horas desde la transfección, se analizó la eficiencia de transfección mediante la detección de la señal de la proteína GFP por citometría de flujo observándose una eficiencia de entre el 60-70% en ambas líneas celulares (datos no mostrados). Las células que presentan la proteína GFP también presentan la interferencia del ARNm de la proteína AF10. A partir de estas transfecciones se obtuvieron extractos con los que se realizó un western blot empleando el anticuerpo

anti-AF10p. La proteína TBP se utilizó como control de carga ya que sus niveles no deberían cambiar al producirse la bajada de los niveles de la proteína AF10. En la Figura 27 se observa que sólo en el caso de la construcción AF10i\_2 se produce una bajada en los niveles de la proteína AF10 detectable mediante western blot, lo que parece indicar que esta construcción presenta una secuencia que realmente interfiere con el ARNm de AF10. El hecho de que se observe una banda poco intensa en el extracto de las células transfectadas con el plásmido AF10i\_2 se debe al fondo aportado por las células que no han sido transfectadas ya que la eficiencia de transfección no es del 100% (datos no mostrados).



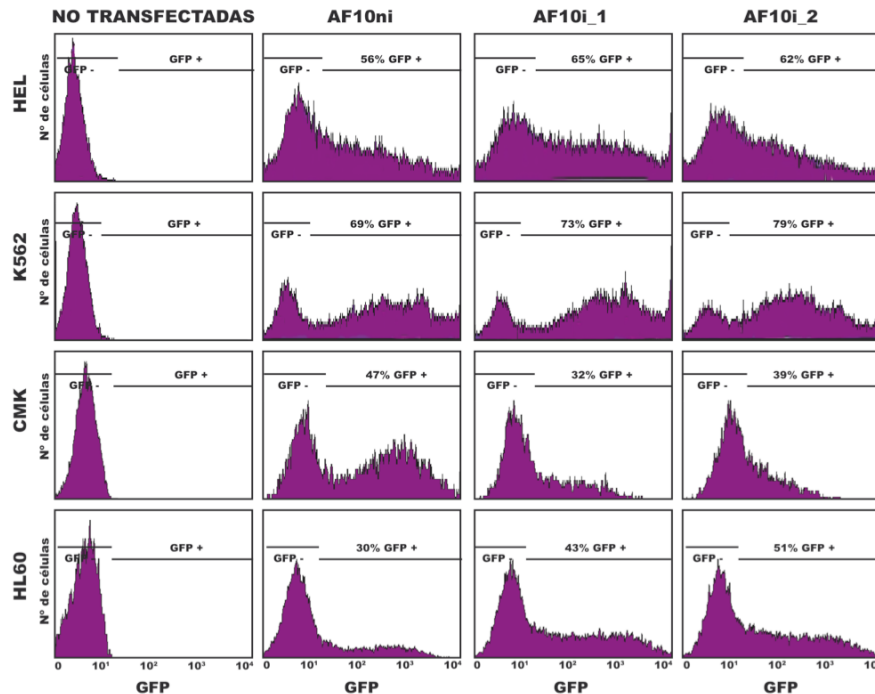
**Figura 27. Estudio de la eficiencia de la interferencia del ARNm de la proteína AF10.** Western blot de los extractos obtenidos de las líneas celulares HEL y K562 transfectadas con los plásmidos AF10ni, AF10i\_1 y AF10i\_2. El anticuerpo empleado para la detección de la proteína AF10 fue el anticuerpo anti-AF10p. La proteína TBP se empleó como control de carga.

#### **4.1. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE LA PROTEÍNA AF10 SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR**

Una vez se comprobó la eficiencia de la interferencia, se realizaron transfecciones en todas las líneas celulares para caracterizar el efecto de la interferencia del ARNm de la proteína AF10 en las mismas.

Las líneas celulares HEL, K562, CMK y HL60 se transfectaron con los plásmidos AF10ni, AF10i\_1 y AF10i\_2. La eficiencia de transfección fue variable entre unas líneas celulares y otras y en ningún caso fue del 100% (Figura 28), por lo que al analizar las células siempre hubo un porcentaje de células que habían sido transfectadas. Para analizar los efectos de la interferencia del ARNm sobre la viabilidad celular se realizó un análisis del porcentaje de células apoptóticas mediante su incubación con

anexina-V. Transcurridas 18 horas desde la transfección, se recogieron las células y se incubaron con anexina-V.

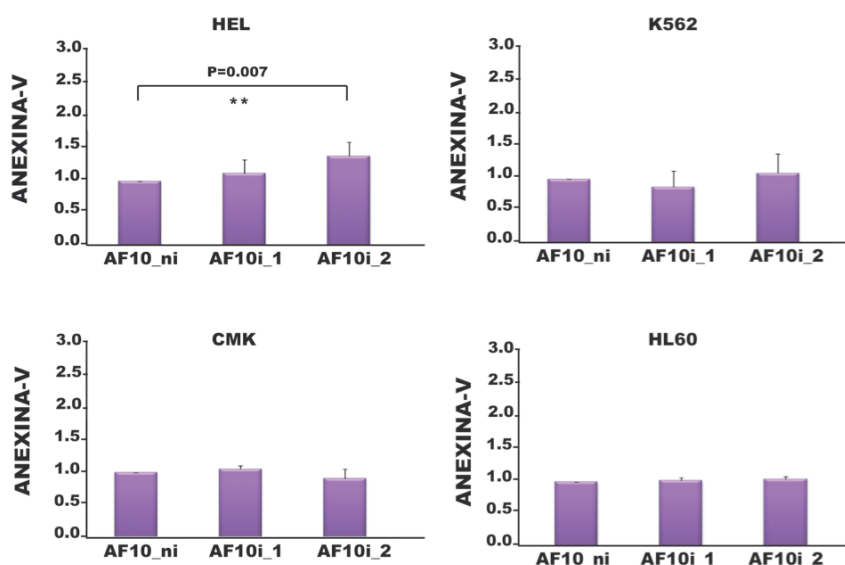


**Figura 28. Detección de la eficiencia de transfección mediante citometría de flujo.** La eficiencia de transfección de las líneas celulares HEL, K562, CMK y HL60 con los plásmidos AF10ni, AF10i\_1 y AF10i\_2 se determinó mediante la detección de la señal emitida por la proteína GFP mediante citometría de flujo. Como control se tomaron las células que no se habían transfectado. Estas gráficas corresponden a un único experimento que representan la eficiencia de transfección habitual para cada línea celular con estos plásmidos.

Cuando las células entran en apoptosis se produce la desorganización de la membrana citoplasmática creándose poros a través de los cuales, las moléculas de pequeño tamaño abandonan la célula. La proteína GFP es una molécula de pequeño tamaño, por lo que al producirse la entrada en apoptosis se puede perder la proteína. De este modo, el análisis de este experimento se puede ver afectado si sólo se tiene en cuenta la proporción de células que presenta el doble marcaje con la proteína GFP y anexina-V. Por otro lado, si se tiene en cuenta sólo la población marcada con anexina-V se van a tomar células que pueden estar muriendo por un motivo distinto a la interferencia del ARNm de la proteína AF10. Por este motivo, el análisis de los niveles de anexina-V se realizó tomando como valor el resultado del cociente entre la señal de anexina-V total (AT) y la suma de AT y la señal de las células que solo están marcadas con la proteína GFP (GFP). Es decir:  $AT/(AT+GFP)$ . La población AT incluye las

células que sólo están marcadas con anexina-V y las que además de anexina-V emiten señal de la proteína GFP.

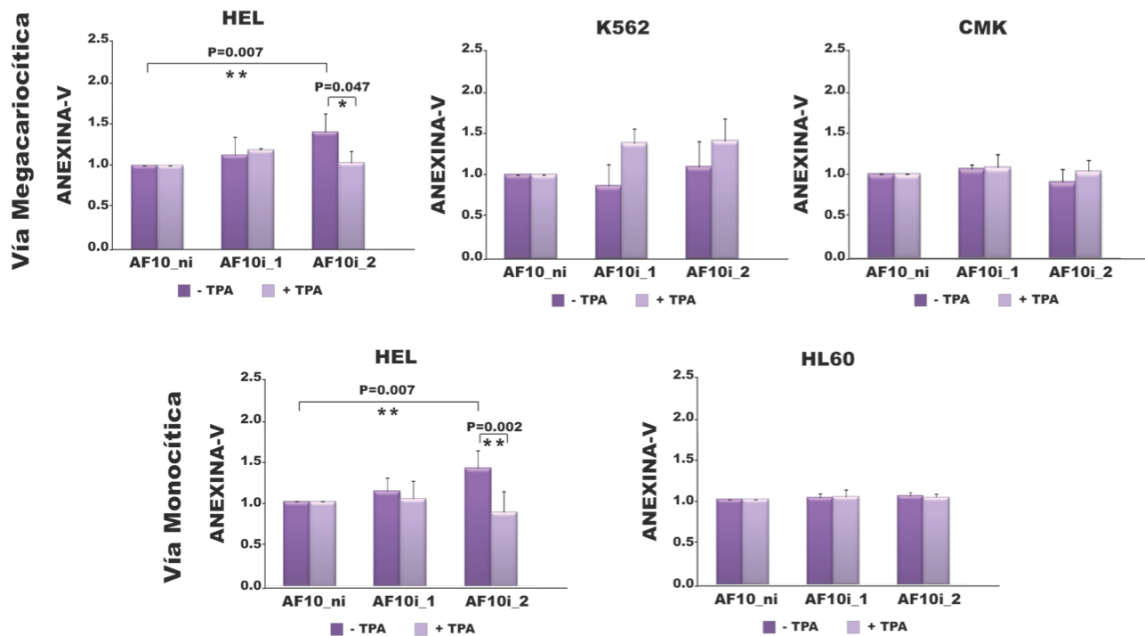
Al analizar las células en el citómetro se observó que en el caso de línea celular HEL, las células transfectadas con el plásmido AF10i\_2 presentaban un incremento estadísticamente significativo ( $P=0.007$ ) de células marcadas con anexina-V (Figura 29) lo que indica que la interferencia del ARNm de la proteína AF10 en la línea celular HEL induce la muerte celular por apoptosis.



**Figura 29. Viabilidad celular tras la transfección con los plásmidos AF10ni, AF10i\_1 y AF10i\_2.** Representación gráfica de los niveles de anexina-V en las líneas celulares HEL, K562, CMK y HL60 tras 18 horas desde la transfección con los plásmidos AF10ni, AF10i\_1 y AF10i\_2. El análisis estadístico se realizó aplicando un t-test.  $** P<0.01$ .  $n \geq 3$

Puesto que al inducir la diferenciación en las células HEL que sobreexpresan la proteína AF10 se produce un descenso de la muerte celular, se realizó un experimento similar con la interferencia del ARNm, induciendo la diferenciación de las células. De este modo, al poner en cultivo las células transfectadas con los plásmidos AF10ni, AF10i\_1 y AF10i\_2, cada uno de los cultivos se separó en dos poblaciones (excepto las transfecciones con la línea celular HEL que se separaron en tres poblaciones, para inducir la diferenciación megacariocítica y monocítica) y una población se incubó con medio completo, mientras que la otra (las otras, en el caso de las células HEL) se

incubaron con medio completo con TPA durante 18 horas. En la Figura 30 se observa que al inducir la diferenciación tanto megacariocítica como monocítica en las células HEL, se produce un descenso en el número de células apoptóticas tras inducir la diferenciación celular, mientras que en las otras líneas celulares no se observa ninguna variación. Este descenso en la línea celular HEL es significativamente menor que en los cultivos en los que no se ha inducido la diferenciación ( $P_{\text{megacariocítica}}=0.047$ ;  $P_{\text{monocítica}}=0.002$ ). Estos resultados indican que la interferencia del ARNm de la proteína AF10 y como consecuencia de ello, la disminución de los niveles de proteína, induce la muerte celular sólo en los estadios tempranos de la diferenciación hematopoyética.



**Figura 30. Viabilidad celular tras inducir la diferenciación en las células interferidas.** Representación gráfica de los valores obtenidos mediante citometría de flujo de los niveles de anexina-V en las líneas celulares HEL, K562, CMK y HL60 sin tratar (- TPA) y tratadas con TPA (+ TPA). Estas líneas celulares habían sido transfectadas con los plásmidos AF10ni, AF10i\_1 y AF10i\_2. El análisis estadístico se realizó aplicando un t-test. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .  $n \geq 3$



## **5. CULTIVOS PRIMARIOS**

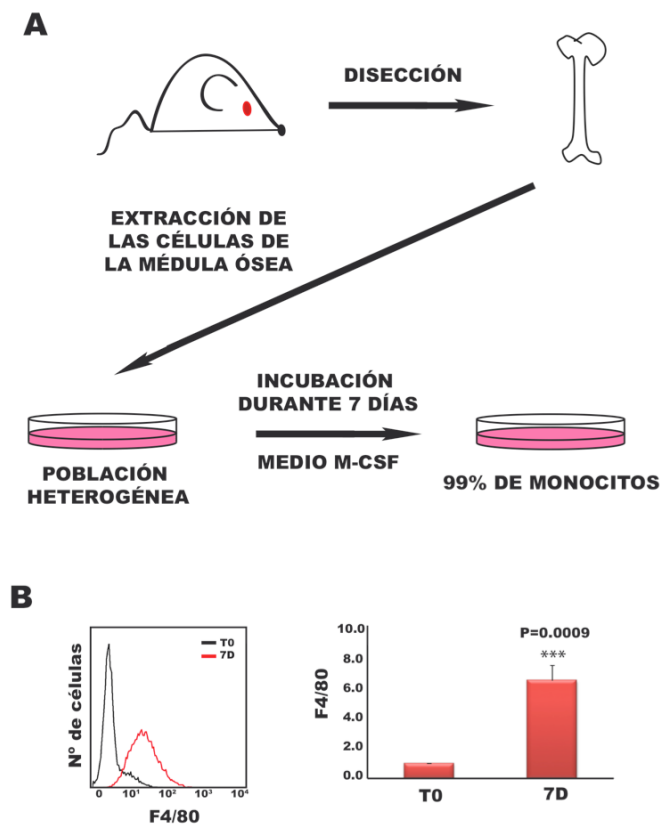
Todo lo demostrado a lo largo de los apartados anteriores está basado en los resultados obtenidos a partir de líneas celulares hematopoyéticas humanas. El proceso de establecimiento de una línea celular, implica someter a las células a una serie de tratamientos que les confieren la capacidad de dividirse y sobrevivir indefinidamente. Además proceden de individuos enfermos, que pueden no ser representativos de la situación habitual en la naturaleza. Esta característica es muy útil a la hora de poner a punto las herramientas en los estadios iniciales de un trabajo de investigación, pero presenta ciertas limitaciones, ya que las células no se comportan como lo harían en el interior de un individuo sano. Este trabajo comenzó tomando como sistema modelo líneas celulares establecidas a partir de pacientes que mostraban diferentes tipos de alteraciones sanguíneas y, si bien, los resultados con estas células son consistentes, se decidió confirmar los resultados en cultivos primarios a partir de la médula ósea de ratones sanos lo que permitiría mostrar la importancia de la proteína AF10 en el proceso de diferenciación hematopoyética en un organismo sano.

### **5.1. INDUCCIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN MONOCÍTICA DE LAS CÉLULAS EXTRAÍDAS DE LA MÉDULA ÓSEA DE RATÓN**

A partir de las células extraídas de la médula ósea de un ratón CD1 sano de entre 10 y 12 semanas de vida se pueden obtener hasta cien millones de células (Figura 31A). Esta población está formada por diferentes tipos celulares hematopoyéticos. Así, el 83% de estas células, que incluyen las células madre hematopoyéticas y los precursores mieloides monocíticos, puede diferenciar hacia monocitos al ser incubados con el medio M-CSF. El 17% restante está constituido por los precursores linfoides y los precursores mieloides eritrocíticos y megacariocíticos que están comprometidos con otros linajes celulares (Domen, 2001).

Una vez se extrajo la médula ósea del ratón, parte de las células se procesaron para el posterior análisis de los niveles de la proteína AF10 y de su ARNm constituyendo los datos a tiempo 0 (T0). Las células restantes se cultivaron durante 7 días con medio M-CSF, que induce la diferenciación monocítica. Las células se recogieron tras la incubación (7D) y se analizaron.

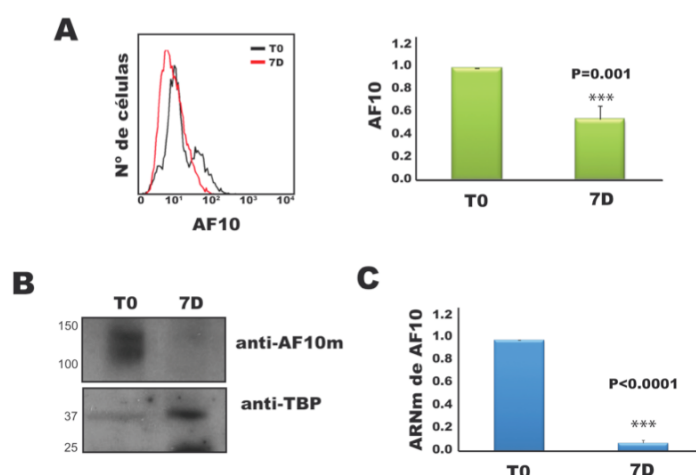
Antes de proceder al estudio de los niveles de la proteína AF10 era necesario comprobar que la diferenciación se había producido de forma adecuada. Para ello, se tomaron muestras de las células antes (T0) y después (7D) de la incubación con el medio M-CSF y se analizaron los niveles del marcador de superficie F4/80, que es el marcador característico de los monocitos. En la Figura 31B se observa que en las células incubadas con el medio M-CSF presentan siete veces más señal de la proteína F4/80 que en las células control, no incubadas con el factor inductor de la diferenciación monocítica. De estos resultados se puede concluir que la diferenciación celular se había producido correctamente.



**Figura 31. Esquema del proceso de extracción y diferenciación de las células de la médula ósea de ratón. (A)** Esquema del procedimiento seguido para la extracción e incubación de las células de la médula ósea de ratón. **(B)** A la izquierda, detección mediante citometría de flujo de los niveles del marcador de superficie F4/80 en la superficie celular antes (T0) y después (7D) de la diferenciación monocítica. A la derecha, representación gráfica de los niveles de la proteína F4/80 obtenidos por citometría de flujo. El análisis estadístico se realizó aplicando un t-test.\*\*\* P<0.001. n ≥ 3

## 5.2. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA AF10 EN CULTIVOS PRIMARIOS DE RATÓN DURANTE LA DIFERENCIACIÓN MONOCÍTICA

Tras comprobar que la diferenciación celular se había producido de forma adecuada, se procedió al estudio de los niveles de la proteína AF10 antes y después de la inducción de la diferenciación monocítica. Para ello se realizó una inmunofluorescencia en tubo y se analizó mediante citometría de flujo. Los resultados indican que se produce un descenso del 50% de los niveles de la proteína AF10 tras el tratamiento con el medio M-CSF (Figura 32A). Por otro lado, se realizó un western blot con el anticuerpo anti-AF10m en el que se observa también la bajada de los niveles de la proteína AF10 (Figura 32B), al igual que ocurre con las líneas celulares humanas. La proteína TBP se empleó como control de carga.



**Figura 32. Cuantificación de los niveles de la proteína AF10 durante la diferenciación monocítica en las células de la médula ósea de ratón.** (A) Cuantificación mediante citometría de flujo de los niveles de la AF10 antes y después de la diferenciación monocítica. (B) Inmunodetección mediante western blot de la proteína AF10 antes y después de la incubación con el medio M-CSF. La proteína TBP se empleó como control de carga. (C) Cuantificación mediante PCR cuantitativa de los niveles de ARNm de la proteína AF10 antes y después de la diferenciación celular. T0: antes de la diferenciación monocítica; 7D: después de la diferenciación monocítica. El análisis estadístico se realizó aplicando un t-test. \*\*\*  $P < 0.001$ .  $n \geq 3$

Por último, se realizó un análisis de los niveles de ARNm de la proteína AF10 antes y después del tratamiento mediante PCR cuantitativa. La sonda empleada en este caso reconoce específicamente la forma murina de la proteína AF10. La cantidad de

ARNm de dicha proteína se normalizó con la cantidad del ARNm del ARNr 18S. En la Figura 32C se observa un descenso estadísticamente significativo ( $P < 0.0001$ ) en los niveles de ARNm de la proteína AF10 asociado a la diferenciación celular, lo que indica que se produce la disminución de los niveles de expresión del gen *AF10*.

Estos resultados obtenidos a partir de células extraídas de la médula ósea de ratón apoyan lo observado previamente en líneas celulares humanas, en los que se muestra que los niveles de la proteína AF10 disminuyen a medida que va avanzando el proceso de diferenciación celular megacariocítica y monocítica. Estos datos sugieren que la proteína AF10 ejerce su función en los estadios iniciales de la diferenciación hematopoyética y que esta función está conservada entre diferentes especies.

# **DISCUSIÓN**



La hematopoyesis es el proceso por el cual se generan las diferentes células sanguíneas a partir de una única célula madre hematopoyética. Estas células se encuentran en la médula ósea y presentan una capacidad proliferativa controlada que aumenta cuando el organismo lo requiere. Cuando comienza la diferenciación celular, las células pierden su capacidad proliferativa a medida que adquieren un mayor compromiso funcional irreversible y diferente al resto de los tipos celulares (Orkin and Zon, 2008).

Las alteraciones en la regulación de la hematopoyesis producen errores en el proceso de diferenciación celular y causan diversas patologías como, entre otras, las leucemias. Se han descrito diferentes translocaciones en las que se ven implicados genes que codifican factores de transcripción que tienen como consecuencia el desarrollo de diversos tipos de leucemia (Rabbitts, 1994). La proteína AF10 es un factor de transcripción descubierto a causa de su participación en el desarrollo de leucemias cuando su gen se transloca con el gen *MLL* (Chaplin et al., 1995a). Posteriormente, se describió la translocación del gen *AF10* con el gen *CALM* que da lugar a la proteína de fusión *CALM-AF10*, también asociada al desarrollo de leucemias mieloides y linfoides (Bohlander et al., 2000). El hecho de que la proteína AF10 esté implicada en procesos leucemiogénicos al producirse la translocación de su gen y que, además, interaccione con factores que participan en la diferenciación eritrocítica y linfocítica (Forissier et al., 2007; Greif et al., 2008) sugiere la implicación de esta proteína en la diferenciación hematopoyética.

A lo largo del desarrollo de este trabajo se ha profundizado en el estudio del comportamiento de la proteína AF10 al inducir la diferenciación hematopoyética megacariocítica y monocítica. Para ello, se han empleado líneas celulares humanas y cultivos primarios de ratón. Los resultados muestran un descenso de los niveles de la proteína AF10 y de su ARNm a medida que progresa la diferenciación hematopoyética. Por otro lado, se ha estudiado el efecto de la alteración experimental de los niveles de la proteína AF10 en líneas celulares humanas, mediante su sobreexpresión y la interferencia de su ARNm. El análisis de los datos obtenidos indica que esta variación de los niveles de la proteína AF10 induce la muerte celular por apoptosis en la línea

celular HEL. Esta línea celular es la única de las empleadas en este trabajo que presenta características multipotenciales.

Las líneas celulares humanas HEL, K562, CMK y HL60 han sido establecidas a partir de pacientes con diferentes tipos de leucemia. Estas líneas celulares presentan diversos grados de compromiso con los linajes megacariocítico y monocítico, lo que ha permitido hacer un estudio de la funcionalidad del factor de transcripción AF10 a lo largo de ambas vías de diferenciación celular. Como se ha mencionado anteriormente, la línea celular HEL sería la que presenta un menor grado de diferenciación seguidas de las líneas celulares K562 y CMK, en la vía megacariocítica y de la línea celular HL60, en la vía monocítica (Figura 8).

### **1. LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA AF10 DISMINUYEN AL INDUCIR LA DIFERENCIACIÓN CELULAR**

Para llevar a cabo el estudio de los niveles de la proteína AF10 durante la diferenciación hematopoyética, se han utilizado dos tipos de técnicas: cualitativas, basadas en inmunofluorescencias y western blots, que mostraron el descenso de los niveles de proteína al inducirse la diferenciación celular (Figuras 12 y 16); y cuantitativas, para determinar si esta disminución es significativa. Los datos cuantitativos se obtuvieron mediante la inmunodetección de la proteína AF10 por citometría de flujo y de su ARNm mediante PCR cuantitativa. Estos análisis demostraron el descenso de los niveles de proteína así como los de su ARNm tras la inducción de la diferenciación celular megacariocítica y monocítica (Figuras 13, 14, 17 y 18).

Los resultados muestran que la disminución de los niveles de ARNm es mayor que la disminución de los niveles de proteína, lo que parece indicar que la caída de los niveles de la proteína AF10 se debe a una bajada de la expresión de su gen. Aunque ya se explicará el efecto de la sobreexpresión de la proteína AF10 con más detalle, cabe destacar en este punto que, al inducir la diferenciación celular en células que sobreexpresan la proteína también se produce la disminución de los niveles de la proteína exógena (Figura 23). El mantenimiento de los niveles de la proteína GFP



empleada como control indica que el promotor exógeno no se ve afectado por la inducción de la diferenciación celular. Si se produjese la caída de los niveles de expresión, no sólo se vería un descenso de la señal de la proteína de fusión GFP-AF10, sino que también se observaría la disminución de la señal de la proteína GFP en las células transfectadas con este plásmido ya que se expresan bajo el control del mismo promotor.

Estos resultados sugieren que además del descenso en la transcripción del gen *AF10*, la inducción de la diferenciación debe llevar asociada un aumento de la degradación activa de la proteína. El experimento de bloqueo del proteasoma mostró que en los extractos de las células en las que se bloqueó el proteasoma tras la inducción de la diferenciación celular no disminuyen los niveles de la proteína AF10 (Figura 25). Este resultado confirma que la proteína sufre una degradación activa a través del proteasoma. No obstante, sería interesante realizar el estudio de la vida media de la proteína para determinar si la velocidad de degradación a través del proteasoma al inducir la diferenciación celular es mayor o menor que en una situación basal.

En resumen, la proteína AF10 parece ser requerida en las fases de la diferenciación hematopoyética en las que las células mantienen características multipotenciales. Así, al inducir la diferenciación hematopoyética, se activan los mecanismos necesarios que resultan en la disminución de los niveles de la proteína AF10 tanto por un descenso de la expresión del gen, como por la degradación de la proteína.

Por otro lado, el análisis detallado de las inmunofluorescencias en placa mostró que las líneas celulares empleadas parecían presentar niveles diferentes de la proteína AF10 antes de la inducción de la diferenciación (Figuras 12A y 16A). El análisis cuantitativo mediante citometría de flujo con las células sin diferenciar confirmó la existencia de una tendencia a la disminución de los niveles de la proteína AF10 en las células más comprometidas hacia determinados linajes celulares con respecto a las menos diferenciadas (Figura 19A y 19B). Este hecho apoya el resultado obtenido a partir de la inducción de la diferenciación celular en cada una de las líneas celulares en las que se muestra el descenso de los niveles de la proteína AF10 asociado a la progresión de la diferenciación.

A diferencia de lo ocurrido con la proteína, cuando se analizaron los niveles del ARNm de la proteína AF10 en las cuatro líneas celulares en el inicio de la diferenciación, sólo se observó una disminución de los niveles de ARNm en el caso de las células HL60. En las líneas celulares K562 y CMK se observa un incremento de los niveles de ARNm con respecto a la línea celular HEL (Figura 19C). El hecho de que haya una disminución en los niveles de proteína entre las líneas celulares HEL y K562 y CMK podría sugerir la existencia de algún mecanismo regulador que impida la traducción del ARNm de la proteína AF10 en las líneas celulares K562 y CMK o bien de un aumento de la degradación de la proteína a nivel post-traducciona. Estos resultados no muestran lo esperado si se tiene en cuenta el efecto que tiene la inducción de la diferenciación celular sobre los niveles de expresión del gen *AF10*, pero se podría explicar ya que se trata de líneas celulares establecidas a partir de pacientes con distintos tipos de leucemia y que presentan características distintas entre unas y otras.

Como ya se ha mencionado, las líneas celulares presentan ciertas limitaciones en la representatividad de los análisis debido a la existencia de diferentes mutaciones que permiten su mantenimiento en cultivo. Por esta razón, se decidió completar este estudio y emplear cultivos primarios de ratón. Este salto permitió caracterizar el comportamiento de la proteína AF10 a partir de un organismo sano que mostraría el proceso de diferenciación hematopoyética como ocurre en la naturaleza. Además, la utilización de células de ratón permite estudiar la respuesta a la inducción de la diferenciación hematopoyética en otra especie, lo que también permitiría ver la conservación de la función de la proteína AF10 a lo largo de la evolución. Para llevar a cabo este estudio se extrajeron las células de la médula ósea de ratón y se indujo su diferenciación monocítica. El análisis mostró un descenso estadísticamente significativo de los niveles de la proteína AF10 y de su ARNm tras la inducción de la diferenciación (Figura 32).

Los resultados de los experimentos realizados en los cultivos primarios de ratón muestran que a medida que la diferenciación celular progresa los niveles de la proteína AF10 disminuyen. Estos datos indican que la proteína es requerida en las células hematopoyéticas que presentan un menor grado de diferenciación celular. El hecho de que estos resultados sean similares a los obtenidos en líneas celulares humanas, no sólo

refuerza la hipótesis de que la proteína AF10 ejerza su función principalmente en células multipotenciales, sino que esta función parece estar conservada entre diferentes especies.

En el futuro, sería interesante estudiar el efecto sobre los niveles de la proteína AF10 de la inducción de la diferenciación siguiendo otras vías de diferenciación hematopoyéticas para completar la caracterización de la proteína en cultivos primarios. Estos experimentos mostrarían la implicación de la proteína AF10 en el estado celular multipotencial.

## **2. LA ALTERACIÓN DE LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA AF10 INDUCE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS MULTIPOTENCIALES**

Dada la implicación de la proteína AF10 en el proceso de diferenciación hematopoyética, se procedió al estudio del efecto que produce la alteración de los niveles de la proteína en las líneas celulares HEL, K562, CMK y HL60. Para ello, se realizaron experimentos de sobreexpresión de la proteína AF10 e interferencia de su ARNm. Para los experimentos de sobreexpresión, las cuatro líneas celulares se transfectaron con un plásmido en el que está clonado el ADNc de la proteína AF10 bajo el control de un promotor constitutivo. Así, la expresión de dicho ADNc provoca un aumento de los niveles basales de la proteína AF10. Para los experimentos de silenciamiento se empleó un sistema de interferencia del ARNm de la proteína AF10.

En una primera aproximación al estudio del efecto de la sobreexpresión de la proteína AF10, se planteó obtener clones que sobreexpresasen la proteína de forma constitutiva e inducible por tetraciclina en las líneas celulares HEL y K562. Aún a pesar de haber realizado varios intentos, sólo se obtuvieron clones que sobreexpresaban la proteína AF10 en las líneas celulares K562 y K562/TetR (Tabla 4). Este hecho sugería que la sobreexpresión de la proteína podría estar induciendo la muerte sobre las líneas celulares HEL y HEL/TetR. Si bien es cierto que el sistema inducible no debería presentar este problema, puede ser que se produzca una expresión basal suficientemente alta como para que se produzca la muerte de las células aún utilizando medio completo con suero libre de tetraciclina para la incubación de las células.

Para determinar en qué grado afecta la alteración de los niveles de proteína a la viabilidad celular, se realizó un análisis de la apoptosis con anexina-V en las líneas celulares HEL, K562, CMK y HL60 tanto al sobreexpresar la proteína AF10 como al interferir su ARNm. Al analizar cada una de las transfecciones, se observó que al alterar los niveles de la proteína tanto por exceso como por defecto se produce un incremento de la muerte celular por apoptosis estadísticamente significativo en el caso de la línea celular HEL, mientras que en el resto de las líneas celulares no se observa este fenotipo (Figuras 22 y 29).

Estos resultados parecen mostrar que los niveles de la proteína AF10 en los estadios iniciales de la hematopoyesis deben ser regulados de forma precisa, ya que cualquier alteración resulta en muerte celular. Una posible explicación es que, la variación de los niveles de la proteína AF10 en las células multipotenciales, estaría alterando la función normal de la célula correspondiente a ese momento de la diferenciación celular. Esta alteración activaría el mecanismo de muerte celular por apoptosis. De este modo, si la proteína AF10 participa en la regulación del ciclo celular de forma directa o indirecta, las alteraciones en los niveles de expresión de genes que afecten al ciclo celular no tienen el mismo efecto cuando las células se encuentran en estado proliferativo o cuando han abandonado el ciclo celular debido a la diferenciación.

Puesto que al inducir la diferenciación de las células hematopoyéticas se produce una disminución de los niveles de la proteína AF10 que no afecta a su viabilidad, se realizaron experimentos de inducción de la diferenciación celular tras las transfecciones que producirían tanto la sobreexpresión de la proteína como la interferencia de su ARNm. Los resultados de estos experimentos muestran un descenso en el número de células que sufren apoptosis en la línea celular HEL con respecto a las células transfectadas en las que no se ha inducido la diferenciación celular. En el resto de las líneas celulares no se observan cambios (Figuras 24 y 30).

Una explicación a estos resultados es que, al alterarse los niveles de la proteína AF10 en células multipotenciales, se estarían produciendo variaciones en los niveles de expresión de genes importantes en el control del ciclo celular proliferativo. De ser así, estas alteraciones contribuirían a la activación de los mecanismos de inducción de la

muerte celular por apoptosis. Sin embargo, si tras la alteración de los niveles de la proteína, tanto por exceso como por defecto, se induce la diferenciación celular, las células irán abandonando el ciclo celular de manera progresiva. En esta situación, las células dejan de requerir la proteína AF10. Así, los mecanismos que participan en la disminución de los niveles de la proteína se habrían activado, lo que resolvería también el problema tanto del exceso de proteína causado por su sobreexpresión como de la ausencia de la proteína causada por la interferencia de su ARNm.

Los datos obtenidos de la alteración experimental de los niveles basales de la proteína AF10, así como los resultados de la posterior inducción de la diferenciación celular, sugieren que esta proteína contribuye al mantenimiento del estado celular multipotencial. Por otro lado, parece ser necesario el mantenimiento de sus niveles dentro de un rango determinado para que la viabilidad de la célula multipotencial no se vea comprometida. Estos resultados están apoyados por los resultados obtenidos de la inducción de la diferenciación megacariocítica y monocítica en los que se observa una disminución de los niveles de la proteína AF10 a medida que progresa la diferenciación celular.

Para confirmar que este modelo se ajusta a la realidad durante el proceso hematopoyético en los organismos vivos sería interesante la reproducción de estos experimentos en cultivos primarios. Puesto que las células obtenidas a partir de la médula ósea presentan diferentes proporciones de cada tipo celular, con diversos grados de diferenciación, es necesario hacer una purificación de la población con la que se quiere trabajar. Para ello un marcaje con anticuerpos que reconozcan marcadores de superficie específicos permitiría separar dichas poblaciones mediante citometría de flujo. A continuación, se podría analizar el efecto de la sobreexpresión de la proteína AF10 y la interferencia de su ARNm. En estos momentos se está intentando poner a punto en el laboratorio la purificación de poblaciones celulares homogéneas para la posterior transfección o infección de las células obtenidas a partir de la médula ósea de ratón para poder realizar este estudio.

### **3. LA PROTEÍNA AF10 COMO MODULADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN**

La implicación de la proteína AF10 en distintos tipos de leucemias asociadas a la translocación de su gen con al menos otros dos genes, *MLL* y *CALM*, así como la interacción con proteínas como Ikaros y FLRG, implicadas en el proceso de diferenciación hematopoyética, sugieren la participación de la proteína AF10 en la diferenciación hematopoyética (Chaplin et al., 1995a; Bohlander et al., 2000; Forissier et al., 2007; Greif et al., 2008). Hasta ahora, diversos trabajos muestran la importancia de los factores de transcripción con los que interacciona la proteína AF10 en el proceso del desarrollo de las leucemias. Así, se ha descrito la interacción de la proteína AF10 con factores de transcripción implicados de forma directa o indirecta en la activación de la expresión génica como ENL, hDOT1L, GAS41, SYT y FLRG (de Bruijn et al., 2001; Debernardi et al., 2002; Okada et al., 2005; Zeisig et al., 2005; Forissier et al., 2007), así como con proteínas que pueden tener una función activadora o represora en función de la región de la cromatina en la que ejerzan su función, como HP1 (Linder et al., 2001; Fanti and Pimpinelli, 2008). Por otro lado, Ikaros es un represor transcripcional que interacciona con la proteína AF10 y que participa en estadios iniciales de la diferenciación linfocítica (Georgopoulos et al., 1992; Greif et al., 2008) y se ha descrito que la interacción entre ambas proteínas disminuye la capacidad represora de Ikaros (Greif et al., 2008). Todos estos datos sugieren que la proteína AF10 pueda participar en el mantenimiento del estado transcripcional activado de los genes cuya expresión regula.

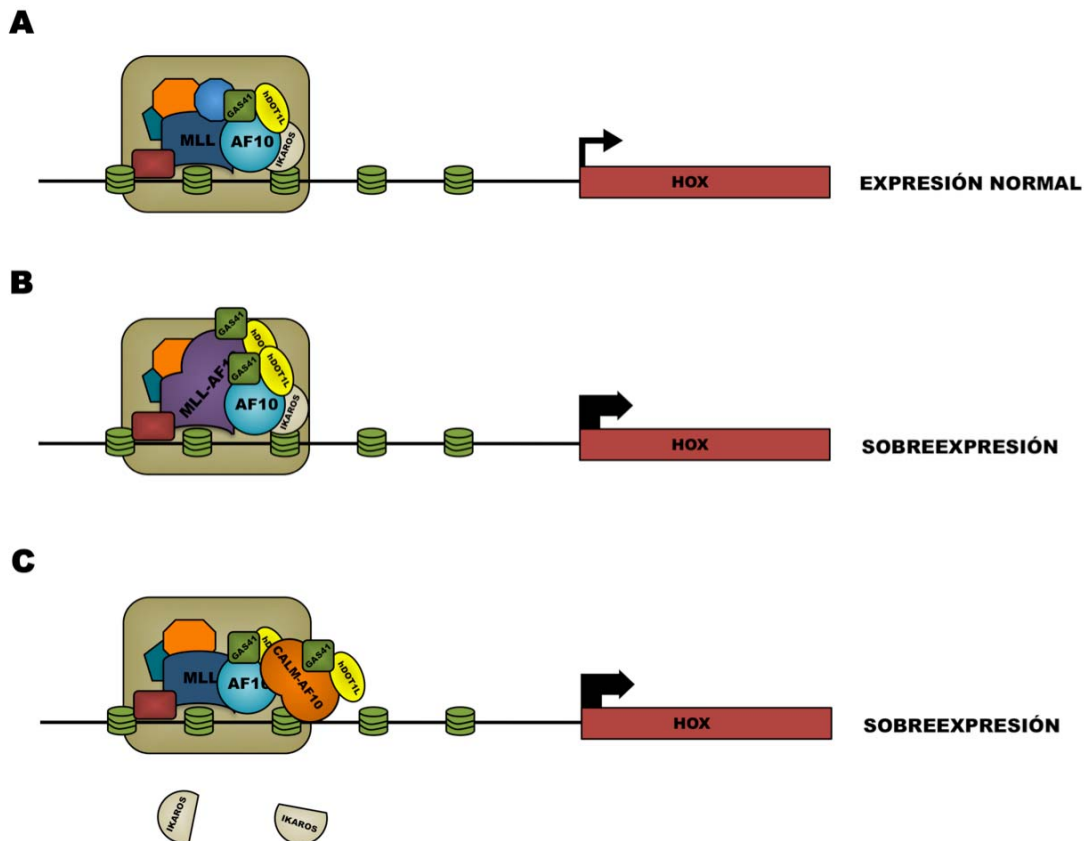
La purificación del complejo regulador de la transcripción en el que se encuentra el factor de transcripción MLL muestra la interacción de esta proteína con otros factores reguladores de la transcripción implicados en la activación de la expresión como ENL, MOF, WDR5, CREB y hDOT1L (Ernst et al., 2001; Dou et al., 2005; Okada et al., 2005; Zeisig et al., 2005; Ruthenburg et al., 2006). Teniendo en cuenta estos datos y que la proteína AF10 interacciona con los factores activadores de la transcripción ENL y hDOT1L, ha habido distintos grupos que han sugerido la posibilidad de que la proteína AF10 pueda interaccionar con la proteína MLL haciendo de puente entre ésta y los factores de transcripción ENL y hDOT1L (Slany, 2009). Esta interacción entre las proteínas MLL y AF10 aún no ha sido demostrada. Puesto que la proteína MLL es un

factor de transcripción perteneciente a las proteínas del grupo Trx que participan en la regulación de los genes *Hox*, se podría pensar que la alteración de la expresión de estos genes asociada al desarrollo de distintos tipos de leucemia viniese producida exclusivamente por la mutación que afecta a la proteína MLL. El hecho de que con la translocación que da lugar a la proteína de fusión CALM-AF10 también se produzca la alteración en la expresión de algunos de los genes *Hox*, como el gen *Hoxa5*, implicado en hematopoyesis, podría indicar la posible implicación de la proteína AF10 en la regulación de la expresión de estos genes, ya que la proteína CALM es citoplasmática y no participa en la regulación de la expresión génica (Caudell and Aplan, 2008). Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que al producirse la proteína de fusión CALM-AF10, el único dominio de interacción con el ADN lo aporta la proteína AF10 (Caudell and Aplan, 2008), luego se podría esperar que la nueva proteína de fusión fuese dirigida a las regiones reguladas por ésta.

El hecho de que (a) el perfil de expresión del gen *AF10* mostrado en esta tesis es el mismo que el de los genes *Hox* implicados en la hematopoyesis (Sauvageau et al., 1994; Pineault et al., 2002); (b) que la proteína AF10, a su vez, parece estar implicada en procesos de activación o mantenimiento del estado transcripcional activado debido a las diversas interacciones con proteínas implicadas en activación transcripcional (de Bruijn et al., 2001; Debernardi et al., 2002; Okada et al., 2005; Zeisig et al., 2005; Forissier et al., 2007); (c) que la proteína AF10 podría interactuar con la proteína MLL (Slany, 2009), que se ha descrito como un regulador de la expresión de los genes *Hox* (Yu et al., 1995; Ernst et al., 2004; Hess, 2004a); y (d) que cuando se transloca el gen *AF10* se produce la sobreexpresión de los genes *Hox* (Ayton and Cleary, 2003; Okada et al., 2005; Okada et al., 2006; Caudell and Aplan, 2008), sugiere que el factor de transcripción AF10 participa en la regulación de la expresión de, al menos, los genes *Hox*.

Si la proteína AF10 interactúa con la proteína MLL, la proteína de fusión MLL-AF10 se podría dirigir a las regiones promotoras de los genes *Hox* reguladas habitualmente por, entre otros, el factor de transcripción MLL. A estas regiones también se dirigirían las proteínas MLL y AF10 aportadas por los alelos que no han sufrido la translocación. La presencia de la proteína de fusión MLL-AF10, así como la de las

proteínas MLL y AF10 podrían contribuir al aumento en la presencia de agentes activadores de la expresión génica y, como consecuencia, el incremento de los niveles de expresión de los genes *Hox*, asociado al desarrollo de leucemia. Además, la proteína de fusión MLL-AF10 facilitaría el reclutamiento de activadores de forma directa, sin necesidad de interacciones intermedias entre las proteínas MLL y AF10 lo que también podría contribuir a la sobreexpresión de los genes *Hox* (Figura 35A y 35B).



**Figura 35. Modelo propuesto del mecanismo regulador de los genes *Hox* en condiciones normales y cuando se producen las proteínas de fusión MLL-AF10 y CALM-AF10 en el caso de que las proteínas MLL y AF10 interaccionasen entre sí. (A) Mecanismo habitual de regulación de la expresión génica. Las proteínas AF10 y MLL interaccionan y participan en la regulación de la expresión normal de los genes *Hox*. (B) Cuando se produce la proteína de fusión MLL-AF10, ésta es atraída a la región promotora de los genes *Hox*. También se reclutan las proteínas AF10 y MLL aportadas por los alelos que no han sufrido la mutación. Las interacciones de estas proteínas con otros factores activadores de la transcripción producirían la sobreexpresión de los genes afectados. (C) Cuando se produce la proteína de fusión CALM-AF10, ésta es atraída a las regiones reguladas habitualmente por AF10 junto con las proteínas AF10 y MLL aportadas por los alelos que no han sufrido la translocación cromosómica. El reclutamiento de los factores activadores produciría el aumento de los niveles de expresión de los genes que se ven afectados. La proteína Ikaros no sería reclutada al núcleo, por lo que su efecto represor desaparecería, lo que contribuiría a la sobreexpresión de los genes.**

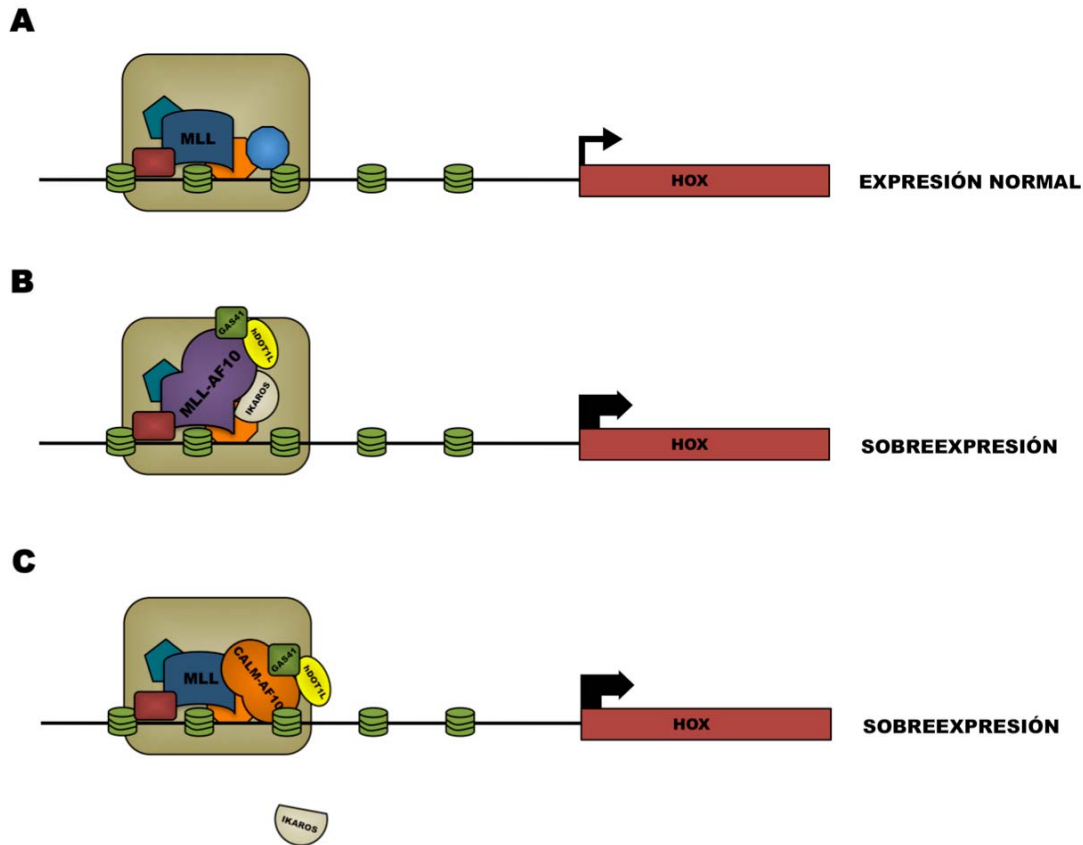


En el caso de la translocación que da lugar a la proteína de fusión CALM-AF10, si las proteínas AF10 y MLL interaccionan de forma habitual, sería reclutada a la región del ADN donde se encuentra la proteína AF10 en condiciones normales, ya que es ésta el único elemento de la proteína de fusión que presenta un dominio de interacción con el ADN. Puesto que también se mantienen los dominios OM y LZ que permiten la interacción con otras proteínas, también se produciría el reclutamiento de esos factores reguladores. Por otro lado, no sólo se uniría la proteína fusionada, sino que también sería reclutada la proteína AF10 expresada por el alelo que no ha sufrido la translocación génica. Como ya se mencionó en la Introducción de esta tesis, la proteína de fusión CALM-AF10 se puede localizar tanto en el núcleo celular como en el citoplasma. Esta última, secuestra a la proteína Ikaros en el citoplasma impidiendo la interacción entre las proteínas Ikaros y AF10 (Greif et al., 2008), por lo que se eliminaría uno de los represores que podrían participar en el mantenimiento de los niveles de expresión génica dentro de un determinado rango. Estos hechos contribuirían al incremento del número de señales activadoras de la expresión génica, lo que podría aumentar los niveles de expresión de los genes afectados (Figura 35A y 35C).

Si las proteínas AF10 y MLL no interaccionan, la proteína de fusión MLL-AF10 se uniría a la región del ADN a la que se une la proteína MLL de forma habitual y atraería los factores activadores de la transcripción con los que interacciona la proteína AF10, como GAS41, hDOT1L, SYT o HP1 (Linder et al., 1998; de Bruijn et al., 2001; Linder et al., 2001; Debernardi et al., 2002; Okada et al., 2005; Zeisig et al., 2005; Forissier et al., 2007). Este hecho provocaría el incremento de las señales activadoras de la expresión que podría tener como consecuencia el aumento de los niveles de expresión de los genes *Hox* (Figura 36A y 36B).

En el caso de la proteína de fusión CALM-AF10, si las proteínas AF10 y MLL no interaccionan de forma habitual, podría ser que los dominios de interacción con la clatrina aportados por la proteína CALM contribuyesen a la interacción de la proteína de fusión con otros factores que participan en regiones diferentes a aquéllas en las que la proteína AF10 ejerce su función. De esta forma, uno de los sitios donde podría ser reclutada la proteína de fusión CALM-AF10, entre otros, serían las regiones promotoras de los genes *Hox*. Así, atraería a los activadores que interaccionan con la proteína AF10,

lo que contribuirían al aumento de los niveles de expresión de los genes afectados (Figura 36A y 36C).



**Figura 36. Modelo propuesto del mecanismo regulador de los genes *Hox* en condiciones normales y cuando se producen las proteínas de fusión MLL-AF10 y CALM-AF10 en el caso de que las proteínas MLL y AF10 no interaccionasen entre sí. (A) Mecanismo habitual de regulación de la expresión génica de los genes *Hox* por la proteína MLL. (B) Cuando se produce la proteína de fusión MLL-AF10, se reclutan proteínas activadoras, como hDOT1L y GAS41, a la región promotora como consecuencia de la presencia de la proteína de fusión MLL-AF10. (C) Cuando se produce la proteína de fusión CALM-AF10 que se une a la región promotora de los genes *Hox*. Los dominios OM y LZ de AF10 permiten el reclutamiento de proteínas las activadoras de la transcripción hDOT1L y GAS41, lo que favorece el aumento de los niveles de los genes *Hox*.**

Para poder dar por válido alguno de estos modelos sería necesario determinar si las proteínas AF10 y MLL interaccionan entre sí lo que daría información sobre los genes en cuya regulación podría participar la proteína AF10. Por otro lado, experimentos de inmunoprecipitación de cromatina podrían mostrar las regiones promotoras a las que se une la proteína AF10, siendo los genes *Hox* los principales candidatos.

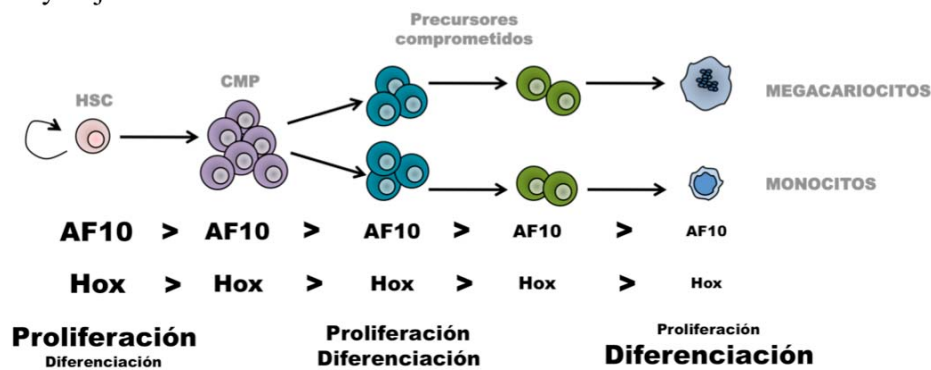
#### **4. LA PROTEÍNA AF10 COMO REGULADOR DEL CICLO CELULAR**

Independientemente de si las proteínas AF10 y MLL interaccionan entre sí y teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis, los genes que regularía la proteína AF10 presentarían unos niveles de expresión elevados en estadios tempranos de, al menos, la diferenciación hematopoyética. Así, la expresión disminuiría al progresar el proceso hematopoyético. El hecho de que la alteración de los niveles de la proteína AF10 en las células hematopoyéticas con un menor grado de diferenciación celular induce la muerte por apoptosis, sugiere que AF10 tiene alguna implicación en la regulación de la expresión de genes que participan en el control del ciclo celular. De este modo, el aumento o la disminución de la expresión de dichos genes en estadios tempranos de la hematopoyesis, produciría la alteración del ciclo y por tanto, la inducción de la muerte celular por apoptosis. Sin embargo, este efecto no se produce en las células que presentan un mayor grado de diferenciación celular que presentan capacidad proliferativa menor.

Diversos trabajos han mostrado la implicación de algunos de los factores de transcripción pertenecientes a la familia de los genes *Hox* en la regulación del ciclo celular durante la hematopoyesis (Svingen and Tonissen, 2006). Así, el factor de transcripción HoxA5 se ha identificado como un activador del gen supresor de tumores *p53* (Raman et al., 2000) y como activador o represor del gen *p21*, un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina (Bromleigh and Freedman, 2000). *p21*, a su vez, también es activado por el factor de transcripción HoxA10 en células monocíticas (Bromleigh and Freedman, 2000). Por otro lado, el factor de transcripción HoxB4 participa en la entrada en el ciclo celular proliferativo de las células madre hematopoyéticas cuando éstas se encuentran en el nicho de la médula ósea (Sauvageau et al., 1995). Estos datos sugieren que la alteración de los niveles de expresión de los genes *Hox* puede alterar el ciclo celular.

Con el trabajo presentado en esta tesis se propone un modelo que se representa la Figura 37. Este modelo explicaría lo que ocurre en las células multipotenciales al alterar los niveles de la proteína AF10 en el caso de que ésta regulase la expresión de los genes *Hox*. Así, en las células madre hematopoyéticas, los niveles de la proteína

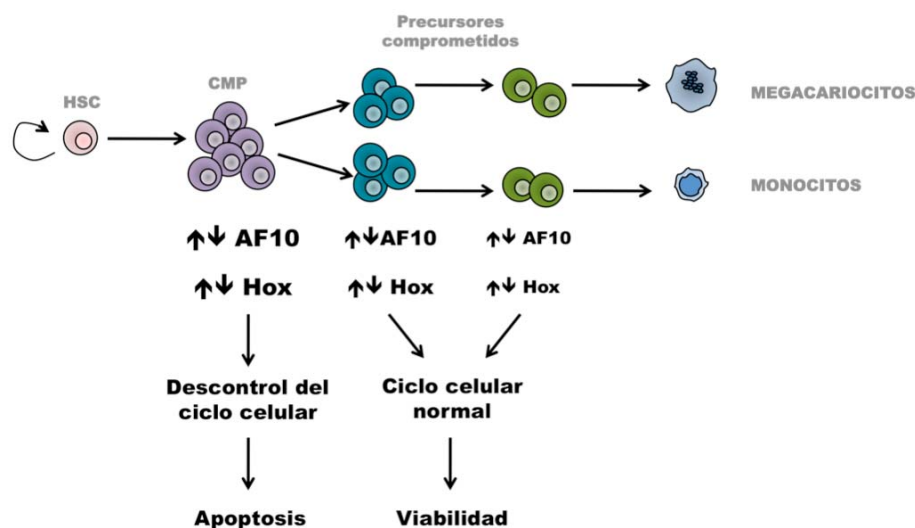
AF10 serían elevados, y se produciría la activación de los genes *Hox* implicados en el mantenimiento de estas células madre con la ayuda de otros factores reguladores. Si la proteína AF10 regula la expresión de los genes *Hox*, esta regulación también afectaría a los genes implicados en el ciclo celular regulados por los factores de transcripción pertenecientes a la familia de los factores de transcripción *Hox*. A medida que la hematopoyesis avanzase las células adquirirían un mayor compromiso celular y una menor capacidad proliferativa. Puesto que los niveles de expresión del gen *AF10* comenzarían a disminuir, también lo harían a los niveles de expresión de los genes *Hox*. Cuando las células llegasen al estado celular totalmente diferenciado, el ciclo celular se detendría y los niveles de expresión del gen *AF10* y del conjunto de los genes *Hox* serían muy bajos.



**Figura 37. Modelo propuesto de la regulación de la proliferación celular.** Las células madre hematopoyéticas (HSCs) con alta capacidad protliferativa presentan altos niveles de expresión del gen *AF10* y de los genes *Hox*. A mediad que avanza la hematopoyesis, los niveles de expresión del gen *AF10* y de los genes *Hox* disminuyen y por tanto, disminuyen los niveles de las proteínas correspondientes. Esta variación en los niveles de estas proteínas van acompañadas del aumento del grado de diferenciación celular y de la pérdida de la capacidad de proliferación. El tamaño de letra indica el nivel de expresión de los genes, la capacidad proliferativa y el grado de diferenciación celular. HSC: células madre hematopoyéticas; CMP: precursores mieloides comunes.

Si los niveles de la proteína AF10 se ven alterados durante los estadios iniciales del proceso de diferenciación celular, la regulación de la expresión de los genes *Hox* también se vería alterada y como consecuencia los genes regulados por los diferentes factores de transcripción de la familia *Hox* estarían afectados. Puesto que algunos de estos últimos genes participan en la regulación del ciclo celular, su alteración conllevaría a la activación de los mecanismos de inducción de la muerte celular por apoptosis. Este hecho no se observaría en las células que presentan un mayor grado de

diferenciación celular ya que a medida que avanza el proceso hematopoyético se produce una parada del ciclo celular (Figura 38).



**Figura 38. Modelo propuesto del proceso que tendría lugar al alterar los niveles de la proteína AF10 durante la diferenciación hematopoyética.** La inducción del aumento (↑) o disminución (↓) de los niveles de la proteína AF10 conllevaría la alteración de los niveles de expresión de los genes *Hox*. En el caso de las células multipotenciales mieloides (CMP) esta alteración afectaría al proceso proliferativo por lo que se induciría la muerte celular por apoptosis. Este efecto no se produciría en el caso de los precursores más comprometidos. HSC: células madre hematopoyéticas; CMP: precursores mieloides comunes

Las sobreexpresión de algunos de los genes *Hox* como consecuencia de la aparición de las proteínas de fusión MLL-AF10 y CALM-AF10, sin embargo, no sólo induce la muerte de las células, sino que aumenta su capacidad proliferativa (Chaplin et al., 1995a; Bohlander et al., 2000). Este hecho podría explicarse porque estas proteínas de fusión presentarían una nueva función que no sólo afecte a la regulación de estos genes *Hox*, sino que además se verían alterados otros factores fundamentales que en condiciones normales contribuirían a la inducción de la apoptosis y que en presencia de estas proteínas sean reprimidos favoreciendo la proliferación celular descontrolada.

Si bien es cierto que aún queda mucho trabajo por hacer para determinar los genes que son regulados por el factor de transcripción AF10, así como el mecanismo por el cual se produce el desarrollo de diferentes tipos de leucemias cuando su gen se transloca, el trabajo desarrollado en esta tesis sugiere la implicación funcional de la proteína AF10 en el mantenimiento del estado celular desdiferenciado.



# **CONCLUSIONES**





1. En líneas celulares hematopoyéticas humanas, los niveles de la proteína AF10 disminuyen cuanto mayor es el grado de diferenciación de la célula.

2. En cultivos primarios obtenidos a partir de la médula ósea ratón, los niveles de la proteína AF10 disminuyen cuanto mayor es el grado de diferenciación hematopoyética monocítica.

3. Al inducirse la diferenciación hematopoyética tanto megacariocítica como monocítica, los niveles de expresión del gen *AF10* disminuyen y la proteína es degradada a través del proteasoma, lo que contribuye al descenso de los niveles de proteína en el interior de las células a medida que va avanzando el proceso de diferenciación celular.

4. La sobreexpresión de la proteína AF10 en líneas celulares humanas que presentan características multipotenciales induce la muerte celular por apoptosis; mientras que en líneas celulares más comprometidas hacia determinados linajes hematopoyéticos no se observa este efecto.

5. La inducción de la diferenciación celular en líneas celulares multipotenciales tras la sobreexpresión de proteína AF10, disminuye la muerte celular por apoptosis con respecto a las células que presentan la sobreexpresión de la proteína AF10 y no se les induce la diferenciación celular.

6. La interferencia del ARNm de la proteína AF10 induce la muerte celular por apoptosis en líneas celulares multipotenciales, mientras que en las líneas celulares que presentan un mayor grado de diferenciación celular no se observa este fenotipo.

7. La inducción de la diferenciación hematopoyética en las líneas celulares que sufren la interferencia del ARNm de la proteína AF10 produce una disminución de los niveles de muerte celular por apoptosis, mientras que en las líneas celulares que presenta un mayor grado de diferenciación celular no se observa este ningún cambio con respecto a las células que no han sido sometidas a la diferenciación celular.



# **BIBLIOGRAFÍA**



- AGRAWAL, N., DASARADHI, P. V., MOHMMED, A., MALHOTRA, P., BHATNAGAR, R. K. & MUKHERJEE, S. K. (2003) RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, 657-85.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, New York, Garland Science.
- ARAI, F. & SUDA, T. (2007) Regulation of hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Adv Exp Med Biol*, 602, 61-7.
- ARGIROPOULOS, B. & HUMPHRIES, R. K. (2007) Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene*, 26, 6766-76.
- AUSTYN, J. M. & GORDON, S. (1981) F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol*, 11, 805-15.
- AYTON, P. M., CHEN, E. H. & CLEARY, M. L. (2004) Binding to nonmethylated CpG DNA is essential for target recognition, transactivation, and myeloid transformation by an MLL oncoprotein. *Mol Cell Biol*, 24, 10470-8.
- AYTON, P. M. & CLEARY, M. L. (2001) Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene*, 20, 5695-707.
- AYTON, P. M. & CLEARY, M. L. (2003) Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes Dev*, 17, 2298-307.
- BAROLO, S., CARVER, L. A. & POSAKONY, J. W. (2000) GFP and beta-galactosidase transformation vectors for promoter/enhancer analysis in *Drosophila*. *Biotechniques*, 29, 726, 728, 730, 732.
- BITOUN, E., OLIVER, P. L. & DAVIES, K. E. (2007) The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling. *Hum Mol Genet*, 16, 92-106.
- BLOW, J. J. & DUTTA, A. (2005) Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 476-86.
- BOHLANDER, S. K., MUSCHINSKY, V., SCHRADER, K., SIEBERT, R., SCHLEGELBERGER, B., HARDER, L., SCHEMMEL, V., FONATSCH, C., LUDWIG, W. D., HIDDEMANN, W. & DREYLING, M. H. (2000) Molecular analysis of the CALM/AF10 fusion: identical rearrangements in acute myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma patients. *Leukemia*, 14, 93-9.
- BOLTZ-NITULESCU, G., WILTSCHKE, C., HOLZINGER, C., FELLINGER, A., SCHEINER, O., GESSL, A. & FORSTER, O. (1987) Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant. *J Leukoc Biol*, 41, 83-91.

- BROMLEIGH, V. C. & FREEDMAN, L. P. (2000) p21 is a transcriptional target of HOXA10 in differentiating myelomonocytic cells. *Genes Dev*, 14, 2581-6.
- CAIRNS, B. R. (2001) Emerging roles for chromatin remodeling in cancer biology. *Trends Cell Biol*, 11, S15-21.
- CAUDELL, D. & APLAN, P. D. (2008) The role of CALM-AF10 gene fusion in acute leukemia. *Leukemia*, 22, 678-85.
- CHAPLIN, T., AYTON, P., BERNARD, O. A., SAHA, V., DELLA VALLE, V., HILLION, J., GREGORINI, A., LILLINGTON, D., BERGER, R. & YOUNG, B. D. (1995a) A novel class of zinc finger/leucine zipper genes identified from the molecular cloning of the t(10;11) translocation in acute leukemia. *Blood*, 85, 1435-41.
- CHAPLIN, T., BERNARD, O., BEVERLOO, H. B., SAHA, V., HAGEMEIJER, A., BERGER, R. & YOUNG, B. D. (1995b) The t(10;11) translocation in acute myeloid leukemia (M5) consistently fuses the leucine zipper motif of AF10 onto the HRX gene. *Blood*, 86, 2073-6.
- CHEN, J., SANTILLAN, D. A., KOONCE, M., WEI, W., LUO, R., THIRMAN, M. J., ZELEZNIK-LE, N. J. & DIAZ, M. O. (2008) Loss of MLL PHD finger 3 is necessary for MLL-ENL-induced hematopoietic stem cell immortalization. *Cancer Res*, 68, 6199-207.
- COLLINS, S. J. (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood*, 70, 1233-44.
- CORRAL, J., LAVENIR, I., IMPEY, H., WARREN, A. J., FORSTER, A., LARSON, T. A., BELL, S., MCKENZIE, A. N., KING, G. & RABBITS, T. H. (1996) An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell*, 85, 853-61.
- DASER, A. & RABBITS, T. H. (2004) Extending the repertoire of the mixed-lineage leukemia gene MLL in leukemogenesis. *Genes Dev*, 18, 965-74.
- DAVIDSON, E. H., RAST, J. P., OLIVERI, P., RANSICK, A., CALESTANI, C., YUH, C. H., MINOKAWA, T., AMORE, G., HINMAN, V., ARENAS-MENA, C., OTIM, O., BROWN, C. T., LIVI, C. B., LEE, P. Y., REVILLA, R., RUST, A. G., PAN, Z., SCHILSTRA, M. J., CLARKE, P. J., ARNONE, M. I., ROWEN, L., CAMERON, R. A., MCCLAY, D. R., HOOD, L. & BOLOURI, H. (2002) A genomic regulatory network for development. *Science*, 295, 1669-78.
- DE BRAEKELEER, M., MOREL, F., LE BRIS, M. J., HERRY, A. & DOUET-GUILBERT, N. (2005) The MLL gene and translocations involving chromosomal band 11q23 in acute leukemia. *Anticancer Res*, 25, 1931-44.

- DE BRUIJN, D. R., DOS SANTOS, N. R., THIJSEN, J., BALEMANS, M., DEBERNARDI, S., LINDER, B., YOUNG, B. D. & GEURTS VAN KESSEL, A. (2001) The synovial sarcoma associated protein SYT interacts with the acute leukemia associated protein AF10. *Oncogene*, 20, 3281-9.
- DEBERNARDI, S., BASSINI, A., JONES, L. K., CHAPLIN, T., LINDER, B., DE BRUIJN, D. R., MEESE, E. & YOUNG, B. D. (2002) The MLL fusion partner AF10 binds GAS41, a protein that interacts with the human SWI/SNF complex. *Blood*, 99, 275-81.
- DIMARTINO, J. F., AYTON, P. M., CHEN, E. H., NAFTZGER, C. C., YOUNG, B. D. & CLEARY, M. L. (2002) The AF10 leucine zipper is required for leukemic transformation of myeloid progenitors by MLL-AF10. *Blood*, 99, 3780-5.
- DOMEN, J. (2001) The role of apoptosis in regulating hematopoietic stem cell numbers. *Apoptosis*, 6, 239-52.
- DOU, Y., MILNE, T. A., TACKETT, A. J., SMITH, E. R., FUKUDA, A., WYSOCKA, J., ALLIS, C. D., CHAIT, B. T., HESS, J. L. & ROEDER, R. G. (2005) Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell*, 121, 873-85.
- DREYLING, M. H., MARTINEZ-CLIMENT, J. A., ZHENG, M., MAO, J., ROWLEY, J. D. & BOHLANDER, S. K. (1996) The t(10;11)(p13;q14) in the U937 cell line results in the fusion of the AF10 gene and CALM, encoding a new member of the AP-3 clathrin assembly protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 4804-9.
- ERNST, P., FISHER, J. K., AVERY, W., WADE, S., FOY, D. & KORSMEYER, S. J. (2004) Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. *Dev Cell*, 6, 437-43.
- ERNST, P., WANG, J., HUANG, M., GOODMAN, R. H. & KORSMEYER, S. J. (2001) MLL and CREB bind cooperatively to the nuclear coactivator CREB-binding protein. *Mol Cell Biol*, 21, 2249-58.
- FANTI, L. & PIMPINELLI, S. (2008) HP1: a functionally multifaceted protein. *Curr Opin Genet Dev*, 18, 169-74.
- FENG, Q., WANG, H., NG, H. H., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., STRUHL, K. & ZHANG, Y. (2002) Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol*, 12, 1052-8.
- FORISSIER, S., RAZANAJAONA, D., AY, A. S., MARTEL, S., BARTHOLIN, L. & RIMOKH, R. (2007) AF10-dependent transcription is enhanced by its interaction with FLRG. *Biol Cell*, 99, 563-71.
- FREIMAN, R. N., ALBRIGHT, S. R., ZHENG, S., SHA, W. C., HAMMER, R. E. & TJIAN, R. (2001) Requirement of tissue-selective TBP-associated factor TAFII105 in ovarian development. *Science*, 293, 2084-7.

- GALLAGHER, R., COLLINS, S., TRUJILLO, J., MCCREDIE, K., AHEARN, M., TSAI, S., METZGAR, R., AULAKH, G., TING, R., RUSCETTI, F. & GALLO, R. (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 54, 713-33.
- GARTNER, L. & HIATT, J. (2007) *Color text book of Histology*, Philadelphia, Saunders Elsevier.
- GARVIE, C. W. & WOLBERGER, C. (2001) Recognition of specific DNA sequences. *Mol Cell*, 8, 937-46.
- GEORGOPOULOS, K., MOORE, D. D. & DERFLER, B. (1992) Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science*, 258, 808-12.
- GREGORY, G. D., VAKOC, C. R., ROZOVSKAIA, T., ZHENG, X., PATEL, S., NAKAMURA, T., CANAANI, E. & BLOBEL, G. A. (2007) Mammalian ASH1L is a histone methyltransferase that occupies the transcribed region of active genes. *Mol Cell Biol*, 27, 8466-79.
- GREIF, P. A., TIZAZU, B., KRAUSE, A., KREMMER, E. & BOHLANDER, S. K. (2008) The leukemogenic CALM/AF10 fusion protein alters the subcellular localization of the lymphoid regulator Ikaros. *Oncogene*, 27, 2886-96.
- GRIER, D. G., THOMPSON, A., KWASNIEWSKA, A., MCGONIGLE, G. J., HALLIDAY, H. L. & LAPPIN, T. R. (2005) The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol*, 205, 154-71.
- HARLOW & LANE (1988) *Antibodies. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.
- HESS, J. L. (2004a) Mechanisms of transformation by MLL. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 14, 235-54.
- HESS, J. L. (2004b) MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med*, 10, 500-7.
- JENUWEIN, T. & ALLIS, C. D. (2001) Translating the histone code. *Science*, 293, 1074-80.
- KIRSCH-VOLDERS, M., VANHAUWAERT, A., DE BOECK, M. & DECORDER, I. (2002) Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutat Res*, 504, 137-48.
- KOOPMAN, G., REUTELINGSPERGER, C. P., KUIJTEN, G. A., KEEHNEN, R. M., PALS, S. T. & VAN OERS, M. H. (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84, 1415-20.
- KRUMLAUF, R. (1994) Hox genes in vertebrate development. *Cell*, 78, 191-201.



- LAWRENCE, H. J., SAUVAGEAU, G., HUMPHRIES, R. K. & LARGMAN, C. (1996) The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells*, 14, 281-91.
- LEE, D. H. & GOLDBERG, A. L. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol*, 8, 397-403.
- LESSARD, J. & SAUVAGEAU, G. (2003) Polycomb group genes as epigenetic regulators of normal and leukemic hemopoiesis. *Exp Hematol*, 31, 567-85.
- LINDER, B., GERLACH, N. & JACKLE, H. (2001) The Drosophila homolog of the human AF10 is an HP1-interacting suppressor of position effect variegation. *EMBO Rep*, 2, 211-6.
- LINDER, B., JONES, L. K., CHAPLIN, T., MOHD-SARIP, A., HEINLEIN, U. A., YOUNG, B. D. & SAHA, V. (1998) Expression pattern and cellular distribution of the murine homologue of AF10. *Biochim Biophys Acta*, 1443, 285-96.
- LONG, M. W., HEFFNER, C. H., WILLIAMS, J. L., PETERS, C. & PROCHOWNIK, E. V. (1990) Regulation of megakaryocyte phenotype in human erythroleukemia cells. *J Clin Invest*, 85, 1072-84.
- LOZZIO, C. B. & LOZZIO, B. B. (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45, 321-34.
- MAGUER-SATTA, V. & RIMOKH, R. (2004) FLRG, member of the follistatin family, a new player in hematopoiesis. *Mol Cell Endocrinol*, 225, 109-18.
- MARTIN, D. G., BAETZ, K., SHI, X., WALTER, K. L., MACDONALD, V. E., WLODARSKI, M. J., GOZANI, O., HIETER, P. & HOWE, L. (2006) The Yng1p plant homeodomain finger is a methyl-histone binding module that recognizes lysine 4-methylated histone H3. *Mol Cell Biol*, 26, 7871-9.
- MELLOR, J. (2006) It takes a PHD to read the histone code. *Cell*, 126, 22-4.
- MEYER, C., KOWARZ, E., HOFMANN, J., RENNEVILLE, A., ZUNA, J., TRKA, J., BEN ABDELALI, R., MACINTYRE, E., DE BRAEKELEER, E., DE BRAEKELEER, M., DELABESSE, E., DE OLIVEIRA, M. P., CAVE, H., CLAPPIER, E., VAN DONGEN, J. J., BALGOBIND, B. V., VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M., BEVERLOO, H. B., PANZER-GRUMAYER, R., TEIGLER-SCHLEGEL, A., HARBOTT, J., KJELDSSEN, E., SCHNITTGER, S., KOEHL, U., GRUHN, B., HEIDENREICH, O., CHAN, L. C., YIP, S. F., KRZYWINSKI, M., ECKERT, C., MORICKE, A., SCHRAPPE, M., ALONSO, C. N., SCHAFFER, B. W., KRAUTER, J., LEE, D. A., ZUR STADT, U., TE KRONNIE, G., SUTTON, R., IZRAELI, S., TRAKHTENBROT, L., LO NIGRO, L., TSAUR, G., FECHINA, L., SZCZEPANSKI, T., STREHL, S., ILENCIKOVA, D., MOLKENTIN, M., BURMEISTER, T., DINGERMANN, T., KLINGEBIEL, T. & MARSCHALEK, R. (2009) New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*, 23, 1490-9.

- MEYER, C., SCHNEIDER, B., JAKOB, S., STREHL, S., ATTARBASCHI, A., SCHNITTGER, S., SCHOCH, C., JANSEN, M. W., VAN DONGEN, J. J., DEN BOER, M. L., PIETERS, R., ENNAS, M. G., ANGELUCCI, E., KOEHL, U., GREIL, J., GRIESINGER, F., ZUR STADT, U., ECKERT, C., SZCZEPANSKI, T., NIGGLI, F. K., SCHAFER, B. W., KEMPSKI, H., BRADY, H. J., ZUNA, J., TRKA, J., NIGRO, L. L., BIONDI, A., DELABESSE, E., MACINTYRE, E., STANULLA, M., SCHRAPPE, M., HAAS, O. A., BURMEISTER, T., DINGERMAN, T., KLINGEBIEL, T. & MARSCHALEK, R. (2006) The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*, 20, 777-84.
- MILNE, T. A., BRIGGS, S. D., BROCK, H. W., MARTIN, M. E., GIBBS, D., ALLIS, C. D. & HESS, J. L. (2002) MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell*, 10, 1107-17.
- MILNE, T. A., MARTIN, M. E., BROCK, H. W., SLANY, R. K. & HESS, J. L. (2005) Leukemogenic MLL fusion proteins bind across a broad region of the Hox a9 locus, promoting transcription and multiple histone modifications. *Cancer Res*, 65, 11367-74.
- MUNTEAN, A. G., GIANNOLA, D., UDAGER, A. M. & HESS, J. L. (2008) The PHD fingers of MLL block MLL fusion protein-mediated transformation. *Blood*, 112, 4690-3.
- NISHITANI, H. & LYGEROU, Z. (2002) Control of DNA replication licensing in a cell cycle. *Genes Cells*, 7, 523-34.
- OGURO, H. & IWAMA, A. (2007) Life and death in hematopoietic stem cells. *Curr Opin Immunol*, 19, 503-9.
- OHLSTEIN, B., KAI, T., DECOTTO, E. & SPRADLING, A. (2004) The stem cell niche: theme and variations. *Curr Opin Cell Biol*, 16, 693-9.
- OKADA, Y., FENG, Q., LIN, Y., JIANG, Q., LI, Y., COFFIELD, V. M., SU, L., XU, G. & ZHANG, Y. (2005) hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell*, 121, 167-78.
- OKADA, Y., JIANG, Q., LEMIEUX, M., JEANNOTTE, L., SU, L. & ZHANG, Y. (2006) Leukaemic transformation by CALM-AF10 involves upregulation of Hoxa5 by hDOT1L. *Nat Cell Biol*, 8, 1017-24.
- ORKIN, S. H. (2000) Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet*, 1, 57-64.
- ORKIN, S. H. & ZON, L. I. (2008) Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 132, 631-44.
- OWENS, B. M. & HAWLEY, R. G. (2002) HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells*, 20, 364-79.

- PAPAYANNOPOULOU, T., NAKAMOTO, B., YOKOCHI, T., CHAIT, A. & KANNAGI, R. (1983) Human erythroleukemia cell line (HEL) undergoes a drastic macrophage-like shift with TPA. *Blood*, 62, 832-45.
- PERRIN, L., BLOYER, S., FERRAZ, C., AGRAWAL, N., SINHA, P. & DURA, J. M. (2003) The leucine zipper motif of the Drosophila AF10 homologue can inhibit PRE-mediated repression: implications for leukemogenic activity of human MLL-AF10 fusions. *Mol Cell Biol*, 23, 119-30.
- PHILLIPS, D. R., CHARO, I. F., PARISE, L. V. & FITZGERALD, L. A. (1988) The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood*, 71, 831-43.
- PINEAULT, N., HELGASON, C. D., LAWRENCE, H. J. & HUMPHRIES, R. K. (2002) Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Exp Hematol*, 30, 49-57.
- RABBITTS, T. H. (1994) Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*, 372, 143-9.
- RAMAN, V., MARTENSEN, S. A., REISMAN, D., EVRON, E., ODENWALD, W. F., JAFFEE, E., MARKS, J. & SUKUMAR, S. (2000) Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature*, 405, 974-8.
- RINGROSE, L. (2007) Polycomb comes of age: genome-wide profiling of target sites. *Curr Opin Cell Biol*, 19, 290-7.
- RUTHENBURG, A. J., WANG, W., GRAYBOSCH, D. M., LI, H., ALLIS, C. D., PATEL, D. J. & VERDINE, G. L. (2006) Histone H3 recognition and presentation by the WDR5 module of the MLL1 complex. *Nat Struct Mol Biol*, 13, 704-12.
- SAMBROOK & RUSSELL (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual*, Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- SATO, T., FUSE, A., EGUCHI, M., HAYASHI, Y., RYO, R., ADACHI, M., KISHIMOTO, Y., TERAMURA, M., MIZOGUCHI, H., SHIMA, Y. & ET AL. (1989) Establishment of a human leukaemic cell line (CMK) with megakaryocytic characteristics from a Down's syndrome patient with acute megakaryoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 72, 184-90.
- SAUVAGEAU, G., LANSDORP, P. M., EAVES, C. J., HOGGE, D. E., DRAGOWSKA, W. H., REID, D. S., LARGMAN, C., LAWRENCE, H. J. & HUMPHRIES, R. K. (1994) Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 12223-7.
- SAUVAGEAU, G., THORSTEINSDOTTIR, U., EAVES, C. J., LAWRENCE, H. J., LARGMAN, C., LANSDORP, P. M. & HUMPHRIES, R. K. (1995) Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev*, 9, 1753-65.

- SCHUETTENGRUBER, B., CHOURROUT, D., VERVOORT, M., LEBLANC, B. & CAVALLI, G. (2007) Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*, 128, 735-45.
- SINGER, M. S., KAHANA, A., WOLF, A. J., MEISINGER, L. L., PETERSON, S. E., GOGGIN, C., MAHOWALD, M. & GOTTSCHLING, D. E. (1998) Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 150, 613-32.
- SLANY, R. K. (2009) The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica*, 94, 984-93.
- SLANY, R. K., LAVAU, C. & CLEARY, M. L. (1998) The oncogenic capacity of HRX-ENL requires the transcriptional transactivation activity of ENL and the DNA binding motifs of HRX. *Mol Cell Biol*, 18, 122-9.
- STUART, R. K. & HAMILTON, J. A. (1980) Tumor-promoting phorbol esters stimulate hematopoietic colony formation in vitro. *Science*, 208, 402-4.
- SUDA, T., ARAI, F. & HIRAO, A. (2005) Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol*, 26, 426-33.
- SVINGEN, T. & TONISSEN, K. F. (2006) Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Heredity*, 97, 88-96.
- TEBAR, F., BOHLANDER, S. K. & SORKIN, A. (1999) Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Mol Biol Cell*, 10, 2687-702.
- VERMEULEN, K., BERNEMAN, Z. N. & VAN BOCKSTAELE, D. R. (2003a) Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif*, 36, 165-75.
- VERMEULEN, K., VAN BOCKSTAELE, D. R. & BERNEMAN, Z. N. (2003b) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 36, 131-49.
- WASSARMAN, D. A. & SAUER, F. (2001) TAF(II)250: a transcription toolbox. *J Cell Sci*, 114, 2895-902.
- WYSOCKA, J., SWIGUT, T., XIAO, H., MILNE, T. A., KWON, S. Y., LANDRY, J., KAUER, M., TACKETT, A. J., CHAIT, B. T., BADENHORST, P., WU, C. & ALLIS, C. D. (2006) A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*, 442, 86-90.
- YU, B. D., HESS, J. L., HORNING, S. E., BROWN, G. A. & KORSMEYER, S. J. (1995) Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature*, 378, 505-8.

- ZEISIG, D. T., BITTNER, C. B., ZEISIG, B. B., GARCIA-CUELLAR, M. P., HESS, J. L. & SLANY, R. K. (2005) The eleven-nineteen-leukemia protein ENL connects nuclear MLL fusion partners with chromatin. *Oncogene*, 24, 5525-32.
- ZELEZNIK-LE, N. J., HARDEN, A. M. & ROWLEY, J. D. (1994) 11q23 translocations split the "AT-hook" cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 10610-4.
- ZHANG, J., NIU, C., YE, L., HUANG, H., HE, X., TONG, W. G., ROSS, J., HAUG, J., JOHNSON, T., FENG, J. Q., HARRIS, S., WIEDEMANN, L. M., MISHINA, Y. & LI, L. (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425, 836-41.

