

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica

Estudio *ex vivo* del papel de GATA-1 en el destino celular de progenitores eritro-megacariocíticos.

Bárbara Fernández Morales

Madrid, 2010



Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

Estudio *ex vivo* del papel de GATA-1 en el destino  
celular de progenitores eritro-megacariocíticos

Bárbara Fernández Morales  
Licenciada en Bioquímica

Director de Tesis: Dra. Carmela Calés Bourdet

Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid “Alberto Sols”  
CSIC-UAM

Esta Tesis ha sido financiada con una beca FPI,  
del Ministerio de Educación y Ciencia





MINISTERIO  
DE CIENCIA E  
INNOVACIÓN



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
"ALBERTO SOLS"

Carmela Calés, PhD  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Arturo Duperier, 4.  
E-28029 Madrid, SPAIN  
Tel: 34 91 585 4469  
Fax: 34 91 585 4401  
Email: ccales@iib.uam.es

CARMELA CALÉS BOURDET, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

certifico que:

BÁRBARA FERNÁNDEZ MORALES, licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid ha realizado, bajo mi dirección, el trabajo de investigación titulado:

**Estudio *ex vivo* del papel de GATA-1 en el destino celular de progenitores eritromegacariocíticos**

Considero, además, que el mencionado trabajo reúne la originalidad y calidad científica requeridas para poder ser presentado para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a todos los efectos, firmo el presente certificado,

En Madrid, a 30 de octubre de 2010.

Fdo: Carmela Calés

C/Arturo Duperier, nº 4  
28029 MADRID  
ESPAÑA  
TEL: 91 585 4400  
FAX: 91 585 4401



*A mis padres y mi hermana,  
por estar SIEMPRE a mi lado.*





## *Agradecimientos*

---



Ya casi ni me acuerdo del día que entré por la puerta del laboratorio con ganas de enfrentarme a una nueva etapa y sin embargo me parece mentira que todo haya pasado tan deprisa. Echando la vista atrás me doy cuenta de que han sido muchas las personas que han contribuido al desarrollo de esta tesis, sin cuya ayuda, seguramente esto no hubiera sido posible.

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Carmela Cales, directora de esta tesis, su confianza y cariño a lo largo de todos estos años. Gracias por darme la oportunidad de disfrutar de esta etapa y por tu amistad en lo buenos y malos momentos. Por valorarme SIEMPRE, por tu cercanía y por tu cariño. Gracias por todas las charlas compartidas, las de trabajo y las de nuestras vidas, por tus consejos y por todo lo que me has enseñado durante todos estos años (y parece que fue ayer cuando llegué...). Nunca podré olvidar los momentos, de risas y también de lágrimas que hemos compartido en el 1.4.2, que para mí siempre será “mi labo”. ¡Gracias por todo Carmel!.

Gracias al Dr. Paco portillo, por su buen humor y sus consejos durante todos estos años compartiendo pasillo. Al Dr. Luis del Peso, por regalarme parte de su tiempo echándome una mano con el análisis *in silico*. Al Dr. Miguel Ángel Vidal, por acogerme en su laboratorio y hacerme sentir como si fuera el mío. ¡Gracias por los fines de semana compartidos picando clones!

Muchas son las cosas que me llevo de todos estos años pero sin duda la amistad de mis compañeros del 1.4 es una de las mejores. Por eso, quiero dedicar esta tesis especialmente a Leticia, mi Leti, porque sin su ayuda estoy segura de que no hubiera sido posible. Gracias por ser mi compañera, mi amiga y mi confidente. Por quererme y cuidarme siempre desde que te conocí. Voy echar mucho de menos nuestras risas constantes, nuestras canciones míticas, los corte de radio por falta de pago, nuestras excursiones a la Vaguada y sobre todo las tardes de poyata trabajando hasta las mil. Quiero que sepas que te admiro por cómo eres y que te quiero mucho. A María, por ser una de esas personas de las que uno se siente orgulloso de tener como amiga. Gracias por tus consejos, tu apoyo y tu cariño en todos estos años. Por ayudarme siempre y estar a mí lado cada vez que lo he necesitado. Por cada aventura que hemos pasado juntas y por todas las que espero que disfrutemos a partir de ahora. Eres una de las mejores personas que me he encontrado en mi vida. A Alberto, que se ha convertido en uno de mis grandes amigos durante esta etapa. Gracias por tu cariño, por tus achuchones, por escucharme tantas veces. Por tener siempre una sonrisa pase lo que pase. Voy a echar de menos nuestras tontunas de los viernes, el baile del desayuno y todas las pequeñas cosas que hemos compartido juntos y que para mí han sido tan importantes. Te quiero mucho Al. A Dani, porque es una de esas personas con las que te sientes a gusto estés donde estés. Gracias por tus consejos, por tu optimismo, por demostrarme que todo es posible si uno se lo propone. Por compartir esa locura que me encanta y ser uno de los mejores amigos que me llevo de esta etapa. A Camino, con la que he compartido momentos muy especiales durante estos años. Por nuestras conversaciones eternas a primera hora de la mañana, por conocerme y comprenderme siempre. Gracias por todo el cariño y la dulzura que me has hecho llegar. A las recién llegadas al

labo, a Yenny, Mónica y Silvia por su alegría y su aire fresco. Gracias por tener paciencia conmigo en esta etapa y por vuestra generosidad. A Amanda y a Rafa por los ratos de poyata compartidos.

A Ignacio Palmero, por su demostrarme su interés y su cariño en los momentos importantes. Gracias por acogerme y hacerme sentir siempre como parte del 1.4.1.

Gracias a toda la gente de los laboratorios vecinos por las cosas que hemos compartido durante estos años. A Irene, a Pablo, a Amparo, a Marlies, por tener siempre una sonrisa. A la gente del 1.3.1, del antiguo y del nuevo, por esas conversaciones de los pasillos que tanto ayudan en los malos y buenos momentos. Gracias a Gema por ser un apoyo cuando lo he necesitado. Quiero agradecer especialmente a Marta, por toda la ayuda que me ha prestado desde que la conocí y por ser una amiga de esas que sabes que no tienes que dejar escapar. . Quiero que sepas que un pedacito de esta tesis es tuyo. A Irene por todas las vivencias compartidas en esta etapa que nos unen tanto. A la gente del 2.4.1 y 2.4.2, los que están y los que estuvieron, a Miguel, a Josué, a María a Irene, a Teresa, a Celia, por formar parte importante de esta etapa en la que hemos disfrutado juntos de tantas cosas. A Lucía, por tus consejos y por tu ayuda. Gracias por escucharme, ¡eres genial!. A la gente del 0.2 y 0.3, a Merche, a Antonio, a Patri, a Pilar y a Anna, por tantos momentos compartidos en todos estos años. Gracias por vuestro apoyo en los momentos difíciles y por conseguir hacerme sonreír siempre.

Gracias a toda la gente que hace posible que esto funcione. A los chicos de informática, muy especialmente a Guti, Nani y Javi por demostrarme vuestro cariño cada día. Gracias por dejarme disfrutar de tantos buenos momentos a vuestro lado. A Javi, Antonio y Ricardo, de Imagen, por estar siempre dispuestos a echar una mano. A los chicos de almacén, especialmente a Dani, que me ha escuchado siempre que lo he necesitado. A Laura, por ayudarme a sortear mis mini cantidades de células y por hacerlo siempre con una sonrisa. A Estrella y a Mati, de Citometría, por estar siempre dispuestas a ayudar y a enseñar. A Diana, Conchi y Diego, de Secuenciación por todo el trabajo compartido. A Seguridad, especialmente a Carlos, por alegrarme la entrada al trabajo cada mañana. Por tu interés, por tus cuidados. Eres el mejor.

A toda la gente que de un modo u otro ha compartido esta etapa conmigo. A mi Glori, por convertirme en mucho más que en una compañera de poyata. Gracias por estar cuando lo necesito. A Lara, de quien todavía recuerdo ese “vamos a desayunar” del primer día. Gracias por tu amistad. A Pili, por ser una personilla a la que es imposible no querer. A Gema por los buenos momentos del principio. A Esther, por sus detalles, por preocuparse siempre a pesar de la distancia. A Ana, por tu alegría, por tu sonrisa por ser un ejemplo de fortaleza para todos. A Iván, a quien recuerdo con un cariño especial y de quien aprendí muchas cosas en poco tiempo. A Juan, gracias por esos primeros años de pipeta y todo lo que compartimos juntos. A Héctor por contagiarme esa alegría tan loca siempre que estamos juntos. A Menchu, por su dulzura y su cariño. A Ángel, por todo lo compartido durante estos años. Eres una persona estupenda. A Alain por estar pendiente durante

todo esta etapa. A Ana, por acordarte siempre de mí. A Pablo Piercing, por ser una de esas personas especiales con quien tienes la suerte de cruzarte en la vida.

Thanks to Hanna Mikkola and her entire lab, for welcoming me and teaching me so much during my stay in UCLA. Special thanks to Amelie, Guillaume, Akanksha, Ben, Paul, Pam for being so special during these months. Thank you for all the time spending together. For being my family in LA. I miss you every day. Thanks to Gwyneth, for being a wonderful house mate. For the English lessons during the meals. For all, thank you so much. Gracias a Elena y a Yiyo por abrirme las puertas de su casa sin conocerme. Por hacerme sentir como una amiga desde el primer día. Gracias por vuestra generosidad y vuestro cariño.

A Sonia, a Elena, a Soraya, a Fernando, a Chema y a Iván, por estar siempre cuando lo necesito. Por todas las cosas vividas juntas y las que nos quedan. Gracias por quererme tanto y demostrármelo en cada momento. Os quiero mucho chicos. A mis amigas de toda la vida, a Blanca, a Yoli, a Noelia, a Eva y a Rocío, por hacer que cada día juntas se convierta en un momento para recordar. Gracias por hacer que el tiempo no pase. A Violeta, a Silvia, a Sara, a Laura, a Carlos, a Eugenia, por contar siempre conmigo aunque nos veamos poco. Gracias por demostrarme vuestra amistad y vuestro cariño siempre. A Borja, Javi, Rubén, Cristi y Naiara por saber que están cuando les necesito. Por formar parte de mi vida.

A Eugenio, Charo y Marta por hacerme sentir uno más de la familia desde el primer día. Gracias por quererme y cuidarme durante estos años.

Gracias a mis tíos, tías, primos y primas por estar siempre pendientes de mí. A mis abuelas, Ascensión y Lucía por su espíritu de fortaleza y su ejemplo de mujer luchadora. Por dejarme aprender tantas cosas de vosotras y demostrarme vuestro apoyo en cualquier situación. Gracias por vuestro cariño infinito y vuestro amor.

A mi hermana Esther, a la que admiro y quiero con todo mi corazón. Por ser un ejemplo para mí en cada situación. Por tus consejos y ayuda en todos los momentos. Por hacerme disfrutar siempre que estamos juntas. Por enseñarme a no rendirme ante las dificultades. Por cada minuto compartido contigo.

A mis padres Ángel y Pilar por TODO. Por estar siempre a mí lado en los pequeños y grandes momentos. Por enseñarme todo lo que sé. Por dejarlo todo cuando les necesito. Por conocerme mejor que nadie. Por acompañarme en cada momento importante de mi vida y formar parte de todos los especiales. Por quererme de esa manera tan generosa que soy incapaz de describir. Os quiero mucho.

A Héctor por hacerme tan feliz cada día. Por demostrarme que no hay imposibles. Por tus abrazos que hacen que me sienta mejor al instante. Por escucharme. Por apoyarme en todas mis decisiones y comprenderme. Por hacerme reír siempre. Por Momo, Rofío y todas las pequeñas cosas que hacen que sea maravilloso. Por compartir tu vida conmigo. Lilo.



## *Resumen*

---





GATA-1 es uno de los reguladores clave en el desarrollo hematopoyético y juega un papel esencial en la diferenciación y maduración eritro-megacariocítica. En los últimos años se han identificado mutaciones somáticas en el gen de *GATA-1*, mayoritariamente en niños con Síndrome de Down, que han suscitado un gran interés debido a su relación con desórdenes mieloproliferativos y su progresión a leucemias. Las diferentes mutaciones en el gen de *GATA-1* llevan, todas ellas, a la expresión exclusiva de una isoforma truncada de la proteína, carente del dominio amino terminal, y que se ha denominado GATA-1s.

En este trabajo demostramos que la sobreexpresión de GATA-1s en células inmaduras de médula ósea adulta de ratón, tiene un efecto dominante que provoca la hiperproliferación de progenitores eritro-megacariocíticos (MEPs), así como una alteración en el potencial intrínseco de proliferación/diferenciación, impulsando preferencialmente la vía megacariocítica en detrimento de la eritroide. Descubrimos, además, un fenómeno inédito que sugiere la relación directa entre una mayor o menor tasa de proliferación de los progenitores que expresan GATA-1s y la elección sesgada de la vía de diferenciación megacariocítica o eritroide, respectivamente.

Por otra parte, mostramos que el efecto inhibitorio de la proliferación causado por GATA-1 no depende únicamente de la conocida interacción con la proteína retinoblastoma (pRb), sino que todo el dominio amino terminal es esencial para esta función antiproliferativa de GATA-1. Asimismo, GATA-1s interfiere con un programa transcripcional, dirigido a incrementar la expresión de inhibidores de ciclo celular. Entre ellos, hemos identificado a Schlafen 1 como nueva diana directa de GATA-1, lo que apoya el papel inhibitorio del ciclo celular por parte de GATA-1.

Por último, en este trabajo analizamos el papel leucemogénico de GATA-1s, demostrando que los progenitores que sobreexpresan dicha isoforma son más sensibles a la acción de alteraciones génicas posteriores, por ejemplo la sobreexpresión de HOXA9 que les confiere capacidad de autorenovación, de migración e invasión, sugiriendo que GATA-1s actúa como un oncogén.

En conjunto, nuestros resultados nos llevan a proponer un papel singular para GATA-1 como regulador directo del ciclo celular en progenitores eritro-megacariocíticos, que tiene como consecuencia la regulación selectiva de la vía eritrocítica o megacariocítica, en un papel asimilable a un supresor tumoral.



## *Abstract*

---



GATA-1 is one of the key regulators of hematopoietic development, playing an essential role in erithro-megakaryocytic differentiation and maturation. In the last few years, different somatic mutations, mostly in Down syndrome infants, have been found in *GATA-1* gene. An intense interest has come from the fact that these mutations have been clearly related to myeloproliferative disorders and leukaemia progression. All GATA-1 mutations result in the exclusive expression of a truncated protein isoform that lacks N-terminal domain, thus named GATA-1s (for GATA-1 *short*).

In this thesis we show that GATA-1s overexpression in adult bone marrow immature cells has a dominant effect that leads to hyperproliferation of erithro-megakaryocytic progenitors (MEPs). In addition, GATA-1s alters MEPs intrinsic proliferation/differentiation potential, giving rise preferentially to megakaryoblasts at the expense of erythroblasts. We also uncovered an unreported mechanism that suggests a direct relationship between GATA-1s expressing progenitors slow or rapid proliferation rate and a byased election of erythrocytic or megakaryocytic pathway, respectively.

On the other hand, we show that the inhibitory effect of GATA1 on proliferation does not depend uniquely on the interaction with retinoblastoma protein (pRb), and that the whole N-terminal domain is essential for GATA-1 antiproliferative function. Also, GATA-1s interferes with a concerted transcriptional program directed to increase cell cycle inhibitors. Among them, we have identified Schlafen 1 as a new GATA-1 direct target, also supporting GATA-1 as a cell cycle inhibitor.

Finally, we analyse GATA-1s leukemogenic role and show that the progenitors expressing this truncated isoform are more sensitive to subsequent genetic lesions such as overexpression of HOXA9 that results in self renewal capacity, enhanced migration and invasion potential. This suggests that GATA-1s functions as an oncogene.

Altogether, the results presented here allow us to propose a unique role for GATA-1 as a direct cell cycle regulator in MEPs that brings about the selective regulation of erythrocytic or megakaryocytic pathways, through a role that can be assigned to a tumor suppressor function.



## *Índice*

---





<b>Agradecimientos</b>	<b>III</b>
<b>Resumen</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract</b>	<b>XIII</b>
<b>Índice</b>	<b>3</b>
<b>Clave de Abreviaturas</b>	<b>7</b>
<b>Introducción</b>	<b>11</b>
<b>1. Hematopoyesis</b>	<b>13</b>
1.1. Sistema hematopoyético	14
1.1.2. Eritropoyesis	16
1.1.3. Megacariopoyesis	17
1.2. Hematopoyesis en el desarrollo	18
1.3. Regulación de la hematopoyesis	19
1.3.1. Regulación extrínseca: Microambiente	19
1.3.2. Regulación intrínseca: Factores de Transcripción.	20
<b>2. GATA-1</b>	<b>22</b>
2.1. Estructura de GATA-1	23
2.2 Regulación de GATA-1	24
2.2.1. Regulación transcripcional	24
2.2.2. Regulación post-traducciona	24
2.2.3. Cofactores de GATA-1	25
2.2.4. GATA-1 y ciclo celular	26
2.3. Papel biológico de GATA-1	27
<b>3. GATA-1s</b>	<b>28</b>
3.1. GATA-1s y leucemia	29
3.2. GATA-1s frente a GATA-1	31
<b>Objetivos</b>	<b>33</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>37</b>
1. Inmunodepleción magnética	39
2. Cultivos celulares	39
3. Plásmidos utilizados	40
4. Infección retroviral	41

5. Curvas de crecimiento	42
6. Ensayos de transactivación	42
7. RT-PCR y PCR cuantitativa	43
8. Análisis de expresión génica	43
9. Separación por citometría de flujo preparativa	44
10. Marcaje de superficie	44
11. Inmunofluorescencia	45
12. Extractos nucleares de proteína	45
13. Extractos totales de proteína	46
14. Inmunoblot o <i>Western blot</i>	46
15. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética, EMSA	47
16. Inmunoprecipitación de cromatina, chIP	48
17. Ensayos de migración e invasión in Vitro	49
18. Ensayos clonogénicos	49
<b>Resultados</b>	<b>51</b>
<b>1. Hiperproliferación de progenitores hematopoyéticos por expresión ectópica de la isoforma GATA-1s</b>	<b>53</b>
1.1. Efecto de GATA-1s sobre la proliferación celular	53
1.2. GATA-1s induce la hiperproliferación de células progenitoras	55
1.3. GATA-1s induce hiperproliferación de progenitores megacariocíticos	57
1.4. Caracterización de las células c-Kit <sup>+</sup> /CD41 <sup>+</sup>	58
<b>2. Estudio funcional de GATA-1s y GATA-1<sub>wt</sub></b>	<b>61</b>
2.1. Papel del dominio de unión a retinoblastoma en la generación de progenitores megacariocíticos hiperproliferantes	61
2.2. Efecto de la tasa de proliferación en la elección a linaje eritro-megacariocítico	65
2.3. Papel del dominio amino terminal en el equilibrio proliferativo de la diferenciación eritro-megacariocítica	67
<b>3. Análisis de la expresión de genes diana de GATA-1s</b>	<b>70</b>
3.1. Perfil de expresión génica asociado a ciclo celular inducido por GATA-1s	70
3.2. Estudio del efecto de GATA-1 sobre la expresión de <i>Schlafen 1</i>	72
3.3. Estudio del efecto de GATA-1 sobre la expresión de <i>Cdc6</i>	74
<b>4. Potencial leucemogénico de GATA-1s</b>	<b>80</b>

<b>Discusión</b>	<b>87</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>101</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>105</b>



## *Clave de Abreviaturas*

---



- AD:** Dominio de activación (*Activation Domain*)
- ARNm:** ARN mensajero
- chIP:** Inmunoprecipitación de cromatina (*Chromatin Immunoprecipitation*)
- CLPs:** Progenitores linfoides comunes (*Common Lymphoid Progenitor*)
- CMPs:** Progenitores mieloides comunes (*Common Myeloid Progenitor*)
- CF:** Dedo de zinc carboxilo terminal (*C-Finger*)
- CFUs:** Unidades formadoras de colonias (*Colony Forming Units*)
- DMEM:** Medio Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- E:** Prefijo referido a los días post-coito (*Embryonic day*)
- ECM:** matriz extracelular (*Extracellular Matrix*)
- EMSA:** Ensayo de retardo en gel (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)
- FBS:** Suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)
- FACS:** separación celular por fluorescencia (*Fluorescence Activated Cells Sorting*)
- GFP:** Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)
- GMP:** Progenitores granulo-macrofágico
- HSC:** Célula madre hematopoyética (*Hematopoietic Stem Cell*)
- IMDM:** Modificación Iscove del medio Dulbecco (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*)
- IRES:** Sitio interno de entrada al ribosoma (*Internal Ribosome Entry Site*)
- LLA:** leucemia linfoblástica aguda
- LMA:** Leucemia mieloide aguda
- LMCA:** Leucemia megacarioblástica aguda
- LT-HSCs:** Célula madre hematopoyética de largo plazo (*Long Term Hematopoietic Stem Cells*)
- MEPs:** Progenitores eritro-megacariocíticos
- MPPs:** Progenitores multipotentes (*Multipotent Progenitors*)
- NF:** Dedo de zinc amino terminal (*N-Finger*)
- PE:** Ficoeritrina
- PercpCy5.5:** complejo clorofila-peridina
- RBD:** Dominio de unión a retinoblastoma (*Retinoblastoma Binding Domain*)
- RPMI-1640:** Medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute-1640*
- SCF:** Factor de célula madre (*Stem Cell Factor*)
- ST-HSCs:** Células madre hematopoyética de corto plazo (*Short Term Hematopoietic Stem Cells*)
- TMT:** Trastorno mieloproliferativo transitorio





## *Introducción*

---



## 1. Hematopoyesis

El proceso de hematopoyesis genera diariamente miles de millones ( $1 \times 10^{12}$ ) de células sanguíneas necesarias para la supervivencia de un adulto (Ogawa, 1993). Esta producción compensa la pérdida diaria de dichas células, de tal manera que en condiciones normales, los niveles en circulación de eritrocitos, leucocitos y plaquetas se mantienen constantes.

En la médula ósea de adulto, las células sanguíneas se encuentran en varios estadios de desarrollo. La idea de un progenitor multipotente capaz de producir células sanguíneas de diferentes tipos surge en 1960 y 70 por los trabajos de Metcalf y Moore así como Till y McCullough. Estos grupos documentan la existencia de unidades formadoras de colonias (CFUs), derivadas de la médula ósea de ratón capaces de producir células de diferentes linajes cuando son transferidas a ratones irradiados y subdivididas en base a sus respuestas a factores estimuladores de colonias (Metcalf, 1970, 1991; Till and Mc, 1961). En el vértice de la pirámide de progenitores hematopoyéticos se encuentran las células madre hematopoyéticas, HSCs (*Hematopoietic Stem Cells*). Estas células, que ocupan el 0,01%-0,05% de la población total de la médula ósea (Harrison et al., 1988; Morrison et al., 1995), se caracterizan por su capacidad de autorrenovación así como por su multipotencialidad, siendo capaces de generar todo tipo de células sanguíneas (Siminovitch et al., 1963).

Debido a la complejidad del proceso de hematopoyesis, es evidente que la aparición de alteraciones en alguno de los compartimentos celulares, sobre todo en los más primitivos, produce cambios que influyen en la homeostasis del sistema. Así, trastornos como la anemia aplásica, las leucemias mieloides y linfoides (tanto crónicas como agudas) y los síndromes mielodisplásicos, se originan partir de alteraciones en células troncales y progenitoras hematopoyéticas (Hope et al., 2003; Maciejewski and Risitano, 2003; Mundle, 2003; Petzer and Gunsilius, 2003). A día de hoy, existe un mayor conocimiento acerca de los genes implicados en la transformación celular que conducen a leucemia (Jordan, 2002), así como de la identidad de las células inmaduras donde ocurren dichas transformaciones (Montesinos and Mayani, 2002) y el microambiente hematopoyético donde se desarrollan (Mayani, 1996; Oh and Kwon).

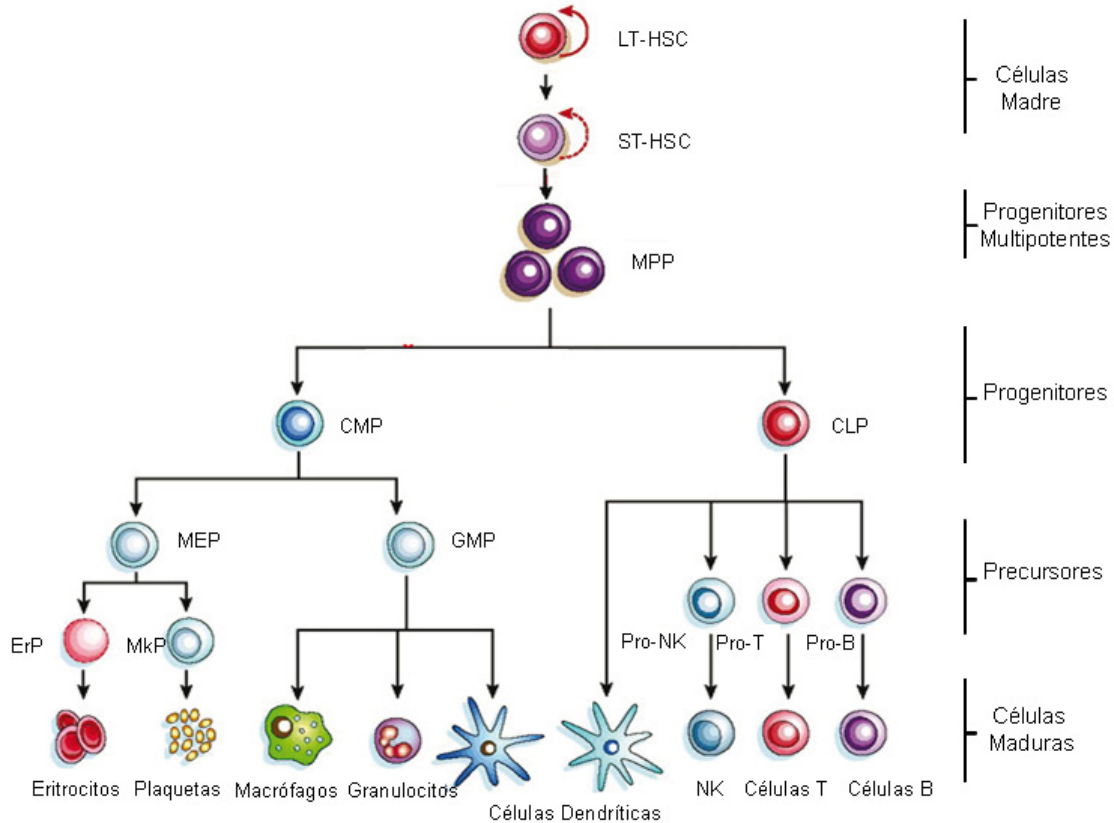
## 1.1. El sistema hematopoyético

El sistema hematopoyético está compuesto por diferentes tipos celulares que derivan de la diferenciación y expansión de progenitores inmaduros. Su funcionamiento correcto asegura la producción de las células responsables del transporte de oxígeno, la coagulación sanguínea y la inmunidad. El inicio del proceso de diferenciación hematopoyética se encuentra en el compartimento de células madre o células troncales hematopoyéticas, HSCs. Las células más inmaduras dentro de este compartimento son las llamadas LT-HSCs (*Long Term Hematopoietic Stem Cells*), nombradas así por su máxima capacidad de autorrenovación y potencialidad de regenerar y mantener a largo plazo la hematopoyesis del receptor de un trasplante (Dick et al., 1985; Keller and Snodgrass, 1990; Lemischka et al., 1986). Las ST-HSCs (*Short Term Hematopoietic Stem Cells*) son células multipotenciales que, sin embargo, poseen una baja capacidad de autorrenovación, así como un potencial transitorio de reconstitución hematopoyética (Morrison et al., 1995).

Los progenitores multipotentes, MPPs (*Multipotent Progenitors*), poseen la misma capacidad de diferenciación multi-linaje que las LT y ST-HSCs pero no están definidos como células madre ya que han perdido el potencial de autorrenovación (Christensen and Weissman, 2001; Morrison et al., 1997b; Spangrude et al., 1988).

Hasta este punto, todas las células tienen la capacidad de diferenciar hacia todos los linajes maduros. En el modelo clásico, el siguiente paso implica la adopción de una vía de diferenciación hacia el linaje mieloide o linfoide, que tiene como consecuencia la pérdida directa de potencial. De esta manera se genera el progenitor común mieloide CMP (*Common Myeloid Progenitor*) (Akashi et al., 2000) y el progenitor común linfoide CLP (*Common Lymphoid Progenitor*) (Kondo et al., 1997). Los CMPs dan lugar a dos tipos de células oligopotentes, el progenitor eritro-megacariocítico, MEP (*Megakaryocyte/Erythrocyte Progenitors*), que retiene la capacidad de generar plaquetas y glóbulos rojos y el granulo-monocítico, GMP (*Granulocyte/Monocyte Progenitors*), que genera granulocitos, macrófagos y células dendríticas (Akashi et al., 2000). En este mismo modelo, la rama linfoide comienza en el CLP, el cual tiene potencial para formar las células B, las células T, *Natural Killer* (NK) y las células dendríticas (Akashi et al., 1999; Kondo et al., 1997). Mientras que todos los otros procesos de diferenciación y formación de célula madura ocurren en la médula ósea, la diferenciación y maduración de las células T ocurren en el timo como órgano linfoide primario. Es importante resaltar que evidencias

recientes muestran al CLP como principal progenitor de célula B, con limitado potencial de célula T, lo que indica que el linaje T se separa en algún punto durante la diferenciación (Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2003).



**Figura 1. El sistema hematopoyético.** Esquema de la organización del sistema hematopoyético, adaptado de (Reya et al., 2001), donde se muestra el tipo de células y las relaciones existentes entre ellas.

Ha sido posible caracterizar en mayor detalle a las células progenitoras e incluso a varias poblaciones de HSCs en base a su expresión de antígenos en la superficie celular (generalmente detectada por citometría de flujo) así como a su expresión génica. Esto ha permitido una mayor y mejor clasificación de poblaciones progenitoras intermedias. En ratón, la actividad hematopoyética multipotente es contenida en una pequeña fracción de médula ósea definida como ( $Lin^-/ Sca-1^+/c-Kit^+$  ó LSK) (Ikuta and Weissman, 1992; Spangrude et al., 1988). La fracción LSK puede ser dividida en subpoblaciones funcionalmente caracterizadas por los niveles de expresión de Thy1.1 (Spangrude et al., 1988), CD4 y Mac-1 (Morrison and Weissman, 1994), CD34 (Osawa et al., 1996), Flk2/Flt3 (Adolfsson et al., 2001; Christensen and Weissman, 2001) y la familia Slam (Forsberg et al., 2005; Kiel et al., 2005; Kim et al., 2006) en su superficie.

El modelo de una completa e irreversible separación entre los compartimentos mieloide y linfoide, proveniente del laboratorio de Weissman (Akashi et al., 2000), ha sido recientemente puesto en duda. Así, se ha descrito, desde el laboratorio de Jacobsen, la existencia de una población de LSK, caracterizada por expresar Flt3 a altos niveles, y que manteniendo el potencial mieloide y estando primada hacia linaje linfoide, habría perdido la capacidad de producir células eritroides y megacariocíticas (Adolfsson et al., 2005). Estos datos se apoyan en estudios que caracterizan la existencia de dicha población progenitora en base a la mayor o menor expresión de reguladores transcripcionales específicos de linaje, como por ejemplo *Gata-1*, *Epor*, *Mpl*, *Gfi1b*, *Cebpea*, *Pax5*, *Cd3e*, *Rag1*, *Rag2*, entre otros, tanto en hígado fetal como en médula ósea adulta (Mansson et al., 2007). Sin embargo, y a pesar de estos resultados, este modelo no es compartido por otros grupos, que han demostrado que dicha población ( $\text{Lin}^-/\text{Sca-1}^+/\text{c-Kit}^+/\text{Flt3}^{++}$ ) mantiene el potencial eritro-megacariocítico *in vivo* (Forsberg et al., 2006).

Independientemente de la precisión de cada uno de estos modelos, el balance de estas nuevas evidencias indica una emergencia temprana de precursores eritro-megacariocíticos durante la transición de HSCs a progenitores. De hecho, este debate probablemente ilustra alguna de las dificultades en usar un modelo de jerarquía celular para explicar la hematopoyesis. Poblaciones intermedias podrían no existir como entidades con puntos irreversibles que marcan la separación entre diferentes linajes, y sí como células con gran plasticidad para iniciar una u otra vía de diferenciación en función de las necesidades fisiológicas, o de las condiciones de aislamiento, cultivo y manipulación *ex vivo*. Podría producirse, por tanto, un cambio progresivo en el balance de los factores de transcripción con el que la célula elija preferencialmente ciertos caminos, lo cual ya habría sido propuesto hace algún tiempo (Hu et al., 1997).

### 1.1.2. Eritropoyesis

La eritropoyesis es el proceso de formación de células de la serie roja, los eritrocitos. Siguiendo una clasificación morfológica, la primera célula identificable durante los estadios de maduración y diferenciación eritroide es el proeritroblasto. Los proeritroblastos maduran a eritroblastos basófilos y luego a eritroblastos policromáticos en los que se inicia la síntesis de hemoglobina. Al final del proceso, los eritroblastos policromáticos maduran a eritroblastos ortocromáticos que al perder el núcleo evolucionan a reticulocitos. Finalmente, los reticulocitos progresan, en 2-4 días, hacia eritrocitos

maduros, que permanecen en la sangre durante unos 120 días. Los eritrocitos tienen una forma oval, bicóncava, aplanada, con una depresión en el centro y un diámetro típico de 6 a 8  $\mu\text{m}$ . Este diseño parece ofrecer las condiciones óptimas para el intercambio de oxígeno con el medio que lo rodea, pues otorga flexibilidad para atravesar los capilares donde liberan la carga de oxígeno. La eritropoyetina (EPO), citoquina producida en el riñón, es la que estimula la eritropoyesis y es responsable de mantener una masa eritrocitaria constante.

### **1.1.3. Megacariopoyesis**

El proceso de formación de los megacariocitos, células precursoras de plaquetas, se conoce con el nombre de megacariopoyesis. La maduración megacariocítica envuelve varios procesos especializados. Los megacariocitos maduros sufren un proceso de endoreplicación (doblan el contenido de ADN en fase S sin la subsecuente salida de ciclo celular) permitiendo un secuencial aumento en la ploidía celular en cada ciclo (hasta 128N), que está acompañada de la expansión de la masa citoplasmática y formación de membranas de demarcación que darán lugar a las plaquetas.

Al igual que la eritropoyesis, la megacariopoyesis es un proceso secuencial de maduración en el que se distinguen varios tipos celulares. El promegacarioblasto, célula precursora del megacarioblasto, no tiene identificación morfológica específica. Se trata de una célula mononucleada de aspecto muchas veces pseudolinfoide, que precisa, para su detección, de la reacción de peroxidasa plaquetar a nivel estructural o de la expresión de anticuerpos monoclonales específicos de esta línea mieloide como es CD41. Los promegacarioblastos maduran a megacarioblastos y éstos a su vez a promegacariocitos donde se inicia ya el proceso de granulogénesis en distintas áreas del citoplasma. El megacariocito, célula más madura dentro de esta serie, posee como características más destacables su gran tamaño (80 $\mu\text{m}$  o más) y su elevada ploidía. Posee un núcleo multilobulado, y un citoplasma de gran tamaño, de 16-56  $\mu\text{m}$ . Los megacariocitos maduros están preferentemente localizados alrededor de los vasos sanguíneos, donde interactúan con el endotelio. En la actualidad se cree que la puesta en circulación de las plaquetas comprende la formación de unas prolongaciones de la membrana del megacariocito, denominadas proplaquetas, que atraviesan el endotelio, fragmentándose finalmente en plaquetas circulantes.

La principal hormona reguladora de la producción plaquetaria es la trombopoyetina, TPO, que tiene cierta homología con la eritropoyetina. Es sintetizada de forma constante en hígado, riñones y músculo esquelético, y eliminada de la circulación por internalización en las plaquetas y megacariocitos circulantes (Kuter, 1996).

## **1.2. Hematopoyesis en el desarrollo.**

En la mayoría de los vertebrados, la hematopoyesis ocurre en varias etapas secuenciales integradas en dos grandes etapas: la hematopoyesis primitiva y definitiva (Cumano and Godin, 2007). La primera fase de formación sanguínea tiene una localización extraembrionaria, a día E7-7,5 en los islotes hemáticos del saco vitelino (Cumano and Godin, 2007; Palis et al., 1999). Estos islotes sanguíneos se originan a partir de una célula mesodérmica, denominada hemangioblasto, que ha sido descrito como el progenitor común de las células hematopoyéticas y de las células endoteliales (Choi et al., 1998; Huber et al., 2004; Lancrin et al.). En esta etapa, la hematopoyesis se caracteriza por la generación de poblaciones hematopoyéticas transitorias, que cubren las necesidades inmediatas del embrión, incluyendo células rojas primitivas, requeridas para el transporte de oxígeno (Palis et al., 1999; Palis and Yoder, 2001; Ransom et al., 2004), macrófagos para la remodelación de tejido y la defensa (Bertrand et al., 2006) y megacariocitos primitivos (Tober et al., 2007; Xu et al., 2001).

A día E10,5 son detectadas las primeras HSCs definitivas, que a diferencia de las células hematopoyéticas primitivas, tienen la capacidad de regenerar la hematopoyesis de forma permanente al ser trasplantadas a un ratón inmunodeprimido, SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) irradiado (Medvinsky and Dzierzak, 1996; Muller et al., 1994). El principal sitio de generación de novo de HSCs ocurre en la llamada aorta-gónadas-mesonefros, AGM (Cumano et al., 1996; de Bruijn et al., 2000; Godin et al., 1999; Medvinsky and Dzierzak, 1996; Muller et al., 1994). Interesantemente, las nuevas HSCs formadas no pueden ser retenidas en la AGM y migran hacia el hígado fetal a día E11 – E11,5 (Kumaravelu et al., 2002), donde son capaces de expandirse exponencialmente así como de diferenciar hacia múltiples linajes. El hígado es el principal nicho hematopoyético hasta el nacimiento, momento en el que la actividad hematopoyética se localiza principalmente en la médula ósea (Ema and Nakauchi, 2000).



### 1.3. Regulación de la hematopoyesis.

El destino de una célula madre hematopoyética viene definido por un equilibrio entre señales celulares extrínsecas e intrínsecas. Así, la mayoría de las HSCs en la médula ósea, se encuentran en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular (células madre durmientes) (Bradford et al., 1997; Cheshier et al., 1999). Tras la recepción de una señal apropiada, las HSCs entran en ciclo y se dividen simétricamente, dando lugar a dos células hijas idénticas que poseen dicha pluripotencialidad, o asimétricamente, dando lugar a una HSC y a un progenitor que es dividido y diferenciado hacia célula madura (Morrison et al., 1997a). La división celular asimétrica es más común en la hematopoyesis fisiológica, mientras que ante un estado de estrés, la mayoría de las HSCs se dividen simétricamente (Osawa et al., 1996).

#### 1.3.1. Regulación extrínseca: Microambiente

En los últimos años, parece evidente que uno de los factores más importantes que gobierna el comportamiento de una célula madre es el microambiente o nicho donde reside (Adams and Scadden, 2006; Arai et al., 2005). El microambiente hematopoyético consiste en una estructura tridimensional, altamente organizada, compuesta de células del estroma y sus productos (matriz extracelular, citoquinas y quimioquinas, entre otras), que regula la localización y fisiología de la célula hematopoyética (Carlesso and Cardoso; Mayani et al., 1992; Perkins and Fleischman, 1988).

Las citoquinas son los reguladores esenciales de la diferenciación hematopoyética que forman parte del microambiente medular (Metcalf, 1998). Actúan, muchas de ellas, como factores de crecimiento y comprenden un amplio grupo de proteínas o glicoproteínas que poseen la capacidad de modular la actividad funcional de células individuales y de tejidos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Un importante regulador de la hematopoyesis es c-Kit, una proteína transmembrana que funciona como un receptor con actividad tirosina quinasa. Estructuralmente es similar a otros receptores con actividad tirosina quinasa, como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) (Chabot et al., 1988; Geissler et al., 1988). La expresión de c-Kit está restringida a células madre y progenitores inmaduros (Ogawa et al., 1991; Ogawa et al., 1993). C-Kit es expresado notablemente en LT y ST-HSCs, y su ligando, SCF (*Stem Cell Factor*) es el regulador crítico en el control de su proliferación y diferenciación (Metcalf and Nicola, 1991; Okada et al., 1991). Otras citoquinas de la familia hematopoyética son los receptores

de la interleuquinas (IL), la eritropoyetina (EPO), la trombopoyetina (TPO) y factores estimuladores de colonias (por ejemplo GM-CSF; *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*).

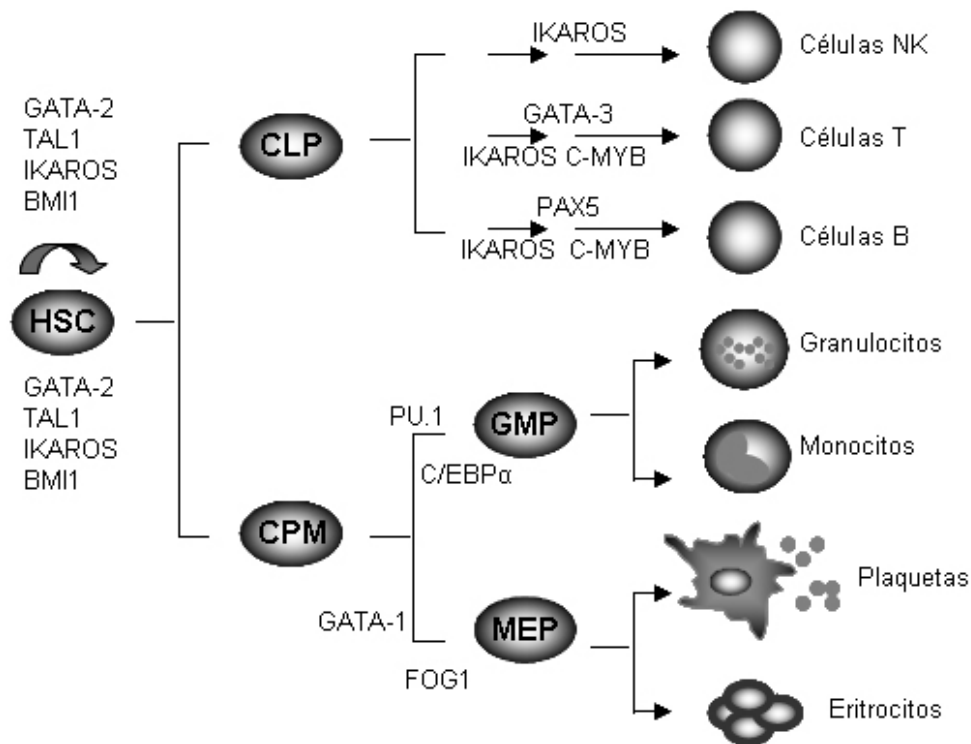
### **1.3.2. Regulación intrínseca: Factores de transcripción**

Uno de los máximos responsables en la determinación del compromiso y/o especificación de un linaje hematopoyético, es el conjunto de factores que dirige el programa transcripcional. Los factores de transcripción tienen un papel muy importante en todos los estadios hematopoyéticos, desde la emergencia y maduración de las HSCs hasta la proliferación y diferenciación hacia un determinado linaje (Orkin, 2000; Sieweke and Graf, 1998; Teitell and Mikkola, 2006). La alteración de la regulación transcripcional del sistema hematopoyético está relacionada con el desarrollo de leucemias, lo que indica el delicado balance que existe entre la acción fisiológica o patológica de un factor de transcripción. De hecho, más del 50% de los reguladores hematopoyéticos han sido descritos primariamente como genes relacionados con la leucemogénesis (Orkin, 2000).

Se pueden distinguir dos grupos de factores de transcripción implicados en la hematopoyesis, los que actúan en el proceso más precoz del desarrollo y los que regulan la autoregeneración y el comienzo de la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos. Entre los primeros cabe destacar SCL, LMO2, GATA-2, AML1/RUNX-1, y MLL; y entre los segundos IKAROS, NOTCH-1, HOX, GATA-1, GATA-3 y PU.1 (Shivdasani, 1997) (Zhu and Emerson, 2002).

SCL (*Stem Cell Leukemia/T-cell Acute Leukemia 1*, SCL/TAL1) es un factor de transcripción implicado en leucemia, cuya activación aberrante es encontrada en el 60% de los casos de leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T) en niños y adultos (Bash et al., 1995). SCL es indispensable en la generación de HSCs durante el periodo embrionario (Shivdasani et al., 1995; Visvader et al., 1998), no siendo, sin embargo, requerido en el mantenimiento y la autorrenovación de las HSCs adultas (Mikkola et al., 2003). De la misma forma, ratones deficientes en LMO2, generan defectos similares a los producidos por SCL en la hematopoyesis primitiva y definitiva (Yamada et al., 1998), mientras que la pérdida de GATA-2 genera defectos en la proliferación de las HSCs emergentes (Tsai et al., 1994). Por su parte, el factor transcripcional RUNX1/AML1 muestra un fenotipo intermedio, resultando esencial para el desarrollo de las células hematopoyéticas definitivas pero no el de las primitivas durante la ontogenia (North et al.,

1999; Okuda et al., 1996). La ausencia de la proteína Ikaros tiene efectos sobre el linaje linfoide, impidiendo la diferenciación de los linfocitos B y T (Cortes et al., 1999), mientras la expresión diferencial de C/EBP $\alpha$  es responsable directa de la elección de linaje de los GMPs hacia la vía granulocítica o monocítica (Zhang et al., 1997)



**Figura 2. Factores de transcripción implicados en el proceso de hematopoyesis.**

Algunos de estos factores de transcripción pertenecen al grupo de los llamados *master regulators* (*reguladores maestros*) caracterizados por gobernar programas específicos de linaje. Estos factores son capaces de forzar la adquisición de ese programa de linaje a células que pertenecen a otro. Un ejemplo de esto es el factor de transcripción GATA-1 (del que se habla más adelante), que es capaz de reprogramar los CLPs en progenitores con potencial eritroide y megacariocítico (Fujiwara et al., 1996; Iwasaki et al., 2003). Por otra parte algunos factores de transcripción se caracterizan por tener efectos dependientes de su concentración. Por ejemplo, se requieren bajos niveles de expresión de PU.1 para el desarrollo de célula B, mientras que altas dosis inhiben dicha vía, permitiendo la diferenciación hacia macrófagos (DeKoter and Singh, 2000). Los mecanismos por los cuales la concentración de estos factores de transcripción influye en la función celular todavía son desconocidos, existiendo la hipótesis de que la cooperación entre dichos

factores y otras proteínas reguladoras provoca un balance de efectos positivos y negativos determinantes en el destino celular.

## **2. GATA-1**

GATA-1, también conocido como NF-E1, NF-1, Ery-1 y GF-1 (Martin and Orkin, 1990) fue el primer miembro de la familia GATA en ser descubierto (Evans et al., 1988). GATA-1 es un factor de transcripción hematopoyético perteneciente a la familia de proteínas GATA. Esta familia consta de seis miembros de los cuales GATA-1, GATA-2 y GATA-3 están implicados en hematopoyesis, mientras que los otros tres, GATA-4, GATA-5, GATA-6, se expresan en otros tejidos incluyendo intestino, corazón y pulmón (Ferreira et al., 2005).

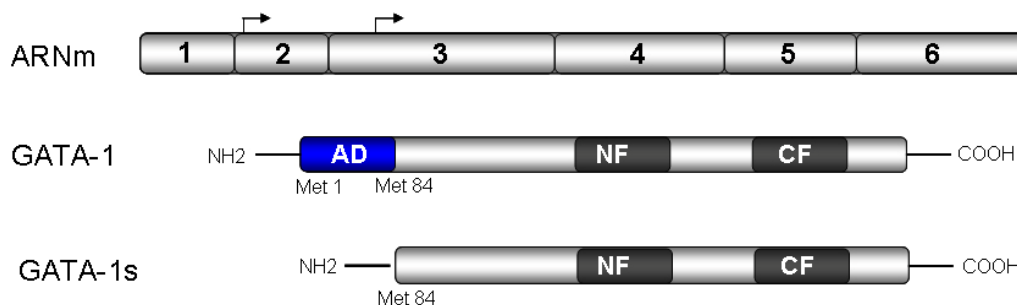
GATA-1 está localizado en el cromosoma Xp11.23 (Zon et al., 1990) y consta de 6 exones distribuidos a lo largo de 8 kb. Fue inicialmente identificado por su capacidad para unirse funcionalmente a secuencias reguladoras de ADN encontradas en genes de globinas (Hannon et al., 1991; Whitelaw et al., 1990). Desde entonces han sido identificados motivos de unión de GATA, (T/A)GATA(A/G), en promotores y/o regiones amplificadoras de la transcripción (*enhancers*) de casi todos los genes eritromegacariocíticos específicos estudiados (Sposi et al., 1992; Weiss and Orkin, 1995). Al igual que el resto de los miembros de la familia, GATA-1 contiene dos motivos de dedos de zinc conservados, mediante los cuales se une a las secuencias consenso WGATAR y realiza las interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción, como SP1, CBP/p300, FOG-1, los factores específicos eritroides EKLF y el propio GATA-1 (Martin and Orkin, 1990). Esta secuencia está altamente conservada a lo largo de la escala filogenética, siendo los factores GATA reguladores clave en diversas células y procesos de diferenciación en hongos (Kudla et al., 1990), plantas (Teakle et al., 2002; Zhao et al., 2004), invertebrados (Spieth et al., 1991), y vertebrados como el pez cebra (Lyons et al., 2002), *Xenopus* (Zon et al., 1991), pollo y mamíferos (Evans et al., 1988; Lowry and Atchley, 2000; Morceau et al., 2004; Patient and McGhee, 2002; Weiss and Orkin, 1995).

GATA-1 se expresa a niveles bajos (casi indetectables), que se consideran basales, en progenitores hematopoyéticos (Sposi et al., 1992) (Leonard et al., 1993) y a niveles altos en eritrocitos (Yamamoto et al., 1990), mastocitos (Harigae et al., 1998),

megacariocitos (Romeo et al., 1990), eosinófilos (Zon et al., 1993) y curiosamente, en células de Sertoli de testículo (Ito et al., 1993).

## 2.1. Estructura de GATA-1.

*GATA-1* posee dos promotores específicos de tejido: uno distal (IT, *Testis-specific*) y uno proximal (IE, *Erythroid-especific*). El promotor distal contiene el primer exón, el cual es específicamente transcrito en células de Sertoli, mientras que el promotor proximal dirige la expresión de un transcrito más pequeño que es encontrado en células hematopoyéticas. *GATA-1* presenta dos isoformas, la isoforma larga, conocida como *GATA-1* y una versión más corta de la proteína denominada *GATA-1s* de la que se hablará más detenidamente en el apartado 3. *GATA-1* codifica una proteína de 413 aminoácidos con al menos 3 dominios funcionales: un dominio amino terminal de activación (o represión) y los dos dedos de zinc, el amino terminal y el carboxilo terminal. El dedo de zinc C-terminal es responsable del reconocimiento y la unión de *GATA-1* a la secuencia consenso del ADN, WGATAR (Tsai et al., 1989). El dedo de zinc N-terminal no se une directamente al ADN pero contribuye a la estabilidad y especificidad de esta unión (Chang et al., 2002; Whyatt et al., 1993). Además, es responsable de la interacción proteína-proteína de *GATA-1* con cofactores como FOG-1 (Cantor et al., 2002; Cantor and Orkin, 2001; Fox et al., 1998). Por el contrario, otras proteínas como PU.1 interaccionan con el dedo de zinc localizado en el carboxilo terminal, pero teniendo como resultado bloquear la unión de *GATA-1* al ADN (Cantor and Orkin, 2001; Zhang et al., 2000).



**Figura 3. Estructura de GATA-1.** AD, dominio de activación; NF, dedos de zinc amino terminal; CF, dedos de zinc carboxilo terminal

## 2.2. Regulación de GATA-1.

### 2.2.1 Regulación transcripcional

GATA-1, y también otros miembros de la familia, tienen la capacidad de unirse a su propio promotor (Elefanty et al., 1996). Esta asociación sugiere la existencia de mecanismos de control transcripcional que conducen a su autorregulación (Hannon et al., 1991; Nicolis et al., 1991; Nishikawa et al., 2003; Tsai et al., 1991). El análisis del locus de hipersensibilidad a DNasa 1 en el gen *Gata-1*, reveló tres regiones reguladoras, denominadas HS1, HS2, HS3 (Hipersensitive site) (McDevitt et al., 1997a; Valverde-Garduno et al., 2004). HS1 se encuentra entre unas 2,9 kb y 2,6 kb antes del primer exón (IE). HS2 corresponde a la región putativa del promotor de *Gata-1*, IE y por último, HS3 esta localizada en el primer intrón. Se ha descrito que la transcripción del gen *Gata-1* en diferentes linajes hematopoyéticos requiere diferentes secuencias reguladoras. Así, en el linaje megacariocítico, la expresión de *Gata-1* requiere de la secuencia completa contenida en la región HS1 (317 pb), mientras que en linaje eritroide solo son necesarias las 62 primeras pares de bases (Nishimura et al., 2000; Vyas et al., 1999b). En eosinófilos la expresión de *Gata-1* es independiente de la región HS1 (Guyot et al., 2004) pero requiere del doble motivo GATA que está presente en la región HS2 (Yu et al., 2002).

Estas evidencias indican que la regulación de la expresión de este gen ha adquirido elementos distintivos para acomodar las distintas características de cada linaje.

### 2.2.2 Regulación post-traducciona.

GATA-1 es también regulada a nivel post-traducciona mediante fosforilación, acetilación y sumoilación. En ratón, GATA-1 es acetilada en dos motivos conservados ricos en lisina localizados en el extremo carboxilo terminal de cada uno de los dedos de zinc. Sin embargo, la importancia funcional de la acetilación de GATA-1 no está totalmente explicada. La interacción entre GATA-1 y P300/CBP, y consecuentemente, la acetilación del factor de transcripción parecen ser responsables del aumento de su actividad transcripcional (Blobel et al., 1998). Se ha descrito que la acetilación de GATA-1 en pollo aumenta la afinidad de la proteína por el ADN (Boyes et al., 1998) pero no se ha podido demostrar ese efecto en ratón (Hung et al., 1999).

Se ha propuesto que la combinación de la acetilación y fosforilación lleva a la degradación de la proteína vía ubiquitina proteasoma (Hernandez-Hernandez et al., 2006). Los patrones de fosforilación de GATA-1 parecen variar durante la inducción de diferenciación de líneas celulares hematopoyéticas (Crossley and Orkin, 1994). Además, la fosforilación de GATA-1 parece estar dinámicamente regulada en progenitores hematopoyéticos en respuesta a señalización inducida por citoquinas (Kadri et al., 2005; Towatari et al., 2004).

Por último, se ha descrito la sumoilación de GATA-1 aunque todavía se desconocen los posibles efectos sobre la regulación de la proteína (Collavin et al., 2004).

### 2.2.3 Cofactores de GATA-1

La actividad transcripcional de GATA-1 también es modulada por la interacción con otras proteínas en complejos multiproteicos transcripcionalmente activos. Estos complejos han sido bien caracterizados en el linaje eritroide. En estas células, GATA-1 existe en un complejo con la proteína de dedos de zinc FOG-1 (*Friend Of GATA-1*) (Rodriguez et al., 2005; Tsang et al., 1997). Estudios en ratones (Crispino et al., 1999) y en humanos (Freson et al., 2002; Nichols et al., 2000) confirman la importancia de esta interacción en la maduración eritrocítica. Se han descrito al menos dos complejos GATA-FOG: uno que activa y otro que reprime debido a la presencia del complejo remodelador de la cromatina MeCP1/NURD (*Nucleosome Remodelling and Deacetylating*) el cual interacciona directamente con FOG-1 (Hong et al., 2005; Rodriguez et al., 2005).

GATA-1 también forma parte de un complejo pentamérico que produce activación transcripcional y que incluye SCL/TAL-1, E2A, LDB1 y LMO2 (Wadman et al., 1994). Ocupa secuencias reguladoras de los genes *Gata-1* (Valverde-Garduno et al., 2004; Vyas et al., 1999b), alfa globina (Anguita et al., 2004) y Glicoforina A (Lahlil et al., 2004) y ha sido aislado bioquímicamente en células eritroides (Rodriguez et al., 2005; Schuh et al., 2005). Cuando este complejo pentamérico contiene ETO-2 (Davis et al., 1999), proteína co-represora implicada en leucemogénesis humana (Gamou et al., 1998), el complejo es represivo, vía E2A (Goardon et al., 2006; Meier et al., 2006; Schuh et al., 2005).

También en células eritroides GATA-1 se une al factor de transcripción GFI1B (Rodríguez et al., 2005), el complejo remodelador de la cromatina ACH/WCRF (Kadam and Emerson, 2003; Rodríguez et al., 2005) y el factor de transcripción Fli-1 (Starck et al., 2003). Igualmente, las proteínas EKLF y SP1 han sido descritas por inmunoprecipitar con GATA-1 cuando son sobreexpresadas en sistemas celulares heterólogos (Gregory et al., 1996; Merika and Orkin, 1995). Finalmente, GATA-1 es capaz de unirse asimismo para formar multímeros (Crossley et al., 1995).

En megacariocitos, la naturaleza de los complejos que forma GATA-1 es menos conocida. GATA-1 se une a FOG-1 (Tsang et al., 1997; Wang et al., 2002), al complejo pentamérico (Schuh et al., 2005) y RUNX-1 (Elagib et al., 2003). Aparte de esto, no se ha descrito la existencia de otros complejos análogos a los presentes en células eritroides.

#### **2.2.4 GATA-1 y ciclo celular.**

Existen evidencias inconexas sobre la capacidad de GATA-1 para actuar coordinadamente sobre proliferación y diferenciación celular. La primera implicación de GATA-1 en la regulación de la maquinaria del ciclo celular fue descrita por Dubart y colaboradores en 1996, donde se demuestra que la expresión exógena de GATA-1, en fibroblastos NIH3T3 de ratón y en células hematopoyéticas FDCP-1, disminuye la tasa proliferativa, prolongando la fase S del ciclo celular (Dubart et al., 1996). Además de la capacidad de GATA-1 para interferir en el ciclo celular, se ha demostrado que sus niveles de expresión son diferencialmente regulados dependiendo de la fase celular en la que se encuentre. Así, se ha observado un aumento de sus niveles de expresión de ARNm y de proteína, en la fase S del ciclo, en células MEL (Cullen and Patient, 1997). Sin embargo, estudios acerca de los efectos de la sobreexpresión de GATA-1 sobre dicha línea celular eritroleucémica, muestran resultados contradictorios. Así, Rekhtman y colaboradores demuestran que la sobreexpresión de GATA-1 induce la diferenciación y el arresto de proliferación (Rekhtman et al., 1999), mientras que el grupo de Skoultchi describe que GATA-1 bloquea la maduración químicamente inducida en estas células (Whyatt et al., 1997).

Igualmente existen discrepancias acerca del efecto de GATA-1 sobre la proliferación en otras células hematopoyéticas. Así, mientras que la sobreexpresión de GATA-1 en las células mieloides, FDCW2, inhibe la entrada en fase S, tras la estimulación



por citoquinas (Seshasayee et al., 1998), en la línea celular mieloide M1 induce proliferación, bloqueando la diferenciación hacia macrófagos mediada por IL6 (Tanaka et al., 2000).

En base a estos resultados, parece claro que GATA-1 provoca diferentes efectos sobre la proliferación dependiendo de sus niveles de expresión y del ambiente celular en el que se encuentre. Se han definido dianas directas de GATA-1, específicas de determinados linajes como es el caso de ciclina D1 (Muntean, Pang et al. 2007) y *CDC6* (Vilaboa et al., 2004), descritas por jugar un papel esencial en la maduración megacariocítica terminal. En diferenciación eritroide, un trabajo reciente demuestra, que GATA-1 regula directamente la expresión del gen de p21 en dicho linaje (Papetti et al.).

Además, GATA-1 ha sido implicado en la regulación positiva de ciertos genes que afectan a la maquinaria de ciclo celular como inhibidores de progresión celular *p18<sup>INK4c</sup>* y *p27<sup>Kip1</sup>* e inhibidores del crecimiento *Btg2*, *Hipk2*, *JunB* y *Crep*, así como en la regulación negativa de genes con propiedades mitóticas como son *Myc*, *Myb* y *Nab2* (Rylski et al., 2003).

A falta de nuevas evidencias que confirmen y aclaren el papel que ejerce GATA-1 sobre el destino celular, en términos de proliferación y diferenciación, estos antecedentes ponen de manifiesto que la regulación de la maquinaria de ciclo celular es uno de los mecanismos de acción de la proteína.

### 2.3 Papel biológico de GATA-1

Numerosos estudios de pérdida y ganancia de función de GATA-1 evidencian la importancia de este factor, así como las consecuencias de la alteración de su expresión *in vivo*. Ratones nulos para *Gata-1* mueren debido a una severa anemia a día E10,5-11,5, coincidiendo con la etapa de eritropoyesis definitiva en el hígado fetal (Fujiwara et al., 1996). Sin embargo la eritropoyesis primitiva es bastante normal, mostrando únicamente defectos en la proliferación. Además, estos ratones presentan una acumulación de precursores megacariocíticos inmaduros en el hígado fetal (Pevny et al., 1995). Las hembras heterocigotas para *Gata-1* nacen normalmente, aunque con una anemia que desaparece en la edad adulta, debido presumiblemente a la selección de progenitores eritroides que expresan el alelo normal de *Gata-1* (Pevny et al., 1991).

Debido a que la supervivencia de los embriones nulos para *Gata-1* no era suficientemente larga como para hacer un estudio de los fenotipos, se han generado variantes con niveles reducidos de *Gata-1*, que también presentan defectos específicos en linaje eritroide y megacariocítico (Shivdasani et al., 1997).

Los ratones denominados GATA-1 low expresan en torno al 20% de los niveles de normales *Gata-1* (McDevitt et al., 1997b). Sin embargo la mayoría de estos animales mueren a día E13,5-14,5 por anemia. Aun así, nacen el 5% de los machos, algunos de los cuales mueren a los dos días del nacimiento mientras que otros sobreviven hasta la edad adulta con una anemia severa y una reducción aberrante del número de plaquetas (McDevitt et al., 1997b; Vyas et al., 1999a). Las hembras heterocigotas sufren de infertilidad, esplenomegalia y trombocitopenia, a pesar de que presentan un hematocrito normal.

Los ratones denominados como GATA-1.05, expresan menos del 5% de los niveles de *Gata-1*, mostrando como cabía esperar, un fenotipo más severo, muriendo a día E11,5 y E12,5 con una elevada acumulación de precursores megacariocíticos en el saco vitelino (Takahashi et al., 1997). Interesantemente, estos animales muestran un mayor riesgo de sufrir dos tipos de leucemia (leucemia eritroblástica en estadios tempranos y leucemia de célula B en estadios tardíos). Estas leucemias pueden ser prevenidas por restauración transgénica de la expresión de *Gata-1* (Shimizu et al., 2004b).

A día de hoy no ha sido totalmente definido el papel de GATA-1 en hematopoyesis así como los estadios sobre los que actúa. Estudios de sobreexpresión de GATA-1 sugieren que la proteína influye decisivamente en la determinación de linaje de progenitores multipotentes, al menos en pollo (Kulesa et al., 1995). Sin embargo, los modelos animales descritos anteriormente permiten una visión general del importante papel de GATA-1 en maduración y supervivencia celular de los linajes eritro-megacariocíticos.

### **3. GATA-1s**

Como se nombró anteriormente, GATA-1 parece tener al menos dos isoformas. La más larga, denominada GATA-1, representa la isoforma hematopoyética producida por traducción de un producto de ARN largo. La isoforma corta, GATA-1s pierde el dominio amino terminal por un procesamiento alternativo entre los exones 1 y 3 en humano (Rainis

et al., 2003). Interesantemente, la producción de ambas proteínas en ratón se lleva a cabo a partir de la traducción alternativa de un único ARNm (Calligaris et al., 1995; Halsey et al.). Mutaciones puntuales en el exón 2 (primer exón codificante) del gen de *GATA-1*, permiten la traducción exclusiva de la isoforma corta, que utiliza el codón 84 como codón de iniciación alternativo, siendo actualmente objeto de interés debido a su aparente implicación en situaciones pre-leucémicas y leucémicas asociadas con la trisomía del cromosoma 21 (Crispino, 2005; Groet et al., 2003; Hitzler et al., 2003; Wechsler et al., 2002).

*GATA-1s* ha sido descrita por poseer un menor potencial de transactivación que la proteína completa, debido a la ausencia del dominio amino terminal que podría actuar como sitio de unión a cofactores responsables del aumento de la actividad de *GATA-1* (Calligaris et al., 1995; Martin and Orkin, 1990). Estudios *in vivo*, donde el gen de *Gata-1* es remplazado por el de *Gata-1s* indican anomalías en hematopoyesis fetal con hiperproliferación transitoria de progenitores, que en un 10-15% de los embriones provoca la muerte (Li et al., 2005). Muchos de esos ratones sobreviven a la edad adulta mostrando sorprendentemente una hematopoyesis aparentemente normal.

Sin embargo, estos datos no coinciden con los recientemente publicado acerca del estudio de una familia sin trisomía en el cromosoma 21 que posee una mutación en el gen de *GATA-1* que provoca la expresión exclusiva de *GATA-1s* (Hollanda et al., 2006). El análisis de la médula ósea de estos pacientes muestra una displasia que afecta a tres linajes, reduciendo la eritropoyesis y la granulopoyesis y aumentando el número de megacariocitos, los cuales son pequeños e inmaduros. A pesar de que estos individuos poseen síntomas similares a pacientes con síndrome de Down, que sufren de leucemia megacarioblástica aguda, no existe un estado de malignidad ni progresión hacia leucemia. Todos estos estudios sugieren que *GATA-1s* es incapaz de soportar adecuadamente el desarrollo normal de la eritropoyesis y la megacariopoyesis en adulto.

### 3.1. *GATA-1s* y leucemia

*GATA-1s* está presenta en pacientes con trisomía del cromosoma 21 que desarrollan una leucemia mieloide aguda del subtipo M7, LMA-M7, también llamada

leucemia megacarioblástica aguda (LMCA) (Crispino, 2005; Rainis et al., 2003). Estos pacientes presentan un trastorno mieloproliferativo transitorio (TMT), caracterizado por la expansión de un número anormal de megacarioblastos en sangre periférica y en hígado, que afecta entre un diez y un veinte por ciento de los niños con síndrome de Down en la etapa neonatal (Vyas and Crispino, 2007). Interesantemente, en la mayor parte de los casos, el TMT se resuelve espontáneamente sin requerir tratamiento, aunque cerca de un 30% de los casos desarrolla una leucemia megacarioblástica aguda entre los 2 y los 6 años de edad. Alternativamente, aunque en contadas ocasiones, el desorden mieloproliferativo es causa directa de muerte como resultado de una fibrosis hepática masiva por infiltración megacarioblástica o por aparición de una insuficiencia cardiorrespiratoria (Al-Kasim et al., 2002). La incidencia de desarrollo de una leucemia megacarioblástica aguda en niños con síndrome de Down es de 1 en 500, con una media de edad de 4 años, lo que corresponde a un riesgo 500 veces mayor que el de niños sin Down (Creutzig et al., 1996; Lange et al., 1998; Zipursky, 2003). La LMCA es caracterizada por la presencia de células leucémicas de fenotipo correspondiente a megacarioblastos, tanto en sangre periférica como en medula ósea y es frecuentemente acompañada por mielofibrosis y trombocitopenia (Lange, 2000). Mutaciones en *GATA-1* aparecen en todos los casos de TMT o LMCA, pero sin embargo no son encontradas en otros tipos de leucemias (Mundschau and Crispino, 2006).

El efecto de la acción conjunta de GATA-1s y la trisomía del cromosoma 21 en transformación megacariocítica es un área de intensa investigación en la actualidad. Mientras que es claro que los niños con síndrome de Down tienen mayor riesgo de desarrollar leucemia, todavía no se han definido los factores genéticos que contribuyen a ello. El modelo establecido es que la leucemia megacarioblástica deriva de la evolución de un clon, ya presente en el síndrome mieloproliferativo transitorio, más que de un evento independiente, convirtiéndose el TMT en una fase pre-leucémica de la LMCA (Ahmed et al., 2004). Este estudio muestra que el tamaño de clon que lleva la mutación de *GATA-1s*, adquirida como primer evento en el útero (Shimada et al., 2004), puede variar considerablemente en el nacimiento. Eventos genéticos postnatales adicionales en las células residuales pre-leucémicas parecen ser necesarios para la generación de leucemia aguda, la cual ocurre en una fracción pequeña pero significativa de esos niños.

Debido a que el trastorno mieloproliferativo es capaz de resolverse espontáneamente, la combinación de trisomía del cromosoma 21 y la mutación de *GATA-1* parecen no ser suficientes para causar una leucemia, por lo que para identificar un tercer

evento, se han llevado a cabo estudios comparativos de expresión génica entre los blastos de TMT y LMCA en niños con síndrome de Down (McElwaine et al., 2004). Estos estudios muestran patrones de expresión similares, lo que concuerda con un origen clonal común a los dos trastornos hematopoyéticos. Sin embargo se han encontrado pequeñas diferenciadas. Las más destacables son el aumento de expresión de  $p18^{CDKN2C}$  (identificado como mediador de GATA-1 en el arresto de ciclo celular) en leucemia megacarioblástica, así como el aumento de *N-MYC* (oncogén derivado de neuroblastoma) en el síndrome mieloproliferativo transitorio. Destaca, sobre todo, la expresión exclusiva del antígeno tumoral PRAME en los blastos de la LMCA, a diferencia de los pertenecientes al TMT donde no aparece (McElwaine et al., 2004).

Igualmente se han identificado genes del cromosoma 21 como candidatos a actuar como oncogenes responsables del desarrollo de leucemia (Cantor, 2005). Un potente candidato es *RUNX-1*, factor de transcripción esencial en las primeras etapas hematopoyéticas, expresado en megacariocitos y encontrado previamente por tener un alto grado de mutación en leucemias y síndromes mielodisplásicos (Speck and Gilliland, 2002) (Cameron and Neil, 2004; Qiu et al., 2003). Otros genes del cromosoma 21, *APP*, *ETS2* y *ERG3* también han sido descritos como posibles candidatos, ya que se han observado fenómenos de amplificación en regiones que albergan estos genes en ciertas leucemias mieloides agudas (Balduis et al., 2004; Stankiewicz and Crispino, 2009). Sin embargo, a día de hoy, no se ha conseguido demostrar la implicación directa de dichos factores en la producción de leucemias en modelos animales.

### 3.2. GATA-1s frente a GATA-1.

A pesar del abundante trabajo publicado sobre GATA-1 y GATA-1s, los mecanismos por los cuales GATA-1 y/o su isoforma truncada afectan de manera directa, si lo hacen, a la capacidad intrínseca de los progenitores hematopoyéticos de proliferar de manera acoplada a la diferenciación, se desconocen actualmente.

Como queda descrito anteriormente, es sabido que los dos dedos de zinc de GATA-1 son esenciales para la actividad normal de la proteína, pero el papel funcional del dominio amino terminal, definido inicialmente por conferir el potencial de activación transcripcional de GATA-1 (Calligaris et al., 1995; Martin and Orkin, 1990; Yang and Evans, 1992) no está completamente claro a día de hoy. Existen evidencias de que GATA-

1s es incapaz de soportar el desarrollo normal de la eritropoyesis y megacariopoyesis *in vivo* (Hollanda et al., 2006); sin embargo, han sido varios los estudios que han sugerido que este dominio no es absolutamente requerido para la función de GATA-1. Así, la sobreexpresión de GATA-1s es capaz de sustituir a GATA-1 *in vivo* (Li et al., 2005; Shimizu et al., 2001) e *in vitro* (Visvader et al., 1995). Además se ha demostrado que dicho dominio es dispensable en el rescate de la diferenciación eritroide y megacariocítica en células ES deficientes para GATA-1 (Blobel et al., 1995; Weiss et al., 1997).

Ninguno de estos experimentos ha sido capaz de definir de manera definitiva el modo de acción de GATA-1s, siendo todos ellos un modelo de solo ciertos aspectos del papel de dicha isoforma en el desarrollo hematopoyético. El dominio amino terminal de GATA-1 parece ser requerido para tomar parte en las decisiones transcripcionales asociadas a la elección de linaje y el mantenimiento de un apropiado equilibrio entre represión y activación génica en la hematopoyesis definitiva. La pregunta de si GATA-1s tiene un único papel en hematopoyesis, o si es redundante con la presencia de un alelo completo y funcional de GATA-1 no ha sido contestada hasta el momento.

## *Objetivos*

---





El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar el papel de GATA-1 como regulador directo del equilibrio proliferación/diferenciación de progenitores eritromegacariocíticos y de la disfunción resultante por expresión de la isoforma mutante GATA-1s. Para ello nos propusimos los siguientes puntos concretos:

1. Caracterizar el efecto de la expresión de GATA-1s y otras isoformas de GATA-1 en progenitores hematopoyéticos de médula ósea de ratón adulto.
2. Analizar las diferencias entre el patrón de expresión de GATA-1 y GATA-1s en el contexto de la hematopoyesis y del ciclo celular.
3. Evaluar *ex vivo* la acción sensibilizadora de GATA-1s a lesiones leucemogénicas.



# ***Materiales y Métodos***

---



## 1. Inmunodepleción magnética.

Las células de médula ósea utilizadas en este trabajo se obtuvieron de ratones de entre dos y tres meses de edad, pertenecientes a la cepa C57BL/6J. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y el interior de fémures y tibias fue lavado mediante el uso de una aguja de 21G con tampón fosfato salino PBS (*Phosphate Buffered Saline*) suplementado con 2% de suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*, Gibco). Una vez obtenidas las células, en condiciones estériles, se lavaron dos veces con tampón de depleción desgaseado (PBS con BSA al 0,5%) y se pasaron a través de filtros de nylon de 30  $\mu\text{m}$  (Miltenyi Biotec), siguiendo las instrucciones del fabricante, para eliminar cualquier resto o tejido celular que pudiera bloquear el paso por la columna.

Las células linaje negativas ( $\text{Lin}^-$ ) fueron obtenidas por separación inmunomagnética, mediante el uso del kit *Lineage Cell Depletion* (Miltenyi Biotec), columnas de separación LD y la unidad de separación magnética QuadroMACS siguiendo las instrucciones del fabricante. El sistema de separación se basa en el uso de un conjunto de anticuerpos primarios biotinilados contra antígenos de superficie característicos de célula madura (TER-119, CD3e, CD11b, CD45R/B220, Ly-6G/Ly-6c (Gr-1) y CD41 (eBioscience), y posterior incubación con anticuerpos monoclonales anti-biotina conjugados a bolas magnéticas (Microbeads), utilizados como marcaje secundario. Las células marcadas magnéticamente quedan retenidas en la columna, mientras que las células linaje negativas pasan a través de ella.

## 2. Cultivos celulares

Las células  $\text{Lin}^-$ , obtenidas por inmunodepleción magnética fueron cultivadas en medio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Fetal Bovine Serum, Gibco), inactivado por calor, antibióticos (50U/ml de penicilina, 0,05mg/ml de estreptomocina), 50 ng/ml de IL6 (PeproTech), 10% de medio condicionado de la línea celular WEHI 3B+, fuente de IL3 murina, HEPES 0,1M, pH 7,5, 10% de medio condicionado de la línea celular K3, fuente de SCF (*Stem Cell Factor*).

La inducción hacia diferenciación megacariocítica terminal se llevó a cabo cultivando éstas células en medio IMDM, en ausencia de suero y presencia de trombopoyetina, TPO (50 ng /ml, Stem Cell Technologies)

Como células empaquetadoras de retrovirus, así como para los ensayos de transactivación, utilizamos la línea celular HEK-293T, células epiteliales de riñón humano, que expresan el antígeno T del virus SV40. Estas células fueron cultivadas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*, Gibco) inactivado por calor, y antibióticos (50U/ml de penicilina, 0,05mg/ml de estreptomina).

También se han utilizado dos líneas celulares de ratón, una de linaje megacariocítico (L8507) y otra de linaje eritroide (MEH), cedidas por el laboratorio de Hanna Mikkola, Universidad de los Ángeles, California (UCLA). Estas células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute-1640*, Gibco) suplementado con 10% de FBS y antibióticos (50U/ml de penicilina, 0,05mg/ml de estreptomina) y en medio DMEM (Gibco), suplementado de la misma forma, respectivamente

Los cultivos se mantuvieron en incubadores con una atmósfera de 37°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3. Plásmidos utilizados.**

El plásmido pCDNA3-GATA-1<sub>wt</sub>, cedido por el Dr. Nakano, Universidad de Osaka, Japón, fue además utilizado para generar el vector de expresión pCDNA3-GATA-1s, mediante el corte con la enzima EcoRI y posterior clonaje en pCDNA3.

El plásmido pLZR-IRES-GFP, a partir de ahora denominado, vector vacío, fue generado a partir del plásmido pLZR-IRES-ΔNGFR, cedido por el Dr. Bernard (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, CNIC, Madrid). Para ello se cortó el vector con las enzimas BamHI y NotI, para eliminar el ADNc de ΔNGFR, y se religó, tras romper previamente dichos extremos.

Los plásmidos retrovirales bicistrónicos y que permiten la expresión de las diferentes isoformas de GATA-1 etiquetadas con el epítipo c-MYC (*Myc Tagged*, MT) pLZR-MT-GATA-1s-IRES-GFP, pLZR-MT-GATA-1<sub>wt</sub>-IRES-GFP, pLZR-MT-GATA-1s+RBD-IRES-GFP denominados en este trabajo como GATA-1s, GATA-1<sub>wt</sub> y GATA-1s+RBD respectivamente, se obtuvieron a partir de las construcciones pCS2-MT-GATA-1s, pCS2-MT-GATA-1<sub>wt</sub> y pCS2-MT-GATA-1s+RBD disponibles en el laboratorio, que contenían el ADNc de ambas isoformas de GATA. Para ello se llevaron a cabo ligaciones

triples de fragmentos de las construcciones pLZR-IRES- $\Delta$ NGFR (BamHI/NotI), pLZR-IRES-GFP (NotI/SalI) y pCS2-MT-GATA-1s o pCS2-MT-GATA-1<sub>wt</sub> (BamHI/SalI).

Para la generación del vector mutante pLZR-MT-GATA-1+RBD<sup>mut</sup>-IRES-GFP, denominado a partir de ahora, GATA-1<sub>wt</sub>+RBD<sup>mut</sup>, se utilizó el kit de mutagénesis QuickChange Site-Directed de Stratagene. Siguiendo las instrucciones del kit, y un programa generado por Stratagene, generamos dos oligonucleótidos que contenían la mutación deseada de GATA-1, siendo cada uno complementario a cada una de las cadenas de ADN. Se realizó una reacción de PCR con la polimerasa *PFU Turbo* a partir del vector pCS2-MT-GATA-1<sub>wt</sub>, introduciendo la mutación en los productos de PCR. Las hebras parentales se digirieron con la enzima NotI y los productos se transformaron en bacterias. Los oligos utilizados fueron:

5'-GTATCCACTGCTCAACGGTATGAAGGGAATTCCTGGGGG-3' y 5'-CCC  
CCA GGA ATT CCC TCC ATA CCG TTG AGC AGT GGA TAC-3'

Los plásmidos pMSCV-Neo-HOXA9 y pMSCV-Neo-FLAG-MEIS1-IRES-HOXA9, denominados a partir de ahora HOXA9 y HOXA9/MEIS1 respectivamente, fueron cedidos Dr. Mark P. Kamps, UCSD (Universidad de San Diego, Los Ángeles).

Los plásmidos reporteros, pCDC6-166 y pCDC6-166-GATA<sup>M</sup>, que contienen el motivo de unión de GATA-1, WGATAR, y están acoplados al gen testigo de la proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*), se generaron por amplificación mediante PCR, del fragmento de 166 pb que contiene dicho motivo, usando como molde el ADNc de los plásmidos pHscdc6-(-4537/-2800), pHscdc6-(-4537/-2800)-GATA<sup>M</sup>, presentes en el laboratorio y descritos en (Vilaboa et al., 2004). Para ello se utilizaron los siguientes cebadores: 5'-ACAAAAGGATGCCAGACAGGT-3' y 5'-ATGGTTAGATTGGGTTGGGAA-3'. Finalmente se clonaron dichos fragmentos, tras previa ligación al vector pGEMT y corte con la enzima EcoRI, en el plásmido reportero SV40-GFP, disponible en el laboratorio.

El plásmido pCLEco, fue cedido por el Dr. Ignacio Palmero, del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols de Madrid, IIBM.

#### 4. Infección retroviral.

Para la producción de virus, las células HEK-293T fueron cotransfectadas de forma transitoria, mediante la técnica de fosfato cálcico, con 10 $\mu$ g del vector retroviral de interés y 10 $\mu$ g del vector pCLEco que expresa los genes virales gag, pol, env. Pasadas 48 horas, el

sobrenadante que contenía las partículas virales se filtró con un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y se añadió polibreno a una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Este sobrenadante se añadió a los cultivos a infectar, plaqueados el día anterior a una densidad de  $10^5$  células por pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos. Las células fueron sometidas a una centrifugación en placa a 2500 rpm durante 60 minutos a temperatura ambiente. Tras esto se retiraron  $\frac{3}{4}$  partes del sobrenadante viral y se añadió medio fresco. Este procedimiento se repitió a las 24 horas. Tras un día de recuperación con medio fresco, las células se purificaron en base a su fluorescencia por citometría de flujo preparativa en un FACS Vantage sorter (BD Biosciences) o bien se sometieron a selección con antibiótico (G418 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante un periodo de 7 días.

### **5. Curvas de crecimiento.**

Las diferentes células infectadas con las construcciones indicadas se plaquearon a día +1 tras la separación por FACS, a una densidad de 5000 células por pocillo en placas de 24 pocillos, por duplicado. En los tiempos indicados las células se recogieron, y se contaron con una cámara de Neubauer.

En el caso de las células infectadas con los oncogenes HOXA9/MEIS1 las células fueron plaqueadas a día +1 postselección, y contadas a día +5 postselección.

### **6. Ensayos de transactivación.**

Para la transfección con fosfato cálcico, un total de  $5 \times 10^6$  células HEK-293T fueron plaqueadas de 4 a 12 horas antes de la adición de los cristales de ADN generados por mezcla de ADN y HBS (concentraciones finales, NaCl 280 mM, HEPES pH 7,2 50 mM, 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) con  $\text{CaCl}_2$  (concentración final 125 mM) bajo agitación y 10 minutos de incubación a temperatura ambiente (cada condición se sembró por triplicado). Las cantidades de ADN utilizadas fueron: 10  $\mu\text{g}$  de plásmido reportero y 5 ó 10  $\mu\text{g}$  (según el caso) de vector de expresión de GATA-1, GATA-1s, o pcDNA3. El análisis se llevó a cabo 48 después; para ello las células fueron recogidas y lavadas con PBS 1x y resuspendidas en 300  $\mu\text{l}$  del propio tampón salino, conteniendo 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de yoduro de propidio (Sigma). Para el análisis se utilizó un FACScan y el programa CellQuest. Todos los experimentos se repitieron al menos 3 veces.



## 7. RT-PCR y PCR cuantitativa

La extracción de ARN total de células HEK-293T se llevó a cabo utilizando el método Tri Reagent (Sigma). Se utilizaron 2 µg del ARN total para sintetizar ADNc usando la transcriptasa reversa M-MLV (Promega). 1µl de la reacción fue utilizado para llevar a cabo reacciones estándar de PCR o PCR cuantitativa. La integridad del ARN se comprobó mediante análisis en un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies) y además, se analizó electroforéticamente en geles del 1% de agarosa teñidos con *SYBERSafe DNA Gel Stain* (Invitrogen).

Para la PCR cuantitativa se utilizó el equipo 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems), del Servicio de Secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols de Madrid, IIBM. Los datos fueron analizados por el método de la cuantificación relativa por comparación de  $C_t$  (*Threshold cycle*, umbral de detección establecido). En este método se calcula la media entre los triplicados, y los niveles de expresión del gen de interés se normalizan por la media de los triplicados del gen constitutivo utilizado (18S ARNr) en la misma muestra. A continuación, la cantidad de ARNm del gen de interés de una muestra determinada (M) se expresa en relación a los niveles de dicho ARNm en una muestra calibradora (C). Así la cantidad relativa de un gen de interés en una muestra m es igual a  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , donde  $\Delta\Delta C_t = (\Delta C_t)_m - (\Delta C_t)_C$ , siendo  $\Delta C_t = C_t$  gen interés –  $C_t$  gen constitutivo. Los oligonucleótidos utilizados se recogen en la Tabla 1.

## 8. Análisis de la expresión génica.

Para llevar a cabo el análisis de expresión génica, la extracción de ARN total de células de médula ósea se realizó mediante purificación por columnas utilizando el kit *RNeasy Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para eliminar posibles contaminaciones de ADN genómico se realizó un paso de digestión con DNAsa (Qiagen) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Se utilizó 0,5ug de ARN total para sintetizar ADNc utilizando el kit *RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array System* (SABiosciences) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Las concentraciones de ARN extraído se determinaron espectrofotométricamente en un *NanoDrop Spectrophotometer ND-100* (NanoDrop Biotechnologies). La integridad del ARN se comprobó mediante análisis en un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies). Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en el equipo 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems), del

Servicio de Secuenciación del IIBM. Los datos fueron analizados por el método de la cuantificación relativa por comparación de  $C_t$ .

**Tabla 1. Cebadores para el análisis génico por RT-PCR cuantitativa**

Gen	Especie	Cebador directo 5'-3'	Cebador reverso 5'-3'
<i>CDC6</i>	Humano	GTCCCCCTCACTCACATACACT	CCTCTTCCTGACAAATCTCCTG
<i>Cdc6</i>	Murino	ACGTCTGGGCGATGACAAC	TTGGTGGAGAACAGGGAGATAAC
<i>Sifn1</i>	Murino	CCAGACCAGCACCTGCAC	AAGAGGTTGGAGGGGGCTCAT
<i>Ccdn1a</i>	Murino	TGGCCAAGCCAGAAACACTT	GGCAAGGCACAATCTCATTTAAT
<i>Ccdn1d</i>	Murino	TTGTGCATCTACACTGAC	GAAGTGTCGATGAAATCGT
<i>Cdkn1a</i>	Murino	GCAGATCCACAGCGATATCCA	CGGACATCACCAGGATTG
<i>Cdkn1b</i>	Murino	GAAGCCCGGCCTTCGA	CATGTATATCTTCCTTGCTTCATAAAGC
<i>Cdkn2a</i>	Murino	CCCAACGCCCGAACT	CGTGAACGTTGCCCATCA
<i>Skp2</i>	Murino	GCCTCGACTTAAGTGACAGTATCATG	GAGGTGTTGGAGGTAGTTGAGTTGA
<i>Cks1b</i>	Murino	GAGTTCGAATACCGGCATGTC	GGGTTTTCGGGACCAGCTT
<i>Pescadillo</i>	Murino	CCCCATCATTGGCAGGTAATA	CGGGCATTACACAGTCAAA
<i>MMP-2</i>	Murino	AACTACGATGATGACCGGAAGTG	TGGCATGGCCGAACTCA
<i>MMP-9</i>	Murino	CGAACTTCGACACTGACAAGAAGT	GCACGCTGGAATGATCTAAGC

## 9. Separación por citometría de flujo preparativa.

La separación por citometría de flujo preparativa (FACS, *Fluorescence Activated Cells Sorting*), se llevó a cabo un día después de la purificación de las células Lin<sup>-</sup> por inmunodepleción magnética. Las células se recogieron mediante centrifugación a 1100 rpm durante 7 minutos, y se lavaron dos veces con PBS–EDTA 5mM, pH 8. A continuación se resuspendieron en el mismo tampón de lavado a una concentración de 100.000-200.000 células/ml, en tubos de citómetro estériles (BD Falcon™). El aparato utilizado para la separación de las células en base a su expresión de GFP fue un FacsVantage (Becton Dickinson), con software FacsDiva, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Madrid.

## 10. Marcaje de superficie.

El marcaje de superficie se realizó sobre las células Lin<sup>-</sup>, purificadas por inmunodepleción magnética, en un citómetro analítico FacScan (Becton Dickinson), con software CellQuest. Las células se resuspendieron en tampón de lavado (PBS, 2 % de FBS y 0,01 % azida de sodio) a una concentración entre  $4 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$  células/ml. Para evitar uniones inespecíficas, las células se bloquearon con Fc block (Miltenyi Biotec), durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, las células se incubaron con los anticuerpos correspondientes (ver tabla 2) durante 20 minutos a 4°C y oscuridad. Tras esto se llevó a cabo un lavado y se resuspendió en dicho tampón hasta su análisis. En el caso de los anticuerpos biotinilados se realizó una segunda incubación con estreptavidina, conjugada

al fluorocromo requerido (Ficoeritrina, PE, Complejo Peridina-clorofila), durante 10 minutos a 4°C y oscuridad. Los anticuerpos utilizados se recogen en la Tabla 2.

**Tabla 2. Anticuerpos utilizados en el marcaje de superficie**

Anticuerpo	Conjugado	Procedencia
CD16/CD32 (Fc III/II Receptor)	PE	BD Pharmingen™
TER-119	PE	BD Pharmingen™
CD41	PE	BD Pharmingen™
CD117 (c-Kit)	PE	BD Pharmingen™
CD11b (Mac1)	Biotina	BD Pharmingen™
CD117 (c-Kit)	Biotina	BD Pharmingen™
CD41	Biotina	eBioscience
TER-119	Biotina	BD Pharmingen™
CD34	Biotina	eBioscience
CD3e	Biotina	BD Pharmingen™
CD45R/B220	Biotina	BD Pharmingen™
Ly-6G/Ly-6c (Gr-1)	Biotina	BD Pharmingen™
Estreptavidina	PE	BD Pharmingen™
Estreptavidina	PercP-Cy5.5	BD Pharmingen™

## 11. Inmunofluorescencia

Las células de médula ósea se depositaron en un portaobjetos de cristal (15.000 células por pocillo) mediante cito-centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los citoespines se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos, se permeabilizaron en Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 15 minutos y se incubaron en solución de bloqueo (2% de BSA en PBS) toda la noche a 4°C. Al día siguiente se incubó, durante al menos horas, con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 3) en la misma solución de bloqueo, a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con PBS-Tritón 0,1%, y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos (Tabla 4), en solución de bloqueo. Tras 3-4 lavados, las muestras se montaron con Vectashield con DAPI (Laboratorios Vector), y se analizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM710, del servicio de Microscopía Confocal del IIBM.

## 12. Extractos nucleares de proteína.

Un total de  $10 \times 10^6$  a  $15 \times 10^6$  células fueron recogidas por centrifugación, a 2000 rpm durante 5 minutos, y resuspendidas en 500  $\mu$ l de tampón hipotónico, A (HEPES a 10 mM pH 7,9,  $MgCl_2$  a 1,5 mM, KCl a 10 mM, DTT a 0,5 mM, e inhibidores de fosfatasa y proteasas); después de incubarse durante 10 min a 4°C en dicho tampón, se añadieron 200

μl de tampón B (0.5% de Nonidet P-40 en tampón A) y se mantuvo otros 10 minutos a 4°C. A continuación, las células se centrifugaron durante 10 minutos, a 2000 rpm y a 4°C. El sobrenadante (conteniendo el contenido citoplasmático) fue desechado y el sedimento nuclear fue resuspendido en 150 μl de tampón hipertónico, C (HEPES a 20 mM pH 7,9, glicerol al 25%, NaCl a 0,42 M, MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM, EDTA a 0,2 mM pH 8,0, DTT a 0,5 mM, e inhibidores de fosfatasa y proteasas). Tras una incubación de 30 minutos a 4°C, el lisado nuclear fue centrifugado durante 20 minutos a 10000 rpm, a 4°C y el sobrenadante fue recogido. La fracción nuclear fue congelada y mantenida a -70°C hasta su uso. La cuantificación de los lisados se llevó a cabo mediante la técnica de Bradford (Bradford Protein Assay, Bio Rad).

### **13. Extractos totales de proteína.**

Se obtuvieron extractos de proteínas celulares totales homogeneizando las células con tampón RIPA: 50mM tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 0,1% dodecil sulfato sódico (SDS), 1%NP-40, 0,5 % deoxicolato sódico, inhibidores de fosfatas (1 mM de ortovanadato sódico, 1mM de glicerofosfato sódico), e inhibidores de proteasa (1mM fluoruro de fenil metil sulfonilo, PMSF; Complete 25x, Roche) sobre hielo durante 30 min. Para asegurar una lisis total las muestras fueron pasadas por una aguja de 0,5x16mm, e incubadas otros 30 minutos a 4°C. Los restos celulares fueron eliminados mediante centrifugación a 11.000 rpm y 4°C durante 15 minutos. La cuantificación de los lisados se llevó a cabo mediante la técnica de Bradford (Bradford Protein Assay, Bio Rad).

### **14. Inmunoblot ó *Western Blot*.**

El análisis de proteínas se realizó mediante el método de *Western Blot* ó Inmunoblot. Las muestras de proteína se separaron en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS), en los que se cargaron entre 35 μg de extracto proteico por cada carril. Posteriormente los geles se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Pall Corporation) mediante electrotransferencia semiseca a 2mA/cm<sup>2</sup> durante 1h a temperatura ambiente (aparato de transferencia de Pharmacia Biotech). La tinción con Rojo Ponceau se lleva a cabo rutinariamente sobre la membrana para comprobar el control de carga. A continuación, estas membranas se incubaron con tampón de bloqueo (0,1% Tween-20, 5% de leche desnatada en TBS) durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. A continuación las membranas se incubaron con tampón de bloqueo.

Posteriormente las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 3) diluïdos en tampón de bloqueo. Tras tres lavados con tampón de lavado (0,1% Tween-20 en TBS) se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidada (Tabla 4) y diluido en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras tres lavados con solución de lavado y mediante una reacción de quimioluminiscencia con el reactivo Supersignal West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce) se detectaron las bandas por autorradiografía (Konica).

**Tabla 3. Anticuerpos utilizados**

Antígeno	Anticuerpo	Origen	Dilución	Procedencia
CDC6	Ab-3	Monoclonal ratón	1/500	Calbiochem
GATA-1	C-20	Policlonal cabra	1/1000 WB; 2µg chIP	Santa Cruz sc-1233
GATA-1	N6 X	Monoclonal de rata	chIP: 2µg	Santa Cruz sc-265X
Schlafen1	I19	Policlonal cabra	1/200	Santa cruz sc-8898
MYC	9B11	Monoclonal ratón	1/1000 (IF)	Cell signaling
FLAG	F7425	Policlonal conejo	1/2000	Sigma
HOXA9	ab-92565	Policlonal conejo	1/1000	Abcam
β-actina	AC-15	Monoclonal ratón	1/10000	Sigma A5441

**Tabla 4. Anticuerpos secundarios**

Anticuerpo		Origen	Dilución	Procedencia
Anti-Ig ratón-HPR	WB	Policlonal cabra	1/5000	DAKO P 0447
Anti-Ig conejo-HPR	WB	Policlonal burro	1/5000	Amershan NA 934
Anti-Ig cabra-HPR	WB	Policlonal conejo	1/3000	DAKO P 0160
Anti-Ig ratón alexa 647	WB	Policlonal cabra	1/500	Molecular probes

## 15. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética, EMSA.

El anillamiento de oligos se llevó a cabo disolviendo 3 µg de cada oligo (a la misma molaridad) en un volumen final de 50 µl de tampón de anillamiento (10 mM de Tris, pH 7,5-8,0, NaCl a 50 mM y EDTA a 1 mM). Tras calentar a 95-100°C durante 5 minutos se dejó enfriar a temperatura ambiente entre 45 y 60 minutos. Una vez generada la doble cadena, se marcaron un total de 100 ng de oligo con 12,5 µCi de [<sup>32</sup>P]-dCTP, dNTPs (-dCTP) a 5 mM y 1 µl de la Enzima Klenow (Promega). Tras una doble incubación de 30 minutos a 37°C (añadiendo dCTP a 2.5 mM a la mitad del proceso y Tris/EDTA al final), se purificó la sonda por medio de columnas Sephadex<sup>®</sup> G-50 (Amersham). La reacción de unión de la sonda con los extractos nucleares se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 20 minutos en tampón de unión (glicerol al 40%, DTT a 2 mM, HEPES a 40 mM pH 7,9, MgCl<sub>2</sub> a 10 mM, EDTA a 0,4 mM y KCl a 200 mM), conteniendo 0,625 ng de oligo marcado con dCTP [<sup>32</sup>P] (sonda), 20µg de extracto nuclear de células HEK-293T y

40 µg/ml Poly (dIdC). Los oligos usados como competidores se añadieron en exceso (100x) a la reacción de unión. Para determinar la identidad de los complejos, se utilizaron 2 µg de anticuerpos anti-GATA-1 (C-20 Santa Cruz), que fue incubado con los extractos nucleares durante 2 horas, a 4°C, antes de la adición del oligo marcado. Los complejos ADN-proteína fueron separados de los oligos marcados no unidos, en un gel de poliacrilamida al 5%, no desnaturalizante, en TBE (Tris-Borate/EDTA). Después de secar el gel, los complejos unidos a la sonda se visualizaron por autorradiografía. Los oligos utilizados fueron: 5'-GTATGAGTTAGCAGGTGATAAG-3' y 5'-AGGTCCTTATCACCTGCTAACT-3'.

## **16. Inmunoprecipitación de cromatina, chIP.**

Las proteínas asociadas al ADN se entrecruzaron añadiendo formaldehído al 1% directamente al medio de cultivo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras detener la fijación con Glicina 0,125 mM durante 5 minutos, las células se lisaron con tampón de lisis 1 (Tris-HCl a 15 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> a 5 mM, KCl a 60 mM, DTT a 0,5 mM, NaCl a 15 mM, sacarosa a 300 mM, 1% de NP-40) y tampón de lisis 2 (SDS 1%, Tris-HCl, pH 8 a 20mM, EDTA a 20 mM, e inhibidores de proteasas), seguido de sonicación, para obtener fragmentos de cromatina entre 200 y 1000 pares de bases. Un 10 % del sobrenadante se usó para obtener cromatina total (INPUT) y el resto se diluyó 1:10 con tampón de dilución para la inmunoprecipitación (1,1 % Triton X-100, 0,01% SDS, 167 mM NaCl, 1,2 mM EDTA pH 8, 16,7 mM Tris-HCl, pH 8.0 e Inhibidores de proteasas). Se realizó un pre-aclarado con una matriz de Agarosa G (Pierce) y se incubaron con los anticuerpos específicos (Tabla 3) durante toda la noche en rotación a 4° C, seguido de incubación con 50 µl de la matriz Agarosa G (Fisher) durante 2 horas en rotación a 4° C. Tras centrifugación y lavados sucesivos con tampón A (HEPES pH 7,9 a 50mM, SDS 0,1%, 1% de Triton X-100, NaCl a 140 mM, EDTA 1 mM, 0,1% de deoxicolato sódico), tampón B (HEPES pH 7,9 a 50 mM, 0,1% de SDS, 1% de Triton X-100, NaCl a 500mM, EDTA a 1 mM, 0,1% de deoxicolato sódico), tampón LiCl (Tris-HCl a 20mM, pH 8, 0,5% de NP-40, 0,5% de deoxicolato sódico, EDTA a 1mM, LiCl a 250mM) y TE (Tris-HCl 10mM, pH 8, EDTA 0,1mM) se incubaron los inmunocomplejos con tampón de elución 1 (Tris-HCl a 50mM, pH 8, EDTA a 1mM, 1% de SDS) y con tampón de elución 2 (TE, 0,67% de SDS). La disociación de los complejos proteína-DNA se llevó a cabo calentando a 65° C. durante toda la noche, seguido de tratamiento con ARNasa (30 minutos a 37°C) y Proteinasa K (2

horas a 56°C). Tras una precipitación con fenol-cloroformo, la fracción de cromatina precipitada se usó para realizar la amplificación por PCR (2 µl por reacción) para los promotores dianas usando los oligonucleótidos descrito en la Tabla 5.

**Tabla 5. Cebadores utilizados en los ensayos de ChIP**

Gen	Especie	Cebador directo 5'-3'	Cebador reverso 5'-3'	Producto
<i>CDC6</i>	Humano	ACAAAAGGATGCCAGACAGGT	ATGGTTAGATTGGGTTGGGAA	166pb
<i>Sfn1</i>	Murino	CAATGATGTCCAATAGGTGTGC	CCCTACTTCCTACCCCCACCTTA	256 pb

### 17. Ensayos de migración e invasión *in vitro*.

Para evaluar la capacidad migratoria e invasiva de las células se utilizaron cámaras *transwell* con filtros de policarbonato de 6,5 mm de diámetro y 8µm de tamaño de poro (Becton Dickinson). Para la migración, los filtros fueron cubiertos durante 16 horas con 0,5% de gelatina (Gibco) en PBS. En el caso de la invasión, los filtros se cubrieron con 25 µg de Matrigel (Becton Dickinson) diluïdos en 100 µl de medio sin suero, y se dejaron secar toda la noche en la campana de flujo. Asimismo, las células estuvieron en ausencia de suero y citoquinas durante 16 horas previas a la migración. Se sembraron  $1 \times 10^5$  de células resuspendidas en medio sin suero en la parte superior del filtro, mientras que en la parte inferior se añadieron 250 µg de medio base conteniendo 10% de FBS, 50 ng/ml de IL6 (Peprotech), 10% de medio condicionado de la línea celular WEHI 3B+, fuente de IL3 murina, HEPES a 0,1M ,pH 7,5 y 10% de medio condicionado de la línea celular K3, fuente de SCF.

Tras incubación de 16 horas (en la migración) y 32 horas (en la invasión), se retiraron las células que no habían migrado/invadido con bastoncillos de algodón. Los filtros se fijaron con metanol y se montaron con Vectashield con DAPI (Laboratorios Vector). Se contó el número de células que habían migrado/invadido en un microscopio de fluorescencia ZEISS Axiophot.

### 18. Ensayos clonogénicos.

Los ensayos de formación de colonias se llevaron a cabo a día 1 tras la purificación por FACS, o bien a día 1 tras la selección con neomicina (día 15 tras la separación por FACS) en el caso de las células doblemente infectadas con GATA-1s y HOXA9/MEIS. Para ello se empleó un medio comercial semisólido (Methocult® M3231, Stem Cell Technologies), que contiene una base de metilcelulosa. Las células purificadas, Lin<sup>-</sup>/GFP<sup>+</sup>, se resuspendieron en 100 µl de medio completo IMDM suplementado con antibióticos



(50U/ml de penicilina, 0,05mg/ml de estreptomicina), 50 ng/ml de IL6 (PeproTech), 10% de medio condicionado de la línea celular WEHI 3B+, fuente de IL3 murina, HEPES 0,1M, pH 7,5 10% de medio condicionado de la línea celular K3, fuente de SCF (*Stem Cell Factor*) y 1ml de Methocult. Los ensayos se realizaron por triplicado, sembrando 500 células por pocillo en placas de 24 pocillos. Después de 7-10 días de cultivo, se contabilizaron el número de colonias y el número de células por colonia. Las sucesivas rondas de plaqueo se realizaron sembrando el número de células correspondiente al 10% del total de células existentes en el control.

Las colonias megacariocíticas y eritroides se llevaron a cabo a día 1 tras la purificación por FACS. Para ello se empleó un medio comercial MegaCult™ y colágeno (Stem Cell Technologies), siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial, suplementado con IL6 (PeproTech) e IL3 (medio condicionado de la línea celular WEHI) y trombopoyetina, TPO 50 ng /ml, o eritropoyetina, EPO (4U/ μl) (StemCell Technologies) en el caso de las megacariocíticas y las eritrocíticas respectivamente. En ambos casos se plaquearon 600 células por pocillo por triplicado usando placas de 24 pocillos para las colonias eritroides y en portaobjetos de doble cámara (Nalg Nunc™ International) en el caso de las colonias megacariocíticas.

La tinción con acetilcolinesterasa se llevó a cabo, tras deshidratación de los geles de colágeno con acetona, mediante una solución que contenía acetilcolina a 0,5mg/ml (Sigma), citrato de sodio a 5 mM (Fisher), sulfato de cobre a 3 mM (Fisher) y ferrocianato de potasio a 0,5 mM (Sigma). Tras tres horas de tinción en cámara húmeda, las células se fijaron durante 10 minutos con etanol al 95%, y tras lavar con agua templada se dejaron secar al aire. La contratinción con hematoxilina de Harris (Sigma), se llevó a cabo durante 30 minutos. Finalmente se lavaron con agua templada y se montaron con Vectashield (Laboratorios Vector).



## *Resultados*

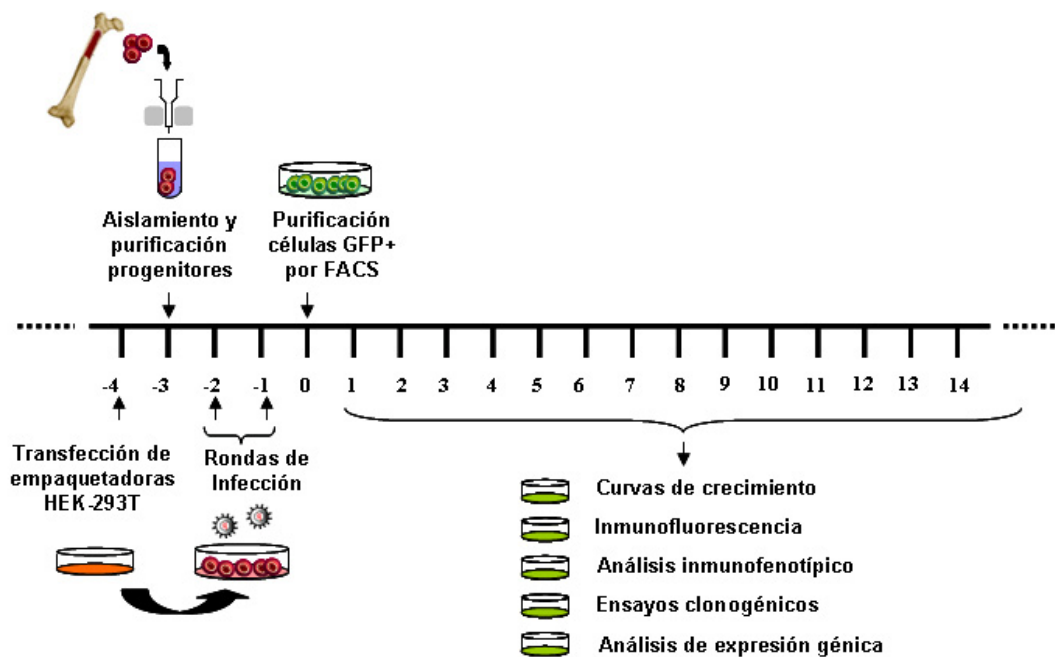
---



## 1. Hiperproliferación de progenitores hematopoyéticos por expresión ectópica de la isoforma GATA-1s.

### 1.1. Efecto de GATA-1s sobre la proliferación celular.

Como queda descrito anteriormente, la mutación que da lugar a la forma leucemogénica de GATA-1 (GATA-1s) conlleva la aparición de un síndrome mieloproliferativo con progresión a leucemia megacarioblástica aguda (Wechsler et al., 2002). Con el fin de investigar el papel que juega GATA-1s en la adquisición del fenotipo transformado, decidimos estudiar el efecto de la sobreexpresión de dicha proteína mutada en células inmaduras de médula ósea de ratón. El diseño experimental seguido para abordar esta parte del trabajo se esquematiza en la Figura 4.

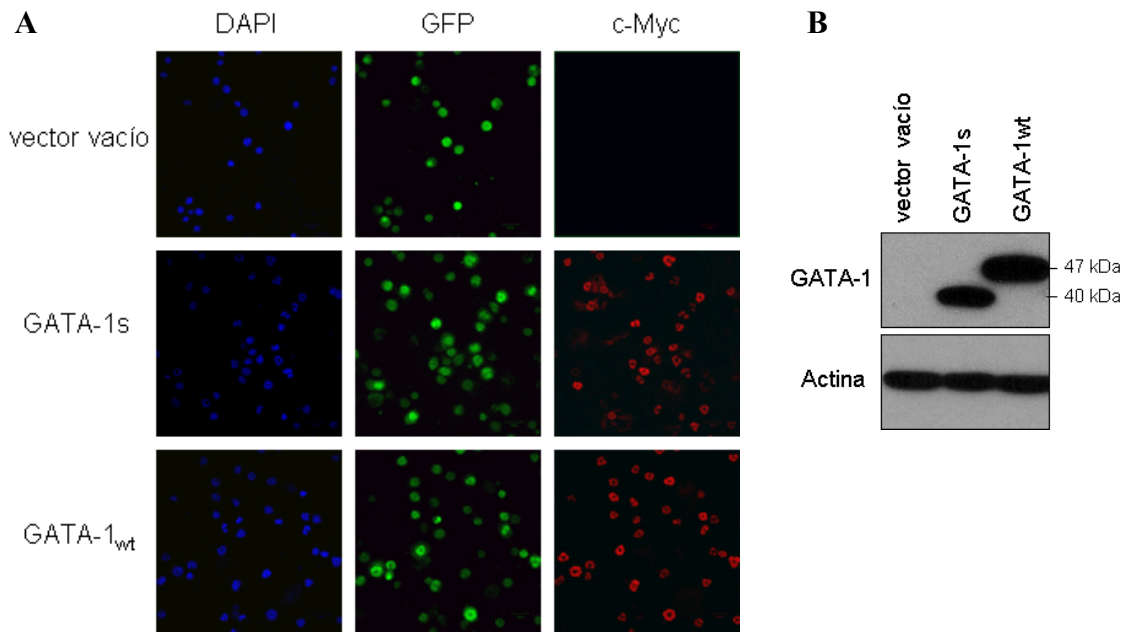


**Figura 4.** Diseño experimental de obtención, purificación y sobreexpresión de proteínas de progenitores hematopoyéticos de médula ósea de ratón adulto. Para la producción de partículas virales se utilizaron como empaquetadoras las células HEK-293T. Dos días después de la transfección con los vectores retrovirales, se recogió el sobrenadante viral, y se añadió al medio de cultivo de las células Lin<sup>-</sup>, previamente obtenidas y purificadas por inmunodeplección magnética de células de médula ósea de ratón adulto. Se hicieron dos rondas de infección mediante centrifugación en placa, tras lo cual las células fueron separadas en base a su contenido en GFP, mediante citometría de flujo preparativa, FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*). Tras la separación se llevaron a cabo los distintos experimentos.

Para ello, mediante transducción retroviral, expresamos ectópicamente la proteína en células progenitoras hematopoyéticas (células Lin<sup>-</sup>), previamente purificadas por inmunodeplección magnética. Utilizamos el vector retroviral bicistrónico pLZR-IRES-

GFP, que permite la expresión de un único transcrito que contiene el ADNc de interés, en este caso GATA-1s o GATA-1<sub>wt</sub>, seguido de una secuencia IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) y un segundo ADNc, que codifica para la proteína verde fluorescente, GFP (*Green Fluorescent Protein*), que nos sirve de testigo y nos permite separar por citometría de flujo preparativa, las células GFP positivas.

Las células GFP positivas se cultivaron durante 5 días y la expresión de GATA-1<sub>wt</sub> y GATA-1s se determinó por inmunofluorescencia y detección del epítipo c-MYC humano, etiqueta fusionada a ambas proteínas (Figura 5A). Por otra parte, el análisis por *Western blot* reveló la correcta expresión y diferencia de tamaño de la proteína silvestre y su forma mutada (Figura 5B).

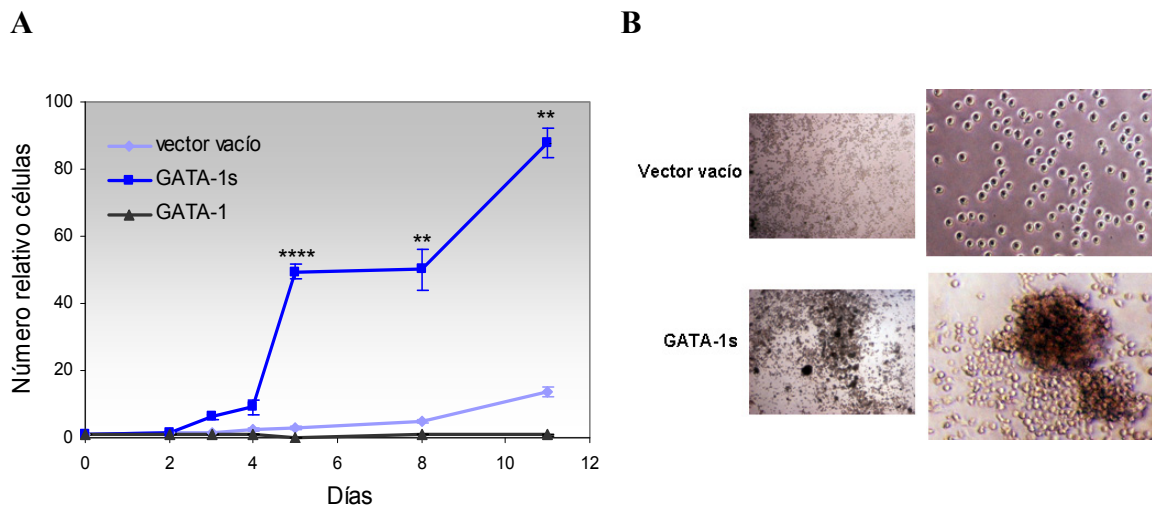


**Figura 5. Sobreexpresión de GATA-1<sub>wt</sub> y GATA-1s en células Lin<sup>-</sup> aisladas.** (A) Imágenes de microscopía confocal de células de médula ósea de ratón transducidas con virus que contenían vector vacío, GATA-1<sub>wt</sub> y GATA-1s, separadas en base a su expresión de GFP por FACS y sometidas a análisis por inmunofluorescencia indirecta del epítipo humano c-MYC (rojo). Los núcleos celulares se visualizaron mediante tinción con DAPI. (B) Análisis por *Western Blot* de los niveles de GATA-1 en las células HEK-293T transfectadas con la proteína silvestre (GATA-1<sub>wt</sub>), GATA-1s o vector vacío. La hibridación se realizó con un anticuerpo que reconoce el carboxilo terminal de GATA-1.

En primer lugar analizamos el posible efecto de GATA-1s sobre la proliferación celular. Para ello realizamos curvas de crecimiento de las células GFP<sup>+</sup> aisladas. Como se muestra en la Figura 6<sup>a</sup> la sobreexpresión de GATA-1s produce un aumento estadísticamente significativo de la proliferación. Por el contrario, GATA-1<sub>wt</sub>, no solo no produce el mismo efecto, sino que provoca una inhibición de la proliferación celular.

Debido a este papel antiproliferativo, así como al número siempre limitado de células que manejamos en cada experimento, decidimos centrar nuestros esfuerzos en la caracterización de GATA-1s. Por ello, en la siguiente serie de experimentos, se analizaron las células que expresan dicha isoforma frente a las transducidas con el vector vacío.

Como se muestra en la figura 6B, las células que sobreexpresaban GATA-1s, mostraban un comportamiento llamativo, caracterizado por la formación de acúmulos celulares en medio líquido, que sugerían un crecimiento clonal.



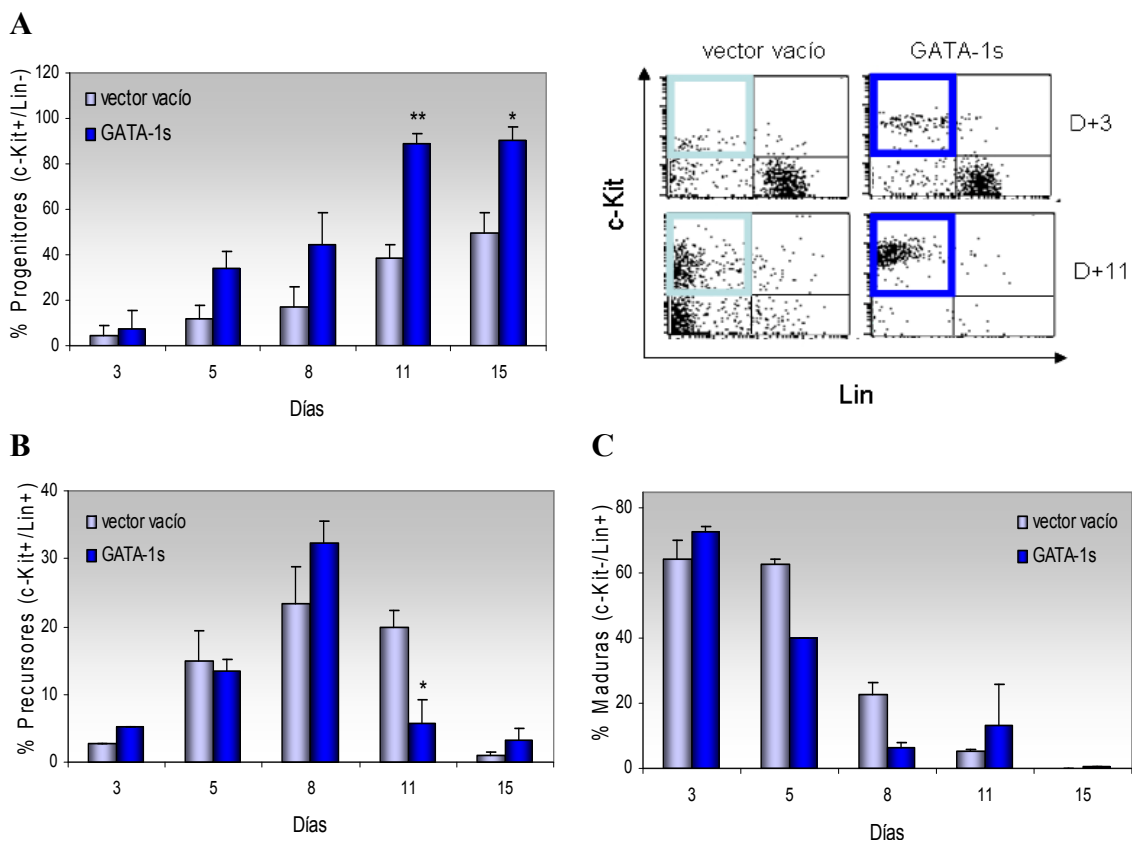
**Figura 6. GATA-1s aumenta la proliferación celular.** (A) Curvas de crecimiento de células Lin<sup>-</sup> transducidas con vector vacío, GATA-1<sub>wt</sub> o GATA-1s. Se contó el número de células en los tiempos indicados tras la separación por FACS, y se representa el número de células relativos a día 0. (B) Imágenes de microscopía, a día 5 de cultivo, de células infectadas con vector vacío ó GATA-1s. Aumento 100x. El panel de la derecha muestra una imagen a escala ampliada a para una mejor visualización. Se representa la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001; \*\*\*\*, p<0,0001).

Estos resultados indican que la expresión ectópica de GATA-1s confiere una ventaja proliferativa a las células más inmaduras de médula ósea de ratón, así como un comportamiento característico de formación de acúmulos celulares en suspensión.

## 1.2. GATA-1s induce la hiperproliferación de células progenitoras.

Las células hematopoyéticas inmaduras, Lin<sup>-</sup>, diferencian espontáneamente en cultivo hacia linaje mieloide mayoritariamente. Este hecho, se ve favorecido por la extensión de nuestro protocolo, que se alarga 96 horas en el tiempo (24 horas de precultivo, dos rondas de infección y separación por FACS). A pesar de la utilización de una combinación de citoquinas, que aseguran el máximo mantenimiento de las células en

un estado inmaduro, resulta casi imposible mantener la totalidad de la población celular completamente indiferenciada. Debido a esto, quisimos determinar qué tipo de células hiperproliferaban. Para ello, llevamos a cabo un análisis, mediante citometría de flujo, en base a la expresión de un marcador de superficie característico de célula progenitora (c-Kit), y de diferentes antígenos marcadores de células diferenciadas hacia los distintos linajes (Lin). Como muestra la Figura 7A, GATA-1s produce un aumento del porcentaje de células c-Kit<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup>, aproximándose al 100% de la población a día 15 de cultivo, en claro contraste con las células control. Por otra parte, no se detectaron cambios en el porcentaje de precursores hematopoyéticos (caracterizados por el doble marcaje de c-Kit y Lin) (Figura 7B), ni tampoco en el porcentaje de células maduras (c-Kit<sup>-</sup>, Lin<sup>+</sup>) (Figura 7C).

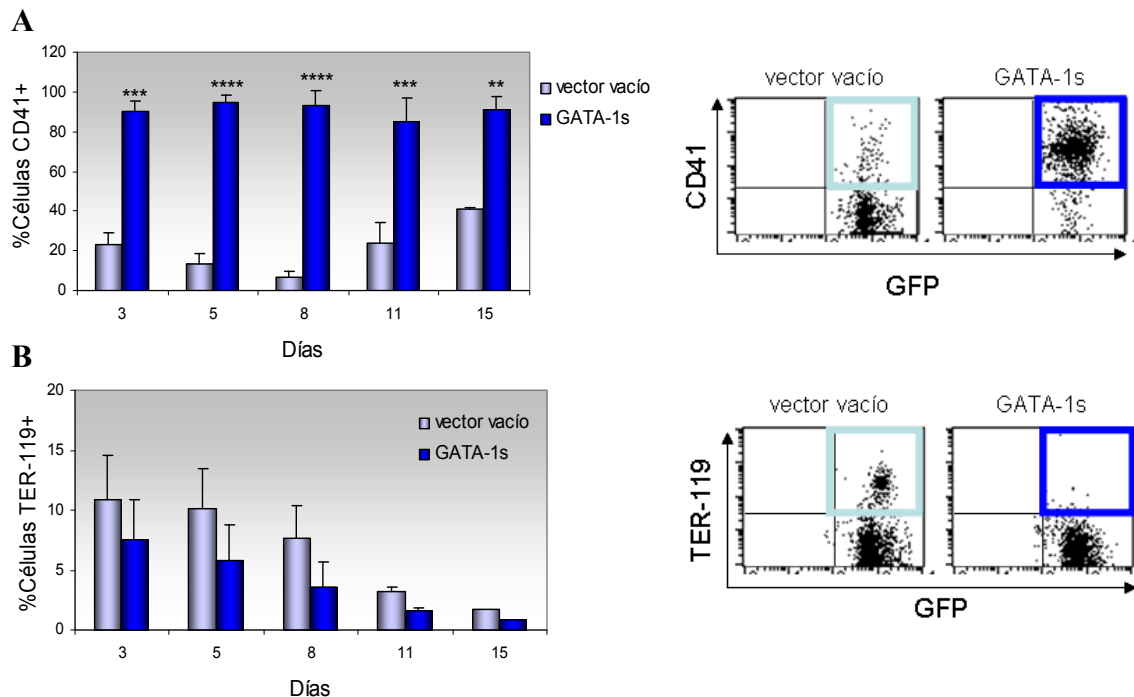


**Figura 7. GATA-1s provoca la hiperproliferación de progenitores hematopoyéticos.** Análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares GFP<sup>+</sup> transducidas con vector vacío o GATA-1s, en base a los antígenos de superficie c-Kit y Lin. (A) Análisis del porcentaje de progenitores hematopoyéticos, definidos como c-Kit<sup>+</sup>/Lin<sup>-</sup>. El panel de la derecha muestra los gráficos de puntos correspondientes a día 3 y día 11 tras la separación por FACS. Los marcos de color azul claro y azul oscuro muestran la población definida como progenitora en las células infectadas con vector vacío y GATA-1s respectivamente. (B) Análisis del porcentaje de precursores hematopoyéticos, definidos como c-Kit<sup>+</sup>/Lin<sup>+</sup>. (C) Análisis del porcentaje de células maduras, definidas como c-Kit<sup>-</sup>/Lin<sup>+</sup>. Se representa la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*, p<0,05; \*\*, p<0,01).

En base a estos datos, concluimos que la sobreexpresión de GATA-1s sobre células adultas de ratón produce una hiperproliferación de las células hematopoyéticas más inmaduras.

### 1.3. GATA-1s induce hiperproliferación de progenitores megacariocíticos.

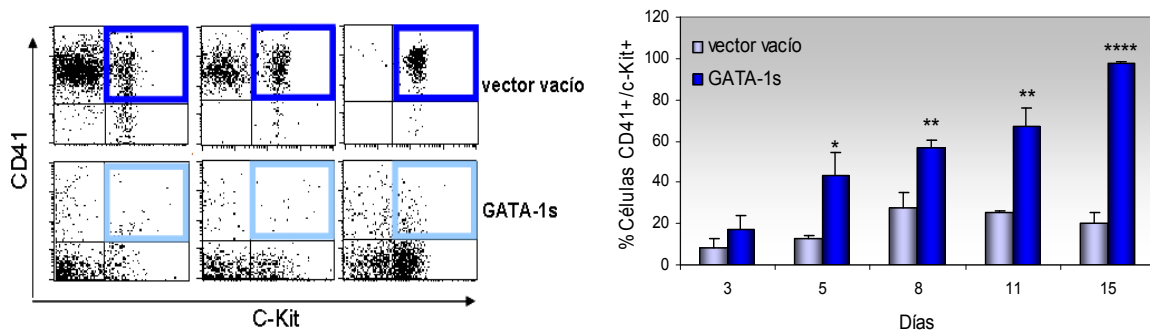
Dado que GATA-1 es un factor clave en la diferenciación eritroide y megacariocítica (Pevny et al., 1991; Shivdasani et al., 1997), quisimos estudiar el efecto de GATA-1s sobre ambos linajes. Para ello, analizamos los niveles de expresión de marcadores de superficie característicos de células eritroides (TER-119) y megacariocíticas (CD41) por citometría de flujo. Como muestra la Figura 8A, las células que sobreexpresan GATA-1s sufren un aumento significativo de los niveles de CD41 frente al control.



**Figura 8. GATA-1s potencia la diferenciación hacia linaje megacariocítico.** Análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares GFP<sup>+</sup> transducidas con vector vacío o GATA-1s, en base a los antígenos de superficie CD41 y TER-119 (A) Análisis del porcentaje de células pertenecientes a linaje megacariocítico definido como CD41<sup>+</sup>. El panel de derecho es una muestra representativa de los gráficos de puntos utilizados para el análisis, a día 8 tras la separación por FACS. Los marcos de color azul claro y azul oscuro muestran la población perteneciente a linaje megacariocítico en las células infectadas con vector vacío y GATA-1 respectivamente (B) Análisis del porcentaje de células pertenecientes a linaje eritroide definido como TER-119<sup>+</sup>. El panel de derecho es una muestra representativa de los gráficos de puntos utilizados para el análisis. En este caso los marcos de color azul claro y azul oscuro muestran la población perteneciente a linaje eritroide en las células infectadas con vector vacío y GATA-1 respectivamente. Se representa la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001; \*\*\*\*, p<0,0001).

La elevada expresión de CD41 se manifiesta desde los primeros días, afectando a la práctica totalidad de la población. Por el contrario, las células que expresan TER-119 (marcador eritroide), disminuyen paulatinamente su expresión, tanto en la población control como en la transducida con GATA-1s (Figura 8B).

El análisis conjunto de expresión de los marcadores c-Kit y CD41 reveló la existencia de una población altamente proliferativa, c-Kit positiva y perteneciente a linaje megacariocítico, que constituía la práctica totalidad de la población celular a día 15 de cultivo (Figura 9).



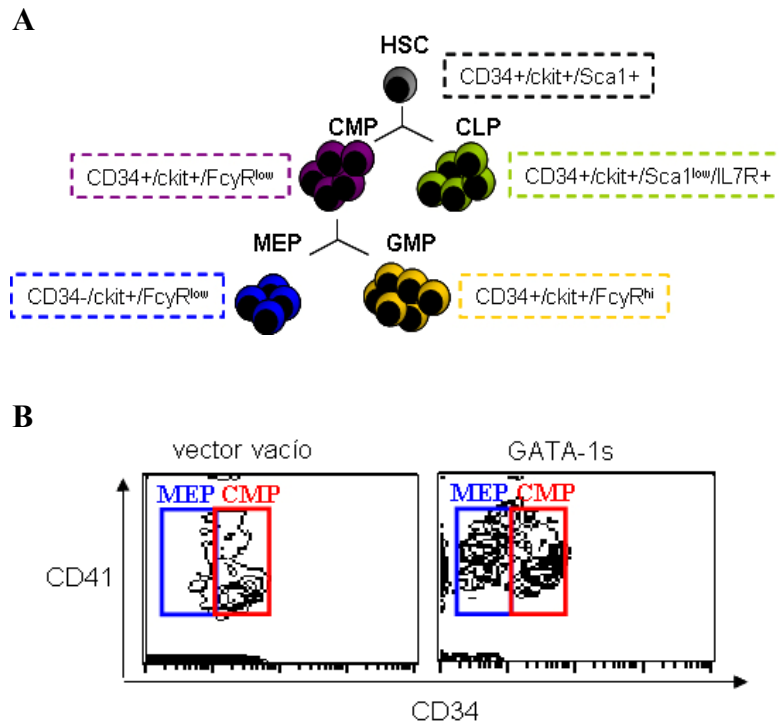
**Figura 9. GATA-1s provoca la aparición de una población que expresa los marcadores c-Kit y CD41.** El panel izquierdo es una muestra representativa de los gráficos de densidad utilizados para el análisis. El gráfico de la derecha recoge los porcentajes de células que presentan dicho perfil antigénico a lo largo del tiempo tras la separación por FACS. Se representa la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

En base a estos datos, podemos concluir que las células que hiperproliferan por sobreexpresión de GATA-1s son progenitores megacariocíticos, ya que coexpresan los marcadores c-Kit (de progenitor) y CD41 (de megacariocito).

#### 1.4. Caracterización de las células c-Kit<sup>+</sup>/CD41<sup>+</sup>.

Las distintas subclases de progenitores hematopoyéticos vienen definidas por características antigénicas que se resumen en la Figura 10A (Akashi et al., 2000). Basándonos en dicha clasificación, y con el objetivo de identificar la naturaleza de los progenitores que hiperproliferaban en nuestros cultivos, así como su relación con los progenitores eritro-megacariocíticos, MEPs, descritos en médula ósea, analizamos más en profundidad, su perfil inmunofenotípico.





**Figura 10. GATA-1s provoca hiperproliferación de progenitores eritromegacariocíticos, MEPs.**

(A) “Modelo Weissman” descrito previamente (Akashi et al., 2000), que identifica a los progenitores hematopoyéticos en base a sus características inmunofenotípicas.

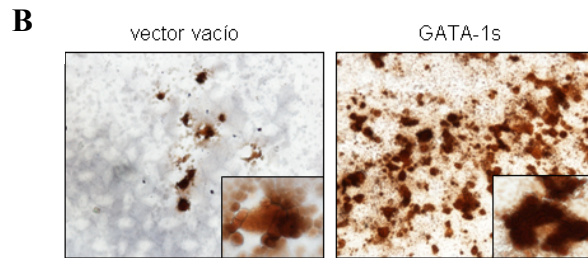
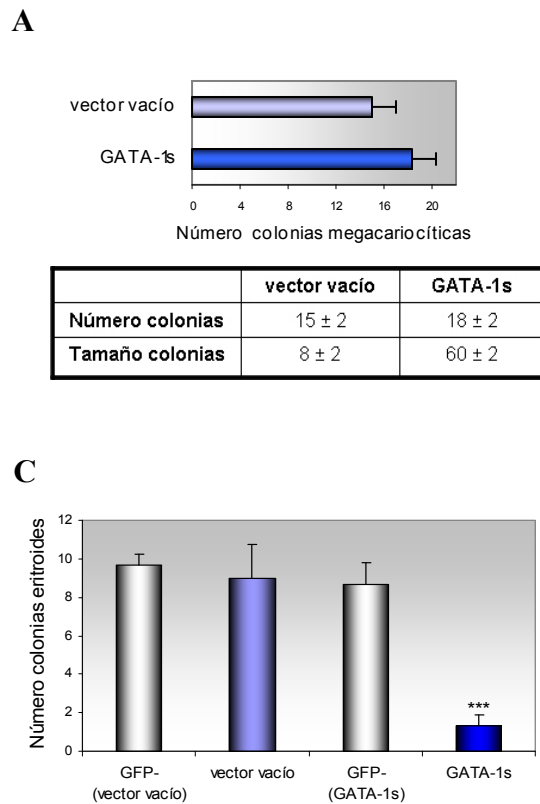
(B) Diagramas de contorno de células  $Lin^-$ ,  $c\text{-Kit}^+$ ,  $GFP^+$ ,  $FcyR^{low}$ , previamente transducidas con vector vacío y GATA-1s en base a los marcadores inmunofenotípicos CD41 y CD34. El análisis se realizó mediante citometría de flujo a día 11 de cultivo.

Low (Expresión baja); Hi (Expresión alta)

Como se muestra en la Figura 10B, las células que expresaban GATA-1s, presentaban una proporción muy elevada de progenitores eritro-megacariocíticos (MEPs), a diferencia de las células control. Estos MEPs, caracterizados de acuerdo al “modelo Weissman” por el perfil antigénico  $c\text{-Kit}^+/Lin^-/FcyR^{low}/CD34^-$ , (Akashi et al., 2000; Rieger et al., 2009), se distinguían por la elevada expresión del marcador CD41 en la práctica totalidad de la población. Igualmente, la expresión de CD41 en los progenitores  $c\text{-Kit}^+/Lin^-/FcyR^{low}/CD34^+$ , identificados en ese mismo modelo como CMPs, era algo superior en las células transducidas con GATA-1s.

A continuación, quisimos caracterizar la funcionalidad de estos progenitores. Para ello llevamos a cabo ensayos clonogénicos, que nos permiten medir la capacidad de proliferación y renovación de dichos progenitores además de su potencial diferenciador. Estos ensayos se basan en la formación de colonias a baja densidad, siendo el mejor método para el análisis de la proliferación clonal. El análisis de las colonias, generadas en medio que sostiene la diferenciación megacariocítica mostró que GATA-1s provoca un aumento en el tamaño y, aunque en menor proporción, en el número de sus colonias, constituidas por poblaciones mucho más densas que las células transducidas con el vector vacío (Figura 11A). La tinción con acetilcolinesterasa, que se expresa a altos niveles en megacariocitos murinos específicamente, reveló que los MEPs que expresan GATA-1s

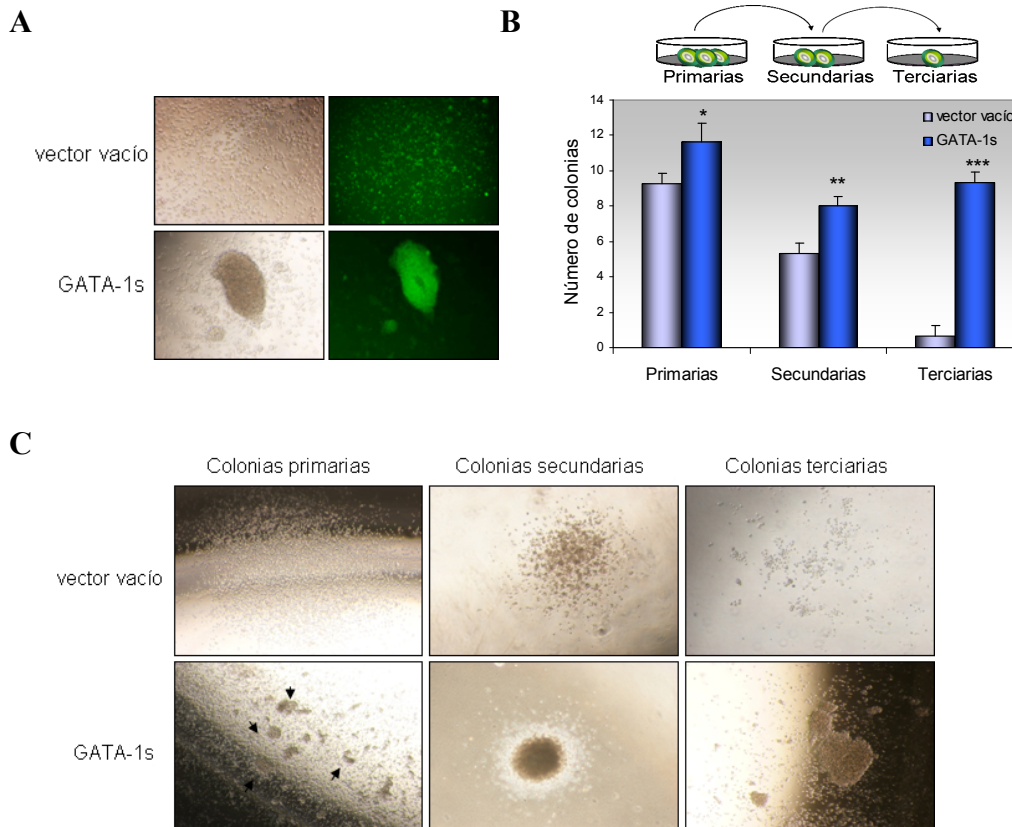
mantiene la capacidad de diferenciación terminal (Figura 11B). Por el contrario, el número de colonias eritroides generadas por la isoforma mutante de GATA-1, fue significativamente muy inferior al producido por las células control (Figura 11C).



**Figura 11. La sobreexpresión de GATA-1s no impide la diferenciación terminal hacia linaje megacariocítico.** (A) El gráfico superior representa el número de colonias megacariocíticas, a día 8 de cultivo. La tabla inferior recoge el número de colonias, así como el tamaño de las mismas (definido en base al número de células por colonia). (B) Tinción con acetilcolinesterasa de colonias megacariocíticas. Las fotografías corresponden a día 8. (C) Número de colonias eritroides a día 8. Para confirmar estos datos, se compararon los resultados obtenidos con las células GFP<sup>+</sup>, que habían sido infectadas con vector vacío o GATA-1s, con sus respectivos controles GFP<sup>-</sup>, obtenidos tras la separación por FACS. Se representa la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*\*\*, p<0,001).

Estos resultados indican que la sobreexpresión de GATA-1s, provoca un sesgo en los progenitores eritro-megacariocíticos (MEPs) favoreciendo la diferenciación, prácticamente exclusiva, hacia linaje megacariocítico.

Adicionalmente, realizamos ensayos secuenciales de formación de colonias en metilcelulosa, con el mismo medio en el que llevamos a cabo los cultivos líquidos, que no induce específicamente ningún linaje en concreto, para averiguar la capacidad de renovación de estas células. GATA-1s produce colonias de gran tamaño y densidad (Figura 12A). Asimismo, los progenitores así generados poseen un mayor potencial de renovación, ya que mantienen la capacidad clonogénica tras sucesivas rondas de plaqueo. Muestra de ello es la presencia de un número significativo de colonias terciarias, frente al número casi despreciable generado en las células control (Figura 12B y 12C). Sin embargo, cuando estas células fueron co-trasplantadas en ratones singénicos irradiados subletalmente, no fueron capaces de autorenovarse, como mostró la ausencia de células GFP<sup>+</sup> a los tres meses tras el trasplante (datos no mostrados).



**Figura 12. Ensayos clonogénicos de células que expresan la isoforma GATA-1s.** (A) Imágenes representativas de colonias en medio semisólido con metilcelulosa, a día 8 de cultivo. El panel de la derecha muestra la expresión de GFP de dichas colonias. (B) Ensayos secuenciales de formación de colonias. Se representa el número de colonias primarias, secundarias y terciarias generadas por las células transducidas con vector vacío ó GATA-1s. (C) Imágenes de colonias primarias secundarias y terciarias, a día 8, día 16 y día 24 de cultivo respectivamente tras la separación por FACS. Se representa la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

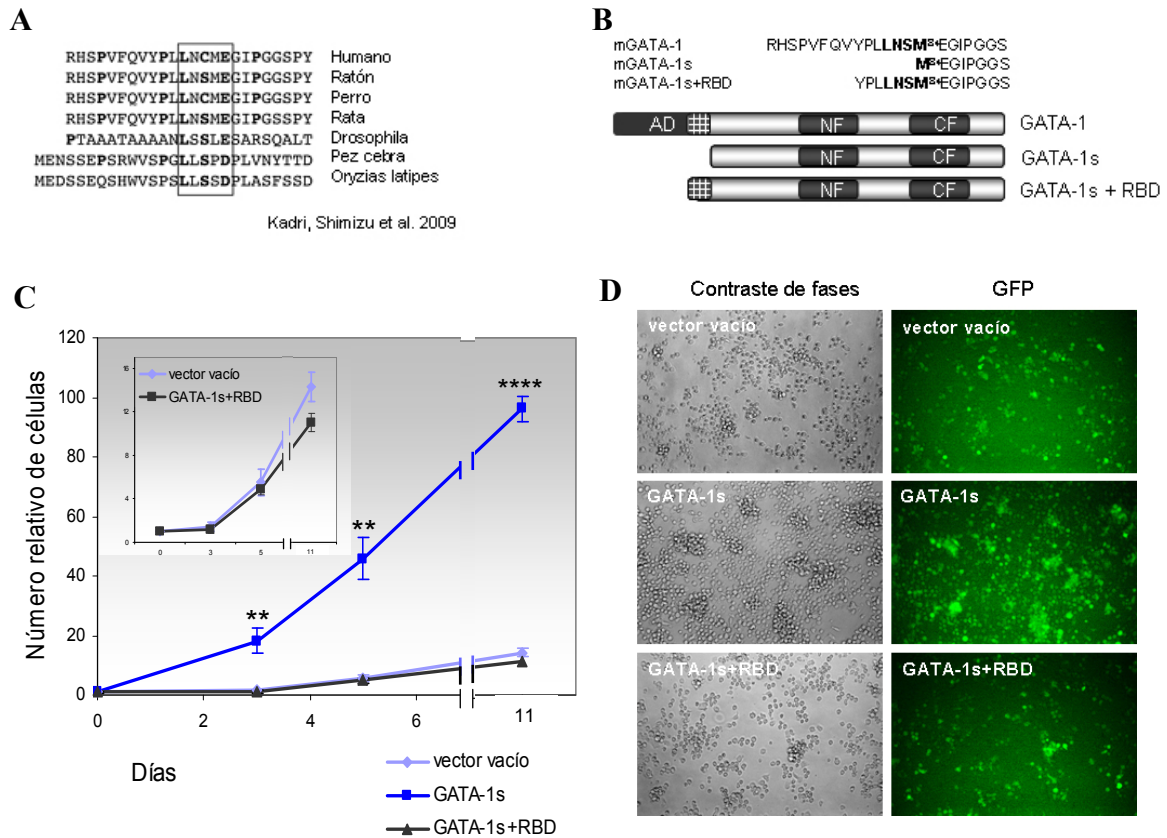
Estos resultados indican que GATA-1s aumenta el potencial de proliferación de un único tipo de célula progenitora, que comparte características fenotípicas con los progenitores MEPs, pero con distinta funcionalidad.

## 2. Estudio funcional de GATA-1s y GATA-1<sub>wt</sub>.

### 2.1 Papel del dominio unión a retinoblastoma en la generación de progenitores megacariocíticos hiperproliferantes.

Ha sido descrito recientemente que GATA-1 forma un complejo trimérico con la proteína retinoblastoma (pRb) y E2F-2, que induce arresto de ciclo celular durante la diferenciación eritroide (Kadri et al., 2009). Esta interacción requiere de la existencia de un motivo

LX(C/S)XE localizado en el extremo amino terminal de GATA-1 (Figura 13A). GATA-1s es incapaz de unirse a la proteína de retinoblastoma porque su codón de iniciación MET<sup>84</sup> esta localizado en dicho motivo LNSM<sup>84</sup>E (Kadri et al., 2009).

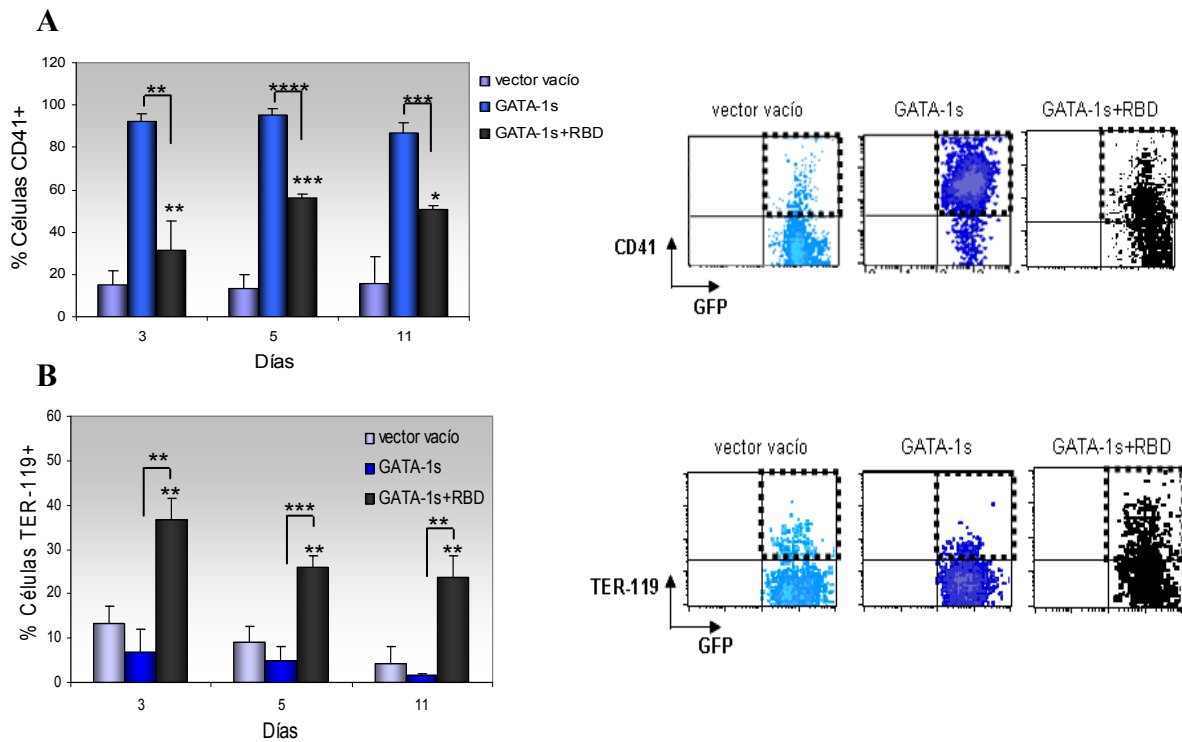


**Figura 13. Respuesta proliferativa causada por el mutante GATA-1s+RBD.** (A) Alineamiento de secuencias de ortólogos de GATA-1. El marco señala la secuencia consenso del motivo de unión a pRb, (adaptado de (Kadri et al., 2009)). (B) Alineamiento de las secuencias de proteína GATA-1 y los mutantes utilizados (AD, Dominio de Activación; NF, dedo de zinc amino terminal; CF, dedo de zinc carboxilo terminal). (C) Curvas de crecimiento de células Lin<sup>+</sup>, transducidas con vector vacío, GATA-1s o GATA-1s+RBD. Se contó el número de células en los tiempos indicados tras la separación por FACS, y se representa el número de células relativo a día 0. En el panel superior se muestra una representación comparativa, a escala ampliada, de las curvas de proliferación del vector vacío y GATA-1s+RBD. (D) Imágenes de microscopía a día 5 de cultivo de células infectadas con vector vacío, GATA-1s, o GATA-1s+RBD. Se representa la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001; \*\*\*\*, p<0,0001).

Con estos antecedentes quisimos determinar la contribución del dominio de unión a pRb en la isoforma GATA-1s, con relación a la aparición de progenitores megacariocíticos proliferativos. Para ello generamos una versión mutante de GATA-1s que contenía el motivo LN(C/S)ME de ratón (de ahora en adelante RBD: *Retinoblastoma Binding Domain*) unido a la secuencia de GATA-1s (Figura 13B). Las células Lin<sup>+</sup> de médula ósea fueron transducidas con virus que contenían dicha construcción, de la misma forma que en los experimentos anteriormente descritos. Para determinar el efecto de la mutación,

evaluamos, en primer lugar, la tasa de proliferación celular mediante curvas de crecimiento. Como muestra la Figura 13C y 13D, GATA-1s+RBD revierte completamente el efecto hiperproliferativo del mutante de GATA-1, pero no produce inhibición de la proliferación.

El análisis por citometría de flujo mostró, asimismo, que GATA-1s+RBD no provoca el mismo aumento de expresión de CD41 que el que induce GATA-1s, siendo a pesar de esto significativamente mayor que el generado por las células control (Figura 14A). Sin embargo, el porcentaje de células positivas para el marcador TER-119 en el caso de GATA-1s+RBD, fue significativamente mayor, no sólo con respecto a las células GATA-1s, sino también con respecto a las control (Figura 14B).

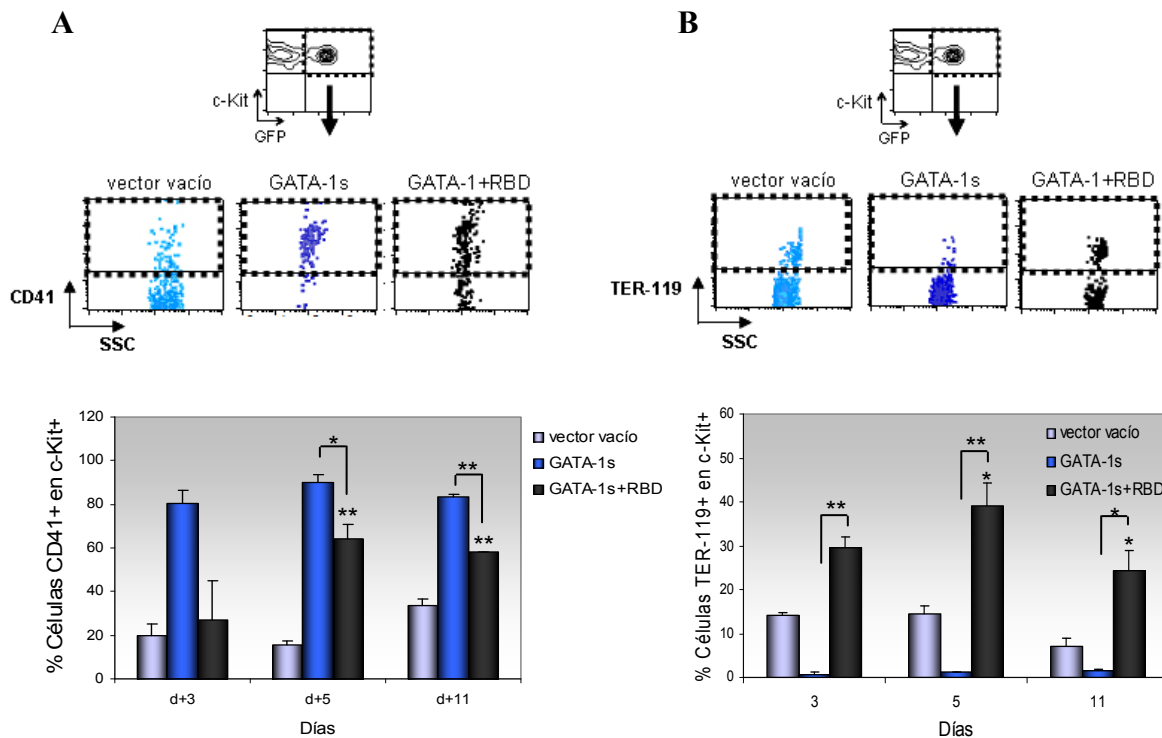


**Figura 14. Efecto de GATA-1s+RBD sobre la diferenciación eritro-megacariocítica.** Análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares, GFP<sup>+</sup>, transducidas con vector vacío, GATA-1s o GATA-1s+RBD, en base a los antígenos de superficie CD41 y TER-119. (A) Análisis del porcentaje de células pertenecientes a linaje megacariocítico, definido como CD41<sup>+</sup>. El panel derecho es una muestra representativa de los gráficos de densidad utilizados para el análisis, correspondiente a día 5. La región delimitada por línea de puntos muestra la población CD41<sup>+</sup> de cada caso. (B) Análisis del porcentaje de células pertenecientes a linaje eritroide, definido como TER-119<sup>+</sup>. El panel derecho es una muestra representativa de los gráficos de densidad utilizados para el análisis, correspondiente a día 5. La región delimitada por línea de puntos muestra la población TER-119<sup>+</sup> de cada caso. Se representa la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001; \*\*\*\*, p<0,0001).

Igualmente, el análisis inmunofenotípico realizado en las células c-Kit<sup>+</sup> (por tanto, las más inmaduras), mostró unos resultados similares en el caso de la población



megacariocítica (Figura 15A), mientras que reveló un incremento de la población eritroide, incluso mayor que el observado anteriormente, por parte de la isoforma que contenía el dominio de unión a retinoblastoma (Figura 15B). Por tanto, podemos decir que los progenitores transducidos con GATA-1s+RBD adquieren la capacidad de diferenciar hacia linaje eritroide, a diferencia de los progenitores que expresan la forma truncada, que no interacciona con pRb.



**Figura 15. Efecto de GATA-1s+RBD sobre células progenitoras.** Análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares, GFP<sup>+</sup>, transducidas con vector vacío, GATA-1s o GATA-1s+RBD, en base a los antígenos de superficie c-Kit, CD41 y TER-119. (A) El panel superior muestra la estrategia de análisis elegida para el estudio de la expresión del marcador megacariocítico CD41 en la población celular enriquecida en la expresión de c-Kit. El gráfico inferior muestra el porcentaje de células inmaduras de linaje megacariocítico presentes a día 3, 5 y 11, tras la separación por FACS. (B) El panel superior muestra la estrategia de análisis elegida para el estudio de la expresión del marcador eritroide TER-119 en la población celular enriquecida en la expresión de c-Kit. El gráfico inferior muestra el porcentaje de células inmaduras de linaje megacariocítico presentes a día 3, 5 y 11, tras la separación por FACS. Se representa la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*, p<0,05; \*\*, p<0,01).

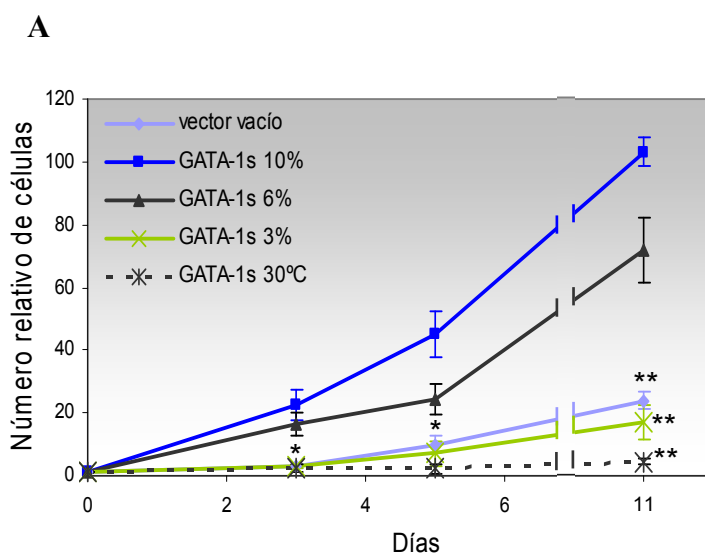
Estos resultados indican que la interacción de GATA-1 con retinoblastoma, tiene como consecuencia la inhibición de la hiperproliferación celular (en este caso, causada por GATA-1s), y adicionalmente la re-adquisición potenciada de competencia de diferenciación eritroide. En base a estos resultados nos preguntamos si es la presencia del dominio de unión a pRb lo que tiene un efecto específico sobre la vía eritroide o si bien la

disminución de la proliferación causada por dicha unión, es la responsable de la re-dirección hacia linaje eritroide.

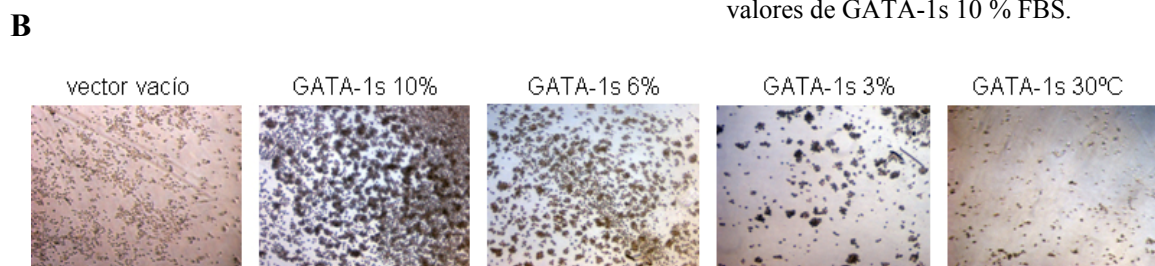
## 2.2. Efecto de la tasa de proliferación en la elección a linaje eritro-megacariocítico.

Para responder a la pregunta planteada anteriormente, analizamos, en primer lugar, la posibilidad de que la ventaja proliferativa, debida a GATA-1s, fuera la responsable, entre otras causas, del sesgo hacia linaje megacariocítico, y por tanto de la reducción de la vía eritroide.

Para ello, decidimos alterar el ritmo proliferativo de las células que expresaban GATA-1s por factores externos que frenaran la proliferación celular sin introducir ninguna otra modificación en los cultivos. Realizamos ensayos en paralelo con dos aproximaciones diferentes. Por una parte las células infectadas con GATA-1s fueron cultivadas en medios con menores concentraciones de suero (6% y 3%) que en condiciones normales (10%). Por otro lado, los cultivos celulares se crecieron a 30° de temperatura (siete grados por debajo de las condiciones normales).

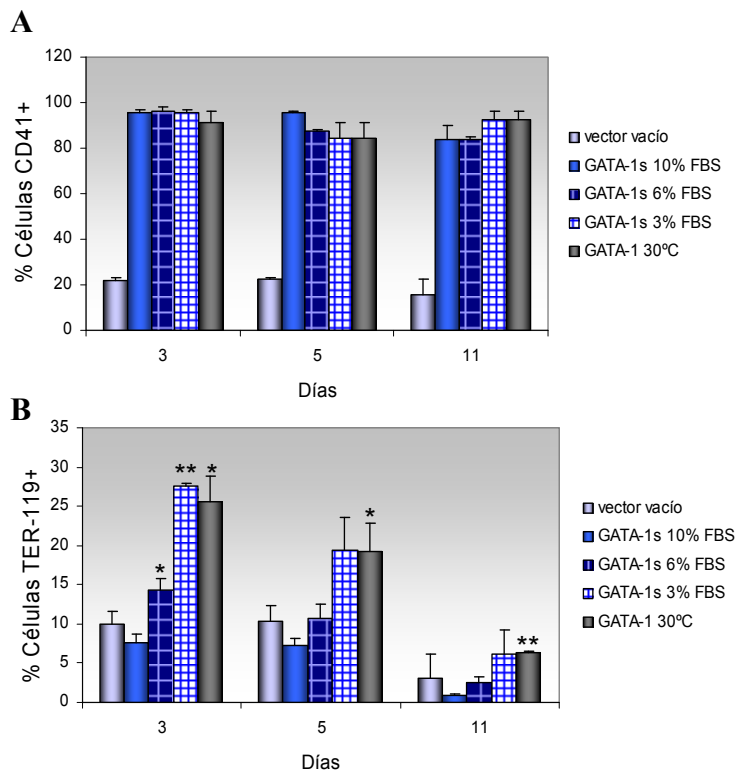


**Figura 16. Alteración de la tasa proliferativa en diferentes condiciones de cultivo.** (A) Curvas de crecimiento de células Lin<sup>+</sup> transducidas con GATA-1s y sometidas a diferentes condiciones de temperatura y suero. Se contó el número de células en los tiempos indicados, y se representa relativizado a día 0. (B) Imágenes de microscopía a día 5 de cultivo de células infectadas con vector vacío o GATA-1s, a distintas condiciones de temperatura y suero, donde se pueden observar los cambios proliferativos. (Aumento 10x). Se representa la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican la probabilidad (p), del test de Student (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ), usando como referencia los valores de GATA-1s 10% FBS.



Tanto en un caso como en otro, se produjo una disminución de la hiperproliferación celular causada por el mutante de GATA-1, siendo el efecto más evidente el generado por la disminución de la temperatura de los cultivos (Figura 16A). A pesar del descenso de la tasa proliferativa, se mantuvo el fenotipo de GATA-1s en forma de acúmulos característicos (Figura 16B).

El análisis por citometría de flujo de la expresión del marcador megacariocítico CD41 no mostró ningún cambio en su expresión bajo ninguna de las condiciones a las que fueron sometidas las células (Figura 17A). Sin embargo, y sorprendentemente, las poblaciones en las que se había revertido el fenotipo hiperproliferativo, mostraban un aumento llamativo de los niveles de expresión del marcador eritroide TER-119 (Figura 17B).

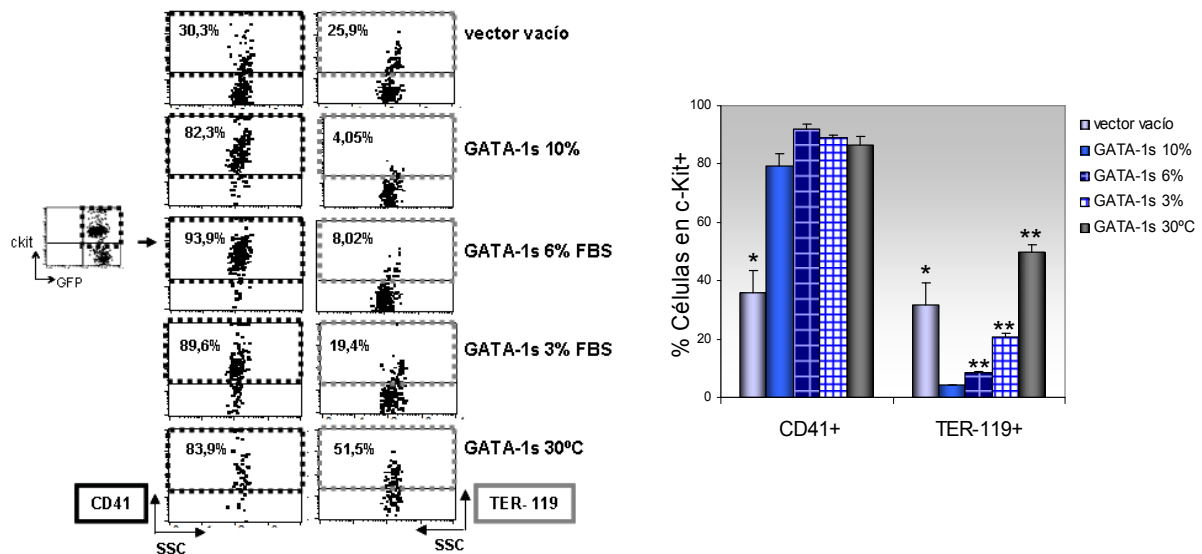


**Figura 17. La reducción de la tasa de proliferación provoca cambios en la elección de la vía de diferenciación mediada por GATA-1s.** Análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares, GFP<sup>+</sup>, infectadas con GATA-1s y sometidas a distintas condiciones de temperatura y suero, en base a los antígenos de superficie CD41 (marcador megacariocítico) y TER-119 (marcador eritroide). Como control se utilizaron células transducidas con vector vacío. (A) Análisis del porcentaje de células CD41<sup>+</sup>. (B) Análisis del porcentaje de células TER-119<sup>+</sup>. Se representa la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican la probabilidad (p) del test de Student (\*, p<0,05; \*\*, p<0,01), usando como referencia los valores de GATA-1s 10% FBS.

Intentando saber de nuevo, el grado de madurez de las células así generadas, evaluamos el nivel de expresión de CD41 y TER-119 dentro de la población celular más primitiva, definida por la expresión de c-Kit. Así, encontramos que en el caso de las células infectadas con el vector vacío, el porcentaje de progenitores CD41<sup>+</sup> (megacariocíticos) es idéntico al porcentaje de progenitores TER-119<sup>+</sup> (eritroides). Sin embargo, comparando las distintas condiciones de cultivo, observamos que mientras que la expresión de CD41 se



mantiene constante y elevada, el número de progenitores que expresan TER-119 es mayor a medida que disminuye la proliferación (Figura 18).



**Figura 18. Efecto de la reducción de la tasa de proliferación sobre células progenitoras.** En el panel izquierdo se observa una muestra representativa de los gráficos de densidad, obtenidos por citometría de flujo, correspondientes a la expresión de CD41 y TER-119, en la población inmadura definida como c-Kit<sup>+</sup>, en las células GATA-1s sometidas a diferentes condiciones de cultivo. Las regiones delimitadas por una línea de puntos negra ó gris, representan las poblaciones celulares pertenecientes al linaje megacariocítico o eritroide respectivamente, en las distintas condiciones. El gráfico de la derecha representa las medias de los porcentajes celulares que presentan dicho perfil antigénico. Se representa la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*, p<0,05; \*\*, p<0,01).

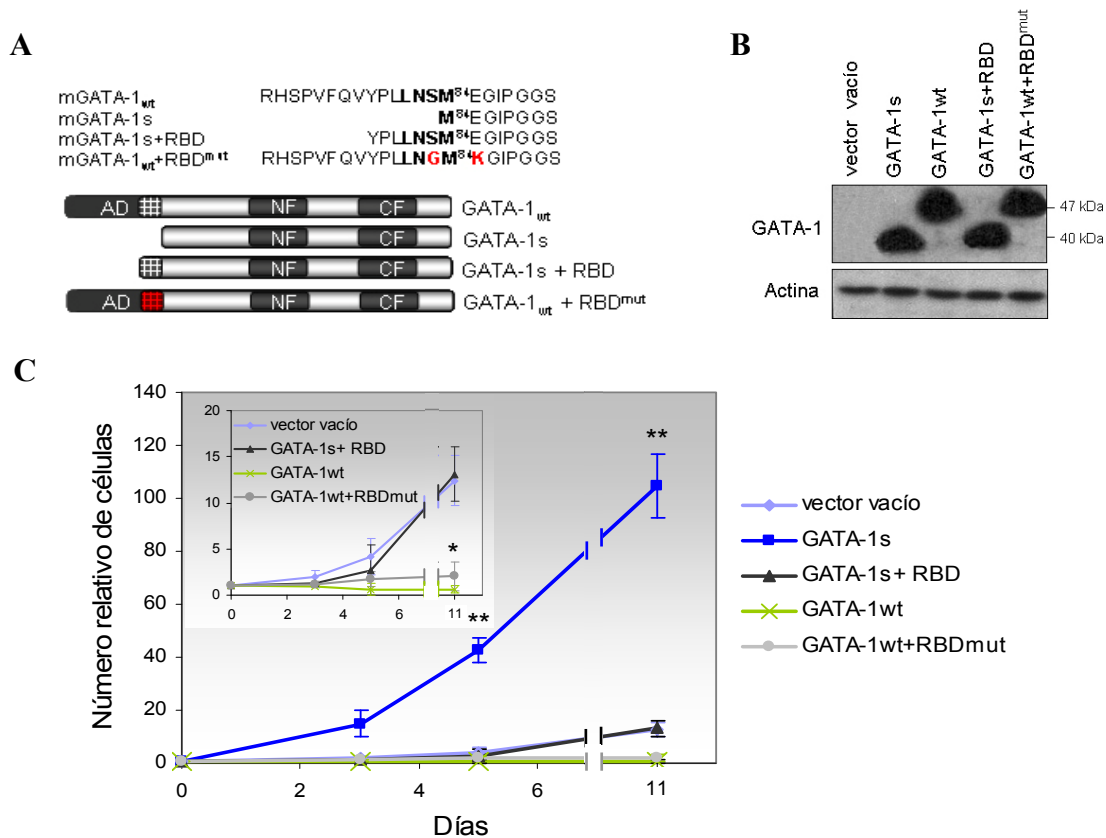
Estos resultados indican que el efecto de GATA-1s es sensible a alteraciones en la tasa de proliferación de la población celular, permitiendo, cuando disminuye, la entrada en la vía eritroide.

### 2.3. Papel del dominio amino terminal en el equilibrio proliferativo de la diferenciación eritro-megacariocítica.

En este punto, resultaba imprescindible conocer las diferencias entre el fenotipo provocados por GATA-1s frente al causado por la sobreexpresión de la proteína silvestre. La caracterización de la función de GATA-1<sub>wt</sub> ha resultado complicada debido al efecto antiproliferativo de la proteína, lo que nos ha obligado a trabajar con un escaso número de células.

Para determinar el efecto del dominio N-terminal y del de unión a pRb sobre la acción de GATA-1<sub>wt</sub>, transdujimos las células con el vector vacío, GATA-1<sub>wt</sub>, la isoforma GATA-1s, el mutante GATA-1s+RBD y un vector que contenía el ADNc codificante para GATA-1<sub>wt</sub>, mutado en el motivo LN(C/S)ME (GATA-1+RBD<sup>mut</sup>), que impide su unión a retinoblastoma (Kadri et al., 2009) pero que mantiene el dominio amino terminal integro (Figura 19A).

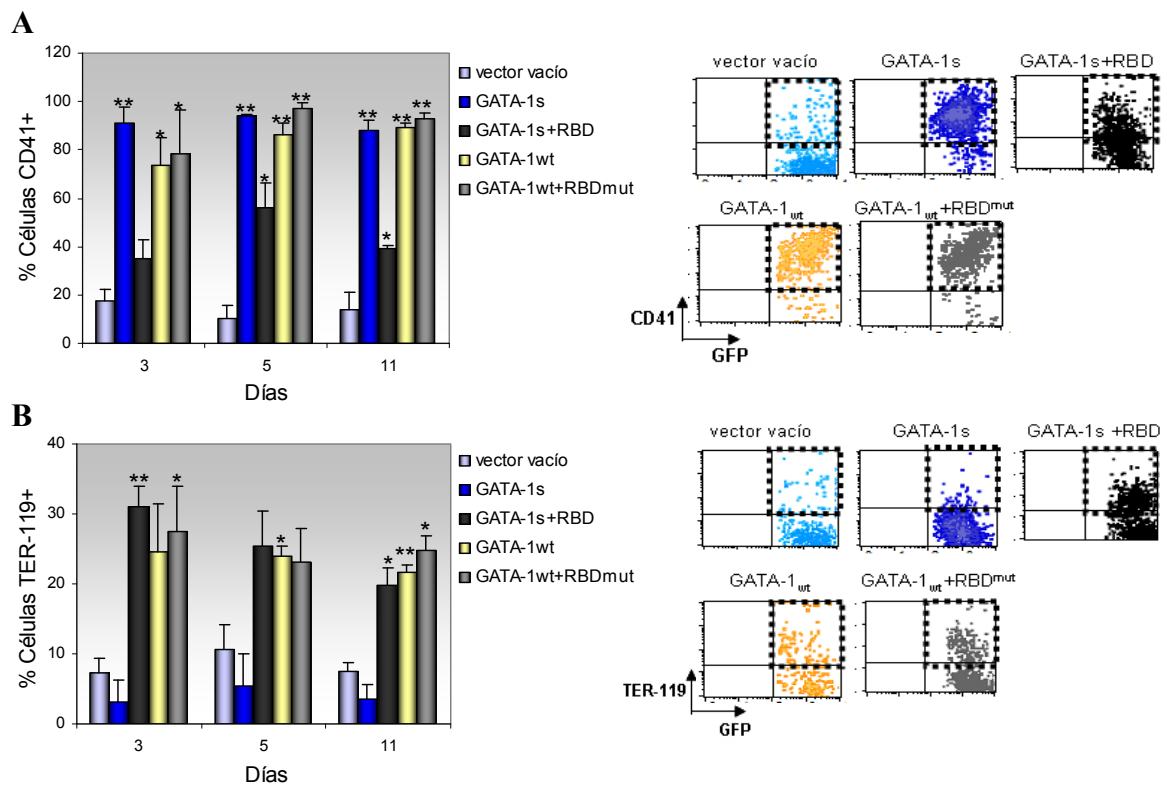
Como se observa en la Figura 19C, GATA-1<sub>wt</sub> induce una inhibición de la proliferación celular, en concordancia con el efecto antiproliferativo descrito en la Figura 6. Por su parte GATA-1<sub>wt</sub>+RBD<sup>mut</sup>, no muestra cambios significativos frente a la forma silvestre, siendo incapaz de alcanzar los niveles proliferativos generados por GATA-1s.



**Figura 19. Respuesta proliferativa de GATA-1wt y diferentes isoformas.** (A) Alineamiento de las secuencias de proteína de GATA-1 y los mutantes utilizados. (B) Análisis por *Western Blot* de los niveles de GATA-1 en las células HEK-293T transfectadas con vector vacío, GATA-1s, GATA-1<sub>wt</sub>, GATA-1s+RBD o GATA-1<sub>wt</sub>+RBD<sup>mut</sup> y las distintas isoformas. La hibridación se realizó con un anticuerpo que reconoce el carboxilo terminal de GATA-1. (C) Curvas de crecimiento de células Lin<sup>-</sup> transducidas con vector vacío, GATA-1s, GATA-1<sub>wt</sub>, GATA-1s+RBD o GATA-1<sub>wt</sub>+RBD<sup>mut</sup>. Se contó el número de células en los tiempos indicados tras la separación por FACS, y se representa el número de células relativo a día 0. En el panel superior se muestra una representación a escala ampliada de las curvas de proliferación del vector vacío, GATA-1<sub>wt</sub>, GATA-1+RBD, GATA-1<sub>wt</sub>+RBD<sup>mut</sup>. Se representa la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001; \*\*\*\*, p<0,0001).

Estos resultados sugieren que el dominio amino terminal de GATA-1, es esencial para mantener el efecto antiproliferativo de la proteína, ya que, en primer lugar, GATA-1s+RBD no disminuye la tasa de proliferación hasta los niveles de la proteína silvestre, sino que simplemente anula el efecto antiproliferativo de GATA-1s; y en segundo lugar, la mutación del dominio de unión a retinoblastoma de GATA-1<sub>wt</sub>, no es suficiente para causar hiperproliferación celular.

A continuación analizamos el fenotipo de las células que expresan cada una de las isoformas mutantes de GATA-1, por inmunodetección de CD41 y TER-119. Como muestra la Figura 20A, GATA-1<sub>wt</sub> aumenta los niveles del marcador megacariocítico en una proporción de células idéntica a la que afecta su isoforma corta. Sin embargo, la diferenciación eritrocítica está específicamente inducida en presencia de GATA-1<sub>wt</sub>, independientemente de la ausencia ó presencia del dominio de unión a retinoblastoma RBD (Figura 20B)



**Figura 20. Efecto de GATA-1wt y sus isoformas sobre linaje eritro-megacariocítico.** Análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares, GFP<sup>+</sup>, transducidas con vector vacío, GATA-1s, GATA-1<sub>wt</sub>, GATA-1s+RBD, GATA-1<sub>wt</sub>+RBD<sup>mut</sup>, en base a los antígenos de superficie CD41 y TER-119. (A) Análisis del porcentaje de células pertenecientes al linaje megacariocítico, definido como CD41<sup>+</sup>. El panel derecho es una muestra representativa de los gráficos de densidad utilizados para el análisis. En este caso corresponden a día 5 tras la separación por FACS. La región delimitada por línea de puntos corresponde a la población CD41<sup>+</sup>. (B) Análisis del porcentaje de células pertenecientes al linaje eritroide, definido como TER-119<sup>+</sup>. El panel derecho es una muestra representativa de los gráficos de densidad utilizados para el análisis. En este caso corresponden a día 5. La región delimitada por línea de puntos corresponde a la población TER-119<sup>+</sup>. Se representa la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*, p<0,05; \*\*, p<0,01).

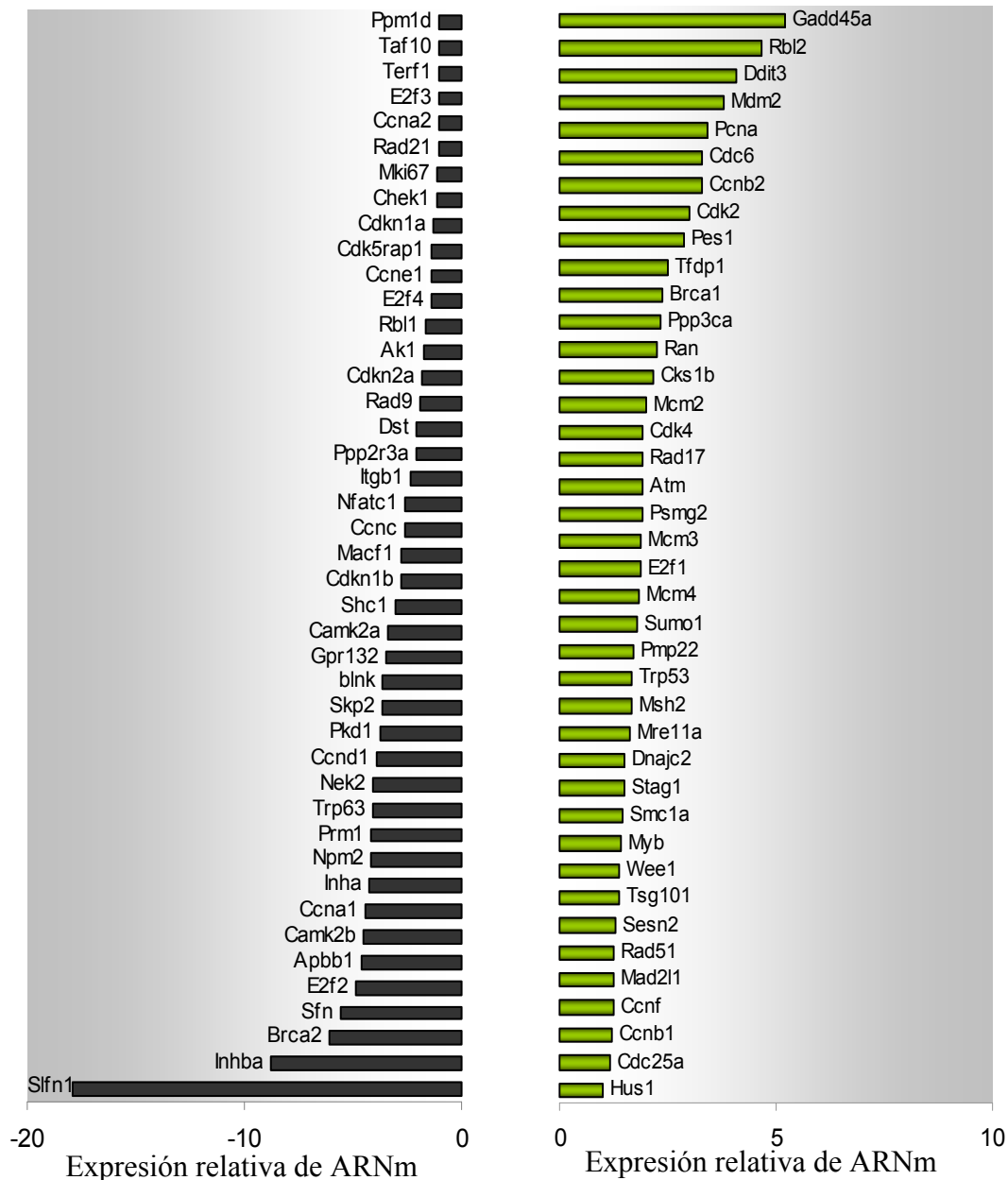
En conjunto, estos resultados muestran que el dominio amino terminal de GATA-1 es el responsable de su actividad antiproliferativa y que es ésta acción la responsable de una mayor inducción de la diferenciación eritrocítica.

### 3. Análisis de la expresión de genes diana de GATA-1s.

#### 3.1. Perfil de expresión génica asociado a ciclo celular inducido por GATA-1s.

Existen evidencias inconexas sobre la capacidad de GATA-1s para actuar coordinadamente sobre la proliferación y diferenciación celular (Blobel et al., 1995; Li et al., 2005; Shimizu et al., 2001; Visvader et al., 1995; Weiss et al., 1997). Por ello, quisimos analizar si la sobreexpresión de GATA-1s en células adultas de la médula ósea, altera la expresión de genes relacionados con ciclo celular. Adoptamos, por consiguiente la estrategia de analizar dicho perfil génico, mediante el uso de una matriz de expresión de PCR cuantitativa (PCR *array*) a partir de ARN total extraído de células GFP positivas que expresaban GATA-1s frente a células control. Elegimos el día 1 para llevar a cabo dicho análisis, ya que es el día donde todavía no se han producido diferencias fenotípicas detectables en los cultivos, que nos proporcionen un patrón genético que sea causa y no consecuencia de la aparición de una nueva población celular, asumiendo, por otra parte, que ya se ha definido el programa transcripcional causado por GATA-1. De 87 genes asociados a ciclo celular, la expresión de 40 aumentó y la de 43 disminuyó en las células que expresaban GATA-1s con respecto a las control.

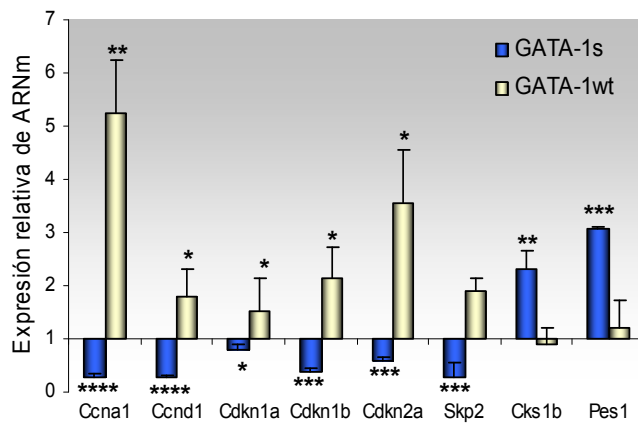
Como observamos en la Figura 21, el patrón de expresión obtenido de genes implicados en progresión y/o parada de ciclo celular es concordante con la hiperproliferación celular causada por GATA-1s. Así, observamos la inducción de la expresión de ciclinas mitóticas (*CCnb1*, *Ccnb2*, *Ccnf*), como la represión de genes pertenecientes a la familia de proteínas Cki/Kip (*Cdkn1a*, *Cdkn1b*, *Cdkn2a*, *skp2*). Cabe destacar la reducción de la expresión de *Ccnal* y *Ccnd1* en el caso de GATA-1s, pudiéndose explicar en base a evidencias recientes, que describen a dichos genes como dianas directas de GATA-1 (Lele and Wolgemuth, 2004; Muntean et al., 2007). Estos resultados fueron validados, por RT-PCR cuantitativa, incluyéndose además células transducidas con GATA-1<sub>wt</sub> (Figura 22). El análisis de expresión comparativo entre las dos isoformas es consistente con las evidencias anteriormente descritas.



**Figura 21. Análisis de la expresión de genes afectados por GATA-1s.** Se representa la expresión relativa de genes relacionados con ciclo celular, en células transducidas con GATA-1s frente a células control, a día 1 tras la separación por FACS. El gráfico de la izquierda muestra los genes reprimidos por expresión de GATA-1s, mientras que el gráfico de la derecha representa aquellos que se activan por la acción de dicha isoforma.

Como cabía esperar, también encontramos un aumento de expresión de otros genes implicados en la progresión del ciclo celular como *Pcna*, *Cdk2*, *Cdk4*, *Mcm2*, *Mcm3*, *Mcm4* o *Cdc25* (Figura 21). Igualmente observamos una disminución en la expresión de genes que han sido descritos como posibles dianas de GATA-1, el receptor de Tromboxano *Prm1* en megacariocitos (Gannon and Kinsella, 2008), o las citoquinas de la familia del

TGF- $\beta$  Inhibina-1 alfa (Feng et al., 1998) e Inhibina-1 beta (Feng et al., 2000) en testículo. Por otra parte, encontramos cambios en genes relacionados con leucemia como Pescadillo (Kinoshita et al., 2001), *Npm2* (Kroeger et al., 2008), *Cks1b* (Zhan et al., 2007), validados por RT-PCR cuantitativa, Figura 22), *Blnk* (SLP65) (Imai et al., 2004; Nakayama et al., 2009), y *Gadd45a*, recientemente descrito por su función antiapoptótica en células hematopoyéticas así como por su papel en la supervivencia de blastos leucémicos (D'Angelo et al., 2009) (Figura 21).



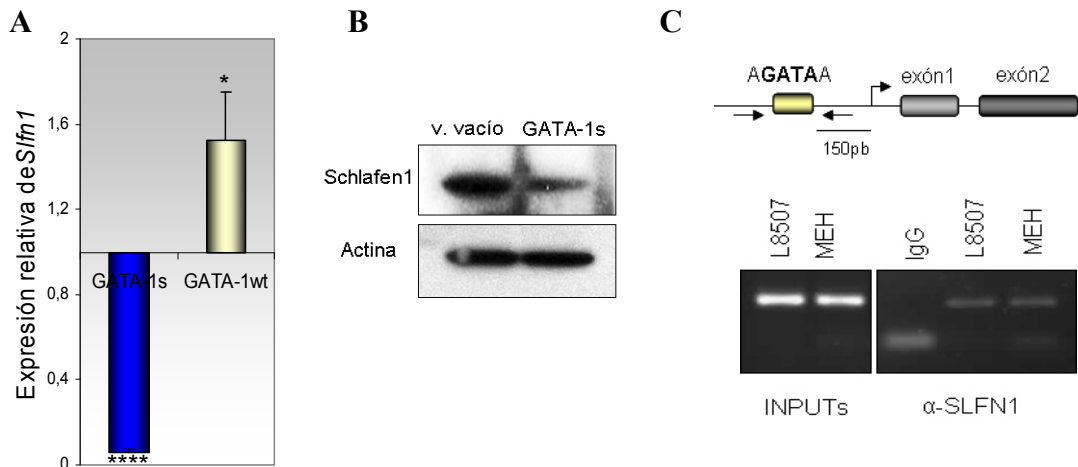
**Figura 22. Análisis de expresión comparativo del efecto de GATA-1s y GATA-1wt.** RT-PCR cuantitativa de los niveles de ARN mensajero de los genes *Ccna1*, *Ccnd1*, *Cdkn1a*, *Cdkn1b*, *Skp2*, *Cks1b* y *Pes1*, en células transducidas con vector vacío, GATA-1s y GATA-1wt. El análisis se llevó a cabo a día 1 tras la separación por FACS. Los niveles de expresión son relativos a los niveles de ARN mensajero de las células control. Se representa la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

### 3.2 Estudio del efecto de GATA-1 sobre la expresión de *Schlafen1*.

El gen cuya expresión disminuía en mayor medida fue *Schlafen 1*, hasta el momento no relacionado con GATA-1. Los genes *Schlafen* (*Slfn*), descritos por primera vez en ratón como genes que se transcribían durante la maduración del timo, conforman una familia de 10 miembros (Schwarz et al., 1998). La expresión de estos genes ha sido descrita en gran variedad de contextos, como respuesta inmune, maduración y diferenciación linfocítica, inflamación, activación de macrófagos y diferenciación mieloide (Bruno et al., 2004; Eskra et al., 2003; McCarty et al., 2004; Rahn et al., 2004; Schwarz et al., 1998). Sin embargo, a día de hoy, no existe una buena caracterización del papel de *Slfn* en dichos procesos. El único *knock-out* estudiado (en *Slfn1*) no muestra un fenotipo aparente, sugiriendo una redundancia funcional entre los miembros de la familia (Geserick et al., 2004).

Con estos antecedentes, quisimos determinar el posible efecto de GATA-1 sobre *Schlafen1*. Para ello llevamos a cabo RT-PCR cuantitativas, en las que validamos los resultados obtenidos del patrón de expresión génica descrito anteriormente, comparándolos con el efecto de sobreexpresión de la proteína salvaje. De manera opuesta a GATA1<sub>wt</sub>, su isoforma truncada es incapaz de activar la expresión de *Slfn1*, produciendo incluso su inhibición (Figura 23A). Teniendo en cuenta el reducido potencial de transactivación que ha sido descrito para GATA-1s (Calligaris et al., 1995; Martin and Orkin, 1990), supusimos que unas de las causas del efecto antiproliferativo de GATA-1 puede ser su efecto represor sobre *Slfn1*.

Igualmente quisimos analizar los niveles de proteína de *Slfn1* en las células que expresaban GATA-1s. Para ello, comparamos mediante *Western Blot* los niveles en células de médula ósea que transducidas con GATA-1s y con el vector vacío. Una vez más el escaso número de células obtenido por sobreexpresión de GATA-1<sub>wt</sub> nos impidió incluirlo en dichos ensayos. Como muestra la Figura 23B, GATA-1s produce una reducción del significativa de los niveles de proteína de *Slfn1*.



**Figura 23. GATA-1 se une y activa el promotor de Schlafen1.** (A) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de ARN mensajero de Schlafen 1 en células Lin- transducidas con GATA-1s o GATA-1<sub>wt</sub>, a día 1, tras la separación por FACS. Los niveles de expresión se relativizaron en base a los niveles de ARN mensajero de las células control. (B) Análisis por *Western Blot* de los niveles de proteína endógena de *Slfn 1* en células Lin- transducidas con GATA-1s o GATA-1<sub>wt</sub>, a día 1, tras la separación por FACS. (C) Análisis por inmunoprecipitación de cromatina (chIP), de la ocupación de la región 5'UTR de *Slfn1* por GATA-1 endógeno en una línea celular de linaje megacarioblástico (L8507), y una línea celular de linaje eritroide (MEH), de ratón. Como control positivo se realizaron PCRs de fragmentos de cromatina purificados antes de la incubación con el anticuerpo (INPUTs). El esquema superior representa el locus de Schlafen 1, así como el motivo de unión de GATA-1 localizado en su región 5'UTR. Se representa la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*, p<0,05; \*\*\*\*, p<0,0001).

Para comprobar si *Schlafen1* es una diana directa de GATA-1, llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (chIPs) en líneas celulares megacarioblásticas (L8057) y eritroide de ratón (MEH). Como muestra la Figura 23C GATA-1 se une al promotor de *Slf1* *in vivo*.

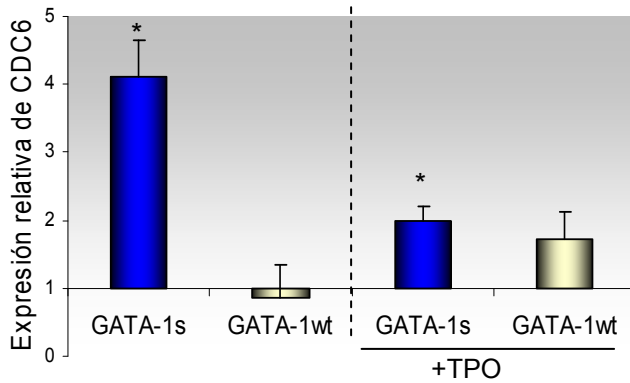
Estos resultados sugieren que *Slf1* puede ser una diana directa de GATA-1 y presumiblemente uno de los responsables del efecto antiproliferativo que produce dicha proteína.

### 3.3. Estudio del efecto de GATA-1 sobre la expresión de *CDC6*.

*CDC6* es uno de los factores esenciales en el ensamblaje y la licencia de los orígenes de replicación durante la fase G1 del ciclo celular, siendo su expresión dependiente de E2F (Hateboer et al., 1998; Ohtani et al., 1998; Yan et al., 1998). Sin embargo, resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que *CDC6* es diferencialmente regulado durante la maduración megacariocítica (Bermejo et al., 2002). Así, se ha descrito la existencia de un motivo de unión a GATA-1 solapado a una caja E2 (GCAGGTGATAA) que confiere actividad *enhancer* transcripcional a la región 5'UTR distal del gen *CDC6* durante la diferenciación megacariocítica (Vilaboa et al., 2004).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, quisimos analizar el efecto de *GATA-1* sobre la expresión de *Cdc6* en nuestro sistema celular. Los resultados obtenidos por PCR cuantitativa muestran que la sobreexpresión de *GATA-1s* produce un aumento significativo de los niveles de expresión de *Cdc6* respecto al producido por la forma silvestre *GATA-1<sub>wt</sub>* (Figura 24), en concordancia con el aumento de ARN correspondiente. Para comprobar la regulación transcripcional específica de *GATA-1* sobre *Cdc6* durante la maduración megacariocítica, llevamos a cabo nuevas RT-PCR cuantitativas de células transducidas con *GATA-1<sub>wt</sub>* y *GATA-1s*, sometidas a diferenciación con trombopoyetina, TPO, durante 5 días. Como muestra la figura 24, observamos que mientras la isoforma truncada produce una disminución significativa de la expresión endógena de *Cdc6* durante el proceso de maduración, *GATA-1<sub>wt</sub>* provoca un aumento de la expresión de dicho gen. Estos datos son consistentes con el hecho de que *Cdc6* pueda ser diferencialmente regulado dependiendo del contexto celular en el que se encuentre.



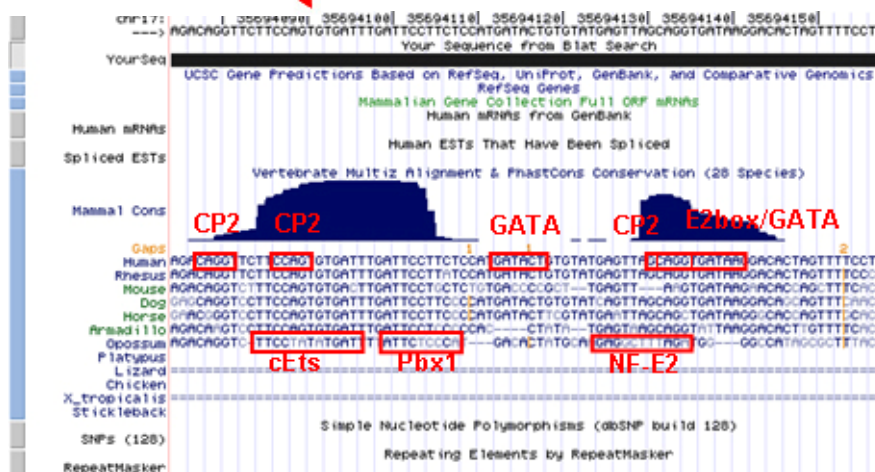


**Figura 24. GATA-1 modula diferencialmente la expresión de *Cdc6*.** Validación y análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de ARN mensajero de *Cdc6* en células Lin<sup>+</sup> transducidas con GATA-1s, GATA-1<sub>wt</sub> o vector vacío en ausencia o presencia de TPO. Los niveles de expresión se relativizaron en base a los niveles de ARN mensajero de las células control. Se representa la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*, p<0,05; \*\*).

El análisis *in silico* de la región 5'UTR de los genes *Cdc6* de diferentes especies, nos permite evaluar el grado de conservación de la secuencia activadora por GATA-1, y por tanto, su putativa relevancia como regulador *in cis* de la transcripción. Como se muestra en la figura 25, los resultados obtenidos mostraron una alta conservación del motivo E2box/GATA, y por consiguiente, de los sitios putativos de unión para GATA-1, que indicaban la existencia de elementos conservados, específicos de genes expresados en sistema hematopoyético, como p45 NF-E2, PBX1, CP2 o ETS.



**Figura 25. Análisis *in silico* del promotor de *CDC6*.** Resultado del alineamiento múltiple de la región 5'UTR del gen de *CDC6*. Se muestra una visión aumentada de la región activadora de la transcripción que contiene el motivo de unión a GATA-1. Se resaltan los sitios consenso reguladores hematopoyéticos descritos como colaboradores de la acción transcripcional de GATA-1. El análisis fue llevado a cabo mediante el programa informático UCSC Genome Browser. (<http://genome.ucsc.edu/>)



Recientemente se ha descrito que las regiones formadas por sitios de unión adyacentes a GATA-1 y a CP2 tienen una relevancia funcional ya demostrada para los promotores del propio GATA-1, EKLf y NF-E2 (Bose et al., 2006). Los autores de este trabajo sugieren que estos factores de transcripción podrían unirse a GATA-1 e influir positiva o negativamente en su capacidad de activación del promotor en el que se encuentra. La tabla 6 muestra la conservación de sitios GATA flanqueados por sitios CP2 entre promotores hematopoyéticos; en ella incluimos el promotor de *CDC6*.

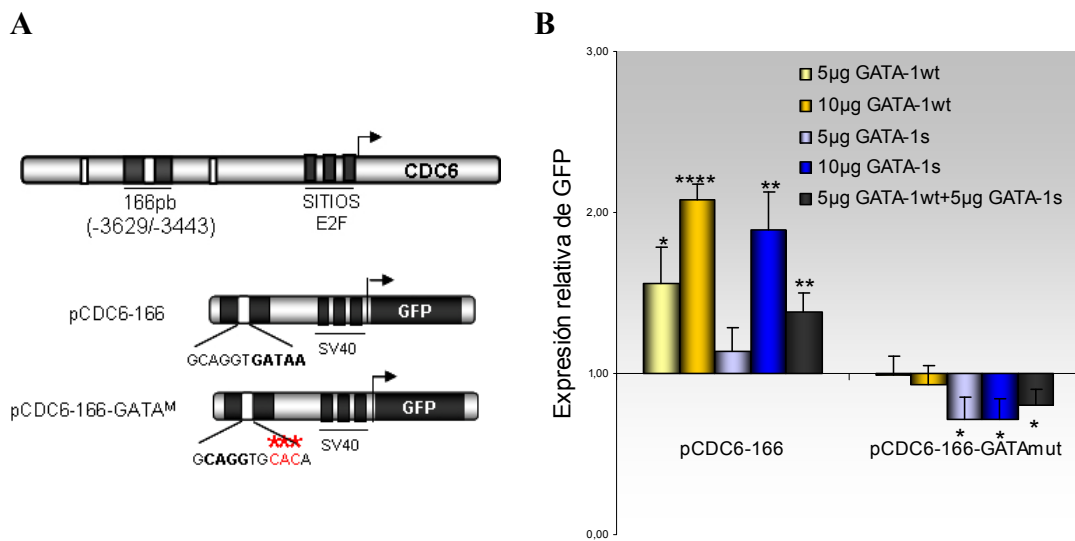
<b>hCDC6</b>	<u>ACAGGTTCTCCAGTGTGATTTGATTTCCTTCTCCAT</u> <sub>gatactGTGTATGAGTTAGCAGGT</sub> <sub>gataaGG</sub>
<b>mGATA-1</b>	CGAGTCCATCT <sub>gataaGAC</sub> <sub>tatcTGCTGCCCCAGAGCAGGCCAGAGCTGGGGTAAGCCCCCA</sub>
<b>mEKLF</b>	CTACCT <sub>gatagCGGCCTGAAACATCTGGTGTGTCT</sub> <sub>gataatGCCTGAA</sub>
<b>mp45/NFE2</b>	CCTGCAGCT <sub>gataaACCCC</sub> <sub>tatcTGGCCCAGGCAGGGGAACCTAAAGTAAGGATGGG</sub>
<b>hGlobinLCR</b>	AGAGTGATGACTC <sub>tatctGGGTCCCAGCAGGATGCTTACAGGGCAG</sub>
<b>mEpoR</b>	GGCTGTAG <sub>cttateTGTCCCCAGCCTGCAAAGCTGGCCCCGCCCCCTGGAAGGAGCTGCC</sub>

**Tabla 6. Lista de regiones reguladoras de genes implicados en hematopoyesis, que contienen sitios de unión de GATA-1 y CP2 adyacentes.** Los sitios de unión de GATA-1 están escritos en minúscula, mientras que los sitios de unión de CP2 están subrayados. Adaptado de (Bose et al., 2006)

Por otra parte, y para contestar a la pregunta que nos planteamos, esto es, si GATA-1 es capaz de regular la actividad de esta región activadora de la transcripción de *CDC6*, era necesario hacer uso de células que no expresaran GATA-1. Por esto nos planteamos utilizar las células HEK-293T, células embrionarias humanas de riñón, como sistema heterólogo, ya que, al estar alejado del linaje hematopoyético, nos permitiría analizar si GATA-1 por sí misma, en ausencia de factores de transcripción eritro-megacariocíticos asociados, era capaz de afectar directamente a la actividad de *CDC6 in vitro*. Debido a esto diseñamos una construcción en la que redujimos la secuencia del promotor de *CDC6* a 166 pb, que contiene el motivo de unión a GATA-1, para evaluar si en ella residía todo el potencial de activación (Figura 26A).

Se llevaron a cabo ensayos de transactivación utilizando como gen reportero la proteína verde fluorescente (GFP). El ADNc de *Gata-1* de ratón fue subclonado en el vector pcDNA3 y cotransfectado en las células HEK-293T junto con una construcción reportera que contenía la secuencia activadora de 166pb de *CDC6* acoplada al promotor mínimo SV40 (pCDC6-166) (Figura 26A). Como muestra la figura 25B, la actividad transcripcional producida por dicha secuencia es directamente proporcional a los niveles de

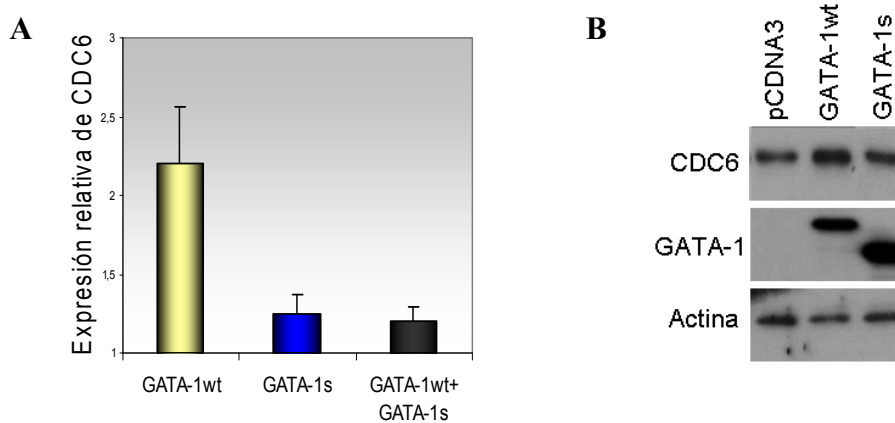
expresión de GATA-1. Para analizar la especificidad de la secuencia requerida para la regulación transcripcional del promotor de *CDC6* se generó una construcción en la que se mutó el motivo de unión a GATA (pCDC6-166-GATA<sup>M</sup>). Como muestra la figura 26B, dicha construcción produce cambios significativos en la actividad del gen reportero, siendo la presencia del motivo GATA imprescindible en la activación del promotor. De manera paralela, cotransfectamos la isoforma mutada GATA-1s. Los resultados indican que a pesar de mostrar un menor potencial de transactivación, la sobreexpresión de dicha isoforma puede llegar a igualar los efectos de GATA-1<sub>wt</sub> (Figura 26B).



**Figura 26. GATA-1 actúa como activador de la transcripción del promotor de *CDC6* en células HEK-293T.** (A) Región promotora de *CDC6*, donde se señalan los sitios de unión de E2F, responsables de su regulación en la mayoría de las células somáticas, así como el motivo de unión a GATA, solapado a una caja E2, descrito en este trabajo. En el panel inferior se muestra la comparativa de las construcciones reporteras del promotor de *CDC6*, utilizadas en los ensayos. Contienen un fragmento de 166 pb del promotor de *CDC6*, bajo el control del promotor mínimo SV40, acopladas al gen testigo GFP. (B) Las células HEK-293T fueron co-transfectadas con las construcciones anteriormente descritas, así como con diferentes cantidades de GATA-1, ó vector vacío (pCDNA3), recogidas y analizadas por citometría de flujo. En paralelo se llevaron a cabo los mismos ensayos de transactivación, utilizando en este caso la isoforma mutada GATA-1s. Los valores de activación se relativizaron en base a los valores obtenidos por co-transfección del vector vacío, pCDNA3, con los plásmidos reporteros, en ausencia de las proteínas GATA. Se representa la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001; \*\*\*\*, p<0,0001).

A la vista de estos resultados podemos concluir que la estimulación de la actividad del promotor de *CDC6*, en células no megacariocíticas, es dependiente de la integridad de un elemento regulador en *cis* definido por una caja E2 que solapa con un motivo GATA (GCAGGTGATAA) y es significativamente activada por la expresión ectópica de GATA-1 y, menor medida por su isoforma mutada GATA-1s.

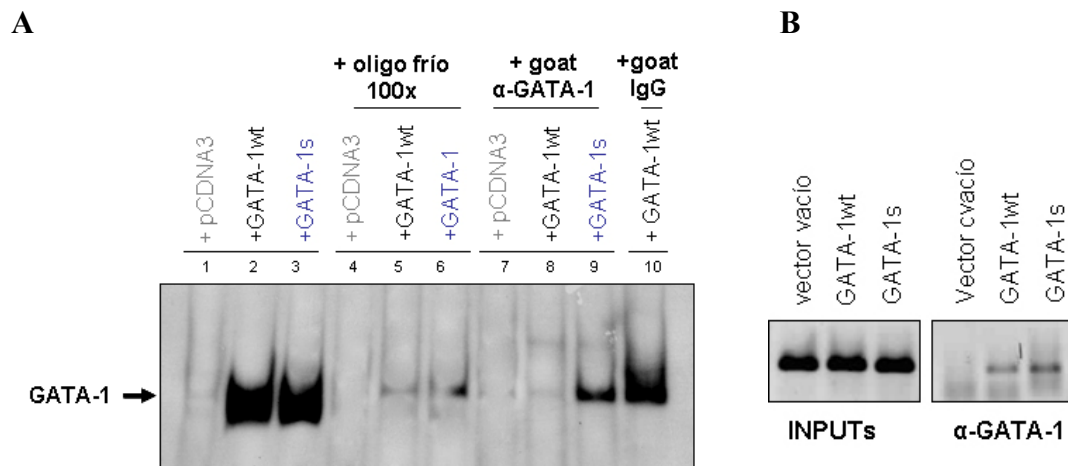
En base a estos datos, nos preguntamos si la expresión ectópica de GATA-1 podía estar afectando igualmente a la expresión endógena de *CDC6* en las células HEK-293T. Para ello se analizaron los patrones de expresión de ARN mensajero y proteína en las células transfectadas. El análisis por RT-PCR cuantitativa demuestra que GATA-1<sub>wt</sub> produce un aumento de los niveles estacionarios de ARN mensajero de *CDC6*, a diferencia de su isoforma corta GATA-1s (Figura 27A). Igualmente la expresión conjunta de ambas isoformas (GATA-1<sub>wt</sub> y GATA-1s) fue incapaz de inducir la expresión endógena de *CDC6* de la misma manera que la forma silvestre, demostrando el papel dominante negativo de GATA-1s. De la misma manera, el análisis por *Western Blot* mostró un aumento de los niveles de la proteína en las células que expresaban GATA-1<sub>wt</sub> a diferencia de la isoforma GATA-1s (Figura 27B).



**Figura 27. Niveles de expresión de CDC6 endógeno en células HEK-293T.** (A) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de ARN mensajero en células HEK-293T transfectadas con GATA-1<sub>wt</sub>, GATA-1s. Los niveles de expresión se relativizaron en base a los niveles de ARN mensajero de las células control, en ausencia de las proteínas GATA. (B) Análisis por *Western Blot* de los niveles de proteína endógena de CDC6, en células HEK-293T transfectadas con GATA-1<sub>wt</sub> y GATA-1s. Se representa la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes.

Con el fin de comprobar si GATA-1<sub>wt</sub> y GATA-1s eran capaces de unirse *in vitro* al motivo GCAGGTGATAA, se llevaron a cabo ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA). Únicamente los extractos nucleares de células HEK-293T transfectadas con las dos isoformas mostraban la presencia de complejos proteicos con capacidad específica de unión a la secuencia E2box/GATA. Para confirmar la unión de GATA-1 y GATA-1s, estos ensayos fueron realizados en presencia y ausencia de anticuerpos contra dichas proteínas. Como muestra la figura 28A, en presencia de anti-GATA-1 la banda correspondiente al complejo proteico es fuertemente desplazada, no

existiendo dicha competición con cantidades equivalentes de suero no inmune (Figura 28A).



**Figura 28. GATA-1wt y GATA-1s se unen *in vitro* e *in vivo* al promotor de *CDC6* en células HEK-293T.** (A) Los extractos nucleares obtenidos de las células HEK-293T transfectadas con vector vacío (pCDNA3), GATA-1wt o GATA-1s, fueron incubadas con un oligo que contenía el motivo de unión a GATA (GCAGGTGATAA), marcado radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ , y analizados en ausencia (carriles 1, 2, 3) o en presencia de un exceso de oligo frío (carriles 4, 5, 6), anticuerpo anti-GATA-1 de cabra que reconoce el carboxilo terminal de la proteína (carriles 7, 8 y 9), o IgG de cabra (carril 10). Los complejos resultantes fueron analizados usando ensayos de retardo en gel (EMSA). (B) Análisis por inmunoprecipitación de cromatina (chIP), de la ocupación del promotor de *CDC6* por GATA-1wt y GATA-1s exógenos, en células HEK-293T. Como control positivo se realizaron PCRs de fragmentos de cromatina purificados antes de la incubación con el anticuerpo (INPUTs)

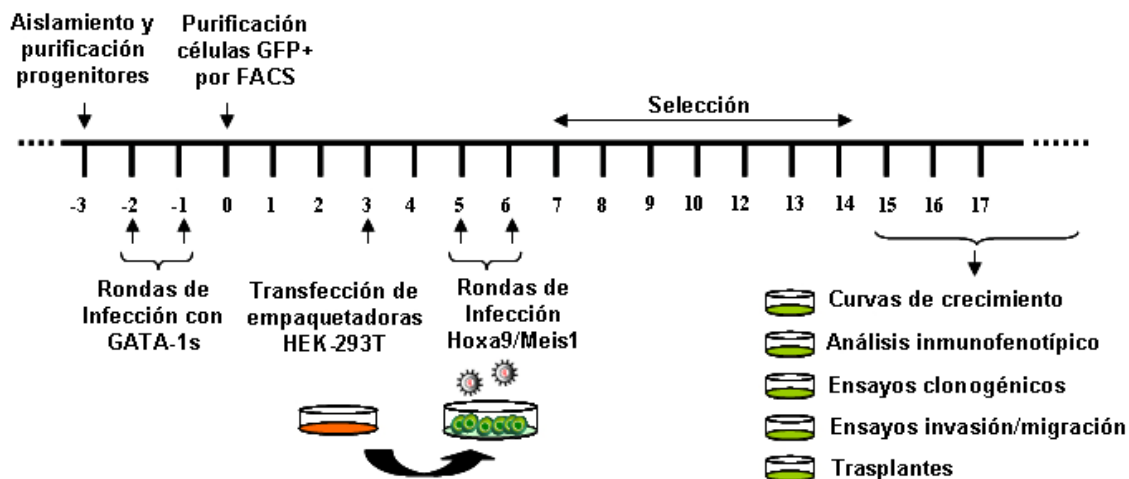
Teniendo en cuenta estos resultados decidimos comprobar si GATA-1 y GATA-1s eran capaces de unirse a la secuencia que contenía el motivo GATA del promotor de *CDC6 in vivo*. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (chIP) en las células HEK-293T transfectadas con ambas isoformas. Como se observa en la figura 28B, tanto en el caso de GATA-1<sub>wt</sub> como en el de GATA-1s, obtenemos un amplímero de 166 pb correspondiente a la secuencia del promotor de *CDC6* que contiene el motivo de unión a GATA. Por el contrario, no se detectó dicho producto en fracciones de células HEK-293T transfectadas con un vector vacío que no contenía ninguna de la isoformas de GATA-1.

Estos resultados indican que GATA-1 induce la expresión de *CDC6* endógeno en células HEK-293T, a través de la unión *in vivo* a la secuencia E2box/GATA, contenida en el promotor de dicho gen. Estos datos son consistentes con las observaciones ya descritas en base a la menor capacidad transcripcional del mutante GATA-1s (Calligaris et al., 1995; Martin and Orkin, 1990), que como demostramos en este estudio, es capaz de unirse *in vivo* a la secuencia activadora de *CDC6* demostrando un potencial de transactivación menor que la isoforma silvestre.

#### 4. Potencial leucemogénico de GATA-1s.

Como se dijo anteriormente, mutaciones somáticas de *GATA-1* han sido asociadas a pacientes con trisomía del cromosoma 21 que desarrollan leucemia megacarioblástica aguda (Crispino, 2005; Rainis et al., 2003). A día de hoy no se ha dilucidado el mecanismo que predispone a las células que expresan GATA-1s a sufrir un proceso de malignización. Debido a ello, quisimos comprobar si las células que expresaban GATA-1s, mostraban, *ex vivo*, una mayor sensibilidad a posteriores alteraciones leucemogénicas. Para ello, sobreexpresamos en las células transducidas con GATA-1s o vector vacío los factores de transcripción HOXA9 y MEIS1, que son bien conocidos por su implicación en transformación leucémica (Nakamura et al., 1996a; Sitwala et al., 2008).

El diseño experimental seguido en esta parte del trabajo se esquematiza en la Figura 29.

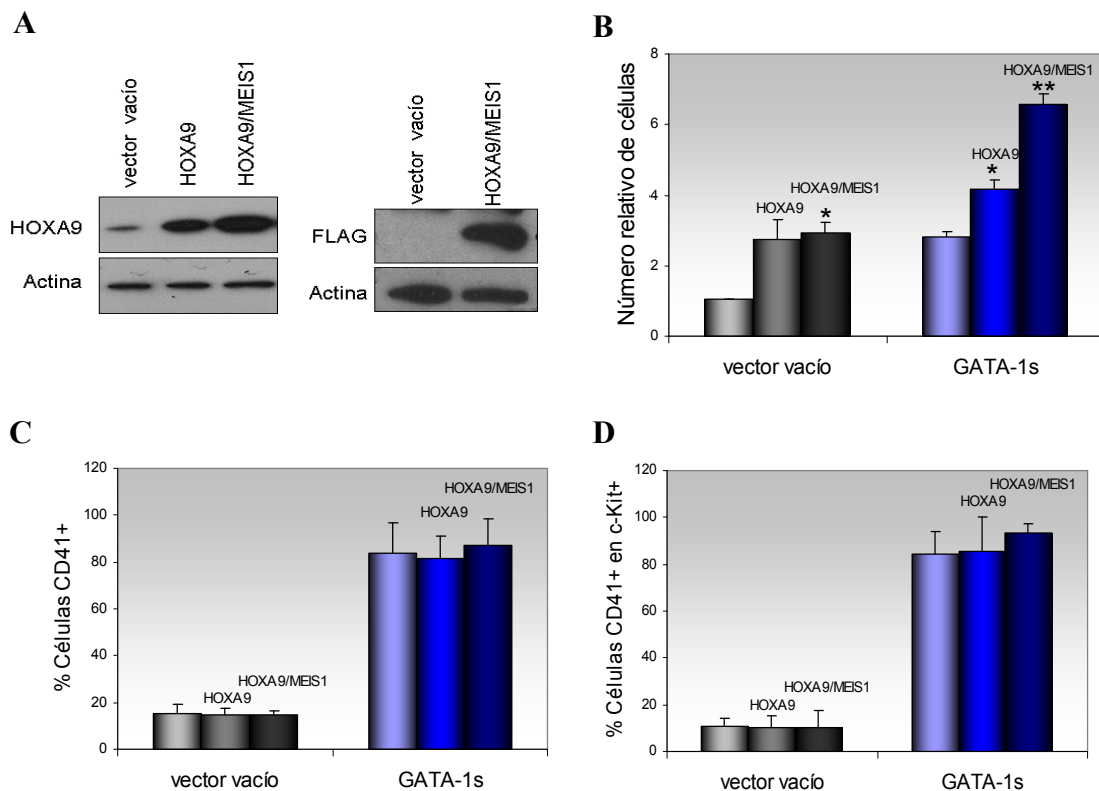


**Figura 28. Diseño experimental para la sobreexpresión de los oncogenes Hoxa9/Meis1, en las células progenitoras infectadas con GATA-1s.** Tras la obtención, purificación e infección de las células que expresaban GATA-1s o el vector vacío (protocolo descrito más en detalle en la figura 4) se llevó a cabo, a día 3, la producción de nuevas partículas virales, utilizando como empaquetadoras las células HEK-293T. Dos días después de la transfección con vectores retrovirales HOXA9/MEIS1, se recogió el sobrenadante viral de las células HEK-293T y se añadió al cultivo de células primarias, sometiéndolas a un protocolo de infección por centrifugación. Se realizaron dos rondas de infección, tras las cuales las células se sometieron a selección con antibiótico. Una vez terminada la selección, se llevaron a cabo los distintos experimentos.

La infección se llevó a cabo, bien con el factor HOXA9, bien con la doble combinación HOXA9/MEIS1, descrita por su mayor potencial leucemogénico (Kroon et al., 1998; Pineault et al., 2003; Pineault et al., 2002). La expresión de HOXA9 provocó un

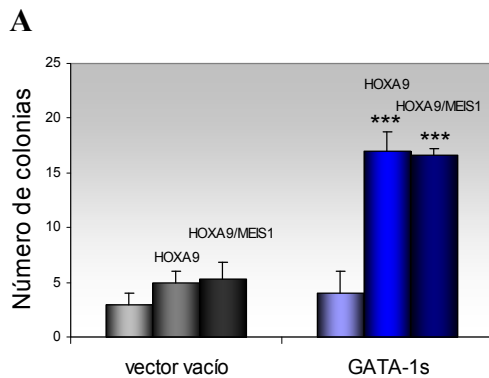


incremento de la proliferación, tanto en las células que expresaban GATA-1s como en las transducidas con el vector vacío (Figura 30B). El efecto más llamativo lo observamos con la doble combinación HOXA9/MEIS1, en las células que poseen la isoforma GATA-1s donde la hiperproliferación aumentó de manera significativa (Figura 30B). El estudio por citometría de flujo de los perfiles inmunofenotípicos de las poblaciones no mostró diferencias en ningún caso, manteniéndose el elevado porcentaje de células progenitoras de linaje megacarioblástico con GATA-1s (Figura 30C y Figura 30D).

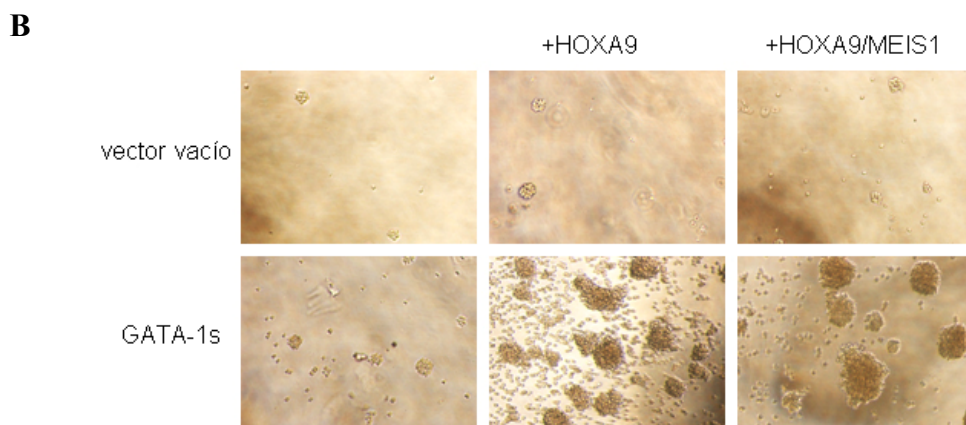


**Figura 30. Efecto de HOXA9 –MEIS1 sobre la proliferación y la determinación a linaje en progenitores hematopoyéticos.** (A) Análisis por *Western Blot* de los niveles de HOXA9 y MEIS1 (detección por el epítipo FLAG) en células Lin<sup>-</sup> transducidas con HOXA o HOXA9/MEIS1 en presencia o ausencia de GATA-1s. (B) Aumento de la proliferación de las células Lin<sup>-</sup> transducidas con HOXA9 y MEIS1 en ausencia y presencia de GATA-1s entre los días 1 y 5 tras la selección con neomicina (día 15 y día 20 tras la separación por FACS). Se contó el número de células en los tiempos post-selección indicados y se representa el número de células relativo al vector vacío en ausencia de los oncogenes. (C) Representación del porcentaje de células Lin<sup>-</sup> transducidas con HOXA9 y MEIS1 en ausencia y presencia de GATA-1s, pertenecientes a linaje megacariocítico, definido como CD41<sup>+</sup>. El análisis se llevó a cabo por citometría de flujo a día 3 tras la selección (día 17 tras la separación por FACS). (D) Se llevó a cabo el mismo análisis que en el apartado B, pero esta vez en una población celular inmadura definida por su expresión positiva para el marcador c-Kit. Se representa por tanto, el porcentaje de células GFP<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup>, transducidas con HOXA9 y MEIS1 en ausencia y presencia de GATA-1s pertenecientes a linaje megacariocítico. Se representa la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*, p<0,05; \*\*, p<0,01).

Con el fin de cuantificar la capacidad de proliferación, supervivencia y autorrenovación de nuestras poblaciones realizamos ensayos de formación de colonias. Como se observa en la Figura 31A, la actividad clonogénica de los cultivos que sobreexpresaba GATA-1s en presencia de HOXA9 y HOXA9/MEIS1 se vio llamativamente aumentada, tanto en el número de colonias, aproximadamente 4 veces superior, como el número de células que componía cada de una de ellas. (Figura 31B).

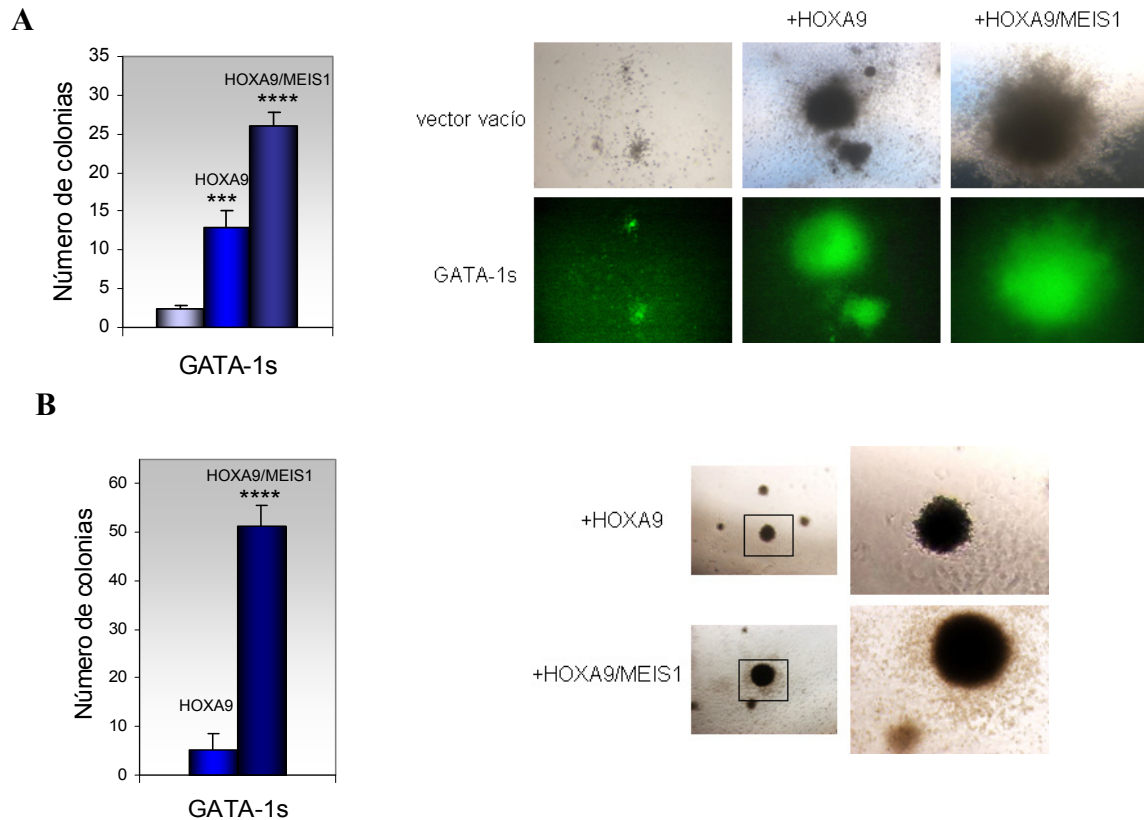


**Figura 31. Ensayos clonogénicos en presencia de HOXA9/MEIS1.** (A) Número de colonias en medio semisólido con metilcelulosa, generadas por las células transducidas con vector vacío y GATA-1s en ausencia y presencia de los oncogenes HOXA9 y MEIS1. Las colonias se analizaron a día 8 tras la selección con antibiótico. (B) Imágenes representativas de colonias generadas como se describe anteriormente, que corresponden a día 6 de cultivo. Se observa claramente un aumento en el tamaño y en el número de colonias GATA-1s en presencia de uno ó dos de los oncogenes sobreexpresados. Se representa la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).



La capacidad de autorrenovación también fue evaluada mediante el plaqueo seriado de colonias. Únicamente las células que expresaban GATA-1s fueron capaces de producir colonias secundarias. Tanto HOXA9 como la doble combinación HOXA9/MEIS1, produjeron un aumento significativo del número de colonias, así como de la densidad celular de cada de una de ellas (Figura 32A). En el caso de las terciarias observamos un crecimiento altamente significativo del número de colonias que comparten los dos oncogenes con GATA-1s (Figura 32B).



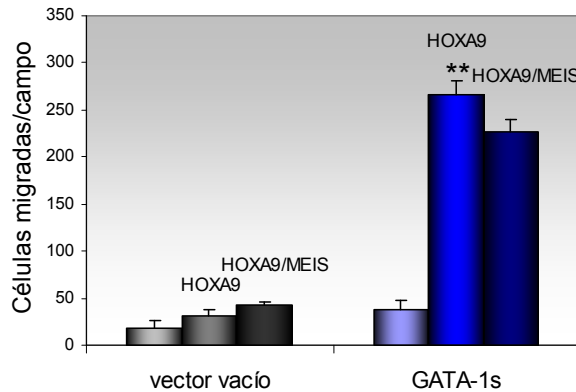


**Figura 32. HOXA9 y/o MEIS1 aumentan la capacidad clonogénica de GATA-1s.** (A) En el gráfico de la izquierda se representa el número de colonias secundarias generadas por las células transducidas con vector vacío o GATA-1s en ausencia y presencia de los oncogenes HOXA9 y MEIS1. En el panel derecho se muestran imágenes representativas de microscopía visible y de fluorescencia de dichas colonias. (B). En el gráfico de la izquierda se representa el número de colonias terciarias generadas por las células transducidas con vector vacío o GATA-1s en ausencia y presencia de los oncogenes HOXA9 y MEIS1. En el panel derecho se muestran imágenes representativas de colonias terciarias de células transducidas con GATA-1s y HOXA9 y/o MEIS1. Se muestra una visión a escala ampliada de dichas colonias para poder observar con más detalle la densidad que les caracteriza. Se representa la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

La leucemia ha sido definida como un proceso incontrolado de proliferación y expansión de células hematopoyéticas que se mantienen en un estado indiferenciado (Sawyers et al., 1991). La crisis blástica de las leucemias agudas linfoides y mieloides se caracterizan por la excesiva movilización de las células leucémicas desde la médula ósea a la sangre periférica, seguido de la infiltración en órganos, piel o membranas mucosas.

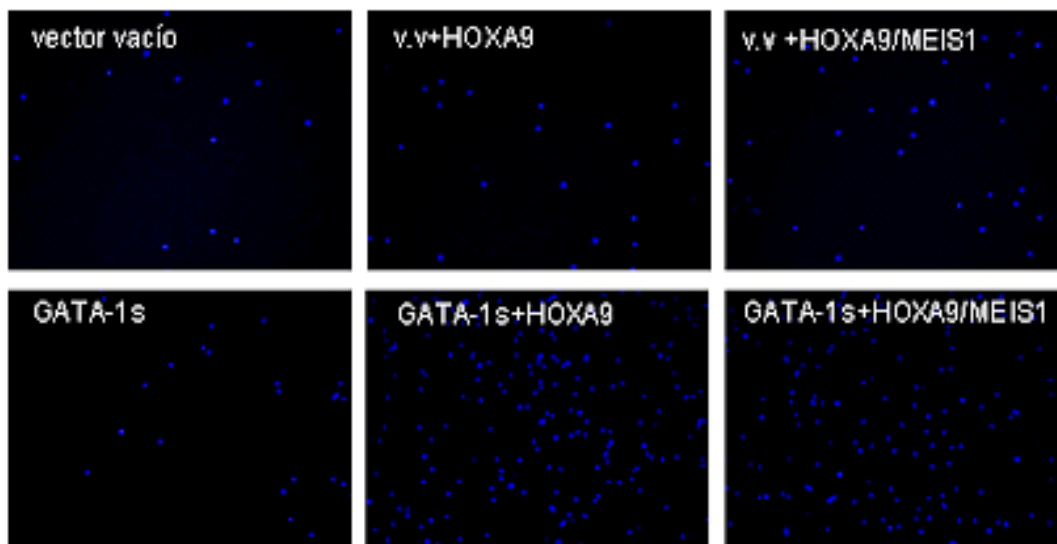
En base a esto, quisimos saber si las células que expresan GATA-1s, que presentaban una descontrolada hiperproliferación y autorrenovación tenían aumentadas sus capacidades migratorias e invasivas. Para ello, llevamos a cabo ensayos de migración con gelatina (Figura 33) y ensayos de invasión con matrigel (Figura 34). Como muestran ambas figuras, las células expresoras de GATA-1s fueron capaces, en presencia de un

único insulto oncogénico, HOXA9, de aumentar significativamente su potencial migratorio e invasivo. Como cabía esperar, la combinación de HOXA9/MEIS1 mantiene o incluso incrementa dicho potencial. Por el contrario, la sobreexpresión de uno o ambos oncogenes sobre las células control no produjo ninguna alteración en sus capacidades migratorias o invasivas.

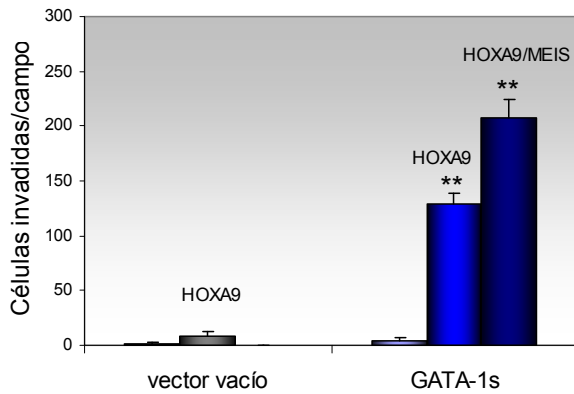


**Figura 33. Análisis de la capacidad migratoria de células GATA-1s, en presencia de HOXA9-MEIS1.**

El gráfico superior representa el número de células migradas durante 16 horas en ausencia y presencia de GATA-1s y/o HOXA9/MEIS1. El panel inferior muestra imágenes de microscopía de fluorescencia, de células migradas tras tinción con DAPI. Aumento 100x. Se representa la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*\*,  $p < 0,01$ ).

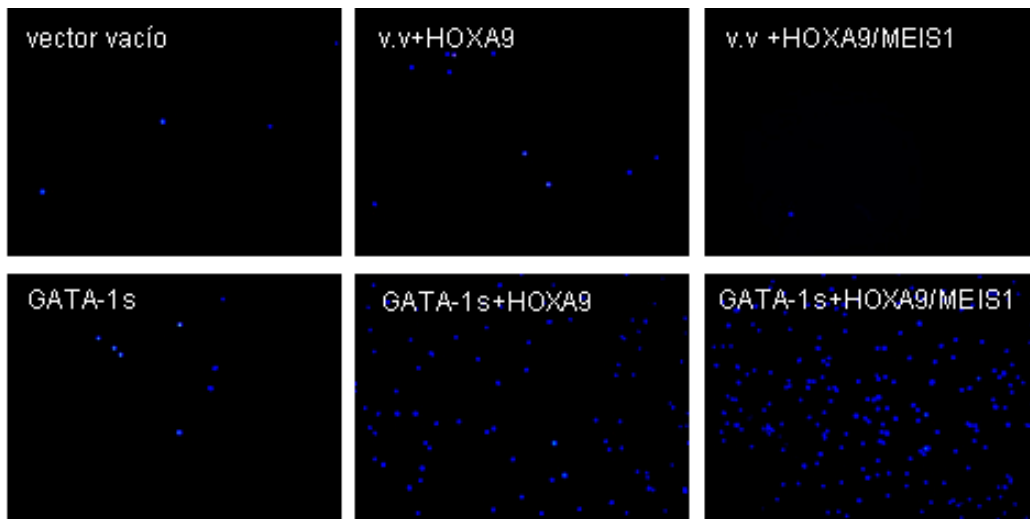


Existen evidencias que relacionan la implicación de varias metaloproteasas en el comportamiento invasivo de células leucémicas, tanto en leucemias mieloides (Sawicki et al., 1998) como en linfoides (Hendrix et al., 1992). El principal papel de las metaloproteasas en angiogénesis, crecimiento tumoral y metástasis es la degradación de la matriz extracelular (ECM). Diversos estudios han relacionado la capacidad agresiva de un tumor con elevados niveles de expresión de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 (Cottam et al., 1992; Gohji et al., 1998; Hendrix et al., 1992; Stetler-Stevenson, 2001).



**Figura 34. Análisis de la capacidad invasiva de células GATA-1s, en presencia de HOXA9-MEIS1.**

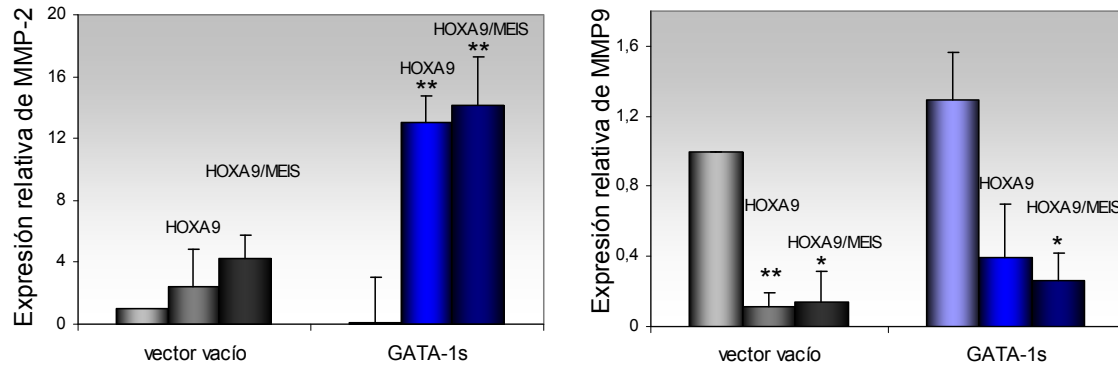
El gráfico superior representa el número de células migradas durante 32 horas en ausencia y presencia de GATA-1s y/o HOXA9/Meis1. El panel inferior muestra imágenes de microscopía de fluorescencia, de células invadidas tras tinción con DAPI. Se representa la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes. Aumento 100x. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*\*,  $p < 0,01$ ).



Existen evidencias que relacionan la implicación de varias metaloproteasas en el comportamiento invasivo de células leucémicas, tanto en leucemias mieloides (Sawicki et al., 1998) como en linfoides (Hendrix et al., 1992). El principal papel de las metaloproteasas en angiogénesis, crecimiento tumoral y metástasis es la degradación de la matriz extracelular (ECM). Diversos estudios han relacionado la capacidad agresiva de un tumor con elevados niveles de expresión de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 (Cottam et al., 1992; Gohji et al., 1998; Hendrix et al., 1992; Stetler-Stevenson, 2001).

Debido a esto quisimos analizar los niveles de expresión de las estas dos metaloproteasas en nuestras células. Como se observa en la figura 34, los niveles de MMP-2 aumentaron significativamente en las células GATA-1s que sobreexpresan HOXA9 ó la doble combinación HOXA9/MEIS1, mientras que los niveles de expresión de MMP-9 disminuyeron tras la sobreexpresión con ambos oncogenes. Estos datos concuerdan con evidencias recientes que relacionan un aumento de los niveles de expresión de MMP-2

con la capacidad de invasión de células leucémicas, así como con otros estudios, que relacionan mayores niveles de MMP-9 en pacientes sanos (Janowska-Wieczorek et al., 1999).



**Figura 34. Análisis de los niveles de expresión de las metaloproteasa MMP-2 y MMP-9 en presencia de los oncogenes HOXA9-MEIS1.** (A) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de ARN mensajero de MMP2 (panel izquierdo) y MMP9 (panel derecho) en células transducidas con vector vacío o GATA-1s en ausencia y presencia de los oncogenes HOXA9 y MEIS1. Los niveles de expresión se relativizaron en base a los niveles de ARN mensajero de las células control, en ausencia de los oncogenes. Se representa la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

En conjunto, estos resultados muestran que la expresión de GATA-1s provoca la hiperproliferación de progenitores eritro-megacariocíticos, así como la hipersensibilización a la transformación por sucesivas alteraciones leucemogénicas.

## *Discusión*

---



En esta tesis hemos demostrado que la forma truncada de GATA-1, GATA-1s, estimula la proliferación de progenitores hematopoyéticos, promueve su diferenciación hacia linaje megacariocítico y aumenta su sensibilización a posteriores alteraciones genéticas leucemogénicas. También mostramos que la expresión ectópica de GATA-1s ejerce una acción dominante sobre GATA-1 endógena, provocando la hiperproliferación de células fenotípicamente equiparables a precursores primitivos megacariocíticos. Estos precursores podrían considerarse progenitores (expresan el marcador c-Kit, y en un alto porcentaje CD34), con plena capacidad de diferenciar a megacariocitos maduros. Además, estas células, que no son leucemogénicas por sí solas, adquieren características de células leucémicas, con capacidad de autorrenovación, permeabilidad e invasividad exacerbadas en presencia del protooncogén HOXA9, que es igualmente incapaz de transformar por sí mismo progenitores primarios. Finalmente, mostramos que genes directamente y fundamentalmente implicados en la regulación del ciclo celular, son dianas directas de GATA-1 y su expresión sufre un cambio diametralmente opuesto en presencia de GATA-1s.

### **GATA-1s estimula específicamente la proliferación de progenitores megacariocíticos.**

En primer lugar, hemos determinado que la expresión de GATA-1s en progenitores hematopoyéticos de médula ósea de ratón adulto es suficiente para desencadenar una respuesta hiperproliferativa, que se acompaña, en cultivos líquidos, de la aparición de acúmulos celulares clonales característicos. El análisis inmunofenotípico demuestra que la ventaja proliferativa afecta preferentemente a progenitores eritro-megacariocíticos, MEPs, que sufren una alteración en su capacidad de diferenciación, ya que se ve potenciada significativamente la vía megacariocítica. Estos resultados concuerdan con los ya publicados donde se demuestra que el dominio amino terminal de GATA-1 regula la proliferación megacariocítica en hígado fetal (Kuhl et al., 2005; Muntean and Crispino, 2005).

Por el contrario, el análisis de la vía eritroide, que parte asimismo de los MEPs, y en cuya diferenciación también es clave GATA-1, indica que la forma truncada de GATA-1 tiene el efecto opuesto. De esta manera, los progenitores que expresan la isoforma

GATA-1s presentan una menor preferencia para diferenciar hacia precursores eritroides (expresores de TER-119), y además, una muy menor, aunque no ausente, capacidad clonogénica eritropoyética. Esta alteración en el balance eritro-megacariocítico concuerda con las evidencias publicadas acerca de trastornos mieloproliferativos transitorios provocados por la isoforma GATA-1s, que preceden a leucemias megacarioblásticas agudas, y en los cuales, a pesar de la desregulación proliferativa del linaje megacariocítico no hay una pérdida total de la producción de células eritroides. Por el contrario, los animales nulos para el gen *Gata-1* mueren por anemia severa (Fujiwara et al., 1996), lo que indica que GATA-1s mantiene la capacidad de inducir diferenciación eritroide, aunque mermada con respecto a la forma silvestre y en claro contraste con el sesgo hacia linaje megacariocítico.

Aunque pueda parecer chocante por el gran número de estudios dedicados a este factor, a día de hoy no están aclarados los mecanismos concretos de actuación de GATA-1, ni en qué funciones celulares actúa. GATA-1 fue descrito inicialmente por su implicación en determinación a linaje (Kulesa et al., 1995; Visvader et al., 1995). Nuestros resultados sugieren fuertemente que GATA-1 actúa en estadios tempranos de la jerarquía hematopoyética, siendo una población progenitora inmadura la que hiperprolifera y se autorenewa por la acción de GATA-1s. Estos datos son consistentes con estudios de ganancia y pérdida de función de la forma silvestre, en modelos animales, descritos en la introducción, donde se demuestra un papel clave de GATA-1 en la hematopoyesis primitiva (Ghinassi et al., 2007). Un ejemplo de ello es la implicación de GATA-1 en la bifurcación entre las poblaciones progenitoras CMP-CLP, en ratones GATA-1.0.5, que solo expresan un 5% de los niveles de *Gata-1*, capaces de desarrollar tanto leucemias mieloides como leucemias de células B (Shimizu et al., 2004a).

Aunque solo comunicado por un laboratorio hasta el momento, se ha extendido la idea de que GATA-1s tiene un efecto exclusivo sobre progenitores fetales, siendo los progenitores de médula ósea adulta insensibles a su sobreexpresión (Li et al., 2005). El mismo grupo ha publicado que la médula ósea de ratones en los cuales un alelo del gen de *Gata-1* ha sido sustituido por su isoforma mutada, no muestra anomalías en la hematopoyesis adulta, lo que les lleva a concluir que los trastornos fetales debidos a la expresión de la forma mutada de GATA-1s desaparecen con el nacimiento. Frente a estas



observaciones, nuestros resultados indican que la sobreexpresión de GATA-1s tiene un efecto dominante sobre el potencial de proliferación/diferenciación de células progenitoras de médula ósea de ratón adulto. En concordancia con nuestras evidencias, se ha descrito recientemente la existencia de una familia de origen brasileño que sufre una mutación en el exón 2 de *GATA-1*, que permite la producción exclusiva de *GATA-1s* (Holland et al., 2006). Dichos individuos tienen afectado el linaje eritroide, (sufriendo en ocasiones anemia severa) y producen de manera hiperproliferativa megacariocitos que presentan una morfología alterada. Estos datos claramente apoyan nuestros resultados, indicando que la expresión de GATA-1s puede provocar una alteración en el linaje eritroide y megacariocítico que se manifiesta y se mantiene durante la edad adulta.

**La elección hacia vía eritrocítica depende de la actividad antiproliferativa que confiere el dominio amino terminal de GATA-1 o en su defecto, una baja tasa proliferativa.**

Otra aportación reciente es la descripción por el grupo de Chretien en 2009 de la existencia de un motivo LX(C/S)XE localizado en el dominio amino terminal de GATA-1 que es requerido para la interacción de la proteína con pRb y E2F-2. Los autores proponen que dicha interacción puede ser la responsable del fenotipo antiproliferativo de GATA-1 (Kadri et al., 2009). En este trabajo hemos analizado el efecto de este dominio sobre la acción de la forma mutante GATA-1s, que tiene truncado dicho motivo (la segunda X es la Metionina iniciadora de esta forma truncada), demostrando que las células que expresan GATA-1s+RBD sufren una reducción de la ventaja proliferativa, que se acompaña, sorprendentemente, de una disminución de la expresión del marcador megacariocítico CD41, si bien el número de células megacariocíticas permanece significativamente aumentado respecto a las células control.

Por otra parte, el análisis comparativo de la sobreexpresión de GATA-1s, GATA-1<sub>wt</sub> y una isoforma de ésta última incapaz de unir pRb (GATA-1<sub>wt</sub>+RBD<sup>Mut</sup>) (Kadri et al., 2009) muestra la importancia del dominio amino terminal de GATA-1, ya que la abolición de la interacción con Rb/E2F no es suficiente para contrarrestar el efecto inhibitorio sobre proliferación, de lo que se deduce que el dominio N-terminal es esencial para mantener la baja tasa proliferativa que confiere GATA-1. Igualmente, el hecho de no encontrar

cambios significativos en el balance de diferenciación a linaje eritroide y megacariocítico entre GATA-1<sub>wt</sub> y la isoforma con el dominio RBD mutado, nos lleva a concluir que el motivo LX(C/S)XE resulta dispensable en presencia del dominio amino terminal de GATA-1. Nuestros resultados parecen contradecir los descritos en el trabajo de Chretien, en el que muestran que GATA-1<sub>wt</sub>+RBD<sup>Mut</sup> no es capaz de rescatar *in vivo* el fenotipo letal embrionario del mutante GATA-1.05, por anemia severa, y que sí rescata la forma silvestre. Una posible explicación podría estar en los diferentes niveles de expresión del mutante, probablemente muy superiores en nuestro sistema que los que se alcanzan *in vivo*. Así, se ha demostrado *in vivo* que la variabilidad de acción de GATA-1 y su isoformas mutadas es directamente dependiente de sus niveles de expresión (Shimizu et al., 2001).

Sorprendentemente, el dato más llamativo de nuestro trabajo en relación con el estudio de los dominios funcionales de GATA-1, ha sido el aumento significativo de la diferenciación eritroide de las células que expresan la forma mutante GATA-1s+RBD que, a diferencia de GATA-1s, no conduce a los progenitores a la hiperproliferación. Estas observaciones nos llevaron a formular una hipótesis: ¿es posible que la velocidad de proliferación intrínseca de un progenitor bipotencial pueda influir en la elección de linaje?. En otras palabras, nos preguntamos si es posible que diferentes subpoblaciones de MEPs, diferencien hacia el linaje eritrocítico o megacariocítico en función de sus respectivas tasas proliferativas y por tanto sean especialmente sensibles a cambios en los requerimientos del sistema. Nuestros datos apoyan esta hipótesis, ya que, al frenar la proliferación con estrategias que no introducen cambios de ganancia o pérdida de función de GATA-1s, como son disminución de la temperatura (con subsiguiente reducción de actividades enzimáticas), o disponibilidad de factores de crecimiento (por menor concentración de suero en el medio), los progenitores que expresan GATA-1s ven incrementada su capacidad de generar células eritrocíticas. A falta de un mecanismo preciso, nuestros resultados muestran una clara correlación entre la reducción de los niveles proliferativos y el incremento en el potencial de diferenciación eritroide en la población celular que expresa la isoforma GATA-1s. Una posible explicación a estos resultados la podemos encontrar en una publicación reciente (Sanchez et al., 2006), en la que se demuestra que bajo condiciones de estrés eritropoyético agudo (por inducción de la apoptosis de eritrocitos circulantes) o crónico (por expresión reducida de GATA-1) que lleva a disminución de la producción eritroide, el potencial de diferenciación dual de los

progenitores eritromegacariocíticos se modula específicamente. Así, existiendo un grado de plasticidad para dar lugar a una u otra población celular en función únicamente de la tasa proliferativa, los MEPs (y pudiera ser que otros progenitores bipotenciales) podrían atender, sin tener que configurar programas transcripcionales, a requerimientos de mayor eritro o megacariopoyesis. En este sentido, nuestro sistema celular podría representar una aproximación experimental de este modelo de respuesta diferenciativa dirigida por la tasa proliferativa celular.

En última instancia, la respuesta mostrada por las células que sobreexpresan GATA-1s ante situaciones que alteran la tasa proliferativa (cambios en la temperatura, las concentraciones de suero o presencia del domino LX(C/S)XE, y por tanto reminiscente a las respuestas proliferativas a diferentes situaciones de estrés celular, podrían también explicar datos publicados recientes que demuestran que los niños con síndrome de Down que padecen leucemia megacarioblástica aguda debida a la expresión de GATA-1s, responden mejor a la administración de algunos agentes quimioterapéuticos como la arabinósido de citosina (Ge et al., 2005). Sin embargo, es necesario evaluar la capacidad de respuesta de la forma silvestre GATA-1<sub>wt</sub> ante dichas situaciones extraordinarias para poder respaldar esta hipótesis.

En conjunto, todas estas evidencias nos llevan a proponer que el mecanismo de acción de GATA-1 como factor determinante de la diferenciación eritro-megacariocítica tiene como principal actor la maquinaria de ciclo celular.

### **GATA-1s actúa preferentemente como represor de inhibidores de la proliferación que son dianas transcripcionales de GATA-1.**

Nuestros datos derivados del análisis comparativo del patrón de expresión de genes en células que expresan GATA-1s y/o GATA-1<sub>wt</sub> sugieren que la forma truncada provoca predominantemente una alteración de la expresión de genes asociados a regulación de ciclo celular más que a genes prototípicamente hematopoyéticos.

La reducción de los niveles de expresión de genes descritos como dianas de GATA-1 (como por ejemplo ciclinas D1 y A1, o *Cdkn2a*) es consistente con el menor potencial de transactivación descrito para GATA-1s (Calligaris et al., 1995). Un ejemplo adicional de ello es *Prm1*, gen que codifica para la isoforma alfa del receptor del

Tromboxano A2 humano (TXA2). El TXA2 juega un papel central en hemostasia, actuando como un potente mediador de la vasoconstricción y agregación plaquetaria (Narumiya et al., 1999) y por tanto es un gen que debe expresarse en megacariocitos. Alteraciones en los niveles del receptor de TXA2 alfa han sido asociadas con variedad de desórdenes vasculares (Hirsh et al., 1981) y estudios recientes demuestran la unión *in vivo* e *in vitro* de GATA-1 a secuencias activadoras del promotor de *Prm1* (Gannon and Kinsella, 2008). Además, la combinación de GATA-1 con factores como NF-E2 y ETS-1 (factores transcripcionales prototípicamente megacariocíticos) parece jugar un papel crucial en la regulación de la actividad de *Prm1* y expresión de TXA2 alfa durante diferentes estadios de diferenciación megacariocítica y maduración plaquetaria (Gannon and Kinsella, 2008).

También se ha descrito que GATA-1 estimula la actividad del promotor de la subunidades alpha (Feng et al., 1998) y beta (Feng et al., 2000) del gen de la Inhibina en células de testículo de rata y ratón respectivamente. Nuestro análisis de expresión génica muestra la represión que GATA-1s ejerce sobre la expresión de dichos genes, lo cual apoya de nuevo el papel de interferencia de la acción de GATA-1 por parte de la proteína truncada.

Uno de las aportaciones más interesantes de esta tesis es la evidencia de una posible nueva diana de GATA-1 en ciclo celular, Schlafen-1. Este gen, *Slfn1*, aunque bajo mucha controversia, ha sido descrito principalmente por su papel antiproliferativo (Schwarz et al., 1998; Zhang et al., 2008). La expresión ectópica de *Slfn1* en fibroblastos de ratón provoca una inhibición del crecimiento celular así como un arresto del ciclo celular en fase G1, aparentemente por represión de la expresión de ciclina D1 (Brady et al., 2005; Geserick et al., 2004; Schwarz et al., 1998). Sin embargo, esta actividad antiproliferativa no es compartida por todos los genes de la familia *Slfn* (Geserick et al., 2004; Lee et al., 2008) y no ha sido confirmada por otros estudios, incapaces de reproducir dichos resultados (Zhao et al., 2008).

En este trabajo demostramos que Schlafen-1 es una diana directa de GATA-1, y sugerimos que puede ser responsable de parte de su potencial antiproliferativo. De acuerdo con esto, el fenotipo hiperproliferativo provocado por la isoforma GATA-1s podría ser

causado, al menos en parte, por la inadecuada activación de Schlafen-1. Coincidiría, además, con los resultados discutidos anteriormente y relativos al potencial antiproliferativo de GATA-1, que no parece ser únicamente debido a la presencia del motivo de unión a Rb, LX(C/S)XE (Kadri et al., 2009). Por otra parte, nuestros resultados son consistentes con los datos obtenidos del análisis por secuenciación masiva de cromatina inmunoprecipitada (*chIP-sequencing*) con un anticuerpo anti-GATA-1 en células eritroides de ratón, donde se demuestra la ocupación del promotor de Schlafen-1 por GATA-1 (Fujiwara et al., 2009).

Por otra parte, nuestros resultados confirman, como previamente habían sugerido trabajos previos del laboratorio (Bermejo et al., 2002; Vilaboa et al., 2004), que *CDC6* es una diana directa de GATA-1, y que puede ser diferencialmente modulada: muy probablemente por E2F en ciclos mitóticos, o por GATA-1 (y GATA-1s) en ciclos endomitóticos, dependiendo del contexto celular en el que se encuentre (en este caso megacarioblastos o megacariocitos). Esta dicotomía de acción de GATA-1 es consistente con los datos publicados por Muntean y colaboradores en 2007 donde se demuestra que ciclina D1 es sólo sensible a la acción de GATA-1 en megacariocitos (Muntean et al., 2007). De acuerdo con estas evidencias, demostramos que la región 5'UTR de *CDC6*, que contiene un motivo E2box/GATA, con actividad amplificadora de la transcripción en megacariocitos, actúa igualmente como activador de la transcripción en células no hematopoyéticas como son las HEK-293T. Este efecto sorprendente de un factor de expresión específica y restringida al linaje eritro-megacariocítico como GATA-1, sobre un regulador esencial de ciclo celular como *CDC6* en las células HEK-293T es reminiscente a su capacidad para estimular la expresión de genes eritroides en células HeLa (epiteliales de cervix, (Layon et al., 2007)), contexto igual de alejado del hematopoyético que el que hemos utilizado en este trabajo (células de riñón embrionario).

Interesantemente, la expresión ectópica de GATA-1s, que se une *in vivo* a la secuencia activadora de *CDC6* en las células HEK-293T, no induce la expresión endógena de dicho gen de la misma manera que la forma silvestre. En línea con nuestros resultados, el análisis de datos obtenidos de un estudio de *chIP-Sequencing* demuestra la ocupación por parte de GATA-1 del promotor de *CDC6* en una línea celular eritro leucémica de ratón (Yu et al., 2009).

Estos resultados sugieren, de nuevo, que GATA-1 controla no solo la expresión de genes específicos de linaje eritro-megacariocítico, sino también, y quizás de manera muy predominante, la de factores implicados en el control del ciclo celular. Se puede incluso especular que el papel central de GATA-1 es el de modular distintas tasas proliferativas en diferentes etapas de determinación, establecimiento y maduración terminal de los MEPs y su progenie. Se podría extender esta función a otros miembros de la familia GATA, en aquellos linajes en los que muestran un papel específico. Así, GATA-2, implicado en la regulación de los estadios hematopoyéticos tempranos (Tsai et al., 1994), y requerido para la supervivencia y proliferación celular de los progenitores (Tsai and Orkin, 1997), pero no de precursores comprometidos (p.e. eritroblastos o megacarioblastos) podría ser responsable directo del control del estatus proliferativo de los mismos. Igualmente, GATA-3, presente en linfocitos T maduros e inmaduros y células embrionarias de cerebro (Yamamoto et al., 1990) podría tener un papel similar en estas células. Curiosamente, HAN, homólogo de GATA-3 en *Arabidopsis thaliana*, está implicada en el control de la proliferación y la diferenciación celular, y su expresión ectópica genera retardo en el crecimiento y patrones de división celular aberrantes (Zhao et al., 2004).

Otro grupo de genes cuya expresión se ve alterada en los progenitores que expresan GATA-1s son los relacionados con leucemias. El gen de la Nucleoplasmina 2 (*NPM2*), cuya expresión está disminuída en las células GATA-1s, se encuentra frecuentemente metilado en líneas celulares leucémicas así como en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) (Kroeger et al., 2008). Estudios recientes demuestran la existencia de mutaciones en la familia de genes NPM en 35% de los casos de LMA (Quentmeier et al., 2005). Igualmente observamos una reducción de la expresión de genes como *Blnk* (SLP65) tras la sobreexpresión de la isoforma mutada GATA-1s. *Blnk* (SLP65) ha sido recientemente identificado como un supresor tumoral, cuya pérdida de expresión esta relacionada con el desarrollo de leucemia linfoblástica aguda en ratón (Imai et al., 2004; Nakayama et al., 2009), aunque su mecanismo de acción se desconoce a día de hoy. También observamos un aumento significativo de expresión de *Cks1b*, que junto con observaciones recientes que muestran una relación directa entre sobreexpresión de *CKS1B* con un mal pronóstico en pacientes con mieloma múltiple (MM) (Zhan et al., 2007), podrían indicar un papel de este inhibidor de p27kip1 en neoplasias hematopoyéticas.

Finalmente, otro gen con expresión aumentada en los progenitores hiperproliferativos que expresan GATA-1s es Pescadillo (*Pes1*). Este gen, esencial en desarrollo (Allende et al., 1996) y con un papel en biogénesis del ribosoma y síntesis de ADN (Oeffinger et al., 2002) ha sido implicado en proliferación celular, transformación oncogénica y progresión tumoral (Maiorana et al., 2004), acciones probablemente relacionadas con las alteraciones del ciclo celular que provoca en células murinas mieloides (Prisco et al., 2004).

En resumen, el repertorio de genes cuya expresión se ve alterada por presencia de GATA-1s en progenitores megacariocíticos es compatible con una acción transcripcional coordinada de represión de genes inhibidores de la proliferación, y no tanto de activación de genes potenciadores, que podría ser no causa, sino consecuencia de la hiperproliferación.

### **GATA-1s promueve la sensibilización y transformación de los progenitores megacariocíticos a posteriores lesiones leucemogénicas.**

Como ya ha quedado dicho anteriormente, la expresión de GATA-1s está asociada al desarrollo de trastornos mieloproliferativos transitorios y posterior progresión a leucemia megacarioblástica aguda en niños con síndrome de Down (Wechsler et al., 2002). Esta estrecha relación entre presencia de GATA-1s y progresión tumoral, ha llevado a la hipótesis de que, junto con el efecto sobre proliferación y diferenciación celular, esta isoforma pueda estar incrementando la predisposición de progenitores eritromegacariocíticos a acumular mutaciones secundarias en un proceso de leucemogénesis

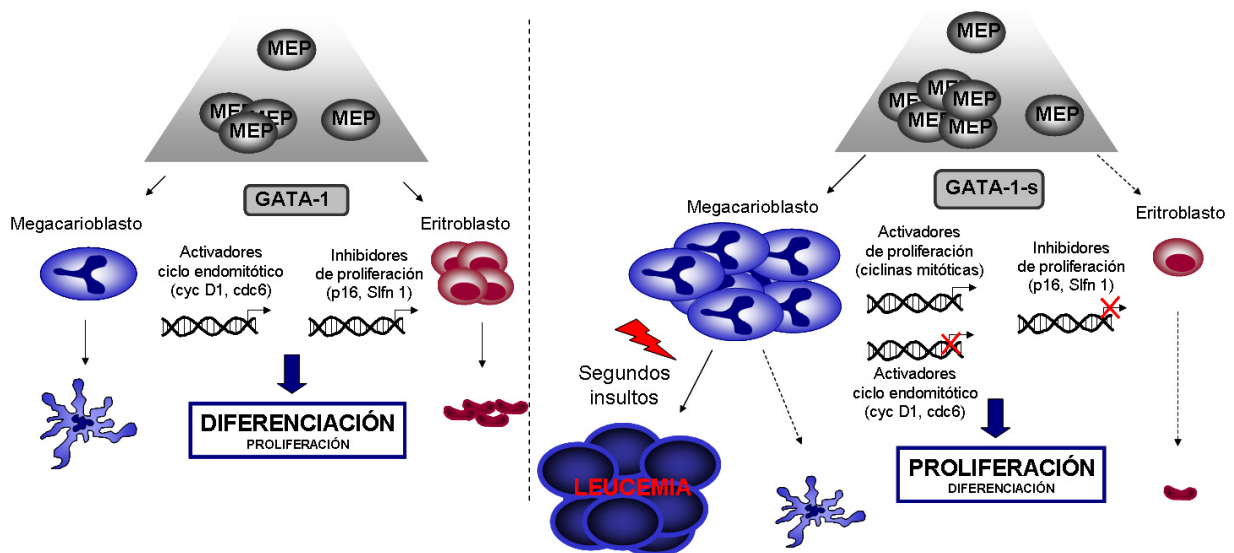
Nuestros resultados son consistentes con estas observaciones, ya que hemos podido establecer que HOXA9, cuya expresión se encuentra aumentada en un número importante de leucemias humanas (Bach et al.; Lawrence et al., 1996; Mullighan et al., 2007; Quentmeier et al., 2004; Rozovskaia et al., 2001) provoca la inmortalización de las células que expresan GATA-1s, a diferencia de las células control. Así, la combinación HOXA9-GATA-1s provoca un aumento significativo del potencial de proliferación y renovación celular en ensayos clonogénicos. Igualmente, se distinguen cambios morfológicos, como el aumento de tamaño y la elevada compactación de las colonias, características

reminiscentes de un fenotipo leucémico. El sinergismo, descrito entre HOXA9 y MEIS1 en transformación leucémica (Nakamura et al., 1996b; Thorsteinsdottir et al., 2001) también se ve reflejado en nuestros resultados, ya que la capacidad de renovación de las colonias GATA-1s, que expresan ambos cofactores y, a diferencia de las control, se ve igualmente potenciada. Interesantemente, hemos podido determinar que la mayor proliferación y autorenovación de las células GATA-1s que sobreexpresan el cofactor HOXA9 se acompaña de un aumento altamente significativo de sus capacidades migratorias e invasivas. Como cabía esperar, la triple expresión GATA-1s-HOXA9-MEIS1 confirma dichos resultados.

Estudios recientes evidencian el papel de diversas metaloproteasas en la contribución al proceso de angiogénesis durante el desarrollo de leucemias agudas (Handsley and Edwards, 2005; Klein et al., 2004). La elevada expresión de MMP-2 y MMP-9 en líneas leucémicas linfoblásticas ha sido directamente relacionada con su capacidad de invasión y metástasis (Hendrix et al., 1992; Ivanoff et al., 1999). Aunque la implicación de dichas metaloproteasas en el curso clínico de las leucemias mieloides agudas no está totalmente aclarada a día de hoy, el aumento de expresión de MMP-2 que observamos en las células que sobreexpresan GATA-1s y HOXA9 podría ser indicativo de un mayor grado de transformación de estos progenitores. Por otra parte, está en concordancia con la evidencia de que la capacidad de invasión *in vitro* de blastos procedentes de LMA depende directamente del aumento de expresión de los niveles de dicha metaloproteasa (Sawicki et al., 1998). Estudios de expresión de MMP-9 dan resultados contradictorios que conciernen sus niveles celulares y su significado en el potencial pronóstico (Klein et al., 2004; Kuitinen et al., 1999; Lin et al., 2002; Ries and Petrides, 1995). Así, se han encontrado altos niveles de expresión MMP-9 en pacientes con LMA, mientras que en otros, la expresión de dicha metaloproteasa presenta mayores niveles en médula ósea de pacientes sanos (Janowska-Wieczorek et al., 1999). Nuestros datos son preliminares y se hace necesario investigar no sólo la expresión de dichas metaloproteasas, sino los niveles secretadas al medio así como la cantidad de forma activa presente, pero sugieren que la contribución de GATA-1s y HOXA9 puede suponer un paso importante a la progresión leucémica.



A pesar de estos resultados y de la inmortalización celular causada por la sobreexpresión conjunta de GATA-1s con los factores HOXA9 y/o MEIS1 *in vitro*, no hemos observado desarrollo de leucemias en animales que han sido trasplantados con estas células, al menos hasta el momento (6 meses) (datos no mostrados). El escaso número de células utilizadas en cada trasplante podría ser una de las causas directas de la falta de fenotipo, pero también es posible que una pobre capacidad de *homing* de las células trasplantadas les impida colonizar médula ósea y por consiguiente encontrar el nicho donde desarrollarse. En este sentido, es importante resaltar la ausencia de capacidad leucemogénica en trasplantes de progenitores fetales transformados con GATA-1 (Stankiewicz and Crispino, 2009).



**Figura 35. Modelo de acción de GATA-1 y GATA-1s en progenitores eritro-megacariocíticos.**  
 La figura representa los mecanismos de acción de GATA-1 y GATA-1s.

En resumen, el trabajo descrito en esta tesis aporta nuevos datos sobre el papel que ejerce la proteína GATA-1, así como los estadios hematopoyéticos sobre los que actúa. El análisis funcional de su isoforma mutante GATA-1s, nos aporta una nueva luz sobre la implicación de la proteína en las decisiones de elección de linaje que comprometen el destino celular, así como de su control directo sobre la maquinaria del ciclo celular. El aumento de las capacidades proliferativa, migratoria e invasiva en respuesta a la sobreexpresión de GATA-1s, aporta nuevas evidencias del papel leucemogénico de dicha isoforma.



## *Conclusiones*

---



1. La sobreexpresión de la isoforma truncada GATA-1s en progenitores hematopoyéticos de médula ósea de ratón adulto, induce un aumento de la tasa proliferativa y la aparición de acúmulos celulares clonales.
2. GATA-1s es responsable de la hiperproliferación de progenitores eritromegacariocíticos MEPs, y de un sesgado potencial de diferenciación megacariocítico.
3. El papel antiproliferativo de GATA-1 reside fundamentalmente en el dominio amino terminal y no únicamente en el dominio RBD de unión a la proteína de Retinoblastoma, pRb.
4. La disminución de la tasa proliferativa de progenitores eritromegacariocíticos, en presencia de GATA-1s, promueve una mayor desviación hacia la vía eritropoyética.
5. GATA-1 activa, posiblemente de manera selectiva, la expresión de reguladores del ciclo celular: activadores como ciclina D1 y *Cdc6*, e inhibidores entre los que se encuentra el gen antiproliferativo *Schlafen 1*.
6. La expresión de GATA-1s sensibiliza a los progenitores hematopoyéticos a posteriores lesiones oncogénicas débiles, (por ejemplo la sobreexpresión de HOXA9) con aumento de la capacidad de autorenovación, migración e invasividad.



## ***Bibliografía***

---





- Adams, G.B., and Scadden, D.T. (2006). The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol* 7, 333-337.
- Adolfsson, J., Borge, O.J., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Astrand-Grundstrom, I., Sitnicka, E., Sasaki, Y., and Jacobsen, S.E. (2001). Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* 15, 659-669.
- Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A., *et al.* (2005). Identification of Flt3+ lymphomyeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121, 295-306.
- Ahmed, M., Sternberg, A., Hall, G., Thomas, A., Smith, O., O'Marcaigh, A., Wynn, R., Stevens, R., Addison, M., King, D., *et al.* (2004). Natural history of GATA1 mutations in Down syndrome. *Blood* 103, 2480-2489.
- Akashi, K., Traver, D., Kondo, M., and Weissman, I.L. (1999). Lymphoid development from hematopoietic stem cells. *Int J Hematol* 69, 217-226.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
- Al-Kasim, F., Doyle, J.J., Massey, G.V., Weinstein, H.J., and Zipursky, A. (2002). Incidence and treatment of potentially lethal diseases in transient leukemia of Down syndrome: Pediatric Oncology Group Study. *J Pediatr Hematol Oncol* 24, 9-13.
- Allende, M.L., Amsterdam, A., Becker, T., Kawakami, K., Gaiano, N., and Hopkins, N. (1996). Insertional mutagenesis in zebrafish identifies two novel genes, pescadillo and dead eye, essential for embryonic development. *Genes Dev* 10, 3141-3155.
- Anguita, E., Hughes, J., Heyworth, C., Blobel, G.A., Wood, W.G., and Higgs, D.R. (2004). Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. *EMBO J* 23, 2841-2852.
- Arai, F., Hirao, A., and Suda, T. (2005). Regulation of hematopoiesis and its interaction with stem cell niches. *Int J Hematol* 82, 371-376.
- Bach, C., Buhl, S., Mueller, D., Garcia-Cuellar, M.P., Maethner, E., and Slany, R.K. Leukemogenic transformation by HOXA cluster genes. *Blood* 115, 2910-2918.
- Baldus, C.D., Liyanarachchi, S., Mrozek, K., Auer, H., Tanner, S.M., Guimond, M., Ruppert, A.S., Mohamed, N., Davuluri, R.V., Caligiuri, M.A., *et al.* (2004). Acute myeloid leukemia with complex karyotypes and abnormal chromosome 21: Amplification discloses overexpression of APP, ETS2, and ERG genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3915-3920.

- Bash, R.O., Hall, S., Timmons, C.F., Crist, W.M., Amylon, M., Smith, R.G., and Baer, R. (1995). Does activation of the TAL1 gene occur in a majority of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia? A pediatric oncology group study. *Blood* 86, 666-676.
- Bermejo, R., Vilaboa, N., and Cales, C. (2002). Regulation of CDC6, geminin, and CDT1 in human cells that undergo polyploidization. *Mol Biol Cell* 13, 3989-4000.
- Bertrand, J.Y., Desanti, G.E., Lo-Man, R., Leclerc, C., Cumano, A., and Golub, R. (2006). Fetal spleen stroma drives macrophage commitment. *Development* 133, 3619-3628.
- Blobel, G.A., Nakajima, T., Eckner, R., Montminy, M., and Orkin, S.H. (1998). CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2061-2066.
- Blobel, G.A., Simon, M.C., and Orkin, S.H. (1995). Rescue of GATA-1-deficient embryonic stem cells by heterologous GATA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 15, 626-633.
- Bose, F., Fugazza, C., Casalgrandi, M., Capelli, A., Cunningham, J.M., Zhao, Q., Jane, S.M., Ottolenghi, S., and Ronchi, A. (2006). Functional interaction of CP2 with GATA-1 in the regulation of erythroid promoters. *Mol Cell Biol* 26, 3942-3954.
- Boyes, J., Byfield, P., Nakatani, Y., and Ogryzko, V. (1998). Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* 396, 594-598.
- Bradford, G.B., Williams, B., Rossi, R., and Bertoncello, I. (1997). Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp Hematol* 25, 445-453.
- Brady, G., Boggan, L., Bowie, A., and O'Neill, L.A. (2005). Schlafen-1 causes a cell cycle arrest by inhibiting induction of cyclin D1. *J Biol Chem* 280, 30723-30734.
- Bruno, L., Hoffmann, R., McBlane, F., Brown, J., Gupta, R., Joshi, C., Pearson, S., Seidl, T., Heyworth, C., and Enver, T. (2004). Molecular signatures of self-renewal, differentiation, and lineage choice in multipotential hemopoietic progenitor cells in vitro. *Mol Cell Biol* 24, 741-756.
- Calligaris, R., Bottardi, S., Cogoi, S., Apezteguia, I., and Santoro, C. (1995). Alternative translation initiation site usage results in two functionally distinct forms of the GATA-1 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11598-11602.
- Cameron, E.R., and Neil, J.C. (2004). The Runx genes: lineage-specific oncogenes and tumor suppressors. *Oncogene* 23, 4308-4314.
- Cantor, A.B. (2005). GATA transcription factors in hematologic disease. *Int J Hematol* 81, 378-384.

- Cantor, A.B., Katz, S.G., and Orkin, S.H. (2002). Distinct domains of the GATA-1 cofactor FOG-1 differentially influence erythroid versus megakaryocytic maturation. *Mol Cell Biol* 22, 4268-4279.
- Cantor, A.B., and Orkin, S.H. (2001). Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev* 11, 513-519.
- Carlesso, N., and Cardoso, A.A. Stem cell regulatory niches and their role in normal and malignant hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 17, 281-286.
- Collavin, L., Gostissa, M., Avolio, F., Secco, P., Ronchi, A., Santoro, C., and Del Sal, G. (2004). Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8870-8875.
- Cortes, M., Wong, E., Koipally, J., and Georgopoulos, K. (1999). Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. *Curr Opin Immunol* 11, 167-171.
- Cottam, D.W., Rennie, I.G., Woods, K., Parsons, M.A., Bunning, R.A., and Rees, R.C. (1992). Gelatinolytic metalloproteinase secretion patterns in ocular melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 1923-1927.
- Creutzig, U., Ritter, J., Vormoor, J., Ludwig, W.D., Niemeyer, C., Reinisch, I., Stollmann-Gibbels, B., Zimmermann, M., and Harbott, J. (1996). Myelodysplasia and acute myelogenous leukemia in Down's syndrome. A report of 40 children of the AML-BFM Study Group. *Leukemia* 10, 1677-1686.
- Crispino, J.D. (2005). GATA1 mutations in Down syndrome: implications for biology and diagnosis of children with transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 44, 40-44.
- Crispino, J.D., Lodish, M.B., MacKay, J.P., and Orkin, S.H. (1999). Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex. *Mol Cell* 3, 219-228.
- Crossley, M., Merika, M., and Orkin, S.H. (1995). Self-association of the erythroid transcription factor GATA-1 mediated by its zinc finger domains. *Mol Cell Biol* 15, 2448-2456.
- Crossley, M., and Orkin, S.H. (1994). Phosphorylation of the erythroid transcription factor GATA-1. *J Biol Chem* 269, 16589-16596.
- Cullen, M.E., and Patient, R.K. (1997). GATA-1 DNA binding activity is down-regulated in late S phase in erythroid cells. *J Biol Chem* 272, 2464-2469.

Cumano, A., Dieterlen-Lievre, F., and Godin, I. (1996). Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86, 907-916.

Cumano, A., and Godin, I. (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol* 25, 745-785.

Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P., and Bernstein, A. (1988). The proto-oncogene *c-kit* encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse *W* locus. *Nature* 335, 88-89.

Chang, A.N., Cantor, A.B., Fujiwara, Y., Lodish, M.B., Droho, S., Crispino, J.D., and Orkin, S.H. (2002). GATA-factor dependence of the multitype zinc-finger protein FOG-1 for its essential role in megakaryopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9237-9242.

Cheshier, S.H., Morrison, S.J., Liao, X., and Weissman, I.L. (1999). In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3120-3125.

Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J.C., and Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125, 725-732.

Christensen, J.L., and Weissman, I.L. (2001). Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14541-14546.

D'Angelo, V., Crisci, S., Casale, F., Addeo, R., Giuliano, M., Pota, E., Finsinger, P., Baldi, A., Rondelli, R., Abbruzzese, A., *et al.* (2009). High Erk-1 activation and Gadd45a expression as prognostic markers in high risk pediatric haemolymphoproliferative diseases. *J Exp Clin Cancer Res* 28, 39.

Davis, J.N., Williams, B.J., Herron, J.T., Galiano, F.J., and Meyers, S. (1999). ETO-2, a new member of the ETO-family of nuclear proteins. *Oncogene* 18, 1375-1383.

de Bruijn, M.F., Peeters, M.C., Luteijn, T., Visser, P., Speck, N.A., and Dzierzak, E. (2000). CFU-S(11) activity does not localize solely with the aorta in the aorta-gonad-mesonephros region. *Blood* 96, 2902-2904.

DeKoter, R.P., and Singh, H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288, 1439-1441.

Dick, J.E., Magli, M.C., Huszar, D., Phillips, R.A., and Bernstein, A. (1985). Introduction of a selectable gene into primitive stem cells capable of long-term reconstitution of the hemopoietic system of W/W<sup>v</sup> mice. *Cell* 42, 71-79.

- Dubart, A., Romeo, P.H., Vainchenker, W., and Dumenil, D. (1996). Constitutive expression of GATA-1 interferes with the cell-cycle regulation. *Blood* 87, 3711-3721.
- Elagib, K.E., Racke, F.K., Mogass, M., Khetawat, R., Delehanty, L.L., and Goldfarb, A.N. (2003). RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood* 101, 4333-4341.
- Elefanty, A.G., Antoniou, M., Custodio, N., Carmo-Fonseca, M., and Grosveld, F.G. (1996). GATA transcription factors associate with a novel class of nuclear bodies in erythroblasts and megakaryocytes. *EMBO J* 15, 319-333.
- Ema, H., and Nakauchi, H. (2000). Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood* 95, 2284-2288.
- Eskra, L., Mathison, A., and Splitter, G. (2003). Microarray analysis of mRNA levels from RAW264.7 macrophages infected with *Brucella abortus*. *Infect Immun* 71, 1125-1133.
- Evans, T., Reitman, M., and Felsenfeld, G. (1988). An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5976-5980.
- Feng, Z.M., Wu, A.Z., and Chen, C.L. (1998). Testicular GATA-1 factor up-regulates the promoter activity of rat inhibin alpha-subunit gene in MA-10 Leydig tumor cells. *Mol Endocrinol* 12, 378-390.
- Feng, Z.M., Wu, A.Z., Zhang, Z., and Chen, C.L. (2000). GATA-1 and GATA-4 transactivate inhibin/activin beta-B-subunit gene transcription in testicular cells. *Mol Endocrinol* 14, 1820-1835.
- Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M., and Philipsen, S. (2005). GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 25, 1215-1227.
- Forsberg, E.C., Prohaska, S.S., Katzman, S., Heffner, G.C., Stuart, J.M., and Weissman, I.L. (2005). Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells. *PLoS Genet* 1, e28.
- Forsberg, E.C., Serwold, T., Kogan, S., Weissman, I.L., and Passegue, E. (2006). New evidence supporting megakaryocyte-erythrocyte potential of flk2/flt3+ multipotent hematopoietic progenitors. *Cell* 126, 415-426.
- Fox, A.H., Kowalski, K., King, G.F., Mackay, J.P., and Crossley, M. (1998). Key residues characteristic of GATA N-fingers are recognized by FOG. *J Biol Chem* 273, 33595-33603.
- Freson, K., Matthijs, G., Thys, C., Marien, P., Hoylaerts, M.F., Vermylen, J., and Van Geet, C. (2002). Different substitutions at residue D218 of the X-linked transcription factor

GATA1 lead to altered clinical severity of macrothrombocytopenia and anemia and are associated with variable skewed X inactivation. *Hum Mol Genet* 11, 147-152.

Fujiwara, T., O'Geen, H., Keles, S., Blahnik, K., Linnemann, A.K., Kang, Y.A., Choi, K., Farnham, P.J., and Bresnick, E.H. (2009). Discovering hematopoietic mechanisms through genome-wide analysis of GATA factor chromatin occupancy. *Mol Cell* 36, 667-681.

Fujiwara, Y., Browne, C.P., Cunniff, K., Goff, S.C., and Orkin, S.H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12355-12358.

Gamou, T., Kitamura, E., Hosoda, F., Shimizu, K., Shinohara, K., Hayashi, Y., Nagase, T., Yokoyama, Y., and Ohki, M. (1998). The partner gene of AML1 in t(16;21) myeloid malignancies is a novel member of the MTG8(ETO) family. *Blood* 91, 4028-4037.

Gannon, A.M., and Kinsella, B.T. (2008). Regulation of the human thromboxane A2 receptor gene by Sp1, Egr1, NF-E2, GATA-1, and Ets-1 in megakaryocytes. *J Lipid Res* 49, 2590-2604.

Ge, Y., Stout, M.L., Tatman, D.A., Jensen, T.L., Buck, S., Thomas, R.L., Ravindranath, Y., Matherly, L.H., and Taub, J.W. (2005). GATA1, cytidine deaminase, and the high cure rate of Down syndrome children with acute megakaryocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 97, 226-231.

Geissler, E.N., Ryan, M.A., and Housman, D.E. (1988). The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 55, 185-192.

Geserick, P., Kaiser, F., Klemm, U., Kaufmann, S.H., and Zerrahn, J. (2004). Modulation of T cell development and activation by novel members of the Schlafen (slfn) gene family harbouring an RNA helicase-like motif. *Int Immunol* 16, 1535-1548.

Ghinassi, B., Sanchez, M., Martelli, F., Amabile, G., Vannucchi, A.M., Migliaccio, G., Orkin, S.H., and Migliaccio, A.R. (2007). The hypomorphic Gata1<sup>low</sup> mutation alters the proliferation/differentiation potential of the common megakaryocytic-erythroid progenitor. *Blood* 109, 1460-1471.

Goardon, N., Lambert, J.A., Rodriguez, P., Nissaire, P., Herblot, S., Thibault, P., Dumenil, D., Strouboulis, J., Romeo, P.H., and Hoang, T. (2006). ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *EMBO J* 25, 357-366.

Godin, I., Garcia-Porrero, J.A., Dieterlen-Lievre, F., and Cumano, A. (1999). Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites. *J Exp Med* 190, 43-52.

Gohji, K., Fujimoto, N., Hara, I., Fujii, A., Gotoh, A., Okada, H., Arakawa, S., Kitazawa, S., Miyake, H., Kamidono, S., *et al.* (1998). Serum matrix metalloproteinase-2 and its

density in men with prostate cancer as a new predictor of disease extension. *Int J Cancer* 79, 96-101.

Gregory, R.C., Taxman, D.J., Seshasayee, D., Kensinger, M.H., Bieker, J.J., and Wojchowski, D.M. (1996). Functional interaction of GATA1 with erythroid Kruppel-like factor and Sp1 at defined erythroid promoters. *Blood* 87, 1793-1801.

Groet, J., McElwaine, S., Spinelli, M., Rinaldi, A., Burtscher, I., Mulligan, C., Mensah, A., Cavani, S., Dagna-Bricarelli, F., Basso, G., *et al.* (2003). Acquired mutations in GATA1 in neonates with Down's syndrome with transient myeloid disorder. *Lancet* 361, 1617-1620.

Guyot, B., Valverde-Garduno, V., Porcher, C., and Vyas, P. (2004). Deletion of the major GATA1 enhancer HS 1 does not affect eosinophil GATA1 expression and eosinophil differentiation. *Blood* 104, 89-91.

Halsey, C., Tunstall, O., Gibson, B., Roberts, I., and Graham, G. Role of GATA-1s in early hematopoiesis and differences between alternative splicing in human and murine GATA-1. *Blood* 115, 3415-3416.

Handsley, M.M., and Edwards, D.R. (2005). Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 115, 849-860.

Hannon, R., Evans, T., Felsenfeld, G., and Gould, H. (1991). Structure and promoter activity of the gene for the erythroid transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3004-3008.

Harigae, H., Takahashi, S., Suwabe, N., Ohtsu, H., Gu, L., Yang, Z., Tsai, F.Y., Kitamura, Y., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1998). Differential roles of GATA-1 and GATA-2 in growth and differentiation of mast cells. *Genes Cells* 3, 39-50.

Harrison, D.E., Astle, C.M., and Lerner, C. (1988). Number and continuous proliferative pattern of transplanted primitive immunohematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 822-826.

Hateboer, G., Wobst, A., Petersen, B.O., Le Cam, L., Vigo, E., Sardet, C., and Helin, K. (1998). Cell cycle-regulated expression of mammalian CDC6 is dependent on E2F. *Mol Cell Biol* 18, 6679-6697.

Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Grogan, T.M., Seftor, R.E., Hersh, E.M., Boyse, E.A., Liotta, L.A., Stetler-Stevenson, W., and Ray, C.G. (1992). Expression of type IV collagenase correlates with the invasion of human lymphoblastoid cell lines and pathogenesis in SCID mice. *Mol Cell Probes* 6, 59-65.

Hernandez-Hernandez, A., Ray, P., Litos, G., Ciro, M., Ottolenghi, S., Beug, H., and Boyes, J. (2006). Acetylation and MAPK phosphorylation cooperate to regulate the degradation of active GATA-1. *EMBO J* 25, 3264-3274.



Hirsh, P.D., Hillis, L.D., Campbell, W.B., Firth, B.G., and Willerson, J.T. (1981). Release of prostaglandins and thromboxane into the coronary circulation in patients with ischemic heart disease. *N Engl J Med* 304, 685-691.

Hitzler, J.K., Cheung, J., Li, Y., Scherer, S.W., and Zipursky, A. (2003). GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood* 101, 4301-4304.

Hollanda, L.M., Lima, C.S., Cunha, A.F., Albuquerque, D.M., Vassallo, J., Ozelo, M.C., Joazeiro, P.P., Saad, S.T., and Costa, F.F. (2006). An inherited mutation leading to production of only the short isoform of GATA-1 is associated with impaired erythropoiesis. *Nat Genet* 38, 807-812.

Hong, W., Nakazawa, M., Chen, Y.Y., Kori, R., Vakoc, C.R., Rakowski, C., and Blobel, G.A. (2005). FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1. *EMBO J* 24, 2367-2378.

Hope, K.J., Jin, L., and Dick, J.E. (2003). Human acute myeloid leukemia stem cells. *Arch Med Res* 34, 507-514.

Hu, M., Krause, D., Greaves, M., Sharkis, S., Dexter, M., Heyworth, C., and Enver, T. (1997). Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev* 11, 774-785.

Huber, T.L., Kouskoff, V., Fehling, H.J., Palis, J., and Keller, G. (2004). Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* 432, 625-630.

Hung, H.L., Lau, J., Kim, A.Y., Weiss, M.J., and Blobel, G.A. (1999). CREB-Binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA-1 at functionally important sites. *Mol Cell Biol* 19, 3496-3505.

Ikuta, K., and Weissman, I.L. (1992). Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1502-1506.

Imai, C., Ross, M.E., Reid, G., Coustan-Smith, E., Schultz, K.R., Pui, C.H., Downing, J.R., and Campana, D. (2004). Expression of the adaptor protein BLNK/SLP-65 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18, 922-925.

Ito, E., Toki, T., Ishihara, H., Ohtani, H., Gu, L., Yokoyama, M., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1993). Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis. *Nature* 362, 466-468.

Ivanoff, A., Ivanoff, J., Hultenby, K., and Sundqvist, K.G. (1999). Infiltrative capacity of T leukemia cell lines: a distinct functional property coupled to expression of matrix



metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). *Clin Exp Metastasis* *17*, 695-711.

Iwasaki, H., Mizuno, S., Wells, R.A., Cantor, A.B., Watanabe, S., and Akashi, K. (2003). GATA-1 converts lymphoid and myelomonocytic progenitors into the megakaryocyte/erythrocyte lineages. *Immunity* *19*, 451-462.

Janowska-Wieczorek, A., Marquez, L.A., Matsuzaki, A., Hashmi, H.R., Larratt, L.M., Boshkov, L.M., Turner, A.R., Zhang, M.C., Edwards, D.R., and Kossakowska, A.E. (1999). Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and -2) in acute myelogenous leukaemia blasts: comparison with normal bone marrow cells. *Br J Haematol* *105*, 402-411.

Jordan, C.T. (2002). Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* *16*, 559-562.

Kadam, S., and Emerson, B.M. (2003). Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol Cell* *11*, 377-389.

Kadri, Z., Maouche-Chretien, L., Rooke, H.M., Orkin, S.H., Romeo, P.H., Mayeux, P., Leboulch, P., and Chretien, S. (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt induced by erythropoietin renders the erythroid differentiation factor GATA-1 competent for TIMP-1 gene transactivation. *Mol Cell Biol* *25*, 7412-7422.

Kadri, Z., Shimizu, R., Ohneda, O., Maouche-Chretien, L., Gisselbrecht, S., Yamamoto, M., Romeo, P.H., Leboulch, P., and Chretien, S. (2009). Direct binding of pRb/E2F-2 to GATA-1 regulates maturation and terminal cell division during erythropoiesis. *PLoS Biol* *7*, e1000123.

Keller, G., and Snodgrass, R. (1990). Life span of multipotential hematopoietic stem cells in vivo. *J Exp Med* *171*, 1407-1418.

Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* *121*, 1109-1121.

Kim, I., He, S., Yilmaz, O.H., Kiel, M.J., and Morrison, S.J. (2006). Enhanced purification of fetal liver hematopoietic stem cells using SLAM family receptors. *Blood* *108*, 737-744.

Kinoshita, Y., Jarell, A.D., Flaman, J.M., Foltz, G., Schuster, J., Sopher, B.L., Irvin, D.K., Kanning, K., Kornblum, H.I., Nelson, P.S., *et al.* (2001). Pescadillo, a novel cell cycle regulatory protein abnormally expressed in malignant cells. *J Biol Chem* *276*, 6656-6665.

Klein, G., Vellenga, E., Fraaije, M.W., Kamps, W.A., and de Bont, E.S. (2004). The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* *50*, 87-100.

- Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* *91*, 661-672.
- Kroeger, H., Jelinek, J., Estecio, M.R., He, R., Kondo, K., Chung, W., Zhang, L., Shen, L., Kantarjian, H.M., Bueso-Ramos, C.E., *et al.* (2008). Aberrant CpG island methylation in acute myeloid leukemia is accentuated at relapse. *Blood* *112*, 1366-1373.
- Kroon, E., Kros, J., Thorsteinsdottir, U., Baban, S., Buchberg, A.M., and Sauvageau, G. (1998). Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO J* *17*, 3714-3725.
- Kudla, B., Caddick, M.X., Langdon, T., Martinez-Rossi, N.M., Bennett, C.F., Sibley, S., Davies, R.W., and Arst, H.N., Jr. (1990). The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *EMBO J* *9*, 1355-1364.
- Kuhl, C., Atzberger, A., Iborra, F., Nieswandt, B., Porcher, C., and Vyas, P. (2005). GATA1-mediated megakaryocyte differentiation and growth control can be uncoupled and mapped to different domains in GATA1. *Mol Cell Biol* *25*, 8592-8606.
- Kuittinen, O., Savolainen, E.R., Koistinen, P., and Turpeenniemi-Hujanen, T. (1999). Gelatinase A and B (MMP-2, MMP-9) in leukaemia MMP-2 may indicate a good prognosis in AML. *Anticancer Res* *19*, 4395-4400.
- Kulesa, H., Frampton, J., and Graf, T. (1995). GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats. *Genes Dev* *9*, 1250-1262.
- Kumaravelu, P., Hook, L., Morrison, A.M., Ure, J., Zhao, S., Zuyev, S., Ansell, J., and Medvinsky, A. (2002). Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development* *129*, 4891-4899.
- Kuter, D.J. (1996). Thrombopoietin: biology, clinical applications, role in the donor setting. *J Clin Apher* *11*, 149-159.
- Lahlil, R., Lecuyer, E., Herblot, S., and Hoang, T. (2004). SCL assembles a multifactorial complex that determines glycoprotein A expression. *Mol Cell Biol* *24*, 1439-1452.
- Lancrin, C., Sroczynska, P., Serrano, A.G., Gandillet, A., Ferreras, C., Kouskoff, V., and Lacaud, G. Blood cell generation from the hemangioblast. *J Mol Med* *88*, 167-172.
- Lange, B. (2000). The management of neoplastic disorders of haematopoiesis in children with Down's syndrome. *Br J Haematol* *110*, 512-524.

- Lange, B.J., Kobrinsky, N., Barnard, D.R., Arthur, D.C., Buckley, J.D., Howells, W.B., Gold, S., Sanders, J., Neudorf, S., Smith, F.O., *et al.* (1998). Distinctive demography, biology, and outcome of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children with Down syndrome: Children's Cancer Group Studies 2861 and 2891. *Blood* *91*, 608-615.
- Lawrence, H.J., Sauvageau, G., Humphries, R.K., and Largman, C. (1996). The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* *14*, 281-291.
- Layon, M.E., Ackley, C.J., West, R.J., and Lowrey, C.H. (2007). Expression of GATA-1 in a non-hematopoietic cell line induces beta-globin locus control region chromatin structure remodeling and an erythroid pattern of gene expression. *J Mol Biol* *366*, 737-744.
- Lee, N.K., Choi, H.K., Yoo, H.J., Shin, J., and Lee, S.Y. (2008). RANKL-induced *schlafen2* is a positive regulator of osteoclastogenesis. *Cell Signal* *20*, 2302-2308.
- Lele, K.M., and Wolgemuth, D.J. (2004). Distinct regions of the mouse cyclin A1 gene, *Ccnal*, confer male germ-cell specific expression and enhancer function. *Biol Reprod* *71*, 1340-1347.
- Lemischka, I.R., Raullet, D.H., and Mulligan, R.C. (1986). Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* *45*, 917-927.
- Leonard, M., Brice, M., Engel, J.D., and Papayannopoulou, T. (1993). Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation. *Blood* *82*, 1071-1079.
- Li, Z., Godinho, F.J., Klusmann, J.H., Garriga-Canut, M., Yu, C., and Orkin, S.H. (2005). Developmental stage-selective effect of somatically mutated leukemogenic transcription factor GATA1. *Nat Genet* *37*, 613-619.
- Lin, L.I., Lin, D.T., Chang, C.J., Lee, C.Y., Tang, J.L., and Tien, H.F. (2002). Marrow matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMP in acute leukaemia: potential role of MMP-9 as a surrogate marker to monitor leukaemic status in patients with acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* *117*, 835-841.
- Lowry, J.A., and Atchley, W.R. (2000). Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *J Mol Evol* *50*, 103-115.
- Lyons, S.E., Lawson, N.D., Lei, L., Bennett, P.E., Weinstein, B.M., and Liu, P.P. (2002). A nonsense mutation in zebrafish *gata1* causes the bloodless phenotype in vlad tepes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 5454-5459.
- Maciejewski, J.P., and Risitano, A. (2003). Hematopoietic stem cells in aplastic anemia. *Arch Med Res* *34*, 520-527.

- Maiorana, A., Tu, X., Cheng, G., and Baserga, R. (2004). Role of p53 in the transformation and immortalization of mammalian cells. *Oncogene* 23, 7116-7124.
- Mansson, R., Hultquist, A., Luc, S., Yang, L., Anderson, K., Kharazi, S., Al-Hashmi, S., Liuba, K., Thoren, L., Adolfsson, J., *et al.* (2007). Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. *Immunity* 26, 407-419.
- Martin, D.I., and Orkin, S.H. (1990). Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev* 4, 1886-1898.
- Mayani, H. (1996). Composition and function of the hemopoietic microenvironment in human myeloid leukemia. *Leukemia* 10, 1041-1047.
- Mayani, H., Guilbert, L.J., and Janowska-Wieczorek, A. (1992). Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 49, 225-233.
- McCarty, N., Shinohara, M.L., Lu, L., and Cantor, H. (2004). Detailed analysis of gene expression during development of T cell lineages in the thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9339-9344.
- McDevitt, M.A., Fujiwara, Y., Shivdasani, R.A., and Orkin, S.H. (1997a). An upstream, DNase I hypersensitive region of the hematopoietic-expressed transcription factor GATA-1 gene confers developmental specificity in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7976-7981.
- McDevitt, M.A., Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., Yang, H., and Orkin, S.H. (1997b). A "knockdown" mutation created by cis-element gene targeting reveals the dependence of erythroid cell maturation on the level of transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6781-6785.
- McElwaine, S., Mulligan, C., Groet, J., Spinelli, M., Rinaldi, A., Denyer, G., Mensah, A., Cavani, S., Baldo, C., Dagna-Bricarelli, F., *et al.* (2004). Microarray transcript profiling distinguishes the transient from the acute type of megakaryoblastic leukaemia (M7) in Down's syndrome, revealing PRAME as a specific discriminating marker. *Br J Haematol* 125, 729-742.
- Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897-906.
- Meier, N., Krpic, S., Rodriguez, P., Strouboulis, J., Monti, M., Krijgsveld, J., Gering, M., Patient, R., Hostert, A., and Grosfeld, F. (2006). Novel binding partners of Ldb1 are required for haematopoietic development. *Development* 133, 4913-4923.

- Merika, M., and Orkin, S.H. (1995). Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol Cell Biol* *15*, 2437-2447.
- Metcalf, D. (1970). Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow cells. II. Action of colony stimulating factor. *J Cell Physiol* *76*, 89-99.
- Metcalf, D. (1991). Lineage commitment of hemopoietic progenitor cells in developing blast cell colonies: influence of colony-stimulating factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 11310-11314.
- Metcalf, D. (1998). Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation. *Blood* *92*, 345-347; discussion 352.
- Metcalf, D., and Nicola, N.A. (1991). Direct proliferative actions of stem cell factor on murine bone marrow cells in vitro: effects of combination with colony-stimulating factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 6239-6243.
- Mikkola, H.K., Klintman, J., Yang, H., Hock, H., Schlaeger, T.M., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (2003). Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature* *421*, 547-551.
- Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2003). To T or not to T: reassessing the common lymphoid progenitor. *Nat Immunol* *4*, 100-101.
- Montesinos, J.J., and Mayani, H. (2002). [New concepts in the biology of acute myeloid leukemia]. *Gac Med Mex* *138*, 67-76.
- Morceau, F., Schnekenburger, M., Dicato, M., and Diederich, M. (2004). GATA-1: friends, brothers, and coworkers. *Ann N Y Acad Sci* *1030*, 537-554.
- Morrison, S.J., Shah, N.M., and Anderson, D.J. (1997a). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* *88*, 287-298.
- Morrison, S.J., Uchida, N., and Weissman, I.L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* *11*, 35-71.
- Morrison, S.J., Wandycz, A.M., Hemmati, H.D., Wright, D.E., and Weissman, I.L. (1997b). Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* *124*, 1929-1939.
- Morrison, S.J., and Weissman, I.L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* *1*, 661-673.

- Muller, A.M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., and Dzierzak, E. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* *1*, 291-301.
- Mullighan, C.G., Kennedy, A., Zhou, X., Radtke, I., Phillips, L.A., Shurtleff, S.A., and Downing, J.R. (2007). Pediatric acute myeloid leukemia with NPM1 mutations is characterized by a gene expression profile with dysregulated HOX gene expression distinct from MLL-rearranged leukemias. *Leukemia* *21*, 2000-2009.
- Mundle, S.D. (2003). Lingering biologic dilemmas about the status of the progenitor cells in myelodysplasia. *Arch Med Res* *34*, 515-519.
- Mundschau, G., and Crispino, J. (2006). GATA1s goes germline. *Nat Genet* *38*, 741-742.
- Muntean, A.G., and Crispino, J.D. (2005). Differential requirements for the activation domain and FOG-interaction surface of GATA-1 in megakaryocyte gene expression and development. *Blood* *106*, 1223-1231.
- Muntean, A.G., Pang, L., Poncz, M., Dowdy, S.F., Blobel, G.A., and Crispino, J.D. (2007). Cyclin D-Cdk4 is regulated by GATA-1 and required for megakaryocyte growth and polyploidization. *Blood* *109*, 5199-5207.
- Nakamura, T., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (1996a). Identification of a new family of Pbx-related homeobox genes. *Oncogene* *13*, 2235-2242.
- Nakamura, T., Largaespada, D.A., Shaughnessy, J.D., Jr., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (1996b). Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukaemias. *Nat Genet* *12*, 149-153.
- Nakayama, J., Yamamoto, M., Hayashi, K., Satoh, H., Bundo, K., Kubo, M., Goitsuka, R., Farrar, M.A., and Kitamura, D. (2009). BLNK suppresses pre-B-cell leukemogenesis through inhibition of JAK3. *Blood* *113*, 1483-1492.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., and Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* *79*, 1193-1226.
- Nicolis, S., Bertini, C., Ronchi, A., Crotta, S., Lanfranco, L., Moroni, E., Giglioni, B., and Ottolenghi, S. (1991). An erythroid specific enhancer upstream to the gene encoding the cell-type specific transcription factor GATA-1. *Nucleic Acids Res* *19*, 5285-5291.
- Nichols, K.E., Crispino, J.D., Poncz, M., White, J.G., Orkin, S.H., Maris, J.M., and Weiss, M.J. (2000). Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet* *24*, 266-270.

- Nishikawa, K., Kobayashi, M., Masumi, A., Lyons, S.E., Weinstein, B.M., Liu, P.P., and Yamamoto, M. (2003). Self-association of Gata1 enhances transcriptional activity in vivo in zebra fish embryos. *Mol Cell Biol* 23, 8295-8305.
- Nishimura, S., Takahashi, S., Kuroha, T., Suwabe, N., Nagasawa, T., Trainor, C., and Yamamoto, M. (2000). A GATA box in the GATA-1 gene hematopoietic enhancer is a critical element in the network of GATA factors and sites that regulate this gene. *Mol Cell Biol* 20, 713-723.
- North, T., Gu, T.L., Stacy, T., Wang, Q., Howard, L., Binder, M., Marin-Padilla, M., and Speck, N.A. (1999). Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. *Development* 126, 2563-2575.
- Oeffinger, M., Leung, A., Lamond, A., and Tollervey, D. (2002). Yeast Pescadillo is required for multiple activities during 60S ribosomal subunit synthesis. *RNA* 8, 626-636.
- Ogawa, M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81, 2844-2853.
- Ogawa, M., Matsuzaki, Y., Nishikawa, S., Hayashi, S., Kunisada, T., Sudo, T., Kina, T., and Nakauchi, H. (1991). Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 174, 63-71.
- Ogawa, M., Nishikawa, S., Yoshinaga, K., Hayashi, S., Kunisada, T., Nakao, J., Kina, T., Sudo, T., and Kodama, H. (1993). Expression and function of c-Kit in fetal hemopoietic progenitor cells: transition from the early c-Kit-independent to the late c-Kit-dependent wave of hemopoiesis in the murine embryo. *Development* 117, 1089-1098.
- Oh, I.H., and Kwon, K.R. Concise review: multiple niches for hematopoietic stem cell regulations. *Stem Cells* 28, 1243-1249.
- Ohtani, K., Tsujimoto, A., Ikeda, M., and Nakamura, M. (1998). Regulation of cell growth-dependent expression of mammalian CDC6 gene by the cell cycle transcription factor E2F. *Oncogene* 17, 1777-1785.
- Okada, S., Nakauchi, H., Nagayoshi, K., Nishikawa, S., Miura, Y., and Suda, T. (1991). Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule. *Blood* 78, 1706-1712.
- Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S.W., Grosveld, G., and Downing, J.R. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84, 321-330.
- Orkin, S.H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 1, 57-64.



- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273, 242-245.
- Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., and Keller, G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126, 5073-5084.
- Palis, J., and Yoder, M.C. (2001). Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol* 29, 927-936.
- Papetti, M., Wontakal, S.N., Stopka, T., and Skoultschi, A.I. GATA-1 directly regulates p21 gene expression during erythroid differentiation. *Cell Cycle* 9.
- Patient, R.K., and McGhee, J.D. (2002). The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr Opin Genet Dev* 12, 416-422.
- Perkins, S., and Fleischman, R.A. (1988). Hematopoietic microenvironment. Origin, lineage, and transplantability of the stromal cells in long-term bone marrow cultures from chimeric mice. *J Clin Invest* 81, 1072-1080.
- Petzer, A.L., and Gunsilius, E. (2003). Hematopoietic stem cells in chronic myeloid leukemia. *Arch Med Res* 34, 496-506.
- Pevny, L., Lin, C.S., D'Agati, V., Simon, M.C., Orkin, S.H., and Costantini, F. (1995). Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* 121, 163-172.
- Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., D'Agati, V., Orkin, S.H., and Costantini, F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349, 257-260.
- Pineault, N., Buske, C., Feuring-Buske, M., Abramovich, C., Rosten, P., Hogge, D.E., Aplan, P.D., and Humphries, R.K. (2003). Induction of acute myeloid leukemia in mice by the human leukemia-specific fusion gene NUP98-HOXD13 in concert with Meis1. *Blood* 101, 4529-4538.
- Pineault, N., Helgason, C.D., Lawrence, H.J., and Humphries, R.K. (2002). Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Exp Hematol* 30, 49-57.
- Prisco, M., Maiorana, A., Guerzoni, C., Calin, G., Calabretta, B., Voit, R., Grummt, I., and Baserga, R. (2004). Role of pescadillo and upstream binding factor in the proliferation and differentiation of murine myeloid cells. *Mol Cell Biol* 24, 5421-5433.



- Qiu, J., Gunaratne, P., Peterson, L.E., Khurana, D., Walsham, N., Loulseged, H., Karni, R.J., Roussel, E., Gibbs, R.A., Margolin, J.F., *et al.* (2003). Novel potential ALL low-risk markers revealed by gene expression profiling with new high-throughput SSH-CCS-PCR. *Leukemia* 17, 1891-1900.
- Quentmeier, H., Dirks, W.G., Macleod, R.A., Reinhardt, J., Zaborski, M., and Drexler, H.G. (2004). Expression of HOX genes in acute leukemia cell lines with and without MLL translocations. *Leuk Lymphoma* 45, 567-574.
- Quentmeier, H., Martelli, M.P., Dirks, W.G., Bolli, N., Liso, A., Macleod, R.A., Nicoletti, I., Mannucci, R., Pucciarini, A., Bigerna, B., *et al.* (2005). Cell line OCI/AML3 bears exon-12 NPM gene mutation-A and cytoplasmic expression of nucleophosmin. *Leukemia* 19, 1760-1767.
- Rahn, W., Redline, R.W., and Blanchard, T.G. (2004). Molecular analysis of Helicobacter pylori-associated gastric inflammation in naive versus previously immunized mice. *Vaccine* 23, 807-818.
- Rainis, L., Bercovich, D., Strehl, S., Teigler-Schlegel, A., Stark, B., Trka, J., Amariglio, N., Biondi, A., Muler, I., Rechavi, G., *et al.* (2003). Mutations in exon 2 of GATA1 are early events in megakaryocytic malignancies associated with trisomy 21. *Blood* 102, 981-986.
- Ransom, D.G., Bahary, N., Niss, K., Traver, D., Burns, C., Trede, N.S., Paffett-Lugassy, N., Saganic, W.J., Lim, C.A., Hersey, C., *et al.* (2004). The zebrafish moonshine gene encodes transcriptional intermediary factor 1gamma, an essential regulator of hematopoiesis. *PLoS Biol* 2, E237.
- Rekhtman, N., Radparvar, F., Evans, T., and Skoultschi, A.I. (1999). Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev* 13, 1398-1411.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- Rieger, M.A., Smejkal, B.M., and Schroeder, T. (2009). Improved prospective identification of megakaryocyte-erythrocyte progenitor cells. *Br J Haematol* 144, 448-451.
- Ries, C., and Petrides, P.E. (1995). Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376, 345-355.
- Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Kolodziej, K.E., Guyot, B., Heck, A.J., Vyas, P., de Boer, E., Grosveld, F., and Strouboulis, J. (2005). GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *EMBO J* 24, 2354-2366.

Romeo, P.H., Prandini, M.H., Joulin, V., Mignotte, V., Prenant, M., Vainchenker, W., Marguerie, G., and Uzan, G. (1990). Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature* *344*, 447-449.

Rozovskaia, T., Feinstein, E., Mor, O., Foa, R., Blechman, J., Nakamura, T., Croce, C.M., Cimino, G., and Canaani, E. (2001). Upregulation of Meis1 and HoxA9 in acute lymphocytic leukemias with the t(4 : 11) abnormality. *Oncogene* *20*, 874-878.

Rylski, M., Welch, J.J., Chen, Y.Y., Letting, D.L., Diehl, J.A., Chodosh, L.A., Blobel, G.A., and Weiss, M.J. (2003). GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. *Mol Cell Biol* *23*, 5031-5042.

Sanchez, M., Weissman, I.L., Pallavicini, M., Valeri, M., Guglielmelli, P., Vannucchi, A.M., Migliaccio, G., and Migliaccio, A.R. (2006). Differential amplification of murine bipotent megakaryocytic/erythroid progenitor and precursor cells during recovery from acute and chronic erythroid stress. *Stem Cells* *24*, 337-348.

Sawicki, G., Matsuzaki, A., and Janowska-Wieczorek, A. (1998). Expression of the active form of MMP-2 on the surface of leukemic cells accounts for their in vitro invasion. *J Cancer Res Clin Oncol* *124*, 245-252.

Sawyers, C.L., Denny, C.T., and Witte, O.N. (1991). Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. *Cell* *64*, 337-350.

Schuh, A.H., Tipping, A.J., Clark, A.J., Hamlett, I., Guyot, B., Iborra, F.J., Rodriguez, P., Strouboulis, J., Enver, T., Vyas, P., *et al.* (2005). ETO-2 associates with SCL in erythroid cells and megakaryocytes and provides repressor functions in erythropoiesis. *Mol Cell Biol* *25*, 10235-10250.

Schwarz, D.A., Katayama, C.D., and Hedrick, S.M. (1998). Schlafen, a new family of growth regulatory genes that affect thymocyte development. *Immunity* *9*, 657-668.

Seshasayee, D., Gaines, P., and Wojchowski, D.M. (1998). GATA-1 dominantly activates a program of erythroid gene expression in factor-dependent myeloid FDCW2 cells. *Mol Cell Biol* *18*, 3278-3288.

Shimada, A., Xu, G., Toki, T., Kimura, H., Hayashi, Y., and Ito, E. (2004). Fetal origin of the GATA1 mutation in identical twins with transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. *Blood* *103*, 366.

Shimizu, R., Kuroha, T., Ohneda, O., Pan, X., Ohneda, K., Takahashi, S., Philipsen, S., and Yamamoto, M. (2004a). Leukemogenesis caused by incapacitated GATA-1 function. *Mol Cell Biol* *24*, 10814-10825.

- Shimizu, R., Ohneda, K., Engel, J.D., Trainor, C.D., and Yamamoto, M. (2004b). Transgenic rescue of GATA-1-deficient mice with GATA-1 lacking a FOG-1 association site phenocopies patients with X-linked thrombocytopenia. *Blood* *103*, 2560-2567.
- Shimizu, R., Takahashi, S., Ohneda, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (2001). In vivo requirements for GATA-1 functional domains during primitive and definitive erythropoiesis. *EMBO J* *20*, 5250-5260.
- Shivdasani, R.A. (1997). Stem cell transcription factors. *Hematol Oncol Clin North Am* *11*, 1199-1206.
- Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., McDevitt, M.A., and Orkin, S.H. (1997). A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J* *16*, 3965-3973.
- Shivdasani, R.A., Mayer, E.L., and Orkin, S.H. (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* *373*, 432-434.
- Sieweke, M.H., and Graf, T. (1998). A transcription factor party during blood cell differentiation. *Curr Opin Genet Dev* *8*, 545-551.
- Siminovitch, L., McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1963). The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol* *62*, 327-336.
- Sitwala, K.V., Dandekar, M.N., and Hess, J.L. (2008). HOX proteins and leukemia. *Int J Clin Exp Pathol* *1*, 461-474.
- Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* *241*, 58-62.
- Speck, N.A., and Gilliland, D.G. (2002). Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* *2*, 502-513.
- Spieth, J., Shim, Y.H., Lea, K., Conrad, R., and Blumenthal, T. (1991). *elt-1*, an embryonically expressed *Caenorhabditis elegans* gene homologous to the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol* *11*, 4651-4659.
- Sposi, N.M., Zon, L.I., Care, A., Valtieri, M., Testa, U., Gabbianelli, M., Mariani, G., Bottero, L., Mather, C., Orkin, S.H., *et al.* (1992). Cell cycle-dependent initiation and lineage-dependent abrogation of GATA-1 expression in pure differentiating hematopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 6353-6357.
- Stankiewicz, M.J., and Crispino, J.D. (2009). ETS2 and ERG promote megakaryopoiesis and synergize with alterations in GATA-1 to immortalize hematopoietic progenitor cells. *Blood* *113*, 3337-3347.

Starck, J., Cohet, N., Gonnet, C., Sarrazin, S., Doubeikovskaia, Z., Doubeikovski, A., Verger, A., Duterque-Coquillaud, M., and Morle, F. (2003). Functional cross-antagonism between transcription factors FLI-1 and EKLf. *Mol Cell Biol* 23, 1390-1402.

Stetler-Stevenson, W.G. (2001). The role of matrix metalloproteinases in tumor invasion, metastasis, and angiogenesis. *Surg Oncol Clin N Am* 10, 383-392, x.

Takahashi, S., Onodera, K., Motohashi, H., Suwabe, N., Hayashi, N., Yanai, N., Nabesima, Y., and Yamamoto, M. (1997). Arrest in primitive erythroid cell development caused by promoter-specific disruption of the GATA-1 gene. *J Biol Chem* 272, 12611-12615.

Tanaka, H., Matsumura, I., Nakajima, K., Daino, H., Sonoyama, J., Yoshida, H., Oritani, K., Machii, T., Yamamoto, M., Hirano, T., *et al.* (2000). GATA-1 blocks IL-6-induced macrophage differentiation and apoptosis through the sustained expression of cyclin D1 and bcl-2 in a murine myeloid cell line M1. *Blood* 95, 1264-1273.

Teakle, G.R., Manfield, I.W., Graham, J.F., and Gilmartin, P.M. (2002). Arabidopsis thaliana GATA factors: organisation, expression and DNA-binding characteristics. *Plant Mol Biol* 50, 43-57.

Teitell, M.A., and Mikkola, H.K. (2006). Transcriptional activators, repressors, and epigenetic modifiers controlling hematopoietic stem cell development. *Pediatr Res* 59, 33R-39R.

Thorsteinsdottir, U., Kroon, E., Jerome, L., Blasi, F., and Sauvageau, G. (2001). Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* 21, 224-234.

Till, J.E., and Mc, C.E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222.

Tober, J., Koniski, A., McGrath, K.E., Vemishetti, R., Emerson, R., de Mesy-Bentley, K.K., Waugh, R., and Palis, J. (2007). The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood* 109, 1433-1441.

Towatari, M., Ciro, M., Ottolenghi, S., Tsuzuki, S., and Enver, T. (2004). Involvement of mitogen-activated protein kinase in the cytokine-regulated phosphorylation of transcription factor GATA-1. *Hematol J* 5, 262-272.

Tsai, F.Y., Keller, G., Kuo, F.C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F.W., and Orkin, S.H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221-226.

Tsai, F.Y., and Orkin, S.H. (1997). Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* *89*, 3636-3643.

Tsai, S.F., Martin, D.I., Zon, L.I., D'Andrea, A.D., Wong, G.G., and Orkin, S.H. (1989). Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* *339*, 446-451.

Tsai, S.F., Strauss, E., and Orkin, S.H. (1991). Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes Dev* *5*, 919-931.

Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M.J., Crossley, M., and Orkin, S.H. (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* *90*, 109-119.

Valverde-Garduno, V., Guyot, B., Anguita, E., Hamlett, I., Porcher, C., and Vyas, P. (2004). Differences in the chromatin structure and cis-element organization of the human and mouse GATA1 loci: implications for cis-element identification. *Blood* *104*, 3106-3116.

Vilaboa, N., Bermejo, R., Martinez, P., Bornstein, R., and Cales, C. (2004). A novel E2 box-GATA element modulates Cdc6 transcription during human cells polyploidization. *Nucleic Acids Res* *32*, 6454-6467.

Visvader, J.E., Crossley, M., Hill, J., Orkin, S.H., and Adams, J.M. (1995). The C-terminal zinc finger of GATA-1 or GATA-2 is sufficient to induce megakaryocytic differentiation of an early myeloid cell line. *Mol Cell Biol* *15*, 634-641.

Visvader, J.E., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (1998). Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev* *12*, 473-479.

Vyas, P., Ault, K., Jackson, C.W., Orkin, S.H., and Shivdasani, R.A. (1999a). Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood* *93*, 2867-2875.

Vyas, P., and Crispino, J.D. (2007). Molecular insights into Down syndrome-associated leukemia. *Curr Opin Pediatr* *19*, 9-14.

Vyas, P., McDevitt, M.A., Cantor, A.B., Katz, S.G., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (1999b). Different sequence requirements for expression in erythroid and megakaryocytic cells within a regulatory element upstream of the GATA-1 gene. *Development* *126*, 2799-2811.

Wadman, I., Li, J., Bash, R.O., Forster, A., Osada, H., Rabbitts, T.H., and Baer, R. (1994). Specific in vivo association between the bHLH and LIM proteins implicated in human T cell leukemia. *EMBO J* 13, 4831-4839.

Wang, X., Crispino, J.D., Letting, D.L., Nakazawa, M., Poncz, M., and Blobel, G.A. (2002). Control of megakaryocyte-specific gene expression by GATA-1 and FOG-1: role of Ets transcription factors. *EMBO J* 21, 5225-5234.

Wechsler, J., Greene, M., McDevitt, M.A., Anastasi, J., Karp, J.E., Le Beau, M.M., and Crispino, J.D. (2002). Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet* 32, 148-152.

Weiss, M.J., and Orkin, S.H. (1995). Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9623-9627.

Weiss, M.J., Yu, C., and Orkin, S.H. (1997). Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol Cell Biol* 17, 1642-1651.

Whitelaw, E., Tsai, S.F., Hogben, P., and Orkin, S.H. (1990). Regulated expression of globin chains and the erythroid transcription factor GATA-1 during erythropoiesis in the developing mouse. *Mol Cell Biol* 10, 6596-6606.

Whyatt, D.J., deBoer, E., and Grosveld, F. (1993). The two zinc finger-like domains of GATA-1 have different DNA binding specificities. *EMBO J* 12, 4993-5005.

Whyatt, D.J., Karis, A., Harkes, I.C., Verkerk, A., Gillemans, N., Elefanty, A.G., Vairo, G., Ploemacher, R., Grosveld, F., and Philipsen, S. (1997). The level of the tissue-specific factor GATA-1 affects the cell-cycle machinery. *Genes Funct* 1, 11-24.

Xu, M.J., Matsuoka, S., Yang, F.C., Ebihara, Y., Manabe, A., Tanaka, R., Eguchi, M., Asano, S., Nakahata, T., and Tsuji, K. (2001). Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. *Blood* 97, 2016-2022.

Yamada, Y., Warren, A.J., Dobson, C., Forster, A., Pannell, R., and Rabbitts, T.H. (1998). The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3890-3895.

Yamamoto, M., Ko, L.J., Leonard, M.W., Beug, H., Orkin, S.H., and Engel, J.D. (1990). Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes Dev* 4, 1650-1662.

Yan, Z., DeGregori, J., Shohet, R., Leone, G., Stillman, B., Nevins, J.R., and Williams, R.S. (1998). Cdc6 is regulated by E2F and is essential for DNA replication in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3603-3608.

- Yang, H.Y., and Evans, T. (1992). Distinct roles for the two cGATA-1 finger domains. *Mol Cell Biol* 12, 4562-4570.
- Yu, C., Cantor, A.B., Yang, H., Browne, C., Wells, R.A., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (2002). Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *J Exp Med* 195, 1387-1395.
- Yu, M., Riva, L., Xie, H., Schindler, Y., Moran, T.B., Cheng, Y., Yu, D., Hardison, R., Weiss, M.J., Orkin, S.H., *et al.* (2009). Insights into GATA-1-mediated gene activation versus repression via genome-wide chromatin occupancy analysis. *Mol Cell* 36, 682-695.
- Zhan, F., Colla, S., Wu, X., Chen, B., Stewart, J.P., Kuehl, W.M., Barlogie, B., and Shaughnessy, J.D., Jr. (2007). CKS1B, overexpressed in aggressive disease, regulates multiple myeloma growth and survival through SKP2- and p27Kip1-dependent and -independent mechanisms. *Blood* 109, 4995-5001.
- Zhang, D.E., Zhang, P., Wang, N.D., Hetherington, C.J., Darlington, G.J., and Tenen, D.G. (1997). Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 569-574.
- Zhang, P., Zhang, X., Iwama, A., Yu, C., Smith, K.A., Mueller, B.U., Narravula, S., Torbett, B.E., Orkin, S.H., and Tenen, D.G. (2000). PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood* 96, 2641-2648.
- Zhang, Y., Yang, Z., Cao, Y., Zhang, S., Li, H., Huang, Y., Ding, Y.Q., and Liu, X. (2008). The Hsp40 family chaperone protein DnaJB6 enhances Schlafen1 nuclear localization which is critical for promotion of cell-cycle arrest in T-cells. *Biochem J* 413, 239-250.
- Zhao, L., Neumann, B., Murphy, K., Silke, J., and Gonda, T.J. (2008). Lack of reproducible growth inhibition by Schlafen1 and Schlafen2 in vitro. *Blood Cells Mol Dis* 41, 188-193.
- Zhao, Y., Medrano, L., Ohashi, K., Fletcher, J.C., Yu, H., Sakai, H., and Meyerowitz, E.M. (2004). HANABA TARANU is a GATA transcription factor that regulates shoot apical meristem and flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 2586-2600.
- Zhu, J., and Emerson, S.G. (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 21, 3295-3313.
- Zipursky, A. (2003). Transient leukaemia--a benign form of leukaemia in newborn infants with trisomy 21. *Br J Haematol* 120, 930-938.



Zon, L.I., Mather, C., Burgess, S., Bolce, M.E., Harland, R.M., and Orkin, S.H. (1991). Expression of GATA-binding proteins during embryonic development in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10642-10646.

Zon, L.I., Tsai, S.F., Burgess, S., Matsudaira, P., Bruns, G.A., and Orkin, S.H. (1990). The major human erythroid DNA-binding protein (GF-1): primary sequence and localization of the gene to the X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 668-672.

Zon, L.I., Yamaguchi, Y., Yee, K., Albee, E.A., Kimura, A., Bennett, J.C., Orkin, S.H., and Ackerman, S.J. (1993). Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood* 81, 3234-3241.